

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА С БИОТОЙ И МИНЕРАЛЬНОЙ ЧАСТЬЮ ПОЧВ

УДК 574.3:57.044:631.417.2:579.29

ВЛИЯНИЕ ФРАКЦИЙ РАСТВОРЕННОГО ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА С РАЗНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ И Cd^{2+} НА РОСТ *Scenedesmus obliquus*

© 2022 г. В. В. Тихонов^а, *, Е. Н. Воронова^а, М. М. Карпухин^а,
Р. А. Аймалетдинов^а, В. В. Демин^а, О. Ю. Дроздова^а

^аМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

*e-mail: vvt1985@gmail.com

Поступила в редакцию 06.12.2021 г.

После доработки 29.12.2021 г.

Принята к публикации 26.01.2022 г.

Изучено влияние фракций растворенного органического вещества (РОВ) с разной молекулярной массой и ионов Cd^{2+} на скорость роста *Scenedesmus obliquus*. Исследования проводили как отдельно для РОВ и Cd^{2+} , так и при их совместном присутствии. Фракции РОВ (>30, 10–30, 3–10, 1–3 и <1 кДа) получали методом ультрафильтрации, рост водорослей фиксировали по содержанию хлорофилла, определяемого спектрофотометрически при 678 нм. Установлено, что Cd^{2+} в концентрации 5.62–22.5 мг/л стимулировал, а в концентрации 56.2 и 112.4 мкг/л подавлял рост водорослей. Фракции РОВ оказывали различное воздействие на *S. obliquus*. Они как подавляли, так и стимулировали рост водорослей в диапазоне 0.001–1 мг С/л, и эффект воздействия на скорость роста лежал в диапазоне ±10–25%. Наибольший положительный отклик на рост микроводорослей оказала фракция <1 кДа, что, вероятно, связано с активным участием данной фракции в питании организма. При наличии ингибирующих концентраций Cd^{2+} фракции РОВ 30, 1–3 и <1 кДа оказывали положительное влияние на рост *S. obliquus*. Возможными механизмами такого влияния РОВ являлось связывание с ним ионов Cd^{2+} (преимущественно на поверхности клеток водорослей), а также высокая биологическая активность его низкомолекулярной фракции <1 кДа. Впервые получены данные по влиянию тяжелых металлов на водоросли в присутствии фракций РОВ с разной молекулярной массой. Они расширяют наше представление о механизмах регулирования численности и состояния микроводорослей в экосистемах при воздействии на нее тяжелых металлов.

Ключевые слова: фракции растворенного органического вещества, молекулярный вес, водоросли, тяжелые металлы

DOI: 10.31857/S0032180X22070115

ВВЕДЕНИЕ

Антропогенное поступление тяжелых металлов в поверхностные континентальные воды может отрицательно повлиять на водные организмы, поскольку некоторые из этих металлов очень токсичны даже при относительно низких концентрациях [47]. Растворенное органическое вещество (РОВ) является одним из факторов, контролирующих формы нахождения металлов в природных водах. Биодоступность и токсичность некоторых металлов в поверхностных водах могут уменьшаться за счет образования комплекса с РОВ [18]. Кроме того, РОВ может сорбироваться на биотических поверхностях (например, поверхностях водорослей), препятствуя внутриклеточному поглощению металлов [17]. Доступность ионов металлов также зависит от такого динамического, меняющегося в зависимости от времени и

сезона, параметра, как размер частиц органической фракции, с которой они связаны [10, 11]. Зеленые микроводоросли рода *Scenedesmus* – обычные пресноводные виды, часто используемые в физиологических исследованиях. Также *Scenedesmus* spp. широко встречаются в почвах как переувлажненных [34], так и засушливых районов [22, 46], активно участвуя в депонировании С и N в почве [40]. Они в значительной степени устойчивы к металлам и легко накапливают их, включая Cd, Ni [19, 32], Pb [31] или Zn [14].

Основная часть РОВ в природных водах (до 70% от общего органического углерода) представлена гуминовыми веществами [18, 48]. В ряде работ изучалось влияние гуминовых веществ и подобных органических молекул на токсичность и биодоступность металлов как для макро- [55], так и микроводорослей [18, 38]. Отдельно изучалось влияние РОВ и, в частности, гуминовых веществ

на скорость роста водорослей [33, 44, 56]. Влияние фракций РОВ на рост водорослей изучен недостаточно, а исследований влияния фракций РОВ разной молекулярной массы на изменения токсичности тяжелых металлов по отношению к водорослям ранее не проводилось.

Таким образом, для оценки потенциальной токсичности кадмия в природных водах необходимо понимание роли различных фракций органических веществ в токсичности металлов.

В данной работе было изучено влияние пяти фракций РОВ, выделенных с использованием метода ультрафильтрации, на рост *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kuetzing, 1883. Также было исследовано влияние этих фракций на токсичность кадмия по отношению к *S. obliquus*.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

РОВ представлено гуминовой кислотой (cas № 1415-93-6, Aldrich), растворенной в 0.01 М NaOH с последующим доведением раствора до pH 7 с помощью 1 М HCl. Основные химические характеристики использованного препарата (Sigma-Aldrich): C – 68.98%, H – 5.26%, N – 0.74%, S – 4.24% и O – 43.55% COOH-группы – 4.38 ± 0.03 мэкв/г, OH-фенольные группы – 2.71 ± 0.03 мэкв/г [23, 37]. Дополнительная информация о структуре этой кислоты и ее фракций, полученных методом ультрафильтрации, приведена в следующих работах [16, 23].

Фракционирование РОВ по молекулярным весам. Для дополнительной очистки РОВ перед фракционированием проба была пропущена через фильтр 0.2 мкм. Фракционирование РОВ проводили методом ультрафильтрации с помощью установки фирмы Amicon и фильтров Millipore с размером пор 1, 3, 10 и 30 кДа. В эксперименте исследовали исходное РОВ (РОВ_{НФ}), а также его фракции: <1 кДа (РОВ_{<1 кДа}), 1–3 кДа (РОВ_{1–3 кДа}), 3–10 кДа (РОВ_{3–10 кДа}), 10–30 кДа (РОВ_{10–30 кДа}), >30 кДа (РОВ_{>30 кДа}). Концентрации фракций РОВ считали по органическому углероду, который определяли на жидкостном элементном анализаторе (Liqui-TOC trace, Elementar).

Определение карбоксильных групп фракций РОВ. Расчет количества карбоксильных групп проводили с учетом их содержания 10 ммоль/г ГК [29].

Растворы ионов кадмия. В опытах по влиянию ионов Cd на рост водорослей использовали водные растворы CdCl₂ (pH 7). Контроль количества Cd²⁺ проводили на оптико-эмиссионном спектрометре с индуктивно связанной плазмой Agilent 5110 ICP-OES.

Анализ связанных форм кадмия с РОВ. С учетом химического состава растворов были выполнены расчеты форм кадмия в исследованных системах

с использованием программы Visual MINTEQ ver. 3.1 [13] в сочетании с базой данных и моделями привязки гуминовых веществ NICA-Donnan для вариантов с РОВ.

