

Министерство науки и высшего образования

Вятский государственный университет

На правах рукописи

Коваль Екатерина Викторовна

**ВЛИЯНИЕ ЦИАНОБАКТЕРИЙ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ЯЧМЕНЯ В
УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТОЙ**

03.02.08 – экология (биология)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Огородникова Светлана Юрьевна,
кандидат биологических наук, доцент

Киров-2019

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В РАБОТЕ

БП – биопленки

ГЛ – глифосат

МДА – малоновый диальдегид

МФК – метилфосфоновая кислота

МФН – метилфосфонаты

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ЦБ – цианобактерии

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
Глава 1. Проблема химического загрязнения окружающей среды метилфосфонатами и их действие на живые организмы (обзор литературы)....	11
1.1. Химическое загрязнение окружающей среды ксенобиотиками.....	11
1.2. Фосфорорганические ксенобиотики – метилфосфонаты	12
1.2.1. Метилфосфоновая кислота.....	13
1.2.2. Глифосат.....	16
1.3. Биологическая деградация метилфосфонатов.....	21
1.4. Влияние поллютантов на жизнедеятельность растений.....	23
1.4.1. Стресс у растений	24
1.4.2. Ответные биохимические реакции растений на действие поллютантов	29
1.5. Цианобактерии и растительно-микробные комплексы в условиях химического загрязнения.....	34
1.5.1. Биология и экология цианобактерий.....	34
1.5.2. Механизмы устойчивости цианобактерий к загрязненной среде....	39
1.5.3. Особенности взаимодействия между высшими растениями и микроорганизмами.....	42
Глава 2. Объекты и методы исследования.....	47
2.1. Характеристика объектов исследования.....	47
2.2. Методика проведения опытов.....	50
2.3. Методики исследования.....	53
2.4. Статистическая обработка результатов исследований.....	55
Глава 3. Влияние метилфосфоновой кислоты и глифосата на показатели жизнедеятельности цианобактерий и многовидовых биопленок	57
3.1. Действие метилфосфоновой кислоты на альгологически чистые культуры цианобактерий и многовидовые биопленки с доминированием <i>Nostoc commune</i>	58
3.2. Влияние глифосата на альгологически чистые культуры цианобактерий и многовидовые биопленки с доминированием <i>Nostoc commune</i>	65
Выводы по главе 3.....	71
Глава 4. Изучение эффективности различных способов	

цианобактериальной обработки растений, выращенных в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой (водная культура)	72
4.1. Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерий, присутствующих в среде выращивания, на жизнедеятельность растений ячменя.....	73
4.2. Влияние цианобактериальной инокуляции семян при проращивании на жизнедеятельность растений, выращенных в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой	83
4.2.1. Влияние предпосевной инокуляции семян альгологически чистыми культурами цианобактерий на жизнедеятельность растений ячменя, выращен- ных в условиях загрязнения водной культуры метилфосфоновой кислотой...	84
4.2.2. Влияние предпосевной инокуляции семян природными биопленками цианобактерий с доминированием <i>Nostoc commune</i> на жизнедеятельность растений ячменя, выращенных в условиях загрязнения водной культуры метилфосфоновой кислотой.....	94
Выводы по главе 4	98
Глава 5. Влияние цианобактериальной инокуляции семян при проращивании на жизнедеятельность растений, выращенных в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой (песчаная культура)	100
5.1. Влияние предпосевной инокуляции семян альгологически чистыми культурами цианобактерий на жизнедеятельность растений ячменя, выращенных в условиях загрязнения песчаной культуры метилфосфоновой кислотой	100
5.2. Влияние предпосевной инокуляции семян биопленками цианобактерий с доминированием <i>Nostoc commune</i> на жизнедеятельность растений ячменя, выращенных в условиях загрязнения песчаной культуры метилфосфоновой кислотой.....	110
Выводы по главе 5.....	113
Заключение.....	114
Список литературы.....	116

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Серьезную опасность для биологических систем представляют ксенобиотики, которые поступают в природные среды и оказывают токсическое действие на живые организмы. Фосфорорганическими ксенобиотиками являются метилфосфонаты (МФН), к которым относятся метилфосфоновая кислота и глифосат. Благодаря наличию в составе молекулы связи С–Р, устойчивой к разрушению, МФН характеризуются повышенной персистентностью (Савельева и др., 2002). Источниками поступления МФН в окружающую среду служат объекты уничтожения фосфорсодержащих отравляющих веществ (Ашихмина, 2002), а также применение пестицидов на основе алкилфосфонатов (Жемчужин, 1985; Федке, 1985; Кузнецова, Чмил, 2010). Метилфосфоновая кислота (МФК) в малых концентрациях вызывает нарушение жизнедеятельности растений (Огородникова и др., 2004; Ионенко и др., 2005; Скоробогатова и др., 2005; Щербакова и др., 2005; Маслова и др., 2010; Аюшинова, 2015), животных (Савельева и др., 2002; Плотникова, 2012), почвенных микроорганизмов (Кондакова и др., 2005; Домрачева и др., 2008; Товстик, 2015). Поэтому очистка окружающей среды от избытка МФН относится к числу значимых экологических задач.

В первую очередь действию поллютантов подвергаются почвенные микроорганизмы и растения. В ответ на действие неблагоприятных факторов в живых клетках происходят биохимические изменения, что является информативным показателем их состояния. В стрессовых условиях в клетках в большем объеме образуются активные формы кислорода, что приводит к запуску антиоксидантной защиты. В условиях чрезмерной выработки активных форм кислорода, развивается окислительный стресс, происходит окисление макромолекул, нарушаются функции мембран, деградация белков и молекул пигментов (Пахомова, 2000; Лукаткин, 2002; Чиркова, 2002; Blokhina et al., 2003; Полесская, 2007). Физиолого-биохимические процессы растительных организмов являются чувствительными индикаторами состояния природных сред и могут

быть использованы при биологическом мониторинге (Колупаев, 2007; Прусаченко и др., 2010; Фокина и др., 2017).

Известно, что устойчивость растений к действию поллютантов повышается при микробной инокуляции семян (Трефилова, 2008). Микроорганизмы способны противостоять изменениям, происходящим в биосфере (Евдокимова, 2010). Ряд прокариот и низших эукариот способны гидролизовать С–Р связь (Quinn, 1989). Цианобактерии (ЦБ) могут приспосабливаться к различным неблагоприятным условиям благодаря особенностям строения и биохимическим процессам, позволяющим накапливать и обезвреживать различные поллютанты (Quintelas, Tavares, 2002; Morin et al., 2006; Choudhary et al., 2007; Yilmazer, Saracoglu, 2009; Ye et al., 2010). Ряд ЦБ проявляет устойчивость к фосфорорганическим токсикантам (Домрачева и др., 2008). Многие протекторные и ростстимулирующие свойства ЦБ применяются в растениеводстве (Трефилова, 2008). Преимущества при выживании в неблагоприятных условиях имеют растительно-цианобактериальные ассоциации. Цианобактерии способствуют не только повышению устойчивости растений к действию загрязнителей, но и удалением поллютантов из среды их обитания (Молекулярные основы..., 2005). В сельском и лесном хозяйстве используются цианобактериальные препараты для повышения биомассы и иммунитета растений (Пегушина, Трефилова, 2006; Домрачева и др., 2008). Цианобактерии *Nostoc muscorum*, *N. paludosum*, *N. linckia* устойчивы к тяжелым металлам, *N. commune* – к нефтепродуктам. Кроме того, ЦБ используются в качестве тест-объектов для оценки загрязнения окружающей среды (Фокина и др., 2017).

Цель исследований – оценка влияния цианобактерий и природных многовидовых биопленок на биохимические показатели и рост растений ячменя в условиях загрязнения среды метилфосфоновой кислотой.

Задачи исследований:

1. Изучить влияние метилфосфонатов (метилфосфоновой кислоты и глифосата) на жизнедеятельность цианобактерий *Nostoc muscorum* Ag., *N. paludosum* Kütz., *N. linckia* (Roth.) Born and Flah. и многовидовых биопленок с доминированием *N. commune* Vaucher ex Bornet & Flahault, определить наиболее чувствительные

биохимические показатели жизнедеятельности цианобактерий, перспективные в качестве тестов на действие метилфосфонатов.

2. Выявить наиболее устойчивые к действию метилфосфонатов виды цианобактерий на примере альгологически чистых культур *N. muscorum*, *N. paludosum*, *N. linckia* и природных биопленок с доминированием *N. commune*.

3. Изучить влияние цианобактериальной обработки семян культурами *N. muscorum*, *N. paludosum*, *N. linckia* и природными биопленками с доминированием *N. commune* на жизнедеятельность растений, выявить виды цианобактерий, повышающие устойчивость растений к действию метилфосфоновой кислоты.

4. Определить наиболее эффективный способ цианобактериальной обработки (внесение в субстрат выращивания, инокуляция семян при проращивании) для повышения устойчивости растений в условиях загрязнения среды выращивания метилфосфоновой кислотой.

Научная новизна. Впервые выявлены эффекты влияния МФК и глифосата (ГЛ) на содержание хлорофилла *a* и интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в клетках ЦБ. Показано, что под влиянием токсикантов происходит изменение концентрации хлорофилла *a* и малонового диальдегида (МДА) – продукта перекисного окисления липидов. Установлено, что более устойчивы к действию водных растворов МФН чистые культуры ЦБ, чем многовидовые биопленки с доминированием *N. commune*. Устойчивость цианобактерий к действию МФК и ГЛ снижается в ряду *N. linckia* – *N. muscorum* – *N. paludosum*. Многовидовые биопленки (БП) с доминированием *N. commune* крайне чувствительны к действию МФН, что проявилось в снижении хлорофилла *a* в культуре и росте количества МДА. Отмечено, что обработка семян ячменя ЦБ ингибирует активность процессов ПОЛ в растительных клетках, стимулирует работу антиоксидантной системы (накопление антоцианов и каротиноидов), а также оказывает ростостимулирующее действие на растения ячменя в условиях загрязнения среды МФК. Доказано, что наиболее эффективным способом цианобактериальной интродукции для повышения устойчивости растений в условиях загрязнения МФК, является инокуляция семян при проращивании. В опытах на водной культуре инокуляция семян многовидовыми БП с

доминированием *N. commune* наиболее эффективна, по сравнению с действием на растения альгологически чистых культур ЦБ. Это проявилось в снижении содержания МДА и стимуляции роста проростков на 20 – 40% от уровня контроля. В опытах на песке, напротив, обработка семян ячменя культурами цианобактерий оказывала большее протекторное действие на растения в условиях загрязнения МФК.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. По изменению биохимических показателей в клетках цианобактерий (содержание хлорофилла *a* и интенсивность процессов перекисного окисления липидов) наиболее устойчивыми к действию метилфосфоновой кислоты и глифосата являются альгологически чистые культуры цианобактерий, по сравнению с многовидовыми цианобактериальными биопленками. В ряду *Nostoc linckia* – *N. muscorum* – *N. paludosum* устойчивость к метилфосфонатам снижается. Многовидовые биопленки цианобактерий с доминированием *N. commune* наиболее чувствительны к действию метилфосфонатов.
2. Цианобактерии обладают фитопротекторными свойствами, что проявляется в снижении токсических эффектов метилфосфонатов на растения ячменя.
3. Для снижения фитотоксичности метилфосфоновой кислоты наиболее эффективной является цианобактериальная инокуляция семян ячменя при проращивании.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты исследований являются перспективными для разработки методов и биопрепарата для фиторекультивации почв, загрязненных МФН, основанных на повышении устойчивости растений к действию МФК (УМНИК, договор № 9858 ГУ2/2015 о предоставлении гранта Фондом содействия инновациям).

Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, внедрены в учебный процесс при разработке лекций по дисциплинам «Экологически опасные факторы» и «Техногенные системы и экологический риск» в Вятском государственном университете (акт внедрения №1 от 2019 года).

Апробация работы. Результаты исследований были представлены и обсуждены на конференциях: "II (X) Международная Ботаническая конференция молодых ученых" (Санкт-Петербург, 2012); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем" (Киров, 2012, 2014, 2015, 2016); XI Всероссийская научно-практическая конференция-выставка инновационных экологических проектов с международным участием "Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем" (Киров, 2013); Международной научной конференции "Физиология растений - теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий" (Калининград, 2014); Международная молодежная конференция "Экотоксикология-2014" (Тула, 2014); Всероссийская научно-практическая конференция "Экологические проблемы промышленных городов" (Саратов, 2015); Всероссийская научная конференция с международным участием "Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий" (Петрозаводск, 2015); II Международная научно-практическая конференция "Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах" (Киров, 2015); Всероссийская молодежная научная конференция "Актуальные проблемы биологии и экологии" (Сыктывкар, 2016); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Экология родного края: проблемы и пути решения" (Киров, 2016; 2017).

Личное участие автора. Автор принимала активное участие на всех этапах подготовки диссертационной работы: сборе и обобщении литературных источников по теме исследования, планировании экспериментов, разработке методики отдельных опытов, выполнении биохимических анализов, обработке полученных результатов, а также формулировке выводов, полученных в ходе исследования.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе – 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов и списка литературы. Работа содержит 147 страниц машинописного текста, включает 16 таблиц, 31 рисунок. Список цитируемой литературы включает 316 источников, в том числе 118 – на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ПРОБЛЕМА ХИМИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ МЕТИЛФОСФОНАТАМИ И ИХ ДЕЙСТВИЕ НА ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Химическое загрязнение окружающей среды ксенобиотиками

Хозяйственная деятельность человека неизбежно связана с использованием природных ресурсов, энергии и информации, которые являются материальной основой развития общества. Увеличение численности населения (от 1 млн в начале неолита до 7,7 млрд в настоящее время), а также рост производства, приводят к значительным изменениям биогенного круговорота веществ и оказывают сильное влияние на биосферу. Сегодня на каждого жителя планеты добывается около 20 т минерального сырья, которое с использованием 800 т свежей воды и 2,5 кВт энергии перерабатывается в продукты потребления и огромные массы отходов (Степановских, 2001; Бурков, 2005; Данилов-Данильян и др., 2005).

Опасные отходы и супертоксиканты представляют собой особую категорию поллютантов, которые зачастую являются ксенобиотиками – веществами, чуждыми для биосферы. Ежедневно на нашей планете производится 1 млн т опасных отходов (Медоуз и др., 2012).

В настоящее время в обороте находится от 50 до 100 тысяч синтетических веществ, причем в большинстве случаев их влияние на биоту неизвестно (Данилов-Данильян и др., 2005). Ксенобиотики вызывают изменения в составе и функционировании живых систем разного уровня организации, что обусловлено отсутствием механизмов их деградации (Лебедева, Анкудинова, 2002; Юрин, 2002).

К ксенобиотикам относятся полихлорированные ароматические углеводороды, бифенилы, фталаты, а также метилфосфонаты и пр. (Юрин, 2002). Большинство из них персистентны в окружающей среде, плохо поддаются химическому и биологическому разложению, и могут сохраняться длительное время в природе, встраиваясь в движение по трофическим цепям и проникая во все среды (Савельева и др., 2002; Данилов-Данильян и др., 2005).

На территории некоторых регионов встречаются специфические загрязнители, что связано с деятельностью техногенных объектов. В Кировской области таким объектом был объект хранения и уничтожения химического оружия «Марадыковский». В сентябре 2015 года объект прекратил свою работу в связи с полной ликвидацией боеприпасов. В результате деятельности подобных объектов в качестве продукта разложения фосфорсодержащих отравляющих веществ в окружающей среде могут появиться метилфосфоновая кислота и ее производные (Ашихмина, 2002). Кроме того, источником поступления метилфосфонатов в окружающую среду является сельское хозяйство, где активно применяются фосфорсодержащие гербициды, действующим веществом которых являются производные алкилфосфонатов.

1.2. Фосфорорганические ксенобиотики – метилфосфонаты

Среди химических загрязнителей наибольшую опасность для живых организмов и природных комплексов представляют ксенобиотики (Юрин, 2002). Фосфонаты и метилфосфонаты являются фосфорорганическими ксенобиотиками.

Первыми синтетическими фосфонатами были аминоксилы и аминокислоты (Hilderbrand, 1983). Метилфосфонаты имеют в своем составе углерод-фосфорную связь (C–P), устойчивую к окислению, фотолизу, гидролизу и термическому разложению (Corbridge, 2005). Особенностью метилфосфонатов является способность связывать и инактивировать холинэстеразу (Михайлов, Щербак, 1983; Абдувахабов и др., 1989).

Фосфонаты широко применяются в хозяйственной деятельности, например, производные метилфосфонатов – в качестве пестицидов (глифосат) (Жемчужин, 1985; Федке, 1985). Наиболее токсичные МФН являются фосфорсодержащими отравляющими веществами (зарин, зоман и Vx газы) (Франке, 1973; Fest, Schmidt, 1982). Фирол 76 (олигомер винилфосфонат-метилфосфоната) – используется в качестве пеногасителя. Полифосфоновые кислоты используются для борьбы с коррозией (Кононова и др., 2002). Бифосфонат, алафосфалин и фосфономицин применяется в качестве антибиотиков (Fleisch, 1991; Кононова и др., 2002).

Циклические эфиры ароматических бифосфонатов используются в качестве полимерных добавок. Фосфоновые кислоты применяются в качестве хелатных добавок к детергентам (Munro et al., 1999).

1.2.1. Метилфосфоновая кислота

Метилфосфоновая кислота ($\text{CH}_3\text{O}_3\text{P}$) представляет собой кристаллическое вещество с температурой плавления $104-106^\circ\text{C}$ (рис. 1).

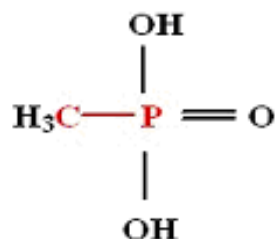


Рис. 1. Структурная формула метилфосфоновой кислоты.

Метилфосфоновая кислота (МФК) является конечным продуктом гидролиза и маркером фосфорсодержащих отравляющих веществ (Савельева, 2002). Имеются сведения о том, что МФК устойчива к разложению и обнаруживается в почве спустя десятилетия после поступления (Кононова и др., 2002).

В почве населённых мест районов размещения объектов по хранению и уничтожению химического оружия ориентировочная допустимая концентрация МФК – 0,22 мг/кг. Класс опасности вещества – 3 (ГН 2.1.7.2609 – 10).

В молекуле МФК малополярная углерод-фосфорная связь (C–P) может расщепляться с образованием свободных радикалов по гомолитическому механизму. Метильный и фосфонатный радикалы, даже при низких концентрациях, способны взаимодействовать с другими радикалами как «ловушки», с активными формами кислорода с образованием более токсичных соединений, инициировать цепные радикальные реакции в организме (Плотникова и др., 2011).

Влияние МФК на животных. Для млекопитающих и водных организмов МФК низкотоксична (Савельева и др., 2002). Полулетальная доза (ЛД 50) для крыс при пероральном введении МФК составляет 5000 мг/кг массы (Плотникова,

2012). Но при этом, МФК имеет выраженное дозозависимое действие с максимальным влиянием на метаболизм животных при применении высоких (2 и 10^{-3} мг/кг) и низких (10^{-12} и 10^{-15} мг/кг) доз и минимальным – на уровне средних и очень низких (10^{-6} и 10^{-18} мг/кг) доз (Савинова, 2012). Действие низких доз МФК вызывает у самцов, по сравнению с самками, большие изменения в белковом обмене и работе антиоксидантной системы (Плотникова, 2012). Обладая специфическим строением и свойствами, МФК может оказывать влияние на процессы окислительной модификации белков и липидов, вызывая изменения в содержании продуктов перекисного окисления белков, также приводить к накоплению основных маркеров эндогенной интоксикации — олигопептидов и веществ низкой и средней молекулярных масс в крови животных организмов (Корепин, 2011). МФК вызывает уменьшение накопления гликогена в печени и мышцах лабораторных мышей, рост содержания общего белка, креатинфосфата и активности лактатдегидрогеназы, а также активацию супероксиддисмутазы (Плотникова и др., 2010; 2011).

Влияние МФК на фототрофные организмы. МФК оказывает влияние на почвенные фототрофные организмы – водоросли и цианобактерии (Ашихмина и др., 2007). Установлено, что кислота стимулирует развитие цианобактерий, в которых заканчивается цикл превращения МФК (Ашихмина и др., 2006).

Эффекты МФК распространяются и на физиолого-биохимические показатели и показатели роста высших растений: угнетение роста и накопления биомассы, активацию пероксидаз, накопление низкомолекулярных антиоксидантов, интенсификацию процессов перекисного окисления липидов в растительных тканях и усилении экзоосмоса электролитов из корней культурных и дикорастущих растений (Огородникова и др., 2004). В первые часы после воздействия МФК происходят биохимические изменения в клетках. Независимо от способа обработки, МФК оказывает системное действие на листья и корни ячменя (Огородникова, 2004; Аюшинова, 2015).

МФК ($0,1$ моль/л и выше) ингибирует прорастание семян ячменя и пелюшки (Огородникова и др., 2004), а также угнетает рост проростков подсолнечника (Скоробогатова и др., 2005). МФК оказывает влияние на накопление хлорофиллов

и каротиноидов в листьях, вызывает нарушения дыхания и скорости тепловыделения (Далькэ и др., 2003; Огородникова и др., 2004). МФК приводит к изменению водного режима растений (угнетение транспирации, обезвоживание растительных тканей) (Огородникова и др., 2004; Ионенко и др., 2005). В условиях загрязнения среды выращивания МФК в растительных тканях накапливается аминокислота пролин (Щербакова и др., 2005; Чиванова, Огородникова, 2014).

Опрыскивание растений растворами МФК (0,05 и 0,1 моль/л) приводит к появлению хлорозов, некрозов и деформации листьев клевера, чины луговой, мышиного горошка и одуванчика. Происходят изменения в пигментном комплексе растений, снижается содержание хлорофиллов и каротиноидов, изменяется их соотношение. Действие МФК (0,1 моль/л) вызывает накопление малонового диальдегида (МДА) в листьях (Огородникова и др., 2004). Так, МФК (0,1 моль/л) снижала содержание пластидных пигментов в листьях *Phalaroides arundinacea*, активность пероксидаз, накопление продуктов ПОЛ, скорость дыхания и тепловыделения в листьях, в корнях растений изменения были выражены в меньшей степени (Маслова и др., 2010).

Влияние МФК на прочие организмы (мико- и микробиоту, тест-объекты).

Под влиянием МФК изменяется длина мицелия и количество спорангий (Кондакова и др., 2005). МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ – 0,01 моль/л) оказывает токсическое действие на тест-организмы (*Paramecium caudatum*, *Chlorella vulgaris*) (Панфилова и др., 2006; Позолотина и др., 2006). МФК в концентрации 0,01 моль/л и менее не оказывает острого токсического действия на тест-объект *Daphnia magna*, но проявляет хроническое токсическое действие в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л (Храбрых и др., 2006). МФК оказывает неблагоприятное воздействие при попадании в почву на её микробное население, нарушает популяционную структуру мицелиальных прокариот. МФК в концентрациях 0,001 – 0,1 моль/дм³ ингибировала интенсивность прорастания спор отдельных штаммов стрептомицетов на 32 – 58% по сравнению с контролем (Товстик, 2015).

1.2.2. Глифосат

Глифосат ($C_3H_8NO_5P$) – контактный фосфорорганический пестицид, оказывает системное действие на растения, применяется в качестве избирательного и сплошного гербицида для борьбы с сорными растениями (рис. 2) (Захаренко, 1990). У истоков создания гербицида стояла компания «Монсанто»: гербицидные свойства обнаружил Джон Франц в 1970 году. В 1987 он получил за это открытие Национальную медаль в области технологий и инноваций (United States Patent..., 1987). Глифосат (ГЛ) среди гербицидов занимает первое место в мире по производству (Kolpin et al., 2006; Al-Rajab et al., 2010). Фосфометилглицин является действующим веществом следующих гербицидных препаратов: Глифосат, Раундап, Ураган, Глитан, Глифопин, Форсат и др. (Справочник пестицидов..., 2002).

Глифосат представляет собой твердое белое вещество, без запаха, разлагается при температуре $230^{\circ}C$, хорошо растворим в воде ($25^{\circ}C$) 12 г/л, плохо растворим в большинстве органических растворителей. Не накапливается в тканях животных и не раздражает кожу. ЛД 50 (в мг/кг): для крыс 4900, для кроликов 3800. ПДК в почве 0,5 мг/кг. В воздухе рабочей зоне ориентировочный безопасный уровень воздействия вещества для ГЛ – $3,3 \text{ мг/м}^3$ (Мельников, 1995). ГЛ относятся к 3 классу опасности для человека и пчел (Государственный каталог..., 2013).

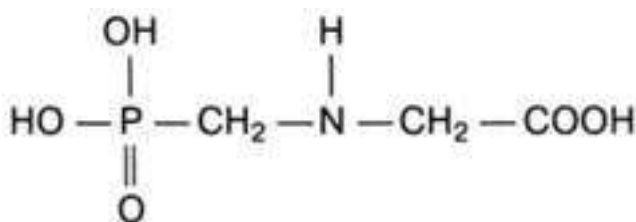


Рис. 2. Структурная формула глифосата

ГЛ ингибирует фермент синтеза ароматических аминокислот – 3-энолпирувилшикимат-5-фосфатсинтазу (ЕС 2.5.1.19) (Jaworski, 1972; Федтке, 1985). Этил- и фенил- производные фосфометилглицина проявляют инсектицидную активность. Производители уверяют, что эти гербициды в почве быстро разлагаются, но в действительности время их разложения зависит от многих факторов. По некоторым данным, ГЛ обнаруживают в почве даже спустя

два года после обработки (Шушкова и др., 2009). Остаточные количества ГЛ способны сохраняться долгое время в растениях (Шутов, Бельков, 1989).

Аминометилфосфоновая кислота является основным метаболитом глифосата, более токсичным и более стойким, чем глифосат, поэтому его присутствие серьезно увеличивает риск загрязнения среды (Kolpin et al., 2006; Al-Rajab et al., 2010, Imfeld et al., 2013). Кроме того, аминометилфосфоновая кислота попадает в окружающую среду от разложения фосфоновых кислот, присутствующих в моющих средствах (Kolpin et al., 2006). Вот почему глифосат и аминометилфосфоновая кислота являются наиболее опасными и встречаемыми загрязнителями в воде (Saitúa et al., 2012, Imfeld et al. 2013) и городской среде (Kolpin et al., 2006; Botta et al., 2009; Gasperi et al., 2012; Zgheib et al., 2012).

Действие ГЛ растения. При опрыскивании наземной части растений глифосатом до 80% пестицида рассеивается на площадь до 40 м от цели, при этом погибают чувствительные виды растений. ГЛ очень быстро транспортируется по сосудистой системе растений и наносит им значительные повреждения. У растений, выживших после подобного ошибочного опрыскивания глифосатом, последствия заметны спустя несколько лет (Федтке, 1985).

Глифосат высокотоксичен для многих растений (осока, злаки, некоторые двудольные и др.), характеризуется системным действием, легко поглощается листьями и перемещается в корни, подавляя их жизнедеятельность на длительный срок. Сложность практического применения гербицида заключается в его неизбирательном действии, он одинаково хорошо угнетает как однодольные, так и двудольные сорняки. Обработку вегетирующих сорняков осуществляют путем опрыскивания (Мельников и др., 1980; Угрюмов и др., 1985). ГЛ вызывает хлороз молодых листьев, торможение роста и полегания стеблей, которое проявляется через 1 – 3 недели после обработки (Химические средства ..., 1986).

Обработка семян ГЛ не оказывает влияния на развитие проростков, но в последствии рост замедляется, и растение погибает (Федке, 1985).

Помимо гербицидных свойств, ГЛ применяется и как химический регулятор созревания, а небольшие концентрации токсиканта способны повышать содержание сахара в тростнике (Досон и др., 1991).

Низкие концентрации (0,003%) ГЛ ингибируют биосинтез ауксина и индолилуксусной кислоты, но способствует выработке этилена (Заякина и др., 1999).

ГЛ вызывает изменения на ультраструктурном уровне, что проявляется в нарушении оболочки эндоплазматического ретикулума и распаде мембран (Федке, 1985). У растений фасоли и изолированных клеток под влиянием ГЛ отмечается торможение абсорбции ионов (Brecke et al., 1980).

Действуя как стресс-фактор на растение, ГЛ активирует накопление глутатиона в тканях (Miteva et al., 2005). Под влиянием ГЛ нарушается образование рибосом и РНК в хлоропластах и биосинтез пигментов, снижает содержание хлорофиллов и каротиноидов в обработанных тканях (Cole, 1979). Под действием ГЛ происходит нарушение фотосинтеза и дыхания (Brecke et al., 1980).

При разложении ГЛ в высших растениях образуются аминометилфосфоновая кислота и саркозин (рис. 3) (Жемчужин, 2002; Кузнецова, Чмиль, 2010).

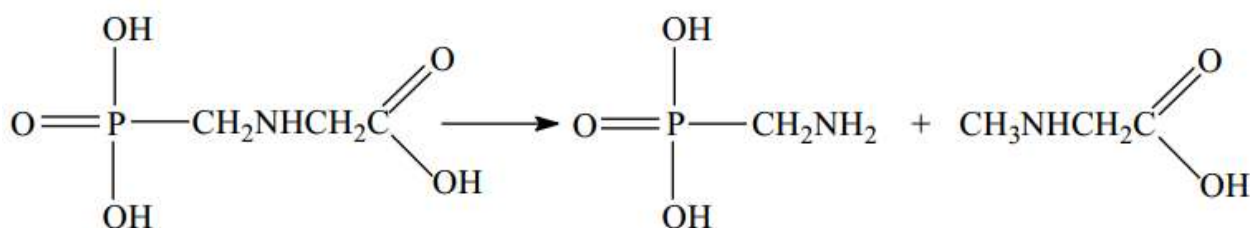


Рис. 3. Схема разложения глифосата в растительных клетках

Действие ГЛ на животные организмы. Препаративная форма гербицида ГЛ, кроме фосфометилглицина, содержит более десяти компонентов (изопропиламин, сорбиновая кислота, сульфат натрия, гидроокись калия, метил пирролидион, изобутан, 3-иодо-2-пропинил бутилкарбамат, бензисотиазолон, сульфат аммония и полиэтоксилированный талловамин и др.) (Lennart, Eriksson, 1999). Рядом исследований показано, что «инертные» компоненты раундапа не менее токсичны самого действующего вещества.

Доказано, что ГЛ может провоцировать образование неходжкинской лимфомы (Lennart et al., 1999). В опытах на мышах, мушке дрозофиле, лимфоцитах

человека, бактериях *Salmonella* был доказан мутагенный эффект ГЛ (Clinical aspects..., 1998).

Глифосат представляет опасность для насекомых, рыб, птиц, делает растения менее устойчивыми к болезням, снижает, угнетает рост микоризы и ингибирует активность бактерий-азотфиксаторов (Атлавините, 1982; Springett, Gray, 1992).

Деструкция ГЛ в окружающей среде. ГЛ мигрирует в почве, его обнаруживали на значительном расстоянии (до 800 метров) от места внесения (Федтке, 1985). Период полураспада ГЛ в почве в зависимости от типа почв, как было установлено специалистами US EPA, находится в диапазоне от 3 до 130 дней (U.S.EPA, 1990). В почвах, в зависимости от условий окружающей среды, ГЛ устойчив к химическому разрушению, действию солнечного света, обладает низкой тенденцией к выщелачиванию (удалению) из почвы, за исключением случаев, когда он находится в адсорбированном состоянии на коллоидных частицах почвы (Кузнецова, Чмиль, 2010).

Что касается разложения глифосата в лабораторных условиях, известно, что проводились исследования по химическому окислению глифосата порошком бирнессита, которое показало, что его абиотическое разложение в почве возможно, но идентифицировать образующиеся побочные продукты не получилось (Barrett, McBride, 2005). При дальнейшем исследовании свойств тонких пленок бирнессита было установлено, что это очень интересный инструмент для процессов разложения метилфосфонатов на границах раздела твердое тело-жидкость. Доказано, что глифосат самопроизвольно разлагается в соответствии с разрывами связи C–P и C–N, приводящими к одновременному образованию аминометилфосфоновой кислоты, формальдегида, фосфат-иона, нитрат и ион аммония, без модификации бирнессита. Данный метод позиционируется, как способ устранения загрязнений глифосатом и аминометилфосфоновой кислотой водных объектов (Ndjeri et al., 2013).

На скорость разложения ГЛ влияет тип почвы. Несмотря на то, что ГЛ достаточно хорошо растворим в воде, он в отличие от большинства водорастворимых гербицидов обладает чрезвычайно высокой способностью связываться частицами почвы, причем эта способность возрастает по мере

увеличения содержания в почве глины, катионообменной емкости почвы, уменьшения pH и содержания фосфора (Кузнецова, Чмиль, 2010). При микробиологическом разложении ГЛ в почве и воде происходит полная его деструкция менее чем за 12 недель (Rueppel et al., 1977). ГЛ устойчив к фотолитическому разложению, не вымывается из почвы. Например, бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (штамм PG 2982) используют ГЛ в качестве источника фосфора и экспоненциально растут в его присутствии (Жемчужин, 2002).

ГЛ сохраняет стабильность в воде при pH 3; 5; 6 и 9 при 35°С (Glyphosate and AMPA..., 2005). Деграция ГЛ в воде, водных осадках и почве обусловлена, главным образом, его разрушением микроорганизмами. Поскольку в водной среде микроорганизмов намного меньше, чем в почве, скорость разложения гербицида в воде меньше, чем в почве (Кузнецова, Чмиль, 2010). При этом основной путь разрушения ГЛ заключается в расщеплении C–N связи с образованием первоначального метаболита – аминометилфосфоновой кислоты, которая, в свою очередь, медленно разрушается под действием микроорганизмов до углекислого газа и других простых неорганических соединений. Другой путь разрушения ГЛ через расщепление C–P связи может также встречаться. При этом одними из метаболитов (второстепенными) являются N-метил-аминометилфосфоновая кислота, метилфосфоновая кислота и N-метилглифосат. Разрушение ГЛ происходит более быстро в аэробных условиях, чем в анаэробных (Кузнецова, Чмиль, 2010).

В почвах микроорганизмы разлагают глифосат в аэробных и анаэробных условиях с образованием аминометилфосфонатов. Время микробной деструкции определяется дозой препарата и типом почв (от месяца до года) (Лунев, 1992; Плотникова и др., 2009). Установлено, что биологическое разложение пестицидов в природной среде идет более интенсивно в районах, где почвы обработаны ранее. Это говорит о приспособляемости естественных популяций микробов, находящихся в почве, к потреблению ксенобиотиков (MacRae, 1989).

1.3. Биологическая деградация метилфосфонатов

Снижение токсического действия ксенобиотиков осуществляется за счет их биообезвреживания в окружающей среде, прежде всего под действием микроорганизмов (Головлева и др., 2008). В зависимости от конечного результата различают полную деградацию (минерализацию, полную деструкцию), неполную деградацию (трансформацию, частичную минерализацию), связывание поллютантов или их метаболитов с другими веществами (конъюгация, полимеризация, конденсация) (Головлева и др., 2008).

Известно, что разложение чужеродных веществ микроорганизмами протекает за счет включения в реакции гидролиза, окисления, восстановления, дегалогенирования, изомеризации, полимеризации и др. По оценкам компании Falmoth Associates биологическое обезвреживание отходов требует приблизительно в 10 раз меньше затрат, чем общепринятые меры, например, озонирование (Завьялова и др., 2014).

Биотехнологии, использующие биокатализаторы, основываются на использовании биореакторов для обработки сточных вод, а также смесей почвы и воды, или на проведении обработки *in situ* за счет стимуляции роста природных микроорганизмов – деструкторов путем проведения аэрации и введения питательных веществ и биопрепаратов на основе иммобилизованных бактерий – деструкторов (Karna et al., 1984).

Биодеградация МФН в почве происходит медленно. Их превращения в природных средах изучены мало. Однако есть сведения, что микроорганизмы могут использовать МФН в качестве источника фосфора (Кононова и др., 2002). Есть организмы, способные расщеплять устойчивую к разложению С–Р связь. К ним относятся прокариотные микроорганизмы и некоторые низшие эукариоты (Quinn et al., 1989). Впервые подтверждение возможности биологического расщепления С–Р связи было получено на примере *Escherichia coli*, которая может использовать метилфосфоновую или этилфосфоновую кислоту в качестве источника фосфора (Schowanek, Verstraete, 1990).

Адаптация клеток к МФН является важной составляющей для биодеградации данных соединений. Известно, что разложение метилфосфонатов начинается

после длительного латентного периода, продолжительность которого зависит от микроорганизма и природы субстрата (Imazu et al., 1998).

Исследование метаболизма различных бактерий позволило выявить ряд и других физиологических особенностей разложения метилфосфонатов. Так, ни разу не было выявлено интенсивного потребления фосфонатов. В большинстве случаев полнота разложения МФН не превышала 50% от теоретически возможной и зависела от роста культуры (Quinn et al., 1989). Потребление ГЛ, как правило, происходит за 7 дней, однако полнота потребления достигает 40–45% (Steed, Wanner, 1993).

Известно, что только отдельные штаммы микроорганизмов способны разлагать МФН, а не определенные группы микроорганизмов (Quinn et al., 1989). Эукариотные организмы, за исключением дрожжей и плесневых грибов, не способны разлагать МФН (Quinn et al., 1989; Ternan, McMullan, 2000). Доказано, что грамотрицательные бактерии являются лучшими деструкторами метилфосфонатов (Quinn et al., 1989). У некоторых видов ЦБ обнаружен фермент катализирующий гидролиз связи С–Р, что свидетельствует об их потенциальной возможности деструктурировать метилфосфонаты (Quinn et al., 1989).

Гидролитические экзоферменты – важное звено в процессах превращения поллютантов. Это отличает микробный метаболизм от превращения ксенобиотиков в клетках высших растений, у которых первичная атака связана в первую очередь с действием оксидоредуктаз. Гидролитическому биопревращению подвергаются, например, пестициды. Это реакции гидролиза амидной и эфирных связей ациланилидов, фенилмочевин, эфиров фосфорных, тиофосфорных и фосфоновых кислот (Головлева и др., 2008).

Использование штаммов микроорганизмов – деструкторов и ферментов для создания биопрепаратов и разработки биотехнологий обеззараживания, очистки и восстановления загрязненных почв и вод в местах бывшего производства, хранения и уничтожения фосфорсодержащих отравляющих веществ выгодно отличается отсутствием вторичных отходов, высокой степенью деградации и возможностью полной ассимиляции продуктов (Холстов и др., 1995; Петров и др., 1995).

Учитывая вышесказанное, большой интерес в качестве деструкторов МФН представляют хорошо распространенные в природе виды прокариотных фототрофов – цианобактерии.

1.4. Влияние поллютантов на жизнедеятельность растений

На живые организмы может действовать множество экстремальных факторов (стрессоров), что приводит к снижению их жизнеспособности, а зачастую и к гибели. При включении различными абиотическими (засоление, засуха, низкие температуры, загрязнение тяжелыми металлами и др.) и биотическими (патогены) стресс-факторами неспецифических сигнальных систем в клетке развивается ряд ответных реакций, называемых стрессом (Селье, 1979; Александров, Кислюк, 1994; Полесская, 2007). Понятие «клеточная сигнализация» включает не только передачу сигналов, но и усиление, ослабление и их выключение (Жаров и др., 1994). Это подразумевает включение защитных механизмов живого организма на действие окислительного стресса.

1.4.1. Стресс у растений

В клетках растений стрессы разной природы провоцируют чрезмерную продукцию активных форм кислорода и развитие окислительного стресса. Определить первичную мишень, на которую действует стрессовый фактор, либо очень сложно, либо в принципе невозможно.

Во время действия стресс-фактора в клетках формируется неспецифическая устойчивость, однако при усилении эффекта происходит спад защитной системы организма и наступает его гибель. Положительный стимуляционный стресс получил название эустресс, а патологический – дистресс. Граница между данными видами стресса зависима от силы воздействия и исходной устойчивости организма (Селье, 1979; Чиркова, 2002).

Выражение «окислительный стресс» применяется для характеристики повышенного накопления активных форм кислорода в клетках (Scandalios et al., 1993). Механизм развития стресса запускается при дисбалансе активности окислительных процессов и антиоксидантной защитой клеток. В ходе развития

стресса достигается максимальная активация механизмов, включающих установление толерантности, избегания и детоксикации. Впоследствии процессы окисления подвергают старению наиболее пострадавшие от стресса компартменты клетки, что приводит к потере ими регуляторных функций. В конечном итоге из аминокрупп белков и переоxygenенных липидов образуются способствующие отмиранию клеток альдегиды и липофусцины, а также продукты фенолоксидаз и пероксидаз (Eltner, Osswald, 1994; Лукаткин, 2002; Foyer, Noctor, 2005).

Молекулярный кислород, который является сильным окислителем, участвует в метаболизме, возможно благодаря тому, что молекула O_2 относительно стабильна и спонтанно не реагирует с биомолекулами. Относительно небольшая часть кислорода (2–5%) переходит в его активные формы, обладающие высокой агрессивностью и способностью повреждать большинство компартментов клетки (Кошкин, 2010). Активные формы кислорода – это комплекс мало живущих взаимопревращающихся реакционноспособных форм кислорода, которые возникают вследствие его окислительно-восстановительных превращений или электронного возбуждения. Активные формы кислорода способны окислять большинство биологических молекул (липиды мембран, белки, молекулы ДНК). Источником их образования в клетках могут быть фотоиндуцированные реакции, а также реакции одно-, двух- и трехэлектронного восстановления кислорода в результате само- и ферментативного окисления (Дмитриев, 2003). Активные формы кислорода включают в себя свободнорадикальные частицы, например, гидроксильный радикал (OH^\cdot), супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), перекисные радикалы (RO_2^\cdot), кроме того, нейтральные молекулы – синглетный кислород (1O_2), пероксид водорода (H_2O_2), озон (O_3) и др. (Кошкин, 2010).

Производство активных форм кислорода — это нормальный процесс, который происходит в растительных фотосинтезирующих клетках, в частности, в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах и апопласте.

Таким образом, активные формы кислорода как сильные и реакционноспособные окислители потенциально могут разрушить и убить

клетку. Но в неповрежденных клетках уровень активных форм кислорода невысок, что обеспечивается работой специальных ферментных систем. Однако содержание активных форм кислорода быстро растет в неблагоприятных для клетки условиях, что приводит к развитию окислительного стресса.

Биологическое значение стресса. Реагируя с остатками жирных кислот в составе фосфолипидов, супероксидрадикал, синглетный кислород и гидроксилрадикал атакуют биологические мембраны. Впоследствии развиваются свободно-радикальные реакции, совокупность которых называется *перекисное окисление липидов мембран* (ПОЛ). Пропускаемость и гидрофобность липидного бислоя, а также, как следствие, функционирование ферментных систем, связанных с мембраной, нарушаются из-за протекания цепного процесса окисления с выработкой свободнорадикальных продуктов.

