

УДК 582.232: 57.083.13

ЭФФЕКТ МЕЛАФЕНА НА РАЗВИТИЕ КУЛЬТУР ЦИАНОБАКТЕРИЙ И ЗЕЛЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ

Е.Л. Барский, И.О. Шандиева, Я.В. Саванина, **А.Ф. Лебедева**,
С.Г. Фаттахов*, Е.С. Лобакова

(кафедра биоинженерии; e-mail: 2gene_b@mail.ru)

Стимулирующий эффект мелафена на рост клеток цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 6301 достигает 30–45% в условиях, когда освещенность культур (1000 лк) ниже таковой для насыщения фотосинтеза; при освещенности культур в области насыщения (4000 лк) эффект мелафена существенно снижается. Скорость роста и накопление биомассы нитчатой цианобактерии *Anabaena variabilis* при наличии азота в среде на 20–25% ниже, чем без азота; при этом на среде без азота мелафен эффективнее стимулирует рост культур. Эти данные указывают, что мелафен активизирует фотосинтетические процессы и, возможно, фиксацию атмосферного азота в клетках. Мелафен увеличивает, а ионы тяжелого металла (ТМ) Cd^{2+} снижают как накопление биомассы, так и среднее количество клеток в нити цианобактерии *A. variabilis*. При совместном добавлении мелафен частично снимает токсический эффект Cd^{2+} . Ионы другого ТМ Cu^{2+} ингибируют рост цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 6301 и зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris*, но стимулируют выделение культурами углеводов. Мелафен частично снимает действие ТМ. Предполагается, что мелафен обладает антистрессовой активностью в условиях токсического эффекта ТМ на рост и развитие культур фототрофных микроорганизмов.

Ключевые слова: цианобактерии, зеленые микроводоросли, стресс, мелафен.

Планктонные микроорганизмы — цианобактерии, микроводоросли, гетеротрофные бактерии — находятся в постоянном контакте со средой. Обмен веществ между клеткой микроорганизма и средой осуществляется всей ее поверхностью, поэтому внутриклеточные процессы зависят исключительно от условий среды. В силу этого такие микроорганизмы представляют перспективную модель для изучения физиологических механизмов адаптации к действию различных физико-химических факторов, включая экстремальные.

Синтетический регулятор роста мелафен, существующий в водных растворах в виде супрамолекулярных полимерных наносистем [1], увеличивает урожай и всхожесть семян культурных растений [2], влияет на биогенез хлоропластов [3], стимулирует электронный транспорт в растительных митохондриях [4], усиливает рост периодических и диализных культур цианобактерий и зеленых микроводорослей [5]. В стрессовых условиях мелафен снижает уровень перекисного окисления липидов мембран растительных и животных митохондрий [6].

Целью настоящей работы является исследование эффекта мелафена на рост культур цианобактерий *Synechococcus* sp. PCC 6301 (*Anacystis nidulans*) и *Anabaena variabilis*, зеленых микроводорослей *Chlorella vulgaris*, редокс-потенциал среды, выделе-

ние клетками углеводов в динамике развития культур в различных стрессовых условиях.

Объекты и методы исследования

В работе использованы аксеничные культуры: цианобактерия *Synechococcus* sp. PCC 6301 (далее *Synechococcus* 6301) и *Anabaena variabilis*, зеленые микроводоросли *Chlorella vulgaris* (из коллекции кафедры физиологии микроорганизмов биологического факультета МГУ). Все исследуемые культуры выращивали на минеральной среде “С” [7]. Опыты с *A. variabilis* проводили в присутствии или отсутствии минерального азота в среде. В периодических культурах клетки выращивали в люминостате при круглосуточном освещении 1000 или 4000 лк, температуре 25–27° в конических колбах с объемом среды 100 или 250 мл.