Водоросли. В качестве объекта исследования выбрана пресноводная зеленая водоросль *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kuetzing. Этот вид широко распространен в природе и является типичным объектом для биоиндикации и биотестирования. Предварительное культивирование альгологически чистой культуры водорослей проводили на среде Тамия в разведении 1/2. Состав среды: KNO₃ – 5 г/л, MgSO₄·7H₂O – 2.5 г/л, KH₂PO₄ – 1.25 г/л, FeSO₄·7H₂O – 0.003 г/л, Na₂ЭДТА – 0.037 г/л, раствор микроэлементов – 1 мл/л. Раствор микроэлементов (состав): H₃BO₃ – 2.86 г/л, MnCl₂·4H₂O – 1.81 г/л, ZnSO₄·4H₂O – 0.222 г/л, MoO₃ – 176.4 мг/10 л, NH₄VO₃ – 229.6 мг/10 л.

Для проведения экспериментов с добавлением солей тяжелых металлов и РОВ водоросли пересаживали на среду Тамия в разведении 1/40, из которой были удалены фосфаты и Na₂ЭДТА. Такая среда необходима, так как при увеличении содержания в воде кальция, магния и фосфатов токсичность солей тяжелых металлов для большинства видов водорослей уменьшается. Na₂ЭДТА способна сорбировать соли тяжелых металлов [2, 36]. Токсичность также зависит от кислотно-щелочных условий. Для поддержания постоянных значений pH в среду был добавлен буферный раствор HEPES. Конечная концентрация HEPES в среде 10⁻³ М. pH среды составлял 7.5. Водоросли выращивали в конических колбах объемом 50 мл при непрерывном облучении светодиодными лампами (LED) интенсивностью 20 мкМ квантов/(м² с) при температуре 22°C в накопительной культуре. Для определения относительного содержания хлорофилла а измеряли спектры его поглощения в суспензии водорослей в диапазоне от 350 до 850 нм на однолучевом спектрофотометре с интегрирующей сферой на базе спектрометра USB2000 (Ocean Optics, USA). Спектр поглощения суспензии водорослей вычисляли из двух спектров ослабления света, полученных при установке кюветы с образцом на разных расстояниях от интегрирующей сферы, что позволяло определить и рассеяние света на образце [27]. Относительное содержание хлорофилла определяли из вычисленных спектров как значение оптической плотности на длине волны 678 нм (максимум поглощения хлорофилла). Известно, что существует прямая корреляция между численностью в культуре водорослей и содержанием хлорофилла а. Для выяснения зависимости между относительным содержанием хлорофилла а и численностью водорослей в пробе была проведена калибровка. Для этого численность определяли методом прямого счета клеток в камере Горяева. Начальная

Таблица 1. Процентное содержание фракций в РОВ и карбоксильных групп в них (\pm ошибка среднего)

Фракция	$[-COOH]$, ммоль/г РОВ	% фракций
РОВ _{НФ}	2.7 ± 0.1	100
РОВ _{>30 кДа}	1.9 ± 0.2	77.8
РОВ _{10–30 кДа}	3.4 ± 0.2	9.7
РОВ _{3–10 кДа}	3.3 ± 0.1	1.5
РОВ _{1–3 кДа}	3.7 ± 0.3	1.0
РОВ _{<1 кДа}	3.3 ± 0.2	10.0

концентрация водорослей в экспериментах составляла 0.075–0.11 единиц оптической плотности на длине волны 678 нм, что соответствовало численности 185–230 тыс. клеток/мл.

Постановка экспериментов. В исследованиях влияния РОВ_{НФ} на рост водорослей добавляли водные растворы РОВ, конечные концентрации были 0.001, 0.01, 0.1, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50 мг/л. В контрольный вариант добавляли эквивалентное количество дистиллированной воды.

В исследованиях влияния Cd^{2+} на рост водорослей в опытные образцы добавляли водные растворы $CdCl_2$, в которых конечная концентрация Cd^{2+} была 5.62, 11.24, 22.5, 56.2, и 112.4 мкг/л. В контрольный вариант добавляли эквивалентное количество дистиллированной воды.

В исследованиях влияния фракций РОВ на рост водорослей добавляли водные растворы РОВ, их конечные концентрации были 0.001, 0.01, 0.1 и 1 мг/л. В контрольный вариант добавляли эквивалентное количество дистиллированной воды.

В исследованиях с фракциями РОВ в присутствии Cd^{2+} на рост водорослей исследовали две концентрации металла 56.2 и 112.4 мкг/л и одну концентрацию органического вещества – 0.1 мг С/л. В контрольный вариант добавляли эквивалентное количество РОВ.

В экспериментах была трехкратная повторность для опытных вариантов и 12-кратная для контрольного варианта.

В исследованиях влияния связанных комплексов РОВ- Cd^{2+} на рост водорослей использовали растворы комплекса РОВ- Cd в соотношении 1 мг Cd^{2+} к 20 мг $C_{(РОВ)}$. Мы исходили из того, что максимальная емкость связывания Cd^{2+} (поведение этого катиона в растворах гуминовых веществ сходно с поведением Cu^{2+}) фульвокислотами, выделенными из поверхностных вод, составляет в зависимости от условий эксперимента 1/5 – 1/20 мгCd(II)/мгРОВ [26].

Концентрации комплексов составляли 5.62, 11.24, 22.5, 56.2 и 112.4 мкг/л в пересчете по кадмию. В контрольный вариант добавляли эквивалентное количество кадмия или РОВ. В эксперименте была трехкратная повторность.

Расчет максимальной удельной скорости роста. Измерения спектров поглощения хлорофилла проводили сразу после добавления токсикантов и гуминовой кислоты, через 24, 48 и 72 ч после начала инкубации. Максимальную удельную скорость роста водорослей определяли путем логарифмирования значений численности в экспоненциальную фазу роста. Значения скорости роста культуры соответствовали угловому коэффициенту линейного уравнения вида $y = kx + b$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Доля фракций в РОВ и содержание карбоксильных групп в них. РОВ состоит преимущественно из фракции РОВ_{>30 кДа} (около 78%), которая содержала меньшее количество карбоксильных групп, чем остальные фракции (табл. 1). Достоверной разницы между содержанием карбоксильных групп в остальных фракциях не выявлено.

Влияние РОВ на рост водорослей. РОВ_{НФ} достоверно увеличивал скорость роста водорослей при концентрациях 0.25 и 1 мг/л на 9 и 19% соответственно. При концентрациях >30 мг/л происходило уменьшение скорости роста водорослей на 13–16% (рис. 1). В остальных вариантах достоверной разницы с контролем обнаружено не было. Слабовыраженная тенденция уменьшения скорости роста водорослей наблюдалась при воздействии сверхнизких доз РОВ (0.001 и 0.01 мг С/л).

Влияние фракций РОВ на рост водорослей. РОВ_{>30 кДа} подавляла рост водорослей в низких концентрациях (0.01 и 0.1 мг/л) и стимулировала при концентрации 1 мг/л. РОВ_{10–30 кДа} стимулировала рост водорослей при концентрации 1 мг/л. РОВ_{3–10 кДа} увеличивала рост водорослей при концентрации 0.001 и 0.01 мг/л. РОВ_{1–3 кДа} не влияла на рост водорослей во всех концентрациях, а РОВ_{<1 кДа} стимулировала рост водорослей во всех концентрациях (рис. 2). Разнонаправленное влияние на рост было просуммировано с учетом количества фракций в РОВ (табл. 1) и полученная теоретическая кривая доза-эффект хорошо совпала с практической кривой РОВ_{НФ}. Таким образом, биологическая активность РОВ_{НФ} может быть представлена как сумма биологических откликов индивидуальных фракций РОВ.

