МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ*

УДК 57.02.001

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ЦИАНОАКТИНОМИЦЕТНЫЕ АССОЦИАЦИИ

Е.О. Омарова, Г.М. Зенова, В.К. Орлеанский, Е.С. Лобакова

(кафедра биологии почв)

Сообщества с участием цианобактерий широко распространены в природе. Примером служат цианобактериальные маты гидротерм и лагун, альго-цианобактериальные сообщества при "цветении" почвы (Домрачева, 2005).

Сообщества цианобактериальных матов, возникнув на ранних этапах развития Земли, проявляют удивительную резистентность на протяжении всей истории нашей планеты (Заварзин и др., 1993; Заварзин, 1995). Древними аналогами современных цианобактериальных матов являются строматолиты — наиболее ранние палеонтологические свидетельства жизни на Земле, демонстрирующие, что жизнь возникла и поддерживалась в виде сообществ (Бактериальная палеонтология, 2002). Именно эти цианобактериальные сообщества, процветающие в докембрии во внутриконтинентальных водоемах, сформировали первую биосферу с устойчивым круговоротом веществ (Заварзин, 1997). Они, являясь первыми колонизаторами суши, определили жизнь на Земле и динамику всех химических и физических процессов более чем 3 млрд лет назад.

В настоящее время господствует представление об эволюции органического мира сообществами, т.е. системами экологически связанных функциональных группировок. Более того, отдельные виды не могут сколько-нибудь длительно существовать вне сообщества. Это предполагает изучение не чистых культур микроорганизмов, а сообществ как единицы эволюции прокариот (Заварзин, 1987).

Цианобактериальные сообщества также широко распространены в местах первичного почвообразования. Известно явление формирования структур, напоминающих маты (ковры), которые в виде студенистых налетов покрывают до 60% поверхности почвы на полях в осенний период (Домрачева, 2005). Фототрофным ядром таких сообществ являются цианобактерии, с которыми метаболическими отношениями связан большой круг сапротрофных партнеров. В слизистых чехлах цианобактерий обитает огромное количество разнообразных микроорганизмов, использующих вещества слизи,

прижизненные выделения и отмирающие клетки бактерий. Наиболее тесные метаболические отношения, развивающиеся по типу мутуалистических, существуют между цианобактериями и олиготрофными бактериями-спутниками (Домрачева, 2005). И нельзя априори отрицать существование в них мицелиальных прокариот.

В местах первичного почвообразования — в водорослевых разрастаниях на скальных породах с выходами карбонатов — обнаружено большое количество актиномицетного мицелия, образующего с зелеными водорослями ассоциации типа актино-лишайника (Звягинцев, Зенова 2001). Наличие сапротрофного комплекса является непрямым условием процветания фототрофов.

Использование традиционного микробиологического подхода (метода чистых культур) удаляет нас от понимания аутоэкологии и синэкологии этих микроорганизмов. В природных консорциумах микроорганизмов реализуются такие метаболические связи, которые промоделировать в условиях чистых культур практически невозможно.

Обнаружение актиномицетов в природных цианобактериальных сообществах делает необходимым изучение экспериментальных цианоактиномицетных ассоциаций для выяснения функциональной роли мицелиальных прокариот в этих экосистемах.

Целью работы явилось выделение из цианобактериального мата и кораллоидных корней саговниковых растений культур актиномицетов и изучение взаимоотношений с цианобактериями в смешанных лабораторных культурах.

Материалы и методы

Объектами нашего исследования явились: культура цианобактерии *Oscillatoria terebriformis* (Ag.) Elenk. emend., выделенная из природного цианобактериального мата гидротерм Камчатки и хранящаяся в лаборатории несколько лет; культура свободноживущей цианобактерии *Anabaena variabilis* ATCC 29413, полученная из музея кафедры физиологии микроорганизмов биологического факультета МГУ; актиномицеты, изолированные из

* Материалы конференции "Взаимоотношения низших растений (грибов, водорослей, лишайников) с другими растениями биосенза". МГУ. Биологический факультет. 31 января—3 февраля 2006 г.

