УДК 581.192:546

ДИАЛИЗНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

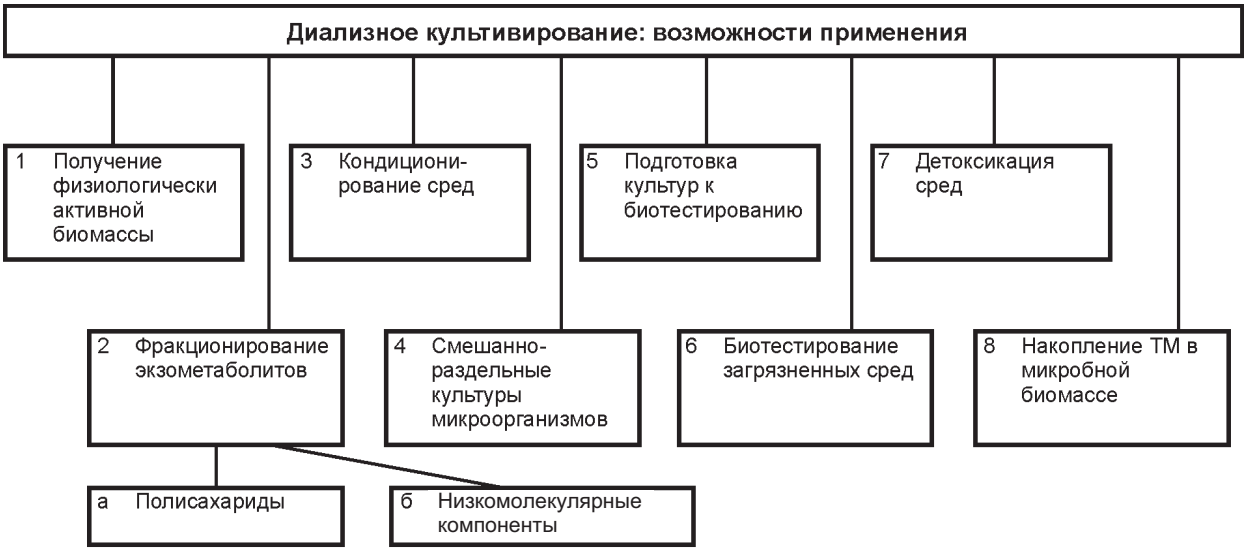
Я.В. Саванина, А.Ф. Лебедева, Е.Л. Барский

(кафедра физиологии микроорганизмов; e-mail:gene_b@mail.ru)

Физиологические ответы клеточных культур цианобактерий и микроводорослей на действующие экологические факторы в значительной степени зависят от условий их культивирования. Наиболее простым методом представляется периодическое суспензионное культивирование, дающее возможность наблюдать все фазы краткого жизненного цикла и быстрого накопления биомассы. Культура иммобилизованных клеток характеризуется сниженной скоростью роста и фотосинтеза при сохранении высокой скорости метаболизма. Диффузионное культивирование предполагает отделение исследуемой суспензионной культуры клеток от внешнего объема среды мембраной с размерами пор, пропускающих соединения с определенной молекулярной массой, через которую осуществляется диффузия веществ (Portner, Markl, 1998). Культура может помещаться как в камеру, ограниченную фильтрами (Parker, Bold, 1961), так и в мешок из селективной мембраны (Сидорова, Максимова, 1985; Гусев и др., 1988). Данная разновидность называется диализным культивированием: диализный мешок с клетками микроорганизмов погружается в значительно больший объем "внешней среды", что обеспечивает свободное выведение продуктов обмена и поступление субстрата. Метод известен с 70-х гг. XX в. и использовался главным образом для изучения влияния экологических факторов на фитопланктон (Schultz, Gerhardt, 1969; Sakshaug, 1977).

Метод пригоден для изучения разных классов микроорганизмов: цианобактерий, зеленых микроводорослей, гетеротрофных бактерий. Исследуемая суспензионная культура находится во внутреннем объеме двойного сосуда. Особенности метода лучше проявляются при максимальном соотношении поверхности и объема диализной мембраны: лучшая форма диализного мешка не шар, а длинный цилиндр, полностью погруженный в 5—10-кратный объем "внешней среды".

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; скорость роста в диализной культуре значительно выше, чем в периодической. Таким образом, в относительно небольшом объеме диализного мешка накапливается значительная биомасса физиологически активных клеток, что может быть использовано как для получения биомассы, так и экзометаболитов. Диализная мембрана разделяет внеклеточные метаболиты на высокомолекулярные, накапливающиеся в диализном мешке, и низкомолекулярные — во внешнем объеме. Клетки, сконцентрированные в диализном мешке, находятся в стерильных условиях, но обмениваются метаболитами с "внешней средой", что позволяет использовать их для изучения взаимодействия культур на уровне продуктов метаболизма (смешанно-раздель-



Возможности использования метода диализного культивирования

ные культуры) и наблюдать за изменением параметров роста каждой из культур. Инокулят в диализном мешке легко перемещать из одной среды в другую, что позволяет использовать его для биоиндикации загрязнений природной среды. Смешанно-раздельные культуры благодаря взаимной регуляции компонентов характеризуются повышенной устойчивостью к воздействию внешних факторов и способствуют как детоксикации среды, так и максимальному накоплению ряда веществ из среды в биомассе.

Исходя из этого можно предложить такие варианты (рисунок) применения метода диализного культивирования, как: получение активной биомассы, получение и предварительное фракционирование экзометаболитов, кондиционирование сред для "пробуждения" трудно культивируемых форм и выделения компонентов из естественных симбиозов, биоиндикация загрязнений природной среды, включая предварительное истощение клеточных резервов для увеличения чувствительности культур, подбор компонентов для смешанных культур, детоксикация загрязненных сред и извлечение ценных металлов.