Диализное культивирование проводили в мешках фирмы “Serva” (Германия), диаметром 25 мм, с размерами пор, пропускающих соединения с молекулярной массой до 15 кДа. Мешки со средой объемом 50 мл помещали в колбы объемом 250 мл и стерилизовали в течение 1 ч при 1 атм. Клетки помещали внутрь диализного мешка и выращивали в люминостате при круглосуточном освещении (1000 или 4000 лк) и температуре 25–27°.

* Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, г. Казань, ул. Арбузова, 8.

Содержание углеводов определяли с антроновым реактивом [8]. Плотность клеточных суспензий определяли нефелометрически при 540 нм. Величину редокс-потенциала среды (E_h) культивирования измеряли на электрометре фирмы "Cole-Parmer" (США), модель DigipHase. Для определения E_h использовали Pt-электрод, а в качестве электрода сравнения — Ag/AgCl. Потенциал электрода сравнения относительно нормального водородного электрода, измеренный, как в работе [9], составляет 225 ± 10 мВ. Ошибки измерений оптической плотности, содержания углеводов, величины E_h не превышали 12–15%.

Результаты и их обсуждение

Как показано в наших предварительных исследованиях [5], мелафен стимулирует рост периодических и диализных культур цианобактерий *Synechococcus* 6301 и *A. variabilis*, а также зеленых микроводорослей *C. vulgaris* и *Dunaliella maritima*. Мелафен эффективен в отношении пресноводных культур *Synechococcus* 6301, *A. variabilis* и *C. vulgaris* в узком диапазоне концентраций (10^{-8} – 10^{-6} М); стимуляция роста морской микроводоросли *D. maritima* почти линейно зависит от увеличивающихся концентраций мелафена в интервале 10^{-9} – 10^{-2} М [5]. Такой характер зависимости может быть обусловлен устойчивостью *D. maritima* к высоким концентрациям солей, в том числе тяжелых металлов (ТМ).

В связи с этим представляет интерес изучение действия мелафена на рост клеток, культивируемых в различных стрессовых условиях. На рис. 1 и 2 представлены данные по периодическому и диализ-

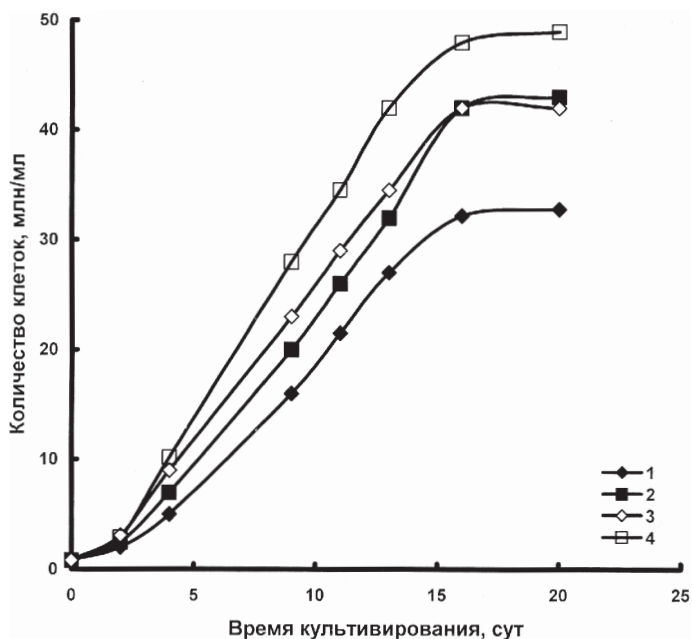


Рис. 1. Эффект мелафена на рост клеток периодической культуры цианобактерии *Synechococcus* 6301 при различной интенсивности света: 1, 2 — без добавок при освещенности 1000 и 4000 лк соответственно; 3, 4 — то же, но в присутствии 10^{-7} М мелафена

