УДК 574.5

Г.М. ЗЕНОВА[1], Е.О. ОМАРОВА[1], А.И. КУРАПОВА[1], В.К. ОРЛЕАНСКИЙ[2], Н.В. ШАДРИН[3]

[1]Московский гос. ун-т им. М.В. Ломоносова, кафедра биологии почв, Ленинские горы, 1, 119991 Москва, Россия
e-mail: zenova38@mail.ru
[2]Ин-т микробиологии РАЕ им. С.Н. Виноградского, пл. 60 лет Октября, д. 7, Москва, Россия
e-mail: orleanor@mail.ru
[3]Ин-т биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАН Украны, просп. Нахимова, 2, 99011 Севастополь, Украина
e-mail: snickolai@yandez.ru

МОДЕЛЬНЫЕ АССОЦИАЦИИ *CYANOPROKARYOTA* И АКТИНОМИЦЕТОВ

В экспериментальных ассоциациях выявлены специфические взаимодействия культур *Oscillatoria terebriformis* (Ag.) Elenk. (*Cyanoprokaryota*) и актиномицета *Streptomyces odorifer* (Rullman 1895) Waksman 1953, выделенного из альгобактериальных матов гиперсоленых озер Крыма. Эти взаимодействия определяются: по наличию положительного тропизма гиф стрептомицета к нитям *O. terebriformis*; по усилению фотосинтетической активности *O. terebriformis* в ассоциации в сравнении с монокультурой; по изменению антимикробных свойств таллома ассоциации в сравнении с монокультурами стрептомицета и осциллатории. Обсуждаются вопросы функциональной роли актиномицетов в природных альгобактериальных матах.

Ключевые слова: актиномицеты, альгобактериальные маты, ассоциации *Cyanoprokaryota* и актиномицетов.

Введение

Синезеленые водоросли (*Cyanoprokaryota)* и актиномицеты привлекают пристальное внимание исследователей. Возникнув на ранних этапах истории Земли, они демонстрируют удивительную резистентность на протяжении всей истории нашей планеты. Уже в докембрийских отложениях постоянно встречаются литифицированные органические остатки микробного происхождения – нити, определяемые как *Cyanoprokaryota*, и более тонкие ветвящиеся нити, которые относят к актиномицетам (Бактериальная …, 2002).

Сохранилось ли подобное взаимодействие фототрофных и гетеротрофных организмов до наших дней? Примером служат альгобактериальные маты – бентосные популяции микроорганизмов, где *Cyanoprokaryota*

являются основными продуцентами органического вещества и отвечают за структуру мата. Именно эти альгобактериальные сообщества, являясь древними обитателями Земли, процветавшие в докембрии в мелководных водоемах, сформировали кислородную атмосферу планеты в далеком прошлом (Заварзин, 1997).

Альгобактериальные сообщества являются высокопродуктивной системой. В этой системе синезеленые водоросли (фототрофный компонент) являются главным продуцентом органического вещества всего сообщества, которое может использоваться в качестве источника углерода и энергии гетеротрофными компонентами сообщества. Вступая в ассоциации с бактериями, синезеленые водоросли участвуют в формировании трофических цепей (Заварзин, 1997).

В состав альгобактериального сообщества входят разнообразные бактерии, включая актиномицеты. Известны ассоциации актиномицетов с зелеными водорослями (актинолишайники), где актиномицеты участвуют в стабилизации бактериального блока системы и усиливают фотосинтетическую активность водоросли (Звягинцев, Зенова, 2001).

Актиномицеты обнаружены в кораллоидных корнях саговниковых растений, где доминантным микросимбионтом являются гетероцистообразующие *Cyanoprokaryota*, и в альгобактериальных матах супра- и сублиторали гиперсоленых водоемов Крыма (Williams, Robinson, 1981; Звягинцев, Зенова, 2001), Азии (Collins et al., 2002), Антарктиды (Jungblut et al., 2005), Америки (Omarova et al., 2005). Ассоциации актиномицетов с синезелеными водорослями обычны в современных строматолитах залива Шарк (Австралия) (Papineau et al., 2005).

Обнаружение актиномицетов в природных альгобактериальных матах требует изучения экспериментальных ассоциаций, состоящих из представителей *Cyanoprokaryota* и актиномицетов для выяснения функциональной роли актиномицетов в этих экосистемах. Исследование взаимодействия *Cyanoprokaryota* и актиномицетов в ассоциациях составляет новый аспект в изучении экологии этих организмов. Этому и посвящена данная работа.

