

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ПОЧВЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ
ОПТИЧЕСКИМИ И ЗОНДОВЫМИ МЕТОДАМИ

МОУ Лицей №68, г. Уфа

Ермак Андрей Сергеевич 9А

Гильманова Айгуль Флюсовна 9А

Науч.рук.: Сафиуллин С.Ю. ассистент

кафедры ботаники БГПУ им. М. Акмуллы

Тьютор Галиев А.Ф. ассистент

кафедры прикладной физики и нанотехнологий БГПУ им. М. Акмуллы

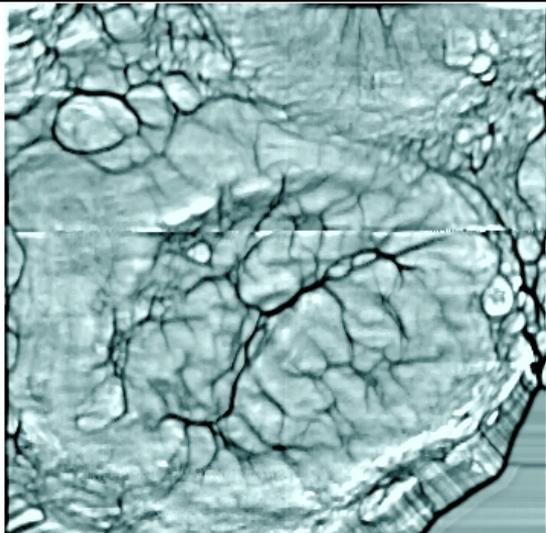
Водоросли – древнейшие про- и эукариотические фотосинтезирующие организмы, ведущие свободный и симбиотический образ жизни. Их можно обнаружить по всей земле, в самых разнообразных местообитаниях, они играют огромную роль в жизни природы и человека.

В настоящее время, активно ведутся исследования, связанные с возможностью использования водорослей для получения биотоплива, поглощения углекислого газа из атмосферы, лечения различных заболеваний и т.д. В России это направление развито недостаточно сильно, но достойно популяризации, поддержки и расширения.

Целью данной работы являлось исследование микроскопических водорослей, перспективных в области экологически безопасной энергетики, очистки окружающей среды и медицины. Для этого были решены следующие задачи: ознакомление с историей и перспективами развития альгологии; ознакомление с методами культивирования водорослей; ознакомление с современными методами исследования водорослей (в частности методами оптической и зондовой микроскопии).

Объектом исследования был *Bracteacoccus minor* var. *dezertorum* аутентичный штамм микроскопической почвенной водоросли, который выращивался в питательной среде Volda с тройным содержанием азота в течении тридцати дней. Для микроскопических исследований часть штаммов была помещена в водный раствор глутаральдегида (2%). Оба вида раствора были нанесены на стеклянные и кремниевые подложки. Далее, образцы выдерживали в течение одного часа при комнатной температуре, затем в течение тридцати минут при температуре 90 °С для окончательной сушки. Готовые образцы были исследованы с помощью оптических микроскопов МИИ-4М, МБС-10, Axio Imager 2 и зондового микроскопа СММ 2000-15Е.

[2.607 mkm x 2.607 mkm x 59.48 nm] (357 x 357 pt) |—————| 500.0 nm



В ходе данной работы исследованы особенности внешнего строения водорослей *Bracteacoccus minor* var. *Dezertorum*. Показана целесообразность использования методов АСМ для исследования микроскопических водорослей в различных средах. Апробирована методика закрепления микроскопических водорослей на стеклянных и кремниевых подложках с помощью раствора глутарового альдегида (2% раствор).

Введение

Водоросли – древнейшие про- и эукариотические фотосинтезирующие организмы, ведущие свободный и симбиотический образ жизни. Распространенные по всему земному шару, в самых разнообразных местообитаниях, они играют огромную роль в жизни природы и человека.

Эта группа организмов обладает большим разнообразием морфологии, анатомии, онтогенеза, географии и экологии. В связи с этим водоросли являются перспективными объектами для проведения разноплановых научных исследований в области физиологии, биохимии, биофизики, генетики, космической биологии и т.д. Их используют для повышения продуктивности водоемов и плодородия почв, получения биологически активных веществ и различных пищевых и кормовых добавок, в качестве индикаторных организмов при изучении текущего состояния почв и водоемов. В последнее время проводятся исследования, направленные на изучение возможности использования водорослей для получения биотоплива и поглощения углекислого газа из атмосферы.

