

УДК 631.872+631.427.4

Оценка изменения параметров системы «питательная среда – зеленая водоросль – гуминовая кислота» во времени*Торопкина М.А.¹, Рюмин А.Г.², Чуков С.Н.², Лянгузов А.Ю.²**¹Зоологический институт Российской академии наук**²Санкт-Петербургский государственный университет***Аннотация**

*Поставлен опыт по изучению поведения препарата гуминовой кислоты, выделенного из серой пахотной почвы, в растворе. Цель работы – оценить изменения окружающей среды в присутствии раствора гуминовой кислоты. В работе ведется учет содержания растворенного кислорода в инкубационных сосудах, получены данные об оптической плотности и спектрах флуоресценции изучаемых суспензий, оцениваются параметры состояния культуры водоросли *Chlorella vulgaris*, такие как размеры и количество клеток. Отмечено, что в присутствии раствора гуминовой кислоты изменяется характер роста культуры водоросли. Обнаружено значительное падение содержания растворенного кислорода в опыте с раствором гуминовой кислоты на 5 сутки, наиболее ярко проявляющееся на свету, что приводит к улучшению условий для зеленой водоросли.*

Ключевые слова: АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ, *CHLORELLA VULGARIS*

Введение

Гуминовые вещества (ГВ) – природные полимеры сложного стохастического строения, которое связано с их особенностями образования [1, 2]. Сложность строения обуславливает достаточно широкий спектр выполняемых ими функций в природе. Одним из важнейших свойств ГВ является их биологическая активность. Множество

исследований подтверждают не только прямое влияние ГВ на живые объекты, но и косвенное, путем улучшения состояния окружающей среды [3-5].

ГВ способны проявлять антиоксидантную активность в различных средах (почва, вода), а также в отношении живых организмов, находящихся в них [6-9].

Важнейшим компонентом ГВ являются гуминовые кислоты (ГК) – высокомолекулярные оксикарбоновые кислоты, в основании которых лежат конденсированные системы с ациклическими и ароматическими кольцами, в присутствии разветвленных боковых цепей и гидрофильных функциональных групп [10].

Существование многих живых организмов связано с поглощением и выделением молекулярного кислорода. Он участвует во множестве физиологических процессов, и в принципе является необходимым компонентом для роста и развития большинства живых организмов. Но высокая концентрация кислорода также оказывает негативное действие на живые организмы, связанное с разрушениями различных клеточных компонентов [11, 12]. Этот эффект называется «окислительным стрессом».

В живом организме постоянно протекают различные окислительно-восстановительные реакции. В ходе реакций неполного (одно-, двух и трехэлектронного) восстановления кислорода образуются активные формы кислорода (АФК). На образование этих форм расходуется около 4 % всего поглощаемого кислорода клеткой, но при действии определенных физических факторов, например при облучении ультрафиолетом, образование АФК способно увеличиваться [13]. Существуют и другие экзогенные причины образования большого количества радикалов, такие как ионизирующее излучение, избыточное количество переходных металлов, побочные эффекты лекарственных препаратов и токсических химических веществ, избыток кислорода [14].

В настоящее время исследования, посвященные поиску веществ, способных снижать влияние избыточного кислорода, довольно распространены. Соединения, которые связывают неспаренные электроны, называют антиоксидантами (АО). Это может происходить в форме образования неактивных радикалов или формирования электронной пары.

Вещества, обладающие антиоксидантной активностью (АОА), делятся на несколько категорий [15]: доноры протонов; полиены; катализаторы; ловушки радикалов;

комлексообразователи. Можно утверждать, что ГВ, обладающие исключительно сложным и нерегулярным строением, подпадают под все эти категории.

В первую группу АО относят вещества, где донором протона являются вещества с легкоподвижным атомом водорода, который нейтрализует свободный радикал. Таким атомом может выступать водород карбоксильных и гидроксильных групп ГВ.

Полиены – это вторая группа антиоксидантных веществ, которые содержат в своей структуре несколько кратных связей. Активные формы кислорода могут атаковать ГВ по двойным и тройным связям в алифатических цепочках периферических частей молекул.

Катализаторы – вещества, которые повышают активность АО систем самих клеток. Не вступая в реакцию, такие соединения способствуют утилизации (элиминации) витамина С и глутатиона для связывания свободных радикалов. Вопрос о возможности проникновения ГВ или их фрагментов в клетку является дискуссионным, но ряд исследователей экспериментально подтверждают, что такое возможно [16]. При этом активность ГВ в отношении природных объектов общепризнана и, возможно, напрямую не изменяясь в процессе химических реакций, ГВ могут стимулировать АОА.

Четвертая группа – ловушки радикалов – работают непосредственно в митохондриях [17], где тяжело представить участие ГВ.

Комлексообразователи связывают катионы металлов, которые могут инициировать образование активных форм кислорода и изменения молекул [18]. Например, в присутствии избытка железа токсичность H_2O_2 может увеличиваться от 10 до 1000 раз [19]. Безусловно, ГВ могут образовывать комплексы с различными катионами [14, 20], снижая их токсичность.

Методов для определения антиоксидантной активности существует большое количество [21]. Это электрохимические методы (вольтамперометрия), флуориметрические, биологические и другие.

Из-за сложности и уникальности строения ГК, они обладают различными физико-химическими свойствами, или типами взаимодействия в разных формах: ионного обмена, комплексообразования (координационная), окислительно-восстановительных и донорно-акцепторных (это ковалентная связь (координационная)) реакций и гидрофобных взаимодействий. Именно донорно-акцепторные и окислительно-восстановительные реакции и отвечают за АОА гуминовых кислот в природе. Многие реакции, в которых

участвуют ГК, проходят по свободно-радикальному типу с участием неспаренных электронов [22], наличие которых в молекулах ГК не подлежит сомнению [23]. Количество неспаренных электронов можно оценить методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

ГК выступает в роли «ловушек» для короткоживущих свободных радикалов, что подтверждает метод электронно-парамагнитной спектроскопии (ЭПР) [7]. Многими исследованиями было показано, что ГК обладают АОА в отношении супероксид-анион-радикала – ключевой активной формой кислорода, взаимодействующей с клеточными белками [11, 24]. Ловушками свободных радикалов в молекулах ГК являются радикалы семихинонного типа, которые активируют процессы восстановления кислорода, что и обуславливает АОА ГК [25].

Для оценки АО невозможно выбрать единый метод, который будет удобен для всех типов исследований. В жидкой среде АОА может быть оценена по изменению содержания растворенного кислорода. Эта информация указывает на участие кислорода в окислении компонентов окружающей среды (в т.ч. и ГК), потреблении живыми организмами при дыхании, либо выделении при фотосинтетической активности.

Содержание растворенного кислорода используют для оценки первичной продукции водоёмов [26]. При этом часть кислорода используется на дыхание живых организмов, а часть на окисление органических и минеральных веществ. Высокие концентрации кислорода могут угнетать живые организмы, в т.ч. фотосинтезирующие, вызывая окислительный стресс [27]. Низкое содержание кислорода диагностируется как анаэробные условия, что, чаще всего, рассматривается как негативное состояние.