Материалы и методы

Объектами исследования служила коллекция культур ИНМИ РАН: альгологически чистая культура *Oscillatoria terebriformis* и культура актиномицета *Streptomyces odorifer* (Rullman 1895) Waksman 1953, выделенная из альгобактериальных матов гиперсоленых озер Крыма. В описании структуры матов отмечено, что культуры видов рода *Oscillatoria*

широко распространены в альгобактериальных матах гиперсоленых озер Крыма (Миходюк и др., 2005).

Для оценки видового разнообразия актиномицетов в альгобактериальных матах гиперсоленых озер пробы отбирали в супра- и сублиторали Бакальского, Кояшского и Киркояшского озер в августе 2005 г. Выделение актиномицетов из отобранных проб проводили методом посева суспензии альгобактериального мата на агаризованную среду минеральный агар-1 (МА-1) (Гаузе и др., 1983). Выделенные актиномицеты идентифицировали по определителям (Гаузе и др., 1983; Определитель …, 1997). Для создания экспериментальной ассоциации использовали *S. odorifer*, выделенный из альгобактериального мата оз. Кояшское, и *O. terebriformis*. Экспериментальные ассоциации формировали в течение 4 суток из 7-суточного мицелия стрептомицета, выращенного в погруженной культуре на среде МА-1, и *O. terebriformis*, выращенной на среде Заварзина следующего состава, г/л: $CaCl_2$ – 0,1; NH_4Cl – 0,1; $MgSO_4$ – 0,2; H_3BO_3 – 0,1; $NaHCO_3$ – 0,3; K_2HPO_4 – 0,1; Na_2SiO_3 – 0,25; $FeSO_4$ – 0,01; смесь микроэлементов (A_5) – 1 мл (Заварзин, 1997). Компоненты инокулята смешивали (1:1) и выращивали в жидкой или на агаризованной среде Заварзина в статическом режиме в люминостате при постоянном освещении (780 лк и температуре 24±1 ^oC).

Мы разработали методику исследования взаимодействия стрептомицета и осциллатории в экспериментальной ассоциации. В качестве критериев для определения характера взаимодействия культур стрептомицета и осциллатории использовали следующие показатели: 1) наличие положительного тропизма стрептомицета к *O. terebriformis*; 2) усиление фотосинтетической активности *O. terebriformis* в ассоциации со стрептомицетом по сравнению с монокультурой; 3) изменение спектра антибиотической активности экспериментальной ассоциации по сравнению с монокультурами стрептомицета и осциллатории.

Наличие положительного тропизма стрептомицета к осциллатории определяли следующим образом. На свежезасеянный «газон» стрептомицета на голодном агаре накладывали ядерные фильтры (d 0,75 мкм), на которые наносили одну бактериальную петлю биомассы осциллатории, выращенной на среде Заварзина. Контрольные фильтры оставляли без осциллатории. Площадь, занимаемую на фильтре мицелием стрептомицета, проросшего через фильтр, подсчитывали под микроскопом (х400) с предварительной окраской фильтров карболовым эритрозином (Методы …, 1991). Наличие положительного тропизма стрептомицета к осциллатории оценивали по величине коэффициента ассоциации (K_{as}), который рассчитывали как отношение площади, занимаемой мицелием

стрептомицета, проникшего на фильтр с осциллаторией, к площади, занимаемой мицелием стрептомицета, проникшего на контрольный фильтр. При $K_{as} > 1$ считали, что имеется положительный тропизм стрептомицета к осциллатории, при $K_{as} < 1$ специфическое взаимодействие отсутствует.

Фотосинтетическую активность осциллатории в ассоциации и монокультуре определяли по количеству хлорофилла *a* (Федоров, 1979), образованного при выращивании ассоциации и монокультуры в жидкой среде Заварзина на свету в течение 4 сут.

Антимикробную активность осциллатории по отношению к стрептомицету и стрептомицета по отношению к осциллатории проверяли методом блоков (Егоров, 1980). Этот метод использовали и для установления антимикробной активности стрептомицета и осциллатории в ассоциации и монокультурах по отношению к исследуемым тест-культурам бактерий, стрептомицетов, грибов и дрожжей. Измеряли радиус зоны отсутствия роста тест-микроба вокруг блока исследуемой культуры.

