

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 621.371

РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ НАТИВНЫХ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ, ВЫДЕЛЯЕМЫХ В СРЕДУ МИКРООРГАНИЗМАМИ, КАК КРИТЕРИЙ СОВМЕСТИМОСТИ ПРИ ПОДБОРЕ СМЕШАННЫХ КУЛЬТУР И ИСКУССТВЕННЫХ АССОЦИАЦИЙ**А.Х. Тамбиев, А.А. Лукьянов***(кафедра биоинженерии; e-mail: tambiev@mail.ru)*

Реакционная способность выделяемых в культуральную среду нативных (прижизненных) экзометаболитов в культурах актиномицетов, цианобактерий и микроводорослей рассматривается в качестве возможного экофизиологического критерия при подборе партнеров для искусственно создаваемых смешанных культур и ассоциативных пар микроорганизмов.

Ключевые слова: экзометаболиты, реакционная способность, смешанные культуры, цианобактерии, микроводоросли, актиномицеты.

В последнее десятилетие большой интерес вызывает исследование микробных сообществ и ассоциаций [1, 2]. Как известно, в большинстве естественных экосистем микроорганизмы сосуществуют в микробных сообществах и нередко в природных условиях образуют ассоциативные комплексы. Такие важные продуценты органического вещества в морских и пресноводных водоемах, как цианобактерии и микроводоросли существуют в окружении сопутствующих бактерий, причем связующим звеном между фототрофами и бактериями являются нативные экзометаболиты как тех, так и других, а также соединения, образующиеся на более поздних сроках роста в результате лизиса мертвых клеток [3–5]. В литературе обсуждалась доля выделяемых в среду нативных прижизненных органических экзометаболитов водорослей от фотосинтезируемого клетками органического вещества и данные по различным источникам колебались от 5–10 до 70–75%, большинство исследователей согласны с цифрой 20–40% [6], что в глобальном масштабе, учитывая избирательную реутилизацию, означает ежегодную циркуляцию в Мировом океане органического вещества между клетками микроорганизмов и средой, измеряемую десятками миллиардов тонн [4].

Актиномицеты, как и немикелиальные бактерии, способны входить в водные экосистемы и формировать наземные ассоциации с другими микроорганизмами. Достаточно интересными бывают ассоциации актиномицетов и микроводорослей или цианобактерий, которые встречаются на выходах карбонатных пород и в некоторых почвах [7]. Некоторые виды цианобактерий входят в состав циано-бактериальных сообществ — матов [2], многие участвуют в формировании симбиозов с эукарио-

тами в природе [8] либо модельных ассоциаций с растительными партнерами в экспериментальных условиях [9], а также являются частью почвенных микробных сообществ [10]. В связи с этим актуальны проблемы получения микробных ассоциаций и смешанных культур в лабораторных условиях и поиск критериев при подборе для них партнеров.

Исследование микробных ассоциаций и симбиозов, партнерами в которые входят представители различных таксонов, — одна из важнейших задач экологии микроорганизмов. Интерес к этой проблеме наблюдается еще со времен возникновения идеи С.Н. Виноградского о полифункциональном микробном сообществе, в котором микроорганизмы взаимодействуют прежде всего за счет трофических связей, как об элементарной эволюционной единице, что, в частности, позволило сопоставить филогенетические схемы бактерий с экологическими принципами [1].

Взаимодействие между организмами, не предполагающее высокоспециализированных, облигатных связей между партнерами, принадлежащими, в том числе, к разным царствам (растения, животные, грибы, бактерии), и оказывающее положительное действие друг на друга, в литературе определяется как ассоциативная система, ассоциация или ассоциативный симбиоз [11, 12].

В природных экосистемах широко распространены симбиотические ассоциации, автотрофным компонентом которых являются цианобактерии [8, 13, 14]. Способность цианобактерий вступать в симбиотические отношения с другими организмами обусловлена их ролью первичных продуцентов органического вещества и кислорода, а также связана с тем, что значительная часть синтезированных ими органических соединений выделяется в среду при

жизни автотрофов и значимость экскретируемых продуктов для функционирования ассоциаций неоднократно подтверждалась [3, 4, 9].

Мы предположили, что по определенным физиологическим характеристикам возможно установить совместимость предполагаемых партнеров для смешанных культур или искусственных ассоциативных пар еще до их создания. Хорошо известно, что взаимное влияние микроорганизмов как в естественных, так и в искусственных условиях происходит в основном через выделяемые в среду экзометаболиты, основываясь на функциях которых, ранее нами была предложена их классификация [3, 4]. Можно было предположить, что необходимой характеристикой может стать реакционная способность (РС) нативных экзометаболитов, выделяемых в среду, у чистых культур предполагаемых партнеров. Необходимо также отметить, что в настоящее время работы, посвященные изучению РС экзометаболитов смешанных культур или ассоциаций, нам не известны.