Гуминовые вещества способны изменяться в природной среде, в т.ч. проявляя свои антиоксидантные свойства. Наиболее доступными для оценки изменения гуминовых веществ в растворе являются оптические (спектральные) методы. К ним относится измерение оптической плотности растворов (снятие спектров поглощения) и получение спектров флуоресценции, а также спектров возбуждения флуоресценции. Гуминовые кислоты способны флуоресцировать в ответ на облучение ультрафиолетом (УФ) и светом в видимой области спектра [28-30]. В природных водах, где в растворе с гуминовыми кислотами могут находиться живые организмы и различные органические компоненты не гуминовой природы, эти компоненты могут также флуоресцировать. Наибольший же

вклад в сигнал флуоресценции даёт хлорофилл, часто перекрывая свечение от других природных флуорофоров природного и антропогенного происхождения [24].

Объекты и методы

Исследования проводили, используя препарат ГК из верхней пятисантиметровой толщи серой пахотной почвы, извлечённый щелочным методом в модификации С.Н. Чукова [23]. Ранее было показано, что именно этот препарат обладает наиболее выраженной физиологической активностью в опытах, по его влиянию на культуру водоросли *Chlorella vulgaris*, среди других, выделенных нами и исследованных препаратов [31]. Во всех вариантах опыта, где присутствовала ГК, её концентрация в растворе составляла 0,003 % (по массе).

Физико-химические характеристики препаратов ГК. Представление об элементном составе препарата ГК получено посредством элементного CHN-анализатора LECO CHN628. По этому показателю содержание элементов составило: С – 52,8%, Н – 4,3%, N – 4,3%.

Количество структурных фрагментов ГК, таких как ароматические и алифатические, и некоторые функциональные группы, определено с использованием спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) на ядрах ^{13}C . Препарат демонстрирует высокое содержание ароматических фрагментов (отношение ароматических структурных фрагментов к алифатическим составило 0,61). Отношение гидрофильных фрагментов ГК к гидрофобным составляет 1,44. По этим показателям изученный препарат ГК близок к препаратам ГК чернозема целинного [31].

Одним из важнейших методов в изучении АОА является метод электронного парамагнитного резонанса. Концентрация свободных радикалов (КСР) была нами определена при помощи ЭПР спектрометра RadioPAN SE/X-2547 с диапазоном частот 8,8–9,5 ГГц, в качестве образца сравнения был использован препаратДФПГ. Именно по КСР в ряду других ранее исследованных нами препаратов ГК серой пахотной почвы показывает наиболее высокое значение $-6,31 \cdot 10^{18}$ спин/г. По данным ЭПР-спектроскопии исследуемый препарат ГК даёт практически симметричную синглетную линию с g-

фактором спектроскопического расщепления, как у свободных радикалов семихинонного типа (рис. 1).

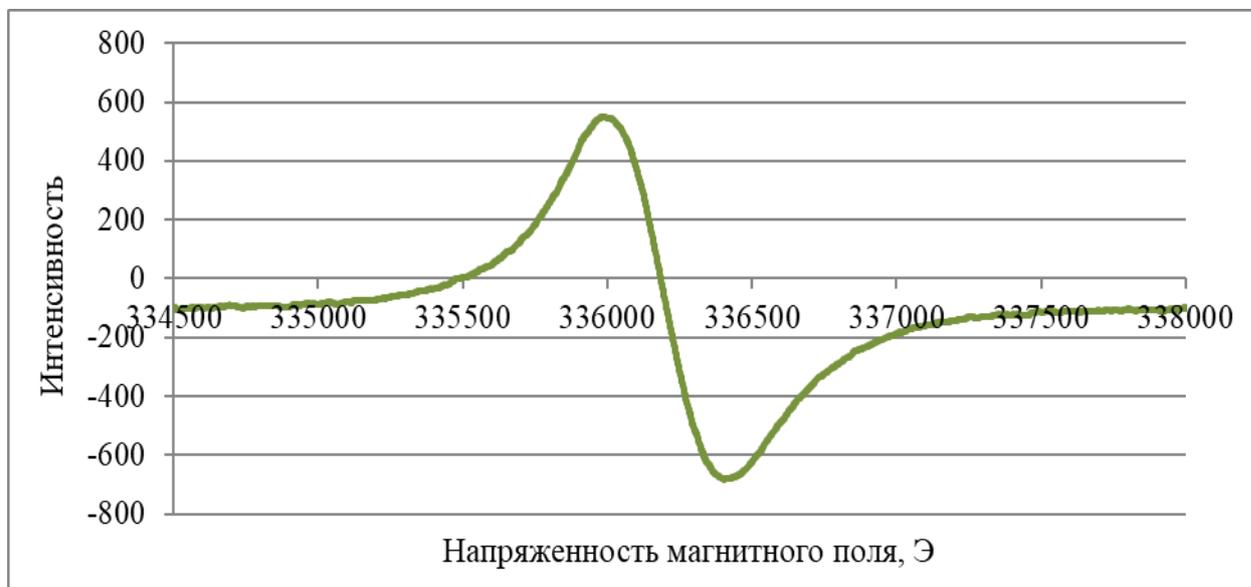


Рис. 1. Спектр ЭПР препарата ГК серой пахотной почвы.

Изучение системы раствор препарата ГК – *Chlorella vulgaris*.

Данная работа является продолжением исследований влияния ГК на культуру водоросли, которую выращивали на питательной среде [31]. В настоящей работе все опыты были поставлены с использованием питательной среды Тамия, приготовленной по прописи согласно ПНД Ф 14.1:2:3:4.10-04.

Схема эксперимента включала в себя оценку поведения суспензии водоросль-ГК на свету и в темноте, а также ряд контрольных проб (гуминовая кислота и питательная среда без водоросли). Все варианты опыта выдерживали в темноте и на свету. Для решения поставленных задач проводили оценку ряда параметров суспензий, таких как содержание растворенного кислорода, оптической плотности, количества клеток и их размеров, интенсивность флуоресценции. Измерения проводились в момент постановки опыта, на 1 и 5 сутки. Схематичное представление постановки опыта представлено на рис. 2.