Результаты и обсуждение

Из отобранных проб альгобактериальных матов при посеве на среду МА-1 выделено 15 штаммов актиномицетов, принадлежащих к роду *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, к видам: *S. griseus* subsp. *griseus* (Krainsky 1940) Waksman et Henrici 1948, *S. globisporus* subsp. *globisporus* (Krasilnikov 1941) Waksman 1953, *S. viridiflavus* (Locci et Schofield 1989) Witt et Stackebrandt 1991, *S. alboniger* Porteret et al. 1952, *S. californicus* (Waksman et Curtis 1916) Waksman et Henrici 1948, *S. olivaceoviridis* (Preobrazhenskaya et Ryabova 1957) Pridham et al. 1958, *S. cirratus* Koshiyama et al. 1963, *S. sindenensis* Nakazawa et Fujii 1857, *S. carpaticus* Maksimova et Terekhova 1986, *S. odorifer* (Rullman 1895) Waksman 1953.

Гифы *S. odorifer* проявляли положительный тропизм к нитям *O. terebriformis*. Коэффициент ассоциативности (K_{as}) оказался больше единицы. Гифы стрептомицета, проникающие на фильтр с водорослью, оплетали нити водоросли.

Установлено достоверное увеличение фотосинтетической активности осциллатории в ассоциации со стрептомицетом (концентрация хлорофилла *a* 43,0 ± 4,46 мг/г биомассы осциллатории при выращивании на свету в среде Заварзина в течение 4 сут) по сравнению с фотосинтетической активностью монокультуры (34,7 ± 3,74 мг/г биомассы осциллатории, выращенной в тех же условиях, что и ассоциация, см. методы).

Отмечено отсутствие антагонистического взаимодействия между исследуемыми культурами *S. odorifer* и *O. terebriformis*. Об отсутствии антагонистического действия стрептомицета по отношению к осциллатории и осциллатории по отношению к стрептомицету судили по отсутствию зоны угнетения роста осциллатории вокруг блока стрептомицета и, соответственно, отсутствию зоны угнетения роста стрептомицета вокруг блока осциллатории.

Выявлено различие антагонистических свойств стрептомицета и осциллатории в монокультурах и в ассоциации. Отмечено усиление антибиотической активности стрептомицета по сравнению с культурами бактерий *Bacillus cereus* Frankl and Frankl 1887, *Arthrobacter agilis* (Ali-Cohen 1889) Koch et al. 1995, *Micrococcus* sp. по сравнению с культурой дрожжей *Rhodotorula* sp. и усиление антимикробных свойств осциллатории в отношении тест-культуры *Streptomyces prunicolor* (см. таблицу). Исследованная ассоциация проявляет антимикробную активность к тест-культурам *Streptomyces xanthocidicus* Asahi et al. 1966 и *Fusarium* sp., к которым монокультуры стрептомицета и осциллатории не проявляют антагонизма.

Таблица. **Радиусы зон лизиса тест-культур микроорганизмов (мм), образованных при действии стрептомицета, осциллатории и ассоциации на тест-культуры**

Тест-культура	*Streptomyces odorifer*	*Oscillatoria terebriformis*	Ассоциация
Bacillus cereus	5,5	0	8,5
Rhodococcus erythropolis	4,0	0	2
Micrococcus sp.	4,2	0	15
Arthrobacter globiformis	4,5	0	17,5
Pseudomonas sp.	5,5	0	1,5
Streptomyces prunicolor	0	3,9	17,5
S. xanthocidicus	0	0	10
Fusarium sp.	0	0	17,5
F. oxysporus	0	0	0
F. graminisarum	0	10	0
Saccharomyces sp.	0	0	0
Rhodotorula sp.	1,5	0	12,5

Заключение

Данные о наличии положительного тропизма гиф стрептомицета к нитям осциллатории, об усилении фотосинтетической активности осцил-

латории и изменении антимикробных свойств стрептомицета и осциллатории в модельной ассоциации по сравнению с монокультурами свидетельствуют о симбиотическом характере взаимодействия *O. terebriformis* и *S. odorifer* в модельной ассоциации. Актиномицеты, как ассоциативные симбионты альгобактериальных матов гиперсоленых озер, очевидно, могут оказывать позитивное воздействие на развитие мата в целом вследствие стимулирующего влияния на фотосинтезирующую способность *Cyanoprokaryota* и повышения защиты мата от других нежелательных организмов за счет выделения антибиотиков. Изучение ассоциации актиномицетов с *Cyanoprokaryota* необходимо для выяснения функционирования природных альгобактериальных матов и циклов биогенов в водоемах.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ грант № 08-04-90201-Монга, Программы Президиума РАН «Происхождение и эволюция биосферы». Авторы благодарны О.С. Миходюк и О.Ю. Премину за помощь в работе.