Влияние Cd на рост водорослей. Cd в концентрациях 5.6, 11.2 и 22.5 мкг/л стимулировал скорость роста водорослей на 9, 17 и 24% соответственно и подавлял рост при концентрации 56 и 112.4 мкг/л на 11 и 65% соответственно (рис. 3).

Влияния фракций РОВ на рост водорослей в присутствии Cd. Кадмий во всех вариантах эксперимента подавлял рост водорослей. Наличие в системе РОВ_{НФ}, РОВ_{>30 кДа}, РОВ_{1–3 кДа} и РОВ_{<1 кДа} достоверно увеличивало скорость роста *S. obliquus*.

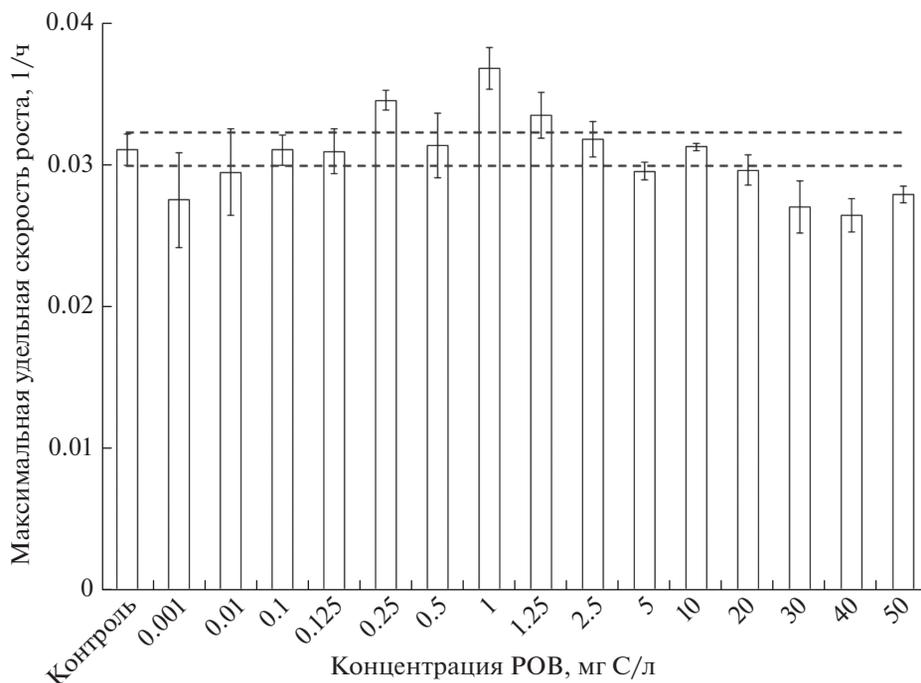


Рис. 1. Влияние РОВ_{НФ} на максимальную удельную скорость роста *Scenedesmus obliquus*.

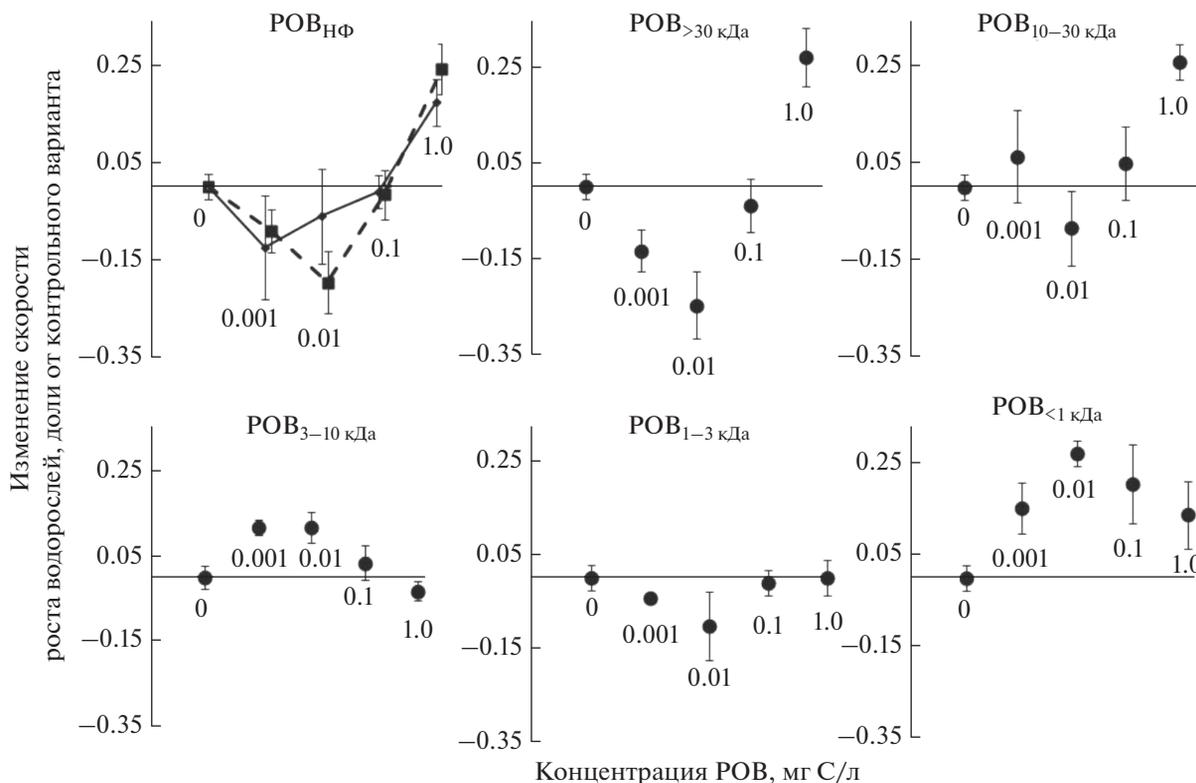


Рис. 2. Влияние РОВ_{НФ} и фракций на изменение максимальной удельной скорости роста *Scenedesmus obliquus*. РОВ_{НФ} (сплошная линия) – фактические данные, РОВ_{НФ} (пунктирная линия) – теоретическая кривая на основе суммирования эффектов с учетом количества фракций в РОВ.

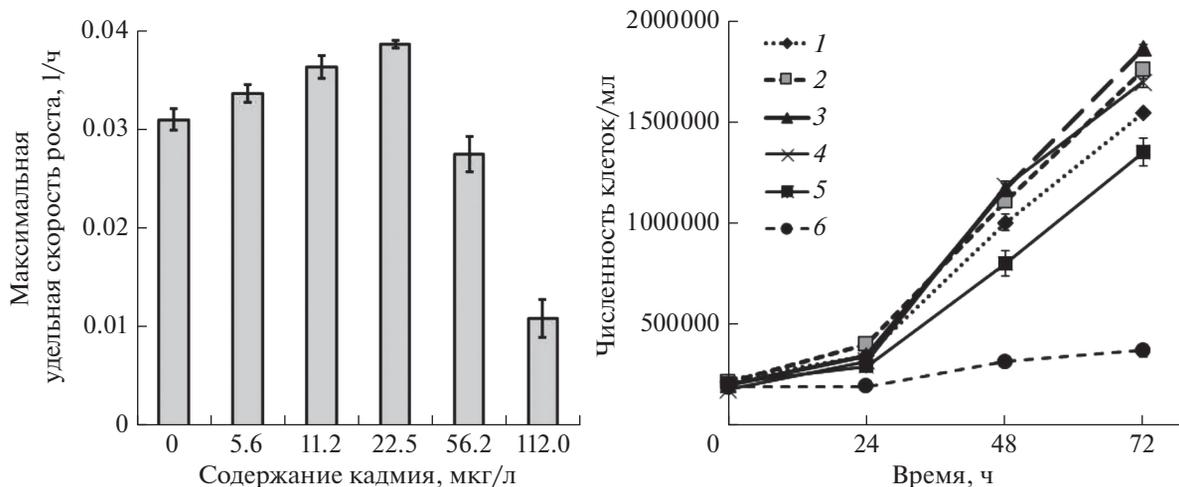


Рис. 3. Влияние CdCl_2 на скорость роста *Scenedesmus obliquus*. Концентрация Cd, мкг/л: 1 – контроль, 2 – 5.62, 3 – 11.24, 4 – 22.5, 5 – 56.2, 6 – 112.4.