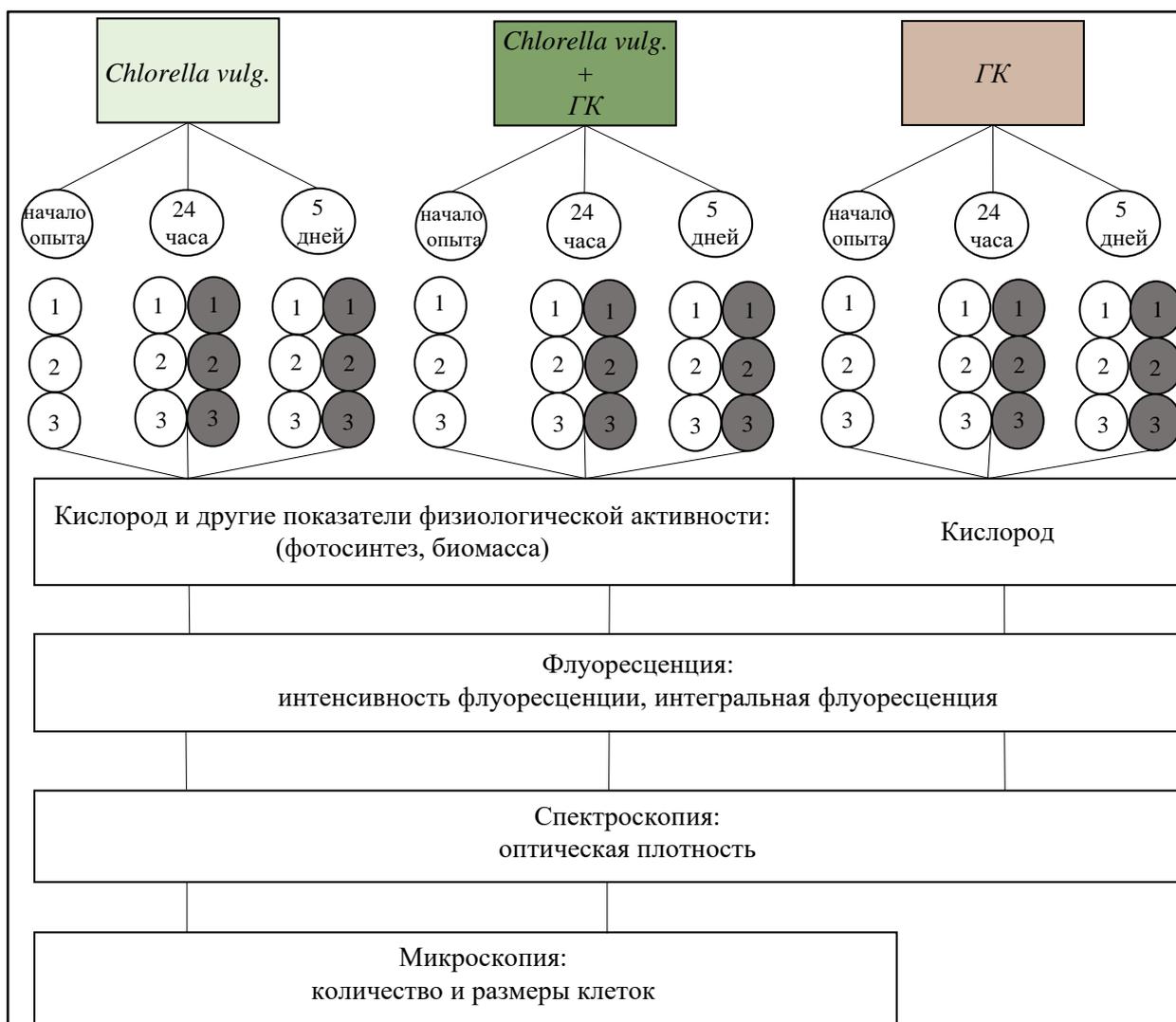


Рис. 2. Схема опыта.

Для изучения влияния препаратов ГК были использованы показатели метаболизма *Chlorella vulgaris*, такие как величина первичной продукции, дыхания и прирост биомассы (рис. 3). Также был использован метод прямого счета количества клеток водоросли и их размеров, который позволяет напрямую охарактеризовать изменения, происходящие с культурой водоросли.

В опыте по изучению физиологической активности препаратов гуминовых кислот был использован метод Винберга в кислородной модификации – по разности содержания кислорода в склянках с культурой *Chlorella vulgaris* после их инкубирования на свету и в темноте в течение 24 и 120 ч. Содержание кислорода определяли при помощи анализатора растворенного кислорода МАРК-302Э.

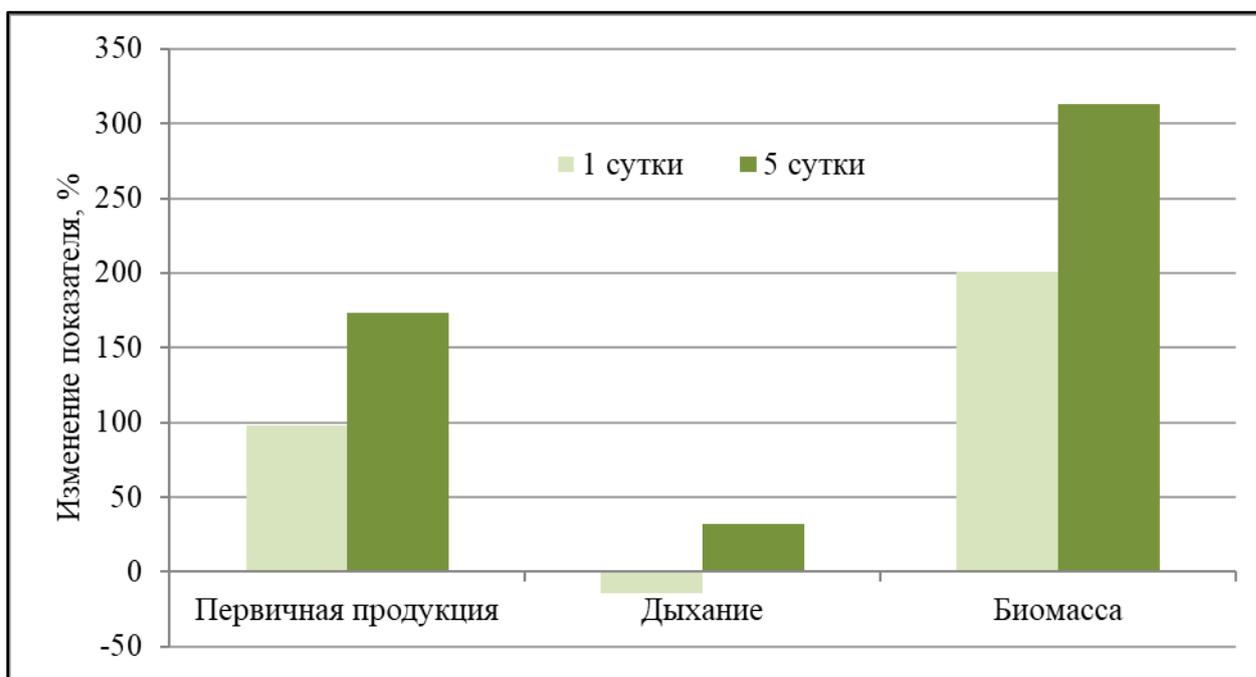


Рис. 3. Изменение показателей метаболизма водоросли на 1 и 5 сутки в присутствии ГК по сравнению с моментом постановки опыта (исходные значения приняты за 100 %)

Для подсчета количества клеток использовали камеру Горяева; изображение получали с помощью цифрового окуляра-приставки Levenhuk C510 к оптическому микроскопу.

Количество клеток в 1 мл исследуемой суспензии вычисляли по формуле:

$$M = a \times 10^3 / Sh,$$

где M – число клеток в 1 мл; a – среднее число клеток в квадрате сетки; S – площадь квадрата сетки, мм^2 ; h – глубина камеры, мм.