К сожалению, в настоящее время в плане передовых научных разработок в области альгологии (науки о водорослях) мы отстаем от зарубежных исследователей. И это отставание связано не только с недостаточностью материальной базы, но и с нехваткой научно-методической литературы, отражающей современные тенденции развития альгологии. Особенно остро ощущается недостаток работ, обобщающих опыт ведущих зарубежных и отечественных исследователей в области культивирования водорослей.

Клетки водорослей (за исключением амёбоидного типа) покрыты клеточной стенкой и/или клеточной оболочкой. Стенка находится снаружи мембраны клетки, обычно содержит структурный компонент (например, целлюлозу) и аморфный матрикс (например, пектиновые или агаровые вещества); также в ней могут быть дополнительные слои (например, спорополлениновый слой у хлореллы). Клеточная оболочка представляет собой или внешний кремнийорганический панцирь (у диатомей и некоторых других охрофитовых), или уплотнённый верхний слой цитоплазмы (плазмалемму), в котором могут быть дополнительные структуры, например, пузырьки, пустые или с целлюлозными пластинками (своеобразный панцирь, тека, у динофлагеллятов). Если клеточная оболочка пластичная, клетка может быть способна к так называемому метаболическому движению — скольжению за счёт небольшого изменения формы тела.

Фотосинтезирующие (и «маскирующие» их) пигменты находятся в особых пластидах — хлоропластах. Хлоропласт имеет две (красные, зелёные, харовые водоросли), три (эвглены, динофлагелляты) или четыре (охрофитовые водоросли) мембраны. Также он имеет собственный сильно редуцированный генетический аппарат, что позволяет предположить его симбиогенез (происхождение от захваченной прокариотной или, у гетероконтных водорослей, эукариотной клетки). Внутренняя мембрана выпячи-

ваются внутрь, образуя складки — тилакоиды, собранные в стопки — граны : монотилакоидные у красных и сине-зелёных, двух- и больше у зелёных и харовых, трёхтилакоидные у остальных. На тилакоидах, собственно, и расположены пигменты. Хлоропласты у водорослей имеют различную форму (мелкие дисковидные, спиралевидные, чашевидные, звёздчатые и т. д.).

У многих в хлоропласте имеются плотные образования — пиреноиды.

Продукты фотосинтеза, в данный момент излишние, сохраняются в форме различных запасных веществ: крахмала, гликогена, других полисахаридов, липидов. Запасание липидов больше свойственно морским формам (особенно планктонным диатомовым, которые за счёт масла держатся на плаву со своим тяжёлым панцирем), а запасание полисахаридов (включая крахмал и гликоген) больше свойственно пресноводным

Водоросли — главные производители органических веществ в водной среде. Около 80 % всех органических веществ, ежегодно создающихся на земле, приходится на долю водорослей и других водных растений. Водоросли прямо или косвенно служат источником пищи для всех водных животных. Известны горные породы (диатомиты, горючие сланцы, часть известняков), возникшие в результате жизнедеятельности водорослей в прошлые геологические эпохи. Кстати, именно по диатомовым водорослям определяется возраст этих пород.

Некоторые, в основном морские, употребляются в пищу (морская капуста, порфира, ульва). В приморских районах водоросли идут на корм скоту и удобрение. В ряде стран водоросли культивируют для получения большого количества биомассы, идущей на корм скоту и используемой в пищевой промышленности.

Съедобные водоросли — богаты минеральными веществами, особенно йодом, продукт — используется в восточноазиатских кухнях. Одно из самых популярных блюд с водорослями — суши.

Многие водоросли — важный компонент процесса биологической очистки сточных вод.

Бурное развитие нитчатых и планктонных водорослей (цветение воды) может создавать проблемы в работе очистных сооружений систем водоснабжения.

В морской аквариумистике водоросли используют в системах биологической фильтрации. Применяются водорослевые танки («водорослевики») и скрубберы. Выращиваются либо специально посаженные макроводоросли (обычно из родов Хетоморфа и Каулерпа), либо используется естественное водорослевое обрастание. Интенсивное освещение обеспечивает быстрый рост водорослей и активное поглощение ими загрязнителей. Периодически масса разросшихся водорослей удаляется из фильтра

Из водорослей получают: студне- и слизиобразующие вещества — агар-агар (анфельция, гелидиум), агароиды (филлофора, грацилярия), карраген (хондрус, гигартина, фурцелярия), альгинаты (ламинариевые и фукусовые), кормовую муку, содержащую микроэлементы и иод.

Водоросли участвуют в образовании некоторых типов лечебных грязей.