При нормальной жизнедеятельности растения процессы ПОЛ и накопление активных форм кислорода протекают в клетках непрерывно. Негативные последствия наступают при чрезмерном накоплении активных форм кислорода, пероксидов и их производных в результате стрессовых воздействий. Концентрация активных форм кислорода в условиях стресса может возрастать в 3 – 10 раз (Guy at al., 2009; Polle, 2001).

Активные формы кислорода являются для клетки не только нежелательными и опасными побочными продуктами аэробного метаболизма. В низких концентрациях эти соединения выполняют функции сигнальных молекул, вторичных мессенджеров, при участии которых возникают ответные реакции растений на стресс, реализуются программы роста и развития растений (Нариманов, Корыстов, 1998; Шорнинг и др., 2000), участвуют в поддержании окислительно-восстановительных процессов в клетке и тиолового статуса белков (Schafer at al., 2004). Выяснение чрезвычайно интересной двойственной роли активных форм кислорода в метаболизме растительной клетки относится сейчас к наиболее быстро развивающимся направлениям в физиологии и молекулярной биологии растений (Полесская, 2007).

При формировании протекторных реакций растений выработка активных форм кислорода необходима, например, при развитии инфекционных

заболеваниях. Находящиеся на поверхности клетки активные формы кислорода (в клеточной стенке и плазматической мембране) принимают участие в синтезе лигнина, необходимого для поддержания механической прочности клеточной стенки, а также в метаболизме фенольных соединений. Образующиеся в ее матриксе свободные радикалы способны атаковать и повреждать патогенную микрофлору. Создается внеклеточный защитный барьер, препятствующий проникновению патогенных микроорганизмов внутрь клетки (Pennell, Lamb, 1997).

Факторы, влияющие на возникновение и протекание окислительного стресса у фототрофных организмов. Реакция на стресс у фототрофных организмов может быть совершенно различной. Многократные исследования позволили выявить несколько закономерностей.

Общего правила реакции на стресс нет (Селье, 1972). Множество патологических процессов, различные типы воздействий на клетки и живые организмы из вне, в том числе действие фосфорсодержащих поллютантов, приводит к изменению активности антиоксидантной системы растений (Квеситадзе, 2005). Вид растений определяет отклик антиоксидантной системы на один и тот же стресс-фактор. Например, при одинаковом уровне засухи реакция антиоксидантной системы в листьях сорго и подсолнечника была разной. У сорго снизилась активность цитозольной аскорбатпероксидазы, пероксидазы и МДА-редуктазы, а активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы не изменялась. У подсолнечника, напротив, активность хлоропластной аскорбатпероксидазы, каталазы возрастала, а пероксидазы – снижалась (Zhang, Kirkham, 1996).

На то, какие ответные реакции антиоксидантной системы будут на стресс, влияет степень и продолжительность данного воздействия. Например, у пшеницы и гороха в условиях почвенной засухи активность СОД, каталазы и пероксидазы возрастала, но при усилении стресса при полной засухе активность ферментов снижалась, что коррелировало с потерей хлорофилла и разрушением мембран (Веселов, 2001).

Кроме того, реакция антиоксидантной системы зависит от характера стрессового фактора. Наиболее четко тезис, что разные стрессоры ведут к разным

ответам, был продемонстрирован при воздействии разных факторов на антиоксидантную систему в листьях *Arabidopsis*. Выяснилось, что высокая интенсивность света и высокая температура (+30 °C) приводили к увеличению экспрессии и активности ДГА-редуктазы, нехватка воды – гваяколовой пероксидазы и ДГА-редуктазы, ультрафиолетовое облучение (УФ-В) – СОД, аскорбатпероксидазы, пероксидазы, МДГА-редуктазы, глутатионредуктазы, а сниженная температура (+5 °C) – глутатионредуктазы и аскорбатпероксидазы на фоне снижения активности каталазы (Полесская, 2007). На этом примере хорошо видно, что действие разных факторов приводит к разным ответам антиоксидантной системы, но закономерности различий не обнаруживаются. Неизвестно, отчего при разных типах стресса растет экспрессия и интенсивность одних ферментов – антиоксидантов и снижается либо остается на первоначальном уровне активность других.

Изменение активности ферментов антиоксидантной системы может использоваться как индикатор загрязнения среды фосфорсодержащими веществами. При действии МФК различных концентраций на антиоксидантные ферменты в листьях овса посевного обнаружен «эффект сверхмалых доз»: наибольшая активность ферментов обнаружена при МФК ($10^{-4} - 10^{-5}$ моль/л и $10^{-15} - 10^{-18}$ моль/л). При добавке МФК к растениям в этих концентрациях пероксидаза имеет максимальную активность, а полифенолоксидаза – минимальную. При действии МФК ($10^{-9} - 10^{-10}$ моль/л) изменение активности ферментов отсутствует в сравнении с контролем (Плотникова, 2009).

Физиологическое состояние растений определяет первоначальный уровень антиоксидантной активности, от которого зависят ответные реакции антиоксидантной системы растения на стресс. Активность ферментов – очень изменчивый и меняющийся показатель (Blokhina et al., 2003). Известны суточные ритмы экспрессии генов, в том числе генов антиоксидантных ферментов некоторых растений (Бараненко, 2006; Poljsak, Milisav, 2012; Miura, Tada, 2014).

Содержание соединений и ферментов – антиоксидантов может определяться возрастом растений и условиями их выращивания (Колупаев, 2007). Большой интерес представляет фактический материал, который демонстрирует четкие

корреляции между генетически детерминированной устойчивостью растений и уровнем антиоксидантной активности. Эти данные были получены при сравнении сортов культурных растений с разной устойчивостью к тем или иным стрессовым факторам. Выяснилось, что у устойчивых сортов исходный антиоксидантный потенциал, выше, чем у неустойчивых (Подберезкина, Осинская, 1989).

Под влиянием стрессовых факторов у устойчивых сортов симптомы окислительного стресса проявляются гораздо слабее, чем у неустойчивых, кроме того, происходит быстрое усиление антиоксидантной защиты, тогда как у неустойчивых такого не наблюдается (Чиркова, 2002).

Для проявления устойчивости критичны не только уровни активности ферментов – антиоксидантов, но и содержание аскорбата. При исследовании двух сортов фасоли с разной устойчивостью к озону было показано, что при выращивании в присутствии озона, у толерантного сорта содержание в апопласте аскорбата было на 28 % выше, чем у чувствительного сорта (Полесская, 2007).

Многие ученые рекомендуют использовать различные методы повышения антиоксидантной защиты организмов. К их числу относятся: обработка напрямую естественными и искусственно синтезированными антиоксидантами, например, маннитом, который защищает от гидроксильного радикала ферменты в хлоропластах (Shen et al., 1997) или защищающим растения от индуцированного УФ-В окислительного стресса селеном (Hartikainen, 2000), кроме того, аналогами салициловой кислоты и фитогормонов или создание трансгенных растений.

Таким образом, генетически детерминированная устойчивость к стрессам той или иной природы коррелирует с уровнем антиоксидантной активности или со способностью быстро нарастить антиоксидантный потенциал. В то же время генетические манипуляции, приводящие к уменьшению этого потенциала, делают растение более уязвимым к действию стрессовых факторов и даже отрицательно сказываются на их жизнеспособности.

1.4.2. Ответные биохимические реакции растений на действие поллютантов

В клетках живых организмов находятся и активно функционируют вещества и ферменты – антиоксиданты, которые уничтожают активные формы кислорода без образования иных токсинов. Из-за того, что бороться с крайне реакционноспособным гидроксилрадикалом невозможно, антиоксидантная система нейтрализует и обезоруживает ранние формы активных форм кислорода – супероксидрадикал, синглетный кислород и пероксид водорода (Лукаткин, 2002; Полесская, 2007; Чиркова, 2002). В состав высокомолекулярных антиоксидантов входят ферменты: супероксиддисмутаза (Sandalio, 1988), каталаза (Garg, Manchanda, 2009), аскорбат- и глутатионпероксидазы (Рогожин, 2004), алкилгидропероксидредуктазы (Лукаткин, 2002; Полесская, 2007), глутатионредуктаза, глутатионтрансферазы. К низкомолекулярным антиоксидантам относятся: каротиноиды (Sieferman, 1987), флавоноиды (Winkel-Shirley, 2002; Масленников, 2003), восстановленный глутатион (Meyer, 2008), аскорбиновая кислота (Чупахина, 1997; Smirnoff et al., 2005), α -токоферол (Hollander-Czytko et al., 2005), пролин, полиамины и другие аминокислоты (Chen, Dickman, 2005; Rhodes et al., 1999).

Пигментный комплекс растений

Пигментный комплекс крайне важен для нормальной жизнедеятельности растений (Photosynthetic pigments ..., 2014). Зеленый пигмент – хлорофилл участвует в процессе фотосинтеза, при котором идет синтез органических веществ и высвобождение молекулярного кислорода на Земле (Физиология растений, 2005). У растений отсутствует способность к активному передвижению, поэтому их фотосинтетический аппарат должен быть пластичен и обладать способностью адаптироваться к меняющимся условиям среды (Мерзляк, 1998). Зачастую размеры клеток растений, содержание и соотношение основных пигментов фотосинтеза (хлорофиллов и каротиноидов), морфология ассимиляционных тканей меняются в ответ на действия внешних факторов (Мерзляк, 1989).

Хлорофиллы. Пигменты играют важную и сложную роль в растительных организмах, принимая участие в процессе фотосинтеза. Пластиды – органеллы,

найденные исключительно в клетках высших растений и водорослей, особые внутриклеточные образования. Предполагают, что ЦБ, которые относятся к фотосинтезирующим прокариотам, вступили в симбиоз с древними ядерными гетеротрофными клетками бесцветных водорослей или простейших, например, с амебами. Гетеротрофные клетки перестали зависеть от органических веществ, поступающих извне: фотосинтезирующие ЦБ продуцируют их сами (Ермаков, Полевой, 1993).

Пластиды ответственны за биосинтез многих соединений растительной клетки, в них протекают промежуточные стадии многих метаболических процессов; образуется хлорофилл, каротиноиды, синтезируются пурины и пиримидины, большинство аминокислот и все жирные кислоты (у животных эти процессы осуществляются в цитозоле) (Хелдт, 2011). Хлорофиллы *a* и *b* представляют собой Mg-содержащие порфирины и находятся в хлоропластах листьев высших растений.

Хлорофилл *a* обнаружен у всех фотосинтезирующих организмов, за исключением анаэробных фотосинтезирующих бактерий (пурпурных и зеленых). В клетках ЦБ присутствует исключительно хлорофилл *a*, хлорофилл *b* отсутствует. В органических растворителях (в красной области спектра) максимальное поглощение хлорофилла *a* происходит при длинах волн 660-664 нм. Обновление хлорофилла *a* идет примерно в три раза быстрее, чем хлорофилла *b* (Бажанова, 1964). Дополнительным пигментом фототрофных организмов (водорослей и высших растений) является хлорофилл *b*. Его отличием от хлорофилла *a* является присутствие во II пиррольном кольце альдегидной группы вместо метильной. Максимум поглощения хлорофилла *b* в красной области спектра в ацетоне происходит при длине волны 645 нм (Физиология растений, 2005; Хелдт, 2011). В пурпурных серобактериях присутствует бактериохлорофилл – пигмент, благодаря которому бактерии используют для восстановления углекислоты энергию света (Arlt et al., 1993).

Содержание пигментов – это чувствительный показатель состояния растений. Поллютанты вызывают изменения в пигментном комплексе растений, к примеру, при действии ряда тяжелых металлов (Ли и др., 2008), при солевом стрессе (Ху,

Лиу, 2008; Гамбарова, Гинс, 2008), загрязнении пестицидами (паракватом) (Радюкина и др., 2008) снижается содержание хлорофилла. К разрушению хлорофиллов в листьях также приводит загрязнение почв нефтепродуктами (Чупахина, Масленников, 2004), гипоксия корней ячменя (при затоплении почвы) (Йорданова, 2003). Но при засолении и ощелачивании почв отмечали рост количества зеленых пигментов в растениях *Lepidium sativum* (Еремченко и др., 2014), а также инкубация *Ceratophyllum demersum* на 1% растворе катионного СПАВ стимулировала накопление хлорофиллов *a* и *b* (Макурина и др., 2015).

Таким образом, образование хлорофилла представляет собой сложный многоступенчатый процесс, на который оказывает влияние целый комплекс условий внешней среды.

Каротиноиды. Каротиноиды – природные пигменты, синтезируемые растениями и микроорганизмами. Это C_{40} – соединение, построенное из восьми C_5 -изопреновых фрагментов. Хромофорная группа каротиноидов представлена полиеновой цепочкой сопряженных двойных связей (Физиология., 2005). В растительной клетке каротиноиды защищают ее структуру от повреждения образующимися в процессе фотосинтеза свободными радикалами. Каротиноиды благодаря своим антиоксидантным свойствам участвуют во множестве внутриклеточных реакциях. Они крайне эффективны в погашении избыточной энергии синглетного кислорода и триплетного хлорофилла. Механизм защитного действия желтых пигментов сводится к поглощению ими энергии возбуждения, в дальнейшем рассеивая ее в виде тепла, предотвращая образование синглетного кислорода (Капитанов, Пименов, 1996).

Каротиноиды способны вступать в реакции с органическими радикалами жирных кислот, действуя в качестве «ловушек» радикалов, а не доноров водорода (Кошкин, 2010). В конечном итоге окислительная цепочка обрывается. Каротиноиды дополняют антиоксидантное действие токоферолов, так как первые эффективны при низком уровне кислорода в субклеточных фракциях, а токоферолы – с более высоким (Чиркова, 2002).

При химическом загрязнении среды возможен рост количества каротиноидов, поэтому зачастую в условиях города в растениях накапливается большее

количество желтых пигментов (Половникова, Воскресенская, 2008). Уровень каротиноидов в листьях возрастает при снижении температуры (Новокрещенова и др., 2008), увеличении влажности окружающей среды (Куренкова, 1998), ощелачивании (Еремченко и др., 2014). Снижение количества каротиноидов происходит при загрязнении почв нефтепродуктами (Чупахина, Масленников, 2004), солевом стрессе (Гамбарова, Гинс, 2008). При воздействии ионов свинца, катионных синтетических поверхностно активных веществ и при их сочетанном действии происходит снижение содержания каротиноидов на 40% на 12 час и увеличение их содержания в 4,7 раза на 72 час инкубации (Макурина и др., 2015).

Антоцианы. Антоцианы (греч. anthos – окраска, цвет; kyanos – лазоревый), растительные гликозиды, имеющие в составе в качестве агликона (антоцианидина) гидроксипроизводные 2-фенилхромена. В положении 3 (реже – 3 и 5) углеводная часть молекулы (обычно остаток глюкозы, рамнозы, галактозы, ди- или трисахарида) связана с агликоном. У ряда антоцианов группы ОН метилированы или ацетилированы (Гауптман и др., 1979). Антоцианы синтезируются в цитоплазме и содержатся в клеточном соке, вакуолях и клеточных оболочках. Как правило, сосредоточены в клетках верхнего эпидермиса и обеспечивают эффективное экранирование в зеленой области спектра, в которой листья значительно прозрачны для света. Относясь к группе флавоноидов, антоцианы выполняют защитные функции в клетке, подавляя в растительных тканях окислительные процессы. В неблагоприятных условиях происходит более активный синтез антоцианов (Мерзляк, 1998). Излишняя солнечная радиация (УФ), неблагоприятные почвенные условия, пониженные температуры (Тихвинский, 2007) стимулируют синтез антоцианов. Загрязнение воздуха г. Калининграда способствовало накоплению антоциановых пигментов в листьях древесных пород (липы мелколистной, рябины обыкновенной, клена остролистного и ели колючей) (Майдебура, 2006). Известно, что активное накопление антоцианов идет на свету при дефиците азота, фосфора и калия в растениях кукурузы; при загрязнении тетраборатом натрия в проростках ржи; при загрязнении почв нефтью (Масленников, 2003). Количество антоциановых пигментов может служить индикатором загрязнения окружающей среды, что

может быть использовано для оперативной биоиндикации и экологическом мониторинге растительных сообществ (Чупахина, Масленников, 2004).

Перекисное окисление липидов

В ходе окислительного стресса активно образуются активные формы кислорода, оказывающие негативное действие на клетку, которые способны запускать реакции ПОЛ. Супероксидрадикал, синглетный кислород и гидроксилрадикал поражают мембраны, вступая в составе фосфолипидов в реакции с остатками жирных кислот. В конечном итоге развивается цепочка свободнорадикальных реакций, в ходе которых идет перекисное окисления липидов ненасыщенных жирных кислот мембран (Полесская, 2007). Активация процессов ПОЛ приводит к деструкции фосфолипидного слоя мембран (митохондрий и хлоропластов) и плазмолеммы – внешней мембраны (Veronesi et al., 1996). Процессы ПОЛ способствуют образованию дефектов и пор в митохондриях, что в конечном итоге приводит к гибели клетки (Владимиров, 1999а, 1999в).

Изменение функций хлоропластов, вследствие нарушения структуры белков и липидов тилакоидных мембран, может происходить в ходе процессов ПОЛ (Веселовский, 1987). При активации процессов ПОЛ идет спад продуктивности, жизнедеятельности и, в конечном счете, гибель растения (Лукаткин, 2002).

Таким образом, образование активных форм кислорода протекает в растениях как при действии стрессовых факторов, так и в нормальных условиях. Активные формы кислорода играют в клетке сигнальную и регуляторную функции. При действии отдельных стресс-факторов активность антиоксидантных ферментов в растениях может ингибироваться, следовательно, активация или индукция биосинтеза низкомолекулярных антиоксидантов в изменившихся условиях становится более эффективным защитным механизмом (Радюкина и др., 2008). Низкомолекулярные антиоксиданты – это активные участники, которые осуществляют взаимодействие между изменившимся при действии стрессоров метаболизме и защитным ответом (Shao et al., 2008).

1.5. Цианобактерии и растительно-микробные комплексы в условиях химического загрязнения

1.5.1. Биология и экология цианобактерий

Строение и физиология цианобактерий. Цианобактерии – морфологически разнообразная группа грамотрицательных прокариот, включающих одноклеточные, колониальные и многоклеточные (нитчатые) формы (Пиневич, Аверина, 2002; Жегалло и др., 2011), древнейшая группа среди живых организмов (Громов, 2000).

Размеры клеток ЦБ составляют от менее 1 до 50 мкм. Химический состав биомассы ЦБ отличается наличием большого количества протеина (до 70% всего органического вещества) (Сассон, 1987), присутствием термостойких ферментов (включая, ДНК-полимеразы), витаминов и пигментов (Барашков, 1972).

В недрах этой группы, вероятно, сформировался и в целом оформился фотосинтез (Громов, 2000). ЦБ – фотоавтотрофные бактерии, содержащие хлорофилл *a*. В периферической части клеток диффузно распределены синий и бурый пигменты, определяющие в сочетании с хлорофиллом *a* сине-зеленый цвет этих организмов (Румянцев, Крюков, 2012). Показателем гибкости светового метаболизма выступает способность ЦБ переключаться при изменении условий с одного типа фотосинтеза на другой и имеет важное экологическое значение (Гусев, Никитина, 1979).

Для цианобактерий характерен смешанный тип питания. ЦБ сами синтезируют углеводы (автотрофы), однако иногда способны использовать и готовые распадающиеся органические вещества (гетеротрофы). В ряду ЦБ встречаются виды, способные к азотфиксации (Громов, 2000; Berman-Frank et al., 2003; Гусев и др., 2005).

ЦБ – это единственные организмы на Земле, которые прошли сквозь её историю и остались в неизменном виде. Современная биосфера сильно отличается от той, где зародились ЦБ примерно 3,5 млрд лет тому назад, что говорит об их огромном адаптационном потенциале (Домрачева и др., 2009).

Характеристика основных свойств цианобактерий. Многочисленными исследованиями доказано, что ЦБ потенциально обладают большими

адаптационными, биоремедиационными и антагонистическими способностями (Громов, 2000; Домрачева, 2005; Лось, 2012).

Будучи космополитами, ЦБ являются типичными обитателями горячих источников, различных водоемов и почв, в том числе и загрязненных (Ефимова, Кузякина, 2004; Кузякина и др., 2007). Некоторые формы ЦБ могут жить даже при $pH = 4$ и ограничивать их существование могут только очень кислые среды, например, моховые болота, кислые сернистые источники (Whitton, Sinclair, 1975; Костяев, 2001). Редкие формы микроорганизмов существуют при низком освещении в пещерах, вокруг их нитей откладывается кальцит, и образуются редкие живые сталактиты (Громов, 2000).

Роль ЦБ в эволюции и существовании биосферы нашей планеты особенно значительна (Громов, 2000). ЦБ представляют собой обязательный компонент сообщества почвенных микроорганизмов и участвуют в почвообразовательном процессе. Вместе с другими бактериями они обогащают почву органическими веществами и азотом, а также обогащают водоемы и воздух кислородом (Домрачева и др., 2009). Водные формы бактерий являются пищей для мелких рыб и животных. Ряд видов ЦБ имеют пищевую ценность. Они продуцируют в процессе жизнедеятельности ценные вещества (белковые вещества, витамины, пигменты и др.), затем их сушат и готовят муку (Трефилова, 2008).

ЦБ отличаются различной степенью чувствительности к некоторым поллютантам. Известно, что вид *Nostoc commune* растет и развивается в среде, загрязненной нефтью (концентрация которой достигает 10% от массы почвы). Рост содержания нефти (от 1 до 4%) не ингибирует рост биоплёнок на поверхности, при этом активирует интенсивность спорообразования (Киреева и др., 2003).

Для некоторых видов ЦБ характерна устойчивость к воздействию тяжелых металлов (ТМ). Например, ЦБ, в частности *N. muscorum*, могут аккумулировать кадмий наряду с другими ТМ быстро и в больших количествах (Shi et al., 1998; Бреховских, 2006). Природные биопленки с доминированием *N. commune* и чистые культуры *N. paludosum* и *N. linckia* обладают высоким потенциалом

обезвреживания ТМ и способны очищать водные растворы от ионов меди (II) и никеля (II) (Фокина и др., 2012).

Выделяя в окружающую среду широкий спектр биологически активных веществ, ЦБ занимают особое место среди микроорганизмов. Среди этих веществ обнаружены производные алифатических терпенов, эфиры, терпеновые спирты, эфирные масла, летучие кислоты, альдегиды, фенолы, ауксины, сапонины, антибиотики, алкалоиды, фитогормоны (Sergeeva et al., 2002; Vardi et al., 2002; Кадырова, 2004; Volk, 2005; Asthana et al., 2006; Scholz, Liebezeit, 2006). Из-за этой особенности многие штаммы альгологически чистых культур ЦБ проявляют ростостимулирующие, протекторные и фунгицидные свойства, благодаря чему активно используются в сельском хозяйстве. Например, *Nostoc paludosum*, *N. linckia* и *Microchaeta tenera* угнетают популяции опасных фитопатогенных грибов р. *Fusarium* (Домрачева и др., 2003; Домрачева, 2005). Кроме того, препараты, в основе которых лежит использование смеси культур ЦБ (*N. paludosum*, *N. linckia* и *Microchaeta tenera*) активно используется в лесном хозяйстве, т.к. при обработке семян и корней способны усиливать прирост сеянцев и саженцев (Трефилова, 2008; Домрачева и др., 2008).

Известно, что ЦБ способны оказывать токсическое действие на млекопитающих, в том числе человека (Горюнова, Демина, 1974; Carmichael, 2001). Ряд ЦБ продуцирует в ходе своей жизнедеятельности аллелохимикаты, благодаря чему, ингибируют развитие конкурирующих водорослей, беспозвоночных и, в конечном итоге, рыбы (Gross, 2003; Berry et al., 2008). В литературе описаны виды, способные синтезировать специфические дермо-, гепато- и нейротоксины (цианотоксины), воздействующие на структуру популяций зоопланктона (коловраток и дафний) (Berry et al., 2008), вследствие чего, зоопланктон не использует ЦБ в качестве источника пищи (Gross, 2003), предпочитая последним зеленые водоросли. Цианобактерии рода *Nostoc* не выделяют цинотоксины или синтезируют их в ничтожно малых количествах.

Множество ЦБ, в частности, *Microcystis*, *Anabaena*, производят антибиотики с гербицидной активностью, препятствующие росту других ЦБ, водорослей и высших растений. Иногда ЦБ синтезируют антибиотики, подавляющие активность

грибков и гетеротрофных бактерий (Громов, 2000). Механизмы, за счет которых достигается весь этот набор уникальных свойств, крайне разнообразны.

Взаимоотношения ЦБ с другими организмами

Цианобактерии с момента своего появления обитали в форме симбиозов, с сапротрофной бактериальной микрофлорой, которая стабилизировала жизнедеятельность первичного ценоза. Именно способность входить в симбиотические отношения, создавать комплексы с различными про- и эукариотами стала основой для их выживания, широкого распространения и процветания в некоторых, даже самых неблагоприятных средах (Громов, 2000; Домрачева, 2005; Панкратова, Трефилова, 2007; Трефилова, 2008; Жегалло и др., 2011).

Объединенные вместе организмы создают единое целое со своими структурными и функциональными взаимосвязями (Домрачева, 2005). В природных условиях ЦБ редко обнаруживаются как монокультура, чаще они образуют сообщества с бактериями, другими видами ЦБ, микроводорослями, микромицетами, растениями (Штина, Панкратова, 1974; Андреюк и др., 1990; Сопрунова, 2005, 2006; Домрачева, 2005; Молекулярные основы..., 2005). Этот механизм осуществляется за счет наличия у ЦБ слизистых чехликов, колониальной слизи. Кроме того, для защиты ассоциантов от высыхания, действия токсичных веществ, а также для создания укрытия ЦБ выделяют различные внеклеточные вещества (полипептиды, полисахариды, ауксины, антибиотики, витамины и аминокислоты) (Fogg et al., 1973; Волошко, Пиневиц, 2014; Бреховских, 2006). В свою очередь, микроорганизмы – симбионты, обеспечивают ЦБ углекислотой, витаминами, поглощают кислород, выделяющийся в процессе фотосинтеза, разлагают сложные органические вещества (Юнг, 1967; Parker et al., 2000; Кокшарова, 2010).

Среди микроорганизмов, обитающих в сообществе с ЦБ, выделяют спутники и сопутствующие виды. Сопутствующие виды с ценозообразователем ценотическими связями не связаны, в свою очередь, микроорганизмы – спутники связаны с ЦБ биохимической специализацией, совместным использованием продуктов жизнедеятельности, влиянием на физико-химические условия среды

(Штина, Панкратова, 1974; Сопрунова, 2005; Домрачева, 2005). Общее число бактерий, сопутствующих водорослям и цианобактериям, может достигать значительных размеров и составляет половину и даже более их объема (Кондратьева и др., 1989). ЦБ выступают для бактерий в качестве постоянно возобновляющегося источника энергии. В свою очередь, бактерии активируют производство углекислого газа и снижают количество кислорода, разрушают органическое вещество вблизи клеток ЦБ, обеспечивают их витаминами (тиамином, рибофлавином и цианкобаламином) (Штина, Панкратова, 1974).

Цианобактериальные сообщества играют важное значение в различных геохимических, биологических и других процессах. Присутствие ЦБ сообществ улучшает водный режим песков, повышает их стабильность, что снижает риск возникновения эрозии почвы. Выделяемые органические кислоты участвуют в биогенном выщелачивании (Добровольский, 2003; Гусев, Минеева, 2005).

Подобный принцип взаимосвязи существует между ЦБ и растениями. При возникновении неблагоприятных условий среды растительно-цианобактериальные ассоциации имеют большие преимущества при выживании за счет взаимовыгодного существования. Отмечено, что их выживание обеспечивается не только увеличением устойчивости к действию поллютантов, но и выносом токсикантов из их среды обитания (Молекулярные основы..., 2005). Известно, что многие азотфиксирующие ЦБ способны обеспечивать растения азотом, в свою очередь, получая от них необходимые для нормальной жизнедеятельности полисахариды. Именно в корневой зоне растений идет процесс деградации поллютантов напрямую, благодаря ферментам и взаимосвязи и микроорганизмами ризосферы, или косвенно, через изменение окружающих условий (Scharader et al., 1999; Kamnev et al., 2001)

Таким образом, в зависимости от сообщества, ассоциантом которого являются ЦБ, происходит превращение окружающей среды в более пригодную для жизни.

1.5.2. Механизмы устойчивости цианобактерий к загрязненной среде

Стрессовые воздействия способны вызывать ответные реакции микроорганизмов, которые можно рассматривать как примеры адаптационных возможностей.

ЦБ – древнейшие организмы на Земле. Они смогли выжить в постоянно меняющихся условиях, заселить совершенно непригодные для других организмов среды. Цианобактерии обладают рядом важных характеристик: способностью азотфиксации (Кондратьева и др., 1989; Панкратова, 2001; Berman-Frank et al., 2004; Панкратова и др., 2008), к фото-, гетеро- и миксотрофии (Кузьменко, 1981), они приспособлены к изменениям pH среды, влажности, температуры, солености, образуют ассоциации с бактериями, микроводорослями, грибами (Молекулярные основы..., 2005; Трефилова, 2008; Артамонова и др., 2014). Зачастую это можно объяснить синтезом в пределах одного организма многочисленных приспособлений бактериальной клетки с главнейшими преимуществами высших растений (Горюнова и др., 1969; Молекулярные основы..., 2005).

Исключительные способности ЦБ достигаются рядом физиологических, морфологических и биохимических особенностей: способностью осуществлять кислородный и анакислородный фотосинтез, гетеротрофную фотоассимиляцию, фиксировать молекулярный азот, окислять соединения серы, разлагать многие органические субстраты, вступать в сообщества с другими организмами, вырабатывать определенные ферменты и т.д. (Quinn, 1998; Заварзин, 2003; Домрачева, 2005; Сопрунова, 2005).

Одной из наиболее интересных способностей ЦБ является способность к обезвреживанию токсикантов. Это происходит за счет определенного набора свойств:

1. *Образование биоплёнок.* Биоплёнки выполняют важнейшие функции в биосферных геохимических процессах (Николаев, Плакунов, 2007). При наступлении стрессовых условий способом защиты клеток является образование структурированных ценозов (Jefferson, 2004). Биопленки проявляют большую устойчивость к действию неблагоприятных факторов, чем отдельные виды ЦБ. При воздействии поллютанта на природные биоплёнки ЦБ его проникновение

затруднено в глубинные слои. Клетки, достаточно удалённые от поверхности, успевают перейти в устойчиво-адаптационное состояние (Szomolay et al., 2004). Установлено, при разрушении биоплёнки с доминированием ЦБ *Nostoc paludosum* ее устойчивость к ионам свинца резко снижается, что проявляется в сокращении титра клеток, количество же погибших клеток ЦБ возрастает в 8 раз (Домрачева и др., 2008).

2. *Интенсивное выделение внеклеточной слизи.* Образование гелеподобных слизистых частиц (полисахаридных или полипептидных) препятствуют проникновению токсикантов вглубь сообществ, обеспечивая высокую сорбционную способность (Parker et al., 2000; Шнюкова, 2005; Бреховских, 2006; Домрачева и др., 2009). Загрязнители из раствора связываются более полно при активном выделении слизи ЦБ (Tien Chien-Jund et al., 2005).

3. *Наличие веществ, связывающих токсиканты.* Тяжелые металлы способны активно собираться как липофильной фракцией клеток, так и полисахаридами (Лябушева, 2004; Бреховских, 2006). Для такого ТМ как кадмий, характерен следующий механизм детоксикации ЦБ: происходит ускоренный синтез и выделение во внешнюю среду полисахаридов измененной первичной структуры для дистанционной детоксикации ионов кадмия; трансформирование Cd^{2+} в менее токсичные частицы и кристаллиты CdS и Cd^0 на слизистой оболочке при участии бактерий-спутников, а также в клетках при помощи фикобилиновых пигментов и специфического металлсвязывающего белка, типа металлотионеина, синтез которого индуцируют ионы кадмия (Бреховских, 2006).

4. *Бактерии-спутники.* Биомасса бактерий-спутников составляет 3,4-12,3% по отношению к биомассе ЦБ, в зависимости от фазы роста, (Тиберкевич, 2001). Так, гетеротрофные спутники принимают участие в образовании в слизи ЦБ сульфидов ТМ (Москвитина и др., 2003). Известно, что многие бактерии спутники способны разлагать фосфорорганические соединения и используются в роли биологических деструкторов токсикантов (Завьялова и др., 2014). Штаммы этих бактерий содержат ферменты способные вызывать гидролиз поллютантов. Например, штамм *Tetrahymena thermophile* содержит органофосфорные ангидролазы, а *Pseudomonas diminuta* MG – фосфотриэстеразы для расщепления связи С–Р и

фермент – пропилфторфосфатаза для расщепления диизопропилфторфосфоната (Trapp, 1985; Attaway et al., 1987).

5. *Глутатион и ферменты глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы.* Данный механизм оказывает влияние на окислительно-восстановительное состояние поллютанта (Домрачева и др., 2009). Вероятно, глутатионовая система клетки первой реагирует на воздействие ТМ, с нее начинается образование металлсвязывающих белков – важного элемента защиты клеток (Саванина, 2003; Фокина и др., 2015).

6. *Образование в клетках нерастворимых сульфидов.* Подобным механизмом борьбы с действием загрязняющих веществ, в частности ТМ, обладают ЦБ *Plectonema boryanum* и *Nostoc muscorum* (Бекасова и др., 1999; Lengke et al., 2006).

7. *Ферментативная активность.* За счёт присутствия в клетках ферментов лакказы и полифенолоксидазы ЦБ *Phormidium valderianum* активно разлагает фенол (Shashirekha et al., 1997). Фосфорсодержащие вещества, в частности фосфонаты и метилфосфонаты, имеющие в своей структуре связь С–Р сложнее поддаются биологической деструкции, но некоторые грамотрицательные организмы содержат необходимые для этого ферменты: фосфонатаза (фосфоноацетальдегидгидролаза), специфически разлагающая 2-АЕР; фосфоноацетатгидролаза, расщепляющая фосфоноацетат; фосфонопируватгидролаза (Quinn, 1998) и С–Р-лиаза (Schowanek, Verstraete, 1990). Фермент С–Р-лиаза в интактных бактериальных клетках разлагает большое количество фосфонатов. Известно, что данный фермент, расщепляет неактивированные С–Р связи алкилфосфонатов, при этом образуются ортофосфаты и соответствующие алканы. Ортофосфат необходим всем видам бактерий и растений для нормальной жизнедеятельности. С–Р-лиазу не обнаруживают в бесклеточных экстрактах, так как она активна только в нативных клетках (Murata et al., 1988; Nakashita et al., 1992). Поскольку ферменты – это биологические катализаторы, для нейтрализации загрязненных территорий и вод требуется небольшое их количество. Важнейшим преимуществом ферментативных процессов детоксикации является их совместимость с любыми биологическими системами. Эта совместимость обуславливает экологическую

безопасность процесса ферментативной деструкции малых концентраций фосфорсодержащих отравляющих веществ и продуктов их детоксикации (Завьялова и др., 2014).

8. *Способность детоксифицировать среду своего обитания.* При высоких концентрациях токсичных металлов микроорганизмы активно поглощают ионы металлов (Vails, de Lorenzo, 2002; Фокина и др., 2015). Фактически виды бактерий способны к преобразованию ионов металлов и неметаллов до органометаллических и органонеметаллических лигандов внутри клетки, типа металлотионеинов (Vails, de Lorenzo, 2002; Фокина и др., 2015).

9. *Процессы биоосаждения* (Gadd, 2000; Vails, de Lorenzo, 2002). При работе ферментных систем, одна форма металла преобразуется в другую, при этом образуется осадок. Нерастворимое металлосодержащее вещество осаждается в виде ионов металлов, объединённых с различными анионами, образующимися при метаболизме клетки (Kotrba, Ruml, 2000). Например, *Citrobacter* sp. может накапливать высокие уровни урана, никеля и циркония путём формирования осадков фосфатов металлов (Basnakova, Macaskie, 1999).

10. *Физико-химическое взаимодействие.* Механизмы связывания металла на поверхности клетки включают электростатические взаимодействия, ван-дер-ваальсовы силы, ковалентное взаимодействие и комбинацию этих процессов (Beveridge, Fyfe, 1985; Flemming, 1995). За биосорбцию кобальта морскими водорослями могут быть ответственны электростатические взаимодействия (Kuuyusak, Volesky, 1989). Отрицательно заряженные группы, такие, как карбоксильные, гидроксильные, фосфорильные группы клеточной оболочки бактерий, адсорбируют катионы металлов силами электростатического поля. Такой вид сорбции происходит быстро, обратимо, часто не зависит от температуры и энергетического метаболизма (Фокина и др., 2015).

1.5.3. Особенности взаимодействия между микроорганизмами и высшими растениями

В природе грибы, бактерии, вирусы и, в некоторых случаях, археи образуют с высшими растениями многоорганизменные сообщества. От того, какие виды

микробов и в каком количестве заселяют поверхность и внутренние части растений зависят их продуктивность и здоровье (Антонюк, 2010). Растения выступают для микроорганизмов в качестве экологической ниши. Подобные взаимоотношения могут формироваться по типу антагонизма, а могут проявлять признаки симбиотического сосуществования (Игнатов, 2005).

Количество и качественный состав корневых выделений зачастую определяет разнообразие растительно-микробных сообществ, которые также зависят от условий выращивания растения, его вида, возраста, а также от влияния эдафических и климатических факторов (Lynch, 1996; Кравченко, 2000; Bais et al., 2006). В свою очередь, под действием микробиологической активности в ризосфере происходит изменение физико-химических характеристик этой зоны и идет синтез биологически активных для растений продуктов жизнедеятельности бактерий. Ризобактерии формируют на корнях сложные многовидовые комплексы, которые с растениями формируют единые растительно-микробные системы (ассоциации) с новыми свойствами, детерминированными положительным взаимодействием партнеров (PGPR, 2005; Bais et al., 2006; Бухарин и др., 2007).

Выделяют микробно-растительные комплексы трофического типа, поддерживающие питание растений, и защитные – снижающие восприимчивость растений к фитофагам и патогенным микробам (Проворов, 2002; Шапошников и др., 2011). Сами же микроорганизмы тоже имеют механизмы защиты от стресс-факторов, предохраняющие отдельные клетки и сообщество в целом, например, покрытие поверхности корней слизеподобным слоем (Lugtenberg et al., 2001).

При ассоциации с растениями эндофитные и ризосферные микроорганизмы способны проявлять ряд полезных для растительно-микробного сообщества свойств (Шапошников и др., 2011; Максимов и др., 2015):

1. Продукция антибиотиков липопептидной природы, подавляющих рост чужеродной микрофлоры.
2. Продукция сидерофоров и хелаторов, способствующих усилению поглощения растениями макро- и микроэлементов, включая кальций, железо, либо наоборот, способные изолировать токсичные тяжелые металлы или органические вещества (в т.ч. вырабатываемые патогенами).

3. Продукция веществ, переводящих фосфор из нерастворимых форм в растворимые, кроме того, усиление способности бактерий-азотфиксаторов задерживать азот из атмосферы (Егоршина, 2011; Akansha et al., 2015).
4. Продукция ферментов, деградирующая клеточные стенки патогенов, а также их токсины.
5. Продукция регуляторов роста, различных сигнальных молекул и регуляция фитогормонального статуса растений (Максимов, 2009; Егоршина и др., 2012).
6. Продукция ферментов, способствующих ингибированию синтеза этилена в растениях.
7. Индукция защитной системы растений и праймирование защитных генов.
8. Регуляция про-антиоксидантного статуса в тканях растений, в том числе за счет синтеза каталаз, оксидаз, органических кислот (Максимов, 2010).

Помимо полезных свойств, микроорганизмы в растительно-микробных ассоциациях способны проявлять и отрицательное влияние. Например, некоторые эндофиты продуцируют алкалоиды. Эндофиты овсяницы, ржи и ряда других злаковых продуцируют токсический алкалоид, который может приводить к болезни и даже гибели животных (Bush et al., 1997).

С 70-х годов XX века известно, что ряд бактерий в растительно-микробных комплексах способны активировать рост и развитие растений, с тех пор ассоциативные бактерии активно изучаются (Montesinos, 2003; Трефилова, 2008). На сегодняшний день список бактерий, положительно влияющих на растения, ширится благодаря исследованиям (Артамонова и др., 2014).

Способность бактерий – интродуцентов активно заселять корни и поддерживать нужную численность популяции – это одно из главных условий плодотворного взаимодействия колонизирующих ризобактерий и растений (Bais et al., 2006; Kiraly et al., 2007). За колонизацию корней ризобактериями отвечает множество растительных и бактериальных генов, кроме того, заселение ризосферы микроорганизмами – это сложный энергоемкий и мультистадийный процесс (Kiraly et al., 2007). Он может иметь несколько стадий: хемотаксис к ризосферным экзометаболизмам; адсорбцию; создание микроколоний в местах

активной экссудации корневых метаболитов, перемещение вдоль поверхности корня и конкуренцию с другими микробами (Kiraly et al., 2007).

ЦБ проявляют свойства, защищающие растения в растительно-цианобактериальных комплексах от воздействия стрессовых факторов, а также повышающие иммунитет растений. Практически нет растений не поражаемых одним из наиболее агрессивных и опасных фитопатогенов – фузариями (Домрачева, 2005). Усиливать патогенный эффект фузарий способно поражение растений другими грибами, загрязнение воздуха, например, озоном (Diehl, Fehrmann, 1989), а также возникновение паразитического эпистазиса – образование патоконспекса фузариума с другими фитопатогенами (Sidhu, 1984) и др. Химические препараты, используемые для борьбы с фузариями, угнетая развитие гриба в тканях растений, часто стимулируют образование хламидоспор, что делает бесперспективной борьбу с грибом с помощью пестицидов (Lutz, 1986). Однако ЦБ *Nostoc paludosum*, *N. linckia* и *Microchaeta tenera* проявляют ярко выраженный фунгицидный эффект (Домрачева, 2005). При этом, вещества, продуцируемые ЦБ (антибиотики и противогрибковые вещества), не проникают в растения, в отличие от химических пестицидов, поэтому при данном способе обработки можно получить безопасные продукты питания.

