

Актиномицеты – ассоциативные компоненты цианобактериальных сообществ и симбиозов

© 2013. Г. М. Зенова¹, д.б.н., профессор, Е. С. Лобакова¹, д.б.н., профессор,
И. Г. Широких², д.б.н., профессор, Е. А. Иванова³, н.с.,

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,

²Зональный НИИ сельского хозяйства Северо-Востока им. Н. В. Рудницкого РАСХН,

³Почвенный институт им. В. В. Докучаева РАСХН,
e-mail: zenova38@mail.ru

В обзоре обсуждаются вопросы распространения в природных цианобактериальных сообществах и симбиозах мицелиальных актинобактерий (актиномицетов). Анализируются работы, посвящённые адаптационным изменениям цианобактерий и актиномицетов в экспериментально сформированных цианобактериально-актиномицетных талломах, определяющие роль этих организмов в формировании и функционировании всего сообщества в целом.

The review discusses the issues of dissemination of the nature of cyanobacterial communities and symbioses mycelial actinobacteria (actinomycetes). Analyzed the work devoted to the adaptive changes of cyanobacteria and actinomycetes in the experimentally established cyanobacterial-actinomycetes thallomes, the role of these organisms in the formation and functioning of the community as a whole.

Ключевые слова: актиномицеты, цианобактерии, альго-бактериальные сообщества,
цианобактериальные сообщества, синцианозы, эндофиты

Key words: actinomycetes, cyanobacteria, algo-bacterial community,
cyanobacterial community, sincyanoses, endophytes

Многочисленные экспериментальные сведения об удивительном разнообразии типов взаимодействия организмов в природе дают основание полагать, что симбиотические системы представляют собой одну из основных форм существования организмов в биосфере [1, 2].

Повсеместное распространение в наземных экосистемах цианобактериальных сообществ, компонентный состав которых представлен разнообразными бактериями, в том числе мицелиальными актинобактериями (актиномицетами), определяет исключительное значение этих организмов в формировании и устойчивом развитии биосферы [3 – 5].

Являясь первопоселенцами на выветриваемых скальных породах, цианобактериальные сообщества принимают активное участие во многих биохимических процессах (накопления органического вещества, его минерализации, разрушения минеральных субстратов, выщелачивания и распределения различных элементов), способствуя тем самым изменению субстрата, ведущего к формированию почвы.

Однако вследствие того, что изучение взаимодействия микроорганизмов в природных сообществах затруднено, выявление взаим-

ного влияния отдельных компонентов сообщества друг на друга возможно путём создания модельных ассоциаций, в которых подбираются и изучаются отдельные пары микроорганизмов.

В современной биологии сложилось новое направление исследований симбиозов как многокомпонентных систем – макросимбионта, традиционного известного доминантного микросимбионта и сопутствующих ассоциативных микросимбионтов, выполняющих функции, обеспечивающие успех симбиоза в целом [1, 2]. В последнее десятилетие открыты новые многочисленные сопутствующие микроорганизмы для большинства известных симбиозов, поэтому настала необходимость выявления роли ассоциативных микроорганизмов в функционировании симбиоза как надорганизменной интегрированной системы в целом.

В современной трактовке ассоциативные системы (ассоциации) предлагается определять как взаимодействие между организмами, не обеспечивающее высокоспециализированных, облигатных связей между партнёрами, оказывающими положительное действие друг на друга. Временной параметр взаимодействия

партнёров ассоциаций не имеет определяющего значения. Ассоциативные системы складываются и в рамках отдельных симбиозов. В качестве макросимбионта в конкретном симбиозе и ассоциативной системе может выступать один и тот же организм, а в качестве доминантного и ассоциативных микросимбионтов – разные организмы. Ассоциативным микроорганизмом может быть в отношении как микро-, так и макропартнёра или в отношении всей системы в целом [1, 2].

Ассоциативные микросимбионты могут не накапливаться в значительных количествах в морфологических структурах макросимбионта и могут присутствовать только на определённых стадиях развития симбиоза. На определённых стадиях онтогенеза макросимбионта доминантный и ассоциативный микросимбионты могут формировать микроразнообразный пространственный микросимбиоз.

Для исследования воздействий ассоциативных микроорганизмов на всю систему в целом на микро- или макросимбионтов необходимо экспериментальное формирование ассоциативных систем микродоминантов с ассоциативными микроорганизмами. Выявление в экспериментальных системах характера взаимодействия партнёров поможет выявлению разнонаправленных действий ассоциативных микроорганизмов, определяющих формирование, стабильность существования и продуктивность симбиотической системы в целом.

