

ЭКОЛОГИЯ

УДК 581.192:546

**ДИАЛИЗНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ
КАК АДЕКВАТНАЯ МОДЕЛЬ КОНТРОЛЯ ПОПУЛЯЦИЙ
ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ЭКОСИСТЕМ****А.Ф. Лебедева**, Е.Л. Барский, Я.В. Саванина, С.Ю. Королева,
Ю.Н. Королев, Е.С. Лобакова*(кафедра физиологии микроорганизмов; e-mail: gene_b@mail.ru)*

Рассматриваются возможности методов экологического контроля антропогенного воздействия на экосистемы. Для оценки экологического состояния живых систем предлагается биотический подход, основанный на диализном культивировании популяций микроорганизмов. Диализные культуры характеризуются высоким уровнем накопления биомассы и значительным увеличением продолжительности экспоненциальной и стационарной фазы роста. Состояние клеток при диализном культивировании по ряду аспектов соответствует состоянию организмов, находящихся в реальных природных условиях. Предлагается методология анализа ответов микробных клеток на внешние факторы воздействия. Она основана на регистрации изменений пространственно-временных параметров клеточных популяций методами послойного неинвазивного анализа с использованием спектроскопии внутреннего отражения.

Ключевые слова: микроорганизмы, диализное культивирование, пространственно-временная организация, спектроскопия внутреннего отражения.

Одна из сложнейших проблем современности — предотвращение надвигающегося экологического кризиса. Имеющиеся подходы к решению этой проблемы позволяют в лучшем случае достаточно эффективно минимизировать негативные последствия человеческой деятельности, но не позволяют достоверно судить о качестве среды, разрабатывать реалистичные сценарии развития процессов в экосистемах и прогнозировать их последствия.

Существующие методики экологического контроля антропогенного воздействия на экосистемы нуждаются в уточнении в том числе и потому, что оценка состояния экосистем производится по уровню абиотических факторов, и границы толерантности лабораторных тестовых организмов по отношению к единичным воздействиям экстраполируются на многокомпонентные природные сообщества.

Многолетний опыт использования для оценки качества среды нормативов и методов экологического контроля дает основания утверждать, что несмотря на широкую практику и научную обоснованность их применения прогнозируемые и реальные эффекты внешних воздействий, особенно отдаленные последствия, часто сильно различаются [1]. Экологические нормативы обозначают, скорее, не реальную границу между опасностью и безопасностью, а некоторый уровень риска, отличающийся для разных компонентов экосистем. В связи с этим весь

ма актуальны поиски новых подходов к оценке качества среды и экологическому нормированию, что является задачей системы экологического контроля. На всей территории России эта система основана на концепции предельно допустимых концентраций (ПДК) загрязняющих веществ, которые определяются в экспериментах на изолированных популяциях организмов, принадлежащих к небольшому числу избранных тестовых видов, по ограниченному набору физиологических и поведенческих реакций.

Реальные природные объекты представляют собой многокомпонентные экосистемы, находящиеся в различных фоновых условиях функционирования, суммарный эффект воздействия которых может проявляться гораздо заметнее, чем эффект загрязняющих веществ. Поэтому оценка состояния природных объектов по уровням ПДК является экстраполяцией границ возможности существования тестовых организмов по отношению к изолированным воздействиям на экосистемы, содержащие разнообразные организмы.

Предпосылки биотического подхода

При создании альтернативной методологии можно выделить две группы проблем: 1) поиск адекватных моделей для лабораторного тестирования эффекта загрязняющих веществ и 2) определение

параметров отдельных компонентов экосистемы, характеризующих ее состояние.