Известно, что цианобактериальная предпосевная обработка семян злаков, бобовых, хвойных культур, а также сеянцев сосны и ели приводит к образованию цианобактериального чехла на поверхности корней (Домрачева и др., 2001, 2003, 2004). Специфика морфологии и физиологии ЦБ состоит в том, что, размножаясь, они образуют пленки определенной текстуры, напоминающие растительную ткань, которая состоит из множества переплетенных нитей, которые с большим трудом отделяются друг от друга. Выделяемая слизь обладает склеивающим действием по отношению к любому субстрату: будь то почва, камни, стекло или поверхность корня. Кроме того, при инокулировании проростков пшеницы в гидропонной системе ЦБ *Nostoc* sp. проникали в корни. Они были обнаружены в межклеточных пространствах и внутри эпидермальных и кортексных клетках растения (Gantar, 2000). Подобно микоризе, цианориза затрудняла попадание патогенов внутрь корня.

Таким образом, ЦБ в любой из форм (монокультура, искусственные цианобактериальные ценнозы, природные биоплёнки, цианобактериально-растительные комплексы) крайне перспективны для создания новых методов и технологий реабилитации загрязненных сред, однако они до сих пор не до конца изучены. Кроме того, методы цианобактериальной биоремедиации являются практически безопасными для окружающей среды.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика объектов исследования

Объектами исследования были высшие растения (ячмень сорта Новичок), ЦБ, а также природные многовидовые БП.

Опыты проводили на альгологически чистых культурах ЦБ *N. linckia*, *N. muscorum* и *N. paludosum* и многовидовых биопленках с доминированием *N. commune*. Культуры предоставлены кафедрой биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии Вятской государственной сельскохозяйственной академии (ВятГСХА) из коллекции микроорганизмов.

***Nostoc linckia* (Roth.) Born and Flah.** № 271. Колонии сначала шаровидные, потом неправильно распростертые, слизистые, синевато-зеленой, грязно-зеленой или коричневой окраски. Влагалища бесцветные, ясно заметные только на периферии колоний. Сильно извитые трихомы, густо переплетающиеся, бледно-синезеленые, 3,5 – 4 (4,7) мкм в ширину. Клетки боченкообразные, длина их равна, несколько меньше или больше ширины, 6 – 7 мкм ширины и 7 – 8 мкм длины, с гладкой коричневой или, очень редко, бесцветной оболочкой (Голлербах и др., 1953). Была выделена Ковиной А.Л. из дерново-подзолистой почвы вблизи г. Кирова и поддерживается в альгологически чистой культуре. Для культуры *N. linckia* характерен высокий уровень сорбционных возможностей по отношению к Cu и Ni. Предварительная обработка семян горчицы *N. linckia* приводила к усилению фиторемедиационных способностей растения, что проявилось в усиленном извлечении ионов меди растением из почвы (Фокина и др., 2011; Горностаева и др., 2012).

***Nostoc paludosum* Kütz.** №18. Колонии микроскопические, мелкие или едва заметные простым глазом, до 0,5 мм в поперечнике, слизистые, без крепкого перидерма, сине-зелёной или желтоватой окраски. Трихомы рыхлолежащие, бледно-синезеленые, (2,5) 3,0 – 3,5 (4,0 – 4,5) мкм ширины. Клетки боченкообразные, реже эллипсоидные 4,6 мкм ширины. Споры эллипсоидные, реже – почти шаровидные, 4,0 – 4,5 мкм ширины и 6 – 8 мкм длины, с гладкой бесцветной или слегка коричневой оболочкой (Голлербах и др., 1953). Был

выделен Перминовой Г.Н. из дерново-подзолистой почвы (Кировская область). Является широкораспространенным видом азотфиксирующих ЦБ в природных и антропогенно-измененных почвах. Он обладает высокой скоростью роста, может массово размножаться на поверхности почвы, и вызывать ее «цветение». Для данного штамма доказана способность восстанавливать супрессивность химически и микологически загрязненных почв (Домрачева, 2005; Домрачева и др., 2008).

Nostoc muscorum Ag. №13. Колонии сначала шаровидные, потом плоско распространенные, 2 – 5 см в поперечнике. Влагища хорошо заметны только на периферии, желто-коричневые. Трихомы тесно переплетающиеся, 3 – 4 мкм ширины. Клетки коротко боченкообразные или цилиндрические, иногда длина их до 2 раз превышает ширину. Гетероцисты почти шаровидные, 6 – 7 мкм в диаметре. Споры удлиненные, 4 – 8 мкм ширины и 8 – 12 мкм длины, с гладкой желтой оболочкой (Голлербах и др., 1953). В природе является свободноживущим граматрицательным микроорганизмом, который заселяет как наземные экосистемы, так и пресноводные водоемы (Cameron, 1960; Blumwald, 1982). Для *N. muscorum* характерны нитевидные клетки, зелено-коричневого цвета, которые могут образовывать споры в условиях усыхания (Allison et al., 1937). Активно осуществляют процесс фотосинтеза и фиксацию атмосферного азота (Allison et al., 1937). Идеальной средой для обитания *N. muscorum* является pH в диапазоне от 7,0 до 8,5, с нижним пределом pH 5,7 (Blumwald, 1982). Почвы инокулированные *N. muscorum* проявляют большую устойчивость к деградации во время смачивания и физического разрушения (Rogers, Burns, 1994). Эта особенность может помочь предотвратить эрозию почвы, а также способствует повышению вероятности прорастания семян в почвах, содержащих *N. muscorum* (Cameron, 1960; Rogers, Burns, 1994). Оригинатор вида – А.Н. Третьякова из черноземов Курской области.

Многовидовые биопленки с доминированием азотфиксирующей гетероцистной ЦБ *N. commune* были отобраны у железной дороги в г. Дзержинске Л.В. Кондаковой (2006 г.). Основа видового состава биопленки: *Nostoc commune*

(доминирующий вид), *Nostoc punctiforme*, *Leptolyngbya foveolarum*, *Plectonema nostocorum*. *N. commune* – многовидовые структурированные сообщества с большой плотностью клеток организмов различных систематических уровней. Для сообщества характерна высокая связь между организмами, которая обеспечивается за счет высокого уровня физических контактов. Эти контакты возможны благодаря выделяемой слизи, а также агрегацией вследствие наличия нитчатых и мицелиальных форм. *N. commune* один из самых активных колонизаторов пространства. Относится к космополитам, обитающим в любом регионе планеты (Домрачева и др., 2007). *N. commune* отличается повышенной световыносливостью и засухоустойчивостью. В природе в условиях засухи его корочки содержат всего 1,7% воды. При обезвоживании у *N. commune* сохраняется вся организация клетки, происходит гелификация цитоплазмы при полном сохранении жизнеспособности (Генкель, Левина, 1975). Показана высокая устойчивость *N. commune* к загрязняющим веществам (Голлербах, Штина, 1969). Данный вид может развиваться и расти при загрязнении почвы нефтью (до 10% от массы почвы) (Киреева и др., 2009). Благодаря уникальным экологическим характеристикам *N. commune* способен становиться эдификатором многовидовых биопленок с широким спектром гетеротрофных спутников (Domracheva et al., 2006).

В качестве второго объекта исследования использовали растения ячменя сорта Новичок. Выбор объекта исследования обусловлен, в первую очередь, высокой хозяйственной ценностью ячменя. Ячмень широко применяют в пищевой промышленности, для производства кормов для животных (используют до 70% урожая ячменя) (Губанов, 2002).

***Hordeum distichon* L.** (ячмень двурядный), однолетнее растение семейства Злаковые (*Poaceae*). Данный сорт ячменя создан методом отбора из сложной гибридной популяции второго поколения Адам×Дуэт. Разновидность нутанс. Средняя высота растения – 71 см. Окраска листа от зеленой до темно-зеленой. Тип куста промежуточный. Зерновка пленчатая. Нервы наружной цветковой чешуи отличаются антоциановой окраской. Отличительные черты сорта –

высокая общая и продуктивная кустистость, причем по количеству стеблей и облиственности он выделяется еще в период кущения, устойчивость к черной и твердой головне, средняя восприимчивость к корневой гнили, стабильная урожайность (Головки и др., 2004). Сорт Новичок характеризуется устойчивостью к ионам Al^{3+} на кислых почвах. Это первый в России алюминотолерантный сорт ярового ячменя (Родина и др., 2007).

2.2. Методика проведения опытов

Для проведения экспериментов природные БП смешанного состава с доминированием ЦБ *N. commune* и альгологически чистые культуры ЦБ предварительно выращивали при 12-ти часовом освещении (3000 лк) и температуре $+25^{\circ}C$ на жидкой среде Громова №6 без азота. Перед проведением опытов БП и ЦБ разбивали с получением суспензии клеток (суспендировали). Титр клеток ЦБ и БП определяли с использованием камеры Горяева (Практикум по микробиологии..., 2005). Цианобактерии выбирались по возрасту и титру клеток в фазу экспоненциального роста. Возраст БП исчислялся с момента внесения сухой пленки в питательную среду Громова.

Растворы готовили из МФК, содержащей 98% действующего вещества.

Для приготовления растворов ГЛ использовали гербицид Глифор Кирово-Чепецкой химической компании с содержанием действующего вещества (N-фосфонометилглицина) 360 г/л.

Влияние метилфосфоновой кислоты и глифосата на показатели жизнедеятельности цианобактерий и многовидовых биопленок

ЦБ и БП гомогенизировали и инкубировали на растворах МФК и ГЛ в течение суток. Через 24 часа определяли содержание хлорофилла *a* и активность ПОЛ в клетках ЦБ. Контроль – дистиллированная вода.

Опыт 1. Изучали токсичность МФК для БП *N. commune* в широком диапазоне концентраций: $1 \cdot 10^{-5}$; $1 \cdot 10^{-4}$; $2,5 \cdot 10^{-4}$; $5 \cdot 10^{-4}$; $7,5 \cdot 10^{-4}$; $1 \cdot 10^{-3}$; $4 \cdot 10^{-3}$; $8 \cdot 10^{-3}$; $4 \cdot 10^{-2}$; $1 \cdot 10^{-1}$ моль/л. Возраст БП – 8 недель. Биомасса ЦБ – 0,013 г/мл.

Опыт 2. Изучали влияние МФК на альгологически чистые культуры ЦБ *Nostoc linckia*, *Nostoc muscorum* и *Nostoc paludosum* в концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$; $2,5 \cdot 10^{-4}$; $5 \cdot 10^{-4}$; $7,5 \cdot 10^{-4}$; $1 \cdot 10^{-3}$; $4 \cdot 10^{-3}$; $8 \cdot 10^{-3}$; $4 \cdot 10^{-2}$; $1 \cdot 10^{-1}$ моль/л. Возраст культур 10 недель. Титр *N. linckia* – $1,4 \cdot 10^8$ кл./мл; *N. paludosum* – $1,7 \cdot 10^8$ кл./мл; *N. muscorum* – $1,9 \cdot 10^8$ кл./мл.

Опыт 3. Изучали влияние ГЛ на биопленки ЦБ с доминированием *Nostoc commune*. Концентрация действующего вещества в тестируемых растворах: $1 \cdot 10^{-4}$; $2,5 \cdot 10^{-4}$; $5 \cdot 10^{-4}$; $1 \cdot 10^{-3}$; $2,5 \cdot 10^{-3}$; $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Возраст культуры 7 недель. Титр БП – $1,4 \cdot 10^8$ кл./мл.

Опыт 4. Изучали действие ГЛ на альгологически чистые культуры ЦБ *Nostoc linckia*, *Nostoc muscorum* и *Nostoc paludosum* в концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$; $2,5 \cdot 10^{-4}$; $5 \cdot 10^{-4}$; $7,5 \cdot 10^{-4}$; $1 \cdot 10^{-3}$; $4 \cdot 10^{-3}$; $8 \cdot 10^{-3}$; $4 \cdot 10^{-2}$; $1 \cdot 10^{-1}$ моль/л. Возраст культур 4 недели. Титр *N. linckia* – $1,6 \cdot 10^8$ кл./мл; *N. paludosum* – $1,7 \cdot 10^7$ кл./мл; *N. muscorum* – $1,5 \cdot 10^7$ кл./мл.

Влияние цианобактериальной интродукции (добавление в среду выращивания) и метилфосфоновой кислоты на жизнедеятельность растений ячменя, выращенных в условиях водной культуры

Семена в течение 7 дней проращивали на дистиллированной воде в чашках Петри. Далее проростки пересаживали в водную культуру, для приготовления которой использовали питательный раствор Кнопа. Варианты опыта: питательный раствор Кнопа (контроль); раствор Кнопа с добавлением ЦБ (К+ЦБ); растворы МФК, приготовленные на растворе Кнопа ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л.); и аналогичные растворы МФК, на растворе Кнопа с добавлением гомогенизированной суспензии культур ЦБ. На 14-й день опыта определяли активность процессов ПОЛ в листьях и корнях растений, содержание пластидных и антоциановых пигментов, линейные показатели роста.

Опыт 5. Титр *N. linckia* в водном субстрате – $8,7 \cdot 10^4$ кл./мл. Возраст культуры ЦБ 8 недель.

Опыт 6. Титр *N. muscorum* в водном субстрате – $1,4 \cdot 10^5$ кл./мл. Возраст культуры ЦБ 10 недель.

Эффекты цианобактериальной инокуляции семян при проращивании на растения ячменя в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой (водная культура)

Семена опытных растений культивировали в чашках Петри на дистиллированной воде в присутствии гомогенизированной суспензии культур ЦБ и без них в течение 7 дней. В дальнейшем проростки пересаживали в сосуды в водную среду, в качестве которой использовали питательный раствор Кнопа (контроль), растворы МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л), приготовленные на растворе Кнопа. На 14-й день определяли активность ПОЛ в листьях и корнях растений, содержание пластидных и антоциановых пигментов, линейные показатели роста.

Опыт 7. Возраст культуры ЦБ *N. muscorum* – 9 недель, титр $6,5 \cdot 10^7$ кл./мл.

Опыт 8. Возраст культуры ЦБ *N. linckia* – 9 недель, титр – $4,6 \cdot 10^7$ кл./мл.

Опыт 9. Возраст культуры биопленки ЦБ с доминированием *N. commune* – 8 недель, титр – $1,6 \cdot 10^8$ кл./мл.

Влияние цианобактериальной инокуляции семян при проращивании на жизнедеятельность растений ячменя в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой (опыты на песчаном субстрате)

Семена ячменя культивировали в чашках Петри на дистиллированной воде в присутствии гомогенизированной суспензии культур ЦБ и без них. Семидневные проростки ячменя пересаживали в сосуды с песчаный субстрат. Песок однократно увлажняли растворами МФК (0,01 и 0,05 моль/л) до 60 % от полной влагоемкости, в дальнейшем увлажнение субстрата поддерживалось добавлением питательного раствора Кнопа. Растения контрольного варианта поливали питательным раствором Кнопа. Для экспериментов на песке использовали раствор МФК большей концентрации, чем для опытов на водной культуре, что обусловлено

поглощательной способностью песчаного субстрата. На 14-й день определяли содержание пластидных пигментов и антоцианов в листьях, активность процессов ПОЛ в корнях и листьях, а также линейные показатели роста.

Опыт 10. Возраст культуры ЦБ *N. linckia* 5 недель. Титр $4,7 \cdot 10^7$ кл./мл.

Опыт 11. Возраст культуры ЦБ *N. muscorum* 6 недель. Титр $6 \cdot 10^7$ кл./мл.

Опыт 12. Возраст культуры ЦБ *N. paludosum* 5 недель. Титр $2,6 \cdot 10^7$ кл./мл.

Опыт 13. Возраст биопленки ЦБ *N. commune* 4 недели. Титр $4 \cdot 10^7$ кл./мл.

2.3. Методики исследования

Изучение биохимических показателей цианобактерий

Определение интенсивности процессов перекисного окисления липидов

Интенсивность процессов ПОЛ в клетках ЦБ определяли по общепринятой методике (Лукаткин, 2002), которая была адаптирована нами для работы с микрофототрофами. Суспензию, содержащую клетки ЦБ (1 мл) гомогенизировали с добавлением 3 мл среды выделения (0,1 моль/л трис-HCl буфер, pH= 7,6, содержащий 0,35 моль NaCl). К полученному гомогенату вносили 2 мл раствора 0,5% тиобарбитуровой кислоты (ТБК) в 20% трихлоруксусной кислоты (ТХУК). Полученную смесь выдерживали в течение 30 минут на кипящей водяной бане вместе с контролем (среда выделения ТБК+ТХУК). Для получения надосадочной жидкости полученные растворы центрифугировали 5 минут при 4000 об./мин. Оптическую плотность центрифугата определяли на спектрофотометре «Specol 1300» (Германия) при длине волны 532 нм.

Определение хлорофилла а в клетках цианобактерий

Исследование проводили по общепринятой методике (Aminot, Rey, 2000). В клетках ЦБ содержатся лишь хлорофилл *a* (81%), участвующий в процессе фотосинтеза и обеспечивающий поглощение света до 750 нм. В основе метода – определение оптической плотности экстракта пигмента. Для приготовления экстракта пробу цианобактериального материала (0,7 – 1 мл) центрифугировали, осадок гомогенизировали в фарфоровой ступке. Пигменты экстрагировали из гомогената ацетоном. Для нейтрализации кислот клеточного сока к ацетону

добавляли карбонат кальция, что способствовало предотвращению образования феофетина. Полученный раствор центрифугировали для удаления остатков клеток. содержание хлорофилла *a* определяли в надосадочной жидкости при длинах волн 665 нм и 750 нм. После измерений в кювету с экстрактом добавляли 0,2 мл соляной кислоты (1%) и через 2 – 3 минуты повторяли измерения для определения уровня феофитина. В качестве стандарта – 100% ацетон.

Изучение показателей жизнедеятельности растений ячменя

Определение интенсивности перекисного окисления липидов в листьях и корнях ячменя

Активность процессов ПОЛ оценивали по накоплению в клетках малонового диальдегида (МДА), который образует окрашенное соединение с тиобарбитуровой кислотой (Лукаткин, 2002). Навеску сырой ткани (0,6 г) измельчали в 10 мл среды выделения (0,1 моль/л ТРИС-HCl буфер pH=7,6, содержащий 0,35 моль/л NaCl). К полученному гомогенизату (3 мл) добавляли 2 мл 0,5% тиобарбитуровой кислоты в 20% трихлоруксусной кислоте и выдерживали в кипящей водяной бане 30 мин вместе с контролем (среда выделения + ТБК с ТХУК). Далее растворы фильтровали и определяли оптическую плотность фильтратов на спектрофотометре «Spescol 1300» (Германия) при длине волны 532 нм.

Определение содержания пластидных пигментов

Определение фотосинтетических пигментов (хлорофилл *a*, *b* и каротиноиды) в листьях растений ячменя проводили по общепринятой методике (Шлык, 1971). Пробу листьев (150 – 200 мг) фиксировали кипящим ацетоном. Перед проведением анализа в фарфоровой ступке измельчали зафиксированную пробу с добавлением ацетона. Для оптимизации pH среды выделения добавляли карбонат кальция (CaCO_3), для обезвоживания пробы – сульфат натрия (Na_2SO_4).

Использовали несколько порций ацетона, сливая каждую предыдущую порцию через стеклянный фильтр, укрепленный в колбе Бунзена с вакуумным насосом. Объединенные порции экстракта переносили в мерную колбу.

Оптическую плотность экстракта измеряли на спектрофотометре при длинах волн 662, 644 (хлорофиллы) и 440,5 нм (каротиноиды) в кювете с толщиной слоя 1 см. Контроль – 100% ацетон.

Определение антоциановых пигментов

Выделение и количественное определение вакуолярных пигментов проводили по методике Д.А. Муравьевой (Муравьева и др., 1987). Навеску листьев (0,15 г) измельчали и переносили в колбу с добавлением 10 мл 1% HCl. Полученный гомогенат выдерживали на водяной бане ($t=40 - 45\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 20 минут. Вытяжку фильтровали через бумажный фильтр. Оптическую плотность раствора определяли на спектрофотометре при длинах волн 510 и 657 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Содержание суммы антоцианов рассчитывали с применением удельного показателя поглощения цианидин-3,5-дигликозида в 1% - ном водном растворе HCl, который равен 453.

Определение показателей линейного роста органов ячменя

Отбирали по 20 растений каждого варианта для изучения влияния МФК на ростовые процессы. Растения разделяли по органам, измеряли длину побегов и корней.

2.4. Статистическая обработка результатов исследований

Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов (Лакин, 1972). На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические величины со стандартным отклонением.

При статистической обработке данных было рассчитано среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации полученных данных.

Важной характеристикой варьирующих признаков является средняя величина. Её значение заключается в свойстве нивелировать индивидуальные различия, в результате чего выступает более или менее устойчивая числовая характеристика признака – не отдельных представителей, а целой группы статистических единиц. Из всех параметрических средних наиболее часто

применяется средняя арифметическая (\bar{x}) представляющая частное от деления суммы всех вариант совокупности на их общее число (формула 1):

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (1)$$

Стандартное (среднеквадратическое) отклонение $S(x)$ показывает, на какую в среднем величину отклоняются результаты n измерений от среднего результата \bar{x} или истинного x (формула 2).

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2)$$

Чтобы стандартное отклонение могло быть использовано в качестве меры сравнения вариабельности признаков, его принято выражать в процентах от средней арифметической. Полученный таким образом показатель оказывается числом относительным, выражающим изменчивость признаков в %, его называют коэффициентом вариации и рассчитывают по формуле 3:

$$\partial = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad (3)$$

Коэффициент вариации может изменяться от 0 до 100 %. В статистике совокупности, имеющие коэффициент вариации больше 30–35 %, принято считать неоднородными.

Отношение числа случаев, в которых происходит некоторое событие, к общему числу рассматриваемых случаев называется доверительной вероятностью (статистической надежностью) P , она составляет: 0,68 (68%), 0,95 (95%), 0,99 (99%). Обычно при оценке экспериментальных данных принимают $P = 95\%$.

При доверительной вероятности $P = 95\%$ находят T -критерий Стьюдента по формуле 4:

$$T = \frac{t_{k.p} \cdot S}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

При числе степеней свободы $k=n-1$. Полученные значения T -Стьюдента сравнивают с данными таблицы, приведенной в аналитических справочниках. В зависимости от этих данных говорят о достоверности результатов эксперимента.

ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ГЛИФОСАТА НА ПОКАЗАТЕЛИ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЦИАНОБАКТЕРИЙ И МНОГОВИДОВЫХ БИОПЛЕНОК

Известно, что внешние факторы способны активировать в ЦБ стресс-Реакцию (Parker et al., 2000; Горностаева и др., 2012). Однако благодаря разнообразным физиологическим особенностям ЦБ способны выдерживать значительные стрессовые нагрузки, что неоднократно подтверждалось исследованиями (Панкратова, 2001; Домрачева, 2005; Ашихмина и др., 2007; Фокина и др., 2011). В ответ на действие стрессоров в клетках ЦБ происходят биохимические и морфологические изменения (увеличение биомассы, толщины клеточных стенок, создание агрегатов клеток, накопление водорода, активных форм кислорода и др.) (Лось, 2012; Шлык-Кернер и др., 2014). Поэтому показатели жизнедеятельности ЦБ могут быть хорошими индикаторами токсичности веществ и качества окружающей среды.

Известно, что действие неблагоприятных факторов на фототрофные организмы вызывает интенсификацию окислительных процессов, накопление активных форм кислорода, что приводит к окислительным повреждениям макромолекул (Veronesi et al., 1996; Лукаткин, 2002; Кошкин, 2010). Ранее было показано, что поллютанты разной химической природы (тяжёлые металлы, хлорид натрия, трефлан, бензин) вызывают возрастание интенсивности процессов перекисного окисления липидов в клетках ЦБ (Фокина и др., 2012).

Биопленки ЦБ являются древнейшими микробными разрастаниями, которые занимают различные биотопы и способны выживать в экстремальных условиях (Levit et al., 1999). *N. commune* – вид, способный образовывать многовидовые биопленки с другими ЦБ, водорослями, бактериями, грибами и беспозвоночными. Он проявляет высокую сорбционную способность по отношению к ряду поллютантов, в частности, к ТМ (Штина, Голлербах, 1976; Патова и др., 2000; Закирова, 2006; Домрачева и др., 2007). Биопленки ЦБ приспособлены к изменениям природной среды (изменения влажности, температуры, давления и т.д.) за счет наличия межклеточного слизистого

матрикса, наличие спектра гетеротрофных спутников, разнообразию видов в биопленке и др. (Домрачева, 2005; Домрачева и др., 2007).

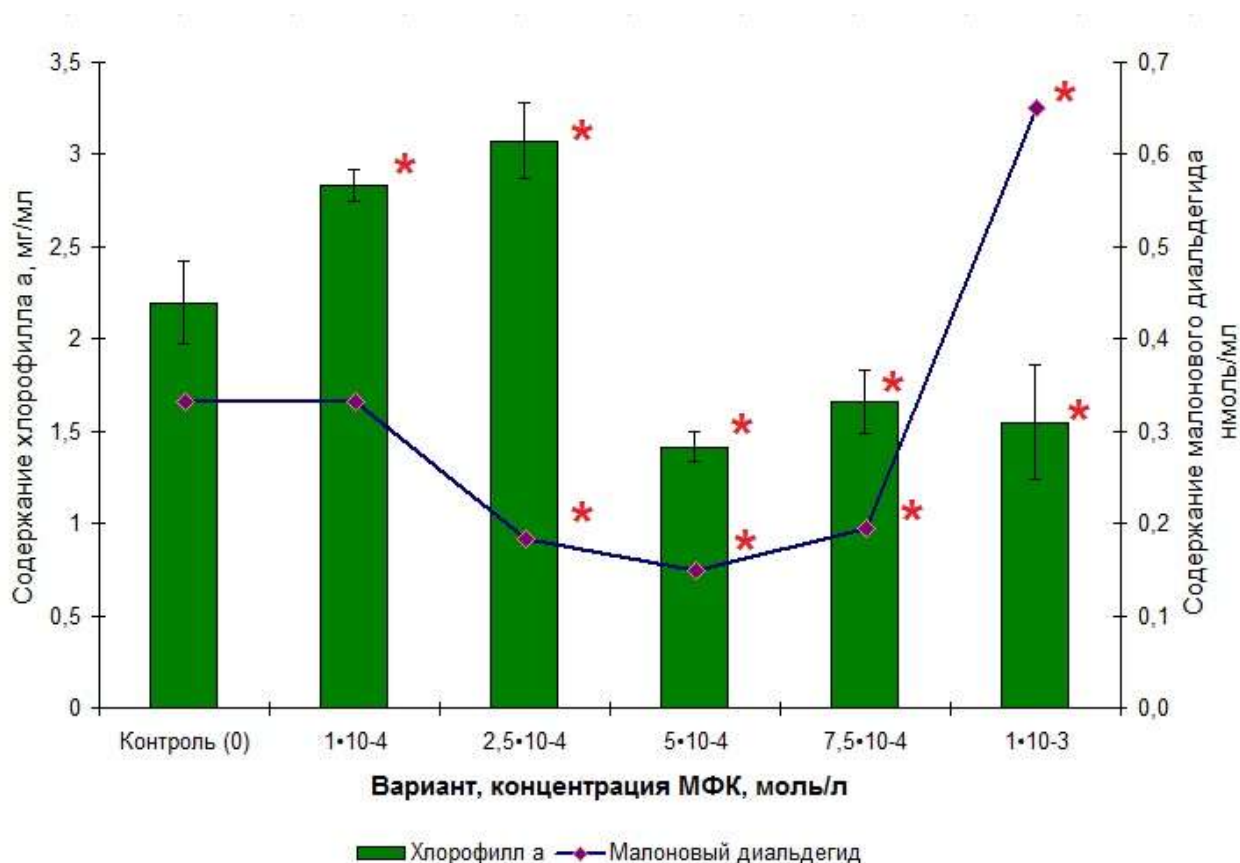
3.1. Действие метилфосфоновой кислоты на альгологически чистые культуры цианобактерий и многовидовые биопленки с доминированием *Nostoc commune*

Ответные реакции культур цианобактерий на действие метилфосфоновой кислоты (опыт 1)

Изучали эффекты МФК в широком диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-1}$ моль/л на альгологически чистые культуры ЦБ: *N. paludosum*, *N. linckia*, *N. muscorum*. Установлено, что МФК в концентрациях $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л и более оказывала летальное действие на клетки ЦБ, что проявилось в нарушении фотосинтетических мембран и разрушении хлорофилла.

МФК в концентрациях ниже, чем $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л, не приводила к гибели ЦБ *N. paludosum*, однако инициировала изменения в содержании хлорофилла *a* (рис. 4). МФК ($1 \cdot 10^{-4} - 2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) вызывала возрастание уровня хлорофилла *a* в клетках ЦБ по сравнению с контролем. В вариантах с действием МФК ($5 \cdot 10^{-4} - 7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) отмечали снижение накопления пигмента.

Снижение уровня хлорофилла *a* в клетках ЦБ сопровождалось активацией процессов ПОЛ. Отмечено достоверное возрастание активности ПОЛ в клетках *N. paludosum* ($P \geq 0,05$) под влиянием МФК самой высокой концентрации ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (рис. 4). МФК в более низких концентрациях $2,5 \cdot 10^{-4} - 7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, напротив, вызывала снижение интенсивности процессов ПОЛ. Ранее подобные эффекты были выявлены в опытах с высшими растениями, где снижение интенсивности ПОЛ сопровождалось активацией антиоксидантных ферментов (Аюшинова, 2015).



Примечание: здесь и далее * — различия с контролем достоверны при $P \geq 0,05$

Рис. 4. Содержание хлорофилла *a* и малонового диальдегида в клетках *Nostoc paludosum* через сутки после инкубации на растворах метилфосфоновой кислоты

При изучении ответных реакций ЦБ *N. linckia* на действие МФК было установлено, что МФК практически во всех вариантах опыта индуцировала накопление хлорофилла *a* в клетках ЦБ (рис. 5). Под влиянием МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) содержание хлорофилла *a* в ЦБ было значительно ниже, чем в других вариантах опыта, исключая контроль. Противоположным образом менялась интенсивность процессов ПОЛ. При воздействии МФК отмечали снижение уровня МДА в клетках *N. linckia* в среднем в 2 раза по сравнению с контролем. Выявлена тесная отрицательная корреляция ($r = -0,84$) между содержанием хлорофилла *a* и интенсивностью процессов ПОЛ в клетках культуры *N. linckia* при действии МФК.

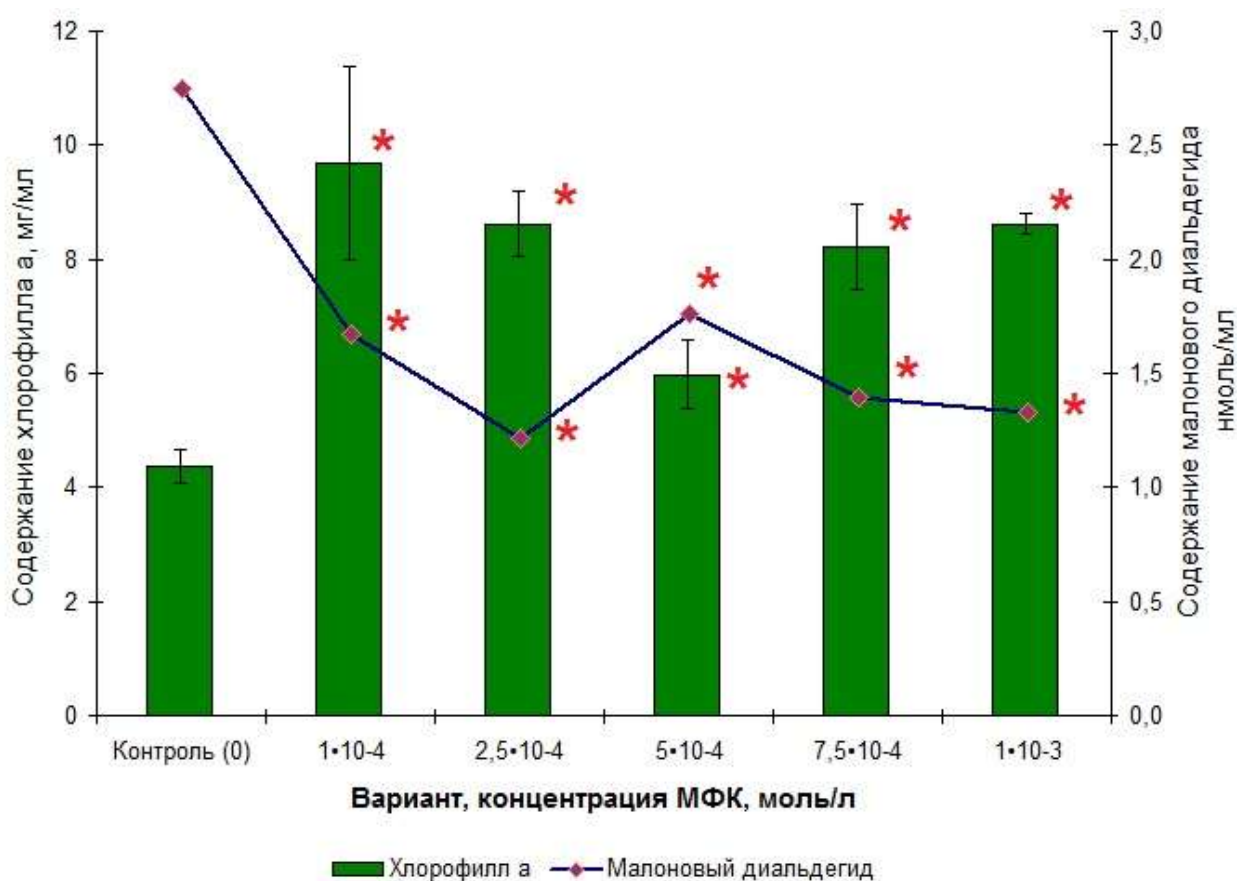


Рис. 5. Содержание хлорофилла *a* и малонового диальдегида в клетках *Nostoc linckia* через сутки после инкубации на растворах метилфосфоновой кислоты

При изучении влияния МФК на показатели жизнедеятельности ЦБ *N. muscorum* установлено, что содержание хлорофилла *a* в клетках ЦБ под влиянием МФК возрастало, причем при воздействии МФК в высоких концентрациях ($5 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) отмечали максимальную концентрацию пигмента (рис. 6). Интенсивность процессов ПОЛ в клетках ЦБ в присутствии МФК в высоких концентрациях ($1 \cdot 10^{-3}$ – $7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) увеличивалась по сравнению с контрольным уровнем в среднем в 1,5 раза. При действии МФК в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л и ниже содержание МДА в клетках ЦБ было близко к контролю.

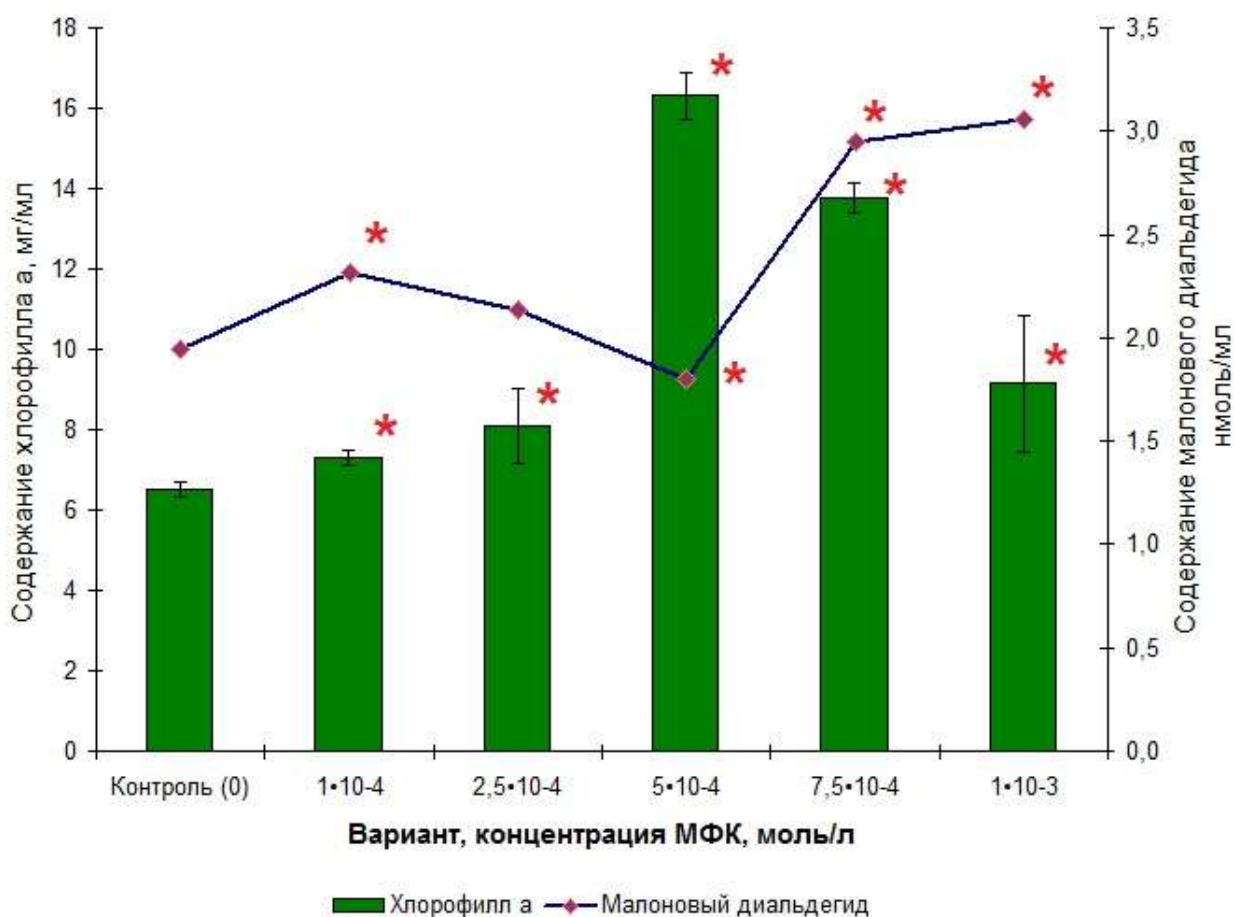


Рис. 6. Содержание хлорофилла *a* и малонового диальдегида в клетках *Nostoc muscorum* через сутки после инкубации на растворах метилфосфоновой кислоты

Ответные реакции биопленок цианобактерий с доминированием Nostoc commune на действие метилфосфоновой кислоты (опыт 2)

Были изучены эффекты МФК на жизнедеятельность многовидовых биопленок с доминированием *N. commune*. Установлено, что, как и в опытах с альгологически чистыми культурами ЦБ, МФК в концентрациях выше $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л оказывала летальное действие на БП. Через сутки после инкубации с МФК отмечали разрушение хлорофилла *a* и гибель клеток в БП.

МФК в концентрациях $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л и ниже не оказывала летального действия на БП, однако, инициировала активацию процессов ПОЛ в клетках (рис. 7). МФК ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л) вызывала накопление МДА в клетках БП, в среднем, на 20% по сравнению с контролем. С увеличением концентрации МФК отмечали существенное возрастание интенсивности процессов ПОЛ. Под влиянием МФК

$5 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л уровень МДА в клетках возрастал в 3 – 4 раза по сравнению с клетками, которые не подвергались действию МФК.

Известно, что ПОЛ является одним из процессов разрушения мембранных липидов и приводит к нарушению функционирования клеток (Барабой, 1991). По-видимому, летальное действие на клетки БП высоких концентраций МФК $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л и выше обусловлено окислительной деградацией органических макромолекул.

МФК вызывала уменьшение содержания хлорофилла *a* в клетках БП. Под влиянием МФК ($1 \cdot 10^{-4} - 2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) количество хлорофилла *a* снижалось в среднем на 17%, по сравнению с контролем. Действие МФК в более высоких концентрациях приводило к серьёзным нарушениям в пигментном комплексе, концентрация хлорофилла была ниже на 30 – 50% по сравнению с контрольным уровнем.

Выявлена тесная отрицательная корреляция между данными по интенсивности процессов ПОЛ и содержанию хлорофилла *a* в клетках фототрофов, формирующих биопленку ($r = -0,83$). Снижение содержания хлорофилла *a* в присутствии МФК, в этом случае, вероятно, является следствием окислительной деградации мембранных липидов и угнетения процессов биосинтеза хлорофилла в стрессовых условиях. Хлорофилл *a* и ряд других пигментов ЦБ (фикобиллины: фикоцианины, фикоэритрины, аллофикоцианин; алициклические каротиноиды) являются важными составляющими фотосинтезирующей системы клетки. Уменьшение количества пигментов, изменение их структуры приводит к значимому снижению фотосинтетической активности и, как следствие, – роста микроорганизмов (Панкратова и др., 2008; Еремченко и др., 2014).

Биопленки *N. commune* – природные многовидовые засухоустойчивые ценозы фототрофных и сапротрофных микроорганизмов, при этом наличие различных партнеров и, следовательно, их бактерий – спутников, обеспечивает их полифункциональность и устойчивость к факторам внешней среды (Домрачева и др., 2007; Панкратова и др., 2008). В опытах с водной культурой показана

повышенная чувствительность *N. commune* к действию токсикантов, таких как нефть (Киреева и др., 2003), ТМ (Домрачева и др., 2007; Горностаева и др., 2013). По-видимому, высокая чувствительность многовидовых биопленок с доминированием *N. commune* к МФК обусловлена угнетением жизнедеятельности компонентов биопленок в условиях водной среды.