Актиномицеты в природных альго-бактериальных экосистемах

Цианобактерии (ЦБ) и мицелиальные актинобактерии (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 ЦБ, и более тонкие ветвящиеся нити, которые относят к актиномицетам [6].

Подобное взаимодействие фототрофных и гетеротрофных организмов сохранилось и до наших дней. Примером служат альго-циано-бактериальные маты – бентосные популяции микроорганизмов, где ЦБ являются основными продуцентами органического вещества и отвечают за структуру мата. Именно эти альго-бактериальные сообщества, являясь

древними обитателями Земли, процветавшими в докембрии в мелководных водоёмах, сформировали кислородную атмосферу планеты в далёком прошлом [7].

Альго-циано-бактериальные сообщества являются высокопродуктивной системой. В этой системе фототрофный компонент – ЦБ – главный продуцент органического вещества всего сообщества, которое может использоваться в качестве источника углерода и энергии гетеротрофными компонентами сообщества. Вступая в ассоциации с бактериями, ЦБ участвуют в формировании трофических цепей [7].

Микробные сообщества с участием ЦБ и актиномицетов широко распространены в природе: циано-бактериальные сообщества, формирующиеся в пятнах «цветения» почвы [8], циано-бактериальные маты гидротерм и лагун [6], альго-бактериальные ассоциации с лишайникоподобным талломом (актинолишайники) в местах первичного почвообразования на осадочных карбонатных породах, где актиномицеты участвуют в стабилизации бактериального блока системы и усиливают фотосинтетическую активность водоросли [9, 4]. Повсеместно распространены как симбиозы азотфиксирующих ЦБ с эукариотными организмами (простейшими, беспозвоночными животными, грибами, растениями) (синцианозы) [10 – 12], так и симбиозы актиномицетов с растениями (актиноризы) [13, 14] и с почвенными животными [4]. Известна способность эндофитных актиномицетов и коринформных бактерий, изолированных из корневых тканей озимой ржи, к образованию ауксинов в жидкофазной культуре. Изоляты коринформных бактерий продуцировали в среде индолил-3-уксусную кислоту (ИУК). Выявлена зависимость образования ИУК актинобактериями от состава и кислотности питательной среды, концентрации в ней триптофана, условий аэрации. Проведена оценка биологической активности бактериальной ИУК. Обработка семян озимой ржи ауксинпродуцирующими актинобактериями способствовала повышению всхожести и более интенсивному росту проростков *in vitro* [15].

Почвообразующую деятельность современных цианобактериальных сообществ, проявляющуюся в формировании наскальных обрастаний и преобразовании минеральной части почвообразующей породы, отмечали многие исследователи [16 – 24]. Однако потенциал функциональных проявлений цианобактериально-актиномицетных ассоциаций в природных сообществах полностью не изучен.

В научной литературе имеются многочисленные описания ассоциативных отношений между организмами в многокомпонентных системах, для которых применяется термин «ассоциативный симбиоз» [1, 2, 25, 26]. В последнее десятилетие ассоциативные микроорганизмы выявлены в составе большинства изученных растительных симбиозов, однако среди исследователей нет единого мнения о том, какую роль они играют в процессе формирования и функционирования симбиозов (бобово-ризобияльного, актиноризного, синцианозах и микоризах).

Мицелиальные бактерии (актиномицеты) часто обнаруживаются в альго-бактериальных природных экосистемах. Эти организмы выделены из альго-бактериальных матов супра- и сублиторали гиперсолёных водоёмов Крыма [6], Антарктиды [27], Австралии [28]. Ассоциации актиномицетов с ЦБ распространены в современных строматолитах залива Шарк (Австралия) [29], актиномицеты выявлены в арктических лишайниках [30].

Примером многокомпонентного симбиоза является синцианоз саговниковых растений [4]. Установлено, что в бактериальном ассоциативном сообществе кораллоидных корней (инфицированных доминантным микросимбионтом – ЦБ) саговниковых растений преобладают бактерии-гидролитики, в том числе актиномицеты [34].

Обнаружение актиномицетов в природных альго-бактериальных сообществах и синцианозах делает необходимым изучение экспериментальных ассоциаций, сконструированных из представителей ЦБ и актиномицетов, для выяснения функциональной роли актиномицетов в этих экосистемах. Исследование «поведения» ЦБ и актиномицетов в ассоциациях составляет новый аспект в изучении экологии этих организмов и выявляет их потенциальные функциональные возможности.

Экспериментально сформированные ассоциации цианобактерий и актиномицетов

В современных исследованиях для выявления эффектов взаимодействия ЦБ и актиномицетов, выделенных из природных синцианозов, разработаны критерии для подбора культур-компонентов экспериментальной ассоциации [33].