Таблица 1

Ассоциации актиномицетов и цианобактерий

Актиномицет	Цианобактерия	Источник выделения пар ассоциаций
<i>Streptomyces odorifer</i>	<i>Oscillatoria terebriformis</i>	Актиномицет из накопительной культуры <i>O. terebriformis</i> Цианобактерия из цианобактериального мата гидротерм Камчатки
<i>S. olivaceoviridis</i>	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Актиномицет из апогеотропных корней саговникового растения <i>Strangeria eriopus</i> Цианобактерия — музейная культура
<i>S. xanthochromogenes</i>	<i>A. variabilis</i> ATCC 29413	Актиномицет из апогеотропных корней саговникового растения <i>Cycas micholitzii</i> Цианобактерия — музейная культура

апогеотропных корней оранжевых саговниковых растений *Strangeria eriopus* и *Cycas micholitzii* (ГБС им. Н.В. Цицина РАН, г. Москва) и идентифицированные как *Streptomyces olivaceoviridis* шт. 1, *S. xanthochromogenes* шт. 1; актиномицет, выделенный из накопительной культуры цианобактерии *O. terebriformis* и идентифицированный как *S. odorifer* шт. 1. Перечисленные культуры цианобактерий и стрептомицетов служили компонентами пар ассоциаций (табл. 1).

Актиномицеты выделяли из накопительной культуры *O. terebriformis* и предварительно растертых апогеотропных корней саговников методом посева и рассыпки (соответственно) на агаризованную питательную среду. Выделение и культивирование стрептомицетов проводили на среде Гаузе-1 (Гаузе и др., 1983).

Поддержание монокультуры цианобактерий проводили: *O. terebriformis* — на среде Заварзина (Орлеанский, Герасименко, 1982); *A. variabilis* — на среде BG-11 (Stanier et al., 1971). Культивирование цианобактерий проводили на жидких и плотных питательных средах (последние содержали 2% агара) при температуре 24° и освещении 780 лк.

Получение смешанных цианобактериальных культур (табл. 1) проводили на среде BG-11 из семисуточного, выращенного в погруженной культуре на среде Г-1 мицелия стрептомицетов и цианобактерий (соотношение биомасс 1 : 1). Биомассу монокультур цианобактерий предварительно выращивали: *O. terebriformis* на среде Заварзина в течение 3 суток, а *A. variabilis* — в течение 3 недель на среде BG-11.

В качестве критериев ассоциативного взаимодействия стрептомицетов и цианобактерий в смешанных культурах использовали следующие показатели: наличие положительного тропизма стрептомицета к цианобактерии; стимуляция роста цианобактерии в ассоциации со стрептомицетом; обнаружение стрептомицета на поверхности и в глубоких слоях экспериментального цианобактериального мата; усиление фотосинтетической и азотфиксирующей активности цианобактерии в ассоциации со стрептомицетом; изменение антимик-

робных свойств ассоциации по сравнению с монокультурами стрептомицетов и цианобактерий.

1. Наличие положительного тропизма стрептомицета *Streptomyces odorifer* к цианобактерии *O. terebriformis* определяли следующим методом. На свежесейный "газон" стрептомицета на голодном агаре накладывали ядерные фильтры (d 0,75), на которые наносили одну бактериальную петлю биомассы монокультуры цианобактерии, выращенной в жидкой среде. Контрольные фильтры оставляли без цианобактерии. Площадь, занимаемую на фильтре мицелием стрептомицета, проросшего через фильтр, подсчитывали под микроскопом ($\times 400$) с предварительной окраской фильтров карболовым эритрозином. Наличие положительного тропизма стрептомицета к цианобактерии оценивали по величине коэффициента ассоциации (K_{as}), который рассчитывали как отношение площади, занимаемой мицелием стрептомицета, проникшего на фильтр с цианобактерией, к площади, занимаемой мицелием стрептомицета, проникшего на фильтр без цианобактерии. При $K_{as} > 1$ считали, что имеется положительный тропизм стрептомицета к цианобактерии. При $K_{as} < 1$ специфическое взаимодействие отсутствует.

Наличие положительного воздействия цианобактерии *A. variabilis* на рост стрептомицетов *S. olivaceoviridis*, *S. xanthochromogenes* регистрировали по интенсивному прорастанию и обрастанию колоний цианобактерий стрептомицетами при совместном посеве монокультур "газоном" на чашки Петри со средой BG-11.

Наличие положительного таксиса *A. variabilis* к стрептомицетам *S. olivaceoviridis*, *S. xanthochromogenes* определяли, помещая в центр агаровой пластинки среды BG-11 биомассу стрептомицета, выращенную на среде Г-1, а по окружности пластинки на расстоянии около 2 см от инокулята стрептомицета — биомассу *A. variabilis*. О наличии таксиса культуры *A. variabilis* судили по величине коэффициента ориентации, т.е. соотношению площади, занимаемой трихомами цианобактерии, растущими по направлению к стрептомицету и в противоположном направлении (Горелова, 2005). Величи-

на коэффициента ориентации > 1 демонстрировала положительный таксис цианобактерии к стрептомицету.