I. Диализные культуры

1. Получение активной биомассы

Рост цианобактерий и зеленых микроводорослей в диализной культуре соответствует обычной S-образной кривой. Клетки начинают расти после лаг-периода, длительность которого составляет 3—4 сут. Следующая за ним экспоненциальная фаза роста переходит в стационарную к 15—18 сут. культивирования. Интенсивность роста при диализном культивировании выше, чем при периодическом, при этом длительность лаг-фазы и время перехода от экспоненциальной фазы роста к стационарной остаются приблизительно такими же (Лебедева и др., 2002).

Диализная культура цианобактерий характеризуется увеличением продолжительности стационарной фазы с сохранением при этом высокой физиологической активности клеток. Биомасса диализной культуры к стационарной фазе в 5—10 раз выше, чем в периодической: максимальная концентрация клеток цианобактерий *Anacystis nidulans* и *Anabaena variabilis* — $32—36 \cdot 10^6$ кл./мл; продолжительность стационарной фазы роста может составлять 2,5—4 мес. После достижения стационарного состояния до 80% популяции *A. nidulans* в периодической культуре представляют собой удлиненные клетки и короткие цепочки (2—4 кл.) с увеличенным содержанием мертвых клеток; диализная же культура представлена "молодыми" короткими одиночными клетками (Гусев и др., 1997). В периодической культуре наблюдается снижение как общего содержания пигментов, так и соотношения фикобилины/хлорофилл, тогда как в диализной культуре при постепенном снижении фотосинтетической активности содержание и соотношение пигментов не меняется (Гусев и др., 1988).

Изменения pH и окислительно-восстановительного потенциала среды (E_h) культивирования можно считать интегральными показателями метаболизма клеток. Начало роста как периодической, так и диализной культуры сопровождается увеличением pH от исходного 7,0 до 8—9; при переходе к стационарной фазе pH периодической культуры достигает 11—11,5, диализной — 9—10,5. Величина E_h отражает соотношение окисленных и восстановленных соединений: в лаг-фазный период развития культур величина E_h к началу экспоненциальной фазы роста снижается от 500—600 мВ до 200—250 мВ. Эффект наблюдается как у цианобактерий (*A. nidulans*), так и у гетеротрофных бактерий (*Pseudomonas diminuta*), что свидетельствует о существенных физиологических изменениях, происходящих в клетке к началу интенсивного роста (Барский и др., 1999). Вероятно, восстановительные условия как внутри клеток, так и в среде культивирования цианобактерий и гетеротрофных бактерий необходимы для последующего роста клеток и синтеза биологически активных веществ. Последующее увеличение E_h может быть связано с использованием восстановленных соединений на биосинтетические процессы в активно растущих клетках. В стационарной фазе E_h периодической культуры продолжает возрастать, что может быть связано с окислительными процессами в деградирующих клетках, E_h диализной культуры поддерживается на уровне, характерном для более молодых клеток (Саванина и др., 2001; Лебедева и др., 2002).

Рост микроводорослей при условии избытка минеральных веществ лимитируют высокая интенсивность света, содержание CO_2, O_2, накопление продуктов метаболизма. При диализном культивировании благоприятное соотношение поверхности и объема диализного мешка и внешний объем среды, в несколько раз превышающий внутренний, обеспечивают отток ингибирующих рост метаболитов во "внешний" объем и непрерывное поступление питательных веществ. В дальнейшем накопление значительной биомассы клеток и экзометаболитов в диализном мешке способствует снижению интенсивности освещения, поскольку интенсивность проходящего через культуру клеток света обратно пропорциональна оптической плотности пигментов и постепенному замедлению фотосинтетической активности, а значит, снижению концентрации кислорода, что существенно тормозит фотоокисление пигментов и липидов. Все эти факторы могут препятствовать деградации клеток и создают условия для "консервации" культуры (Саванина и др., 2001). В периодической культуре по достижении опреде-

ленной плотности клеточной суспензии наблюдается автолиз основной массы клеток и образование покоящихся форм. Таким образом, в небольшом объеме диализного мешка накапливается значительная биомасса физиологически активных клеток.

2. Фракционирование экзометаболитов

Интактные клетки микроорганизмов в процессе жизнедеятельности выделяют в окружающую среду продукты метаболизма, включая внеклеточные биополимеры. Происхождение внеклеточного органического вещества связано с размножением клеток, реассимиляцией и процессами автолиза; его общая экскреция фитопланктоном оценивается в 7—50% от всего фиксированного углерода (Сакевич, 1985).

Максимальное удельное выделение внеклеточного органического вещества в начале экспоненциальной фазы роста связывают с существованием инкубационного шока. В период логарифмической фазы роста наряду с увеличением суммарно выделенной органики наблюдается снижение скорости выделения органических веществ из клеток. Нарушение этой закономерности свидетельствует о деструктивных процессах в клетке: в экстремальных условиях выделение экзометаболитов водорослей значительно увеличивается (Москвина и др., 2000).

Интенсивно растущие культуры выделяют низкомолекулярные органические соединения, для стационарной стадии роста характерно накопление в среде высокомолекулярных соединений. Основным по количеству компонентом внеклеточных биополимеров являются углеводы — свыше 90% от общего количества органических веществ, выделяемых из клеток цианобактерий (Li et al., 2001). Увеличение содержания углеводов в периодической культуре *A. nidulans* наблюдается приблизительно до середины стационарной фазы роста; диализная культура *A. nidulans* характеризуется значительным увеличением содержания углеводов в среде по сравнению с периодической (Лебедева и др., 2002). Полупроницаемая мембрана обеспечивает разделение внеклеточных метаболитов: в диализном мешке накапливаются преимущественно высокомолекулярные соединения, а низкомолекулярные диффундируют во внешний объем.

Экзометаболиты, выделяемые клетками в среду, и слизистые поверхностные слои ряда цианобактерий сходны по составу. Причины такой "расточительности" биологически оправданны: слизистые гелеобразные покрытия защищают клетки от быстрого высыхания и излишней инсоляции, хелатизируют многие микро- и биогенные элементы, что стабилизирует минеральное питание, например в щелочных средах; служат внеклеточным запасом питательных веществ (Li et al., 2001; Raungsomboon et al., 2006). Накапливающиеся в диализном мешке высокомолекулярные полисахариды, возможно, выполняют те же функции, в том числе у цианобактерий, не образующих чехла.