В присутствии $\text{POB}_{10-30 \text{ кДа}}$, $\text{POB}_{3-10 \text{ кДа}}$ и 112 мкг/л Cd^{2+} рост водорослей полностью отсутствовал (рис. 4).

Влияние комплексов $\text{POB}_{\text{HФ}}-\text{Cd}$ на рост *Scenedesmus obliquus* при разном разбавлении. Комплексы $\text{POB}-\text{Cd}$ оказывали меньшее воздействие на рост водорослей, чем свободный Cd (рис. 5). Снижение токсичности Cd было не связано с биологической активностью $\text{POB}_{\text{HФ}}$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в наших экспериментах кривые доза-эффект отличались от классических колоколообразных графиков, характерных для эссенциальных элементов: небольшой, плохо выраженный эффект ингибирования роста клеток водорослей в области сверхнизких концентраций $\text{POB}_{\text{HФ}}$ сменялся слабым стимулированием роста и последующим ингибированием размножения клеток при концентрации $\text{POB}_{\text{HФ}}$ больше 2.5 мг/л. Ранее в ряде работ отмечено негативное влияние POB в концентрациях <0.1 мг/л [43–45]. Негативное влияние высокой концентрации POB связывали с повреждением клеточной мембраны и усилением окислительного стресса у микроводорослей [56]. Однако присутствие в среде POB в концентрации до 2 мг/л стимулировало синтез хлорофилла и биомолекул [56], а также улучшало питание водорослей, облегчая за счет хелатирования микроэлементов их последующий транспорт в клетки [41]. В наших экспериментах из состава питательной среды был удален хелатирующий агент – ЭДТА, и функцию переносчика ионов Fe^{2+} , Zn^{2+} и Mn^{2+} могли играть низкомолекулярные компоненты исходного $\text{POB}_{\text{HФ}}$. Вероятно, этим можно объяснить появление слабовыражен-

ного оптимума на кривой доза-эффект при содержании $\text{POB}_{\text{HФ}}$ около 1 мг С/л. При более высоких концентрациях $\text{POB}_{\text{HФ}}$ может начинаться повреждение клеточных мембран и действие двух различных механизмов биологического влияния POB на клетку вызывает разнонаправленные отклики [56], поэтому, по-видимому, и наблюдаются неклассические кривые доза-эффект. Влияние разных по молекулярной массе фракций POB на рост водорослей было ранее исследовано на таких тест-объектах, как динофлагелляты [9, 15, 42], зеленые [50] и диатомовые [9] водоросли, на представителях *Scenedesmus* sp. такая работа проведена впервые. В одних публикациях отмечалось различное воздействие фракций на рост водорослей: негативное влияние фракций 1–10 кДа [9] и фракции <1 кДа по сравнению с высокомолекулярными фракциями [50], в других, напротив, не обнаружено различий в действии между гуминовыми и фульвокислотами [15].

Анализ представленных на рис. 2 данных позволяет выявить одну из причин, вызывающих эти противоречия, – величина и знак эффекта зависят от использованной в экспериментах концентрации POB . Например, при концентрации 0.1 мг С/л влияние POB на рост водоросли практически отсутствовало (исключение – фракция $\text{POB}_{<1 \text{ кДа}}$). В то же время эффекты при содержании POB в среде 0.01 мг С/л в большинстве случаев максимальны и имеют различный знак: отрицательный для $\text{POB}_{\text{HФ}}$, $\text{POB}_{>30 \text{ кДа}}$, $\text{POB}_{10-30 \text{ кДа}}$ и $\text{POB}_{1-3 \text{ кДа}}$ и положительный для $\text{POB}_{3-10 \text{ кДа}}$ и $\text{POB}_{<1 \text{ кДа}}$. Максимальная амплитуда эффектов отмечается для фракций $\text{POB}_{>30 \text{ кДа}}$ и $\text{POB}_{<1 \text{ кДа}}$.

Хорошее совпадение экспериментальной и расчетной кривых доза-эффект для фракции $\text{POB}_{\text{HФ}}$ обусловлены в первую очередь тем, что на

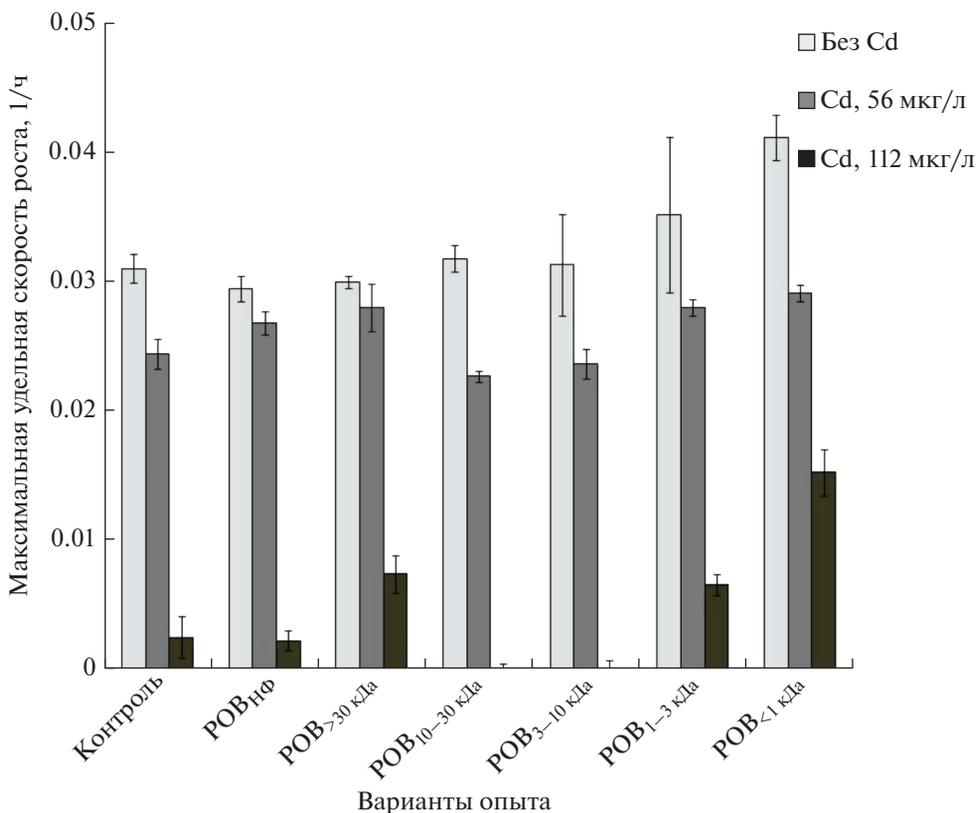


Рис. 4. Влияние CdCl_2 на скорость роста *Scenedesmus obliquus* в присутствии 0.1 мг С/л РОВ и его фракций.