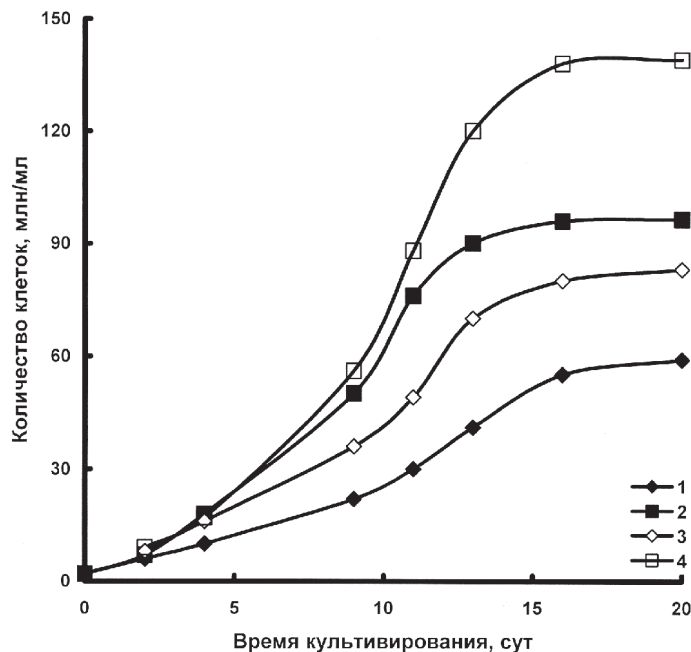


Рис. 2. Эффект мелафена на рост клеток диализной культуры цианобактерии *Synechococcus* 6301 при различной интенсивности света: 1, 2 — без добавок при освещенности 1000 и 4000 лк соответственно; 3, 4 — то же, но в присутствии 10^{-7} М мелафена

ному культивированию одноклеточной цианобактерии *Synechococcus* 6301 при различных интенсивностях освещения. Поскольку кривые роста цианобактерии при освещенности 1000 и 4000 лк отличаются по уровню накопления клеток приблизительно на 30% (рис. 1, кривые 1 и 2) рост клеток, по крайней мере при освещенности 1000 лк, не находится в области светового насыщения. Если при низкой интенсивности (1000 лк) мелафен стимулирует рост клеток периодической культуры *Synechococcus* 6301 на 26–28%, то при более высокой освещенности (4000 лк) стимуляция не превышает 14% (рис. 1). Это может быть связано с тем, что при освещенности 4000 лк клетки получают световой поток, по интенсивности близкий к насыщению фотосинтеза. Аналогичные кривые роста диализной культуры *Synechococcus* 6301 отличаются по концентрации клеток приблизительно на 60% (рис. 2, кривые 1 и 2). Стимулирующее действие мелафена на рост диализных культур *Synechococcus* 6301 практически не зависит от интенсивности света в выбранном диапазоне и составляет 40–45% (рис. 2).

Это свидетельствует о том, что в случае диализной культуры освещенность в 4000, также как и 1000 лк, не лимитирует действие мелафена, поскольку рост культуры не ограничен насыщающей интенсивностью света. Данные рисунков указывают на то, что эффект мелафена на рост культур обусловлен стимуляцией фотосинтетических процессов в клетках.

Физико-химические свойства среды культивирования, такие как E_h , могут отражать физиоло-

гическое состояние культур на определенных стадиях развития. Значительное снижение величины E_h в лаг-фазный период культивирования цианобактерий и гетеротрофных бактерий [10] определяется образованием и выделением из клеток тионинподобных низкомолекулярных белков и гамма-Glu-Cys-пептидов, включая глутатион, содержащих остатки цистеина. Интенсивное образование низкомолекулярных тиолов, по-видимому, обусловлено перестройкой метаболизма в клетках микроорганизмов в период лаг-фазы и началом их интенсивного роста [10]. Выделение низкомолекулярных тиолов при выращивании цианобактерий и гетеротрофных бактерий увеличивается от нескольких до десятков раз (в зависимости от организма) при добавлении ТМ, вызывающих у микроорганизмов токсический стресс. Тиолы связывают ионы ТМ, снимая их токсический эффект [10, 11, 12].