2. Оценку роста цианобактерии *Oscillatoria terebriformis* в смешанной с *S. odorifer* культуре при помещении инокулята на поверхность глинистых минералов монтмориллонита, каолинита, бентонита проводили сравнением радиуса “пятна” роста ассоциации и монокультуры цианобактерии на поверхности минералов.

Сравнивали радиальную скорость роста колоний стрептомицета *S. odorifer* на среде с культуральной жидкостью монокультуры *O. terebriformis* (1% по объему среды) в качестве источника углерода с радиальной скоростью роста на средах с крахмалом, сахарозой, глюкозой. Контролем служил рост колоний стрептомицета на минеральной среде Г-1.

Сравнивали диаметр колоний стрептомицетов *S. olivaceoviridis*, *S. xanthochromogenes* при прорастании через сплошной “газон” *A. variabilis* при одновременном совместном посеве на агаровую среду BG-11 с размерами колоний монокультуры стрептомицетов.

3. Обнаруживали стрептомицет на поверхности и в глубоких слоях цианобактериального мата, сконструированного в лаборатории из накопительной культуры *O. terebriformis* и *S. odorifer*. Формирование экспериментального цианобактериального мата проводили в одной серии опытов из смешанной культуры цианобактерии *O. terebriformis* и стрептомицета, в другой — только цианобактерии. Для этого на агаровую подложку помещали инокулят смешанной культуры или монокультуры цианобактерии, которые засыпали порошком CaCO_3 . При обрастании цианобактериями частичек порошка и формировании на поверхности порошка пленки ее снова засыпали слоем мела, добиваясь формирования мата, состоящего из 8–10 слоев минерала, чередующегося со слоями цианобактерии. Присутствие стрептомицета на поверхности и в глубоких слоях экспериментального цианобактериального мата выявляли по наличию колоний *S. odorifer* при высеве фрагментов материала на чашки Петри со средой Г-1.

4. Фотосинтетическую активность цианобактерии *O. terebriformis* в ассоциации со стрептомицетом *S. odorifer* и в монокультуре определяли по количеству хлорофилла *a*, образованного при выращивании культур на среде Заварзина на свету в течение 7 суток (Федоров, 1979).

5. Антимикробные свойства ассоциации и составляющих ее компонентов — стрептомицета *S. odorifer* и цианобактерии *O. terebriformis* по отношению к исследуемым тест-культурам бактерий, стрептомицетов, грибов и дрожжей проверяли методом блоков (Егоров, 1980). Измеряли радиус зоны отсутствия роста тест-микроба вокруг блока испыты-

мой культуры. В опытах по определению антибиотической активности смешанную культуру стрептомицета и цианобактерии предварительно выдерживали на свету в течение 3–5 суток.

6. Азотфиксирующую активность цианобактерии *A. variabilis* в ассоциации с *S. olivaceoviridis* и монокультуре определяли методом ацетиленредукции на газовом хроматографе (Hardy R. et al., 1973).

Результаты и обсуждение

Исследуемые культуры стрептомицетов *S. odorifer* шт. 1, *S. olivaceoviridis* шт. 1 и *S. xanthochromogenes* шт. 1 не обнаруживали антагонизма к цианобактериям *A. variabilis* (рис. 1) и *O. terebriformis*.

Рис. 1. Активный рост цианобактерии *Anabaena variabilis* и стрептомицета *Streptomyces olivaceoviridis* в ассоциации

Гифы стрептомицета *S. odorifer* проявляли положительный тропизм к клеткам цианобактерии *O. terebriformis*. Коэффициент ассоциативности (K_{as}) в вариантах опыта с этим стрептомицетом оказался больше 1. Гифы стрептомицета, проникающие на фильтр с цианобактерией, оплетали нити последних. Нити *O. terebriformis* и гифы стрептомицета находятся не в лизированном состоянии, что свидетельствует об активной жизненной форме компонентов в ассоциации.

Наблюдали положительный таксис стрептомицетов *S. olivaceoviridis* и *S. xanthochromogenes* к культуре *A. variabilis*. Рост колоний стрептомицетов сосредоточивался на колониях цианобактерии (рис. 2).

Культура *A. variabilis* также проявляла положительный таксис к стрептомицетам *S. olivaceoviridis* и *S. xanthochromogenes*, о чем свидетельствует коэффициент ориентации больше 1.