Бактериальные полисахариды — один из важных продуктов биотехнологии, применяемый, в частности в нефтедобыче, в кровезаменителях (Liu, Pedersen, 2007). Перспективным представляется изучение полисахаридов цианобактерий (Li et al., 2001).

Продукты клеточной экскреции цианобактерий помимо углеводов моно- и полисахаридной природы включают также аминокислоты, пептиды, продукты азотного обмена и липидные соединения (Li et al., 2001; Volk, Furkett, 2006). Ряд низкомолекулярных экзометаболитов характеризуется высокой биохимической активностью, включая растительные гормоны, липиды, витамины, антибиотики, что также представляет интерес для биотехнологии. Наиболее распространенным из низкомолекулярных соединений, выделяемых в среду, является гликолевая кислота. Многие данные свидетельствуют о том, что гликолевая кислота может участвовать в регуляции роста, играть роль внеклеточного запасного вещества и выполнять определенные защитные функции, в частности защиту фотосинтезирующих структур от разрушения под действием света (Сакевич, 1985; Volk, Furkett, 2006.).

3. Кондиционирование сред

Способность клеток, сконцентрированных в диализном мешке, обмениваться метаболитами с "внешней средой" позволяет рассматривать диализное культивирование в качестве одного из вариантов кондиционирования сред вторичными метаболитами микроорганизмов. Метод может использоваться для "пробуждения" покоящихся форм и выделения компонентов из естественных симбиозов, если при инкубации на стандартных средах роста микроорганизмов не наблюдалось.

Так, при высеве проб донного ила из промышленного водоема, содержащего значительные концентрации ионов ванадия (100—700 мг/л), марганца, железа на стандартные среды, признаки роста бактерий (появление колоний, окисление или восстановление субстрата) не обнаруживались. При помещении аналогичных проб во внешний объем диализной культуры цианобактерий *A. nidulans* и *Nostoc* sp., находящихся в логарифмической фазе культивирования, наблюдается стимуляция роста нескольких видов бактерий. Из полученной смешанной культуры грамотрицательных бактерий высевом на селективную среду, содержащую 100 мг/л NH_4VO_3, были отобраны бактерии *Ps. diminuta,* обладающие ванадат-редуктазной активностью и характеризующиеся высокой устойчивостью к ванадату (Саванина и др., 1998).

4. Смешанно-раздельные культуры микроорганизмов

Природные и культивируемые популяции микроводорослей и цианобактерий по природе гетерогенны и часто включают в себя гетеротрофный компонент — грибы, бактерии, актиномицеты (Watanabe et al., 2005; Callow, Callow, 2006).

Высокомолекулярные полисахариды, включая чехлы цианобактерий, могут составлять до 85% по объему природных биопленок и служат местом прикрепления и источником энергии и углерода для гетеротрофного компонента (Hansen et al., 2007; Xavier et al., 2007). В начальной фазе роста уровень выделения внеклеточного органического вещества альгологически чистой культурой микроводорослей и цианобактерий выше, чем у аксеничной, что связано с поглощением органических веществ гетеротрофными бактериями (Watanabe et al., 2005). Для оценки способности бактерий ассимилировать внеклеточные продукты обмена микроводорослей можно использовать среду с добавлением экзометаболитов микроводорослей в качестве единственного источника углерода (Сидорова, Максимова, 1985). Экскреция метаболитов водорослями, по-видимому, эволюционно связана с внеклеточным накоплением запасных веществ, что оказалось благоприятным для роста бактерий и послужило основой их симбиотических отношений. Бактерии-спутники трофически зависят от цианобактерий и повышают их "экологическую валентность", расширяя возможности контакта цианобактерий со средой, в свою очередь выделяют разнообразные соединения в среду. Отсутствие строгой приуроченности микроорганизмов к цианобактериальному партнеру позволяет создавать в экспериментальных условиях сообщества, не встречающиеся в природе, включающие, например, лабораторные штаммы цианобактерий и аборигенные бактерии из промышленных водоемов (Москвина и др., 2000; Саванина и др., 2005а).

Основные проблемы при исследовании смеси микроорганизмов — разделение и учет каждого компонента в отдельности и оценка взаимного влияния партнеров. Гетеротрофные микроорганизмы в разных условиях могут выступать как антагонисты — стимуляторы роста цианобактерий. В свою очередь цианобактерии также секретируют значительные количества экзометаболитов бактериостатического и антибиотического действия, активные по отношению к бактериям и микроводорослям, что обеспечивает регуляцию развития "спутников". Антибактериальная активность микроводорослей проявляется в середине логарифмической фазы культивирования и возрастает с увеличением освещенности культуры (Сидорова, Максимова, 1985). Снижение антибактериальной активности микроводорослей наблюдается при уменьшении интенсивности света и числа клеточных контактов. Интенсивность проходящего света обратно пропорциональна плотности культуры, а максимально высокая плотность клеток в суспензионной культуре достигается при диализном культивировании (Лебедева и др., 2002).

Метод смешанно-раздельного диализного 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 (Norabring-Hertz, 1983), так и на жидких средах с использованием диализных мембран (Саванина и др., 1994). Один из компонентов смешанно-раздельной культуры, чаще фототроф, помещается в диализный мешок, а другой — в среду, находящуюся снаружи мешка. Изучение характера роста цианобактерий в периодической суспензионной культуре и при диализном культивировании дает возможность полнее оценить роль условий культивирования в физиологических проявлениях клеток на действующие экологические факторы клеточных популяций цианобактерий; позволяет более полно оценить значимость выделяемых из клеток цианобактерий соединений для роста гетеротрофных бактерий.