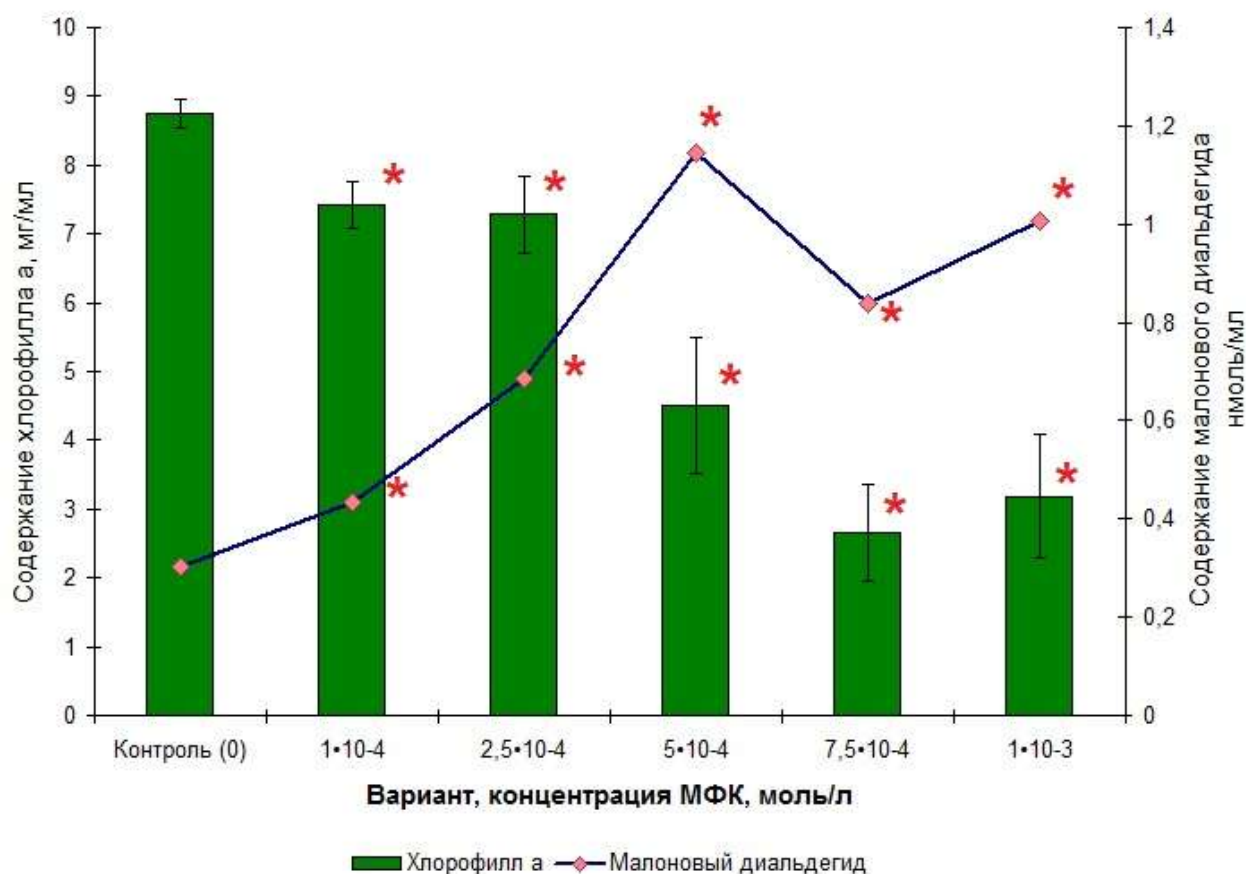


Рис. 7. Содержание хлорофилла *a* и малонового диальдегида в клетках, формирующих биопленки с доминированием *Nostoc commune* через сутки после инкубации на растворах метилфосфоновой кислоты

Таким образом, установлено, что МФК в концентрациях ($1 \cdot 10^{-1} - 4 \cdot 10^{-3}$ моль/л и более) оказывает летальное действие на фототрофные биопленки. Биопленки с доминированием *N. commune* более чувствительны к действию МФК, чем альгологически чистые культуры ЦБ. Под влиянием всех испытуемых концентраций МФК ($1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) происходило достоверное снижение уровня хлорофилла *a* в клетках БП, которое сопровождалось активацией процессов ПОЛ. Причем с ростом концентрации МФК токсический эффект на

культуру БП с доминированием ЦБ *N. commune* усиливался (табл. 1). Среди альгологически чистых культур наиболее чувствительны к действию МФК высокой концентрации ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) были виды *N. paludosum* и *N. muscorum*, что проявилось в активизации процессов ПОЛ, а в случае *N. paludosum* и в снижении содержания хлорофилла *a*. ЦБ *N. linckia* была более устойчива к действию МФК во всех вариантах опыта. Показатель содержания хлорофилла *a* в клетках ЦБ был наиболее чувствителен к действию МФК, чем интенсивность процессов ПОЛ в клетках ЦБ, что может быть использовано при биотестировании. Известно, что многие микроорганизмы способны нейтрализовать токсический эффект загрязнителя, принесенного в среду их обитания, снижая концентрацию загрязнителя до комфортного для их жизнедеятельности уровня (Молекулярные основы..., 2005). Данная способность реализуется за счет личных физиологических особенностей ЦБ, а также за счет наличия бактерий – спутников, способствующих данному процессу (Домрачева и др., 2009). ЦБ *N. linckia* обладает рядом морфо-физиологических особенностей, обуславливающих повышенную устойчивость к токсикантам. Известно, что в условиях стресса *N. linckia* способна сорбировать токсиканты (Мурадян и др., 1991; Рублева и др., 2001; Фокина и др., 2011; Горностаева, 2015), часть гидрофильных групп блокируется с образованием новых соединений (Ahmed shaker Abdul-Jabbar; 2008). Возникают уродливые формы клеток, их слизистые конгломераты, массовое спорообразование, выделение большого количества слизи и переход культуры *N. linckia* в пальмеллоидное состояние (Жарова и др., 2003). Затем мобилизуются множественные защитные реакции, направленные не только на детоксикацию, но и выведение токсиканта из клетки (Деверол, 1980; Гоготов, Зорин и др., 1999). В частности, в микросомах ЦБ возрастает количество бактерий – спутников, играющих существенную роль в адаптации ЦБ к внешним условиям (Штина, Панкратова, 1974; Панкратова, Трефилова, 2007). Подобные особенности обуславливают устойчивость *N. linckia* к действию тяжелых металлов (Фокина и др., 2011). Механизмы устойчивости многовидовых биопленок с доминированием *N. commune* к действию МФК, по-видимому, нарушаются за счет гомогенизации и

переноса в условия водной среды, в результате которых на действие токсикантов реагирует не сообщество в целом, а отдельные клетки.

На основе изучения ответных реакций ЦБ можно расположить ЦБ по мере возрастания чувствительности к действию МФК: *Nostoc linckia* < *Nostoc muscorum* < *Nostoc paludosum* < комплекс фототрофов в БП с доминированием *Nostoc commune*.

Таблица 1

**Действие метилфосфоновой кислоты на биохимические показатели
цианобактерий и многовидовых биопленок, % к контролю**

Вариант	<i>Nostoc linckia</i>		<i>Nostoc muscorum</i>		<i>Nostoc paludosum</i>		БП	
МФК, моль/л	содержание, % к контролю							
	хл <i>a</i>	МДА	хл <i>a</i>	МДА	хл <i>a</i>	МДА	хл <i>a</i>	МДА
$1 \cdot 10^{-4}$	221*	61*	112*	119*	128*	100	85*	144*
$2,5 \cdot 10^{-4}$	197*	44*	124*	110	140*	55*	83*	227*
$5 \cdot 10^{-4}$	137*	65*	251*	93*	64*	45*	52*	378*
$7,5 \cdot 10^{-4}$	188*	51*	212*	151*	75*	59*	30*	277*
$1 \cdot 10^{-3}$	197*	48*	141*	157*	70*	196*	36*	333*
$4 \cdot 10^{-3}$	гибель клеток							

Примечание: хл *a* – хлорофилл *a*; МДА – малоновый диальдегид, * – различия достоверны при $P \geq 0,95$. Цветом выделены ячейки с сильным действием токсиканта на культуру (рост количества МДА более, чем на 25% и снижение хлорофилла *a* более, чем на 25% от контроля).

3.2. Влияние глифосата на альгологически чистые культуры цианобактерий и многовидовые биопленки с доминированием *Nostoc commune*

**Ответные реакции альгологически чистых культур цианобактерий на
действие глифосата (опыт 3)**

Изучено влияние ГЛ на содержание хлорофилла *a* и интенсивность процессов ПОЛ в клетках ЦБ: *N. paludosum*, *N. linckia*, *N. muscorum*.

ГЛ в концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$ – $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л не оказывал влияния на накопление хлорофилла *a* в клетках ЦБ *N. paludosum* (рис. 11). В присутствии ГЛ

в более высоких концентрациях ($5 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) отмечали снижение накопления хлорофилла *a* в 1,8 – 2,2 раза, по сравнению с контролем.

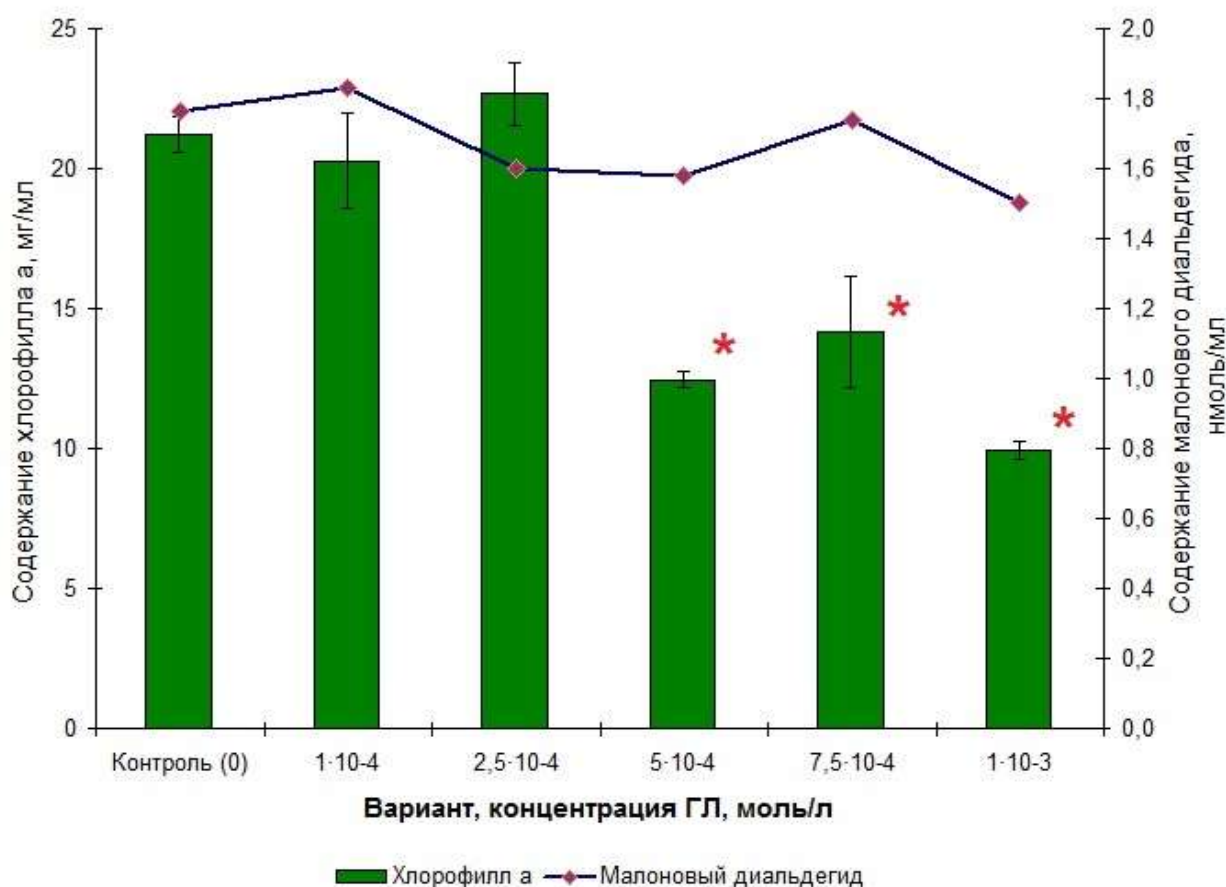


Рис. 8. Содержание хлорофилла *a* и малонового диальдегида в клетках *Nostoc paludosum* через сутки после инкубации на растворах глифосата

Интенсивность процессов ПОЛ в клетках ЦБ при воздействии ГЛ существенно не менялась (рис. 8). Только под влиянием ГЛ в высокой концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л отмечали снижение накопления МДА на 17%, по сравнению с контролем.

Действие ГЛ на накопление хлорофилла *a* и интенсивность процессов ПОЛ в клетках *N. linckia* проявилось в том, что в опытных вариантах уровень хлорофилла *a* изменялся в пределах 4,6 – 9 мг/мл (рис. 9). Зависимости между дозой ГЛ и биохимическими показателями жизнедеятельности ЦБ не выявлено. Установлено, что под воздействием ГЛ ($1 \cdot 10^{-4}$; $5 \cdot 10^{-4}$; $7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) уровень хлорофилла *a* в клетках ЦБ достоверно снижался. В прочих вариантах опыта достоверных изменений содержания зеленых пигментов выявлено не было.

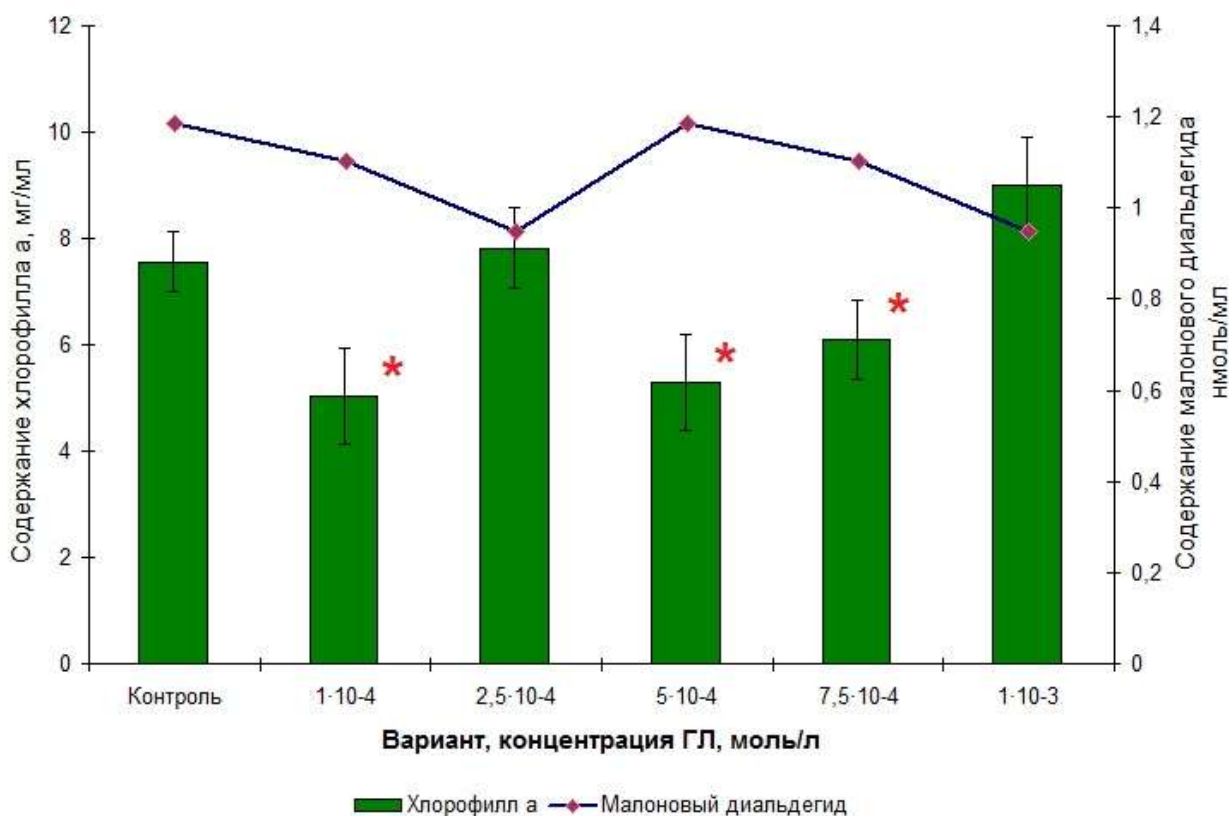


Рис. 9. Содержание хлорофилла *a* и малонового диальдегида в клетках *Nostoc linckia* через сутки после инкубации на растворах глифосата

Глифосат в концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л не вызывал достоверных изменений интенсивности процессов ПОЛ в клетках ЦБ *N. linckia*. Содержание МДА в клетках опытных ЦБ было близко к контролю (рис. 9).

Изучено влияние ГЛ на интенсивность процессов ПОЛ и уровень хлорофилла *a* в клетках ЦБ *N. muscorum*. В спектре изучаемых концентраций ГЛ не оказывал токсического действия на клетки ЦБ. При воздействии ГЛ на клетки ЦБ *N. muscorum* достоверных изменений содержания хлорофилла *a* не отмечено (рис. 10).

Под влиянием ГЛ в концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л количество МДА в клетках *N. muscorum* также было в пределах контроля (рис. 10). Только в варианте с действием $7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л ГЛ отмечали увеличение уровня МДА в клетках ЦБ в 1,5 раза, по сравнению с контролем.

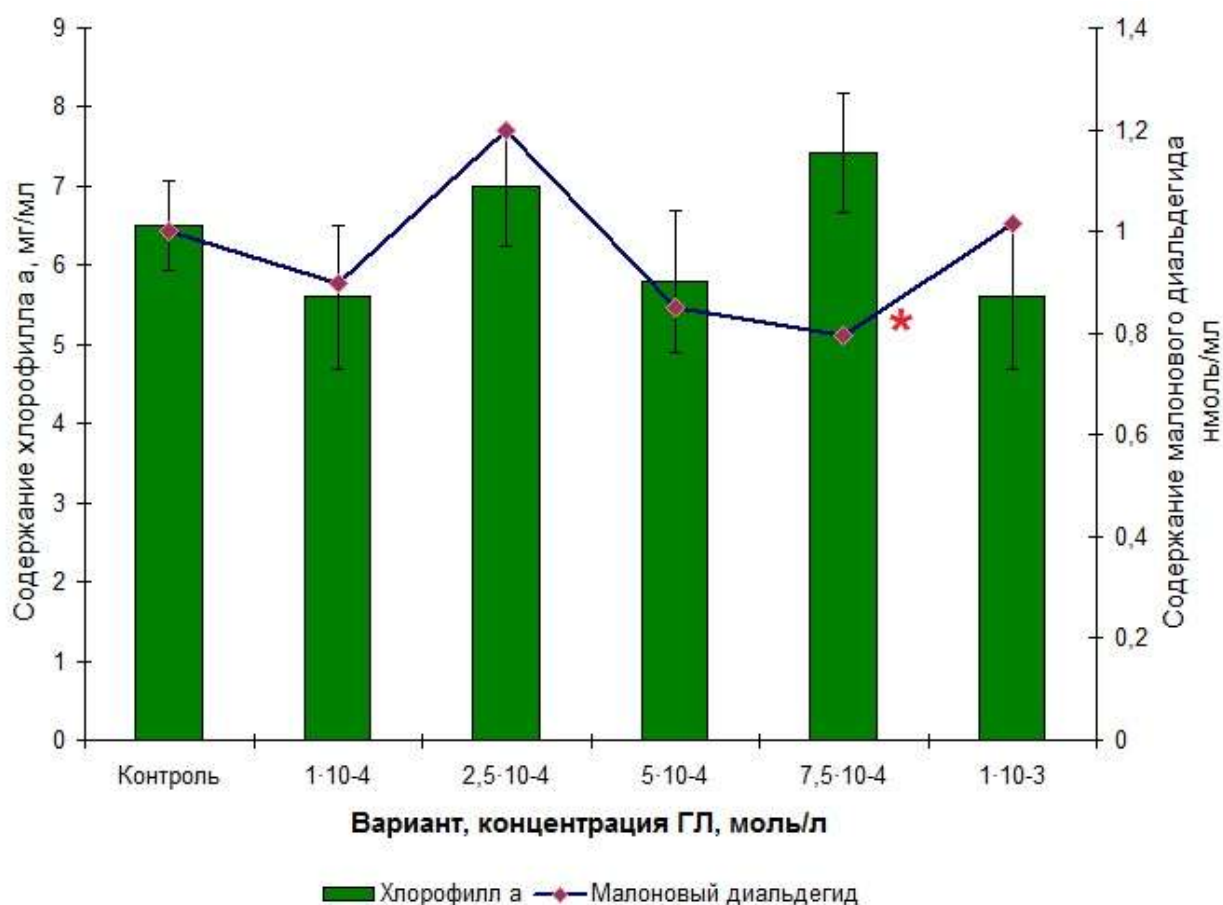


Рис. 10. Содержание хлорофилла *a* и малонового диальдегида в клетках *Nostoc muscorum* через сутки после инкубации на растворах глифосата

Ответные реакции многовидовых биопленок с доминированием Nostoc commune на действие глифосата (опыт 4)

Изучено влияние ГЛ в диапазоне концентраций ($1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$ моль/л) на жизнедеятельность биопленок с доминированием ЦБ *N. commune*.

Установлено, что ГЛ в концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л вызывал разрушение хлорофилла *a* и гибель клеток фототрофов, формирующих БП. Глифосат в концентрациях $1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-4}$ моль/л не оказывал летального действия на БП, однако вызывал биохимические изменения в клетках фототрофных компонентов БП. С ростом концентрации ГЛ в среде происходило снижение содержания хлорофилла *a* в клетках фотосинтезирующих БП (рис. 11). Минимальное содержание хлорофилла *a* отмечали в варианте с действием ГЛ самой высокой концентрации ($5 \cdot 10^{-3}$ моль/л).

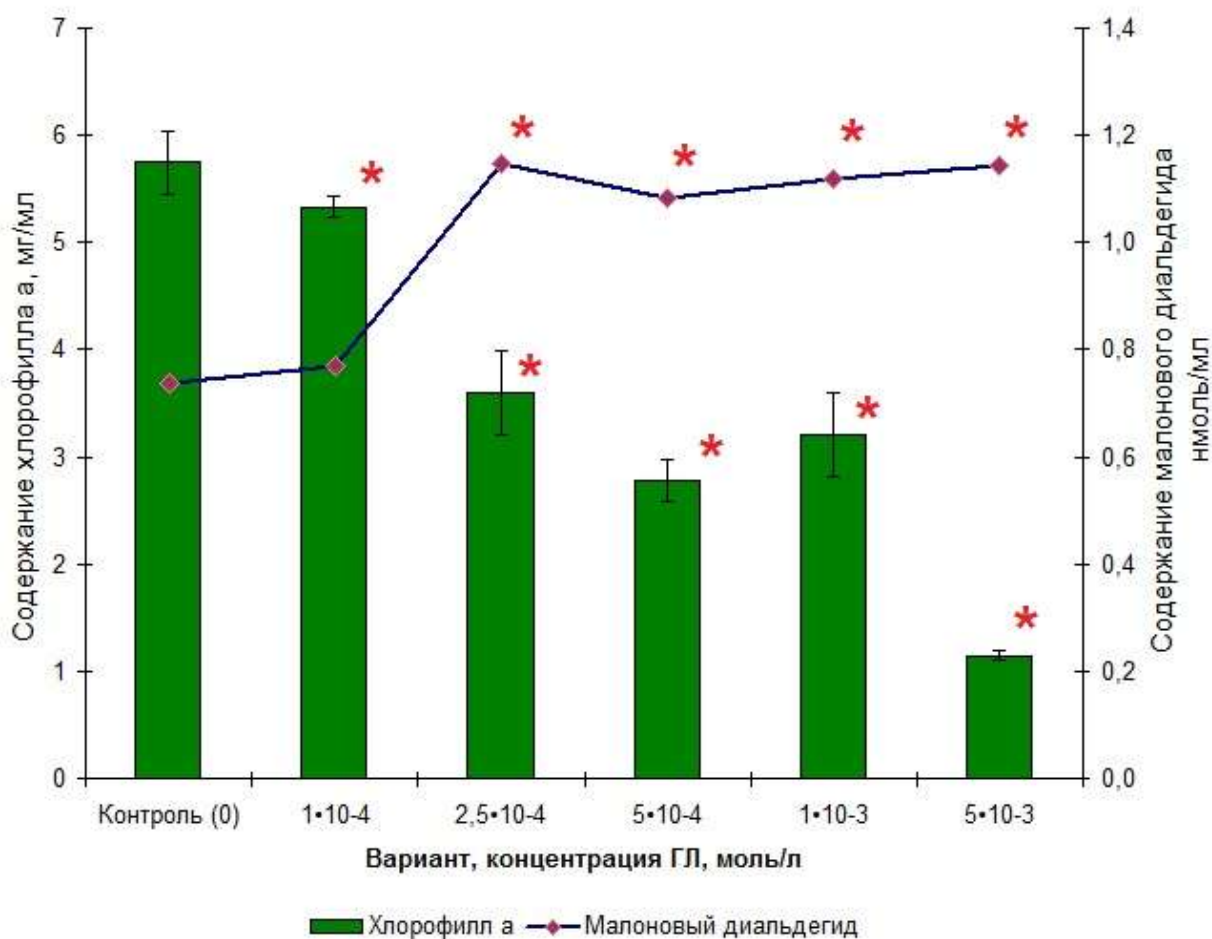


Рис.11. Содержание хлорофилла *a* и малонового диальдегида в клетках фотосинтезирующих биопленок с доминированием *Nostoc commune* через сутки после инкубации на растворах глифосата

Установлено, что снижение уровня хлорофилла *a* в клетках БП сопровождалось активацией процессов ПОЛ (рис. 11). ГЛ ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л) не вызывал достоверных изменений интенсивности процессов ПОЛ в клетках БП с доминированием *N. commune*. С ростом концентрации ГЛ ($2,5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$ моль/л) отмечали существенное (на 40 – 50%) накопление в клетках БП МДА, по сравнению с контролем.

Между активностью процессов ПОЛ и содержанием зеленого пигмента выявлена тесная отрицательная корреляция ($r = -0,87$). Вероятно, в присутствии ГЛ происходит окислительная деградация мембранных липидов и угнетение процессов биосинтеза хлорофилла, как следствие – снижение содержания хлорофилла в клетках БП в присутствии ГЛ.

На основе изучения ответных биохимических реакций можно сделать вывод, что многовидовые биопленки с доминированием ЦБ *N. commune*, по сравнению с альгологически чистыми культурами, были более чувствительны к воздействию ГЛ, как и в опытах с МФК. Отличительной особенностью ответных реакций клеток БП на действие ГЛ является снижение содержания хлорофилла *a* в клетках. БП с доминированием *N. commune* представляют собой уникальные многовидовые ценозы, которые могут поддерживать жизнеспособность в условиях химического загрязнения, сохраняя видовое и родовое разнообразие, а также высокую плотность популяции (Горностаева, 2015). Вероятно, суспензия и нехарактерная среда обитания ослабляют механизмы устойчивости компонентов биопленок и делают их чувствительными к действию метилфосфонатов.

На основе изученных ответных реакций на действие ГЛ можно сделать вывод о разной чувствительности ЦБ, которая возрастает в ряду: *Nostoc linckia* < *Nostoc muscorum* < *Nostoc paludosum* < комплекс фототрофов в БП с доминированием *Nostoc commune*.

Таблица 2

Действие глифосата на биохимические показатели цианобактерий и многовидовых цианобактериальных биопленок, % к контролю

Вариант	<i>Nostoc linckia</i>		<i>Nostoc muscorum</i>		<i>Nostoc paludosum</i>		БП	
ГЛ, моль/л	содержание, % к контролю							
	хл <i>a</i>	МДА	хл <i>a</i>	МДА	хл <i>a</i>	МДА	хл <i>a</i>	МДА
1·10 ⁻⁴	76*	92	82	90	102	104	93	104
2,5·10 ⁻⁴	104	80	114	120	113	90	63*	156*
5·10 ⁻⁴	78*	100	86	85	62*	88	48*	147*
7,5·10 ⁻⁴	81*	93	114	79*	69*	100	-	-
1·10 ⁻³	119	80	78	101	46*	83	56*	142*
5·10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	20*	155*
1·10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	гибель клеток	

Примечание: хл *a* – хлорофилл *a*; МДА – малоновый диальдегид; - нет данных, * – различия достоверны при $P \geq 0,95$. Цветом выделены ячейки с сильным действием токсиканта на культуру (рост количества МДА более, чем на 25% и снижение хлорофилла *a* более, чем на 25% от контроля).

Выводы по главе 3:

1. Глифосат и метилфосфоновая кислота в диапазоне концентраций ($1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) вызывают изменение интенсивности процессов ПОЛ и уровня хлорофилла *a* в клетках ЦБ.
2. МФК в большинстве опытных вариантов стимулировала накопление хлорофилла *a*, тогда как ГЛ вызывал снижение содержания зеленого пигмента в клетках ЦБ. Показатель содержания хлорофилла *a* в клетках цианобактерий более чувствителен к действию метилфосфонатов, чем интенсивность процессов ПОЛ в их клетках, и может быть использовано при биотестировании.
3. Летальное действие на альгологически чистые культуры ЦБ *N. linckia*, *N. muscorum* и *N. paludosum* и на природные биопленки с доминированием *N. commune* оказывала МФК в концентрациях $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л и более. ГЛ в концентрациях $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л и более вызывал гибель клеток биопленок с доминированием *N. commune*, что свидетельствует о большей токсичности для ЦБ глифосата, чем МФК.
4. На основе изучения ответных реакций установлено, что альгологически чистые культуры цианобактерий наиболее устойчивы к действию метилфосфонатов, по сравнению с многовидовыми биопленками с доминированием *N. commune*. Высокая чувствительность биопленок к действию метилфосфонатов объясняется их переносом в условия водной среды и последующей гомогенизацией, в результате которых на действие токсикантов реагируют отдельные клетки, а не сообщество в целом. В ряду *N. linckia* – *N. muscorum* – *N. paludosum* устойчивость цианобактерий к действию метилфосфоновой кислоты и глифосата снижается.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ РАСТЕНИЙ, ВЫРАЩЕННЫХ В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТОЙ (ВОДНАЯ КУЛЬТУРА)

Цианобактерии обладают способностью образовывать симбиозы с различными организмами, в частности с растениями. Объединенные вместе организмы создают единое целое со своими структурными и функциональными взаимосвязями (Домрачева, 2005). Известно, что при инокулировании проростков пшеницы в гидропонной культуре цианобактерии *Nostoc* sp. проникали в корни. Они были обнаружены в межклеточных пространствах и внутри эпидермальных и кортексных клетках растения (Gantar, 2000). Такие растительно-цианобактериальные ассоциации более устойчивы к воздействию неблагоприятных условий среды (Молекулярные основы..., 2005).

В сельском и лесном хозяйстве обработка семян ЦБ используется для стимуляцией роста и защиты от неблагоприятных факторов (Трефилова, 2008). Наличие в цианобактериях ауксино- и гиббериллиноподобных веществ обуславливает ростостимулирующий эффект. В зависимости от их концентрации и вида растения, на которое они действуют, этот эффект проявляется в большей или меньшей степени. Например, при обработке семян пшеницы в лабораторных опытах лучший стимулирующий эффект показывала *N. linckia*, в полевых условиях – смесь культур ЦБ *N. paludosum*, *N. linckia* и *Microchaeta tenera* (Трефилова, 2008). Кроме того, за счет наличия у ЦБ естественных бактерий – спутников, которые способны вырабатывать ряд защитных веществ (флавоцин, полисахариды, фитогормоны, феназиновые пигменты и др.), они проявляют протекторное действие на растения (Ковина, 2001; Трефилова, 2008). Входящие в состав многовидовых биопленок бактерии – спутники уменьшают развитие антракноза, корневых гнилей, мучнистой росы у зерновых, фитофтороза и парши (Тихонович и др., 2005), улучшают структуру почвы (Муронец и др., 1997; Круглов и др., 2000), используются в качестве бактериальных удобрений для

улучшения минерального питания растений (Васюк, 1989; Васюк и др., 1992; Белимов и др., 2004), угнетают действие фитопатогенных грибов рода *Fusarium* (Лабутова, Вишневская, 1998; Поздняков, 1998; Домрачева, 2005). Именно поэтому были проведены опыты с использованием различных способов цианобактериальной обработки растений, выращенных в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой (водная культура) для выявления наиболее эффективного.

Ранее было установлено, что наиболее устойчивы к воздействию МФК альгологически чистые культуры ЦБ *N. linckia* и *N. muscorum*, поэтому именно они были выбраны для эксперимента на водной культуре с внесением ЦБ в среду выращивания.

Для опытов по изучению эффективности предпосевной обработки семян ячменя ЦБ также были выбраны альгологически чистые культуры ЦБ *N. muscorum* и *N. linckia*, а также природные биопленки ЦБ с доминированием *N. commune*.

4.1. Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерий, присутствующих в среде выращивания на жизнедеятельность растений ячменя

Ответные реакции растений ячменя на присутствие цианобактерии *Nostoc linckia* и метилфосфоновой кислоты в среде выращивания (опыт 5)

Действие на растения любых неблагоприятных факторов приводит к ряду неспецифических ответных реакций, к ним относят образование активных форм кислорода в растительных клетках, активацию ферментов антиоксидантной защиты, накопление веществ с антиоксидантными свойствами и продуктов перекисного окисления липидов (Лукаткин, 2002; Mittler, 2002; Красильникова и др., 2004; Abiotic stress..., 2013). Активация процессов ПОЛ может инициировать включение различных механизмов защиты (Верхотуров, 2008).

Было изучено накопление в растительных клетках МДА – продукта ПОЛ. МФК в низкой концентрации ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) вызывала снижение уровня МДА в корнях ячменя в среднем на 30% по сравнению с контролем (рис. 12). Снижение

накопления МДА в растительных клетках при действии низких концентраций МФК отмечали и ранее, причем уменьшение интенсивности ПОЛ сопровождалось значительной активацией антиоксидантного фермента пероксидазы (Коваль и др., 2013). МФК в более высокой концентрации ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л), напротив, инициировала активацию процессов ПОЛ в корнях ячменя, по сравнению с контролем.

Присутствие ЦБ в среде выращивания также приводило к повышенному накоплению МДА в клетках корней растений. По-видимому, ЦБ, присутствующие в среде выращивания и непосредственно контактирующие с корнями растений, являются стрессовым фактором, под влиянием которого запускаются окислительные процессы в клетках корней.

При совместном действии ЦБ и МФК низкой концентрации ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) также отмечали активацию процессов ПОЛ в корнях ячменя, по сравнению с контролем. Содержание МДА в растительных клетках в данном варианте опыта было достоверно выше, чем в опыте с действием $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л МФК и было близко к накоплению МДА в варианте с ЦБ. В варианте с совместным действием на растения ЦБ и $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л МФК уровень МДА в растительных клетках был близок к контролю.

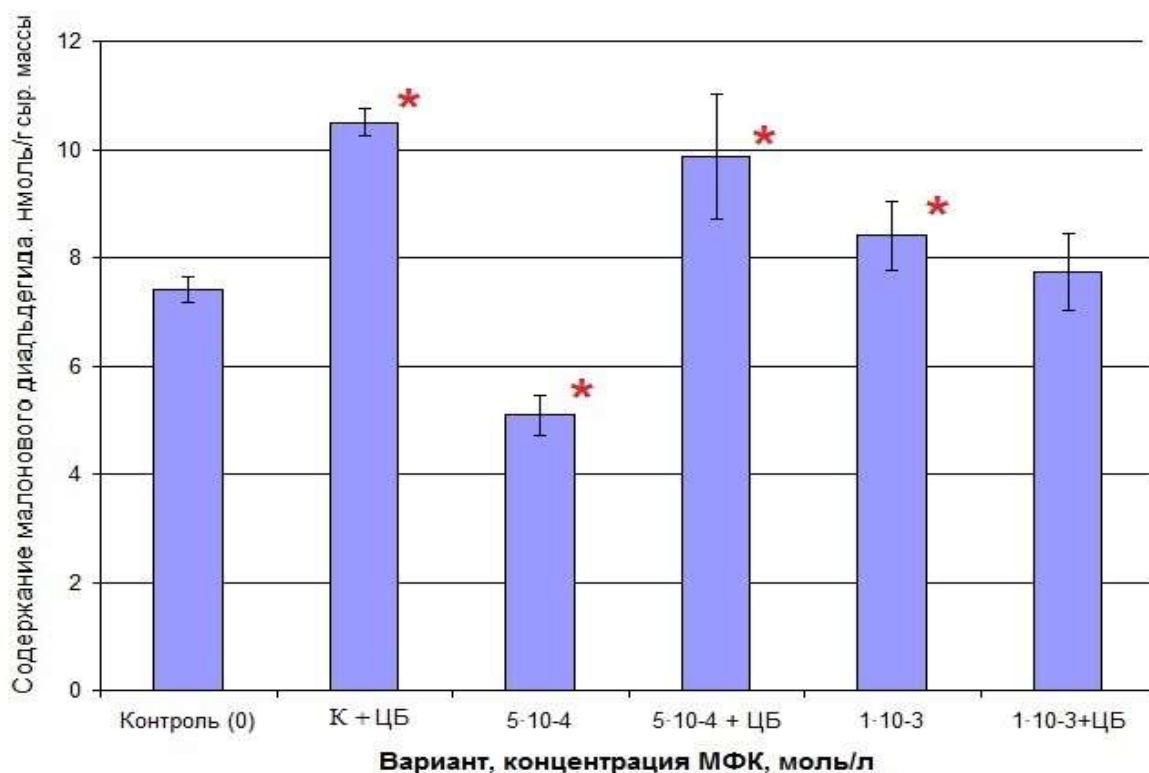


Рис. 12. Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерии *Nostoc linckia* на содержание малонового диальдегида в корнях ячменя

Изменения интенсивности процессов ПОЛ в листьях были более выражены, по сравнению с корнями, что, по-видимому, обусловлено спецификой протекания окислительных процессов в фототрофных клетках. С увеличением концентрации МФК в среде выращивания происходило повышение содержания в листьях МДА (рис. 13). Присутствие в водной среде ЦБ также приводило к активации процессов ПОЛ в листьях ячменя. В варианте с совместным действием на растения $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л МФК и ЦБ отмечали усиление интенсивности процессов ПОЛ, по сравнению с отдельным действием ЦБ и МФК. Напротив, интенсивность процессов ПОЛ в листьях растений в варианте с действием $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л МФК и ЦБ, была меньше, чем в варианте с МФК данной концентрации.

Выявлена сильная корреляция ($r = 0,9$) между интенсивностью процессов ПОЛ и накоплением каротиноидов, относящихся к группе низкомолекулярных антиоксидантов в листьях растений, выращенных на МФК с добавлением и без добавления ЦБ.

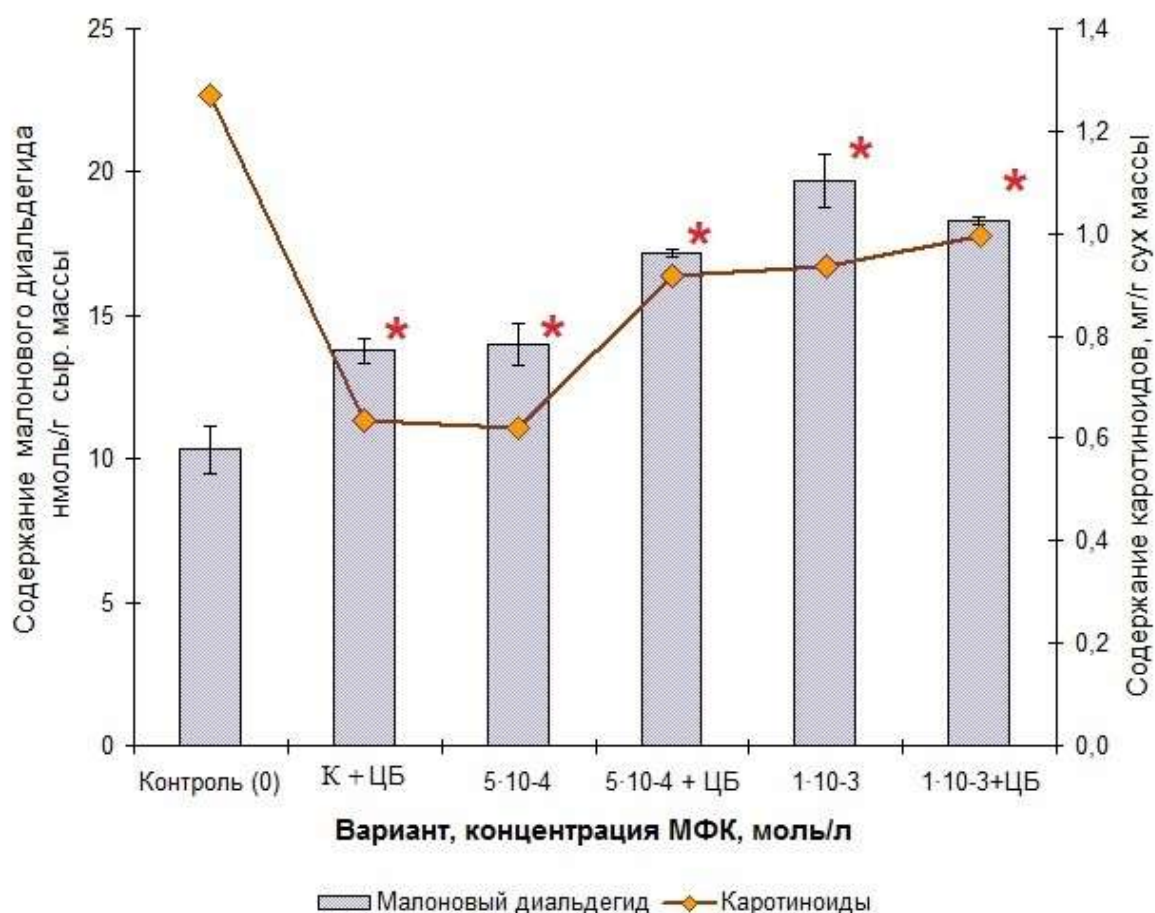


Рис. 13. Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерии *Nostoc linckia* на содержание малонового диальдегида и каротиноидов в листьях ячменя

В листьях опытных растений уровень каротиноидов был достоверно ниже, чем в контроле. Максимально снижалось содержание каротиноидов при воздействии МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) (рис. 13). Присутствие в среде выращивания ЦБ вызывало снижение уровня желтых пигментов в листьях в 1,4 раза по сравнению с контролем. Добавка ЦБ к среде выращивания, загрязненной МФК, стимулировала накопление пигмента, по сравнению с действием МФК. В большей степени данный эффект проявился в варианте с совместным действием на растения $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л МФК и ЦБ.

Было изучено накопление в листьях вакуолярных пигментов – антоцианов, которые являются низкомолекулярными антиоксидантами, входящими в состав стрессо-защитной системы растений. Содержание антоцианов, выполняющих фоторецепторную, защитную и антиоксидантную функции, может являться

наиболее эффективным показателем физиологического состояния растений, находящихся в стрессовых условиях (Масленников, 2003).

В вариантах с присутствием в среде ЦБ и действием $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л МФК содержание антоцианов в листьях было близко к контролю (рис. 14). МФК ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) стимулировала накопление пигмента, его содержание в листьях было в 2,4 раза выше, чем в контроле. Добавка ЦБ к растворам МФК разной концентрации вызывала различные эффекты. Совместное действие ЦБ и $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л МФК стимулировало накопление антоциановых пигментов в листьях. Содержание пигментов было в 2,4 раза выше, чем в варианте с действием $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л МФК. Совместное присутствие в среде выращивания ЦБ и $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л МФК, напротив, приводило к снижению уровня антоцианов в листьях, по сравнению с действием $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л МФК.