G.M. Zenova[1], E.O. Omarova[1], A.I. Kurapova[1], V.K. Orleanskiy[2] & N.V. Shadrin[3]

[1]Department of Soil Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University,
1, Leninskiye Gory, 119991 Moscow, Russia
e-mail: zenova38@mail.ru
[2] S.N. Vinogradskiy Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences,
7, 60 Let Oktiabria Square, Moscow, Russia
e-mail: orleanor@mail.ru
[3] A.O. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas, National Academy of Sciences of Ukraine,
2, Nakhimov Pr., 99011 Sevastopol, Crimea, Ukraine
e-mail: snickolai@yandez.ru

THE MODEL ASSOCIATIONS OF *CYANOPROKARYOTA* AND ACTINOMYCETE

In experimental associations of *Cyanoprokaryota* and Actinomycetes isolated from natural algal-bacterial mats of hypersaline lakes of Crimea the specific interactions of *Oscillatoria terebriformis* (Ag.) Elenk. (*Cyanoprokaryota*) and *Streptomyces odorifer* (Rullman 1895) Waksman 1953 were revealed. They included: positive tropism of streptomyces hyphae to *O. terebriformis*; stimulation of photosynthetical activity of *O. terebriformis* in association with streptomyces comparing to monoculture; changing of antimicrobial properties of association in comparison with monocultures of *Streptomyces* and *Oscillatoria*. Functional role of actinomycetes in natural algal-bacterial mats is discussed.

Keywords: algal-bacterial mats, associations of *Cyanoprokaryota* and Actinomycetes.

Бактериальная палеонтология: Уч. пособ. / Под ред А.Ю. Розанова. – М., 2002. – 188 с.

Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А. и др. Определитель актиномицетов. – М.: Наука, 1983. – 245 с.

Заварзин Г.А. Становление биосферы // Микробиология. – 1997. – **66**, № 6 – С. 725-734.

Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. Экология актиномицетов. – М.: Изд-во ГЕОС, 2001. – 257 с.

Егоров Н.С. Микробы-антагонисты и биологические методы определе ния антибиотической активности. – М.: Высш. шк., 1980. – 96 с.

Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: Изд-во МГУ, 1991 – 303 с.

Миходюк О.С., Орлеанский В.К., Шадрин Н.В., Герасименко Л.М. Современные цианобактериальные маты как аналоги биоценозов докембрия // Современная палеонтология: классические и новейшие методы. – М., 2005. – С. 15-28.

Определитель бактерий Берджи. – М.: Мир, 1997. – 1057 с.

Федоров В.Д. О методах изучения фитопланктона и его активности. – М.: Изд-во МГУ, 1979. – 167 с.

Collins M., Lawson P.A., Labrenz M., Tindall B.J. et al. Nesterenkonia lacusekhoensis sp. nov., isolated from hypersaline Ekho Lake, East Antarctica, and emended description of the genus *Nesterenkonia* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2002. – **52**, N 4. – P. 1145-50.

Jungblut A.D., Hawes I., Moutfort D. et al. Diversity within cyanobacterial mat co mmunities in variable salinity meltwater ponds of MC Murdo Ice Shelf, Antarctica // Environ. Microbiol. – 2005. – **7**, N 4. – P. 519-29.

Omarova E.O., A.M. Kurapova, Orleansky V.K. et al. Actinomycetes and Cyanobacteria as part of aq uatic communities of alternatly drying lakes in the Crimea // Intern. Sci. Conf. «Aquatic Ecology at the Dawn of XX1 Century» (Oct., 2005). Abstr. – SPb.: ZIN Press, 2005. – P. 68.

Papineau D., Walker J.J.M., Stephen J.P., Norman R. Composition and structure of microbial communities from stromatolites of Hamelin pool in shark bay, Western Australia // Appl. Environ . Microbiol. – 2005. – **712**, N 8. – P. 4822-4832.

Williams S.T., Robinson C.S. The role of streptomycetes in decomposition of chitin in acid soils // J. Gen. Microbiol. – 1981. – **127**. – P. 55-63.

Получена 05.10.09

Рекомендовала к печати О.Н. Виноградова