Разделение микроорганизмов полупроницаемой мембраной позволяет исследовать их взаимодействие на уровне продуктов метаболизма и наблюдать за изменением параметров роста каждой из культур в отдельности, что и позволяет рассматривать диализное культивирование в качестве экспресс-метода по подбору пар микроорганизмов, различающихся по типу питания. Отбираются гетеротрофные бактерии, которые способны расти на минеральных средах за счет органических компонентов, выделяемых цианобактериями, при культивировании на минеральной среде — единственном источнике питательного субстрата — и анализируется наличие или отсутствие их влияния на физиологическое состояние "хозяина". Так, при смешанно-раздельном диализном культивировании цианобактерий *A. nidulans* и гетеротрофных бактерий рода *Pseudomonas* наблюдается отсутствие ингибирующего действия бактерий на рост цианобактерий в различных вариантах опыта, стимуляция роста *A. nidulans* при культивировании с *Ps. putida* и *Ps. fluorescens*, а также повышенное выделение углеводов автотрофами в присутствии бактерий. Сравнительный анализ состава экзометаболитов аксеничной и смешанной культур указывает на зависимость роста бактерий в первую очередь от низкомолекулярных углеводов (Саванина и др., 1994). Бактерия *Ps. diminuta* в смешанно-раздельной культуре при равном содержании питательных веществ растет интенсивнее, чем в периодической (Лебедева и др., 2002). Бактерии в свою очередь снижают парциальное давление O_2 и увеличивают парциальное давление CO_2, удаляют продукты автоингибирования цианобактерий. Суммарный гетеротрофный компонент

при диализном смешанно-раздельном культивировании составляет до 10—20%, а в природных ассоциациях — не более 0,1—1% (Саванина и др., 1994; Munoz, Guieysse, 2006). Вероятно, это связано с тем, что диализная мембрана нивелирует ингибирующий эффект, связанный с межклеточными контактами двух различных популяций.

Компонент смешанно-раздельной культуры, находящийся в диализном мешке (автротроф или гетеротроф) характеризуется замедлением изменений pH, низкими величинами E_h и повышенной устойчивостью к внешним воздействиям благодаря высокой концентрации клеток и экзометаболитов в малом объеме. Увеличение продолжительности стационарной фазы *A. nidulans* при культивировании с *Ps. diminuta* относительно диализной культуры без бактерий может свидетельствовать о торможении процесса старения смешанно-раздельной культуры, что скорее всего связано со взаимной регуляцией роста и развития ее компонентов (Лебедева и др., 2002). Такая регуляция проявляется, в частности, в поддержании постоянства pH среды культивирования смешанно-раздельной пары *A. nidulans — Ps. diminuta* на уровне 7,0—7,5, тогда как в периодических культурах pH в экспоненциальной фазе роста клеток увеличивается до 10—10,5 для *A. nidulans*, и снижается — до 4,5—5 для *Ps. diminuta*. В смешанно-раздельных диализных культурах, по-видимому, происходит взаимная компенсация изменений pH, что благоприятно сказывается на развитии обеих культур (Саванина и др., 2005а).

II. Взаимодействие с токсикантами

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, пережидая неблагоприятные условия (как бактерии или моллюски). Реакции многоклеточных организмов на изменения параметров среды опосредованы рядом факторов и сложны для интерпретации. 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. Вследствие этого они представляют перспективную модель для изучения физиологических механизмов адаптации к действию различных физико-химических факторов, включая экстремальные.

По объему поступления в водную среду основной группой загрязняющих веществ являются металлы. Тяжелые металлы (ТМ), т.е. металлы плотностью более 5 г/см^3, наносят главный биологический ущерб. Особое положение ТМ среди загрязнителей связано как с возможностью их накопления и передачи по пищевым цепям, так и с высокой токсичностью. Фитопланктонные организмы как первичные продуценты являются теми компонентами водных экосистем, на которых прежде всего сказывается токсическое действие ТМ (Саванина и др., 2005б; Leao et al., 2007).

В исследованиях взаимодействия фитопланктонных организмов с ТМ можно выделить следующие направления:

1) изучение физиолого-биохимических ответов клеток на повышенное содержание ТМ в водной среде, поиск наиболее чувствительных объектов для биотестирования сточных вод на наличие ТМ, выяснение пределов их чувствительности, наиболее чувствительных и специфических тест-параметров и влияния внешних условий на проявление токсического эффекта металла;

2) удаление и концентрирование ТМ из промышленных стоков, природных водоемов и почв; изучение возможности использования устойчивых культур — аксеничных или смешанных альго-бактериальных пар (Miura et al., 2007).

Диализная культура цианобактерий представляется удобным объектом при исследовании обоих направлений, поскольку:

1) данные микроорганизмы широко распространены в изучаемом регионе: “цветение” водоемов в наших широтах вызывается главным образом цианобактериями;

2) некоторые виды цианобактерий достаточно чувствительны к воздействию ТМ, что объясняется мелкими размерами клеток, обеспечивающими высокое соотношение поверхность/объем для воздействия токсиканта (Leao et al., 2007);

3) природные сообщества, преобладающим компонентом которых являются цианобактерии, удаляют из водной среды до 98% растворенных металлов и металлоидов — Cd, Zn, Cr, Mn (Zhang et al., 2006).

1. Подготовка клеток к биотестированию

Наибольшей чувствительностью к токсическим воздействиям характеризуются культуры физиологически молодых клеток, выращенных на минимальных средах. Таким образом, обязательным условием для получения тест-культур, наиболее отвечающих свойствам природной популяции, является истощение клеточных резервов. При культивировании на минимальных средах в течение нескольких дней либо при многократном отмывании клеток инокулята такими средами нельзя быть уверенным в 100%-й жизнеспособности и однородности полученной популяции по чувствительности. Инокулят 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 автоингибирования. 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 моделирования как разового, так и постоянного сброса ТМ и других загрязнителей путем замены внешней среды и изучать воздействие повреждающих факторов в различных сочетаниях (рисунок). Свободному прохождению молекул токсиканта диализная мембрана не препятствует: уровень накопления ионов Zn и Cu клетками диатомовой водоросли *Phaeodactium tricornutum* из растворов, не оказывающих значительного ингибирующего влияния на рост в диализной культуре, тот же, что в периодической (Revis et al., 1989).