При сравнении роста ассоциации *O. terebriformis* и *S. odorifer* и монокультуры цианобактерии на глинистых минералах установлено, что как при поверхностном обрастании кусочков, так и при засыпании биомасс растертым порошком минералов

Рис. 2. Рост колоний стрептомицета *Streptomyces xanthochromogenes* (1) на колонии цианобактерии *Anabaena variabilis* (2)

радиус пятна позеленения поверхности был более обширным ($r = 4$ см) в случае ассоциации, чем монокультуры цианобактерии ($r = 1$ см). Это свидетельствует о более активном росте цианобактерии в ассоциации.

Установлено, что диаметр колоний стрептомицетов *S. olivaceoviridis* и *S. xanthochromogenes*, проросших через газон *A. variabilis* при последовательном посеве стрептомицета и цианобактерии на плотную среду BG-11, был больше, чем размеры колоний монокультур стрептомицетов, выросших в тех же условиях (рис. 3). Показана максимальная радиальная скорость роста стрептомицета *S. odorifer*

($Kr = 0,71$ мм/сут.) на среде с культуральной жидкостью цианобактерии *O. terebriformis* в качестве источника углерода по сравнению с показателями роста культуры на средах с различными углеводами ($Kr = 0,58–0,65$ мм/сут.).

Установлено достоверное увеличение фотосинтетической активности цианобактерии *O. terebriformis* в смешанной со стрептомицетом *S. odorifer* культуре по сравнению с фотосинтетической активностью монокультуры цианобактерии (табл. 2).

Таблица 2

Концентрация хлорофилла *a* в монокультуре *O. terebriformis* (Ag.) Elenk. emend. и в ассоциации со стрептомицетом *S. odorifer* (мг/г сырого веса)

Повторности	Монокультура цианобактерии	Ассоциация
1	36,8	43,8
2	35,5	47,8
3	41,8	41,8
4	33,5	47,8
5	30,8	47,0
6	34,8	44,3
7	30,8	43,8
8	36,3	35,5
9	37,5	35,5
10	29,3	43,0
Среднее	34,7 + 3,74	43,0 + 4,46

Рис. 3. Относительный диаметр колоний *S. xanthochromogenes* на плотной питательной среде и проросших сквозь "газон" цианобактерии *Anabaena variabilis*

Выявили различия в антимикробной активности ассоциации *O. terebriformis* и *S. odorifer* по сравнению с монокультурами цианобактерии и стрептомицета (табл. 3). Отмечено усиление антибиотической активности стрептомицета в ассоциации по сравнению с чистой культурой против культур бактерий *Bacillus cereus*, *Arthrobacter globiformis*, *Micrococcus agilis*, против культуры дрожжей *Rhodotorula* sp., а также против культуры гриба *Fusarium sporotrichiella* и усиление антимикробных свойств цианобактерии *O. terebriformis* в отношении тест-культуры *Streptomyces prunicolor*. Установлено, что ассоциация стрептомицета и цианобактерии проявляла антимикробную активность к тест-культурам *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces xanthocidicus*, *Spirillum* sp., *Pseudomonas* sp. и *Fusarium oxysporum*, к которым монокультуры антагонизма не проявляли.

Развитие цианоактиномицетной ассоциации *O. terebriformis* и *S. odorifer* на

Таблица 3

Антимикробные свойства стрептомицета *Streptomyces odorifer*,
цианобактерии *Oscillatoria terebriformis* (Ag.) Elenk. emend.
и ассоциации стрептомицета и цианобактерии
(радиус зоны лизиса тест-культуры, мм)

Тест-культуры	Монокультуры		Ассоциация
	стрепто-мицет	циано-бактерия	
<i>Bacillus cereus</i>	5,5	0	8,5
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	4,0	0	2,0
<i>Micrococcus agilis</i>	4,2	0	15,0
<i>Arthrobacter globiformis</i>	4,5	0	17,5
<i>Pseudomonas</i> sp.	5,5	0	1,5
<i>Streptomyces prunicolor</i>	0	3,9	17,5
<i>S. xanthocidicus</i>	0	0	10
<i>Fusarium sporotrichiella</i>	0	0	17,5
<i>F. oxysporus</i>	0	0	0
<i>F. graminisarum</i>	0	10	0
<i>Saccharomyces</i> sp.	0	0	0
<i>Rhodotorula</i> sp.	1,5	0	12,5

глинистой породе каолин приводило к изменениям в ее структуре. Рентгендифрактометрическим методом зафиксировано разукрупнение доминирующего в породе минерала каолинита, о чем свидетельствует снижение интенсивности рефлексов минерала. В породе происходит преобразование хлорита,

наиболее легко выветривающегося минерала, богатого элементами питания.