Если биологической основой методологии ПДК является возможность существования отдельных организмов при внешних воздействиях, то альтернативой этой методологии может служить концепция, основанная на представлениях о приоритете биологического контроля [2], которая предполагает существование причинно-следственной связи между уровнями воздействий на биологическую систему и ее ответом. В рамках этой концепции устанавливаются допустимые уровни воздействий для биотической части реальных экосистем [3], оценка экологического состояния сообществ производится по комплексу биологических показателей, а не по уровням абиотических факторов. Абиотические же факторы (химические загрязнители, электромагнитные излучения и др.) рассматриваются только как потенциальные причины экологического неблагополучия в связи с их воздействием на популяции организмов, на экологические связи между ними.

В существующих системах экологического мониторинга применяются экспертные оценки качества природной среды. Контролируемые при данном подходе показатели объединяет общий недостаток: игнорируются взаимоотношения между популяциями в реальных сообществах. Для коррекции вводятся градации состояния экосистем на основе показателей изменения их состояния под воздействием антропогенных факторов — перестройки структуры и метаболизма биоценозов [2].

Определение интегральных показателей, позволяющих выявить в комплексе абиотических факторов границы между областями нормального и патологического функционирования экосистем, отличить экологически благополучное сообщество от экосистемы, в которой произошли существенные изменения, вызванные внешними воздействиями, представляет собой исключительно сложную задачу.

Подходом к ее решению может служить лабораторное моделирование. Любые изменения среды обитания находят обязательное отражение в физиологических реакциях живой системы. Абсолютных биологических величин, имеющих одинаковый смысл для всех экосистем независимо от типа и географического положения последних, не существует, какие именно свойства системы важны, определяется задачей исследования. Инвариантны для всех без исключения экосистем только основные качественные состояния, описывающие уровень метаболизма и организации биоценоза. Каждое из этих состояний соответствует определенному уровню антропогенной нагрузки, что является объективным критерием для научно обоснованного экологического нормирования.

Очевидно, что не только уровень организации отдельных видов организмов, но и уровень организации их сообществ зависит от окружающей сре-

ды. При изменении внешних условий на уровне отдельных организмов наблюдаются изменения функциональных показателей, а на уровне их сообществ — структурные изменения. Изменение количества и соотношения входящих в сообщество видов приводит к постепенному превращению одной экосистемы в другую. В связи с этим необходимо выявить пределы изменений экологических факторов, при которых сохраняют стабильность признаки, характеризующие экосистему определенного типа, и подобрать методы оценки состояния сообществ, позволяющие отличить экологически благополучную экосистему.

Важнейшим этапом этих исследований является выяснение взаимосвязи развития популяций организмов и экологических модификаций сообщества. Биологический компонент экосистемы представляет собой совокупность организмов, функционально дополняющих друг друга и способных взаимодействовать со средой обитания как некое целое, а не “набор видов, находящихся в одном месте”. Длительное существование вида вне сообщества невозможно, потому что приводит к материальному дисбалансу в месте его обитания [4].

Метаболизм биоценоза составляют процессы извлечения энергии из окружающей среды и превращения экзогенных веществ в биомассу, в которых обеспечивается непрерывный обмен веществ и энергии между биоценозом и его средой. В результате изменения физических и химических характеристик среды может происходить как увеличение интенсивности метаболизма биоценоза (метаболический прогресс), так и уменьшение его интенсивности (метаболический регресс). Связанные с этими явлениями изменения структуры биоценозов обозначаются термином “экологические модификации” [2].

Каждая экологическая модификация характеризуется развитием комплекса общих по своему экологическому значению признаков. Так, для экологического прогресса характерно увеличение устойчивости к внешним возмущениям, которое выражается в увеличении разнообразия биоценоза, длительности жизненных циклов и общего числа видов, усложнении пищевой цепи и т.п. Экологический регресс характеризуется упрощением отношений биоценоза с окружающей средой и, как следствие этого, его организационной деградацией. Экологическая модуляция — наиболее распространенное направление метаболического прогресса, как правило, не ведет к глубоким изменениям интенсивности метаболизма биоценоза, не изменяет общего уровня его организации и может выражаться в частичном изменении видового состава.