2. Биотестирование сред

При индикации загрязнений различной природы используются микроорганизмы, клеточные культуры, растения, животные, биохимические и биофизические тесты, природные сообщества. Изменения, вызываемые воздействием (рост, дыхательная активность и пр.), могут наблюдаться как непосредственно после воздействия, так и с задержкой от нескольких часов до нескольких дней (Campanella et al., 1995). Стандартные измеряемые параметры культур микроводорослей, чувствительные к условиям культивирования, включают: содержание хлорофилла *a*, подсчет числа клеток, биомассу, объем клеток, активность фотосинтеза (Shubert, 1984).

Из исследованных культур цианобактерий наибольшей чувствительностью к ТМ характеризуется *A. nidulans*. Проанализировав данные о повреждающем действии ТМ и адаптивных реакциях цианобактерий, можно отметить, что ингибирование роста, фотосинтетической активности и снижение содержания хлорофилла в присутствии ТМ всегда сопровождается значительными изменениями величины E_h среды и повышенным выделением из клеток углеводов, что и позволяет использовать эти тест-параметры для интегральной оценки физиологического состояния клеток (Лебедева и др., 2002). Содержание экзополисахаридов в клетках *N. muscorum* увеличивается в присутствии ионов Cd; в этих условиях изменяется и состав моносахаридов (Москвина и др., 2000).

E_h среды культивирования в значительной степени зависит от концентрации выделенных в среду тиолов: E_h тиоловых соединений в анаэробных условиях существенно ниже 0 мВ, в то время как стандартные редокс-потенциалы органических кислот составляют 50—250 мВ. Для достижения E_h 250 мВ в аэробных условиях требуется около 2 мМ аскорбата и всего 4—6 мкМ цистеина или другого тиолового соединения. В среде культивирования цианобактерий обнаруживаются сопоставимые концентрации SH-групп, тогда как концентрации органических кислот в сотни раз ниже. Выделение бактериями тиолов или растворение в среде цистеина коррелирует с уменьшением E_h среды в широком диапазоне концентраций SH-групп (Барский и др., 2001).

Высокий уровень тиоловых соединений в составе клеточных метаболитов является важным диагностическим фактором для определения степени загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами, так как находится в зависимости от уровня металлов в среде: тиоловые соединения участвуют как во внутриклеточном накоплении ТМ, так и в выделении ТМ-содержащих комплексов в среду (Pawlic-Skowronska, 2000). Содержание глутатиона и глутатионзависимых ферментов в клетках цианобактерий и бактерий зависит от концентрации и времени действия ТМ (Саванина и др., 2003). Таким образом, изменения в общем фонде тиоловых соединений можно использовать в качестве тест-параметра токсического действия ТМ, измеряя концентрацию SH-групп в клетках либо в среде культивирования фитопланктонных организмов с помощью оптических методов или по изменениям E_h. В присутствии ТМ E_h среды культивирования *A. nidulans* снижается от 540 до 420 мВ. У гетеротрофных бактерий *Ps. diminuta* такое снижение еще заметнее — от 540 до 240 мВ. Соответственно концентрация тиоловых групп в клетках цианобактерий и бактерий увеличивается в 5—10 и 100—200 раз (Барский и др., 2001; Саванина и др., 2005а).

3. Детоксикация сред и концентрирование ТМ культурами микроорганизмов

Для биологической очистки бытовых и промышленных стоков, содержащих ТМ, важны такие свойства микроорганизмов, как детоксикация стоков и концентрирование металлов. Удаление и концентрирование ТМ из промышленных стоков, природных водоемов и почв, определяемое способностью некоторых гетеротрофных микроорганизмов, в частности бактерий и дрожжей, аккумулировать большие количества ТМ из водной среды и донных отложений, является одним из важнейших направлений биотехнологии металлов. Применение устойчивых к загрязнению ТМ видов и штаммов цианобактерий для биологической очистки соответствующих промышленных стоков может служить альтернативным подходом к детоксикации и извлечению ценных металлов. Существует целая группа химических элементов, называемых редкими металлами (Ti, Zn, Nb, Ta, Mo, W) и используемых в промышленности, которые становятся загрязнителями из-за недостаточной очистки сточных вод, в то же время их концентрация в

земной коре невелика, а добыча связана с определенными трудностями. По разным оценкам, иммобилизованные аксеничные и смешанные культуры микроорганизмов удаляют из среды от 20 до 96% добавленных металлов (Munoz, Guieysse, 2006; Zhang et al., 2006). Накапливаются как метаболически важные металлы, так и те, которые в метаболизме не используются, включая золото в форме Au^{3+}, а гетеротрофные спутники цианобактерий (бактерии, грибы, водоросли) способны метаболизировать и сопутствующие токсиканты, такие как CN^{-}, металлы и металлоиды (Zhang, et al., 2006; Miura et al, 2007).

Природные ассоциации микроорганизмов, отличающихся по типу питания, представляют собой сложные образования, включающие наряду с цианобактериями и (или) микроводорослями также гетеротрофные микроорганизмы. При этом образуются устойчивые автономные системы, структурная организация и ферментное разнообразие которых позволяют в природных и техногенных водных экосистемах противостоять стрессовым ситуациям и включать трудноразлагаемые вещества и токсиканты в свой метаболизм (Watanabe et al., 2005; Callow, Callow, 2006).

Наибольшей устойчивостью к ТМ отличаются микроорганизмы, выделенные в местах, содержащих промышленные загрязнения или месторождения соответствующего металла. В ассоциациях, выделенных из отстойников и очистных сооружений промышленных предприятий, преобладающим компонентом являются цианобактерии *Oscillatoria vaucheri* и *Spirullina platensis.* Состав бактериального гетеротрофного компонента, как правило, зависит от таксономического положения цианобактерий и включает 4—12 видов. Смена доминирующих родов сопутствующих бактерий происходит в зависимости от токсических воздействий, в результате чего исчезают наиболее чувствительные виды (Дзержинская и др., 1996; Zhang et al., 2006). Такие ассоциации характеризуются повышенной устойчивостью к воздействию внешних факторов благодаря взаимодействию компонентов: автотрофный (цианобактерии) выделяет органические субстраты, которые поддерживают рост бактерий и способствуют накоплению ионов и взвесей металлов в ближайшем окружении клеток; бактерии в свою очередь обеспечивают окисление, восстановление и осаждение связанных ионов ТМ (Bender et al., 1995; Ganguli, Tripathi, 2002). Влияние сопутствующих бактерий на устойчивость доминанта к ТМ может быть как опосредованным (через влияние на такие физико-химические факторы, как E_h и pH среды), так и прямым — облигатные сопутствующие бактерии в чехлах *N. muscorum* выделяют H_2S, эффективно связывающий ионы Cd^{2+} в CdS, в результате чего устойчивость цианобактерий к ионам Cd^{2+} повышается на три порядка (Москвина и др., 2000).