Таким образом, полученные нами экспериментальные результаты свидетельствуют об ассоциативном характере взаимодействия исследуемых культур в смешанной модельной системе.

Исследуемые в работе культуры цианобактерий и актиномицетов выделены из природных экосистем — цианобактериального мата и корней саговниковых растений, формирующих уникальный симбиоз с азотфиксирующими цианобактериями (Lindblad, Costa, 2002). Наши данные о взаимодействии исследуемых организмов подтверждают известное положение (Сиренко, Козицкая, 1998) о том, что положительные связи между организмами, длительно сосуществующими в микрокосмах, более вероятны, чем между случайно выбранными компонентами.

В своей работе мы опирались на концепцию “эффективных микроорганизмов”, являющихся смешанными культурами, которые могут быть использованы для поддержания стабильности окружающей среды и сохранения природных запасов. Конечной целью нашей работы является подбор микроорганизмов, которые физиологически и экологически совместимы друг с другом и могут быть использованы в практических целях в ассоциации.

* * *

Работа выполнена при поддержке НШ-8797.2006.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бактериальная палеонтология. 2002 / Под ред. А.Ю. Розанова. М. 188 с.
- Вернадский В.И. 1940. Биогеохимические очерки. М. 250 с.
- Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. 1983. Определитель актиномицетов. М. 245 с.
- Горелова О.А. 2005. Растительные синцианозы: изучение роли макропартнера на модельных системах: Автореф. дис. докт. биол. наук. М. 47 с.
- Домрачева Л.И. 2005. “Цветение” почвы и закономерности его развития. Сыктывкар. 336 с.
- Егоров Н.С. 1980. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. М. 96 с.
- Заварзин Г.А. 1987. Эволюция и биоценоотические кризисы. М. 158 с.
- Заварзин Г.А., Герасименко Л.М., Жилина Т.Н. 1993. Цианобактериальные сообщества гиперсоленых лагун Сиваша // Микробиология. 62. № 6. 1113—1126.
- Заварзин Г.А. 1995. Смена парадигмы в биологии // Вестн. РАН. 65. № 1. 8—23.
- Заварзин Г.А. 1997. Становление биосферы // Микробиология. 66. № 6. 725—734.
- Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. 2001. Экология актиномицетов. М. 256 с.
- Орлеанский В.К., Герасименко Л.М. 1982. Лабораторное моделирование термофильного цианобактериального сообщества // Микробиология. 51. № 4. 538—542.
- Сиренко Л.А., Козицкая В.Н. 1988. Биологически активные вещества водорослей и качество воды. Киев. 256 с.
- Федоров В.Д. 1979. О методах изучения фитопланктона и его активности. М. С. 58—61.
- Цавкелова Е.А., Лобакова Е.С., Коломейцева Г.Л., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. 2003. Ассоциативные цианобактерии, выделенные с корней эпифитных орхидей // Микробиология. 72. № 1. 105—110.
- Hardy R., Burns R., Holsten B. 1973. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation // Soil Biol. Biochem. 5. N 1. 41—83.
- Lindblad P., Costa J.-L. 2002. The cyanobacterial-cycad symbiosis // Biol. and Environment. 102 B. N 1. 31—34.

Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., unicellular blue-green algae (order Chlorococcales) // *Bacteriol. Rev.* **35**. 171–205.
Cohen-Bazire G. 1971. Purification and properties of

EXPERIMENTAL ASSOCIATIONS OF CYANOBACTERIA AND ACTINOMYCETES

E.O. Omarova, G.M. Zenova, V.K. Orleanskii, E.S. Lobakova

Associations of cyanobacteria with actinomycetes are not investigated. The task was set in this work to study the biological aspects of coexistence of free-living cyanobacterium *Anabaena variabilis* with actinomycetes isolated from coralloid roots of *Strangeria eriopus* и *Cycas micholitzii* and cyanobacterium *Oscillatoria terebriformis* (Ag.) Elenk. emend., which were isolated from the natural cyano-bacterial mat of Kamchatkan thermal spring, with actinomycetes, isolated from accumulating culture of cyanobacterium. Positive tropism of streptomycetes hyphes to the cyanobacterial trichoms and cyanobacterium to streptomycetes were observed. Stimulation of growth of *O. terebriformis* in the associated culture with the streptomycete was marked. The increase of the fixation of nitrogen by *A. variabilis* and of photosynthetic activity by *O. terebriformis* in the associated culture with the streptomycete was marked. On this background associative interaction cyanobacteria with streptomycetes are positively discussing.