Таким образом, можно говорить о существовании ограничения уровня организации биоценоза, определяемого конкретными условиями среды. Изменяемая человеком среда, в которой существуют

биоценозы, оказывается фактором, определяющим как интенсивность метаболизма биоценозов, так и уровень их организации.

Диализная модель

Рассмотрим, каким образом можно перейти от теоретических предпосылок к экспериментальной оценке экологического состояния. Реакции многоклеточных организмов на изменения параметров среды опосредованы рядом факторов и сложны для интерпретации. Фитопланктонные организмы — цианобактерии и микроводоросли — находятся в постоянном контакте со средой и зависимы от окружающих условий в большей степени, чем мелкие многоклеточные формы, поскольку у них меньше возможностей отделить свою внутреннюю среду от внешней. Так, например, они не могут изолироваться, переживая неблагоприятные условия (как бактерии или моллюски). Обмен веществ между клеткой микроорганизма и средой осуществляется всей ее поверхностью, поэтому внутриклеточные процессы исключительно зависят от условий среды, некоторые процессы метаболизма даже протекают снаружи.

При выборе диализной культуры цианобактерий в качестве тест-объекта для исследований взаимодействия фитопланктонных организмов с загрязнителями учитывались:

1) широкая распространенность данных микроорганизмов: “цветение” водоемов в наших широтах вызывается главным образом цианобактериями;

2) важная роль в формировании природных сообществ, устойчивых к воздействию повреждающих факторов: сообщества, преобладающим компонентом которых являются цианобактерии, удаляют из водной среды до 98% растворенных металлов и металлоидов [5, 6];

3) чувствительность некоторых видов цианобактерий к воздействию ряда загрязнителей, что объясняется мелкими размерами клеток, обеспечивающими высокое соотношение поверхность/объем, а также выраженной зависимостью физиолого-биохимических ответов клеток на действующие физико-химические факторы среды.

При культивировании на жидких средах на суспензионной культуре целесообразнее проводить изучение повреждающего действия различных экологических факторов и компенсаторно-приспособительных реакций на клеточном и субклеточном уровне. Диализная аксеническая и смешанно-раздельная культуры позволяют изучать адаптационные системы более высокого структурного уровня, связанные с популяционными и межвидовыми взаимодействиями.

Диффузионное культивирование предполагает отделение исследуемой суспензионной культуры кле-

ток от внешнего объема среды мембраной с размерами пор, пропускающих соединения с определенной молекулярной массой, через которую осуществляется диффузия веществ. Культура может помещаться как в камеру, ограниченную фильтрами, так и в мешок из селективной мембраны. Такая разновидность называется диализным культивированием: диализный мешок с клетками микроорганизмов погружается в 5–10-кратный объем “внешней среды”, что обеспечивает непрерывное поступление питательных веществ и отток метаболитов, ингибирующих клеточное деление [5]. Метод пригоден для изучения разных классов микроорганизмов: цианобактерий, зеленых микроводорослей, гетеротрофных бактерий.

Полученная система представляет упрощенную модель функционирования природной биопленки цианобактерий: во “внутреннем” объеме накапливаются высокомолекулярные полисахариды, которые объединяют отдельные клетки и создают вокруг них специфические условия — организмы развиваются не в водно-солевой среде, а в коллоидном матриксе [4, 7]. Для диализной культуры характерно увеличение продолжительности стационарной фазы, при этом ряд ее физиологических параметров, таких как скорость фотосинтеза и содержание пигментов у автотрофов, на протяжении опыта не изменяется. Количество биомассы, накопленной в экспоненциальной фазе роста, в диализной культуре значительно выше, чем в периодической [8].