Из-за высокой скорости размножения водоросли применяются для получения биомассы на топливо [1, 2].

Актуальность: В настоящее время активно ведутся исследования, связанные с возможностью использования водорослей для получения биотоплива, поглощения углекислого газа из атмосферы, лечения различных заболеваний и т.д. В России это направление развито недостаточно сильно, но достойно популяризации, поддержки и расширения.

Цель работы: Исследование микроскопических водорослей оптическими и зондовыми методами в различных средах.

Объекты и методы исследования

Материалы и методы: *Bracteacoccus minor var. dezertorum* - аутентичный штамм микроскопической почвенной водоросли. Клетки обычно шаровидные, 4.5-30 мкм в диаметре. Оболочка тонкая, гладкая, иногда с пузыревидными выростами, с возрастом заметно не утолщается. Хлоропласты от 2 до многих, дисковидные, утолщенные в средней части, или полигональные, пристенные и частично внутренние. Запасные продукты – крахмал, иногда в виде скоплений, имитирующих переноид, и масло, с возрастом культуры обычно окрашиваются в оранжево – красный цвет. Зрелые клетки многоядерные.

Зооспоры и апланоспоры образуются путем прогрессивного деления, из оболочки материнской клетки выходят или в слизистом пузыре. Зооспоры метаболические, сразу после освобождения обычно вытянутые, с более выпуклой спинной и почти плоской брюшной сторонами, около 9 мкм дл., 2 мкм шир., иногда почти серповидные или шаровидные, около 4 мкм в диаметре, с 1, возможно 2 сократительными вакуолями, с крошечной красной стигмой, расположенной в задней части хлоропласта (и клетки), с 2 – 3, реже 4 хлоропластами, часто различной величины. Апланоспоры иногда в скоплениях. Повсеместно в почве. По данным R. Starr (1955), изучавшего в культуре типовой штамм вида, клетки водоросли на неорганической среде редко превышают 20 мкм в диаметре, но га средах с органикой могут вырастать до 85 мкм, при старении культуры они окрашиваются в оранжево-красный цвет.

Вид *Bracteacoccus minor var. dezertorum* выращивался в питательной среде Bolda 3N BBN, в течение тридцати дней. Образцы для исследований были изготовлены следующим образом: на чистое покровное стекло наносилось 100 мкл раствора. Кроме того, концентрированный штамм водорослей был помещен в 2% раствор глутарового альдегида. Готовый раствор также наносился на покровное стекло. Образцы выдерживали в течение одного часа при комнатной температуре на воздухе, затем в течение тридцати минут в сушильном шкафу, в течение тридцати минут при температуре 96°C. Выбор глутарового альдегида связан с двумя особенностями. Во-первых слабоконцентрированный раствор глутарала используется в электронной микроскопии для закрепления мелко-

дисперсных (порошковых) образцов. Поэтому интерес представляет определение применимости данного метода для закрепления водорослей. Во-вторых, эта среда является агрессивной по отношению к биологическим объектам. По различиям в изображениях водорослей в двух средах можно судить о процессе разрушения их морфологических параметров.

Готовые образцы исследовались с помощью оптических микроскопов: ЛОМО МИИ-4М (увеличение 200 крат), МБС-10 (увеличение 50 крат), Axio Imager II (увеличение 1000 крат). Также морфологические характеристики водорослей были исследованы с помощью зондового микроскопа СММ 2000-15Е в режиме контактной атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Эксперимент

На рис. 1. представлена фотография высохшей капли раствора водорослей в глутаровом альдегиде, полученная с помощью оптического микроскопа. Во всех каплях наблюдалась самоорганизация в виде спирали. В каплях раствора в питательной среде, такой самоорганизации не наблюдалось. Однако в высушенных каплях заметна пленка питательной среды (рис. 2.).



Рис.1. Водоросли на стеклянной подложке (глутараль 2%, увеличение $\times 50$)