На рис. 3 изображены характерные для цианобактерий и гетеротрофных бактерий [10, 11] изменения E_h среды в динамике развития культур цианобактерии *A. variabilis*. Наличие азота незначительно снижает величину E_h по сравнению с таковой без азота (рис. 3, кривые 1 и 3), что обусловлено увеличением содержания низкомолекулярных тиолов в среде. При дефиците азота в среде величина E_h под действием мелафена значительно выше, чем в присутствии азота (кривые 2 и 4). Расчеты, основанные на данных работы Е.Л. Барского с соавт. [10], показывают, что если различия в содержании тиолов в среде с азотом и без него составляют 20–30%, то зависящее от мелафена увеличение

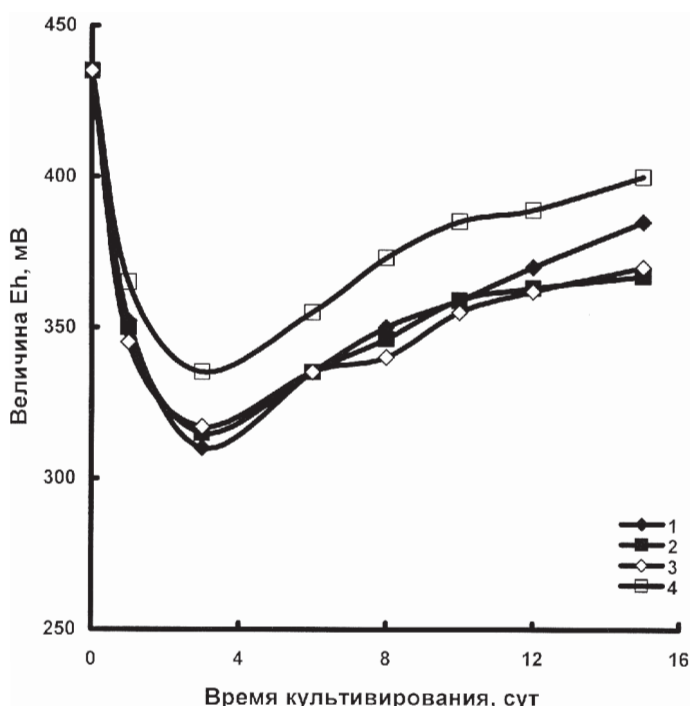


Рис. 3. Изменения E_h среды в динамике развития культуры цианобактерии *A. variabilis*, выращиваемой с азотом (1) и без азота в среде (3); 2, 4 — то же, но в присутствии 10^{-7} М мелафена

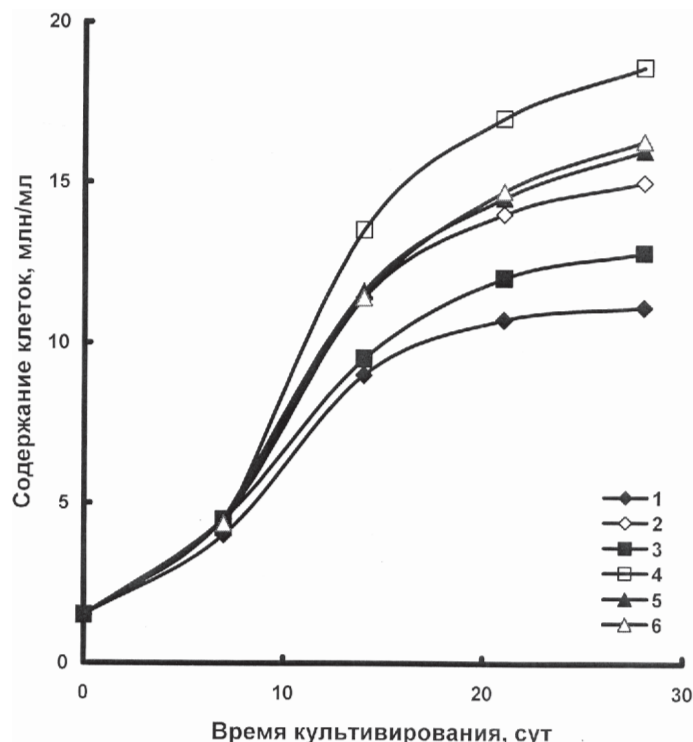


Рис. 4. Эффект 10^{-7} М мелафена на рост периодической культуры цианобактерии *A. variabilis* на среде с азотом (1), без азота (2); 3, 4 и 5, 6 то же, что 1, 2, но при добавлении мелафена; при засеве культуры и на 7-е сут культивирования клеток соответственно