При создании модели природного сообщества используется смешанно-раздельное диализное культивирование. Природные и культивируемые популяции микроводорослей и цианобактерий по природе гетерогенны и часто включают в себя гетеротрофный компонент — грибы, бактерии, актиномицеты [6]. Основные проблемы при исследовании ассоциативных культур — разделение и учет каждого компонента в отдельности и оценка взаимного влияния партнеров. Метод диализного смешанно-раздельного культивирования основан на отделении одной популяции от другой полупроницаемой мембраной; такое культивирование может осуществляться как на твердых средах с использованием в качестве мембраны тонкого слоя агара, так и на жидких средах с использованием диализных мембран. При данном типе культивирования нивелируется ингибирующий эффект, связанный с межклеточными контактами двух различных популяций [7], но происходит обмен метаболитами между культурами, находящимися соответственно в диализном мешке и во “внешней среде”. Таким образом, возможно как изучение взаимодействия культур на уровне продуктов метаболизма, так и наблюдение за изменением параметров роста каждой из культур в отдельности [8]. Взаимная же регуляция роста и развития компонентов смешанно-раздельной культуры благоприятно сказывается на раз-

витии обеих культур, в том числе в условиях антропогенных загрязнений.

Наибольшей чувствительностью к токсическим воздействиям обладают культуры физиологически молодых клеток, выращенных на минимальных средах. Таким образом, условием получения тест-культур, наиболее отвечающих свойствам природной популяции, является истощение клеточных резервов. Культуру в диализном мешке легко перемещать из одной среды в другую: на минимальных средах это позволяет обеспечивать истощение клеточных резервов для увеличения чувствительности культур при одновременном удалении продуктов аутоингибирования. Клетки в диализном мешке остаются в стерильных условиях, что позволяет изучать изменения тест-параметров культур в любых загрязненных средах, включая естественные водоемы, а также дает возможность моделировать как разовый, так и постоянный сброс различных загрязнителей путем замены внешней среды и изучать воздействие повреждающих факторов в различных сочетаниях. Диализная мембрана не препятствует свободному перемещению молекул токсиканта, что позволяет создавать различные фоновые условия, приближенные к реальным условиям функционирования живой системы, и варьировать любой экологический фактор в достаточно широких пределах [5].

Краткий перечень различных аспектов диализного культивирования показывает неоспоримую перспективу его использования для решения задач и физиологии, и экологии, и биотехнологии. Степень же приближения указанных моделей к реальным условиям при использовании выбранной нами методологии можно выявить лишь при ее детальном анализе.

Неинвазивные методы оценки состояния клеточных популяций

Изменения среды обитания находят обязательное отражение в реакциях живых систем. Реакция проявляется либо в количественном варианте (в определенном объеме клетки изменяется количество биохимических компонентов либо их пространственная организация), либо в качественном варианте.

Поскольку материальным носителем жизнедеятельности биологической системы является ее структурная организация, при изучении реакций клеток на факторы воздействия необходимы неинвазивные методы исследования, т.е. обеспечивающие получение информации о степени упорядоченности живых структур без их разрушения. Свойства живой системы, характерные для нового уровня структурной организации, не являются простой суммой свойств составляющих ее макромолекул. Степень упорядоченности структур обуславливает свойства и функциональные возможности исследуемых объ-

ектов. Индикатором изменений состояния живого организма (с учетом взаимосвязи его морфологии, физиологии и биохимии) могут служить динамические изменения его пространственной и временной структуры.

Учитывая сочетание разноуровневых процессов и их взаимосвязь, необходимо получение структурно-динамической информации о живых системах. Согласно современным представлениям, одной из важных черт биологических систем является взаимосвязь между пространственными и временными изменениями их показателей. Единая пространственно-временная организация биологической системы даже в условиях действия экстремальных факторов обеспечивает как ее структурно-функциональную стабилизацию, так и способность к адаптациям. Одним из проявлений пространственной организации биологической системы является ее гетерогенность, проявляющаяся в форме градиентов. Степень выраженности градиентов и их связь с динамикой процессов изменяются при воздействиях на изучаемую биологическую систему.