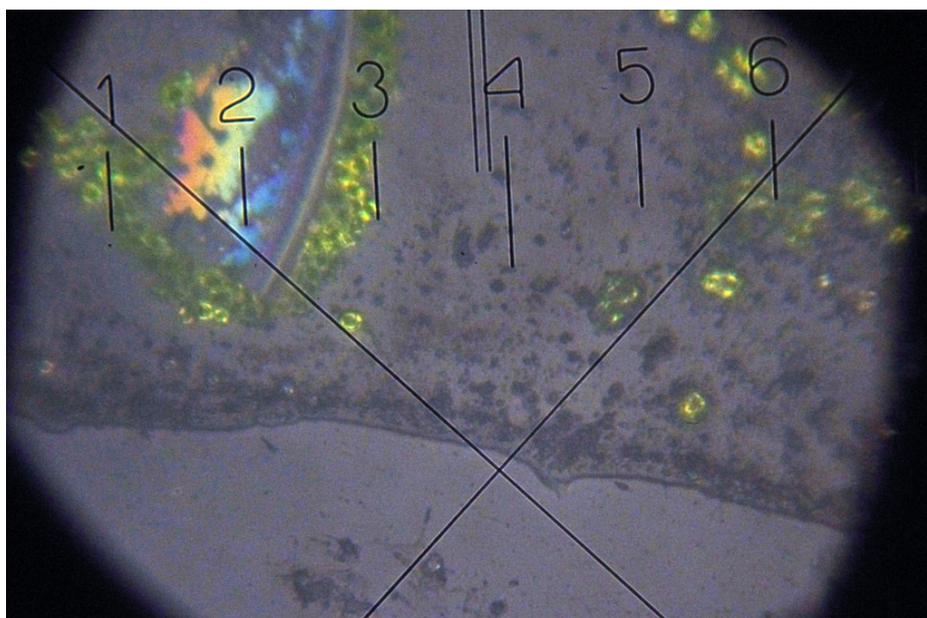


Рис. 2. Водоросли на стеклянной подложке (пит. среда, увеличение×200)

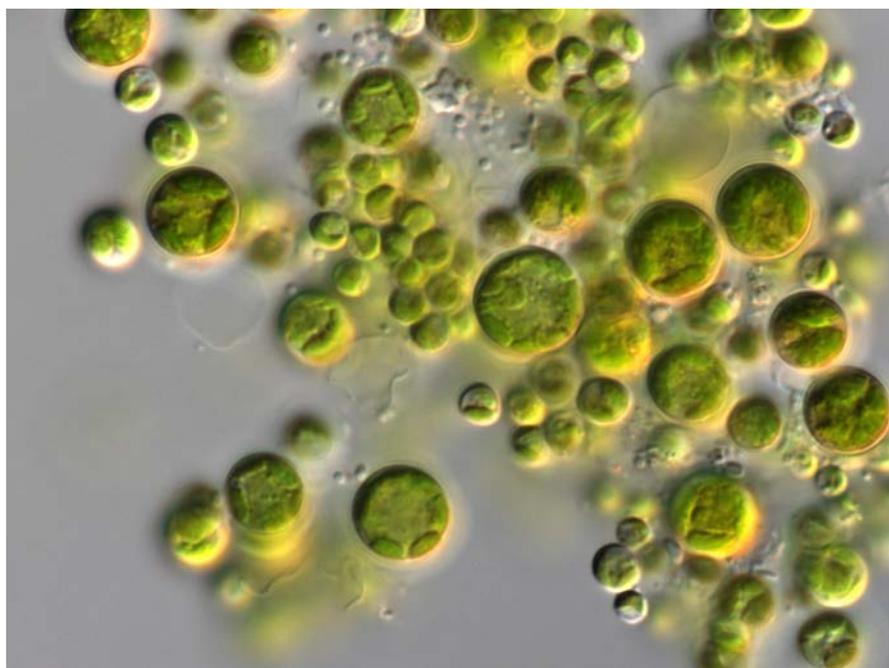


Рис. 3. Изображение водорослей в питательной среде (увеличение 1000)

На рис. 3. представлено изображение водорослей в питательной среде, полученное с помощью оптического микроскопа при увеличении 1000 раз. Из рисунка можно увидеть распределение водорослей по размерам.

На рис. 4. представлено изображение водорослей, закрепленных с помощью глутарового альдегида. Далее, образцы были исследованы методом АСМ. В таблице 1. представлены результаты вычислений размеров водорослей и окружающих их частиц.