Информацию о размерах клеток получали с тех же фотографий, которые использовались для подсчета их количества. Программа, написанная на языке Python, выделяла имеющиеся клетки на фотографии и формировала данные о размерах клеток.

Дополнительным параметром изменения состояния растворов и суспензий был показатель оптической плотности, полученный при помощи спектрофотометра UNICO 1201. Изначально мы использовали спектрофотометр для стандартизации постановки опыта – приведения суспензии культуры водоросли к оптической плотности порядка 0,1 для длины волны 680 нм. Нами отмечено, что эта характеристика изменяется со временем не только для суспензии хлореллы, но и для раствора гуминовой кислоты.

Интенсивность флуоресценции измеряли при помощи спектрофлуориметра PerkinElmer LS 55. Возбуждение флуоресценции проводили на двух длинах волн – 270 и 420 нм. Спектры флуоресценции снимали в диапазоне длин волн 280–800 и 440–800 нм, соответственно. Разницу для вариантов опыта оценивали по площади под кривой флуоресценции. Эксперименты по изучению интенсивности флуоресценции проводили для растворов и суспензий всех вариантов опыта. Пример спектров для различных вариантов опыта приведен на рис. 4.

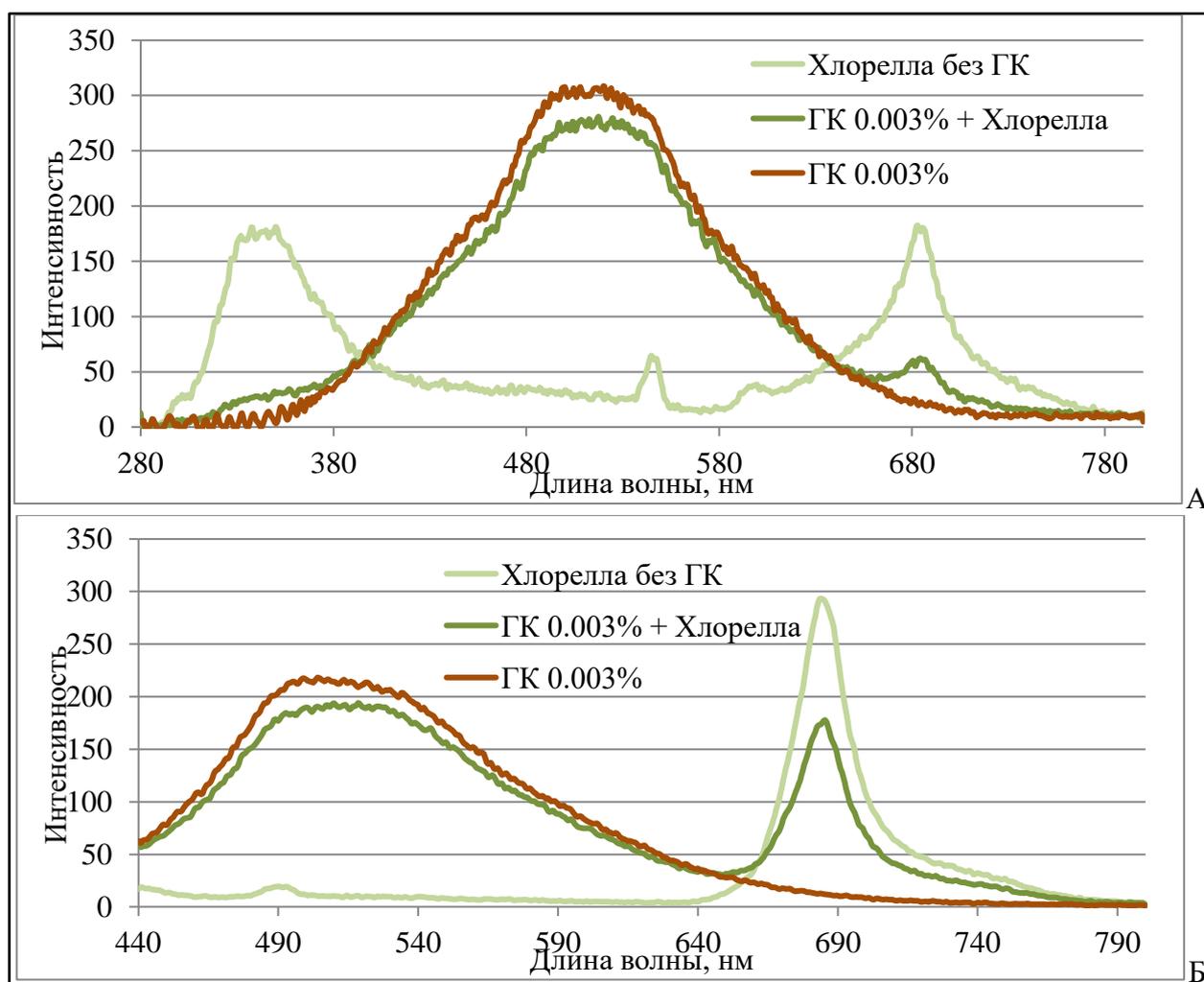


Рис. 4. Спектры флуоресценции для различных вариантов опыта для длины волны возбуждения 270 нм (А) и 420 нм (Б).

Результаты и обсуждение

Влияние препарата ГК на культуру водоросли видно по изменению содержания кислорода и интенсивности флуоресценции на разных длинах волн возбуждения. Также

отмечается изменение оптической плотности суспензии клеток, диаметра клеток и их количества по отношению к контрольному опыту, где гуминовая кислота не вносилась. Результаты прироста биомассы, представленные на рис. 3, подтверждают ранее полученные нами данные о физиологической стимуляции роста и развития *Chlorella vulgaris* препаратами ГК [31].

В опытах было показано, что содержание растворенного кислорода снижается в присутствии гуминовой кислоты. Наиболее ярко это проявляется на 5 сутки в световом варианте опыта (рис. 5).