величины E_h в среде без азота обусловлено снижением концентрации тиоловых соединений в среде в 2–3 раза. В то же время при недостатке азота мелафен эффективнее увеличивает как скорость роста клеток *A. variabilis*, так и накопление биомассы (рис. 4, кривые 1–4). Причем эффект мелафена значительно ниже, если он добавлен не при засеве (кривые 3 и 4), а в начале экспоненциальной фазы роста (кривые 5 и 6) культуры. Таким образом, характер данных рис. 3 и 4 свидетельствует, что снижение уровня тиолов в среде связано с более интенсивным ростом азотфиксирующей культуры *A. variabilis*.

При дефиците азота в среде нитчатая цианобактерия *A. variabilis* образует специализированные клетки — гетероцисты, основная функция которых заключается в синтезе АТФ и фиксации атмосферного азота. Как показано нами ранее [5], в отсутствие азота содержание гетероцист в нитях *A. variabilis* составляет 9–16%, тогда как в присутствии азота гетероцисты не определяются. При этом мелафен на 30–50% увеличивает среднее количество вегетативных клеток в одной нити.

Существенное значение для понимания роли мелафена в физиологической адаптации микроорганизмов имеет сравнительное исследование развивающихся культур в нормальных и стрессовых условиях. Клетки цианобактерий, микроводорослей и гетеротрофных бактерий обладают различной ус-

тойчивостью к токсическому действию ТМ [10, 13]. Устойчивость микроорганизмов существенно возрастает при диализном культивировании аксеничных культур микроорганизмов и особенно при смешанно-раздельном диализном культивировании [11, 12]. Как видно из табл. 1, добавление мелафена в конце экспоненциальной фазы роста культуры *A. variabilis* стимулирует рост клеток, тогда как добавление CdCl_2 подавляет накопление биомассы. При совместном добавлении мелафена и CdCl_2 наблюдается частичное снижение ингибирующего эффекта ТМ.

Таблица 1

Эффект мелафена и CdCl_2 на рост периодической культуры цианобактерии *A. variabilis*

№ п/п	Варианты опыта	Содержание клеток, млн/мл		
		16 сут	21 сут	24 сут
1	без добавок	10	10,8	10,8
2	1 + мелафен	11,3	12,9	12,8
3	1 + CdCl_2	8,4	7,9	7
4	3 + мелафен	9,1	9,2	8,5

Примечание. 1 — без добавок, 2, 3 и 4 в присутствии 10^{-7} М мелафена, 3 мг/л CdCl_2 и их комбинации соответственно. Оба агента добавлены к популяциям клеток на 14-е сут культивирования; содержание клеток составляло 9 млн/мл.

В этих условиях, согласно данным табл. 2, мелафен увеличивает среднее число клеток в одной нити и снижает долю одиночных и парных клеток. В присутствии CdCl_2 число клеток в одной нити значительно снижается, а доля одиночных клеток резко возрастает. Мелафен, добавленный совместно с CdCl_2 , частично снимает эффект Cd^{2+} на число клеток в нити и долю одиночных клеток. Данные о том, что токсический эффект ионов Cd^{2+} на рост культуры *A. variabilis* частично снимается мелафеном, подтверждаются результатами, представленными в табл. 3. Видно, что содержание клеток в культурах *C. vulgaris* и *Synechococcus* 6301 уменьшается под действием ионов Cu^{2+} . Мелафен частично снимает ингибирующее рост клеток действие CuSO_4 . Наряду с этим мелафен несколько снижает количество выделенных клетками углеводов, тогда как ионы Cu^{2+} стимулируют их выделение. Снижение уровня углеводов в среде под действием мелафена, в то время как он стимулирует рост клеток, может быть обусловлено повышенным потреблением метаболитов клеток, в том числе углеводов, на биосинтетические процессы при более интенсивном накоплении биомассы. Мелафен, добавленный совместно с Cu^{2+} , частично снимает эффект этого ТМ на выделение углеводов в среду культивирования.