Объекты и методы

Объектами исследования служили выделенные нами из почвы актиномицеты видов *Streptomyces xanthochromogenes* (шт. № 8) и *Streptomyces cinereorectus* (шт. № 10); полученная из коллекции кафедры генетики биологического ф-та МГУ имени М.В. Ломоносова цианобактерия *Anabaena variabilis* Kütz. ATCC 29413 (штамм докт. С.П. Волка, США) и зеленая микроводоросль *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. из коллекции кафедры гидробиологии биологического ф-та МГУ имени М.В. Ломоносова.

При культивировании смешанных культур актиномицеты, цианобактерии, а также микроводоросли выращивали на модифицированной нами среде Громова № 6, в которую добавлялся растворимый крахмал в количестве 8 г/л. В качестве посевного материала (инокулята) использовалась споровая суспензия актиномицетов, концентрация спор в которой составляла 10^6 клеток/мл. Концентрация клеток в инокуляте цианобактерии и микроводоросли составляла 10^4 клеток/мл. Соотношение аликвот гетеротрофного и фототрофного компонентов на 200 мл среды составляло 2:1 частей соответственно. Для смешанной культуры использовался инокулят фототрофного партнера (цианобактерии, зеленой микроводоросли) после 7-суточной инкубации и споровая суспензия гетеротрофного партнера (актиномицетов), выращивание смешанной культуры проводили до 21 сут.

Оптимальными условиями для роста смешанной культуры являлось использование качалки в течение 2 сут в темноте при 180 об/мин и температуре 28°, что требуется для прорастания спор и начала логарифмической фазы роста актиномицета. Дальнейшее культивирование проводилось на

качалке при 60 об/мин и постоянном освещении ($16,4 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) при той же температуре, чтобы обеспечить развитие фототрофного компонента.

Накопление биомассы определяли весовым методом. По результатам измерений для наглядности оценки были введены следующие показатели накопления биомассы для смешанных культур на 21-е сут роста культуры: +++ — интенсивный рост ($> 0,5$ г/л); ++ — хороший рост (0,25–0,45 г/л); +- — заметный рост (0,1–0,2 г/л); — — слабый рост ($< 0,05$ г/л).

Реакционную способность (РС) нативных (прижизненных) экзометаболитов, выделяемых в среду, определяли методом химических моделей как соотношение окислительной (ОА) и антиокислительной (АОА) активностей [3, 4], в качестве модели использовали раствор 3,4-диоксифенилаланина (ДОФА), изменяющий оптическую плотность при окислении кислородом воздуха и появлении меланина. ОА и АОА определяли соответственно по повышению или понижению скорости реакции автоокисления ДОФА относительно контроля, которым являлось добавление чистой среды, и при добавлении среды, содержащей нативные экзометаболиты. Превышение или замедление скорости реакции автоокисления ДОФА под влиянием культуральной жидкости по сравнению с чистой средой (контролем, ось абсцисс) определялось тангенсом угла наклона кривой на участке наибольшей скорости автоокисления в процессе роста культур при постоянной температуре 45° на оригинальном приборе “Аквакон” 4-й модели. Раствор ДОФА готовился в следующих соотношениях: на 25 мл дистиллированной H_2O брали 10 мг реактива ДОФА, в кювету для измерений наливали 2,5 мл раствора ДОФА и 1,5 мл отфильтрованной культуральной жидкости, содержащей нативные экзометаболиты.

Изменение реакционной способности для смешанных культур и фототрофного компонента определяли до 21-х сут роста, для гетеротрофного компонента измерения проводили до 7-х сут роста в связи с отличием в характере роста и более ранним выходом на стационарную фазу роста гетеротрофной культуры в сравнении с фототрофным компонентом. Биомасса гетеротрофного компонента после выхода на стационарную фазу роста и до 21-х сут существенно не менялась, а суммарная биомасса смешанной культуры нарастала за счет роста фототрофного компонента и до его перехода в стационарную фазу на 21-е сут. Каждый опыт проводился не менее чем в трех повторностях.

Результаты и обсуждение

Изученные нами пары, состоящие из актиномицетов, цианобактерий и зеленых микроводорослей, можно расположить в порядке убывания по совместимости (оценка по уровню накопленной биомассы): 1) *S. xanthochromogenes* + *A. variabilis*; 2) *S. ci-*

nereorectus + *A. variabilis*; 3) *S. xanthochromogenes* + *S. quadricauda*; 4) *S. cinereorectus* + *S. quadricauda* (таблица).