Критериями образования ассоциации ЦБ и актиномицета являются: отсутствие взаимного антагонизма стрептомицета и ЦБ; прояв-

ление положительного тропизма культур друг к другу; образование устойчивых (не разрушающихся при отмывании водой) ассоциативных талломов при культивировании ЦБ и актиномицета в жидкой питательной среде. В случае отсутствия взаимодействия образования талломов не происходит, и микроорганизмы при смешивании образуют двухслойный осадок – конгломераты гиф стрептомицета внизу, слой клеток ЦБ – сверху.

В качестве компонентов для формирования экспериментальных цианобактериально-актиномицетных ассоциаций целесообразно использовать культуры, выделенные из природных экосистем, где они могут адаптироваться друг к другу длительное время. Так, для формирования экспериментальных цианобактериально-актиномицетных ассоциаций использовали альгологически чистую культуру негетероцистообразующей ЦБ *Oscillatoria terebriformis* (Ag.) Elenk. Emend., полученную из коллекции культур Института микробиологии имени С. Н. Виноградского РАН. В описании структуры матов отмечено, что виды р. *Oscillatoria* широко распространены в альго-бактериальных матах гиперсолёных озёр Крыма [32]. Соответственно из числа культур актиномицетов, выделенных из альго-бактериальных матов гиперсолёных озёр Крыма, был отобран согласно разработанным критериям образования ассоциации стрептомицет *Streptomyces odorifer* шт. 1.

В экспериментально сформированных ассоциациях выявлены специфические взаимодействия культур *Oscillatoria terebriformis* (Ag.) Elenk. Emend.) и актиномицета *Streptomyces odorifer* шт. 1 [33, 34]. Эти взаимодействия определяются по наличию положительного тропизма гиф стрептомицета к нитям *O. terebriformis*; по усилению фотосинтетической активности *O. terebriformis* в ассоциации по сравнению с монокультурой; по изменению антимикробных свойств таллома ассоциации по сравнению с монокультурами стрептомицета и цианобактерии. Гифы *S. odorifer* проявляли положительный тропизм к нитям *O. terebriformis*. Коэффициент ассоциативности (K_{as}), который рассчитывали как отношение площади, занимаемой мицелием стрептомицета, проникшего на фильтр с ЦБ, к площади, занимаемой мицелием стрептомицета, проникшего на контрольный фильтр. Гифы стрептомицета, проникающие на фильтр с *O. terebriformis*, оплетали нити ЦБ.

Установлено достоверное увеличение фотосинтетической активности *O. terebriformis*

в ассоциации со *Str. odorifer* (концентрация хлорофилла a $43,0 \pm 4,46$ мг/г биомассы цианобактерии) по сравнению с фотосинтетической активностью монокультуры ($34,7 \pm 3,74$ мг/г биомассы ЦБ).

Отмечено усиление антибиотической активности стрептомицета в ассоциации с *O. terebriformis* против культур бактерий *Bacillus cereus* шт. 1, *Arthrobacter agilis* шт. 3, *Micrococcus* sp. шт. 8, против культуры дрожжей *Rhodotorula* sp. шт. 1 и усиление антимикробных свойств ЦБ в ассоциации со *Str. odorifer* в отношении тест-культуры *Str. prunicolor* шт. 5. Установлено, что таллом экспериментальной ассоциации проявляет антимикробную активность к тест-культурам *Str. xanthocidicus* шт. 6 и *Fusarium* sp. шт. 3, к которым монокультуры стрептомицета и ЦБ не проявляли антагонизма [34].

Полученные данные о наличии положительного тропизма гиф *Str. odorifer* к нитям *O. terebriformis*, усилении фотосинтетической активности ЦБ и изменении антимикробных свойств стрептомицета и ЦБ – компонентов модельной ассоциации по сравнению с монокультурами стрептомицета и ЦБ свидетельствуют о симбиотическом характере взаимодействия *O. terebriformis* и *S. odorifer* в ассоциации.

Очевидно, что актиномицеты в качестве ассоциативных симбионтов в природных альгобактериальных матах гиперсолёных озёр могут оказывать позитивное влияние на формирование и функционирование мата в целом, стимулируя фотосинтетическую активность ЦБ и выполняя ценозообразующую функцию выделением антибиотиков. Изучение ассоциаций актиномицетов с ЦБ важно для лучшего понимания функционирования природных альго-бактериальных матов и циклов биогенов в водоёмах [34].