В соответствии с гипотезой стохастической псевдокристалличности [9] структуры рассматриваются как трехмерные случайные поля, обладающие упорядоченностью, степень которой обуславливает свойства и функциональные возможности исследуемых объектов. Это означает, что при наличии соответствующих методов можно исследовать свойства объекта на основании информации о структуре объекта по трем координатам.

Методическая база исследований нативных клеток должна обеспечить выполнение следующих требований: 1) анализ многокомпонентных гетерогенных систем без их разрушения; 2) получение информации об изменении во времени химического состава объекта на разном расстоянии от его поверхности; 3) получение информации об изменении степени организации биополимеров в пространстве; 4) использование статистических методов анализа и синтеза, поскольку реальные объекты, как правило, носят случайный, а не детерминированный характер.

Анализ современных методов исследования показывает, что наиболее полно в настоящее время отвечают перечисленным выше требованиям методы спектроскопии внутреннего отражения. К преимуществам метода относится возможность получения послойных характеристик даже непрозрачных объектов в любом спектральном диапазоне любыми методами, регистрирующими изменения параметров электромагнитных излучений при их взаимодействии с объектами исследований. Спектральная характеристика представляет собой своего рода кривую закона распределения, которая отражает определенные изменения в структурах клетки, происходящие при наложении внешних электромагнитных волн или в процессе отдачи ими информации.

Для оценки функционального состояния клетки необходимо проанализировать содержание в клетках важнейших биополимеров (белков, нуклеиновых кислот, липидов, полисахаридов), их пространственное распределение, а также структурную организацию, включая пространственную ориентацию определенных химических связей в макромолекулах.

Информацию о наличии, распределении и пространственной упорядоченности биополимеров *in situ* в клетках можно получить, используя методы спектроскопии внутреннего отражения в инфракрасном диапазоне, обеспечивающие сохранность нативного состояния исследуемых объектов. Спектральные характеристики, полученные в поляризованном свете, отражают процессы, которые выражаются в пространственной переориентации отдельных макромолекул. Можно предположить, что преимущественная ориентация определенных химических связей в ансамблях макромолекулярных компонентов клеток характеризует прижизненную организованность биосистемы.

Организм можно рассматривать как систему лабильных информационных взаимодействий (внутреннее информационное поле), находящуюся в постоянно меняющемся внешнем информационном поле. Этот подход заставляет обратить особое внимание на пограничные структуры, через которые и осуществляется взаимодействие организма со средой обитания, как на избирательный информаци-

онный (волновой) фильтр, в определенной степени способный регулировать меру воздействия внешней среды на организм. Степень пространственно-временной организации внешних структур клеток характеризует и степень открытости живой системы [10]. Показана также зависимость изменений степени открытости от этапа развития живой системы и от характера взаимодействия среды обитания и развивающегося организма. Структурирование приводит к резкому сокращению разнообразия резонансных систем в пограничном слое, т.е. к минимизации волновых взаимодействий со средой обитания.

С примерами реализации предложенной в работе методологии анализа реакции клеток живой системы на факторы воздействия можно познакомиться в ряде публикаций [11–13].

Проверка предлагаемых лабораторных моделей на возможность использования их в экологическом мониторинге является задачей, подготовленной нами следующей, экспериментальной работы, где будут предложены интегральные показатели функционирующих систем на основании предпосылок данной работы. Начальным критерием могут служить отличия указанных выше динамических параметров клеток при выращивании одних и тех же культур микроорганизмов в периодическом и диализном режимах культивирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смуров В.А. Экологическая диагностика качества среды обитания на примере наземных сообществ района Южно-Уральского активного следа и донных сообществ залива Нячанг Южно-Китайского моря: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2003.
2. Абакумов В.А. Экологические модификации и развитие биоценозов // Тр. Междунар. симпоз. "Экологические модификации и критерии экологического нормирования". Л.: Гидрометиздат, 1990. С. 18–40.
3. Максимов В.Н. Проблемы комплексной оценки качества природных вод (экологические аспекты) // Гидробиол. журн. 1991. Т. 27. № 3. С. 8–13.
4. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение в природоведческую микробиологию. М.: Книжный дом "Университет", 2001. 256 с.
5. Саванина Я.В., Лебедева А.Ф., Барский Е.Л., Гусев М.В. Диализное культивирование цианобактерий // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. 2008. № 2. С. 16–25.
6. Munoz R., Guieysse B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review // Water Res. 2006. Vol. 40. N 15. P. 2799–2815.
7. Xavier J.B., Foster K.R. Cooperation and conflict in microbial biofilms // Proc. Nat. Acad. Sci. 2007. Vol. 104. N 3. P. 876–881.