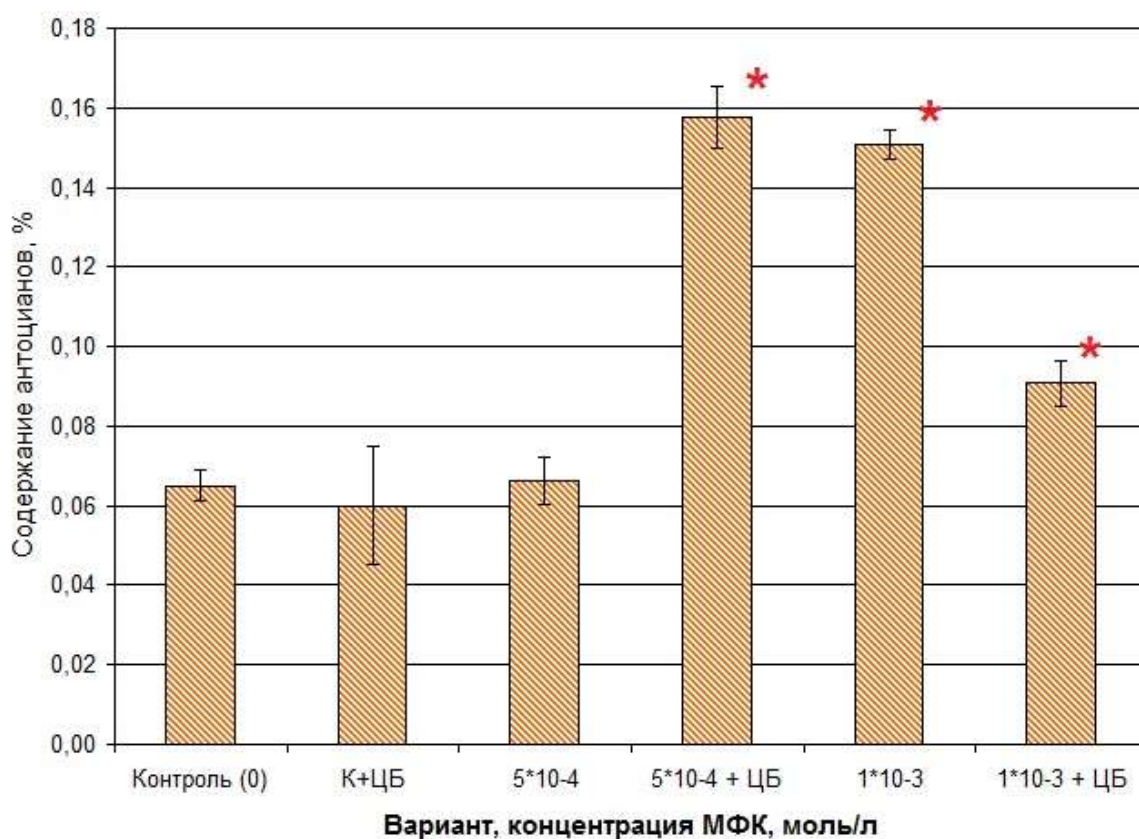


Рис. 14. Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерии *Nostoc linckia* на содержание антоциановых пигментов в листьях ячменя

Одним из показателей реакции растений на изменение факторов внешней среды, степени их адаптации к новым экологическим условиям является

содержание зеленых пигментов – главных фоторецепторов фотосинтезирующей клетки (Photosynthetic pigments..., 2014).

Таблица 3

Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерии *Nostoc linckia* на содержание пластидных пигментов в листьях ячменя

Вариант, МФК, моль/л	Содержание хлорофилла, мг/г сухой массы		
	<i>a</i>	<i>б</i>	<i>a+б</i>
Контроль (0)	4,79±0,30	2,54±0,45	7,34±0,75
К + ЦБ	3,76±0,11*	1,53±0,17*	5,29±0,80*
$5 \cdot 10^{-4}$	3,56±0,13*	1,79±0,03*	5,35±0,35*
$5 \cdot 10^{-4}$ + ЦБ	4,94±0,06	2,50±0,20	7,45±0,63
$1 \cdot 10^{-3}$	4,11±0,14*	1,49±0,10*	5,60±0,24*
$1 \cdot 10^{-3}$ + ЦБ	4,63±0,21	1,48±0,18*	6,11±0,64

Установлено, что МФК вызывала снижение уровня хлорофиллов в листьях ячменя (табл. 3). Присутствие в среде выращивания ЦБ также приводило к уменьшению содержания зеленых пигментов. Наличие ЦБ в загрязненной МФК среде выращивания индуцировало накопление хлорофиллов в листьях, по сравнению с действием МФК. В большей степени действие ЦБ на пигментный комплекс проявилось в варианте с загрязнением среды выращивания $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л МФК. Содержание хлорофиллов в листьях опытных растений в варианте с совместным действием ЦБ и $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л МФК было близко к контролю. Поддержание количества хлорофиллов на уровне контроля, возможно, обусловлено активацией антиоксидантной защиты в клетках. Так, в варианте с совместным действием ЦБ и $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л МФК отмечено повышенное накопление веществ с антиоксидантными свойствами – каротиноидов и антоцианов.

В опыте с совместным действием на растения ЦБ и $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л МФК содержание хлорофилла *б* в листьях ячменя было снижено, по сравнению с контролем и вариантом с действием $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л МФК. Уровень хлорофилла *a*,

напротив, был выше по сравнению с действием $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л МФК и близок к контролю, что свидетельствует о большей устойчивости хлорофилла *a*, входящего в состав фотосистем, к совместному действию ЦБ и $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л МФК.

Таким образом, присутствие ЦБ *N. linckia* в среде выращивания не оказывало выраженного защитного эффекта на растения ячменя при загрязнении МФК в условиях водной культуры. На фоне активации процессов ПОЛ, что проявилось в накоплении МДА в корнях и листьях опытных растений, отмечали снижение количества каротиноидов. Содержание хлорофиллов также снижалось под действием ЦБ *N. linckia*, однако, в присутствии МФК и ЦБ, напротив, отмечали накопление зеленых пигментов. Только в варианте с действием на растения МФК низкой концентрации ЦБ оказывали положительное действие на жизнедеятельность растений. Происходила активация антиоксидантной защиты и накопление хлорофиллов.

Ответные реакции растений ячменя на присутствие цианобактерии Nostoc muscorum и метилфосфоновой кислоты в среде выращивания (опыт 6)

При изучении влияния цианобактериальной интродукции *N. muscorum* на жизнедеятельность растений ячменя, выращенных в условиях загрязнения водной среды выращивания МФК, было установлено, что интенсивность процессов ПОЛ в корнях растений, выращенных в присутствии МФК, ЦБ, а также при их совместном действии снижалась. Отмечали низкое содержание МДА в клетках корней опытных растений (рис. 15).

Выявлена линейная зависимость между дозой МФК и накоплением МДА в корнях ячменя. Присутствие в среде выращивания ЦБ также приводило к снижению содержания МДА в корнях ячменя. В вариантах с совместным присутствием в среде ЦБ и МФК отмечено снижение интенсивности процессов ПОЛ в корнях по сравнению с действием МФК.

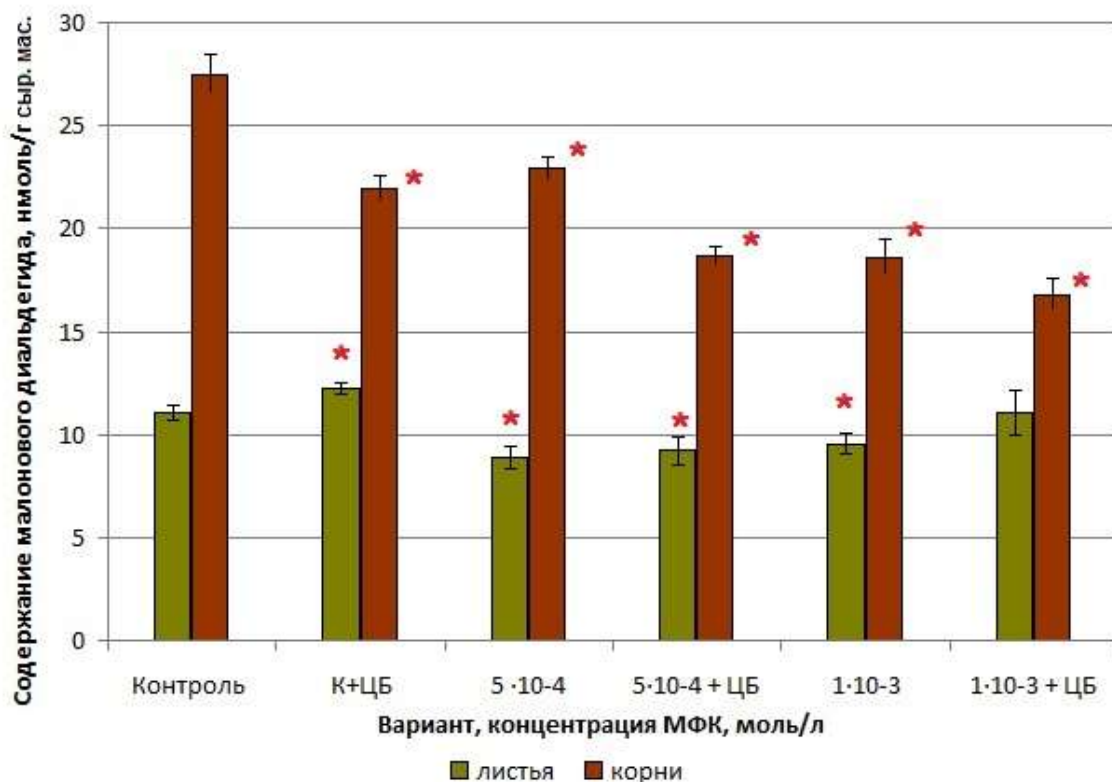


Рис. 15. Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерии *Nostoc muscorum* на интенсивность процессов перекисного окисления липидов в корнях и листьях ячменя

Наличие МФК в среде выращивания вызывало снижение интенсивности процессов ПОЛ в листьях по сравнению с контролем (рис. 15). Добавка ЦБ к МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) снижала содержание МДА в листьях ячменя, но при воздействии МФК более высокой концентрации ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л), напротив, отмечали рост МДА до уровня контроля.

Важным показателем функционального статуса растений является содержание пластидных пигментов. В листьях опытных растений, по сравнению с контролем, происходило повышенное накопление каротиноидов (табл. 4). Самое высокое содержание каротиноидов отмечали в листьях растений, выращенных в присутствии ЦБ и в вариантах с действием $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л МФК. Это свидетельствует об активации антиоксидантной системы в растительных клетках в ответ на действие ЦБ и МФК. При этом наиболее эффективно антиоксидантная защита проявляется в вариантах МФК низкой концентрации ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л), что подтверждается данными по содержанию в листьях зелёных пигментов —

хлорофиллов. Количество хлорофиллов в листьях ячменя во всех вариантах было выше контрольного уровня (табл. 4).

Таблица 4

Действие метилфосфоновой кислоты и цианобактерии *Nostoc muscorum* на содержание пластидных пигментов в листьях ячменя, мг/г сухой массы

Вариант, МФК, моль/л	Содержание, мг/г сухой массы			
	хлорофилл			каротиноиды
	<i>a</i>	<i>б</i>	<i>a+б</i>	
Контроль (0)	5,19±0,91	2,38±0,46	7,57±1,37	1,24±0,17
К + ЦБ	8,22±0,31*	3,71±0,22*	11,94±0,37*	1,7±0,08*
$5 \cdot 10^{-4}$	9,48±0,05*	4,59±0,33*	14,08±0,02*	2,16±0,05*
$5 \cdot 10^{-4}$ + ЦБ	6,98±0,45*	3,22±0,27*	10,20±0,72*	1,56±0,09*
$1 \cdot 10^{-3}$	6,90±0,96	3,22±0,46	10,13±1,42	1,48±0,17
$1 \cdot 10^{-3}$ + ЦБ	6,21±0,09	2,88±0,01	9,08±0,10	1,38±0,25

Цианобактериальная интродукция *N. muscorum* в водную среду выращивания вызывала снижение уровня антоцианов в листьях ячменя практически в 2 раза от уровня контроля (рис. 16). МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л), напротив, вызывала накопление антоцианов в листьях ячменя. Содержание вакуольных пигментов при воздействии МФК в более высокой концентрации оставалось в пределах контроля. Интродукция ЦБ в среды, загрязненные МФК, приводила к накоплению антоцианов в листьях ячменя.

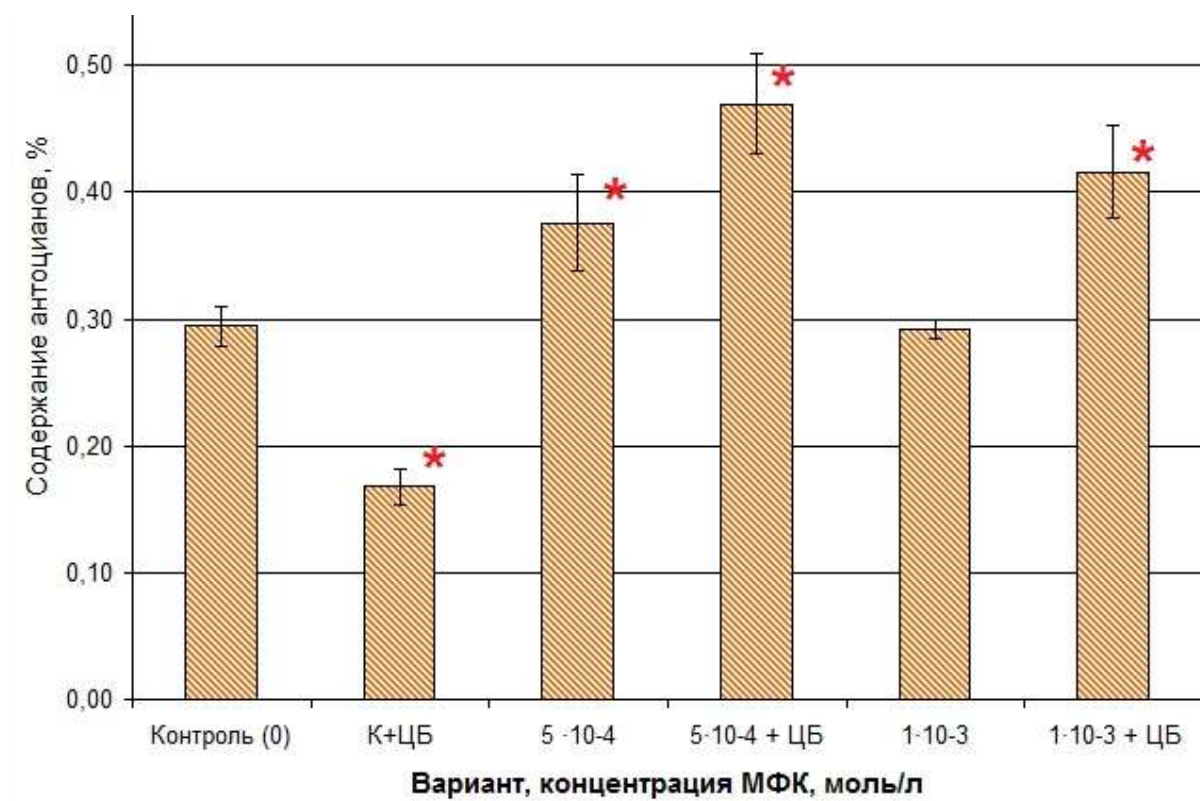


Рис. 16. Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерии *Nostoc muscorum* на содержание антоцианов в листьях ячменя

Действие стрессоров на растения вызывает перестройку метаболизма, характеризующуюся ингибированием энергоёмких анаболических процессов, что, как правило, приводит к торможению роста (Alexieva, 2003; Щербатюк, 2013).

Достоверных изменений линейного роста в вариантах опыта отмечено не было. Однако добавка ЦБ в среду выращивания стимулировала линейный рост листьев, как в контрольном варианте, так и в вариантах с МФК (табл. 5). Рост корней снижался при воздействии ЦБ, МФК и их совместном действии. При этом присутствие ЦБ в среде выращивания ослабляло токсическое действие МФК. Длина побегов и корней растений, выращенных при совместном действии МФК и ЦБ, была выше, по сравнению с растениями, выращенными в условиях загрязнения МФК на 10 – 13%.

Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерии *Nostoc muscorum* на линейный рост органов растений ячменя

Вариант, МФК, моль/л	Длина, см	
	побег	корень
Контроль (0)	14,47±1,14	8,50±1,20
К + ЦБ	15,56±2,66	7,49±1,11
$5 \cdot 10^{-4}$	14,65±1,61	6,73±1,35
$5 \cdot 10^{-4}$ + ЦБ	16,62±3,21	7,14±1,17
$1 \cdot 10^{-3}$	14,67±2,23	6,65±0,99
$1 \cdot 10^{-3}$ + ЦБ	16,25±1,90	7,84±1,67

Таким образом, присутствие ЦБ *N. muscorum* в среде выращивания оказывало фитопротекторный эффект на растения ячменя при загрязнении МФК в условиях водной культуры. Это проявилось в снижении количества МДА в корнях опытных растений, накоплении зеленых пигментов и антоцианов в листьях, а также в выявленной тенденции увеличения показателей линейного роста корней и побегов, по сравнению с действием чистой МФК.

4.2. Влияние цианобактериальной инокуляции семян при проращивании на жизнедеятельность растений, выращенных в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой

В сельском и лесном хозяйстве для повышения иммунитета растений, а также для активации роста используется предпосевная обработка семян препаратами на основе ЦБ (Домрачева, 2005; Трефилова, 2008). Растительно-цианобактериальные ассоциации более устойчивы к воздействию неблагоприятных условий среды. Для изучения эффективности цианобактериальной обработки семян, как способа улучшения жизнедеятельности растений в загрязненной МФК среде, были выбраны альгологически чистые культуры ЦБ *N. muscorum* и *N. linckia*, а также природные БП с доминированием ЦБ *N. commune*.

4.2.1. Влияние предпосевной инокуляции семян альгологически чистыми культурами цианобактерий на жизнедеятельность растений ячменя, выращенных в условиях загрязнения водной культуры метилфосфоновой кислотой

Влияние предпосевной инокуляции семян цианобактерией *Nostoc muscorum* на жизнедеятельность растений ячменя, выращенных в условиях загрязнения водной культуры метилфосфоновой кислотой (опыт 7)

Изучено влияние ЦБ *N. muscorum*, МФК и их совместное действие на показатели жизнедеятельности растений. Одним из индикаторов активности окислительных процессов в растительных клетках является накопление МДА – продукта ПОЛ. Выращивание растений в присутствии ЦБ приводило к снижению интенсивности процессов ПОЛ в листьях ячменя (рис. 17). МФК низкой концентрации ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) вызывала снижение интенсивности процессов ПОЛ в клетках надземных органов. Сходные эффекты на накопление МДА в растениях отмечали в опыте с действием МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) и предварительной обработкой ЦБ. МФК высокой концентрации ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) не вызывала достоверных изменений накопления МДА в листьях, по сравнению с контролем. ЦБ инокуляция семян не снижала интенсивность процессов ПОЛ в листьях растений, выращенных в присутствии МФК.

Цианобактериальная обработка семян приводила к повышению уровня МДА в корнях растений, выращенных в условиях загрязнения МФК, по сравнению с действием МФК (рис. 17). Наиболее сильную активацию окислительных процессов в клетках корней отмечали в варианте с инокуляцией семян цианобактериями и действием МФК ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л), где накопление МДА было в 2,5 раза выше, чем в контроле.

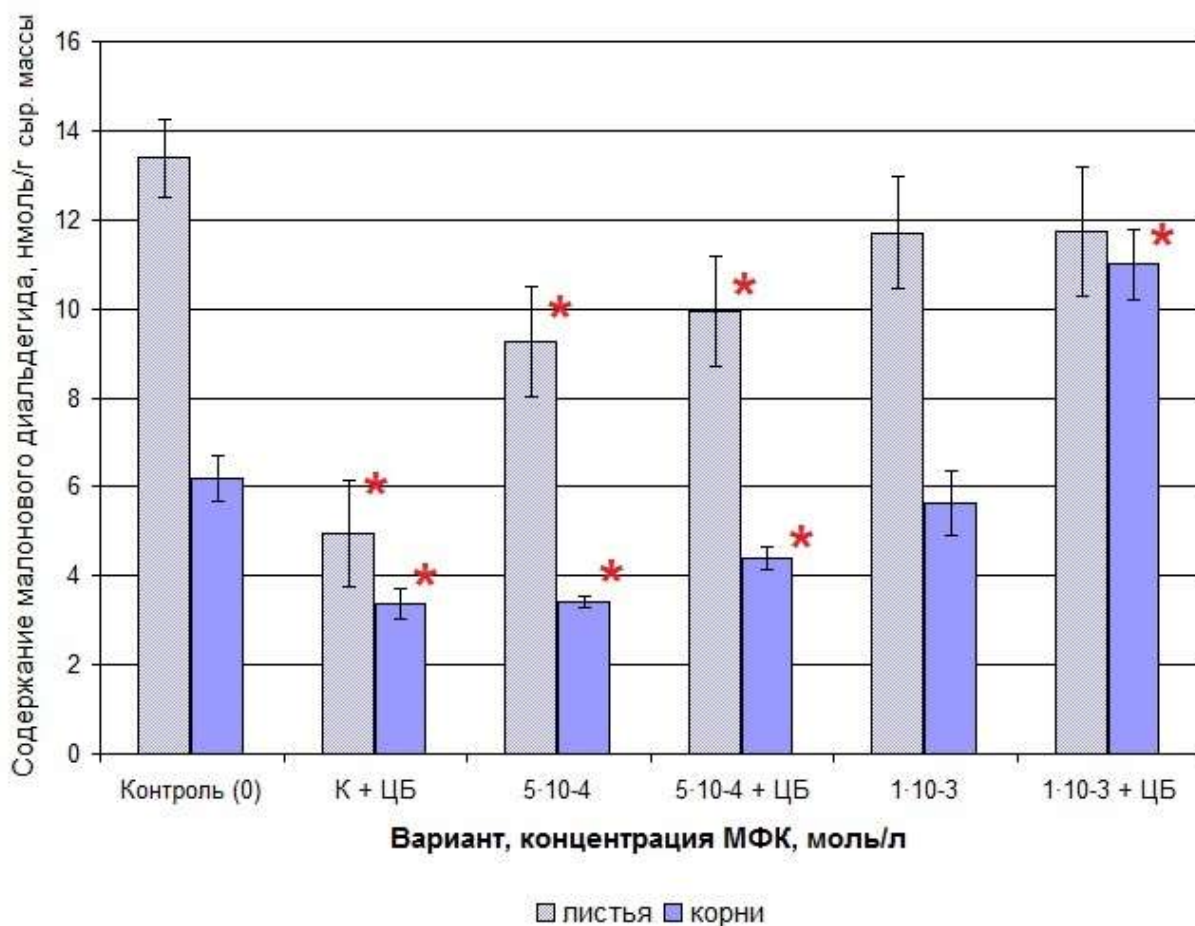


Рис. 17. Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерии *Nostoc muscorum* на интенсивность процессов перекисного окисления липидов в корнях и листьях ячменя

Содержание пластидных пигментов является важным показателем функционального статуса растений. Каротиноиды – пластидные пигменты, которые выполняют протекторную функцию в клетке, они взаимодействуют с органическими радикалами жирных кислот, действуя при этом в качестве «ловушек» радикалов (Кошкин, 2010). В листьях опытных растений, по сравнению с контролем, происходило повышенное накопление каротиноидов (табл. 6). Самое высокое содержание желтых пигментов отмечали в листьях растений, семена которых предварительно инокулировали ЦБ и в вариантах с действием МФК низкой концентрации ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) и при их совместном присутствии. Отмечена сильная обратная зависимость между содержанием каротиноидов и интенсивностью процессов ПОЛ в листьях ячменя ($r = -0,83$), что свидетельствует об активации антиоксидантной системы в растительных тканях в

ответ на действие ЦБ и МФК. Максимальное накопление каротиноидов и низкое содержание МДА в листьях отмечали в клетках растений, выращенных в вариантах с цианобактериальной инокуляцией и присутствием в среде МФК низкой концентрации ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Количество хлорофиллов в листьях ячменя, семена которых инокулировали ЦБ, МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) и при их совместном действии было близко контролю (табл. 6). В вариантах с действием МФК ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) и МФК с ЦБ обработкой отмечали снижение содержания хлорофиллов в 1,2 раза, по сравнению с контролем.

Таблица 6

Действие метилфосфоновой кислоты и предварительной обработки семян цианобактерией *Nostoc muscorum* на содержание пластидных пигментов в листьях ячменя

Вариант, МФК, моль/л	Содержание пигментов, мг/г сухой массы			
	хлорофилл			каротиноиды
	<i>a</i>	<i>б</i>	<i>a+б</i>	
Контроль (0)	5,72±0,42	1,54±0,01	7,26±0,43	0,86±0,11
К+ЦБ	5,42±0,20	1,92±0,28*	7,35±0,17	1,98±0,01*
$5 \cdot 10^{-4}$	5,59±0,15	1,91±0,07*	7,49±0,08	1,84±0,07*
$5 \cdot 10^{-4}$ + ЦБ	5,75±0,69	1,91±0,21*	7,66±0,90	1,92±0,20*
$1 \cdot 10^{-3}$	4,09±0,21*	1,48±0,24	5,58±0,96*	1,26±0,03*
$1 \cdot 10^{-3}$ + ЦБ	4,37±0,40*	1,64±0,21	6,01±0,56*	1,45±0,17*

МФК вызывала накопление антоцианов в листьях ячменя. Под влиянием МФК в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л отмечали рост содержания пигмента в 2 раза, а при более высокой концентрации ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) – в 3 раза от контрольного уровня (табл. 7). В растениях, семена которых предварительно инокулировали ЦБ, при воздействии МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) количество антоцианов снижалось до контрольного уровня, при воздействии МФК ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л), напротив, отмечали резкий рост уровня пигмента. Растения, которые при проращивании инокулировали ЦБ *N. muscorum*, отличались пониженным содержанием антоцианов.

Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерии *Nostoc muscorum* на содержание антоцианов в листьях ячменя

Вариант, МФК, моль/л	Содержание антоцианов, %
Контроль (0)	0,063±0,001
К+ЦБ	0,045±0,009*
$5 \cdot 10^{-4}$	0,131±0,001*
$5 \cdot 10^{-4}$ + ЦБ	0,070±0,015
$1 \cdot 10^{-3}$	0,210±0,005*
$1 \cdot 10^{-3}$ + ЦБ	0,428±0,018*

Степень адаптации к условиям среды можно оценить по показателям роста растений. Инокуляция семян ЦБ стимулировала линейный рост ячменя, высота растений была больше по сравнению с контролем на 40% (рис. 18). Листья растений отличались от других вариантов, имели большую длину и ширину, на них отсутствовали некрозы, хлорозы. Возможно, ростостимулирующий эффект связан с наличием в цианобактериях ауксино- и гиббериллиноподобных веществ. Предварительная инокуляция семян ЦБ при проращивании не оказывала протекторного действия на растения в условиях загрязнения МФК. Длина опытных растений была ниже, чем в контроле.

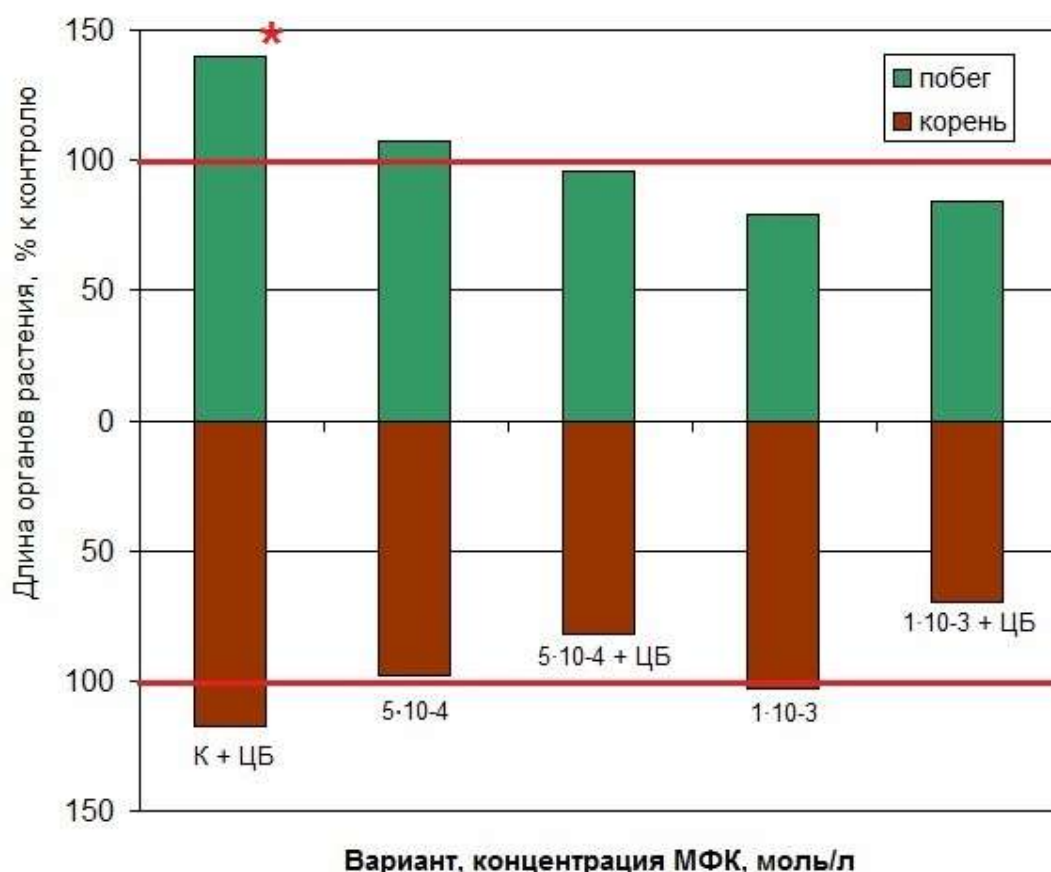


Рис. 18. Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерии *Nostoc muscorum* на линейный рост органов растений ячменя

МФК не оказывала достоверного изменения длины корней. Инокуляция семян ЦБ и наличие в среде выращивания МФК вызвали ростингибирующее действие на растения. Длина корней в опытах с обработкой семян ЦБ и действием МФК была на 20 – 30% ниже, чем в контроле.

Таким образом, предварительная обработка семян ЦБ *N. muscorum* не оказывала выраженного протекторного воздействия на растения, произрастающие в присутствии МФК. Отмечали активацию процессов ПОЛ в клетках, увеличение уровня содержания каротиноидов и антоцианов (в присутствии МФК $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л). В большей степени активация окислительных процессов отмечена в клетках растений, инокулированных ЦБ и выращенных в присутствии МФК высокой концентрации ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л). Результатом развития окислительного стресса стало снижение накопления зеленого пигмента хлорофилла и угнетение линейного роста растений.

Влияние предпосевной инокуляции семян цианобактерией *Nostoc linckia* на жизнедеятельность растений ячменя, выращенных в условиях загрязнения водной культуры метилфосфоновой кислотой (опыт 8)

Изучали влияние МФК на жизнедеятельность растений, которые выращивали с предварительной инокуляцией семян ЦБ и без инокуляции семян ЦБ.

МФК вызывала снижение интенсивности процессов ПОЛ в корнях опытных растений (рис. 19). Причем, с ростом концентрации МФК в среде выращивания, накопление МДА в клетках корней ячменя уменьшалось. Цианобактериальная инокуляция семян индуцировала снижение интенсивности процессов ПОЛ в корнях ячменя в контрольном варианте. Схожий эффект отмечали в опыте с цианобактериальной инокуляцией семян *N. muscorum* (см. п. 5.1.). Показано, что снижение МДА происходило и в растениях, выращенных с предпосевной инокуляцией семян ЦБ, на загрязненном МФК субстрате.

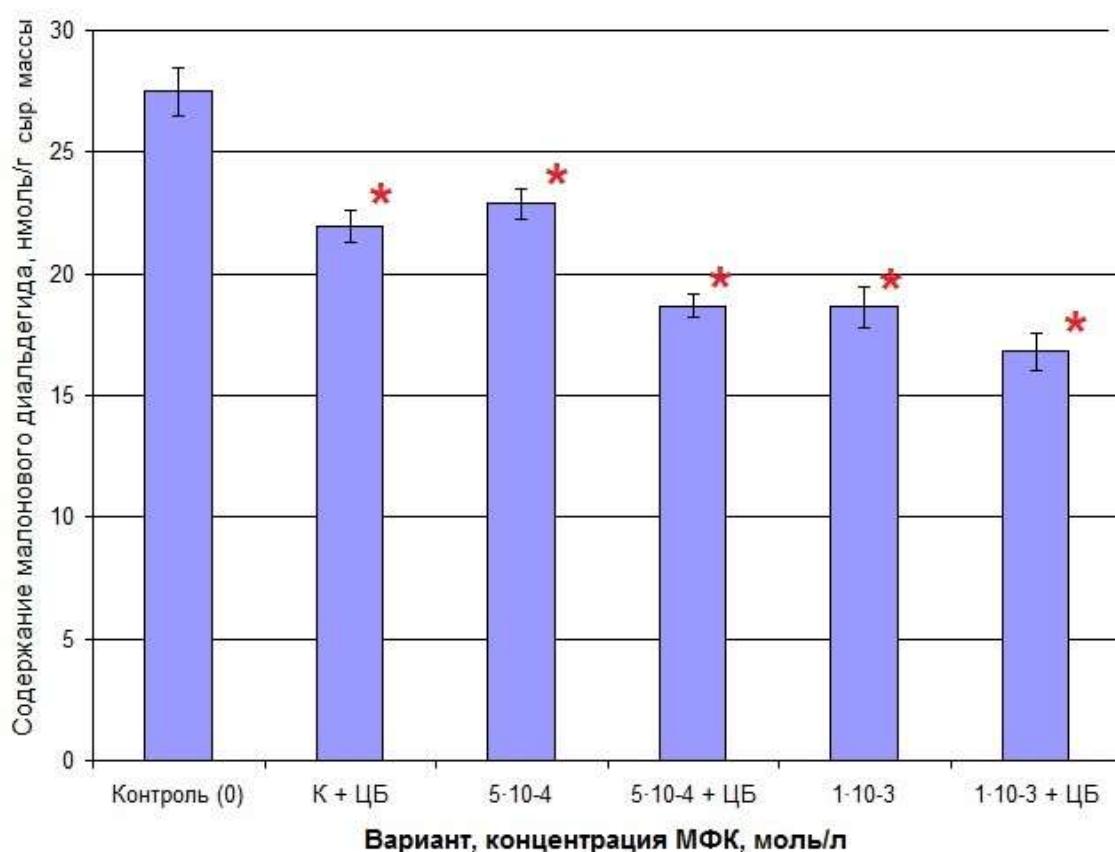


Рис. 19. Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерии *Nostoc linckia* на содержание малонового диальдегида в корнях ячменя

Чувствительность листьев ячменя к действию МФК и ЦБ была меньше, чем корней. В вариантах с действием МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ и $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) отмечали снижение накопления МДА в листьях на 20% и на 15% соответственно от контрольного уровня (рис. 20). Инокуляция семян ЦБ *N. linckia*, напротив, индуцировала активацию процессов ПОЛ в листьях ячменя. Цианобактериальная обработка семян вызывала повышенное накопление МДА в листьях ячменя, выращенных в условиях загрязнения МФК высокой концентрации ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л).

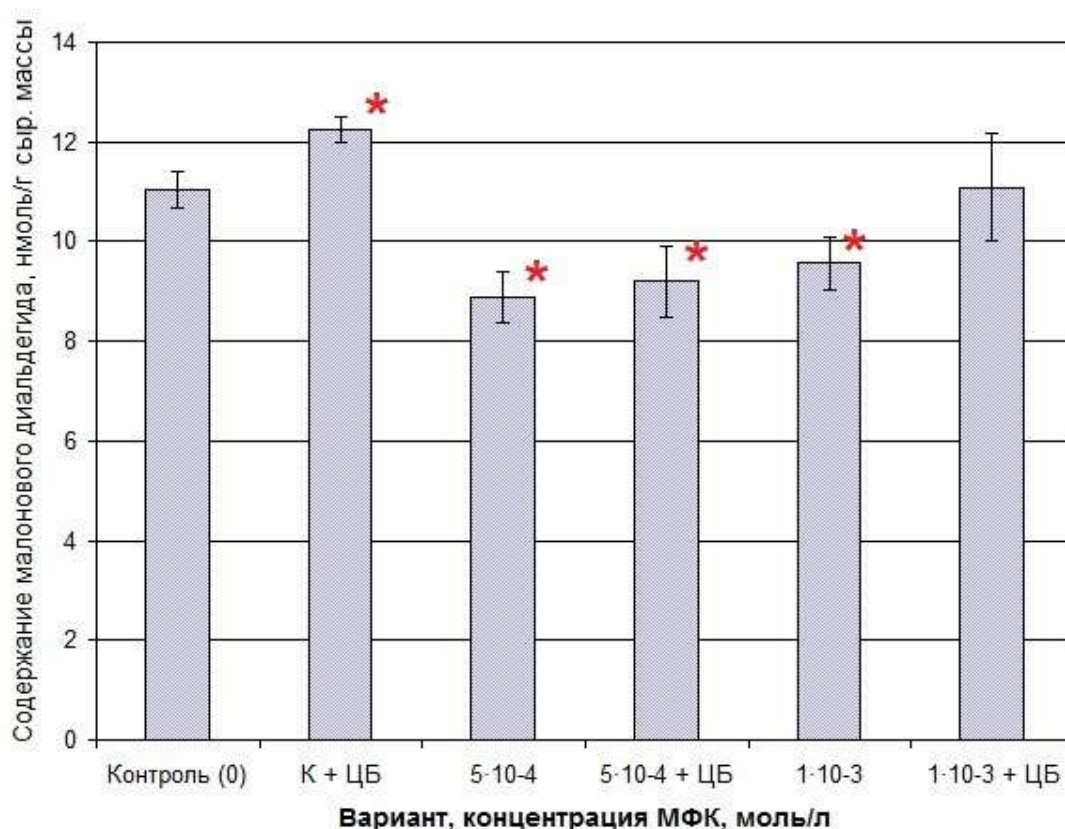


Рис. 20. Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерии *Nostoc linckia* на содержание малонового диальдегида в листьях ячменя

По-видимому, снижение уровня МДА в вариантах с действием $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л и $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л МФК связано с активацией антиоксидантной системы, чему способствует предварительная инокуляция семян ЦБ. Наиболее сильно это проявляется в корнях ячменя, в листьях предварительная цианобактериальная обработка, не вызывала снижения интенсивности ПОЛ, что, возможно, связано с различиями механизмов защиты в клетках надземных и подземных тканей растений.

Изучено содержание пластидных пигментов в листьях ячменя. Установлено, что $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л МФК вызывала достоверное увеличение содержания зеленых пигментов в листьях ячменя (табл. 8). Также в данном варианте отмечали возрастание уровня каротиноидов и антоцианов и снижение интенсивности процессов ПОЛ. Инокуляция семян ЦБ при проращивании не приводила к изменениям в пигментном комплексе растений, содержание хлорофиллов *a* и *b* были близки к контролю.

Таблица 8

Действие метилфосфоновой кислоты и цианобактерии *Nostoc linckia* на содержание пластидных пигментов в листьях ячменя

Вариант, МФК, моль/л	Содержание пигментов, мг/г сухой массы			
	хлорофилл			каротиноиды
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a+b</i>	
Контроль (0)	5,23±0,03	1,99±0,01	7,22±0,30	1,19±0,08
К + ЦБ	5,22±0,02	1,94±0,02	7,16±0,73	1,37±0,25
$5 \cdot 10^{-4}$	7,88±0,01*	2,81±0,01*	10,69±1,03*	1,89±0,21*
$5 \cdot 10^{-4}$ + ЦБ	5,79±0,32	2,16±0,01*	7,95±0,37*	1,26±0,01
$1 \cdot 10^{-3}$	5,30±0,30	1,91±0,01	7,21±0,36	1,21±0,13
$1 \cdot 10^{-3}$ + ЦБ	5,30±0,34	1,79±0,02	7,09±0,28	1,20±0,14

Наряду с активацией процессов ПОЛ, инокуляция семян ЦБ приводила к возрастанию содержания каротиноидов в листьях, что свидетельствует об активации антиоксидантной системы в растительных клетках (табл. 8). Значительное увеличение, в 1,5 раза, уровня каротиноидов в листьях вызывала МФК в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Содержание каротиноидов в листьях остальных вариантах опыта было в пределах контроля.

Низкомолекулярными антиоксидантами, входящими в состав защитной системы растений, являются антоцианы. Имеются данные о том, что антоцианы могут непосредственно нейтрализовывать активные формы кислорода, образующиеся вследствие фотосинтетических процессов в хлоропластах по типу, сходному с каротиноидами (Ehlenfeldt, Prior, 2001).

В листьях ячменя, семена которого при проращивании инокулировали ЦБ, содержание антоцианов было значительно меньше, чем в контроле (рис. 21). Отмечали разнонаправленные изменения содержания веществ с антиоксидантными свойствами (каротиноидов и антоцианов) на цианобактериальную обработку семян, что, возможно, связано со спецификой их антиоксидантной активности в клетках. Известно, что отличительной особенностью большинства эндогенных низкомолекулярных антиоксидантов является нелинейная зависимость между их концентрацией и степенью ингибирования свободнорадикальных процессов (Чупахина и др., 2011).