80% она состоит из фракции $\text{POB}_{>30 \text{ кДа}}$, но, вероятно, высокая степень аддитивности исключает наличие синергетических эффектов. Высокая биологическая активность $\text{POB}_{<1 \text{ кДа}}$ может быть также объяснена возможностью низкомолекулярных органических веществ легче проникать в клетку, участвуя в ее питании [4, 5, 7, 41].

Известно, что Cd подавляет рост водорослей, разрушая клетки и негативно влияя на метаболизм, однако сведений положительного влияния на рост, который мы наблюдали в эксперименте (рис. 3), крайне мало. Так, в концентрациях 46–123 мкг/л Cd стимулировал рост *Scenedesmus protuberans* [21], при концентрации 21 мкг/л возрастал рост *Scenedesmus accuminatus* var. *biseratus* [52], а концентрация 200 мкг/л не влияла на рост *Schroederia setigera* [28]. Механизмы процесса остаются малоизученными. Отмечалось, что среди родов *Ankistrodesmus*, *Chlorella* и *Scenedesmus* представители рода *Scenedesmus* являлись наиболее устойчивыми к загрязнению воды Cd [12]. Можно предположить, что при низких концентрациях микроэлементов в растворе (1/40 среды Тамия) ионы Cd^{2+} , занимая отрицательно заряженные центры, ассоциированные с клеточной стенкой водоросли, могли хотя бы частично облегчать поступление Fe^{2+} , Mn^{2+} и Zn^{2+} в клетку. В то же

время низкая концентрация конкурирующих с Cd^{2+} ионов эссенциальных микроэлементов ограничивает верхний предел концентраций, при которых наблюдается стимулирующий эффект Cd: 22.5 мкг/л в наших экспериментах и 123–200 мкг/л зарегистрированная в работах, цитированных выше, в которых использовались стандартные питательные среды.

Имеется множество работ, посвященных изучению влияния РОВ на уменьшение токсичности и биодоступности Cd микроводорослям [20, 51]. Часть авторов описывала явление образованием комплексов Cd-РОВ в растворе и уменьшением доступности свободных ионов к клетке [20, 35], другие объясняли явление адсорбцией РОВ на поверхности клеток [30], что уменьшало количество адсорбционных центров для свободного металла. Некоторые авторы при работе со схожим по поведению ионом Cu^{2+} объясняли снижение токсичности металла защитой РОВ ферментативного аппарата водорослей, что приводило к уменьшению секреции биопленок по сравнению с вариантом Cu^{2+} без РОВ [39]. Имеются данные, что переход на миксотрофию вызывал большую резистентность к Cd у водорослей, чем чисто автотрофное питание [24]. Миксотрофия известна и для *Scenedesmus obliquus* [54].

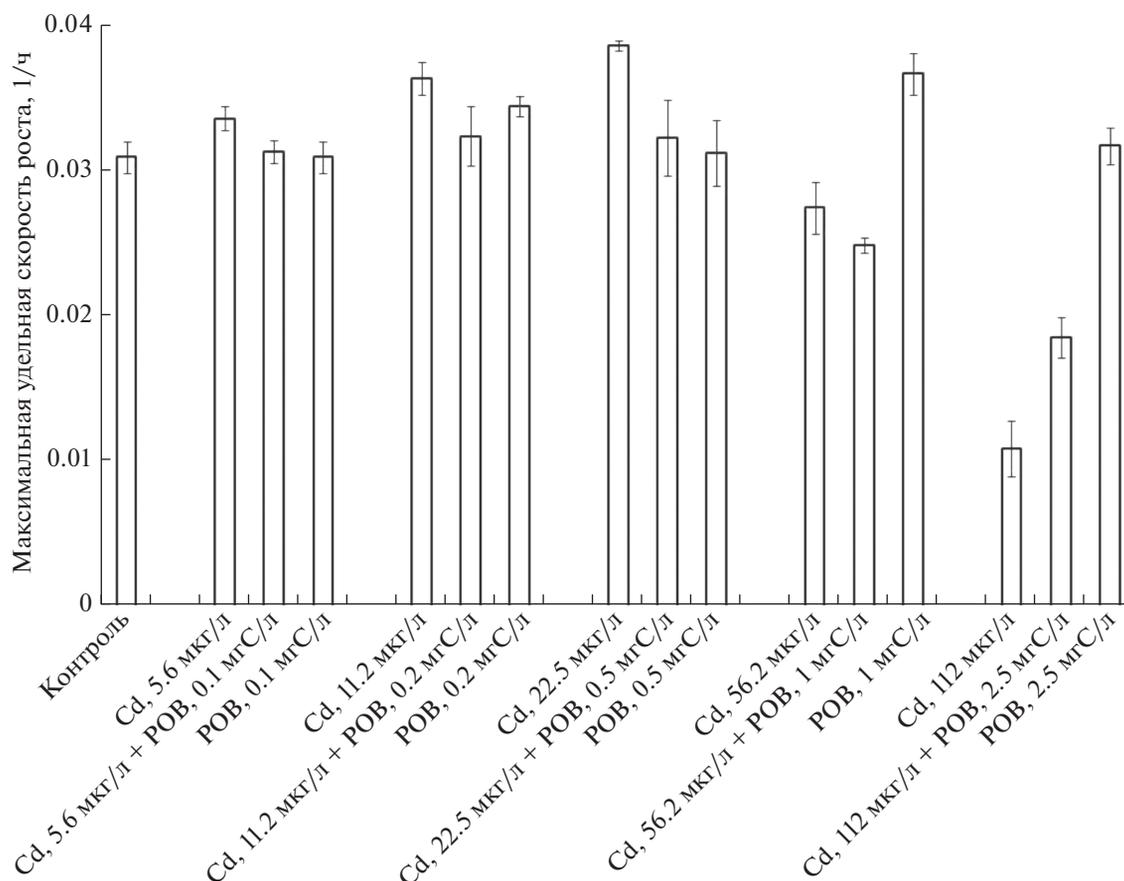


Рис. 5. Максимальная удельная скорость роста *Scenedesmus obliquus* в присутствии различных концентраций $Pb_{HФ}$ и Cd.

Для оценки возможности образования в достаточном количестве комплексов Cd^{2+} с РОВ с помощью программы VisualMinteq ver. 3.1 и модели NICA-Donnan, описывающей взаимодействие ионов металлов с РОВ, были выполнены расчеты для концентрации фракций РОВ в среде 0.1 и 2.5 мг/л и соответствующего количества карбоксильных групп. Полученные результаты показывают, что в использованной культуральной среде доля комплексов Cd^{2+} с РОВ при концентрации последних 0.1 мг С/л равнялась 0.3%, а при 2.5 мг С/л – 10%. Все органическое вещество в растворе было связано в комплексы с катионами питательной среды: абсолютно доминировали комплексы с Mg^{2+} , комплексы с Fe^{2+} , Mn^{2+} и Zn^{2+} существовали в минорных количествах. Таким образом, основным механизмом уменьшения токсичности Cd в присутствии $POB_{>30 кДа}$ не может быть объяснено связыванием ионов Cd^{2+} в растворе, а компенсация негативного влияния Cd^{2+} на клетки водоросли за счет положительной биологической активности РОВ возможно только для фракции $POB < 1 кДа$.