Из исследованных нами микроорганизмов наибольшей устойчивостью к ТМ характеризуются бактерии *Ps. diminuta,* изолированные из пробы придонного осадка промышленного водоема. Если рост *Ps. fluorescens* ингибируется при 50 мг/л, а гибель клеток — при 100 мг/л ванадата, то на рост *Ps. diminuta* ванадат в концентрации 100 мг/л не оказывает заметного влияния, а в концентрации 700 мг/л накопление биомассы снижается только на 30—40% (Саванина и др., 1998). Данные микроорганизмы были использованы в качестве модели природной ассоциации в диализной смешанно-раздельной культуре с цианобактериями. Полученные ассоциации выживают не только на средах с повышенной концентрацией V, Mn, Fe, к которым адаптирована культура *Ps. diminuta*, но также в присутствии сублетальных концентраций Cu, Cd или промышленного концентрата Au. Помимо ТМ культуры эффективно поглощают сопутствующие токсиканты, что подтверждается ростом культуры *A. nidulans,* чувствительной к воздействию ТМ на среде после культивирования смешанно-раздельной культуры. Устойчивость смешанно-раздельных культур к воздействию ТМ в несколько раз превышает таковую в периодической культуре (Саванина и др., 2005б).

В течение первых суток культивирования в присутствии ТМ аксеничных культур цианобактерии *A. nidulans* и гетеротрофной бактерии *Ps. diminuta* наблюдается практически полное поглощение металла из среды. Далее в среду культивирования *Ps. diminuta* возвращается более половины ранее поглощенного металла. В клетках цианобактерий доля связанного металла существенно выше, вне зависимости от чувствительности культуры к ТМ (Саванина и др., 2005б).

Накопление ионов и взвесей металлов в ближайшем окружении клеток обусловлено электростатическим взаимодействием с отрицательно заряженными группами клеточных оболочек цианобактерий, т.е. всех поверхностных слоев, расположенных с внешней стороны от цитоплазматической мембраны, включая клеточные стенки и поверхностные структуры — слизистые слои, капсулы и чехлы (Raungsomboon et al., 2006). Приповерхностный диффузионный слой полисахаридов, как и полисахариды клеточной оболочки, выполняет барьерную функцию между организмом и окружающей средой, лимитируя процессы биосорбции ТМ (Эстрелла-Льопис и др., 2003). Экзополисахариды цианобактерии *Gloeocapsa gelatinosa* связывают до 60—70% Pb^{2+} (Zyer et al., 2004). Высокомолекулярные углеводы не проходят диализную мембрану и менее существенны для роста гетеротрофных бактерий, они накапливаются соответственно в диализном мешке или во внешнем объеме и способствуют повышению устойчивости смешанно-раздельной культуры к воздействию внешних факторов.

Наибольшую устойчивость к воздействию ТМ проявляют популяции с максимальной концентрацией внеклеточных полисахаридов: "старые" сформированные биопленки (Munoz, Guieysse, 2006) и диализные культуры. В условиях диализного культивирования высокое содержание клеток и накопление в диализном мешке высокомолекулярных полисахаридов способствует как снижению доли токсиканта, так и взаимодействию активных участков клеточной поверхности с ионами ТМ (Лебедева и др., 2002).

Последующий этап аккумуляции обусловлен связыванием ионов ТМ с внутриклеточными тиолсодержащими компонентами — металлотионеинами и гамма-Glu-Cys-пептидами. Внешним проявлением увеличения внутриклеточной концентрации тиоловых групп служат изменения E_h среды культивирования в ответ на добавление ионов ТМ. Одновременно возрастает уровень металла в среде (Саванина и др., 2005б). Это позволяет предположить, что ранее поглощенные ионы металла выводятся из клеток совместно с тиолсодержащими соединениями. Под действием различных ТМ клетки *Ps. diminuta* накапливают тиоловые соединения, связывающие ионы ТМ, а затем выделяют в среду комплексные соединения, увеличение концентрации которых коррелирует с уменьшением величины E_h среды (Барский и др., 2001).

При смешанно-раздельном культивировании выделение ранее связанных ТМ во внешнюю среду практически не наблюдается, что может объясняться:

а) значительным увеличением биомассы цианобактерий относительно периодической культуры;

б) тем, что в диализной культуре клетки обоих компонентов дольше сохраняются в нативном состоянии, чем в аксеничных;

в) взаимным влиянием компонентов ассоциативной культуры. В аккумуляции ТМ клетками микроорганизмов можно выделить фазу адсорбции металлов на поверхности клеток и последующую более медленную фазу связывания поглощенных ионов с внутриклеточными компонентами.

Токсичность металлов в водной среде в значительной степени зависит от их "подвижности": легко вступают в реакции и оказывают наибольший токсический эффект ионы ТМ в высокой степени окисления. Металлы, связанные органическими соединениями, менее подвижны и в большинстве случаев менее токсичны. В "старых" культурах цианобактерий pH среды может достигать 10—12 единиц, при этом, как правило, снижается как токсичность действующих форм ТМ, так и поглощение ТМ клетками, в смешанно-раздельной культуре цианобактерий pH поддерживается на уровне 7,0—7,5 (Лебедева и др., 2002). Способность клеток к адсорбции ионов ТМ зависит от величины поверхностного заряда, который в свою очередь определяется количеством ионогенных групп в диссоциированном состоянии на поверхности клеточной стенки, степень диссоциации этих групп зависит от pH среды. Поглощение ионов Cu цианобактериями и микроводорослями в биопленке линейно зависит от pH в диапазоне 4—9: при снижении pH уменьшается адсорбционная способность клеточной стенки: при pH < 5 Cu^{2+} практически не проникает в клетки *A. nidulans,* а при увеличении pH (> 5) ионы ряда ТМ могут переходить в осадок, связываясь с фосфатами и карбонатами среды (Munoz, Guieysse, 2006; Zhang et al., 2006).