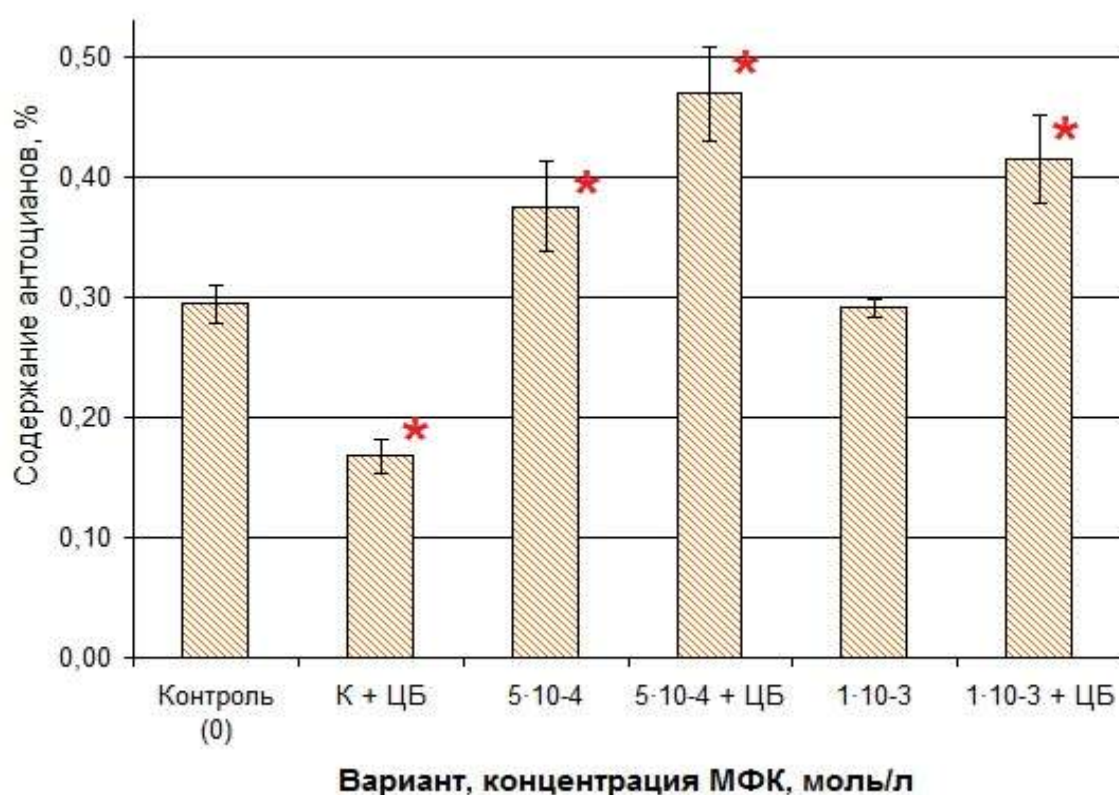


Рис. 21. Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерии *Nostoc linckia* на содержание антоцианов в листьях ячменя

Содержание антоцианов в листья ячменя, выращенном в присутствии МФК более высокой концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, было близко к контролю, что согласуется с данными по накоплению МДА и каротиноидов. ЦБ инокуляция семян при проращивании вызывала накопление антоцианов в листьях растений, которые выращивали на растворах МФК. В опыте с $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л МФК

количество антоцианов в листьях возрастало на 60% от контрольного уровня, при воздействии МФК в большей концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л – на 40% от контроля. Выявлена обратная зависимость между уровнем веществ с антиоксидантными свойствами (каротиноиды и антоцианы) и содержанием МДА в растительных клетках в опыте с $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л МФК. По-видимому, накопление антиоксидантов, способствовало снижению интенсивности процессов ПОЛ в листьях ячменя в опыте с МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л).

Полученные данные свидетельствуют о том, что инокуляция семян ЦБ вызывает накопление антоцианов, выполняющих протекторную функцию, и способствует выживанию растений в стрессовых условиях.

В варианте с действием МФК ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) выявлено угнетение линейного роста побегов, причем инокуляция семян ЦБ не снижала токсического действия МФК (табл. 9). В отличие от побегов, корневая система ячменя была более чувствительна к действию МФК и ЦБ. Достоверное снижение длины корней отмечали во всех опытных вариантах. Предварительная цианобактериальная инокуляция семян не снимала токсического действия МФК на рост корней. Длина корней опытных растений была в среднем на 30% ниже контрольных. Подобные эффекты были отмечены в опыте с цианобактериальной инокуляцией семян *N. muscorum* при проращивании (опыт 7).

Таблица 9

Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерии *Nostoc linckia* на рост растений ячменя

Вариант, МФК моль/л	Длина, см	
	побег	корень
Контроль (0)	$15,37 \pm 1,08$	$9,75 \pm 1,25$
К + ЦБ	$14,93 \pm 1,34$	$6,56 \pm 2,33^*$
$5 \cdot 10^{-4}$	$14,54 \pm 0,83$	$6,36 \pm 0,81^*$
$5 \cdot 10^{-4}$ + ЦБ	$14,46 \pm 1,57$	$6,37 \pm 1,15^*$
$1 \cdot 10^{-3}$	$13,87 \pm 1,60^*$	$6,43 \pm 0,67^*$
$1 \cdot 10^{-3}$ + ЦБ	$13,49 \pm 1,43^*$	$6,30 \pm 0,94^*$

Таким образом, предпосевная инокуляция семян ЦБ индуцировала процессы антиоксидантной защиты в клетках растений ячменя, выращенных в условиях загрязнения МФК. Обработка семян ЦБ, наряду с активацией процессов ПОЛ, приводила к возрастанию содержания пигментов – антиоксидантов (каротиноидов и антоцианов). Однако предварительная инокуляция семян ЦБ не снижала негативного действия МФК на рост растений.

4.2.2. Влияние предпосевной инокуляции семян природными биопленками цианобактерий с доминированием *Nostoc commune* на жизнедеятельность растений ячменя, выращенных в условиях загрязнения водной культуры метилфосфоновой кислотой (опыт 9)

Изучено влияние инокуляции семян ячменя биопленками ЦБ с доминированием *N. commune* на процессы ПОЛ в растительных тканях ячменя.

Выявлена тенденция снижения количества МДА в листьях и корнях при инокуляции семян ячменя биопленками ЦБ *N. commune* (рис. 22). При воздействии МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л и $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) наблюдали рост активности процессов ПОЛ в листьях ячменя на 20 и 60% от уровня контроля соответственно. В листьях растений, выращенных в присутствии БП и МФК, активность ПОЛ была на уровне контроля. Однако инокуляция семян биопленками приводила к росту активности ПОЛ в корнях растений в варианте с присутствием в среде $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л МФК, по сравнению с действием МФК данной концентрации.

Было изучено влияние МФК и инокуляции семян БП на содержание в листьях ячменя веществ с антиоксидантными свойствами – антоцианов и каротиноидов.

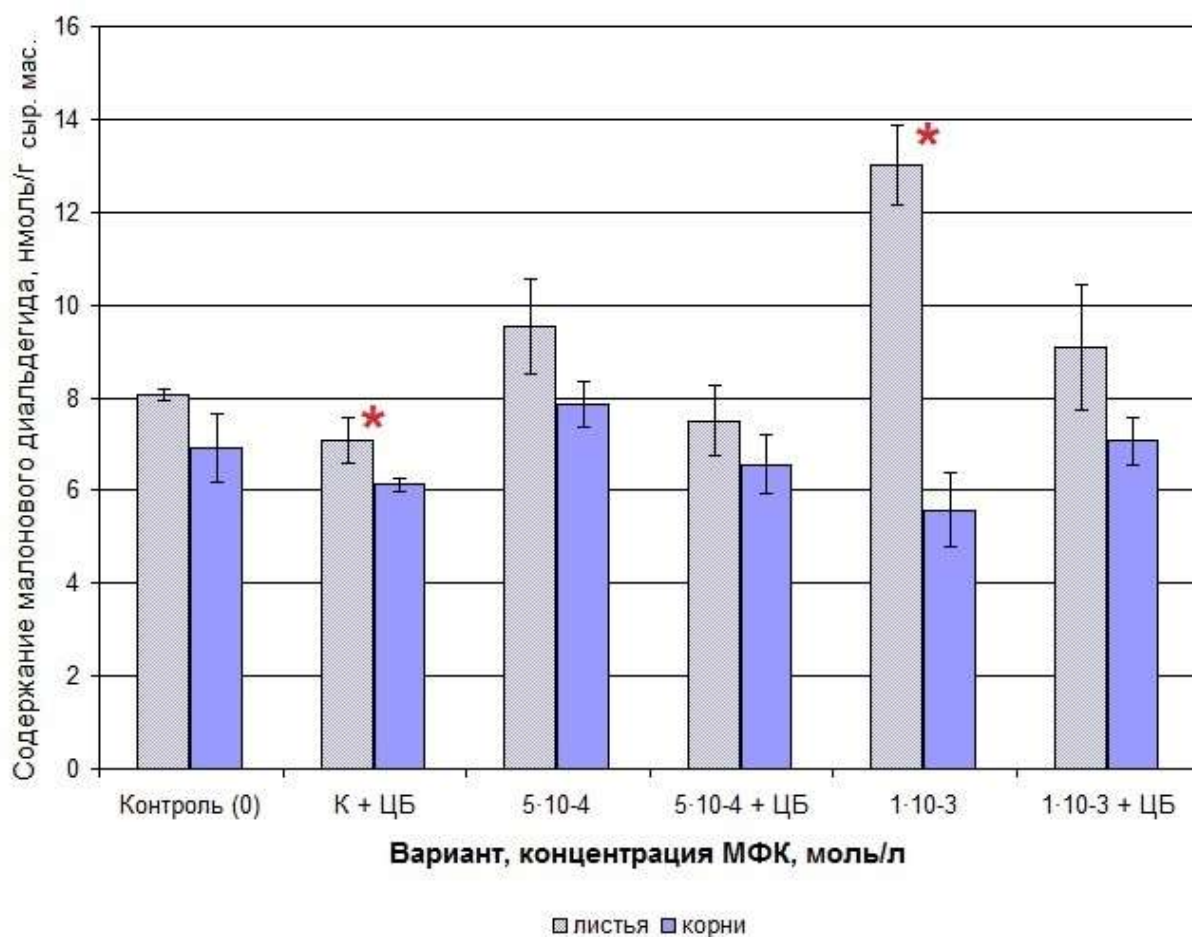


Рис. 22. Влияние метилфосфоновой кислоты и природных биопленок с доминированием *Nostoc commune* на активность ПОЛ в листьях и корнях ячменя

МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) вызывала снижение уровня антоциановых пигментов в среднем на 20% от контроля. МФК в более высокой концентрации ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л), напротив, индуцировала накопление антоцианов (рис. 23). Растения, семена которых инокулировали БП, как в присутствии МФК, так и в контрольном варианте, отличались пониженным накоплением антоцианов.

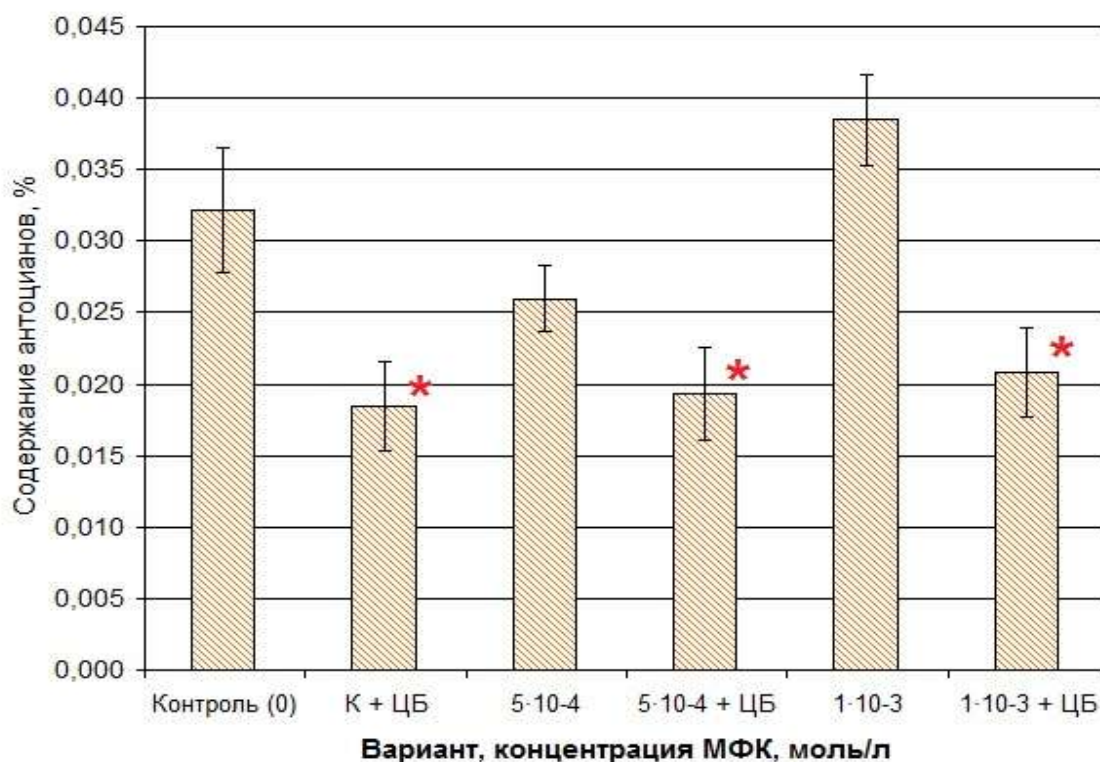


Рис. 23. Влияние метилфосфоновой кислоты и природных биопленок цианобактерий с доминированием *Nostoc commune* на уровень антоцианов в листьях ячменя

МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) вызывала снижение уровня желтых пигментов, а в варианте с действием МФК более высокой концентрации ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л), напротив, отмечали рост содержания пигмента на 30% от уровня контроля (табл. 10). Выявлена тесная корреляция между содержанием каротиноидов и накоплением антоцианов в листьях в опытах с действием МФК ($r=0,99$). Инокуляция семян БП при проращивании приводила к снижению уровня каротиноидов в листьях ячменя. Но растения, обработанные БП и выращенные в условиях загрязнения МФК, напротив, отличались повышенным уровнем каротиноидов, в отличие от вариантов с действием МФК.

**Влияние метилфосфоновой кислоты и биопленок с доминированием
Nostoc commune на содержание пластидных пигментов в листьях ячменя**

Вариант, МФК, моль/л	Содержание пигментов, мг/г сухой массы			
	хлорофиллы			каротиноиды
	<i>a</i>	<i>б</i>	<i>a+б</i>	
Контроль (0)	5,81±0,87	2,52±0,37	8,34±1,24	1,17±0,14
К+БП	4,50±0,14*	1,92±0,01*	6,42±0,15*	1,00±0,15
5·10 ⁻⁴	4,75±0,21	2,00±0,05*	6,76±0,30*	0,96±0,02*
5·10 ⁻⁴ + БП	5,53±0,33	2,35±0,06	7,89±0,40	1,10±0,03
1·10 ⁻³	6,21±0,14	2,80±0,10	9,01±0,17	1,35±0,03*
1·10 ⁻³ + БП	6,09±0,09	2,83±0,01	8,93±0,10	1,49±0,11*

Физиологическое состояние растений во многом определяется содержанием пластидных пигментов в листьях. Установлено, что инокуляция семян БП приводила к снижению количества зеленых пигментов в листьях ячменя (табл. 10). МФК в низкой концентрации (5·10⁻⁴ моль/л) также снижала уровень хлорофиллов в растительных тканях. При воздействии МФК (1·10⁻³ моль/л) количество зеленых пигментов оставалось в пределах контроля. Инокуляция семян БП стимулировала накопление хлорофиллов в условиях загрязнения МФК в концентрации 5·10⁻⁴ моль/л. При действии МФК более высокой концентрации достоверных изменений количества хлорофиллов в растениях, семена которых инокулировали при прорастании БП, не было.

Адаптацию растений к условиям среды также можно оценить по показателям роста. МФК вызывала угнетение роста побегов ячменя, но не оказывала влияние на рост корней (рис. 24). Инокуляция семян при прорастании биопленками ЦБ приводила к активации ростовых процессов. Длина побегов ячменя, выращенного из семян инокулированных БП при прорастании, была выше, чем в контроле на 23%. Инокуляция семян БП оказывала фитопротекторное действие на растения, выращенные в условиях загрязнения МФК. Так, длина побегов ячменя в опыте с инокуляцией БП и действием МФК (5·10⁻⁴ моль/л) была выше, чем в контроле в 1,2 раза, в опыте с МФК (1·10⁻³ моль/л) – в 1,4 раза.

Инокуляция семян БП при проращивании также вызывала линейный рост корней как в контрольном варианте, так и в вариантах с загрязнением среды МФК (рис. 27).

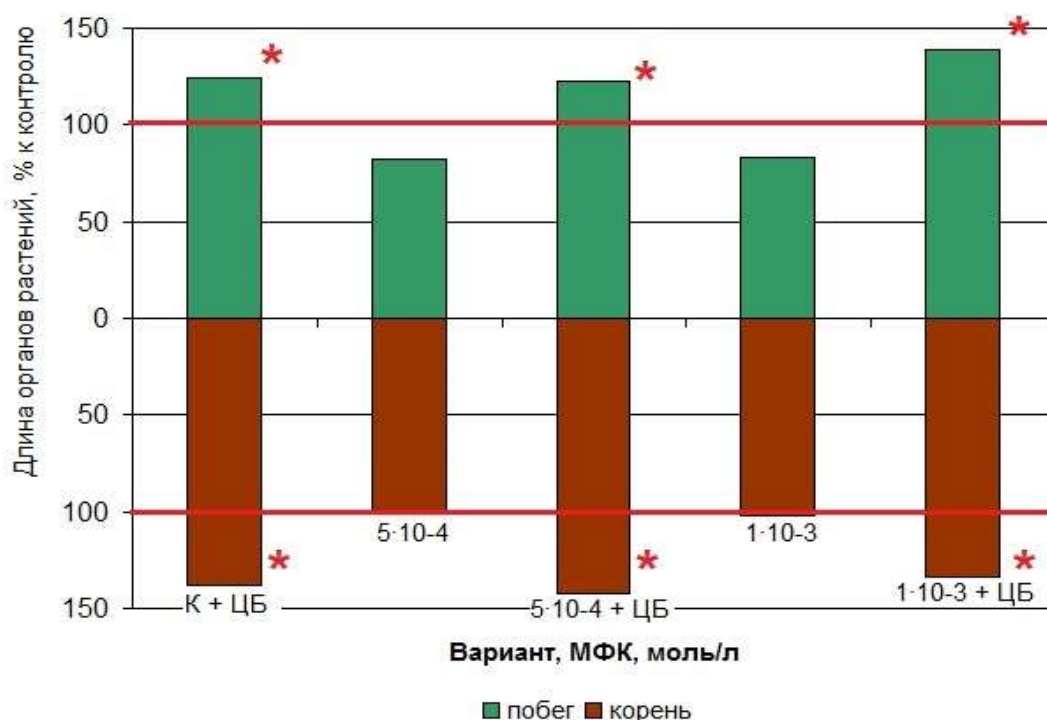


Рис. 24. Влияние метилфосфоновой кислоты и биопленок цианобактерий с доминированием *Nostoc commune* на рост растений ячменя

Таким образом, можно сделать вывод, что инокуляция семян биопленками ЦБ с доминированием *N. commune* оказывала протекторное действие на растения в условиях загрязнения МФК, что проявилось в снижении интенсивности процессов ПОЛ в клетках, накоплении каротиноидов и в значительной стимуляции линейного роста проростков.

Выводы по главе 4:

1. Интродукция альгологически чистых культур ЦБ в водную среду выращивания не оказывала выраженного защитного эффекта на растения в условиях загрязнения МФК. Наиболее эффективно было использование ЦБ *N. muscorum*, что проявилось в улучшении биохимических характеристик растений (уменьшении интенсивности процессов ПОЛ, накоплении пластидных и

вакуолярных пигментов), отмечена тенденция стимуляции роста растений по сравнению с вариантами с действием МФК.

2. Установлено, что более эффективным способом цианобактериальной интродукции для повышения устойчивости растений в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой является инокуляция семян при проращивании, чем внесение ЦБ в субстрат. Инокуляция семян цианобактериями способствовала улучшению биохимических характеристик и росту растений ячменя, как в обычных условиях, так и в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой.

3. Инокуляция семян при проращивании многовидовыми биопленками с доминированием *N. commune*, в опытах на водной культуре в присутствии МФК, более эффективна, по сравнению с действием на растения альгологически чистых культур цианобактерий. Отмечали снижение активности процессов ПОЛ в листьях ячменя и накопление каротиноидов, выполняющих протекторную функцию в растительных клетках. Предпосевная инокуляция семян биопленками ЦБ индуцировала значительный рост органов ячменя, выращенного в присутствии МФК, что свидетельствует о фитопротекторном эффекте организмов, входящих в состав биопленок с доминированием *N. commune*.

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНОКУЛЯЦИИ СЕМЯН ПРИ ПРОРАЩИВАНИИ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ РАСТЕНИЙ, ВЫРАЩЕННЫХ В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТОЙ (ПЕСЧАНАЯ КУЛЬТУРА)

Почва является депонирующей средой, в которой происходит накопление поллютантов, поступающих в окружающую среду. При этом часть поллютантов закрепляется в почве, а часть переходит в растения (Крупкин, 2005). Были проведены модельные опыты на песке, который однократно при посадке семян поливали раствором МФК (0,05 моль/л). Для экспериментов на песке использовали раствор МФК большей концентрации, чем для опытов на водной культуре, что обусловлено большей поглонительной способностью твердого субстрата.

5.1. Влияние предпосевной инокуляции семян альгологически чистыми культурами цианобактерий на жизнедеятельность растений ячменя, выращенных в условиях загрязнения песчаной культуры метилфосфоновой кислотой

Влияние предпосевной инокуляции семян цианобактерией *Nostoc linckia* на жизнедеятельность растений ячменя, выращенных в условиях загрязнения песчаной культуры метилфосфоновой кислотой (опыт 10)

В опытах на песчаной культуре изучено влияние цианобактериальной обработки семян *N. linckia* при проращивании и МФК на активность процессов ПОЛ, содержание пластидных пигментов и показатели линейного роста растений ячменя.

В опыте с загрязнением субстрата МФК отмечали снижение интенсивности процессов ПОЛ в листьях ячменя по сравнению с контролем (рис. 25). Цианобактериальная инокуляция семян стимулировала снижение уровня МДА в листьях в контрольном варианте, а также в варианте с действием МФК.

В корнях растений достоверных изменений накопления продукта ПОЛ – МДА, по сравнению с контролем не выявлено.

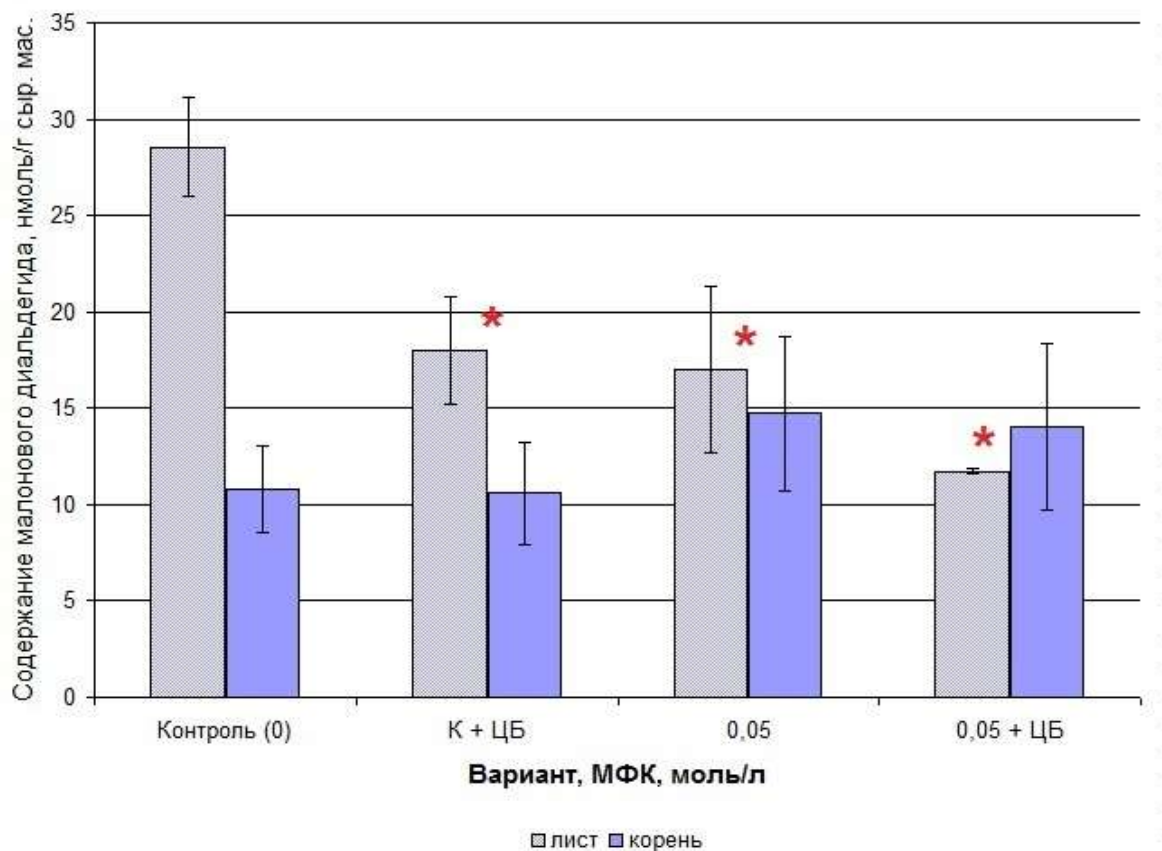


Рис. 25. Влияние инокуляции семян цианобактерией *Nostoc linckia* и метилфосфоновой кислоты на содержание малонового диальдегида в корнях и листьях ячменя

Содержание пластидных пигментов – важный показатель функционального состояния растений. Во всех вариантах отмечали рост количества зеленых пигментов по сравнению с контролем (табл. 11). Наиболее эффективно ЦБ обработка семян проявилась в варианте с действием МФК, содержание хлорофиллов в листьях было в 1,2 раза выше, чем в контроле.

Содержание каротиноидов – пигментов, проявляющих антиоксидантные свойства, во всех вариантах оставалось в пределах контроля (табл. 11).

**Действие метилфосфоновой кислоты и предварительной инокуляции
семян цианобактерией *Nostoc linckia* на содержание пластидных пигментов в
листьях ячменя**

Вариант, МФК, моль/л	Содержание пигментов, мг/г сухой массы			
	каротиноиды	хлорофиллы		
		<i>a</i>	<i>б</i>	<i>a+б</i>
Контроль (0)	0,89±0,07	5,05±0,51	1,02±0,12	6,77±0,82
К+ЦБ	0,85±0,09	4,84±0,38	2,05±0,19*	6,89±1,06
0,05	1,00±0,04	5,53±0,10	2,26±0,05*	7,79±0,14*
0,05+ЦБ	1,02±0,03	6,77±0,67	2,23±0,30*	9,00±1,3*

Результат физиолого-биохимических перестроек в клетках ячменя при действии ЦБ *N. linckia* и МФК оценивали по показателям линейного роста. Подземная и надземная части растений по-разному реагировали на присутствие МФК и инокуляцию ЦБ (рис. 26). Надземные органы были более чувствительны к действию МФК, что проявилось в снижении длины листьев. ЦБ инокуляция семян, напротив, стимулировала рост проростков. Отмечали ростстимулирующее действие ЦБ обработки семян на корни ячменя, в том числе выращенного на загрязненном МФК субстрате.

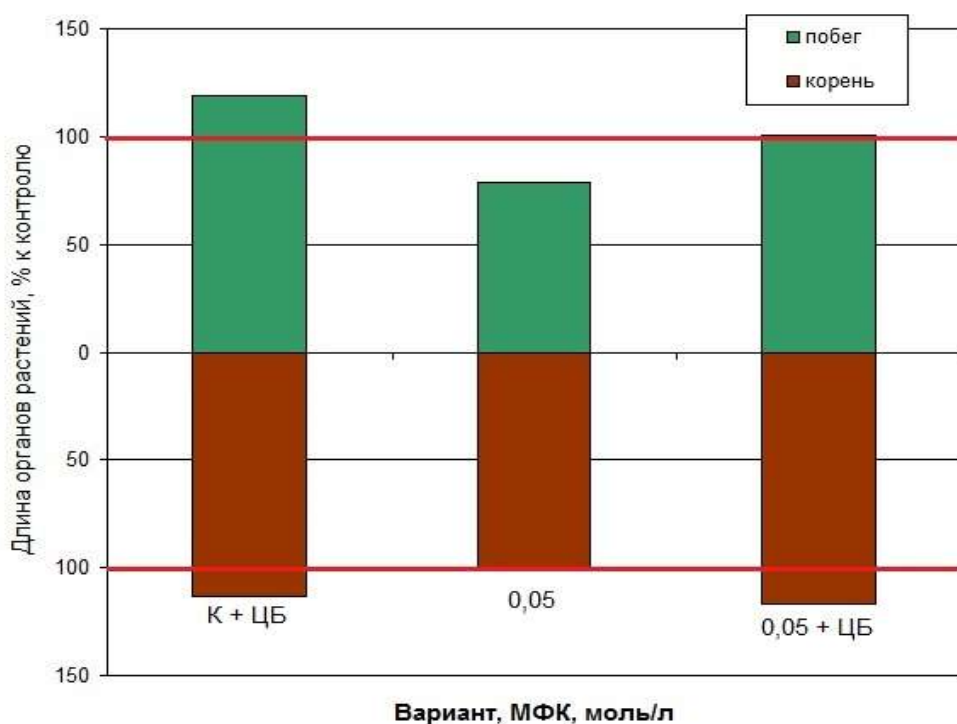


Рис. 26. Влияние метилфосфоновой кислоты и инокуляции семян цианобактерией *Nostoc linckia* на линейный рост органов растений ячменя

Таким образом, предварительная обработка семян ЦБ *N. linckia* при проращивании оказывала фитопротекторное действие на растения ячменя в условиях загрязнения среды обитания МФК. Отмечали снижение активности процессов ПОЛ в листьях и увеличение содержания пластидных пигментов. ЦБ обработка семян оказывала ростстимулирующее действие на корни растений ячменя, которые выращивали на загрязненном МФК субстрате.

Влияние предпосевной инокуляции семян цианобактерией *Nostoc muscorum* на жизнедеятельность растений ячменя, выращенных в условиях загрязнения песчаной культуры метилфосфоновой кислотой (опыт 11)

Было изучено влияние МФК и предварительной обработки семян ЦБ *Nostoc muscorum* на активность процессов ПОЛ, уровень пластидных пигментов и длину органов растений ячменя.

Установлено, что МФК (0,05 моль/л) вызывала активацию процессов ПОЛ в листьях опытных растений (рис. 27). Инокуляция семян ЦБ при проращивании не

вызывала достоверных изменений активности процессов ПОЛ в листьях ячменя. В опыте с ЦБ инокуляцией и действием МФК, отмечали снижение интенсивности ПОЛ в листьях ячменя, по сравнению с действием МФК.

Корни ячменя реагировали иначе на ЦБ инокуляцию и действие МФК. Установлено, что МФК снижала активность ПОЛ в корнях растений, что проявилось в сокращении количества МДА более чем на 40% от уровня контроля (рис. 27). Инокуляция семян ЦБ при проращивании вызывала достоверное повышение уровня МДА в корнях ячменя, как в присутствии МФК, так и в вариантах без МФК.

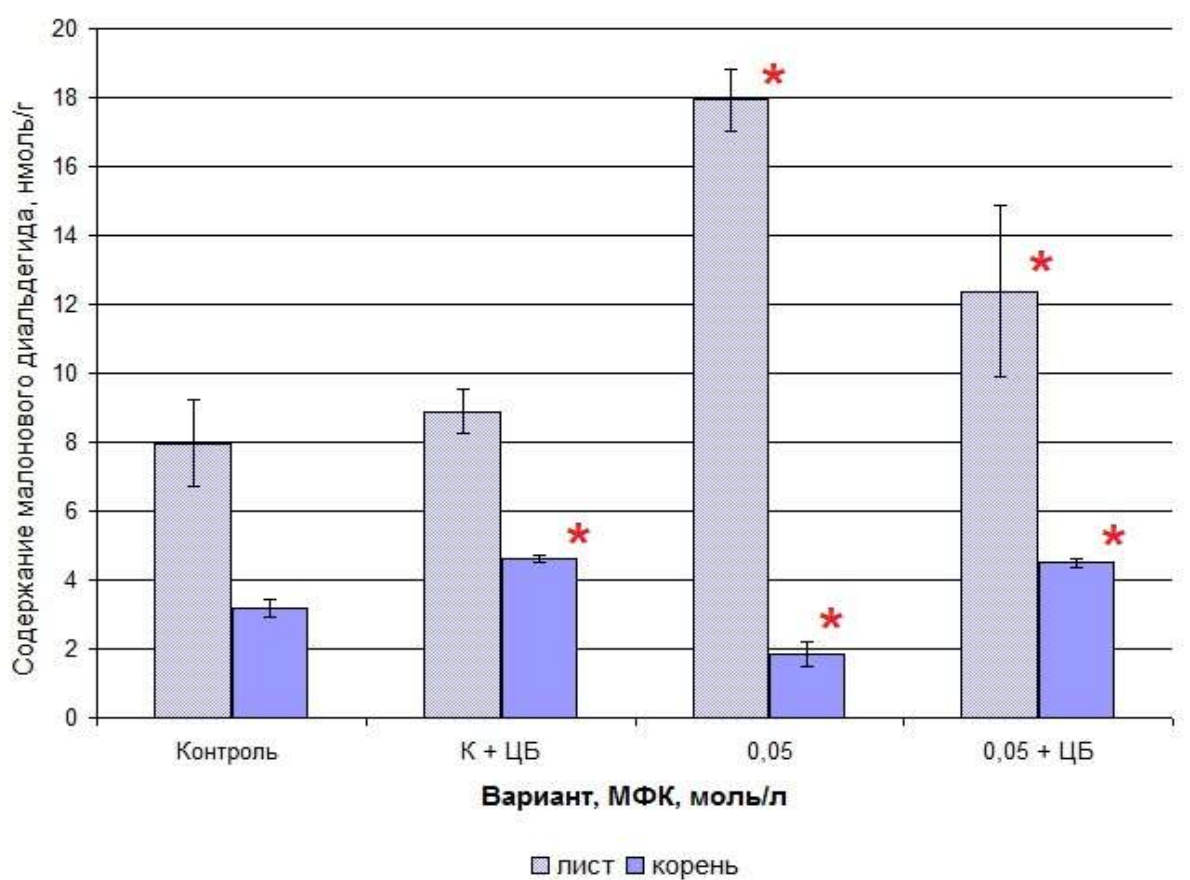


Рис. 27. Влияние предпосевной инокуляции семян цианобактерией *Nostoc muscorum* и метилфосфоновой кислоты на содержание малонового диальдегида в корнях и листьях ячменя

Изучено содержание пластидных пигментов в листьях ячменя. Установлено, что обработка семян ЦБ *N. muscorum* способствовала накоплению каротиноидов в листьях растений, выращенных как на чистом субстрате, так и в условиях

загрязнения МФК (табл. 12). В опыте с МФК содержание каротиноидов в листьях было близко к контролю.

Таблица 12

Действие метилфосфоновой кислоты и предпосевной инокуляции семян цианобактерией *Nostoc muscorum* на содержание пластидных пигментов в листьях ячменя

Вариант, МФК, моль/л	Содержание пигментов, мг/г сухой массы			
	каротиноиды	хлорофилл		
		<i>a</i>	<i>б</i>	<i>a+б</i>
Контроль (0)	0,64±0,05	2,71±0,10	1,35±0,29	4,06±0,14
К + ЦБ	1,00±0,03*	4,84±0,21*	2,01±0,22*	6,85±0,43*
0,05	0,70±0,03	3,35±0,10*	1,22±0,02	4,57±0,09*
0,05+ЦБ	0,82±0,08*	4,09±0,21*	1,42±0,13	5,51±0,25*

Уровень зеленых пигментов во всех вариантах был выше, чем в контроле. При этом МФК в меньшей степени способствовала накоплению зеленых пигментов в листьях (табл. 12). Обработка семян ЦБ приводила к значительному накоплению хлорофиллов. В варианте с загрязнением среды МФК и цианобактериальной обработкой семян сумма хлорофиллов *a* и *б* в листьях ячменя была выше контроля в 1,4 раза.

Отмечена тенденция увеличения длины корней ячменя, семена которого были обработаны ЦБ *N. muscorum*. Однако, достоверных различий между линейными показателями роста ячменя, выращенного в присутствии МФК и предварительной обработкой ЦБ опытных и контрольных вариантов не выявлено (табл. 13).

Таблица 13

Действие метилфосфоновой кислоты и предпосевной инокуляции семян цианобактерией *Nostoc muscorum* на ростовые показатели ячменя

Вариант, МФК, моль/л	Длина, см	
	корень	побег
Контроль (0)	10,07±1,93	15,14±1,51
К + ЦБ	11,42±2,06	15,16±1,62
0,05	10,33±2,20	14,91±1,27
0,05+ЦБ	11,54±2,38	14,57±1,44

Таким образом, предпосевная инокуляция семян *N. muscorum* оказывала фитопротекторное действие на растения ячменя, что проявилось в накоплении хлорофиллов и каротиноидов, как при выращивании растений на чистом песчаном субстрате, так и в условиях загрязнения МФК. Также ЦБ инокуляция семян ячменя оказывала положительное действие на рост корней ячменя.

Влияние предпосевной инокуляции семян цианобактерией *Nostoc paludosum* на жизнедеятельность растений ячменя, выращенных в условиях загрязнения песчаной культуры метилфосфоновой кислотой (опыт 12)

Изучено влияние МФК и предварительной обработки семян ЦБ *N. paludosum* на активность процессов ПОЛ, содержание растительных пигментов (пластидных и вакуолярных) и длину органов растений ячменя.

При воздействии МФК отмечали значительное снижение интенсивности процессов ПОЛ в корнях и листьях опытных растений (рис. 28). Инокуляция семян ЦБ не вызывала достоверных изменений содержания МДА в листьях ячменя, но многократно снижала уровень МДА в корнях растений. Цианобактериальная инокуляция семян оказывала защитное действие на растения ячменя, выращенные в условиях загрязнения МФК. Отмечали значительное в 1,9 раза, по сравнению с контролем, снижение накопления МДА в листьях и корнях растений.

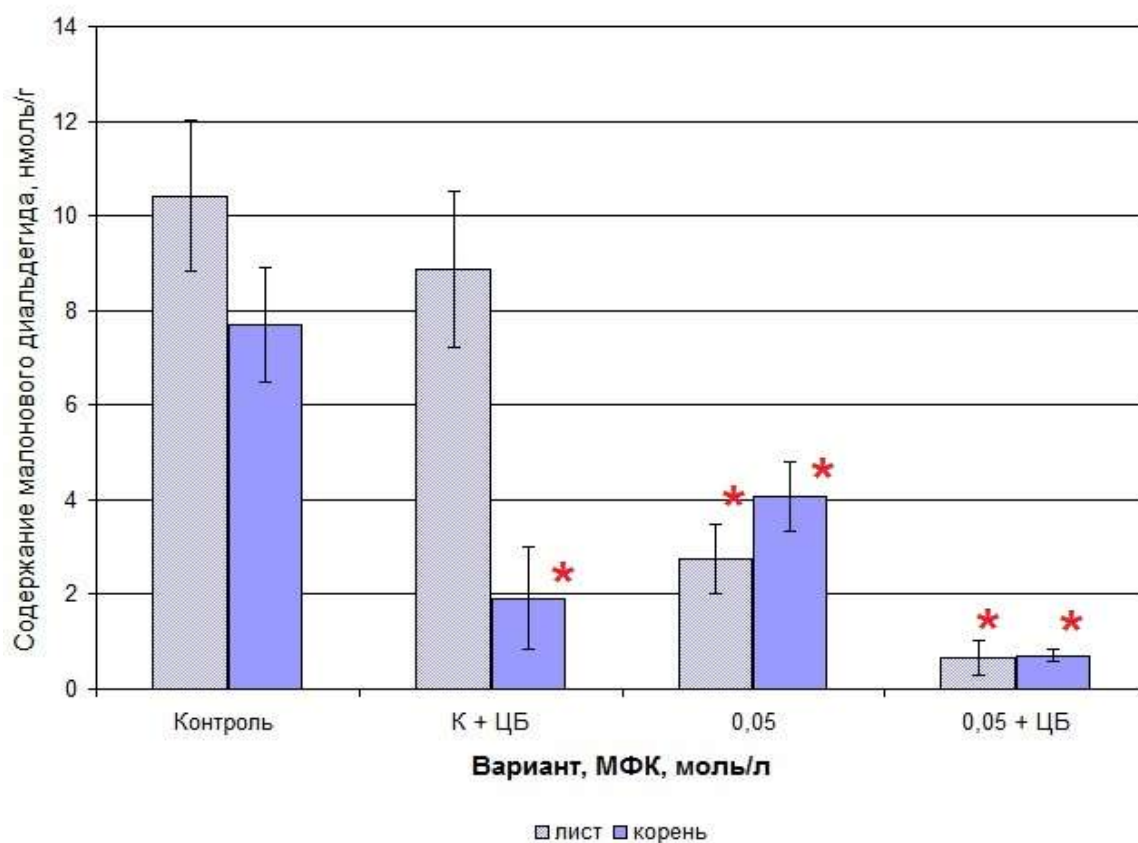


Рис. 28. Влияние предпосевной инокуляции семян цианобактерией *Nostoc paludosum* и метилфосфоновой кислоты на содержание малонового диальдегида в корнях и листьях ячменя

На фоне снижения уровня МДА в клетках, выявлено увеличение содержания пластидных пигментов – хлорофиллов и каротиноидов (табл. 14). МФК вызывала рост содержания каротиноидов в листьях, что согласуется с данными по снижению интенсивности ПОЛ в корнях и листьях в данном варианте. Инокуляция семян ЦБ также приводила к повышенному накоплению каротиноидов в контрольном варианте и в вариант с действием МФК (более чем в 3 раза от уровня контроля). Это свидетельствует о положительном действии ЦБ на пигментный комплекс растений ячменя.

**Действие метилфосфоновой кислоты и предпосевной инокуляции семян
цианобактерией *Nostoc paludosum* на содержание пластидных пигментов в
листьях ячменя**

Вариант, МФК, моль/л	Содержание пигментов, мг/г сухой массы			
	каротиноиды	хлорофилл		
		<i>a</i>	<i>б</i>	<i>a+б</i>
Контроль (0)	0,79±0,16	3,67±0,49	1,02±0,57	4,69±0,08
К + ЦБ	3,24±0,10*	6,01±0,39*	2,16±0,08*	8,17±0,31*
0,05	3,64±0,11*	6,05±0,52*	2,33±0,14*	8,38±0,66*
0,05+ЦБ	3,30±0,03*	5,19±0,23*	1,93±0,09*	7,13±0,23*

В варианте с действием МФК, а также с предпосевной инокуляцией семян ЦБ отмечали увеличение содержания хлорофиллов в 1,7 раза от уровня контроля (табл. 14). При совместном действии ЦБ и МФК количество хлорофиллов в листьях было ниже, чем в опыте с действием МФК, однако оставалось в 1,5 раза выше, по сравнению с контролем.

Инокуляция семян ЦБ, МФК и их совместное действие стимулировали накопление антоцианов в листьях опытных растений (рис. 29). В варианте с МФК содержание антоцианов было в 1,5 раза выше контроля. Цианобактериальная обработка семян способствовала увеличению уровня антоцианов в листьях в 1,6 раза по сравнению с контролем. При совместном действии на растения ЦБ и МФК содержание антоцианов было ниже, чем в варианте с действием МФК, однако значительно выше, чем в контроле.