Аксеничную культуру свободноживущей гетероцистообразующей ЦБ *Anabaena variabilis* Kütz. ATCC 29413, полученную из музея кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, использовали в качестве компонента для формирования экспериментальной цианобактериально-актиномицетной ассоциации потому, что в синцианозах саговниковых растений (современные саговники (цикадовые) – реликтовые голосеменные, по внешнему виду напоминающие пальмы) микродоминантами являются гетероцистные ЦБ из порядка Nostocales). Актиномицетные компоненты отбирали из числа культур, изолированных из апогеотропных

корней оранжерейных саговниковых растений *Stangeria eriopus* (G. Runtze) Nash и *Cycas micholitzii* Dyer (Государственный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, г. Москва). Согласно принятым критериям создания цианобактериально-актиномицетных ассоциаций отобраны два штамма *Str. cyaneofuscatus* шт. № 1 и *Str. pluricologrescens* шт. № 2, идентифицированные по фенотипическим и молекулярно-биологическим признакам как представители рода *Streptomyces* [35]. Актиномицеты выделяли из предварительно растёртых апогеотропных корней саговников методом «рассыпки» на агаризованную питательную среду минеральный агар 1 [36]. Стрептомицеты поддерживали на среде овсяный агар [37].

Антагонистическая активность между отобранными штаммами стрептомицетов и аксеничной культурой свободноживущей гетероцистной ЦБ *A. variabilis* Kütz. ATCC 29413 отсутствовала. Монокультуру ЦБ *A. variabilis* поддерживали на среде Берджи (BG-11) [38] при постоянном освещении (780 лк, $t^{\circ} = 24 \pm 1$ °C).

Отобранные стрептомицеты идентифицированы на основании фенотипических свойств и секвенирования гена 16S рРНК как представители *Str. pluricologrescens* штамм 1 и *Str. cyaneofuscatus* штамм 2. Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК штаммов 1 и 2 депонированы в GenBank NCBI с присвоением индивидуальных номеров доступа: *Str. pluricologrescens* 1 FR837629 и *Str. cyaneofuscatus* 2 FR837630 [39].

Таксис клеток *A. variabilis* к мицелию стрептомицетов оценивали по величине коэффициента ориентации (K_{or}), рассчитываемого как соотношение площадей, занимаемых трихомами *A. variabilis*, растущими по направлению к стрептомицету и в противоположном от стрептомицета направлении. Величина коэффициента ориентации (K_{or}), равная 2, демонстрировала наличие положительного таксиса ЦБ к стрептомицету [40].

Экспериментальные цианобактериально-актиномицетные ассоциации формировали из 7-суточного мицелия стрептомицета, выращенного в погружённой культуре на минеральной среде 1, и ЦБ, выращенной на среде BG-11 в течение 3 недель. Компоненты инокулята смешивали (соотношение 1:1) и ассоциацию выращивали в жидкой или на агаризованной среде BG-11 в статическом режиме в люминостате при постоянном освещении (780 лк и $t^{\circ} = 24 \pm 1$ °C).

Ассоциации стрептомицета и ЦБ активно росли как в жидких, так и на агаризованных

питательных средах. При росте ассоциаций, сформированных из *A. variabilis* и *S. pluricolarescens* 1FR837629, в жидкой питательной среде в статических условиях культивирования отмечали образование талломов, формирующихся в результате оплетения конгломератов стрептомицетного мицелия нитями ЦБ. Явление формирования устойчивых талломов, состоящих из переплетённых гиф актиномицета и трихомов ЦБ, которые трудно разрушить, отмечалось ранее [41].

Морфологические и ультраструктурные адаптационные изменения цианобактерий и актиномицетов в экспериментальных ассоциативных цианобактериально-актиномицетных талломах

В экспериментальном ассоциативном талломе, сформированном из трихомов ЦБ *A. variabilis* и гиф стрептомицетов *S. pluricolarescens* 1FR837629, выделенных из природных синцианозов саговниковых растений, обнаружены морфологические изменения клеток ЦБ, не наблюдаемые в монокультуре. В ассоциативном талломе, сформированном нитями *A. variabilis* и гифами *Str. pluricolarescens* 1FR837629, при изучении в сканирующем электронном микроскопе (Hitachi 405 S, Япония), наряду с вегетативными клетками и гетероцистами, обнаружены формы несбалансированного роста ЦБ в виде гигантских дисковидных изогнутых и ромбовидных клеток. В монокультуре *A. variabilis* подобных морфологически изменённых клеток не обнаружено. В ассоциативном талломе доля гетероморфных клеток в трихомах ЦБ составляла до 34% от среднего их числа в образце. В цианобактериально-актиномицетной ассоциации среднее отношение длины клеток ЦБ к ширине варьировало от 1,22 до 2,32, в то время как в монокультуре этот показатель не превышал значений 1,15 (минимальное значение) – 1,20 (максимальное значение). В экспериментальных ассоциациях на поверхности талломов была обнаружена гиперпродукция слизистого матрикса в виде мелковолоконистой сеточки, в которую оказывались погружёнными нити ЦБ и гифы стрептомицета, что свидетельствует о возникновении специфической ассоциативной морфоструктуры [35].