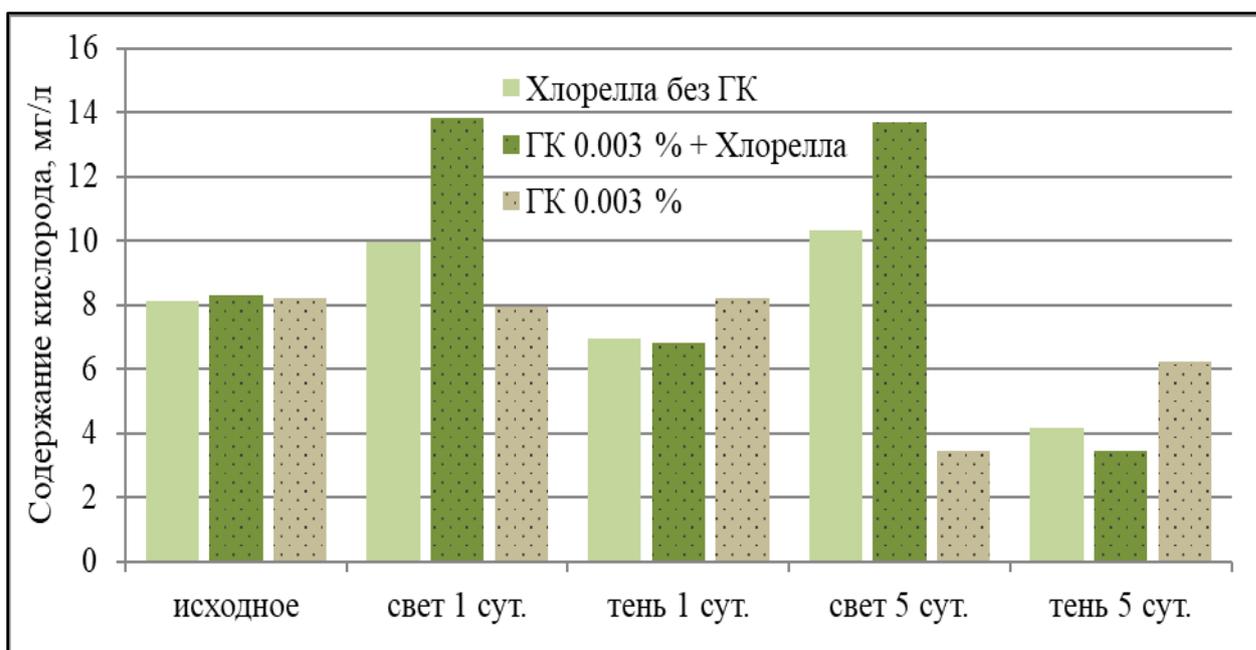


Рис 5. Содержание кислорода (мг/л) в разных вариантах и на разных стадиях опыта.

По результатам измерения оптической плотности (рис. 6) только суспензии водоросли отмечено увеличение этого показателя на свету, что, скорее всего, связано с увеличением содержания хлорофилла, правда, изменения достаточно незначительные. Максимальные изменения мы наблюдаем на свету для культуры водоросли в присутствии ГК, что подтверждает влияние препарата на физиологические процессы и стимуляцию роста живого организма. В то же время отмечено, что оптическая плотность чистого препарата ГК, хоть и не значительно, сама по себе повышается со временем, при этом в тени и на свету различий не наблюдается. Изменения «смеси» в основном связано с

изменением культуры водоросли, в то время как изменения плотности чистого препарата ГК на этом фоне незначительно.

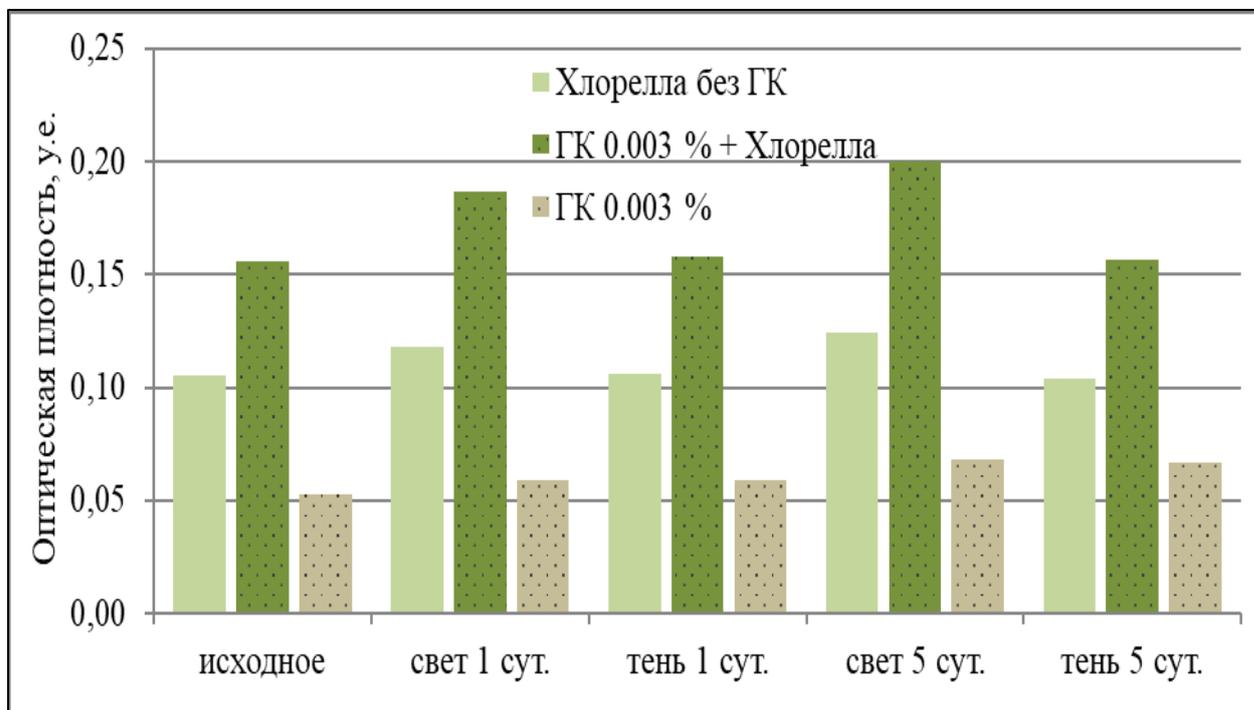


Рис 6. Оптическая плотность в разных вариантах и на разных стадиях опыта.

По спектрам флуоресценции мы не видим существенных изменений сигнала для растворов только препарата ГК во всех вариантах опыта. Максимальные различия наблюдаем для чистой культуры водоросли. Для сравнения флуоресценции разных вариантов опыта нами была вычислена площадь под полученными графиками (рис. 4), которую мы называем «интегральной флуоресценцией». На свету культура водоросли демонстрирует увеличение интегральной флуоресценции, зависящее от длительности опыта (рис. 7). В темноте также заметно увеличение интегральной флуоресценции, что говорит о жизнеспособности и росте водоросли, которое лимитируется отсутствием света. В целом, для длины возбуждения 420 нм указанные зависимости заметны хуже (рис. 7Б). Интересно, что для длины волны возбуждения 270 нм сигнал от раствора гуминовой кислоты всегда больше, чем от суспензии хлореллы с ГК, т.е. сигнал от смеси компонентов не является суммой сигналов отдельных частей (рис. 7А). С этой точки зрения использование длины волны возбуждения 270 нм более предпочтительно, т.к. сигнал от смеси компонентов превышает сигналы каждого из компонентов.