Устойчивость к воздействию ТМ определяется комплексом одновременно действующих и взаимодополняющих механизмов: уменьшением аккумуляции ТМ, выведением металлов из клеток и детоксикацией металлов в среде, на поверхности и внутри клеток. Смешанно-раздельную культуру можно рассматривать как экспериментальную модель симбиотических отношений между растущей в диализном мешке цианобактерией *A. nidulans* и бактерией *Ps. diminuta*. Экзометаболиты, выделяемые цианобактерией во "внешний объем", служат для гетеротрофной бактерии единственным источником питания на минеральной среде. Со своей стороны устойчивая к ТМ *Ps. diminuta* эффективно связывает ионы ТМ, облегчая тем самым развитие чувствительной к ТМ культуры цианобактерии. Выделяемые ею тиоловые комплексы ТМ менее токсичны, чем исходные ионы, и накапливаются в "чехле" — диализном мешке, содержащем высокомолекулярные полисахариды. Усиление роста бактериального компонента в смешанно-раздельной культуре обеспечивает связывание большей части ТМ, таким образом, соотношение устойчивости к степени очистки среды от ТМ возрастает при:

1) повышенной экскреции углеводов цианобактериями;

2) повышенном синтезе тиоловых соединений гетеротрофными бактериями (Гусев и др., 1997; Лебедева и др., 2002).

Рассмотренные в данном обзоре варианты применения диализной культуры не исчерпывают всех возможностей метода (Bohmann et al., 1995; Koyama, Seki, 2004). В частности, варьируя размеры пор диализной мембраны, можно получать иные наборы экзометаболитов; смешанно-раздельные культуры могут включать иные компоненты — цианобактерии и грибы, водоросли и актиномицеты, с помощью цианобактерий можно осуществлять кондиционирование сред для поддержания роста эукариот (культуры растительных тканей, включая нефотосинтезирующие); ассоциативные культуры могут использоваться не только для накопления растворимых соединений, но и для деструкции трудноразлагаемых соединений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Барский Е.Л., Лебедева А.Ф., Саванина Я.В. 1999. 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. № 2. 11—15.

Барский Е.Л., Саванина Я.В., Лебедева А.Ф. 2001. Действие различных тяжелых металлов на рост клеток *Pseudomonas diminuta* и образование металлсвязывающих белков // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. № 4. 44—48.

Гусев М.В., Вольберг М.М., Лебедева А.Ф., Савельев И.Б. 1988. Использование метода диализного культивирования для подбора симбиотических альгобактериальных пар // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. № 1. 103—106.

Гусев М.В., Лебедева А.Ф., Саванина Я.В., Барский Е.Л. 1997. Устойчивость культур цианобактерии *Anacystis nidulans* и микроводоросли *Dunaliella maritima* к токсическому действию ванадия. Влияние фосфата, железа и цистеина // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. № 3. 12—17.

Дзержинская И.С., Саинов Д.И., Сопрунова О.Б. 1996. Состав и свойства техногенных альго-бактериальных сообществ // Вестн. Астр. гос. тех. ун-та. № 2. 84—86.

Лебедева А.Ф., Саванина Я.В., Барский Е.Л. 2002. 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. № 2. 24—29.

Москвина М.И., Бреховских А.А., Бекасова О.Д., Никандров В.В. 2000. Роль слизистой оболочки цианобактерий *Nostoc muscorum* в связывании и детоксикации ионов кадмия // Тез. докл. Междунар. конф. “Автотрофные микроорганизмы”. К 75-летию со дня рождения акад. Е.Н. Кондратьевой. М. С. 124—125.

Сакевич А.И. 1985. Экзометаболиты пресноводных водорослей. Киев. 199 с.

Саванина Я.В., Лебедева А.Ф., Савельев И.Б. 1994. Смешанно-раздельное культивирование цианобактерий *Anacystis nidulans* и *Nostoc muscorum* и бактерий рода *Pseudomonas* в присутствии ванадия // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. № 2. 29—34.

Саванина Я.В., Пахомкина Б.С., Лебедева А.Ф., Дольникова Г.А. 1998. Смешанно-раздельное культивирование цианобактерий *Anacystis nidulans*, *Anabaena variabilis* и *Nostoc muscorum* с бактериями, выделенными из ванадийсодержащего промышленного водоема // Тез. докл. на V Междунар. конф. “Новые информационные технологии в медицине и экологии”. Гурзуф. С. 29.

Саванина Я. В., Лебедева А. Ф., Гусев М.В. 2001. Микроводоросли и цианобактерии: устойчивость к тяжелым металлам // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. № 4. 14—24.

Саванина Я.В., Лебедева А.Ф., Барский Е.Л. 2003. Значение глутатионовой системы в накоплении и детоксикации тяжелых металлов в клетках цианобактерий и микроводорослей // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. № 3. 29—37.

Саванина Я.В., Лебедева А.Ф., Барский Е.Л. 2005а. Детоксикация золотосодержащих стоков с использованием смешанных культур микроорганизмов // Тез. докл. Междунар. науч. конф. “Автотрофные микроорганизмы”. К 80-летию со дня рождения акад. Е.Н. Кондратьевой. М. С. 171—172.

Саванина Я.В., Лебедева А.Ф., Барский Е.Л., Гусев М.В. 2005б. Взаимодействие микроорганизмов с ионами золота // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. № 4. 19—22.

Сидорова О.А., Максимова И.В. 1985. Выделение светочувствительных антибактериальных веществ зеленой водорослью *Westella botryoides* // Изв. АН СССР. Сер. Биология. № 4. 614—616.