Сравнительная оценка накопления биомассы смешанными культурами фототрофных и гетеротрофных микроорганизмов на 21-е сут роста

№ п/п	Смешанная культура	Биомасса
1	<i>S. xanthochromogenes</i> + <i>A. variabilis</i>	+++
2	<i>S. cinereorectus</i> + <i>A. variabilis</i>	++
3	<i>S. xanthochromogenes</i> + <i>S. quadricauda</i>	+-
4	<i>S. cinereorectus</i> + <i>S. quadricauda</i>	-

Примечание. +++ — интенсивный рост; ++ — хороший рост; +- — заметный рост; - — слабый рост.

Используя метод химических моделей, мы для каждой культуры партнеров определяли степень проявления окислительной (ОА) или антиокислительной активности (АОА) нативных экзометаболических веществ. У исследованных видов актиномицетов была выявлена ярко выраженная ОА на всех фазах роста — так для *S. xanthochromogenes* превышение ОА культуральной жидкости по сравнению с чистой средой (контролем) составляло около 80% на экспоненциальной фазе роста (3-суточная культура) (рис. 1), аналогичный показатель для *S. cinereorectus* составлял 60% (рис. 2).

Для культуры *A. variabilis* наблюдалось снижение кривой в область АОА с уменьшением до 20% по сравнению с контролем на 7-е сут роста, затем повышение и переход через ось абсцисс в область ОА на 14-е сут роста, после чего наблюдался постепенный рост ОА до 21-е сут (рис. 1). Суммарная кривая РС смешанной культуры показывает ее физиологическое состояние, являясь результирующим показателем, и находится, как видно, сначала в области ОА под влиянием быстрорастущего партнера (актиномицета), а затем в области АОА, следуя значениям РС чистой культуры *A. variabilis* (рис. 1). Эта смешанная культура дала наибольший выход биомассы, что говорит о наилучшей совместимости в ней партнеров в наших опытах (таблица, № 1).

Для культуры *S. quadricauda* наблюдалось повышение ОА до 40% по отношению к контролю на 11-е сут роста, затем небольшое снижение ОА к 21-м сут. Суммарная кривая РС этой смешанной культуры (*S. cinereorectus* и *S. quadricauda*) на протяжении всего времени роста находилась в области ОА (рис. 2), выход биомассы этой культуры был существенно ниже, чем у первой пары (таблица, № 3).

Из результатов исследований видно, что самые подходящие партнеры, дающие наибольшую биомассу в смешанной культуре, обладали противоположной реакционной способностью культуральной

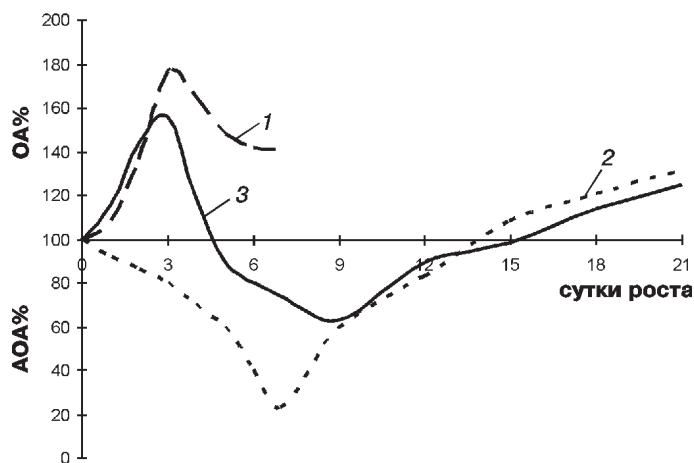


Рис. 1. Изменение реакционной способности (РС) нативных экзометаболических веществ в процессе роста смешанной культуры актиномицета *S. xanthochromogenes* и цианобактерии *A. variabilis*, а также отдельно у ее партнеров. 1 — *Streptomyces xanthochromogenes* шт. № 8; 2 — *Anabaena variabilis*; 3 — смешанная культура. ОА — окислительная активность экзометаболических веществ, % к контролю; АОА — антиокислительная активность экзометаболических веществ, % к контролю

жидкости, содержащей нативные экзометаболические вещества, т.е. активностями ОА и АОА в чистых культурах в процессе роста (рис. 1). Можно предположить, что в смешанной культуре экзометаболические вещества одного партнера, имеющие значение АОА, во многом или частично нейтрализуют экзометаболические вещества другого партнера, обладающие выраженными значениями ОА, что, согласно литературе [3, 4], более присуще экзометаболическим веществам с антагонистическим действием. Это отражается на суммарной кривой РС, имеющей меньшие значения в области ОА, что в конечном итоге способствует увеличению выхода биомассы смешанной культуры (таблица, рис. 1).