Можно предположить, что основным механизмом уменьшения токсичности Cd^{2+} является огра-

ничение скорости переноса катиона через клеточную стенку к плазматической мембране из-за тех затруднений, которые возникают при связывании РОВ на поверхности клеток. Локализация гуминовых веществ на клетках может рассматриваться как один из механизмов проявления защитного действия этих полимеров на живые организмы [1]. Показано, что РОВ активно адсорбируется на микроводорослях [6], в количестве, близком для клеток бактерий [3]. Прокариоты связывают преимущественно высокомолекулярные фракции РОВ [25, 49] и, вероятно, это может быть справедливо и для водорослей.

Концентрация эссенциальных микроэлементов в очень разбавленных средах является величиной, по порядку близкой к концентрации исследуемого токсичного иона металла и концентрации отрицательно заряженных центров связывания ионов как в молекулах РОВ (COOH-группы), так и в клеточных стенках водоросли (те же COOH-группы). Поэтому наблюдаемые изменения в скоростях роста водоросли следует приписывать не только присутствию ионов Cd^{2+} , но и возможному дефициту эссенциальных микроэлементов.

Эффект смягчения негативного действия Cd^{2+} , вызванный присутствием в культуральной среде фракций $POB_{>30 \text{ кДа}}$ и $POB_{<1 \text{ кДа}}$ следует, вероятно, объяснять разными причинами. Сорбция высокомолекулярных фракций POB клеточными стенками водоросли тормозит перенос в клетку и ионов Cd^{2+} , и ионов эссенциальных элементов. Напротив, низкомолекулярные компоненты POB , образуя комплексы с ионами микроэлементов, ускоряют их транспорт через клеточную стенку, улучшая снабжение клетки необходимыми элементами, смягчая таким образом негативный эффект присутствия в среде Cd^{2+} .

Хорошо выраженная аддитивность действия различных фракций POB , полученная в описанных выше экспериментах, нарушалась с введением в раствор ионов Cd^{2+} . Обращает внимание ярко выраженный отрицательный эффект присутствия в среде фракций $POB_{10-30 \text{ кДа}}$ и $POB_{3-10 \text{ кДа}}$ (рис. 4), в то время как на кривых доза-эффект какие-либо значимые эффекты для этих фракций не наблюдались (рис. 2). Возможно, причиной отклонения от простых закономерностей являлось значительное различие в константах устойчивости комплексов различных фракций POB с ионами металлов. Зависимость констант устойчивости POB с кадмием от молекулярной массы фракций, по-видимому, не линейна, например для Co [53] получен следующий ряд: $k_{POB \text{ 5-10 кДа}} \gg k_{POB < 5 \text{ кДа}} > k_{POB \text{ 30-100 кДа}} > k_{POB \text{ 10-30 кДа}}$ и определено, что низкомолекулярные фракции $<10 \text{ кДа}$ увеличивали выживаемость дафний в присутствии кобальта, а высокомолекулярные ($30-100$ и $>100 \text{ кДа}$), напротив, подавляли их жизнедеятельность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование по влиянию Cd на рост водорослей в присутствии фракций POB разных молекулярных масс является первым исследованием на водорослях. Полученные данные свидетельствуют о том, что фракции POB могут как усиливать, так и уменьшать токсичность металла. Сложность изучения данного феномена заключается в разнообразии эффектов для POB и тяжелых металлов: Cd в микроконцентрациях может оказывать положительное влияние на рост водорослей, в то время как POB уже в концентрации 1 мкг/л — подавляет рост. Таким образом, исследования только чистых веществ и использование исключительно критерия скорости роста при оценке воздействия токсикантов на организмы, являются некорректным подходом, хотя они лежат в основе многих экотоксикологических тестов (например, OECD 201, ГОСТ 32293-2013). По-видимому, не совсем точно говорить о POB (или гуминовых веществах), как веществах, смягчающих стресс при рассмотрении воздействия на индивидуаль-

ную особь, и следует признать, что, находясь в естественных природных условиях, водоросли подвержены большему стрессу, нежели лабораторные культуры, в том числе под действием POB . На популяционном и экосистемном уровнях POB безусловно являются веществами, ослабляющими негативные эффекты, и при взаимодействии с металлами основным механизмом смягчения воздействия является связывание POB и их фракциями токсикантов в неактивные комплексы. На наш взгляд, перспективными являются работы по изучению адсорбционных явлений POB и прочих токсикантов на поверхности организмов. Адсорбция веществ на клетках микроорганизмов и ее изменение под действием природных факторов может являться важным фактором устойчивости природных экосистем.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа по фракционированию POB выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 075-15-2021-1396.

Работа по химическому анализу POB выполнена в рамках темы государственного задания “Почвенные микробиомы: геномное разнообразие, функциональная активность, география и биотехнологический потенциал”, № 121040800174-6

Работа с микроводорослями осуществлена при поддержке РНФ проект № 21-77-10028.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демин В.В., Терентьев В.А., Завгородняя Ю.А. Вероятный механизм действия гуминовых веществ на живые клетки // Гуминовые вещества в биосфере. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2004. С. 37–40.
2. Мур Д., Раммамурти С. Тяжелые металлы в природных водах. Контроль и оценка влияния. М.: Мир, 1987. 288 с.
3. Тихонов В.В., Орлов Д.С., Лисовицкая О.В., Завгородняя Ю.А., Бызов Б.А., Демин В.В. Сорбция гуминовых кислот бактериями // Микробиология. 2013. № 82(6). С. 691–697.
4. Antia N., Harrison P., Oliveira L. Phycological reviews: the role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology, and ecology // Phycologia. 1991. V. 30. P. 1–89. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-30-1-1.1>
5. Baltazar M., Correia S., Guinan K., Sujeeth N., Bragança R., Gonçalves B. Recent advances in the molecular effects of biostimulants in plants: An Overview // Biomolecules. 2021. V. 11. P. 1096. <https://doi.org/10.3390/biom11081096>