Полученные данные позволяют предположить, что мелафен обладает антистрессовой активностью

Таблица 2

Эффект мелафена, CdCl_2 и их комбинации на содержание одиночных, парных, мертвых и делящихся вегетативных клеток в 17-суточных клеточных популяциях *A. variabilis*

№ п/п	Варианты опыта	Содержание клеток, %		
		одиночные	парные	среднее количество в нити
1	без добавок	0,22 (3,6%)	0,1 (1,6%)	6,3
2	1 + мелафен	0,16 (1,3%)	0,03 (0,24%)	12,4
3	1 + CdCl_2	0,7 (16,7%)	0,03 (0,6%)	4
4	3 + мелафен	0,5 (10%)	0,13 (0,6%)	5,3

Примечание. Мелафен и CdCl_2 добавляли к культурам в концентрациях 10^{-7} М и 3 мг/л соответственно за 3 сут до подсчета количества клеток.

Таблица 3

Эффект 10^{-7} М мелафена в концентрации, 3 мг/л CuSO_4 и их комбинации на рост периодических культур *C. vulgaris* и *Synechococcus* 6301

№ п/п	Варианты опыта	Содержание клеток, млн/мл	Содержание углеводов, мкг/мл
1	<i>C. vulgaris</i>	3,5	46
2	1 + мелафен	7,9	38
3	1 + CuSO_4	1,5	59
4	3 + мелафен	3,2	47
5	<i>Synechococcus</i> 6301	15,7	140
6	5 + мелафен	19,8	125
7	5 + CuSO_4	6,2	148
8	5 + мелафен	7,3	136

Примечание. Содержание клеток и углеводов для обеих культур определяли на 10-й день соответственно.

по крайней мере в отношении токсического действия ТМ. К заключению об антистрессовой активности мелафена ранее пришли другие авторы [4, 6]. Их выводы основаны на таких эффектах мелафена, как взаимодействие с супероксидными анион-радикалами, стимуляция активности дыхательных ферментов в митохондриях высших растений и животных и увеличение степени ненасыщенности жирных кислот в сопрягающих мембранах. Вероятно, эти факты могут лежать в основе адаптивных реакций растений к неблагоприятным факторам среды.