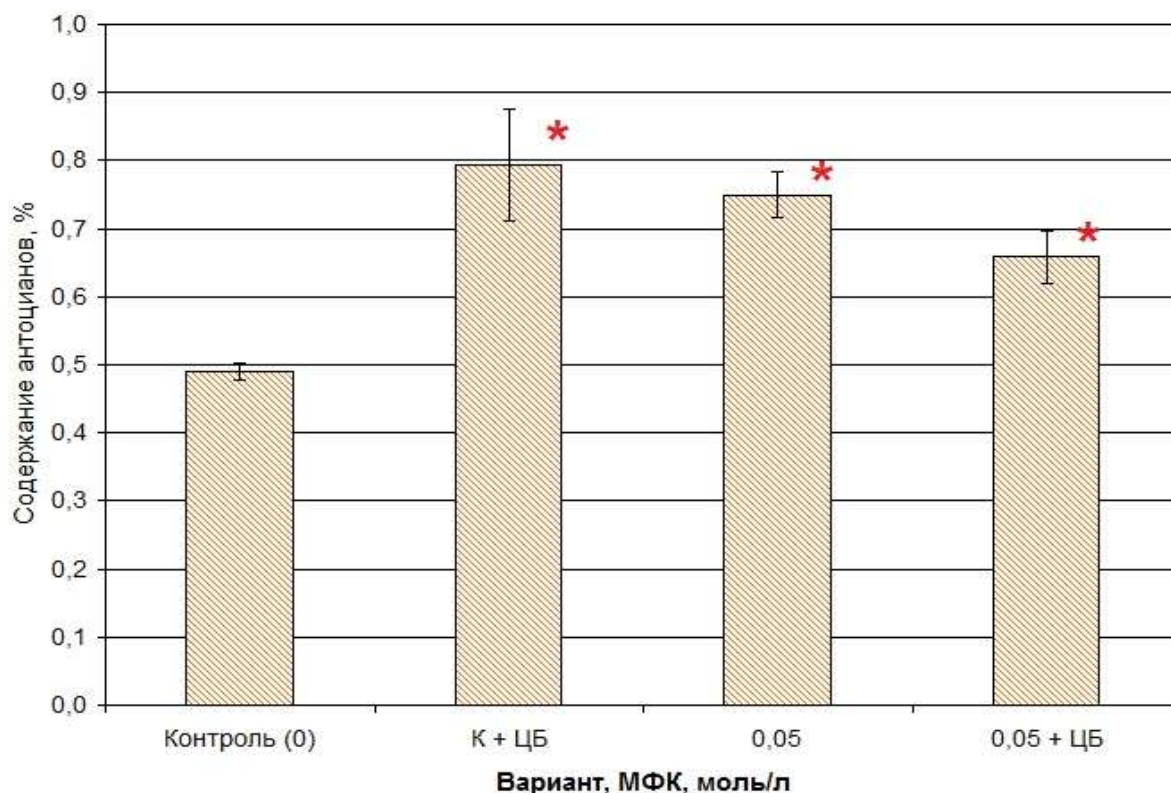


Рис. 29. Влияние метилфосфоновой кислоты и предпосевной инокуляции семян цианобактерией *Nostoc paludosum* на содержание антоциановых пигментов в листьях ячменя

Достоверных различий между вариантами опыта по показателям линейного роста не выявлено (табл. 15). Предпосевная инокуляция семян ЦБ снижала токсическое действие МФК, в варианте с совместным действием ЦБ и МФК отмечали стимуляцию роста органов опытных растений по сравнению с контролем.

Таблица 15

Действие метилфосфоновой кислоты и предпосевной инокуляции семян цианобактерией *Nostoc paludosum* на ростовые показатели ячменя

Вариант, МФК, моль/л	Длина, см	
	корень	побег
Контроль (0)	6,95±1,99	14,3±2,00
К +ЦБ	7,86±1,46	16,44±1,55
0,05	5,42±1,31	14,62±1,80
0,05+ЦБ	8,77±1,57	15,45±1,51

Таким образом, инокуляция семян ЦБ *N. paludosum* оказывала фитопротекторное действие на растения ячменя, что проявлялось в снижении активности процессов ПОЛ, стимуляции накопления хлорофиллов и каротиноидов, как при выращивании растений на чистом песчаном субстрате, так и в присутствии МФК.

5.2. Влияние предпосевной инокуляции семян биопленками цианобактерий с доминированием *Nostoc commune* на жизнедеятельность растений ячменя, выращенных в условиях загрязнения песчаной культуры метилфосфоновой кислотой (опыт 13)

Изучено влияние МФК и обработки семян БП с доминированием *N. commune* на биохимические показатели жизнедеятельности и рост растений ячменя.

Установлено, что МФК вызывала рост содержания МДА в корнях ячменя (рис. 30). Инокуляция семян БП приводила к снижению интенсивности процессов ПОЛ в корнях ячменя. В опыте с инокуляцией семян биопленками и выращиванием растений на загрязненном МФК субстрате интенсивность процессов ПОЛ в корнях ячменя была ниже, по сравнению с растениями, выращенными в условиях загрязнения МФК без обработки биопленками.

МФК вызывала накопление продуктов ПОЛ в листьях ячменя (МДА) почти в 2 раза от уровня контроля (рис. 30). Инокуляция семян *N. commune* приводила к росту содержания МДА в листьях ячменя.

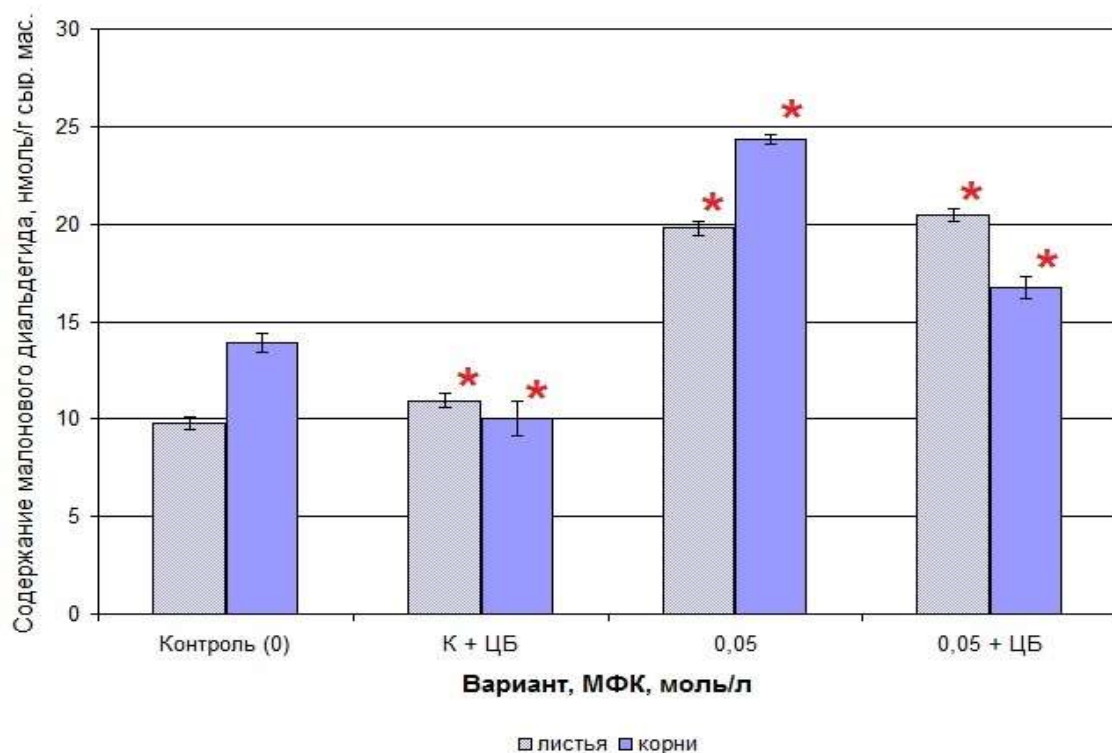


Рис. 30. Влияние метилфосфоновой кислоты и предпосевной инокуляции биопленками с доминированием *Nostoc commune* на интенсивность процессов перекисного окисления липидов в корнях и листьях ячменя

Выявлено повышенное накопление каротиноидов в листьях растений ячменя, семена которых были инокулированы БП (табл. 16). В варианте с загрязнением субстрата МФК содержание каротиноидов было значительно ниже, чем в контроле. Выявлена тесная отрицательная корреляция между показателями содержания МДА в листьях и содержанием каротиноидов ($r = -0,82$). Инокуляция семян БП не снижала фитотоксического действия МФК на пигментную систему ячменя. Уровень каротиноидов в листьях ячменя, предварительно обработанного биопленками и выращенного на загрязненном МФК субстрате, был ниже на 40% по сравнению с контролем.

Цианобактериальная инокуляция семян ячменя индуцировала накопление зеленых пигментов в листьях ячменя. В растениях, обработанных при проращивании БП, сумма хлорофиллов была выше в 1,4 раза, по сравнению с контролем (табл. 15). МФК, напротив, вызывала снижение накопления зеленых

пигментов в листьях ячменя до 40% от уровня контроля, причем сходный эффект отмечен в варианте с совместным действием инокуляции семян БП и МФК.

Таблица 16

Влияние метилфосфоновой кислоты и предпосевной инокуляции биопленками с доминированием *Nostoc commune* на пигментный комплекс ячменя

Вариант, МФК, моль/л	Содержание пигментов, мг/г сух. массы			
	хлорофиллы			каротиноиды
	<i>a</i>	<i>б</i>	<i>a + б</i>	
Контроль (0)	2,85±0,17	1,25±0,04	4,10±0,28	0,77±0,07
К + ЦБ	4,11±0,12*	1,77±0,03*	5,89±0,31*	1,16±0,10*
0,05	1,71±0,16*	0,85±0,10*	2,56±0,24*	0,47±0,01*
0,05 + ЦБ	1,66±0,31*	0,73±0,15*	2,39±0,46*	0,46±0,04*

Достоверного изменения длины побегов опытных растений ни в одном из вариантов опыта отмечено не было, однако прослеживалась тенденция к снижению длины побегов при воздействии МФК (рис. 31). Корневая система оказалась более чувствительна к действию МФК и БП. Инокуляция семян БП с доминированием *Nostoc commune* стимулировала линейный рост корней, длина корней была больше по сравнению с контролем на 64%. Значительное угнетение роста корней отмечали при воздействии МФК.

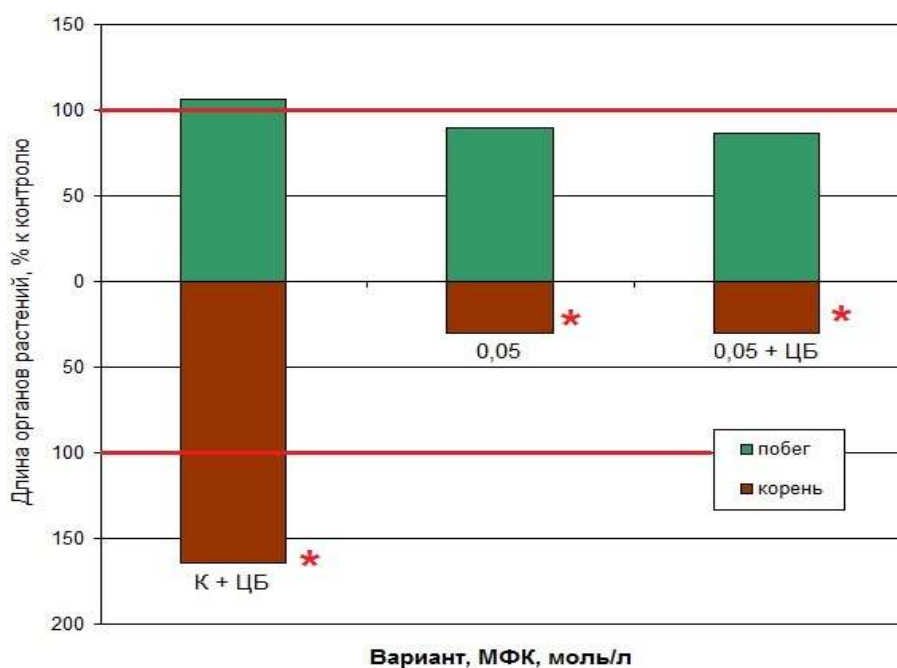


Рис. 31. Действие метилфосфоновой кислоты и предпосевной инокуляции семян биопленками с доминированием *Nostoc commune* на ростовые показатели ячменя

Таким образом, инокуляция семян БП с доминированием ЦБ *N. commune* способствовала снижению активности ПОЛ в корнях, значительному росту проростков. Однако в условиях загрязнения МФК предпосевная инокуляция семян биопленками была малоэффективна и не снижала токсического действия МФК.

Выводы по главе 5:

1. В опытах на песчаной культуре предпосевная инокуляция семян ЦБ *N. linckia*, *N. muscorum* и *N. paludosum* показала себя как эффективный способ повышения устойчивости растений к действию МФК. Обработка семян ЦБ способствовала ингибированию процессов ПОЛ в корнях и листьях растений, накоплению веществ с антиоксидантными свойствами (каротиноидов и антоцианов), в том числе в условиях загрязнения МФК, что проявилось в активации роста побегов.

2. В опытах на песчаной культуре, предпосевная инокуляция семян альгологически чистыми культурами цианобактерий оказывала большее протекторное действие на растения в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой, чем природные биопленки ЦБ с доминированием *N. commune*.

3. Наибольший протекторный эффект на растения ячменя, выращенные на песчаной культуре, в том числе, загрязненной МФК, оказывала предпосевная обработка ЦБ *N. paludosum*. При этом отмечали активное снижение интенсивности процессов ПОЛ как в корнях, так и листьях опытных растений, выращенных в присутствии МФК, повышение каротиноидов и антоцианов, входящих в состав антиоксидантной системы растений, а также накопление хлорофиллов в листьях. Также в вариантах, обработанных перед посадкой ЦБ *N. paludosum*, отмечали тенденцию активации роста органов растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований была дана оценка степени чувствительности цианобактерий к действию метилфосфонатов, кроме того, выявлены положительные эффекты предпосевной обработки семян цианобактериями на рост и биохимические показатели ячменя, в том числе произрастающего в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой. В целом, по работе можно сделать следующие выводы:

1. Выявлено влияние метилфосфоновой кислоты и глифосата на содержание хлорофилла *a* и интенсивность процессов перекисного окисления липидов в клетках цианобактерий. Показатель содержания хлорофилла *a* в клетках цианобактерий наиболее чувствителен к действию метилфосфонатов и может быть использован при биотестировании.
2. В модельных опытах с водными культурами установлено, что альгологически чистые культуры цианобактерий наиболее устойчивы к действию метилфосфонатов. В ряду *Nostoc linckia* – *Nostoc muscorum* – *Nostoc paludosum* устойчивость цианобактерий к действию метилфосфоновой кислоты и глифосата снижается. Более чувствительны к действию метилфосфонатов природные многовидовые биопленки с доминированием *Nostoc commune*.
3. Цианобактериальная инокуляция семян оказывает положительное действие на биохимические показатели и рост растений ячменя. Отмечается снижение интенсивности процессов перекисного окисления липидов в растительных клетках, накопление веществ с антиоксидатными свойствами (антоцианов и каротиноидов) и ростостимулирующее действие цианобактерий на растения.
4. Инокуляция семян при проращивании является наиболее эффективным способом цианобактериальной обработки для повышения устойчивости растений в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой. Цианобактериальная инокуляция семян способствует улучшению биохимических характеристик и росту растений ячменя в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой.
5. Инокуляция семян многовидовыми биопленками с доминированием *Nostoc commune*, в опытах с водной культурой, в большей степени снижает

фитотоксическое действие метилфосфоновой кислоты, по сравнению с альгологически чистыми культурами цианобактерий. В опытах с песчаной культурой, напротив, обработка семян альгологически чистыми культурами цианобактерий оказывает большее протекторное действие на растения в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой. Выявленные особенности могут послужить основой для разработки приемов фиторекультивации сред, загрязненных метилфосфоновой кислотой.

Список литературы

1. Абдувахабов А.А. Антиферментное действие и детоксикация фосфорорганических ингибиторов холинэстераз / А.А. Абдувахабов [и др] // отв. ред. Ш. И. Салихов. – Ташкент: АН УзССР: Ин-т биоорг. химии. Фан, 1989. – 182 с.
2. Александров В.Я. Реакция клеток на тепловой шок: физиологический аспект / В.Я. Александров, И.М. Кислюк // Цитология. – 1994. – № 36. – С. 5–59.
3. Андреюк Е.И. Цианобактерии / Е.И. Андреюк, Ж.П. Коптева, В.В. Занина – Киев: Наукова думка, 1990. – 200 с.
4. Антонюк Л.П. Коммуникация в растительно-бактериальных симбиозах: современное состояние и перспективы / Л.П. Антонюк // Стратегия взаимодействия микроорганизмов с растениями и окружающей средой: Материалы V всероссийской конференции молодых ученых. – Саратов: Научная книга. – 2010. – С. 6.
5. Артамонова М.Н. Роль бактериальных симбионтов в растительно-микробных ассоциациях / М.Н. Артамонова, Н.И. Потатуркина-Нестерова, О.Е. Безубенкова // Вестник Башкирского университета. – 2014. – Т. 19. – №1. – С. 81–83.
6. Атлавините О. Влияние пестицидов на педобионты и биологическую активность почв / О. Атлавините. – Вильнюс: Мокслас, 1982. – 65 с.
7. Ашихмина Т.Я., Эколого-аналитический мониторинг антропогенно-нарушенных почв / Т. Я. Ашихмина, Л.И. Домрачева, Л.В. Кондакова, Е.В. Дабах, Г.Я. Кантор, А.А. Калинин, А.И. Вараксина, С.Ю. Огородникова // Вестник Вятского государственного гуманитарного университета. – 2006. – №14. – с. 153–169.
8. Ашихмина Т.Я. Комплексный экологический мониторинг объектов хранения и уничтожения химического оружия / Т.Я. Ашихмина. – Киров: Вятка, 2002. – 544 с.
9. Ашихмина Т.Я. Метилфосфоновая кислота как регулятор биологических процессов в экологических системах: действие на микроорганизмы,

ферментативную активность и высшие растения / Т.Я. Ашихмина, Л.В. Кондакова, Л.И. Домрачева, С.Ю. Огородникова // Теоретическая и прикладная экология. – 2007. – № 2. – С. 78–87.

10. Аюшинова Л.С. Ответные реакции растений на действие специфических поллютантов (на примере метилфосфоновой кислоты, пирогосфата натрия, фторида натрия) : автореф. дис. канд. биол. наук : 03.02.08 / Аюшинова Любовь Сергеевна. – Сыктывкар, 2015. – 18 с.

11. Бажанова Н.В. Пигменты пластид зеленых растений и методика их исследования / Н.В. Бажанова ; Акад. наук СССР. Ботан. ин-т им. В. Л. Комарова. – Москва; Ленинград : Наука. [Ленингр. отд-ние], 1964. – 121 с.

12. Барабой В.А. Механизмы стресса и ПОЛ / В.А. Барабой // Успехи современной биологии. – 1991. – Т.111. Вып.6. – С.923–931.

13. Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений / В.В. Бараненко / Цитология. – 2006. – Т. 48. – С. 465–473.

14. Барашков Г. К. Сравнительная биохимия водорослей / Г.К. Барашков. – М.: Пищ. пром-сть, 1972. – 336 с.

15. Бекасова О. Д. Аккумуляция кадмия и алюминия цианобактерией *Nostoc muscorum* / О.Д. Бекасова, В.К. Орлеанский, В.В. Никандров // Микробиология. – 1999. – Т. 68. – С. 851–859.

16. Белимов А.А. Использование ассоциативных бактерий для инокуляции ячменя в условиях загрязнения почвы свинцом и кадмием / А.А. Белимов, А.М. Кунакова, В.И. Сафронова, В.В. Степанок, Л.Ю. Юдкин, Ю.В. Алексеев, А.П. Кожемяков // Микробиология. – 2004. – Т. 73. – №1. – С. 118–125.

17. Бихари Ф. Химические средства борьбы с сорняками /Ф. Бихари [и др]. – М.: Агропромиздат, 1986. – 413 с.

18. Бреховских А.А. Защитные механизмы автотрофной цианобактерии *Nostoc muscorum* от токсического воздействия ионов кадмия : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.04 / Бреховских Александр Андреевич. – М., 2006. – 26 с.

19. Бурков Н.А. Прикладная экология: учебное пособие / Н.А. Бурков. – Киров: Вятка, 2005. – 272 с.

20. Бухарин О. В. Ассоциативный симбиоз / О. В. Бухарин [и др]. – Екатеринбург: УрО РАН, 2007. – 264 с.
21. Васюк Л.Ф. Азотфиксирующие микроорганизмы на корнях небобовых растений и их практическое использование / Л.Ф. Васюк // Биологический азот в сельском хозяйстве СССР. – М.: Наука, 1989. – С. 88-99.
22. Васюк Л.Ф. Специфичность взаимодействия ассоциативных diaзотрофов с сортами картофеля / Л.Ф. Васюк, Н.С. Иванов, В.К. Чеботарь [и др]. // Микроорганизмы в сельском хозяйстве: тез.докл. – Пущино, 1992. – С. 28–29.
23. Верхотуров В.В. Физиолого-биохимические процессы в зерновках ячменя и пшеницы при их хранении, прорастании и переработке : автореф. дис. ... д-ра. биол. наук : 03.00.12 / Верхотуров Василий Владимирович. – М., 2008. – 40 с.
24. Веселов А.П. Гормональная и антиоксидантная системы при ответе растения на тепловой шок : автореф. дис. д-ра. биол. наук : 03.00.12 / Веселов Александр Павлович. – М.: ИФР, 2001. – 40 с.
25. Веселовский В. А. Надежность растительной клетки и стресс: надежность и гомеостаз биологических систем / В.А. Веселовский. – Киев: Наукова думка, 1987. – С. 96-100.
26. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А.И. Арачков. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
27. Владимиров Ю. А. Биологические мембраны и незапланированная смерть клетки / Ю. А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 1999а. – Т. 6. – № 9. – С. 2–9.
28. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 1999б. – Т. 6. – № 12. – С. 13–19.
29. Волошко Л.Н. Разнообразие токсинов цианобактерий / Л.Н. Волошко, А.В. Пиневиц // Астраханский вестник экологического образования. – 2014. – № 1 (27). – С.68–80.
30. Прусаченко А.В. Ростовые реакции *Chlorella Vulgaris* и *Scenedesmus Quadricauda* при элюатном тестировании урбаноземов / А.В. Прусаченко, Е. П.

- Процено, С. Ю. Миронов, НА. Клеева, И.А.Гриненко, А.В. Галяс // Проблемы региональной экологии. – 2010. – № 4. – С. 61–65.
31. Гамбарова Н.Г. Содержание и активность антиоксидантов амаранта в зависимости от условий азотного питания и NaCl – стресса / Н.Г. Гамбарова, М. С. Гинс // Агрохимия. 2008. – № 10. – С. 27–33.
32. Гауптман З. Органическая химия / З. Гауптман, Ю. Грефе, Х. Ремане. – М.: Химия, 1979. – 502 с.
33. Генкель П.А. Защитные реакции некоторых водорослей на действие неблагоприятных условий окружающей среды / П.А. Генкель, В.В. Левина // Журнал общей биологии. – 1975. – Вып.1. – Т.36. – С. 7.
34. ГН 2.1.7.2609–10. Ориентировочная допустимая концентрация (ОДК) метилфосфоновой кислоты в почве населенных мест районов размещения объектов по хранению и уничтожению химического оружия / Гигиенический норматив. – М.: Бюллетень нормативных актов федеральных органов исполнительной власти, 2010. – № 26 – 2 с.
35. Гоготов И.Н. Аккумуляция металлов фототрофными микроорганизмами и их извлечение / И.Н. Гоготов, Н.А. Зорин, О.А. Задворный // Экология и почвы. – М.: Политекс. – 1999. – Т. 3. – С. 238–251.
36. Голлербах М.М. Почвенные водоросли / М.М. Голлербах, Э.А. Штина. – Л.: Наука, 1969. – 228 с.
37. Голлербах М.М. Синезеленые водоросли: определитель пресноводных водорослей / М.М. Голлербах, Е.К. Коссинская, В.И. Полянский. – СССР, Выпуск 2. – М.: Советская наука, 1953. – 652 с.
38. Головкин Т.К. Ячмень на севере (селекционно-генетические и физиолого-биохимические основы продуктивности) / Т.К. Головкин [и др]. – Екатеринбург: УрО РАН, 2004. – 156 с.
39. Головлева Л.А. Роль микроорганизмов в трансформации устойчивых органических поллютантов: учебное пособие / Л.А. Головлева [и др]. – Тула, 2008. – 100 с.

40. Горностаева Е.А. Влияние ионов меди (II) на биохемилюминесценцию почвенных цианобактерий / Е.А. Горностаева, А.И. Фокина, Д.С. Лаптев // Адаптационные реакции живых систем на стрессорные воздействия: матер. всерос. молод. конф. – Киров, 2012. – С.114–120.
41. Горностаева Е.А. Потенциал природных биоплёнок *Nostoc commune* как сорбентов тяжёлых металлов в водной среде / Е.А. Горностаева, А.И. Фокина, Л.В. Кондакова, С.Ю. Огородникова, Л.И. Домрачева, Д.С. Лаптев, Е.М. Сланикова // Вода: химия и экология. – 2013. – № 1. – С. 93–101.
42. Горностаева Е.А. Влияние ионов меди и никеля на почвенные цианобактерии и цианобактериальные сообщества : дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Горностаева Елена Анатольевна ; МГУ. – М., 2015. – 189 с.
43. Горюнова С.В. Синезелёные водоросли (биохимия, физиология, роль в практике) / С.В. Горюнова, Г.Н. Ржанова, В.К. Орлеанский. – М.: Наука, 1969. – 228 с.
44. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. – М.: Министерство сельского хозяйства Российской Федерации (Минсельхоз России), 2013.
45. Громов Б.В. Цианобактерии в биосфере: энциклопедия "Современное естествознание"/ Б.В. Громов. – Т. 2. – Москва: Издательский Дом МАГИСТР-ПРЕСС, 2000. –307 с.
46. Губанов И.А. *Hordeum vulgare* L. - ячмень обыкновенный / И.А. Губанов // Иллюстрированный определитель растений Средней России в 3 т. – М.: Т-во науч. изд. КМК, Ин-т технолог. иссл., 2002. – С. 259.
47. Гусев М.В. Микробиология: учебник для студ. биол. специальностей 5-е издание, из серии «Классический университетский учебник» / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – Изд. «Академия», 2005. – 464 с.
48. Гусев М.В. Цианобактерии / М.В. Гусев, К.А. Никитина. – М.: Наука, 1979. – 228 с.
49. Далькэ И.В. Использование микрокалориметрии для характеристики активности метаболизма растений ячменя (сорта Новичок) в норме и при стрессе /

- И. В. Далькэ, Р. В. Малышев, С. Ю. Огородникова // Актуальные проблемы биологии и экологии: Материалы X молодежн. науч. конф. – Сыктывкар, 2003. – С. 69–70.
50. Данилов-Данильян В.И. Перед главным вызовом цивилизации. Взгляд из России / В.И. Данилов-Данильян, К.С. Лосев, И.Е. Рейф. – М.: ИНФРА-М, 2005. – 224 с.
51. Деверол Б.Ж. Защитные механизмы растений / Б.Ж. Диверол. – М.: Мир, 1980. – 126 с.
52. Дмитриев А.П. Сигнальные молекулы растений для активации защитных реакций в ответ на биотический стресс / А.П. Дмитриев // Физиология растений. – 2003. – Т. 50. – С. 465–474.
53. Добровольский Г.В. Структурно-функциональная роль почв и почвенной биоты в биосфере / Г.В. Добровольский; МГУ. – М.: Наука, 2003. – 364 с.
54. Домрачева Л.И. Биоремедиационные возможности почвенных цианобактерий (обзор) / Л.И. Домрачева, Л. В. Кондакова, Л. Б. Попов, Ю. Н. Зыкова // Теоретическая и прикладная экология. – 2009. – № 1. – С. 8–17.
55. Домрачева Л.И. Применение тетразольно-топографического метода определения гидрогеназной активности цианобактерий в загрязнённых средах / Л.И. Домрачева, Л.В. Кондакова, Т.Я. Ашихмина // Теоретическая и прикладная экология. – 2008. – № 2. – С. 23–28.
56. Домрачева Л.И. Эволюция фототрофных микробных сообществ при антропогенных воздействиях на почву / А.Н. Третьякова, Л.В. Трефилова // Экология и почвы. – Пушкино, 2001. – Т. 4. – С. 184–191.
57. Домрачева Л.И. Использование почвенных цианобактерий при выращивании посадочного материала ели и сосны / Л.И. Домрачева, Л.В. Трефилова // Почвы национальной достояние России: матер. IV съезда Докучаевского общества почвоведов. – Новосибирск, 2004. – Кн.2. – С. 330.
58. Домрачева Л.И. Цианобактериальное ингибирование фузариозных инфекций / Л.И. Домрачева, Л.В. Трефилова, И.Л. Ветлужских // Вопросы экологии и природопользования в аграрном секторе. – М.: АНК, 2003. – С. 236–240.

59. Домрачева Л.И. Биологическая защита семян от болезней в питомниках / Л.И. Домрачева [и др] // Леса Кировской области / ред. Видякин А.И., Ашихмина Т.Я., Новосёлова С.Д. – Киров: ОАО «Кировская областная типография», 2008. – С. 292–299.
60. Домрачева Л.И. Биопленки *Nostoc commune* – особая микробная сфера // Л.И. Домрачева, Л.В. Кондакова, О.А. Пегушина, А.И. Фокина // Теоретическая и прикладная экология. – 2007. – № 1. – С. 15–20.
61. Домрачева Л.И. Цветение почвы и закономерности его развития / Л.И. Домрачева. – Сыктывкар, 2005. – 336 с.
62. Досон Р. Справочник биохимика / Р. Досон [и др]. – М.: Мир, 1991. – 539 с.
63. Егоршина А.А. Участие фитогормонов в формировании взаимоотношений проростков пшеницы с эндофитным штаммом *Bacillus subtilis* 11ВМ / А.А. Егоршина, Р.М. Хайруллин, А.Р. Сахабутдинова, М.А. Лукьянцев // Физиология растений. – 2012. – Т.59. – № 1. – С. 148–154.
64. Егоршина А.А. Фосфат-мобилизующая активность эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* и их влияние на степень микоризации корней пшеницы / А.А. Егоршина, Р.М. Хайруллин, М.А. Лукьянцев, З.М. Курамшина, Ю.В. Смирнова // Журнал сибирского федерального университета. Серия биология. – 2011. – №2. – С. 172–182.
65. Евдокимова Г.А. Очищение почв и сточных вод от нефтепродуктов комбинированными методами в условиях севера / Г. А. Евдокимова и др. // Вестник Кольского научного центра РАН. – 2010. – №. 3. – С. 17– 24.
66. Еремченко О.З. Содержание пигментов в растениях *Lepidium sativum* в условиях хлоридно-натриевого засоления и ощелачивания / О.З. Еремченко, М.Г. Кусакина, Е.В. Лузина // Вестник Пермского университета. Серия биология. – 2014. – № 1. – С. 30–37.
67. Ермаков Е.И. Изменении баланса эндогенных ИУК и АБК в корнях проростков кукурузы при прямом и опосредованном низкотемпературном стрессе / Е.И. Ермаков, А.В. Полевой // Докл. Росс. акад. наук, 1993. – №3. – С.16–19.

68. Ефимова М.В. Технологические возможности культивирования цианобактерий рода *Phormidium* для биотехнологических целей / М.В. Ефимова, Т.И. Кузякина // Современные наукоемкие технологии. – 2004. – № 1 – С. 55–56.
69. Жаров В. Н. Динамика показателей перекисного окисления липидов в эритроцитах при лечении детей с приобретенной тяжелой апластической анемией / В.Н. Жаров, И. К. Филиппов, М. И. Баканов, И. В. Кошель // Бюллетень эксперим. биологии и медицины. – 1994. – Т. 117. – №1. – С.36–38.
70. Жарова О.А. Устойчивость *Scenedesmus obliquus* и *Nostoc linckia* к действию катионов кадмия / О.А. Жарова, И.М. Рублева, А.И. Ульданова, А.Э. Светлова, Ю.В. Ростовкина // Современные проблемы биологии, экологии, химии: региональный сборник научных трудов молодых ученых. – Ярославль, 2003. – С. 20–24.
71. Жегалло Е.А. Биологические проблемы первых колонизаторов планеты Земля / Е.А. Жегалло, В.К. Орлеанский, К.Р. Напольская, А.И. Курапова // Теоретическая и прикладная экология, 2011. – №2. – С. 15–20.
72. Жемчужин С.Г. Глифосат и методы его анализа / С.Г. Жемчужин // Агрохимия. – 1985. – № 1. – С. 121–126.
73. Жемчужин С.Г. Биodeградация пестицидов и родственных контаминантов окружающей среды // Агрохимия. – 2002. – №9. – С. 76–91.
74. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии / Г.А. Заварзин; Ин-т микробиологии. – М.: Наука, 2003. – 348с.
75. Завьялова Н.В. Биотехнологические методы и нейтрализующие средства для обеззараживания и очищения почв и вод, загрязненных экотоксикантами / Н.В. Завьялова, И.В. Филимонов, Е.Н. Ефременко, В.И. Холстов, А.А. Янковская // Теоретическая и прикладная экология. – 2014. – № 4. – С. 26–33.
76. Закирова З.Р. Синезеленые водоросли (цианобактерии) антропогенно нарушенных почв и их консортивные связи : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.05 / Закирова Зульфия Равилевна ; БГУ. – Уфа, 2006. – 17 с.
77. Захаренко В.А. Гербициды / В.А. Захаренко. – М: Агропромиздат, 1990. – 240 с.

78. Заякина О.В. Использование в модельных опытах глифосата как ингибитора биосинтеза ауксина в растениях / О.В. Заякина, В.В. Заякин, В.С. Шевелуха // IV Съезд Общества физиологов растений России: тез. докл. – М., 1999. – Т. 2. – С. 649.
79. Игнатов В. В. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / В.В. Игнатов. – М.: Наука, 2005. – 262 с.
80. Ионенко И. Ф. Влияние метилфосфоновой кислоты на диффузионный транспорт воды в корнях кукурузы. Исследование методом СПИН-ЭХО ЯМР / И.Ф. Ионенко, Т.К. Головкин, А.В. Анисимов // Проблемы сельского хозяйства: межвузовский сборник научных трудов. – Калининград: КГТУ, 2005. – С. 165–172.
81. Йорданова Р. И. Влияние затопления корневой системы на фотосинтез и содержание антиоксидантов в растениях ячменя / Р. И. Йорданова, В. С. Алексиева, Л. П. Попова // Физиология растений. – 2003. – Т. 50. – № 2. – С. 183–187.
82. Кадырова Г.Х. Продуцирование ауксинов цианобактериями / Г.Х. Каддырова // Узбекский биологический журнал. – 2004. – № 4. – С. 9–13.
83. Капитанов А. Б. Каротиноиды как антиоксидантные модуляторы клеточного метаболизма / А. Б. Капитанов, А. М. Пименов // Успехи современной биологии. – 1996. – Т. 116. Вып. 2. – С. 179–193.
84. Квеситадзе Г.И. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях: монография / Г.И. Квеситадзе [и др]. – М.: Наука, 2005. – 199 с.
85. Киреева Н. А. Влияние загрязнения почв нефтью на физиологические показатели растений и ризосферную микробиоту / Н.А. Киреева, Е. И. Новоселова, А. С. Григориади // Агрохимия. – 2009. – № 7. – С. 71–80.
86. Киреева Н.А. Фитотоксичность антропогенно загрязнённых почв / Н.А. Киреева, [и др]. – Уфа: Гилем, 2003. – 266 с.
87. Ковина А.Л. Микробные агроконсорциумы на основе цианобактерий: автореф. дис. канд. биол. наук : 03.00.07 / Ковина Алевтина Леонидовна ; ВятГСХА. – М., 2001. – 23 с.

88. Коваль Е. В. Оценка токсических эффектов метилфосфоновой кислоты по ответным биохимическим реакциям фототрофных организмов / Е.В. Коваль, Л.С. Свинолупова, С.Ю. Огородникова // Теоретическая и прикладная экология. – 2013. – № 1. – С. 89–93.
89. Кокшарова О. А. Применение методов молекулярной генетики и микробиологии в экологии и биотехнологии цианобактерий / О. А. Кокшарова // Микробиология. – 2010г. – т. 79. – № 6. – С.734–747.
90. Колупаев Ю.Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции / Ю.Е. Колупаев // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия биология. – 2007. – №3 (12). – С. 3–26.
91. Кондакова Л. В. Инварианты организации фототрофных микробных сообществ дерново-подзолистой почвы при действии метилфосфоновой кислоты / Л. В. Кондакова, Л. И. Домрачева, С. Ю. Огородникова, Т. Я. Ашихмина // Актуальные проблемы регионального экологического мониторинга: научный и образовательный аспекты: матер. всеросс. науч. школы. – Киров: Старая Вятка. – 2005. – С. 62–65.
92. Кондратьева Е.Н. Фототрофные микроорганизмы: учебное пособие / Е.Н. Кондратьева, И.В. Максимова, В.Д. Самуилов – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 376с.
93. Кононова С.В. Фосфонаты и их деградация микроорганизмами / С.В. Кононова, М.А. Несмеянова // Биохимия. – 2002. – Т. 67. Вып. 2. – С. 220–233.
94. Корепин А.М. Перекисное окисление белков и содержание маркеров эндогенной интоксикации в крови лабораторных мышей после введения метилфосфоновой кислоты: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Корепин Антон Михайлович ; Нижегородский гос. ун-т. – Нижний Новгород, 2011. –23 с.
95. Костяев В.Я. Синезеленые водоросли и эволюция эукариотных организмов / В.Я. Костяев. – Л.: Наука, 2001. – 130 с.
96. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур: учебное пособие / Е.И. Кошкин. – М.: Дрофа, 2010. – 638 с.

97. Кравченко Л.В. Роль корневых экзометаболитов в интеграции микроорганизмов с растениями: автореф. ... д-ра биол. наук : 03.00.07 / Кравченко Лев Витальевич ; МГУ. – М., 2000. – 51 с.
98. Красильникова Л. А. Биохимия растений / Л. А. Красильникова, О. А. Аксентьева, В. В. Жмурко. – Ростов: Феникс, 2004. – 224 с.
99. Круглов Ю.В. Биомасса и структура комплекса гетеротрофных микроорганизмов дерново-подзолистой почвы в условиях различной антропогенной нагрузки / Ю.В. Круглов, Г.А. Ахтемова, Н.Б. Герш, Н.К. Кирьякова, В.Л. Игуменов // 111 съезд ДОП: тезисы докладов. – М.: 2000. – Кн.111. – С.153–154.
100. Крупкин П.И. Пути рационального использования почв, загрязненных фтором / П.И. Крупкин // Агрохимия. – 2005. – № 3. – С. 79–87.
101. Кузнецова Е.М. Глифосат: поведение в окружающей среде и уровни остатков / Е.М. Кузнецова, В. Д. Чмилъ // Современные проблемы токсикологии. – 2010. – № 1. – С.87–95.
102. Кузьменко М.И. Миксотрофизм синезеленых водорослей и его экологическое значение / М.И. Кузьменко. – Киев: Наукова думка, 1981. – 211 с.
103. Кузякина Т.И. Термофильные синезеленые водоросли (цианобактерии) Паратунского геотермального месторождения. Способы культивирования и использования в биотехнологии / Т.И. Кузякина, А.С. Латкин, А.А. Ефимов, М.В. Ефимова // Современные проблемы науки и образования. – 2007. – № 6. – С. 121–126.
104. Куренкова С.В. Пигментная система культурных растений в условиях подзоны средней тайги европейского Северо-Востока / С.В. Куренкова. – Екатеринбург: УрОРАН, 1998. – 114 с.
105. Лабутова Н.М. Влияние *Agrobacterhim radiobacter* на популяцию фитопатогенного гриба *Fusarium solani* при различных условиях в почве / Н.М. Лабутова, Н.А. Вишневская // Микробиология почв и земледелие: тез. докл. – СПб, 1998. – С. 39.

106. Лебедева М. И. Экология: учебное пособие / М. И. Лебедева, И.А. Анкудинова – Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2002. – 80 с.
107. Ли Т.К. Антиоксидантная система в корнях двух контрастных экотипов *Sedum alfredii* при повышенных концентрациях цинка / Т.К. Ли, Л.Л. Лу, Е. Жу, Д.К. Гупта, Е. Ислам, Х. Е. Янг // Физиология растений. – 2008. – Т. 55. – № 6. – С. 886–894.
108. Лось Д.А. Сенсорные системы цианобактерий / Д. А. Лось. – М., Научный Мир, 2012. – 218 стр.
109. Лукаткин А. С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс / А.С. Лукаткин. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. – 208 с.
110. Лунев М.И. Пестициды и охрана агрофитоценозов / М.И. Лунев. – М.: Колос, 1992. – 272 с.
111. Лябушева О.А. Накопление элементов клетками цианобактерий: автореф. ... дис. канд. биол. наук : 03.00.25 / Лябушева Ольга Александровна ; МГУ. – М., 2004. – 21 с.
112. Майдебура И. С. Влияние загрязнения воздушного бассейна города Калининграда на анатомо-морфологические и биохимические показатели древесных растений: автореф. дисс. ... канд. биол. наук : 03.00.16 / Майдебура Ирина Сергеевна: КГУ. – Калининград, 2006. – 22 с.
113. Максимов И. В. Абсцизовая кислота во взаимоотношениях растений и микроорганизмов / И.В. Максимов // Физиология растений. – 2009. – Т. 56. – № 6. – С. 824–835.
114. Максимов И.В. Влияние бактерий *Bacillus subtilis* 26D на содержание пероксида водорода и активность пероксидазы в растениях яровой пшеницы / И.В. Максимов // Агрохимия. – 2010. – № 1. – С. 55–60.
115. Максимов И.В. Регуляция защиты растений против патогенов и вредителей эндофитными микроорганизмами / И.В. Максимов, Р.М. Хайруллин, В.А. Вахитов // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и

антропогенных воздействий: матер. Всерос. науч. конф. с междунар. участием и школы для молодых ученых. – Петрозаводск, 2015 г. – С. 326.