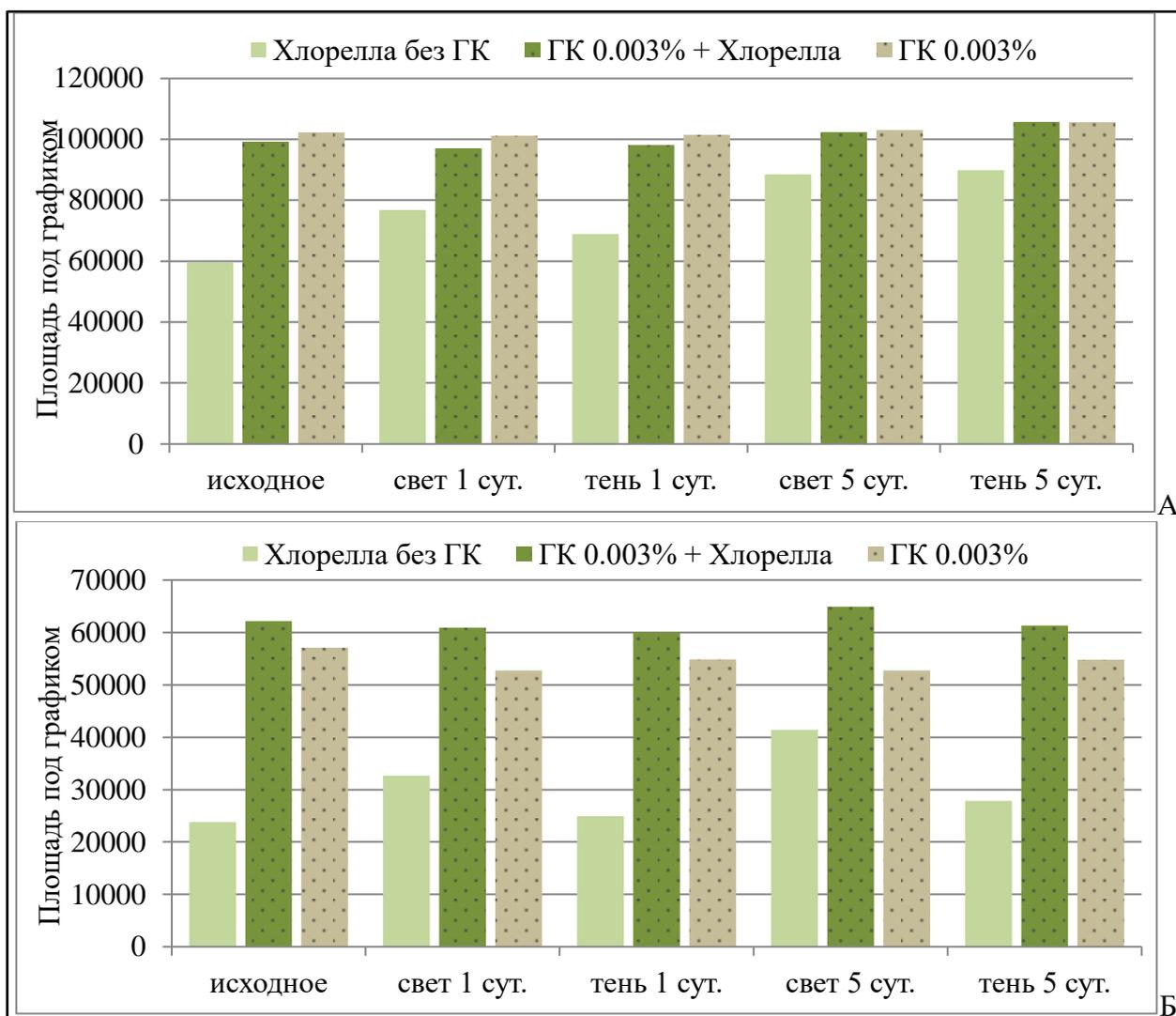


Рис. 7. Интегральная флуоресценция для различных вариантов опыта для длины волны возбуждения 270 нм (А) и 420 нм (Б)

На основе полученных данных можно предположить, что ГК может влиять на водоросль также и посредством изменения окружающей среды (в первую очередь через содержание кислорода). Это подтверждается тем, что наблюдается изменение количества клеток водоросли и их размеров (рис. 8 и 9), отмечается увеличение кислорода на свету, но при этом нет явных изменений, происходящих на фотосинтетическом аппарате, которые можно оценить за счет изменения интенсивности флуоресценции/интегральной флуоресценции (ИФ).