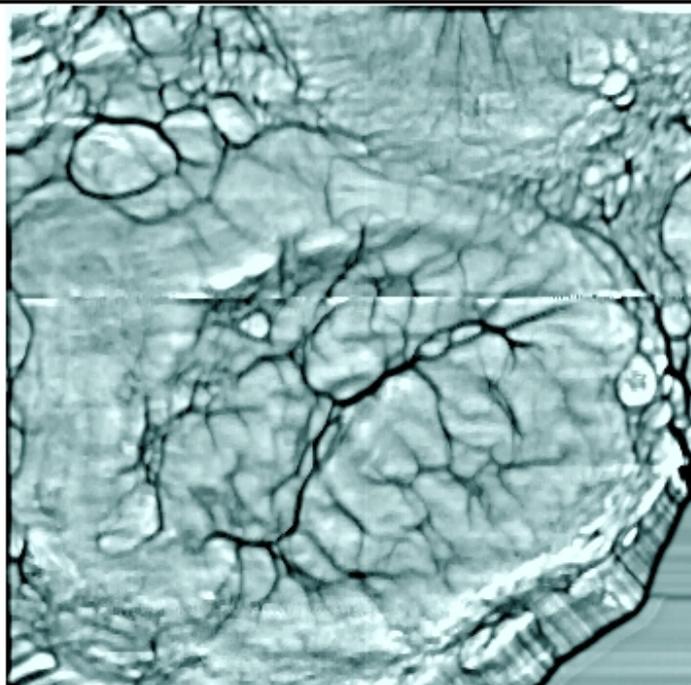


Рис. 4. Водоросли в глутаровом альдегиде

Таблица 1. Размеры водорослей и частиц среды

| без глутарала, mkm | с глутаралем, mkm | Частицы среды, глутараль, nm | Частицы среды, без глутарала, nm | Толщина трещины (рис. 4) nm |
|-----------------------|----------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| 2,93 | 2,92 | 236 | 639 | 20 |

Вывод

- Исследованы морфологические особенности водорослей *Bracteacoccus minor var. Dezertorum*.
- Продемонстрирована возможность использования методов АСМ для исследования микроскопических водорослей в различных средах.
- Апробирована методика закрепления микроскопических водорослей с помощью раствора глутарового альдегида (2% раствор)
- В настоящее время ведется исследование влияния среды на состояние морфологии поверхности водорослей.

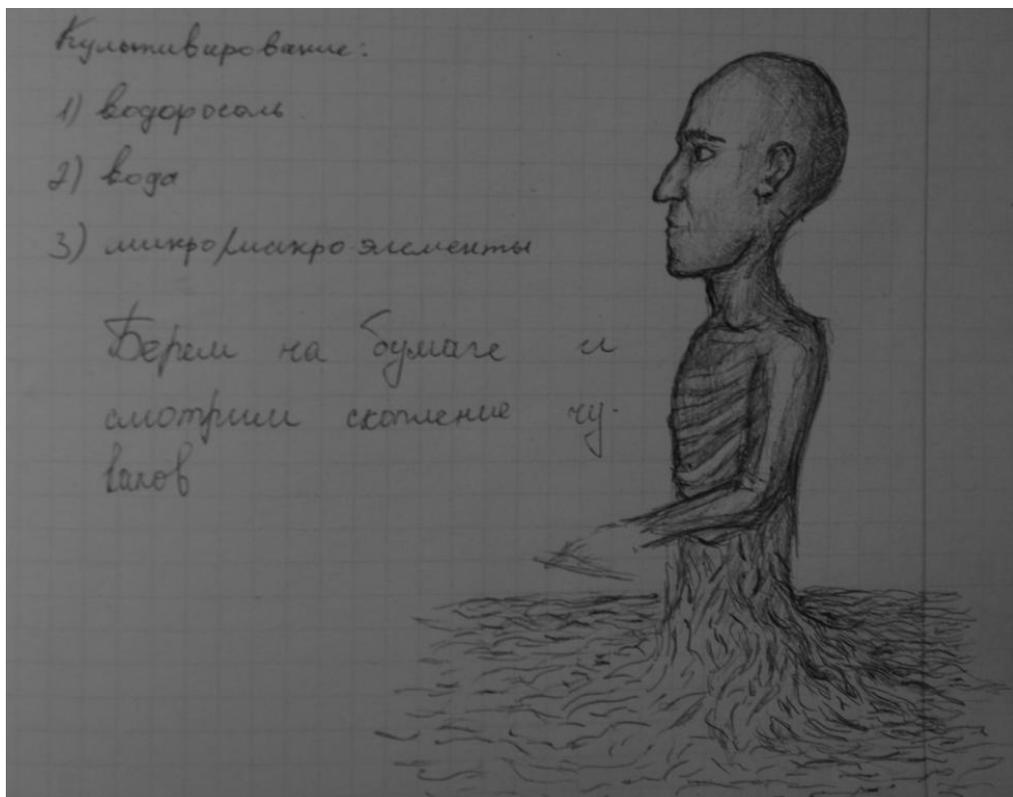
Использованная литература

1. В. М. Андреева, 1998, Санкт-Петербург «Наука»

Приложения



Набор сухих образцов водорослей



В перерывах...