116. Макурина О.Н. Динамика ферментативной активности и пигментного состава в тканях водного погруженного растения *Ceratophyllum demersum* в условиях воздействия ксенобиотиков и последующей реабилитации / О.Н. Макурина, С.А. Розина, О.А. Розенцвет // Известия Самарского научного центра РАН. – 2015. – №4–5. – С.1000–1007.

117. Масленников В.П. Экологические аспекты накопления антоциановых пигментов в растениях: автореф. дисс. ... канд. биол. наук : 03.00.16 / Масленников Павел Владимирович ; КГУ. – Калининград, 2003. – 23 с.

118. Маслова С.П. Реакции растений двукисточника тростниковидного (*Phalaroides arundinacea*) на фосфорорганический ксенобиотик – метилфосфоновую кислоту / С. П. Маслова, Е. В. Гармаш, С. Ю. Огородникова // Агрохимия. – 2010. – № 1. – С. 73–78.

119. Медоуз Д.Х. Пределы роста: 30 лет спустя / Д. Х. Медоуз, Й. Рандерс, Д.Л. Медоуз; пер. с англ. Е. С. Оганесян; под ред. Н. П. Тарасовой. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 358 с.

120. Мельников Н.Н. Пестициды и регуляторы роста растений / Н.Н. Мельников. – М.: Химия, 1995. – 576 с.

121. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки / М.Н. Мерзляк // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Физиология растений. – 1989. – Т.6. – С. 1–168.

122. Михайлов С.С. Метаболизм фосфорорганических ядов / С.С. Михайлов, И.Т. Щербак. – М.: Медицина, 1983. – 112 с.

123. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / ред. Игнатов В.В.; Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов. – М.: Наука, 2005. – 262 с.

124. Москвина М.И. Роль гетеротрофных спутников цианобактерии *Nostoc muscorum* в синтезе сульфида кадмия / М.И. Москвина, А.А. Бреховских, В.В. Никандров // Микробиология. – 2003. – Т. 72. – № 2. – С. 284–285.

125. Муравьева Д.А. Спектрофотометрическое определение суммы антоцианов в цветках василька синего / Д.А. Муравьева, В.Н. Бубенчикова, В.В. Беликов // Фармация. – 1987. – №5. – С. 28–29.
126. Мурадян Е.Л. Влияние метанола на филогенетически отдаленные виды агрокультур / Е.Л. Мурадян, И.М. Рублева, О.Г. Воропаева // Биологические науки. – 1991. – №3. – С. 77–82.
127. Муронец Е.М. Синтез индолилуксуюной кислоты сапрофитной ассоциативной бактерией *Agrobacterium radiobacter* / Е.М. Муронец, Н.В. Белавина, Т.Н. Митронова, С.В. Каменева // Микробиология. – 1997. – Т.66. – № 4. – С. 506–513.
128. Нариманов А.А. К механизму повышения всхожести семян ячменя перекисью водорода в условиях переувлажнения / А.А. Нариманов, Ю.Н. Корыстов // Изв. РАН. Серия биология. – 1998. – №1. – С.110–114.
129. Николаев Ю.А. Биоплёнка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? / Ю.А. Николаев, В.К. Плакунов // Микробиология. – 2007. – Т. 76. – № 2. – С. 149–163.
130. Новокрещёнова М.Г. Роль гена *NFZ 24 Arabidopsis thaliana* в контроле ответа на холодостресс / М.Г. Новокрещёнова, О.П. Солдатова, Л.А. Волкова, А.Б. Бургутин, Т.А. Ежова // Экологическая генетика. – 2008. – №6. – С. 20–26.
131. Огородникова С. Ю. Реакции растений на фосфорорганический ксенобиотик – метилфосфоновую кислоту / С.Ю. Огородникова, Т. К. Головкин, Т. Я. Ашихмина // Научные доклады. Вып. 464 – Сыктывкар: Коми научный центр УрО РАН, 2004. – 24 с.
132. Панкратова Е.М. Цианобактерия *Nostoc paludosum* Kutz как основа для создания агрономически полезных микробных ассоциаций на примере бактерий рода *Rhizobium* / Е.М. Панкратова, Л.В. Трефилова, Р.Ю. Зяблых, И.А. Устюжанин // Микробиология. – 2008. – Т. 77. – № 2. – С. 266–272.
133. Панкратова Е.М. Симбиоз как основа существования цианобактерий в естественных условиях и в конструируемых системах / Е.М. Панкратова, Л.В. Трефилова // Теоретическая и прикладная экология. – 2007. – №1. – С. 4–14.

134. Панкратова Е.М. Почвенные цианобактерии в прошлом Земли и их экологическая роль в настоящем и возможная в будущем / Е.М. Панкратова // Экология и почвы. – 2001. – С. 84–104.
135. Панфилова И.В. Изучение воздействия различных концентраций метилфосфоновой кислоты на *Chlorella vulgaris* / И. В. Панфилова, Н. В. Бородина, Т. Я. Ашихмина // Экология родного края: проблемы и пути решения: матер. I областной науч.-практич. конф. молодежи. – Киров: Старая Вятка. – 2006. – С. 157.
136. Патова Е.Н. *Nostoc commune* (Cyanophyta) в тундрах Российского сектора Арктики / Е.Н. Патова, М.В. Гецен // Ботанический журнал. – 2000. – Т.85. – № 1. – С. 71–80.
137. Петров С.В. Биотехнология в решении проблемы уничтожения химического оружия / С.В. Петров, Ю.Н. Корякин, В.И. Холстов, Н.В. Завьялова // РХЖ. – 1995. – Т. 39. – №4. – С. 18–20.
138. Пиневиц А.В. Кислородная фототрофия / А.В. Пиневиц, С.Г. Аверина. – СПб: С.-Петербургский университет, 2002. – 234 с.
139. Плотникова О.М. Биохимические показатели крови в оценке влияния метилфосфоната на лабораторных мышей в долговременном эксперименте / О.М. Плотникова, А.М. Корепин, Н.Н. Матвеев, С.Н. Лунева // Теоретическая и прикладная экология. – 2011. – № 3. – С. 65–70.
140. Плотникова О.М. Биохимические показатели лабораторных мышей в зависимости от времени интоксикации метилфосфонатом / О.М. Плотникова, Н.Н. Матвеев, А.М. Корепин, И.В. Дуплякина // Теоретическая и прикладная экология. – 2010. – № 1. – С. 81–86.
141. Плотникова О.М. Влияние метилфосфоновой кислоты на основе звеньев гомеостаза белых лабораторных мышей : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.01.04 / Плотникова Ольга Михайловна; Казан. (Приволж.) федер. ун-т. – Казань, 2012. – 44 с.
142. Плотникова О.М. Биохимическая оценка активности антиоксидантной системы овса при воздействии фосфорсодержащих поллютантов / О.М.

- Плотникова, И.В. Дуплякина, А.М. Корепин // Вестник Курганского государственного университета. – 2009. – №1. – С. 71–74.
143. Подберезкина Н.Б. Биологическая роль супероксиддисмутаза / Н.Б. Подберезкина, Л.Ф. Осинская // Украинский биохимический журнал. – 1989. – Т.61. – № 2. – С.14–27.
144. Поздняков В.Н. Почвенные бактерии-антагонисты фитопатогенной микрофлоры / В.Н. Поздняков // Биотехнология. – 1998. – № 1. – С. 29–32.
145. Позолотина М. А. Изучение хемотаксической реакции тест-объекта инфузории по метилфосфоновой кислоте / М. А. Позолотина, И. В. Панфилова, Н. А. Шулятьева, Т. Я. Ашихмина // Экология родного края: проблемы и пути их решения: матер. I обл. науч.-практ. конф. молодежи. – Киров: «Старая Вятка», 2006. – С. 142.
146. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода: учебное пособие / О.Г. Полесская. – М: КДУ, 2007. – 140 с.
147. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов и др. – М.: Издательский дом "Академия", 2005. – 608 с.
148. Проворов Н.А. Растительно-микробные симбиозы как эволюционный континуум / Н.А. Проворов // Микробиология. – 2002. – Т. 71. – С. 521–525.
149. Радюкина Н.Л. Участие пролина в системе антиоксидантной защиты у шалфея при действии NaCl и параквата / Н. Л. Радюкина, А. В. Шашукова, Н. И. Шевякова, В.В. Кузнецов // Физиология растений. – 2008. – Т. 55. – № 5. – С. 721–730.
150. Рогожин В.В. Физиолого-биохимические механизмы формирования гипобиотических состояний высших растений: автореф. дисс...докт. биол. наук : 03.00.12 / Рогожин Василий Васильевич ; Сибирск. ин-т физиологии и биохимии растений. – Иркутск, 2000. – 59 с.
151. Родина Н. А. Селекция адаптивных сортов ярового ячменя / Н.А. Родина, И.Н. Щенникова, М.В. Грибков // Зерновое хозяйство. – 2007. – № 3–4. – С. 15–16.

152. Рублева И.М. Исследование влияния тяжелых металлов на некоторые физиологические функции низших и высших растений / И.М. Рублева, И.К. Ирбе, Т.Н. Орлова [и др]. // Современные проблемы биологии, химии, экологии, экологического образования: региональный сборник науч. трудов. – Ярославль, 2001. – С. 190–197.
153. Румянцев В.А. Особенности природы цианобактерий / В.А. Румянцев, Л.Н. Крюков // Среда обитания (Terra Humana). – 2012. – № 1. – С. 232–238.
154. Саванина Я.В. Значение глутатионовой системы в накоплении и детоксикации тяжёлых металлов в клетках цианобактерий и микроводорослей / Я.В. Саванина, А.Ф. Лебедева, Е.Л. Барский // Вестн. МГУ. Сер. 16. – 2003. – №3. – С. 29–37.
155. Савельева Е.И. Исследование продуктов превращений фосфорорганических отравляющих веществ методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии / Е.И. Савельева, И.Г. Зенкевич, Т.А. Кузнецова, А.С. Радилов, Г.В. Пшеничная / Российский химический журнал. – 2002. – Т. XLVI. – № 6. – С. 82–91.
156. Савинова И.В. Содержание энергетических субстратов в печени и мышцах и продуктов гликолиза в крови лабораторных мышей после введения метилфосфоновой кислоты : диссер. ... канд. Биол. наук : 03.01.04 / Савинова Ирина Викторовна; Казан. (Приволж.) федер. ун-т. – Казань, 2012. – 125 с.
157. Сассон А. Биотехнология: совершення и надежды / А. Сассон. – М.: Мир, 1987. – 416 с.
158. Селье Г. Стресс без дистресса / Г. Селье. – М.: Прогресс, 1979. – 123 с.
159. Скоробогатова В.И. Реабилитация почв, загрязненных продуктами разложения фосфорорганических токсичных химикатов / В. И. Скоробогатова, Л. Ф. Щербакова, И. Т. Ермакова // Биологическая наука XXI века: междунар. Пушкинская школа конференции молодых ученых. – Пушкино. – 2010. – Т. 2. – С. 261.
160. Сопрунова О.Б. Функционирование цианобактериальных сообществ в условиях техногенных экосистем / О.Б. Сопрунова // Вестн. МГУ. – 2006. – Сер. 16. – № 2. – С. 24–29.

161. Сопрунова О.Б. Цианобактериальные консорциумы в очистке сточных вод / О.Б. Сопрунова // Исследовано в России. – 2005. – №11. – С. 113–120.
162. Справочник пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. – М.: Агрорусь, 2002. – Вып. 6. – 378 с.
163. Степановских А. С. Охрана окружающей среды: учебное пособие / А.С. Степановских. – М.: ЮНИТИ-ДАНА. 2001. – 559 с.
164. Тиберкевич Н.Я. Бактерии-спутники в культурах цианопрокариот и зелёных водорослей / Н.Я. Тиберкевич, А.И. Сакевич // Гидробиологический журнал. – 2001. – Т.37. – № 1. – С. 54–63.
165. Тихвинский С. Ф. Антоциановые пигменты растений и их роль в практической селекции сельскохозяйственных культур / С.Ф. Тихвинский. – Киров: Авангард, 2007. – 80 с.
166. Тихонович И. А. Биопрепараты в сельском хозяйстве / И. А. Тихонович [и др.]. // Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве. – М.: Россельхозакадемия, 2005. – 154 с.
167. Товстик Е.В. Комплексы почвенных актиномицетов в зоне действия объекта по уничтожению химического оружия "Марадыковский" : дис. ... канд. Биол. наук : 03.02.08 / Товстик Евгения Владимировна ; Институт биологии Коми научного центра УрО РАН. – Сыктывкар, 2015. – 156 с.
168. Трефилова Л.В. Использование цианобактерий в агробиотехнологии : автореф. дис. канд. биол. наук : 03.00.07 / Трефилова Людмила Васильевна. – Саратов, 2008. – 26 с.
169. Угрюмов Е.П. Зависимость гербицидной активности глифосата от условий и способа применения / Е.П. Угрюмов, Н.Р. Денисенкова, А.П. Савва, А.М. Доценко // Агрохимия. – 1985. – № 4. – С.94–99.
170. Федке К. Биохимия и физиология действия гербицидов / К. Федтке. – М., 1985. – 224 с.
171. Физиология растений: учебник для студ. вузов / Под ред. И. П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

172. Фокина А. И. Цианобактерии как тест-организмы и биосорбенты / А. И. Фокина, С. Ю. Огородникова и др. // Почвоведение. – 2017. – № 1. – С. 77–85.
173. Фокина А.И. Микроорганизмы как биосорбенты поллютантов // Фокина [и др]. // Особенности урбоэкосистемподзоны южной тайги Европейского Северо-Востока / ред. Т. Я. Ашихмина, Л. И. Домрачева. – Киров: Вятский государственный гуманитарный университет, 2012. – С. 232–252.
174. Фокина А.И. Состояние цианобактерии *Nostoc linckia* в условиях загрязнения среды никелем и нефтепродуктами и перспективы её использования в качестве биосорбента / А.И. Фокина, С.С. Злобин, Г.И. Березин // Теоретическая и прикладная экология. – 2011. – №1. – С.69–75.
175. Фокина А.И. Методология изучения влияния тяжелых металлов на культуры почвенных цианобактерий / А.И. Фокина, Ю.Н. Зыкова, Д.Н. Данилов, Т.Я. Ашихмина, М.С. Жмак // Теоретическая и прикладная экология, 2011. – №3. – С. 16–22.
176. Фокина А.И. Химические основы токсикологии: учебное пособие / А.И. Фокина [и др]. – Киров: Изд-во ООО «ВЕСИ», 2015. – 266 с.
177. Франке З. Химия отравляющих веществ / З. Франке. –М.: Химия, 1973. – 440 с.
178. Хелдт Г.-В. Биохимия растений / Г.-В. Хелдт; пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 471 с.
179. Холстов В.И. Пути решения проблемы безопасности, уничтожение опасных веществ за рубежом / В.И. Холстов, Ю.В. Тарасевич, С.Г. Григорьев // РХЖ. – 1995. – Том 39. – №4. – С. 65–73.
180. Храбрых Т.С. Изучение воздействия метилфосфоновой кислоты на живые организмы на примере дафний (*Daphnia magna*) / Т.С. Храбрых, Т. И. Кочурова, Т.Я. Ашихмина // Экология родного края: проблемы и пути их решения: матер. I обл. науч.- практ. конф. молодежи. – Киров: «Старая Вятка». – 2006. – С. 143–145.
181. Ху Ю. Ф. Ферменты антиоксидантной защиты и физиологические характеристики двух сортов топинамбура при солевом стрессе / Ю.Ф. Ху, Ж.П. Лиу // Физиология растений. – 2008. – Т. 55. – № 6. – С. 863–868.

182. Чиванова С.В. Влияние метилфосфонатов на накопление пролина в растительных тканях / С.В. Чиванова, С.Ю. Огородникова // Сборник матер. форума. – Кузбасский государственный технический университет им. Т.Ф. Горбачева. – 2014. – С. 77.
183. Чиркова Т. В. Физиологические основы устойчивости растений / Т.В. Чиркова. – СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2002. – 244 с.
184. Чупахина Г. Н. Природные антиоксиданты (экологический аспект) / Г.Н. Чупахина, П. В. Масленников, Л. Н. Скрыпник. – Калининград: Изд-во БФУ им. И. Канта, 2011. – 111 с.
185. Чупахина Г. Н. Система аскорбиновой кислоты растений / Г.Н. Чупахина. – Калининград, 1997. – 120 с.
186. Чупахина Г.Н. Адаптация растений к нефтяному загрязнению / Г.Н. Чупахина, П.В. Масленников // Экология. – 2004. – №5. – С. 330–335.
187. Шапошников А. И. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями: механизмы образования и факторы эффективности ассоциативных симбиозов / А.И. Шапошников, А.А. Белимов, Л.В. Кравченко, Д.М. Виванко // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – №3. – С. 16–22.
188. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зелёных листьев / А.А. Шлык // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – С. 154–171.
189. Шлык-Кернер О. В. Изучение механизмов адаптации цианобактерий к повышенным температурам: платформа для создания стрессоустойчивых продуцентов биоводорода / О. В. Шлык-Кернер, С. В. Овечкин, А. С. Гасников // Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о Земле. – 2014. – Вып. 3. – С. 27–38.
190. Шнюкова Е.И. аккумуляция ионов металлов экзополисахаридами *Nostoc linckia* (Roth) Born. et Flach. (*Cyanjphyta*) / Е.И. Шнюкова // Альгология. – 2005. – Т.15. – №2. – С. 172–180.

191. Шорнинг Б.Ю. Необходимость образования супероксида для развития этиолированных проростков пшеницы / Б.Ю. Шорнинг, Е.Г. Смирнова, Л.С. Ягужинский, Б.Ф. Ванюшин // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – № 12. – С. 1612–1617.
192. Штина Э.А. Взаимодействие азотфиксирующих синезелёных водорослей с микроорганизмами-спутниками / Э.А. Штина, Е.М. Панкратова // Актуальные проблемы биологии синезелёных водорослей. – 1974. – С. 61–78.
193. Шутов И.В. Применение гербицидов и арборицидов в лесовыращивании: справочник / И.В. Шутов, В.П. Бельков. – М.: Агропромиздат, 1989. – 223 с.
194. Шушкова Т.В. Сорбция глифосата и его микробная деградация в почвенных суспензиях / Т.В. Шушкова, Г.К. Васильева, И.Т. Ермакова, А.А. Леонтьевский // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45. – № 6. – С. 664–670.
195. Щербакова Л. Ф. Ответные реакции растений на воздействие химических стрессоров / Л.Ф. Щербакова, В.И. Скоробогатова, А.А. Щербаков, Н.В. Сотников, Е.Е. Федоров, Е.В. Любунь, Е.В. Крючкова / Молекулярные механизмы взаимодействия микроорганизмов и растений: фундаментальные и прикладные аспекты: матер. конф. – Саратов: «Научная книга». – 2005. – С. 49–50.
196. Щербатюк А. П. Растения как индикаторы состояния урбанизированных экосистем / А.П. Щербатюк // Вестник ЗабГУ. – № 02 (93). – 2013. – С. 56–60.
197. Юнг Л.А. Влияние синезелёных водорослей на почвенную микрофлору / Л.А. Юнг // Современное состояние и перспективы изучения почвенных водорослей в СССР: Тр. Кировск.с-х. ин-та. – 1967. – Вып. 40. – С. 254–261.
198. Юрин В.М. Основы ксенобиологии / В.М. Юрин. – Мн.: Новое знание, 2002. – 267 с.
199. Abiotic Stress – Plant Responses and Applications in Agriculture/ Edited by Kourosh Vahdatiand, Charles Leslie. InTech, Croatia, 2013. – 418 p.
200. Abdul-Jabbar A. Tohir cheeted theteethe *Nostoc linckia* (Roth.) Bron. & Thar., *Oscillatoria limosa* (Roth.) C. A. Ag in the removal of some heavy elements from waste water in the Nasiriyah power station // Journal of Basrah Researches (Sciences). – 2008. – Vol. 34. – P. 15 – 21.

201. Akansha J., Akanksha S., Surendra S., HarikeshBahadur S. Phenols enhancement effect of microbial consortium in pea plants restrains *Sclerotinia sclerotiorum* // Biological Control. – 2015. – № 89. – P. 23 – 32.
202. Al-Rajab A.J., M. Schiavon Degradation of ¹⁴C-glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in three agricultural soils // J. Environ. Sci. – 2010. – Vol. 22. – Issue 9. – P. 1374 – 1380.
203. Alexieva V., Ivanov S., Sergiev I., Karanov E. Interaction between stresses // Bulg. J. PlantPhysiol. – 2003. – Special issue. – P. 1 – 17.
204. Allison F.E., Hoover S.R., Morris H.J. Physiological studies with the nitrogen-fixing Alga, *Nostoc muscorum* // Botanical Gazette. – 1937. – Vol. 98. – № 3. – P. 433 – 463.
205. Aminot A., Rey F. Standard procedure for the determination of chlorophyll a by spectroscopic methods. – Denmark, Copengagen, 2000. – 25 p.
206. Arlt, T., Schmidt, S., Kaiser, W., Lauterwasser C., Meyer M., Scheer H., Zinth, W. The accessory bacteriochlorophyll: A real electron carrier in primary photosynthesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – Vol. 90. – P 11757 – 11761.
207. Asthana R.K., Strivastava A., Singh A.P. Identification of an antimicrobial entity from the cyanobacterium *Fischerella* sp., isolated from bark Azadirachtaindia (Neem) // J. Appl. Phycol. – 2006. – Vol. 18. – № 1. – P. 33 – 39.
208. Attaway H., Nelson J. O., Baya A.M. Bacterial detoxification of diisopropyl fluorophosphate // Applied and environmental microbiology. – 1987. – Vol. 53. – № 7. – P. 1685 – 1689.
209. Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms // Annu. Rev. Plant Biol. – 2006. – Vol. 57. – P. 233 – 266.
210. Barrett K.A., M.B. McBride Oxidative Degradation of Glyphosate and Aminomethylphosphonate by Manganese Oxide // Environ. Sci. Technol. – 2005. – Vol. 39. – P. 9223 – 9228.
211. Basnakova G., Macaskie L. E. Accumulation of zirconium and nickel by *Citrobacter* sp. // J. Chem. Technol. Biotechnol. – 1999. – Vol. 74. – P. 509 – 514.

212. Berman-Frank I., Bidle K., Haramaty L., Falkowski P. G. 2004. The demise of the marine cyanobacterium, *Trichodesmium* spp., via an autocatalyzed cell death pathway // Limnol. Oceanogr. – 2004. – Vol. 49. P. 997 – 1005.
213. Berman-Frank I., Falkowski P. Nitrogen fixation and Photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria // Res. Microbiol. – 2003. – № 154. – P. 157 – 164.
214. Beveridge T.I., Fyfe W. S. Metal fixation by bacterial cell walls // Can. J. Earth Sci. – 1985. Vol. 22. – P. 1893 – 1898.
215. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review // Ann. Bot. (Lond.). – 2003. – Vol. 91. – P. 179 – 194.
216. Blumwald E., Tel-Or E. Structural aspects of the adaptation of *Nostoc muscorum* to salt // Archives of Microbiology. – 1982. – Vol. 132. – P. 163 – 167.
217. Botta F., Lavison G., Couturier G., Alliot F., Moreau-Guigon E., Fauchon N., Guery B., Chevreuil M., Blanchoud H. Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems // Chemosphere. – 2009. – Vol. 77. – P. 133 – 139.
218. Brecke B.J., Duke W.B. Effect of glyphosate on intact bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and isolated cells // Plant Physiology. – 1980. – Vol. 66. – P. 656 – 659.
219. Bush L.P., Wilkinson H.H., Schardl C.L. Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses // Plant Physiology. – 1997. – № 114. – P. 1 – 7.
220. Cameron R.E. Communities of soil algae occurring in the sonoran desert in Arizona // Journal of the Arizona Academy of Science. – 1960. – Vol. 1. – № 3. – P. 85 – 88.
221. Chen C., Dickman M. B. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102. – P. 3459 – 3464.
222. Choudhary M., Jetley U.K., Abash Khan M., Zutshi S., Fatma T. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis* S5 // Ecotoxicology and environmental safety. – 2007. – Vol. 66. – № 2. – P. 204 – 209.

223. Clinical aspects of long-term low-dose exposure. Organophosphate sheep dips // Report of a joint working party of the royal college of physicians and royal college of psychiatrists. – 1998. – 67 p.
224. Cole R.M. Mycoplasma and Spiroplasma viruses: ultrastructure // The mycoplasmas / Eds M.F. Barile, S. Razin. – New York, 1979. – 1. P. 385- 410.
225. Corbridge D.E.C. Phosphorus world. Chemistry, biochemistry and technology. – Burn Bridge, Derek Corbridge Harrogate. – 2005. – 1347 p.
226. Diehl T., Fehrmann H. Weizenfusariosen - Einfluss von Infektionstermin, Gewebeschädigung und Blattläusen auf Blatt- und Ährenbefall // Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. – 1989. – Vol. 96. – P. 393 – 407.
227. Domracheva L.I., Dabakh E.V., Kondakova L.V., Varaksina A.I. Algal-micological complexes in soils upon their chemical pollution // Eurasian Soil Science. – 2006. – Vol. 39. – P. 91 – 97.
228. EC 2.5.1.19 - 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (IUBMB Enzyme Nomenclature).
229. Ehlenfeldt M.K, Prior R.L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of high bush blueberry // J. Agric Food Chem. – 2001. – Vol. 49. – № 5. – P. 2222 – 2227.
230. Elstner E. F., Osswald W.F. Mechanism of oxygen activation in plant stress // Proc. Roy. Soc. Edinburgh. – 1994. – Issue 102b. – P. 131 – 154.
231. Fest C., Schmidt K.-J. Organophosphorus pesticides. – Berlin: Springer-Verlag, 1982. – 360 p.
232. Fleisch W. Bisphosphonates. Pharmacology and use in treatment of tumor induced hypercalcaemia and metastatic bone disease // Drugs. – 1991. – Vol. 42. – P. 919 – 944.
233. Flemming H. C. Sorption sites in biofilms // Water Sci. Tech. – 1995. – Vol. 32. – P. 27 – 33.
234. Fogg G.E., Stewart W.P., Fay P., Walsby A.E. The blue-green algae. – London; New York: Acad. Press, 1973. – 459 p.

235. Foyer C. H., Noctor G. Redox homeostis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses // *Plant Cell*. – 2005. – Vol. 17. – P. 1866 – 1875.
236. Gadd G.M. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 11. – P. 271 – 279.
237. Gantar M. Mechanical damage of roots provides ennanced colonization of the wheat endorhizosphere by the dinitrogen-fixing cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain 2S9B // *Biol. Fertil. Soils*. – 2000. – Vol. 32. – Issue 3. – P. 390 – 395.
238. Gantar M. Co-cultivation of N₂ fixing cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 2S9B and wheat callus symbiosis // *Symbiosis*. – 2000. – Vol. 29. – № 1. – P. 1 –18.
239. Garg N., Manchanda G. ROS generation in plants: boon or bane // *Plant Biosys.* – 2009. – Vol. 143. – P. 8 – 96.
240. Gasperi J., S. Zgheib, M. Cladière, V. Rocher, R. Moilleron, G. Chebbo Priority pollutants in urban stormwater: Part 2 - Case of combined sewers // *Water Res.* – 2012. – Vol. 46. – P. 6693–6703.
241. Glyphosate and AMPA in Drinking water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. – WHO, 2005. 10 p.
242. Guy T.H., Holtgreffe S., König N., Strodtkötter I., Voss I., Scheibe R. Use of transgenic plants to uncover strategies for maintenance of redox homeostasis during photosynthesis // *Advances in botanical research*. – 2009. – Vol. 52. – P. 207 – 251.
243. Hartikainen H., Tailin X., Vieno P. Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass // *Plant and Soil*. – 2000. – Vol. 225. – Issue 1 – 2. – P 193 – 200.
244. Hilderbrand R.L., Henderson T.O. Phosphonic acids in nature // *The role of phosphonates in living systems*. – Florida: C.R.C. Press. Inc. Boca Raton, 1983. – P. 5 – 30.
245. Hollander-Czytko H., Grabowski J., Sandorf I., Weckermann K., Weiler E. W., Tocopherol content and activities of tyrosine aminotransferase and cysteine lyase in *Arabidopsis* under stress conditions // *Plant Physiol.* – 2005. – Vol. 162. – P. 767 – 770.

246. Imazu K., Tanaka S., Kuroda A., Anbe Y., Kato J., Ohtake H. Enhanced utilization of phosphonate and phosphate by *Klebsiella aerogenes* // *Appl Environ. Microbiol.* – 1998. – Vol. 64. – P. 3754 – 3758.
247. Imfeld G., Lefrancq M., Maillard E., Payraudeau S. Transport and attenuation of dissolved glyphosate and AMPA in a stormwater wetland // *Chemosphere.* – 2013. – Vol. 90. – P. 1333 – 1339.
248. Jaworski E.G. Mode of action of N-phosphonomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis // *J. Agric. Food Chem.* – 1972. – Vol. 20. – № 6. – P. 1195 – 1198
249. Jefferson K.K. What drives bacteria to produce a biofilm // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2004. – Vol. 236. – P. 163–173.
250. Kamnev A.A., Shchelochkov A.G., Perfiliev Yu. D., Tarantilis P.A., Polissiou M.G. Spectroscopic investigation of indole-3-acetic acid interaction with iron (III) // *Journal of Molecular Structure.* – 2001. – Vol. 563 – 564. – Issue 1 – 3. – P. 565-572
251. Karna J.S., Kilbane J.J., Chatterjee D.K. // *Basic Life Sci.* – 1984. – Vol. 28. – № 1. P. 3 – 21.
252. Kiraly L., Barna B., Kiraly Z. Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of innate and acquired resistance // *J. Phytopathol.* – 2007. – Vol. 155. – P. 385 – 396.
253. Kolpin D., Thurman M., Lee E.A., Meyer M.T., Furlong E.T., Glassmeyer S.T. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States // *Sci. Total Environ.* – 2006. – Vol. 354. – P. 191 – 197.
254. Kotrba P., Ruml T. Bioremediation of heavy metal pollution exploiting constituents, metabolites and metabolic pathways of livings // *Collect. Czech. Chem. Commun.* – 2000. – Vol. 65. – P. 1205 – 1247.
255. Kuyucak N., Volesky B. Accumulation of cobalt by marine alga // *Biotechnol. Bioeng.* – 1989. – Vol. 33. – P. 809 – 814.
256. Lengke M.F., Ravel B., Fleet M.E., Wanyer G., Gordon R.A., Southam G. Mechanisms of gold bioaccumulation by filamentous cyanobacteria from gold (III) –

- chloride complex // *Environ. Sci. and Technol.* – 2006. – Vol. 40. – № 20. – P. 6304 – 6309.
257. Lennart H.A., Eriksson M. Case-Control Study of Non-Hodgkin Lymphoma and Exposure to Pesticides // *Cancer.* – 1999. – Vol. 85. – №6. – P. 1353 – 1360.
258. Levit G.S., Gorbuchina A.A., Krumbein W.E. Geophysiology of cyanobacterial biofilms and the “dissymmetry” principle // *Bull. Inst. ocenogr.* – 1999. – P. 175 – 196.
259. Lugtenberg B.J., Dekkers L., Bloemberg G.V. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas* // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2001. – Vol. 39. – P. 461 – 490.
260. Lutz V. Warum sind so schwer zu *Fusarium* und *Verticillium* bekämpfen? // *TASPO-Mag.* – 1986. – № 1 – 2. – P. 8 – 9.
261. Lynch J.M. *The rhizosphere.* – Chichester, England, J. Willey Ltd., 1990. – 458 p.
262. MacRae I.C. Microbial metabolism of pesticides and structurally related compounds // *Reviews Environ Contam Toxicol.* – 1989. – Vol. 109. – P. 1 – 87.
263. Meyer A.J. The integration of glutathione homeostasis and redox signaling // *Plant Physiol.* – 2008. – Vol. 165. – P. 1390 – 1403.
264. Miteva E., Hristova D., Nenova V., Manava S. Arsenic as a factor affecting virus infection in tomato plants: changes in plant growth, peroxidase activity and chloroplast pigments // *Scientia Horticulturae.* – 2005. – Vol. 105. – P. 343 – 358.
265. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant Sci.* – 2002. – Vol. 7. – P. 405 – 409.
266. Miura K., Ya T. Regulation of water, salinity and cold stress responses by salicylic acid // *Frontiers in plant science.* – 2014. – Vol. 5. – P. 1 – 12.
267. Montesinos E. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection // *Int. Microbiol.* – 2003. – № 6. – P. 245 – 252.
268. Morin C.M., LeBlanc M., Daley M., Gregoire J. P., Merette C. Epidemiology of insomnia: prevalence, self-help treatments, consultations, and determinants of help-seeking behaviors // *Sleep Medicine.* – 2006. – Vol. 7. – № 2. – P. 123 – 130.

269. Munro N.B., Talmage S.S., Griffin G.D., Waters L.C., Watson A.P., King J.F., Hauschild V. The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products // *Environ. Health Perspect.* – 1999. – Vol. 107. – P. 933 – 974.
270. Murata K., Higaki N., Kimura A. Detection of carbon-phosphorus lyase activity in cell free extracts of *Enterobacter aerogenes* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1988. – Vol. 157. – P. 190 – 195.
271. Nakashita H., Shimazu A., Hidaka T., Seto H. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate phosphomutase from *Pseudomonas gladioli* B-1 // *J. Bacteriol.* – 1992. – Vol. 174. – P. 6857 – 6861.
272. Parker D.L., Michalick J.E., Plude M.J., Clark T.P., Egan L., Flom J.J., Rau L.C., Kumar H.D. Sorption of metals by extracellular polymers from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* flos-aquae strain C 3-40 // *J. Appl. Phycol.* – 2000. – Vol. 12. – № 3. – P. 219 – 224.
273. PGPR: Biocontrol and biofertilization. V. XIII /Z.A. Siddiqui (ed.). – Springer, Berlin Heidelberg, N.Y., 2005. – 318 p.
274. Pennell R.I. Lamb C. Programmed cell death in plants // *Plant Cell.* – 1997. – Vol. 9. – № 7. – P. 1157 – 1168.
275. Photosynthetic pigments – chemical structure, biological function and ecology // Eds. T.K. Golovko, W.I. Gruszeski, M.N.V. Prasad, K. Strzalka. – Syktyvkar, 2014. 448 p. (Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences).
276. Poljsak B., Milisav I. The Neglected Significance of “Antioxidative Stress” // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2012. – Vol. 2012. P. 1 –12.
277. Polle A. Dissecting the superoxide dismutase ascorbate-glutathione-pathway in the chloroplasts by metabolic modeling. Computer stimulations as a step towards flux analysis // *Plant Physiol.* – 2001. – Vol. 126. – P. 445 – 462.
278. Quinn J.P., Peden J.M.M., Dick R.E. Carbon-phosphorus bond cleavage by grampositive and gram-negative soil bacteria // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1989. – Vol. 31. – P. 283 – 287.

279. Quintelas C., Tavares T. Lead (II) and iron (III) removal from aqueous solution: Biosorption by a bacterial biofilm supported on granular activated carbon // *Journal of Resource and Environmental Biotechnology*. – 2002. – Vol. 3. – № 4. – P. 196–202.
280. Rhodes D., Verslues P. E., Sharp R. E. Role of amino acids in abiotic stress resistance. *Plant Amino Acids // Biochemistry and Biotechnology*. – Marcel Dekker, NY, 1999. – P. 319–356.
281. Rogers S.L., Burns R.G. Changes in aggregate stability, nutrient status, indigenous microbial populations, and seedling emergence, following inoculation of soil with *Nostoc muscorum* // *Biology and Fertility of Soils*. – 1994. – Vol. 18. – №. 3. – P. 209 – 215.
282. Rueppel M.L., Brightwell B.B., Schaefer J., Marvel J.T. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1977. – Vol. 25. – P. 517 – 528.
283. Saitúa H., Giannini F., Padilla A.P. Drinking water obtaining by nanofiltration from waters contaminated with glyphosate formulations: process evaluation by means of toxicity tests and studies on operating parameters // *J. Hazard Mater.* – 2012. – Vol. 227–228. – P. 204 – 210.
284. Sandalio M., Rio L.A. Intra-organellar distribution of superoxide dismutase in plant peroxisomes (glyoxysomes and leaf peroxisomes) // *Plant Physiol.* – 1988. – Vol. 88. – P. 1215 – 1218.
285. Scandalios J.G. Regulation and properties of plant catalases. Zn C Foyer, P Mullineaux, eds, *Photooxidative Stress in Plants*. CRC Press, Boca Raton. 1993. Scandalios J.G: Regulation and properties of plant catalases // *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants / Foyer CH, Mullineaux PM (eds)*. –CRC Press, Boca Raton, FL, 1994. – P. 275–315.
286. Schafer F.Q., Cueno K.L., Venkataraman S., Martin S.M., Buettner G.R. Nitric oxide is a cellular chain-breaking antioxidant via its reaction with peroxy radicals: Lipid alkoxyl radicals are minor propagating species // *Free Radic. Biol. Med.* – 2004. – Vol. 36. – P. 51 – 64.

287. Scholz B., Liebezeit G. Chemical screening for bioactive substances in culture media of microalgae and cyanobacterial from marine and brackish water habitats: First results // *Pharm. Biol.* – 2006. – Vol. 44. – № 7. – P. 544 – 549.
288. Schowanek D., Verstraete W. Phosphonate utilization by bacterial cultures and enrichments from environmental samples // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – Vol. 56. – P. 895 – 903.
289. Scharader B., Dippel B., Erb I. NIR Raman spectroscopy in medicine and biology: results and aspects // *Journal of Molecular Structure.* – 1999. – Vol. 480 – 481. – P. 21 – 32.
290. Sergeeva E., Liemer A., Beryman B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria // *Planta.* – 2002. – Vol. 215. № 2. – P. 229 – 238.
291. Shao H. B., Chu L.Ye., Lu Zh.H, Kang C. M. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells // *International Journal of Biological Sciences.* – 2008. – Vol. 4. – №1. – P. 8 – 14.
292. Shashirekha S., Uma L., Subramaniam G. Phenol degradation by the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 1997. – Vol. 19. № 2. – P. 130 – 133.
293. Shen B., Richard C., Jensen I., Bohnert H. Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals // *Plant Physiol.* – 1997. – № 11. – P. 527 – 532.
294. Shi Y., Mosser D.D., Morimoto R.I. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors // *Genes & Dev.* – 1998. – Vol. 12. – P. 654 – 666.
295. Sidhu G.S. Parasitic epistasis // *Phytopathol.* – 1984. Vol. 74. – № 4. – P. 382 – 384.
296. Sieferman-Harms D. The light harvesting function of carotenoids in photosynthetic membrane // *Plant Physiol.* – 1987. – Vol. 69. – P. 561 – 568.
297. Smirnoff N. Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions // *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants* / Ed. by N. Smirnoff. – Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2005. – P. 53 – 86.

298. Schowanek D., Verstraete W. Phosphonate utilization by bacterial cultures and enrichments from environmental samples // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – Vol. 56. – P. 895–903.
299. Springett J.A., R.A. Gray. Effect of repeated low doses of biocides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa* in laboratory culture // *Soil. boil. biochem.* – 1992. – Vol. 24. – № 12. – P.1739 – 1744.
300. Steed P.M., Wanner B.L. Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon // *J. Bacteriol.* – 1993. – Vol. 175. – P. 6797 – 6809.
301. Szomolay B., Klapper I., Ockery J., Stewart P.S. Adaptive responses to antimicrobial agents in biofilms // *Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 7. – № 8. – P. 1186 – 1191.
302. Ternan, N.G., McMullan G. Organophosphonate utilization by the thermophile *geobacillus caldoxylosilyticus* // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2000. – Vol. 184. – P. 237 – 400.
303. Tien C.J., Sigee D.C., White K.N. Copper adsorption kinetics of cultured algae cells freshwater phytoplankton with emphasis on cell surface characteristics // *J. Appl. Phycol.* – 2005. – Vol. 17. – № 5. – P. 379 – 389.
304. Trapp R. SIPRI Chemical and Biological Warfare Studies. – London, Philadelphia: Taylor and Fransis Ltd, 1985.
305. U.S. EPA: Pesticide Fact Handbook. Noyes Data Corporation. – Park Ridge, New Jersey, 1990. – Vol. 2. – P. 301 – 312.
306. United States Patent and Trademark Office (USPTO) — Официальная страница [электронный ресурс]: National Medal of Technology and Innovation. <http://www.uspto.gov/about/nmti/recipients/1987.jsp>.
307. Vails M., de Lorenzo V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2002. – Vol. 26. – P. 327 – 338.

308. Vardi A., Schatz D., Beeri K., Levine A., Kaplan A. Cyanobacterium-dinoflagellate cross-talk, may determine the dynamics and composition of the phytoplankton assemblage // 5 European Workshop on the Molecular Biology of cyanobacteria. – Stockholm, 2002. – P. 10.
309. Veronesi C., Rickaner M., Fournier J., Pouenat M.-L., Esquerre-Tugaye M.-T. Lipoxygenase gene expression in the Tobacco-Phytophthora parasitica nicotianae interaction // Plant Physiol. – 1996. – Vol. 112. – P. 997 – 1004.
310. Volk R.-B. Screening of microalgal culture media for presense of algicidal compounds and isolation and identification of two bioactive metabolites, excreted by the cyanobacteria *Nostoc insulare* and *Nodularia harveyana* // J. Appl. Phycol. – 2005. – Vol. 17. – № 4. – P. 339 – 347.
311. Whitton B. A., Sinclair C. Ecology of blue- green algae // Science Progress. – 1975. – Vol. 62. – P. 429 – 446.
312. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress // Cur. Op. Plant Biol. – 2002. – Vol. 5. – P. 218 – 223.
313. Ye J., Yin H., Mai B., Peng H., Qin H., He B., Zhang N. Biosorption of chromium from aqueous solution and electroplating wastewater using mixture of *Candida lipolytica* and dewatered sewage sludge // Bioresource technology. – 2010. – Vol. 101. – № 11. – P. 3893 – 3902.
314. Yilmazer, P. Saracoglu N. Bioaccumulation and biosorption of copper (II) and chromium (III) from aqueous solutions by *Pichia stipitis* yeast // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. – 2009. – Vol. 84. – Issue 4. – P. 604–610.
315. Zgheib S., R. Moilleron, G. Chebbo Priority pollutants in urban stormwater: Part 1 – Case of separate storm sewers // Water Res. – 2012. – Vol. 46. –P. 6683 – 6692.
316. Zhang J., Kirkham M.B. Enzymatic Responses of the Ascorbate-Glutathione Cycle to Drought in Sorghum and Sunflower Plants // Plant Sci. – 1996. – Vol. 113. – P. 139 – 147.