Эстрелла-Льопис В.Р., Юркова И.Н., Бородинова Т.И. 2003. Роль внеклеточных полисахаридов (ВПС) микроорганизмов в биосорбции металлов // Тез. докл. X Междунар. конф. “Новые информационные технологии в медицине и экологии”. Гурзуф. С. 232—234.

Bender J., Lee R.F., Phillips P. 1995. Uptake and transformation of metals and metalloids by microbial mats and their use in biodegradation // J. Ind. Microbiol. **14**. N 2. 113—118.

Bohmann A., Portner R., Markl M. 1995. Performance of a membrane-dialysis bioreactor with a radial-flow fixed bed for cultivation of a hibridoma cell line // Appl. Microbiol. Biotechnol**. 43**. N 5. 772—780.

Callow J.A., Callow M.E. 2006. Biofilms // Proc. Mol. Subcell. Biol. N 42. 141—169.

Campanella L., Favero G., Tomasetti M. 1995. Immobilised yeast cells biosensor for total toxicity testing // Sci. Total Environ. **171**. N 1—3. 227—234.

Ganguli A., Tripathi A.K. 2002. Bioremediation of toxic chromium from electroplating effluent by chromate-reducting *Pseudomonas aeruginosa* A2 Chr in two bioreactor // Appl. Environ. Microbiol. Biotechnol. **58**. N 3. 416—419.

Hansen S.K., Rainey P.B., Haagensen J.A., Molin S. 2007. Evocation of species interaction in a biofilm community // Nature. **445**. N 7127. 533—536.

Koyama K., Seki M. 2004. Cultivation of yeast and plant cells entrapped in the low-viscosis liquid-core of an alginate membrane capsule prepared using polyethylene glycol // J. Biosci. Bioeng. **97**. N 2. 111—118.

Leao P.N., Vasconcelos M.T., Vasconcelos V.M. 2007. Role of marine cyanobacteria in trace metal biovailability in seawater // Microb. Ecol. **53**. N 1. 104—109.

Li P., Harding S.E., Liu Z. 2001. Cyanobacterial exopolysaccarides. Their nature and potential biotechnological application // Biotechnol. Genet. Eng. Rev. N 18. 375—404.

Liu J., Pedersen L.C. 2007. Anticoagulant heparan sulfate: structural specifity and biosynthesis // Appl. Microbiol. Biotechnol. **74**. N 2. 763—772.

Miura Y., Watanabe Y., Okabe S. 2007. Membrane biofouling in pilote-scale membrane bioreactors (MBR-S) treating municipale wasterwater: impact of biofilm formation // Environ. Sci. Technol. **41**. N 2. 632—638.

Munoz R., Guieysse B. 2006. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a reveiew // Water Res. **40**. N 15. 2799—2815.

Norabring-Hertz B. 1983. Dialysis membrane technic for studing microbial interaction // Appl. Environ. Microbiol. **45**. N 1. 290—293.

Parker B.C., Bold H.C. 1961. Biotic relationship between soil algae and other microorganisms // Amer. J. Bot. **48**. N 2. 185—197.

Pawlic-Skowronska B. 2000. Relationships between acid-soluble thiol peptides and accumulated Pb in the green alga *Stichococcus bacillaris* // Aquat. Toxicol. **50**. N 3. 211—230.

Portner R., Markl M. 1998. Dialysis culture // Appl. Microbiol. Biotechnol. **50**. N 4. 403—414.

Raungsomboon S., Chiathalsong A., Bunnarg B., Inthom D., Harvey N.W. 2006. Production, composition and Pb^{2+}-adsorption characteristic of capsular polysaccarides, extracted from a cyanobacterium *Gloeocapsa gelatinosa* // Water Res. **49**. N 20. 3759—3766.

Revis N.J.P., Merks A.G.A. 1989. Heavy metal uptake by plankton and other seston particles // Chem. Spec. and Bio. **1**. N 1. 31—37.

Sakshaug E. 1977. Limiting nutrients and maximum growth rates for diatoms in Narragasnsett bay // Jor. Exp. Mar. Biol. Ecol. **28**. N 109, 123.

Shubert L.E. 1984. Algae as ecological indicators. London. P. 213—237.

Shultz J.S., Gernfrdt P. 1969. Dialysis culture of microorganisms desing theory and results // Bacteriological revues. **33**. 1.

Volk R.B., Furkett F.H. 2006. Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth // Microbiol. Res. **161**. N 2. 180—186.

Watanabe T., Takihaba N., Hanada S., Aoyagi H., Watanabe Y., Ohmura N., Saiki H., Tanaka H. 2005. Symbiotic association in Chlorella culture // FEMS Microbiol. Ecol. **51**. N 2. 187—196.

Xavier J.B., Foster K.R. 2007. Cooperation and conflict in microbial biofilms // Proc. Nat. Acad. Sci. **104**. N 3. 876—881.

Zhang X., Brussee K., Coutino C.T., Rooney-Varga J.N. 2006. Chemical stress induced by copper: examination of a biofilm system // Water Sci. Technol. **54**. N 9. 191—199.

Zyer A., Mody K., Jha B. 2004. Accumulation of hexavalent chromium by a exopolysaccharide producing marine *Enterobacter cloaceae* // Mar. Pollut. Bull. **49**. N 11—12. 974—977.

Поступила в редакцию
15.12.07

DYALISIS CULTIVATION OF CYANOBACTERIA

Ja.V. Savanina, A.F. Lebedeva, E.L. Barsky

Various aspects and its significance of dialysis cultivation method for physiology, ecology and biotechnology are examined. In this method the cell culture is separated with the semipermiable membrane from a 5—10 times greater medium volume. Dialysis cultivation is a promising method in term of noncultivating form “resuscitation”, symbiotic components isolation, bionts selection for mixed cultures, exometabolite production, environment monitoring etc. Dialysis cultures are characterized by high rates of photosynthesis and growth and considerable increase the stationary stage duration. Thus, the small volume of dialisis bag contains high concentrations of physiologically active cells, which can be used for production of biomass and organic substances.