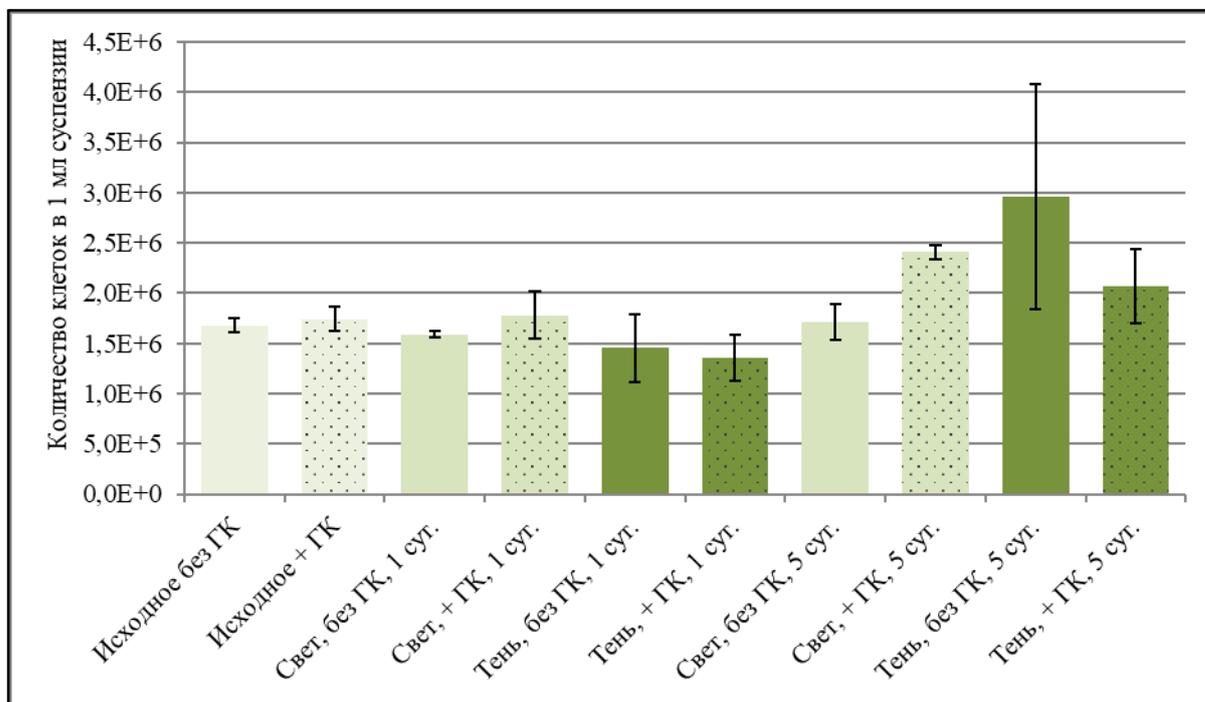


Рис. 8. Количество клеток водоросли в разных вариантах и на разных стадиях опыта

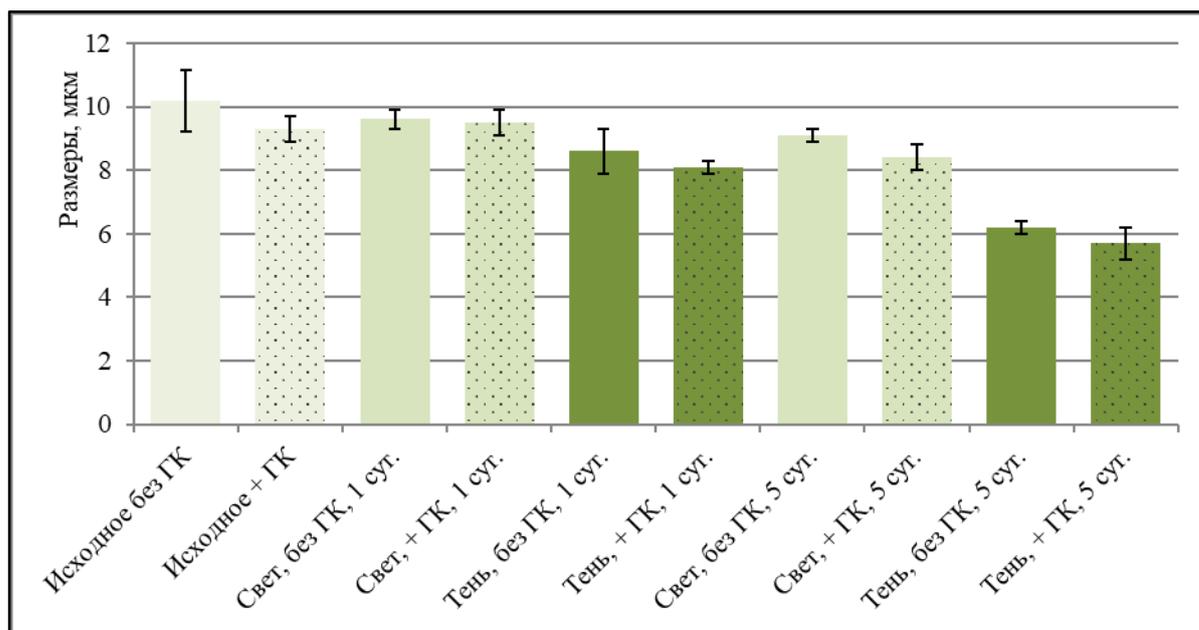


Рис. 9. Размеры клеток водоросли в разных вариантах и на разных стадиях опыта

Высокое содержание кислорода в среде может негативно влиять на культуру водоросли. Это косвенно подтверждается увеличением интенсивности флуоресценции, которая зависит не только от общего содержания пигментов в водоросли, но и стресса живого организма. Так мы наблюдаем максимальные уровни кислорода на 5 сутки на

свету, в этих же вариантах опыта флуоресценция достигает максимальных значений. В присутствии ГК вообще не отмечено существенных изменений интенсивности интегральной флуоресценции. Нами отмечено, что присутствие ГК приводит к связыванию «избыточного» кислорода, что стабилизирует условия роста водоросли, в свою очередь, отражающееся на результатах флуоресценции. Нельзя не отметить, что ГК окрашивают среду в темные тона (поглощают возбуждающее излучение и гасят сигнал флуоресценции), обладают собственными спектрами флуоресценции (т.е. флуоресценция, вызванная хлореллой, может привести ко вторичной флуоресценции ГК). Таким образом, спектры флуоресценции в системе хлорелла – ГК формируются за счет наложения их сигналов. Нами показано, что интегральная интенсивность флуоресценции не изменяется существенно со временем для раствора ГК, при этом, для опыта с хлореллой в присутствии ГК, интегральная флуоресценция также изменяется незначительно.

При изучении размера клеток водоросли было отмечено, что добавление раствора ГК приводит к наблюдаемому уменьшению диаметра клеток. Средний минимальный размер клеток был обнаружен на 5 сутки в темновых вариантах опыта как с присутствием, так и отсутствием ГК. В этих же вариантах отмечено максимальное количество клеток, что указывает на размножение культуры водоросли.

Заключение

По результатам проведенных экспериментов можно сделать заключение, что препараты ГК влияют на культуру водоросли *Chlorella vulgaris*, увеличивая прирост ее биомассы и численности клеток.

Проведенные эксперименты показали, что влияние ГК на зеленую водоросль во многом связано с изменением ими окружающей среды. В первую очередь ГК не позволяют концентрации растворенного в среде кислорода достигать высоких значений, которые могут быть токсичны для живого организма. Во вторую очередь, хоть и незначительно (в концентрации, использованной для постановки эксперимента), но ограничивают количество света, которое попадает на клетки водоросли.

Препарат ГК серой пахотной почвы обладает АОА, уменьшая стресс от «избыточного» кислорода.

Наибольшие изменения, происходящие как с водорослью, так и с препаратом ГК связаны со световыми вариантами опыта, что говорит о фотоиндуцируемой природе наблюдаемых явлений. Ярко проявляется убыль в содержании кислорода в опыте с ГК на 5 сутки.

В опыте с водорослью наибольшее количество кислорода выделяется на свету в 1 и 5 сутки в присутствии препарата ГК, который снижает возможный окислительный стресс на водоросль. Это же подтверждается наибольшим приростом количества клеток водоросли на 5 сутки на свету.

В присутствии ГК размеры клеток водоросли меньше, чем в вариантах без ГК даже в самом начале закладки опыта, что, скорее всего, связано с осмотическим эффектом действия ГК. Дальнейшее уменьшение размеров может быть вызвано отмеченным в опыте делением и увеличением численности клеток.

В присутствии препарата ГК заметно небольшое увеличение интенсивности интегральной флуоресценции в опыте с *Chlorella vulgaris*, но существенно меньшее, чем для вариант опыта только с водорослью. При этом изменения спектров флуоресценции самой ГК тоже не установлены. Это опять же подтверждает стабилизирующую роль ГК в среде.

Благодарность

Исследования проведены при поддержке ресурсного центра «Обсерватория экологической безопасности» научного парка СПбГУ, проект № 118–16535.

Список использованных источников:

1. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. – М.: Изд-во МГУ. 1990. – 332 с.
2. Орлов Д.С. Химия почв. Издание 2-е, исправленное и дополненное. – М. Изд-во МГУ. 1992. – 400 с.
3. Безуглова О.С., Самоничева Е.А. Эффективность гуминовых удобрений различной природы // Труды 4 всероссийской конференции – Гуминовые вещества в биосфере, Москва 19–21 декабря – 2007 – С. 393–398.
4. Coelho C., Ter Halle A., Guyot G., Richard C., Cavani L., Ciavatta C. Photoremediation properties of dissolved organic matter extracted from compost // Proceedings

of the 14th International Meeting of the International Humic Substances Society, September 14–19, 2008, Moscow - Saint Petersburg, Russia, – 2008 – Vol. II. P. 635–638.

5. Nardi S. Carletti P., Pizzeghello D., Muscolo A. Biological activities of humic substances // Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems. – 2009. – V. 2. No.1. – P. 309–335.