Таким образом, реакционную способность нативных экзометаболических веществ, выделяемых в культуральную жидкость у чистых культур микроорганизмов — предполагаемых партнеров смешанных культур или

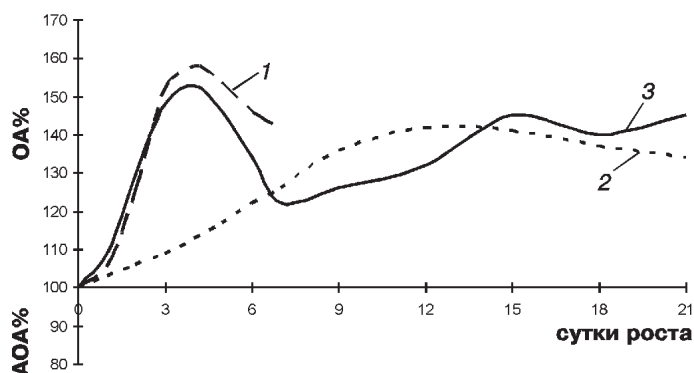


Рис. 2. Изменение реакционной способности (РС) нативных экзометаболических веществ в процессе роста смешанной культуры актиномицета *S. cinereorectus* шт. № 10 и зеленой водоросли *S. quadricauda*, а также отдельно у ее партнеров. 1 — *Streptomyces cinereorectus* шт. № 10; 2 — *Scenedesmus quadricauda*; 3 — смешанная культура. ОА, АОА — обозначения те же, что на рис. 1

ассоциативных пар, по нашему мнению, можно использовать как один из быстро определяемых экофизиологических критериев при выборе микроор-

ганизмов в качестве партнеров для создания таких культур в искусственных условиях, а также при их массовом культивировании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. М.: Наука, 2003. 348 с.
2. Заварзин Г.А. Развитие микробных сообществ в истории Земли // Тр. Ин-та микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. 2004. Вып. 12. С. 149—159.
3. Тамбиев А.Х. Летучие вещества, запахи и их биологическое значение. М.: Знание, 1974. 64 с.
4. Тамбиев А.Х. Реакционная способность экзометаболитов растений М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. 72 с.
5. Сиренко Л.А., Козицкая В.Н. Биологически активные вещества водорослей и качество воды. Киев: Наукова думка, 1988. 256 с.
6. Сакевич А.И. Экзометаболиты пресноводных водорослей. Киев: Наукова думка, 1985. 199 с.
7. Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. Экология актиномицетов. М.: ГЕОС, 2001. 256 с.
8. Schenk H.E.A. Cyanobacterial symbioses // The Prokaryotes / Eds. A. Ballows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer. N.Y.: Springer-Verlag, 1992. P. 3819—3854.
9. Gusev M.V., Baulina O.I., Gorelova O.A., Lobakova E.S., Korzhenevskaya T.G. Artificial cyanobacterium-plant symbioses // Cyanobacteria in symbiosis / Eds. A.N. Rai, B. Bergman, U. Rasmussen. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. P. 253—312.
10. Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв. М.: Наука, 2002. 282 с.
11. Емцев В.Т. Ассоциативный симбиоз почвенных diaзотрофных бактерий и овощных культур // Почвоведение. 1994. № 4. С. 74—84.
12. Douglas A.E. Symbiotic interaction. Toronto: Oxford Univer. Press, 1994. 148 p.
13. Rai A.N. Cyanobacterial-fungal symbioses: the cyanolichens // Handbook of Symbiotic Cyanobacteria / Ed. A.N. Rai. Boca Raton, Florida, USA: CRS Press, 1990. P. 9—41.
14. Rai A.N., Söderbäk E., Bergman B. Cyanobacterium-plant symbioses // New Phytologist. 2000. Vol. 147. P. 449—481.

Поступила в редакцию
05.08.10

THE REACTIVITY OF THE EXOMETABOLITES ALLOCATED IN THE CULTURES LIQUID OF MICROORGANISMS, AS A CRITERION OF COMPATIBILITY AT THE SELECTION OF THE MIXED CULTURES AND ARTIFICIAL ASSOCIATIONS

A.H. Tambiev, A.A. Lukyanov

The reactivity of the exometabolites allocated in the culture liquid in cultures of actinomycetes, cyanobacteria and microalgae as possible using like the ecophysiological criterion of the selection of partners for the create mixed cultures and associative pairs of microorganisms has been considered.

Key words: *exometabolites, reactivity of the exometabolites, mixed cultures, cyanobacteria, microalgae, actinomycetes.*

Сведения об авторах:

Тамбиев Александр Хапачевич — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: (495)939-25-87, e-mail: tambiev@mail.ru

Лукьянов Александр Андреевич — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: (495)939-25-87, e-mail: loockart@mail.ru