8. Лебедева А.Ф., Саванина Я.В., Барский Е.Л. Изменения редокс-потенциала и содержания углеводов в среде при периодическом и диализном культивировании цианобактерии *Anacystis nidulans* и бактерии *Pseudomonas diminuta* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. 2002. № 2. С. 24–29.

9. Богданов К.М. Оптико-структурный машинный анализ микрообъектов в морфологических исследованиях: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Пушино-на-Оке, 1971.

10. Гусев М.В., Королев Ю.Н. О взаимосвязи эволюции живых систем и их открытости // Синергетика. М.: МГУ, 2004. Т. 7. С. 150–169.

11. Калабеков А.Л., Королев Ю.Н. Экологический мониторинг. Некоторые методы неинвазивного анализа интактных клеток. М.: Прима-Пресс, 2000. 180 с.

12. Малахов Ю.И., Королев Ю.Н., Калабеков А.Л. Использование методов спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения для анализа биологических объектов // Измерительная техника. 2002. № 8. С. 40–45.

13. Асланян Р.Р., Королев Ю.Н. Исследование роста культуры одноклеточных зеленых водорослей методом неинвазивного анализа. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. 2007. № 3. С. 13–16.

Поступила в редакцию
30.03.09

DIALYSIS CULTIVATION OF MICROORGANISMS AS ADECVATE MODEL OF POPULATIONS CONTROL IN ECOSYSTEMS RESEARCH

*A.F. Lebedeva, E.L. Barsky, Ya.V. Savanina, S.U. Koroleva,
U.N. Korolev, E.S. Lobakova*

Ability of ecological control methods of anthropogenic influence on ecosystems are examined. The biotic approach for estimation of ecological status of living systems: dialysis cultivation of microorganisms population is offered. Dialysis cultures are characterized by high levels of biomass accumulation and considerable increase the exponential and stationary stage duration. Cells status at dialysis method correspond in series aspects to microorganisms behaviour in real nature conditions. Methodology of analysis of microbial cell responses on the effects of external factors is suggested. It is based on changes registration of space-time parameters of cell populations by layer noninvasive analysis with using of internal reflection spectroscopy.

Key words: *microorganisms, dialysis cultivation, space-time organization, attenuated total reflection.*

Сведения об авторах

Лебедева Александра Федоровна — канд. биол. наук, доц. кафедры физиологии микроорганизмов биологического факультета МГУ.

Барский Евгений Львович — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры физиологии микроорганизмов биологического факультета МГУ. Тел. (495) 939-41-69; e-mail: gene_b@mail.ru

Саванина Янина Вячеславовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии микроорганизмов биологического факультета МГУ. Тел. (495) 939-41-69; e-mail: gene_b@mail.ru

Королёв Юрий Николаевич — докт. биол. наук, доц. кафедры физиологии микроорганизмов биологического факультета МГУ. Тел. (495) 939-41-69; e-mail: cordekor@list.ru

Королёва Светлана Юрьевна — инженер кафедры физиологии микроорганизмов биологического факультета МГУ. Тел. (495) 939-41-69; e-mail: cordekor@list.ru

Лобакова Елена Сергеевна — докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии микроорганизмов биологического факультета МГУ. Тел. (495) 939-38-07; e-mail: elena.lobakova@rambler.ru