6. Бузлама А.В., Чернов Ю.Н. Анализ фармакологических свойств, механизмов действия и перспектив применения гуминовых веществ в медицине // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, No. 9. – С. 43–48.

7. Логвинова Л.А. Физико-химические и кардиотропные свойства гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа: дисс. ... канд. фарм. наук: 14.04.02. – Томск. – 2019. – 243 с.

8. Aeschbacher M., Graf C., Schwarzenbach R.P., Sander M. Antioxidant properties of humic substances // Environ. Sci. Technol. – 2012. – 46, 9. – P. 4916–4925. DOI:10.1021/es300039h.

9. Bratishko K.A., Buyko E.E., Zyкова M.V., Belousov M.V. The Vasugan swamp peats (Tomsk region) as a promising source of organic matter with antioxidant properties // Journal of Economics and Social Sciences. – 2019. – Vol. 14(14). – P. 82–88.

10. Линкевич Е.В., Юдина Н.В., Савельева А.В. Формирование гуминовых коллоидов в зависимости от рН среды водных растворов // Журнал физической химии. – 2020. – Т. 94, No. 3. – С. 568–573.

11. Зайцев В.Г., Островский О.В., Закревский В.И. Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антиоксидантов прямого действия // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003. – Т. 66, No. 4. – С. 66–70.

12. Сейфулла Р.Д., Рожкова Е.А., Ким Е.К. Антиоксиданты // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72, No. 3. – С. 60–64.

13. Улащик В.С. Активные формы кислорода, антиоксиданты и действие лечебных физических факторов. Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2013. – Т. 1. – С. 60–69.

14. Соколова И.В., Чайковская О.Н. Влияние гуминовых кислот на фотопроцессы в водных средах // Вестник ТГПУ. – 2008. – Вып. 4 (78). – С. 42–46.

15. Зыкова М.В., Логвинова Л.А., Кривошеков С.В., Воронова О.А., Ласукова Т.В., Братишко К.А., Жолобова Г.А., Голубика О.А., Передерина И.А., Дрыгунова Л.А., Тверяков Е.Н., Белоусов М.В. Антиоксидантная активность высокомолекулярных соединений гуминовой природы // Химия растительного сырья. – 2018. – № 3. – С. 239–250. DOI: 10.14258/jcprm.2018033925.

16. Kulikova N.A., Perminova I.V., Badun G.A., Chernysheva M.G., Koroleva O.V., Tsvetkova E.A. Estimation of Uptake of Humic Substances from Different Sources by Escherichia coli Cells under Optimum and Salt Stress Conditions by Use of Tritium-Labeled

Humic Materials // Applied and environmental microbiology. – 2010 – Vol. 76, No. 18. – p. 6223–6230.

17. Кнорре Д.А., Фенюк Б.А., Попова Е.Н., Лямзаев К.Г., Черняк Б.В. Структура и функции митохондрий [Электронный ресурс] // Конспект лекций, Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова. – 2019. – С. 118. Режим доступа: <https://teach-in.ru/file/synopsis/pdf/the-structure-and-function-of-mitochondria-M1.pdf>

18. Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity // BioFactors. – 1997. – vol. 6(4). – P. 391–397. DOI: 10.1002/biof.5520060404

19. Сырвая А.О., Леонтьева Ф.С., Новикова И.В., Иванникова С.В. Биологическая роль свободных радикалов в развитии патологических состояний // Международный медицинский журнал. – 2012. – № 3. – С. 98–103.

20. Дину М.И., Шкинев В.М. Комплексообразование ионов металлов с органическими веществами гумусовой природы: методы исследования и структурные особенности лигандов, распределение элементов по формам // Геохимия. – 2020–65(2). – С. 165–177. DOI: 10.31857/S001675252002003X.

21. Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов // Химия растительного сырья. – 2004. – No. 3. – С. 63–75.

22. Скрипкина Т.С. Механохимическая модификация структуры гуминовых кислот для получения комплексных сорбентов: дисс. ... канд. хим. наук: 02.00.21 – Новосибирск. – 2018. – 124 с.

23. Чуков С.Н. Структурно-функциональные параметры органического вещества почв в условиях антропогенного воздействия. – СПб.: изд. СПбГУ, 2001. – 216 с.

24. Горшкова О.М., Пацаева С.В., Федосеева Е.В., Шубина Д.М., Южаков В.И. Флуоресценция растворенного органического вещества природной воды // Вода: химия и экология. – 2009. – № 11(17). – С. 31–37.

25. Zyкова M.V., Schepetkin I.A., Belousov M.V., Krivoshechekov S.V., Logvinova L.A., Bratishko K.A., Yusubov M.S., Romanenko S.V., Quinn M.T. Physicochemical characterization and antioxidant activity of humic acids isolated from peat of various origins // Molecules. – 2018 – 23(4), 753 – DOI:10.3390/molecules23040753.

26. Винберг Г.Г. Пути количественного изучения потребления и усвоения пищи водными животными // Журн. общ. биол. – Т.25. – № 4. – С.254–266.

27. Федураев П.В. Участие пероксида водорода в передаче сигнала холодового стресса в клетках цианобактерии *Synechocystis*: дис. ... канд. биол. наук: 03.01.05. – Москва – Калининград. – 2018. – 90 с.

28. Шубина Д.М., Якименко О.С., Пацаева С.В., Изосимов А.А., Терехова В.А., Федосеева Е.В., Южаков В.И. Спектральные свойства водных растворов промышленных гуминовых препаратов // Вода: химия и экология. – 2010. – № 2(20). – С. 22–26.

29. Шубина Д.М., Якименко О.С., Пацаева С.В., Изосимов А.А., Терехова В.А., Федосеева Е.В., Южаков В.И. Спектральные свойства водных растворов промышленных

Торопкина М.А., Рюмин А.Г., Чуков С.Н., Лянгузов А.Ю. Оценка изменения параметров системы «питательная среда – зеленая водоросль – гуминовая кислота» во времени

.....
**Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»**
=====

гуминовых препаратов (продолжение) // Вода: химия и экология. – 2010. – № 3(21). – С. 21–25.

30. Гостева О.Ю., Изосимов А.А., Пацаева С.В., Южаков В.И., Якименко О.С. Флуоресценция водных растворов промышленных гуминовых препаратов // Журнал прикладной спектроскопии. – 2011. – Т. 78, № 6. – 8 с.

31. Торопкина М.А., Рюмин А.Г., Кечайкина И.О., Чуков С.Н. Влияние гуминовых кислот на метаболизм *Chlorella vulgaris* в модельном опыте // Почвоведение, 2017. – № 11. – С. 1336–1343.
=====

Цитирование:

Торопкина М.А., Рюмин А.Г., Чуков С.Н., Лянгузов А.Ю. Оценка изменения параметров системы «питательная среда – зеленая водоросль – гуминовая кислота» во времени [Электрон. ресурс] // АгроЭкоИнфо: Электронный научно-производственный журнал. – 2023. – № 3. – Режим доступа: http://agroecoinfo.ru/STATYI/2023/3/st_312.pdf. DOI: <https://doi.org/10.51419/202133312>.