* * *

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 07-03-12046).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коновалов А.И., Рыжкина И.С., Муртазина Л.И., Тимошева А.П., Шагидуллин Р.Р., Чернова А.В., Аввакумова Л.В., Фаттахов С.Г. Супрамолекулярные системы на основе дигидрата меламиновой соли бис(оксиметил)фосфиновой кислоты (мелафена) и поверхностно-активных веществ. Сообщение 1. Строение и самоассоциация мелафена в воде и хлороформе // Изв. РАН. Сер. хим. 2008. № 6. С. 1207—1214.
2. Фаттахов С.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. Мелафен — перспективный регулятор роста растений для сельского хозяйства и биотехнологии // Сб. мат.-лов Всерос. семинара-совещания «Состояние исследований и перспективы применения регулятора роста растений нового поколения “мелафен” в сельском хозяйстве и биотехнологии». Казань, 2007. С. 3—12.
3. Осипенкова О.В., Ермохина О.В., Белкина Г.Г., Олескина Ю.П., Фаттахов С.Г., Юрина Н.П. Влияние мелафена на экспрессию генов белков светового стресса хлоропластов *Elip1* и *Elip2* у ячменя // Прикладная биохим. и микробиол. 2008. Т. 44. № 6. С. 701—708.
4. Жигачева И.В., Фаткуллина Л.Д., Шугаев А.Г., Генерозова И.П., Фаттахов С.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. Функциональное состояние мембран митохондрий корнеплода сахарной свеклы при действии препарата мелафен // Физиол. раст. 2007. Т. 54. № 5. С. 672—677.
5. Барский Е.Л., Саванина Я.В., Шандиева И.О., Лебедева А.Ф., Фаттахов С.Г., Лобакова Е.С. 2009. Действие мелафена на рост и физиологические параметры фототрофных и гетеротрофных микроорганизмов // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. 2009. № 4. С. 14—19.
6. Жигачева И.В., Бурлакова Е.Б., Шугаев А.Г., Генерозова И.П., Фаттахов С.Г., Коновалов А.И. Фосфоорганический регулятор роста растений: устойчивость клеток растений и животных к стрессовым воздействиям // Биологические мембраны. 2008. Т. 25. № 3. С. 196—202.
7. Kratz W.A., Myers J. Nutrition and growth of several blue-green algae // Am. J. Bot. 1955. Vol. 42. P. 2282—2287.
8. Методы химии углеводов / Под ред. Н.К. Кочеткова. М., 1967.
9. Barsky E.L., Samuilov V.D. 1979. Blue and red shifts of bacteriochlorophyll absorption band around 880 nm in *Rhodospirillum rubrum* // Biochim. Biophys. Acta. Vol. 548. P. 448—457.
10. Барский Е.Л., Лебедева А.Ф., Саванина Я.В. Изменения окислительно-восстановительного потенциала среды культивирования устойчивой к тяжелым металлам бактерии *Pseudomonas diminuta*: взаимосвязь с выделением из клеток металлотионеиноподобных белков // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. 1999. № 2. С. 11—15.
11. 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.
12. Саванина Я.В., Лебедева А.Ф., Барский Е.Л. Значение глутатионовой системы в накоплении и детоксикации тяжелых металлов в клетках цианобактерий и микроводорослей. // Вестн. Моск. Ун-та. 2003. Сер. Биология. № 3. С. 29—37.
13. Гусев М.В., Барский Е.Л., Лебедева А.Ф., Саванина Я.В. Устойчивость культур цианобактерии *Anacystis nidulans* и микроводоросли *Dunaliella maritima* к токсическому действию ванадия. Влияние фосфата, железа и цистеина // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. 1997. № 3. С. 12—17.

Поступила в редакцию
18.11.09

MELAFEN EFFECT ON DEVELOPMENT OF CYANOBACTERIA AND GREEN MICROALGAE CULTURES IN STRESS CONDITIONS

E.L. Barsky, I.O. Shandieva, Ya.V. Savanina, A.F. Lebedeva,
S.G. Fattakhov, E.S. Lobakova

Melafen stimulating effect on cell growth of cyanobacteria *Synechococcus* 6301 amounted to 30—45% at 1000 lux cultures illumination. Cells illumination in the area saturation (4000 lux) produced to decrease of melafen action. Growth rate and biomass accumulation of *Anabaena variabilis* cells made up 20—25% lower with nitrogen then without one in the medium. Melafen more efficiently stimulated cultures growth rate without nitrogen. Data indicate melafen activates photosynthetic processes and quite possible atmospheric nitrogen fixation in the cells. Heavy metal Cd^{2+} ions decreased biomass accumulation and average number cells in the filaments of *A. variabilis*. Melafen took away partially Cd^{2+} toxic effect. Cu^{2+} ions depressed *Synechococcus* 6301 and *Chlorella vulgaris* cells growth, but stimulated carbohydrate accumulation. Cu^{2+} ions action was partially decreased by melafen. It is supposed that melafen shows untistress activity in the conditions of toxic heavy metal effect on the growth of phototrophic microorganisms.

Key words: cyanobacteria, green microalgae, stress conditions, melafen.

Сведения об авторах

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

Шандиева Индира Оразалиевна — аспирантка, кафедра 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 биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел. (495)939-41-69; e-mail: gene_b@mail.ru

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

Фаттахов Саитгарей Галяевич — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН. Тел. 8432-73-18-62; e-mail: mshulaeva@iorg.knc.ru

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