6. Campbell P., Twiss M., Wilkinson K. Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2011. V. 54. P. 2543–2554.
<https://doi.org/10.1139/cjfas-54-11-2543>
7. Canellas L., Olivares F., Aguiar N., Jones D., Nebbioso A., Mazzei P., Piccolo A. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture // *Sci. Hortic.* 2015. V. 196. P. 15–27.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>
8. Fagerberg T., Carlsson P., Lundgren M. A large molecular size fraction of riverine high molecular weight dissolved organic matter (HMW DOM) stimulates growth of the harmful dinoflagellate *Alexandrium minutum* // *Harmful Algae*. 2009. V. 8. P. 823–831.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.02.002>
9. Fagerberg T., Jephson T., Carlsson P. Molecular size of riverine dissolved organic matter influences coastal phytoplankton communities // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2010. V. 409. P. 17–25.
<https://doi.org/10.3354/meps08616>
10. Giesy J., Briese L. Metals associated with organic carbon extracted from Okefenokee swamp water // *Chem. Geol.* 1977. V. 20. P. 109–120.
[https://doi.org/10.1016/0009-2541\(77\)90040-7](https://doi.org/10.1016/0009-2541(77)90040-7)
11. Giesy J., Lerversee G., Williams D. Effects of naturally occurring aquatic organic fractions on cadmium toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Daphnidae) and *Gambusia affinis* (Poeciliidae) // *Water Res.* 1977. V. 1. P. 1013–1020.
[https://doi.org/10.1016/0043-1354\(77\)90160-9](https://doi.org/10.1016/0043-1354(77)90160-9)
12. Granda D., Vallejo C., Botero L. Cadmium (Cd) tolerance evaluation of three strains of microalgae of the genus *Ankistrodesmus*, *Chlorella* and *Scenedesmus* // *Revista Facultad De Ingeniería Universidad De Antioquia*. 2019. V. 92. P. 60–69.
<https://doi.org/10.17533/udea.redin.20190523>
13. Gustafsson J. Visual MINTEQ Ver. 3.1. [Электронный ресурс] <http://vminteq.lwr.kth.se>. 2013
14. Hamed S., Zinta G., Klöck G., Asard H., Selim S., Abdelgawad H. Zinc-induced differential oxidative stress and antioxidant responses in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus acuminatus* // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2017. V. 140. P. 256–263.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.055>
15. Heil C. Influence of humic, fulvic and hydrophilic acids on the growth, photosynthesis and respiration of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller // *Harmful Algae*. 2005. V. 4(3). P. 603–618
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2004.08.010>
16. Klein O., Kulikova N., Konstantinov A., Zykova M., Perminova I. A systematic study of the antioxidant capacity of humic substances against peroxy radicals: relation to structure // *Polymers*. 2021. V. 13. P. 3262.
<https://doi.org/10.3390/polym13193262>
17. Knauer K., Buffle L. Adsorption of fulvic acid on algal surfaces and its effect on carbon uptake // *J. Phycology*. 2001. V. 37. P. 47–51.
<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.037001047.x>
18. Koukal B., Guéguen C., Pardos M., Dominik J. Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* // *Chemosphere*. 2003. V. 53(8). P. 953–961.
[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00720-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00720-3)
19. Kováčik J., Klejduš B., Babula P., Hedbavny J. Age affects not only metabolome but also metal toxicity in *Scenedesmus quadricauda* cultures // *J. Hazard. Mater.* 2016. V. 306. P. 58–66.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.11.056>
20. Lamelas C., Slaveykova V. Comparison of Cd(II), Cu(II), and Pb(II) biouptake by green algae in the presence of humic acid // *Environ Sci Technol.* 2007. V. 41. P. 4172–4178.
<https://doi.org/10.1021/es063102j>
21. Le V., Vo M., Le N., Nguyen N., Hoang N., Vo T., Dao T. Development of freshwater microalgae under exposure to atrazine and cadmium // *J. Science Technology Development*. 2019. V. 3(4). P. 299–306.
<https://doi.org/10.32508/stdjns.v3i4.609>
22. Lewis L., Flechtner V. Cryptic species of *Scenedesmus* (Chlorophyta) from desert soil communities of Western North America // *J. Phycology*. V. 40(6). P. 1127–1137.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03235.x>
23. Malcolm R., MacCarthy P. Limitations in the use of commercial humic acids in water and soil researches // *Environ. Sci. Technol.* 1986. V. 20. P. 904–911.
<https://doi.org/10.1021/es00151a009>
24. Marchello A., Oliveira N., Lombardi A., Polpo A. An investigation onto Cd toxicity to freshwater microalga *Chlorella sorokiniana* in mixotrophy and photoautotrophy: A Bayesian approach // *Chemosphere*. 2018. V. 211. P. 794–803.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.019>
25. Maurice P., Manecki M., Fein J., Schaefer J. Fractionation of an aquatic fulvic acid upon adsorption to the bacterium *Bacillus subtilis* // *Geomicrobiol. J.* 2004. V. 21. P. 69–78.
<https://doi.org/10.1080/01490450490266235>
26. McKnight D., Wershaw R. Complexation of copper by fulvic acid from the Suwannee River – Effect of counter-ion concentration // *Humic substances in the Suwannee River: Interaction, properties, and proposed structures*. U.S. Geological Survey Water-Supply Paper. 1994. P. 33–44.
27. Merzlyak M., Naqvi K. On recording the true absorption and scattering spectrum of a turbid sample: application to cell suspensions of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* // *J. Photochem. Photobiol.* 2000. V. 58. P. 123–129.
[https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(00\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(00)00114-7)
28. Nguyen V., Vo T., Tran Q., Vo T., Bui T., Trinh B., Dao T. Growth and metal removal efficiency of the green algae *Schroederia setigera* and *Selenastrum bibrainum* exposed to nickel, zinc and cadmium // *Vietnam J. Science and Technology*. 2020. V. 58(5A). P. 22–31.
<https://doi.org/10.15625/2525-2518/58/5A/15183>
29. Oliver B., Thurman E., Malcolm R. The contribution of humic substances to the acidity of colored natural waters // *Geochimica Cosmochimica Acta*. 1983. V. 47. P. 2031–2035.
[https://doi.org/10.1016/0016-7037\(83\)90218-1](https://doi.org/10.1016/0016-7037(83)90218-1)
30. Pempkowiak J., Kosakowska A. Accumulation of cadmium by green algae *Chlorella vulgaris* in the presence of

- marine humic substances // Environ. Int. 1998. V. 24. P. 583–588.
[https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(98\)00044-0](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(98)00044-0)
31. Piotrowska-Niczyporuk A., Bajguz A., Talarek M., Bralska M., Zambrzycka E. The effect of lead on the growth, content of primary metabolites, and antioxidant response of green alga *Acutodesmus obliquus* (Chlorophyceae) // Environmental Science and Pollution Research. 2015. V. 22(23). P. 19112–19123.
<https://doi.org/10.1007/s11356-015-5118-y>
 32. Pokora W., Bascik-Remisiewicz A., Tukaj S., Kalinowska K., Pawlik-Skowronska B., Dziadziszko M., Tukaj Z. Adaptation strategies of two closely related *Desmodesmus armatus* (green alga) strains contained different amounts of cadmium: a study with light-induced synchronized cultures of algae // J. Plant Physiol. 2014. V. 171(2). P. 69–77.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.10.006>
 33. Pouneva I. Effect of humic substances on the growth of microalgal cultures // Russian J. Plant Physiology. 2005. V. 52. P. 410–413.
<https://doi.org/10.1007/s11183-005-0060-3>
 34. Sarwa P., Verma S. Identification and characterization of green microalgae, *Scenedesmus* sp. MCC26 and *Acutodesmus obliquus* MCC33 isolated from industrial polluted site using morphological and molecular markers // Int. J. Appl. Sci. Biotechnol. 2017. V. 5(4). P. 415–422.
<https://doi.org/10.3126/ijasbt.v5i4.18083>
 35. Sedlacek J., Kallqvist T., Gjessing E. Effect of an aquatic humus on uptake and toxicity of cadmium to *Selenastrum capricornutum* Printz // Aquatic and Terrestrial Humic Materials. Ann. Arbor. Science Publishers MI. 1983. P. 495–516.
 36. Serra A., Guasch H., Admiraal W., Van der Geest H., Van Beusekom S. Influence of phosphorus on copper sensitivity of fluvial periphyton: the role of chemical, physiological and community-related factors // Ecotoxicology. 2010. V. 19. P. 770–780.
<https://doi.org/10.1007/s10646-009-0454-7>
 37. Shin H., Monsallier J., Choppin G. Spectroscopic and chemical characterizations of molecular size fractionated humic acid // Talanta. 1999. V. 50. P. 641–647.
[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00161-7](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00161-7)
 38. Shi W., Jin Z., Hu S., Fang X., Li F. Dissolved organic matter affects the bioaccumulation of copper and lead in *Chlorella pyrenoidosa*: a case of long-term exposure // Chemosphere. 2017. V. 174. P. 447–455.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.119>
 39. Shi Z., Xu H., Wang Z., Du H., Fu X. Effects of co-exposure to copper and humic acids on microalga *Chlorella vulgaris*: growth inhibition, oxidative stress, and extracellular secretion // Environ. Pollut. Bioavailability. 2021. V. 33(1). P. 415–424.
<https://doi.org/10.1080/26395940.2021.1995504>
 40. Shtina E. The principal directions of experimental investigations in soil algology with emphasis on the USSR // Geoderma. 1974. V. 12. P. 151–156.
[https://doi.org/10.1016/0016-7061\(74\)90047-0](https://doi.org/10.1016/0016-7061(74)90047-0)
 41. Steinberg C., Meinelt T., Timofeyev M., Bittner M., Menzel R. Humic substances (review series). part 2: interactions with organisms // Environ. Sci. Pollut. Resour. 2008. V. 15. P. 128–135.
<https://doi.org/10.1065/espr2007.07.434>
 42. Stolte W., Panosso R., Gisselson L., Granéli E. Utilization efficiency of nitrogen associated with riverine dissolved organic carbon (>1 kDa) by two toxin-producing phytoplankton species // Aquat. Microb. Ecol. 2002. V. 29. P. 97–105.
<https://doi.org/10.3354/ame029097>
 43. Sun B., Tanji Y., Unno H. Influences of iron and humic acid on the growth of the cyanobacterium *Anabaena circinalis* // Biochemical Engineering Journal. 2005. V. 24. P. 195–201.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.02.014>
 44. Sun B., Tanji Y., Unno H. Extinction of cells of cyanobacterium *Anabaena circinalis* in the presence of humic acid under light // Applied Microbiology and Biotechnology. 2006. V. 72(4). P. 823–828.
<https://doi.org/10.1007/s00253-006-0327-4>
 45. Suzuki D., Shoji R. Toxicological effects of chlorophenols to green algae observed at various pH and concentration of humic acid // J. Hazard. Mater. 2020. V. 400(5). P. 123079.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123079>
 46. Terlova E., Lewis L. A new species of *Tetradesmus* (Chlorophyceae, Chlorophyta) isolated from desert soil crust habitats in southwestern North America // Plant and Fungal Systematics. 2019. V. 64(1). P. 25–32.
<https://doi.org/10.2478/pfs-2019-0004>
 47. Tessier A., Turner D. (Eds.) Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems. Wiley and Sons Ltd., Chichester, England. 1995. V. 3. P. 696.
 48. Thurman E. Organic geochemistry of natural waters. Springer, Netherlands. 1985. 497 p.
 49. Tikhonov V., Drozdova O., Cheptsov V., Demin V. Sorption of dissolved organic matter by freshwater bacterioplankton // E3S Web of Conferences. 2021. V. 265(04003). P. 7.
<https://doi.org/10.1051/e3sconf/202126504003>
 50. Tulonen T., Salonen K., Arvola L. Effects of different molecular weight fractions of dissolved organic matter on the growth of bacteria, algae and protozoa from a highly humic lake // Hydrobiologia. 1992. V. 229. P. 239–252.
<https://doi.org/10.1007/BF00007003>
 51. Vigenault B., Campbell P. Uptake of cadmium by freshwater green algae: Effects of pH and aquatic humic substances // J. Phycol. 2005. V. 41. P. 55–61.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.04068.x>
 52. Vo M., Nguyen V., Vo T., Bui T., Dao T. Responses of green algae and diatom upon exposure to chromium and cadmium // Vietnam J. Sci. Technol. Eng. 2020. V. 62(1). P. 69–73.
[https://doi.org/10.31276/VJSTE.62\(1\).69-73](https://doi.org/10.31276/VJSTE.62(1).69-73)
 53. Watanabe C., Monteiro A., Gontijo E., Lira V., Bueno C., Kumar N., Fracácio R., Rosa A. Toxicity assessment of arsenic and cobalt in the presence of aquatic humic substances of different molecular sizes // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2017. V. 139. P. 1–8. ISSN 0147-6513.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.018>
 54. Yang S., Liu G., Meng Y., Wang P., Zhou S., Shang H. Utilization of xylose as a carbon source for mixotrophic

- growth of *Scenedesmus obliquus* // Bioresour. Technol. 2014. V. 172. P. 180–185.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.122>
55. Ytreberg E., Karlsson J., Ndungu K., Hassellöv M., Breitharth E., Eklund B. Influence of salinity and organic matter on the toxicity of Cu to a brackish water and marine clone of the red macroalga *Ceramium tenuicorne* // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2011. V. 74(4). P. 636–642.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.09.013>
56. Zheng X., Xu Z., Zhao D., Luo Y., Lai C., Huang B., Pan X. Double-dose responses of *Scenedesmus capricornus* microalgae exposed to humic acid // Science of The Total Environment. 2022. V. 806(1). P. 150547.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150547>

Effect Dissolved Organic Matter Fractions of Varying Molecular Weight and Cd²⁺ on *Scenedesmus Obliquus* Growth

V. V. Tikhonov^{1, *}, E. N. Voronova¹, M. M. Karpukhin¹, R. A. Aimaletdinov¹,
 V. V. Demin¹, and O. Yu. Drozdova¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: vvt1985@gmail.com

The effect of dissolved organic matter (DOM) fractions of various sizes and Cd²⁺ on the growth rate of *Scenedesmus obliquus* was studied. The studies were carried out both separately for DOM and Cd²⁺, and in their joint presence. DOM fractions (>30, 10–30, 3–10, 1–3 and <1 kDa) were obtained by ultrafiltration; algae growth was corresponded by the chlorophyll content, determined spectrophotometrically at 678 nm. It was found that cadmium at concentrations of 5.62–22.5 mg/L stimulated and at concentrations of 56.2 and 112.4 µg/L suppressed the growth of algae. DOM fractions had different effects on *S. obliquus*, both reduced and stimulated the growth of algae in the range of 0.001–1 mgC/L, and the effect on the growth rate was in the range of ±10–25%. The greatest positive response to the growth of microalgae was shown by the fraction <1 kDa, which is probably associated with the active participation of this fraction in its nutrition. In the presence of inhibitory concentrations of Cd²⁺, DOM fractions of 30, 1–3, and <1 kDa had a positive effect on the growth of *S. obliquus*. The probable mechanisms of such an effect of DOM were the binding of Cd²⁺ ions with it (mainly on the surface of algal cells), as well as the high biological activity of its low molecular weight fraction <1 kDa. For the first time, data were obtained on the effect of heavy metals on the growth of algae in the presence of fractions of DOM of different sizes. The data obtained expand our understanding of the mechanisms of regulation of the number and state of microalgae in ecosystems when exposed to heavy metals.

Keywords: fractions of dissolved organic matter, molecular weight, algae, heavy metals