Следует отметить, что морфологические изменения ЦБ (укорочение нитей, увеличение размеров клеток, возрастание доли гетероцист от общего числа клеток) наблюдали как

в природных симбиозах с грибами (лишайники) [11], высшими растениями [42, 43], так и в модельных ассоциациях с культурами растительных клеток при компартментации внутри тканей макросимбионтов [44, 45]. При росте в ассоциациях у ЦБ обнаруживаются также признаки нарушения клеточного деления. В зонах локализации симбиотических ЦБ в растительных синцианозах микросимбионты образуют клеточные формы, специализированные на гиперпродукции слизистых веществ. Предполагается, что экстрацеллюлярные полимеры (преимущественно полисахаридной природы) играют структурообразующую роль в межклеточном транспорте метаболитов [43, 46, 47]. Такие изменения цианобионтов считаются типичными для природных симбиозов с высшими растениями. Сходство морфологических изменений ЦБ в талломах модельных ассоциаций с актиномицетами и природных системах предполагает, что для эффективного функционирования цианобионтов необходимы условия их тесного контакта с актиномицетом и воздействие его метаболитов.

Адаптационные изменения ЦБ, выявляющиеся при их взаимодействии с актиномицетами в модельных ассоциациях, возможно, являются результатом длительной ко-эволюции организмов, потенциально способных к формированию симбиозов.

В экспериментальном талломе, сформированном трихомами ЦБ *A. variabilis* и гифами *S. pluricolarescens* 1FR837629, наблюдаются ультраструктурные изменения ЦБ [39, 48]. Клетки ЦБ в составе ассоциативного таллома не имеют чётких очертаний, что может быть объяснено формированием клеток с дефектной клеточной стенкой, характеризующихся частичной утратой пептидогликанового слоя. В ассоциативном талломе в популяции клеток ЦБ отмечено формирование спороподобных клеток – акинет, что в литературе отмечается для природных синцианозов растений [49]. В монокультуре ЦБ *Anabaena variabilis* акинеты отсутствовали. В цианобактериально-актиномицетных талломах было отмечено образование форм несбалансированного роста у клеток с дефектной клеточной стенкой [39].

В процессе исследования ультратонких срезов ассоциативного таллома, сформированного клетками ЦБ *A. variabilis* и гифами *S. pluricolarescens* 1FR837629, в трансмиссионном электронном микроскопе впервые обнаружены специфические особенности актиномицетного компонента [39, 48]. Выявлено,

что часть актиномицетных гиф в талломе характеризуется деградацией внутреннего содержимого и разрушением клеточной стенки. В клетках с признаками деградации часть цитоплазмы без изменений отделялась цитоплазматической мембраной от остального содержимого. Отмечено присутствие гиф, у которых отсутствует пептидогликановый слой, но сохраняется цитоплазматическая мембрана с наружными выростами, что может свидетельствовать об образовании L-подобных форм у актиномицетов в ассоциативном талломе.

При пересеве 1,5- и 2-месячных талломов ассоциации на свежую среду демонстрировался рост актиномицета, что может свидетельствовать о жизнеспособности гиф актиномицетов в ассоциативном талломе.

Из литературы известно, что L-подобные формы бактерий, у которых клеточная стенка либо модифицирована, либо отсутствует, могут образовывать симбиозы с растениями и выступать в этих симбиозах в качестве биоконтрольных агентов [50]. Очевидно, L-подобные формы актиномицетов, являющихся ассоциативными компонентами синцианоза кораллоидных корней саговникового растения, могут осуществлять биоконтрольные функции в данном растительном синцианозе.

Таким образом, зафиксированы морфологические и ультраструктурные изменения компонентов в сформированном цианобактериально-актиномицетном талломе, что доказывает симбиотический характер взаимодействия ЦБ и актиномицетов в системе.

Физиолого-биохимические адаптации цианобактерий и актиномицетов в экспериментальных ассоциативных талломах

Выявлены существенные различия в физиолого-биохимических характеристиках ЦБ *A. variabilis*, развивающейся в монокультуре и в ассоциативном талломе с *S. pluricologrescens* 1FR837629. В экспериментальном талломе установлено увеличение (в десятки раз) азотфиксирующей активности ЦБ, определяемой методом ацетиленредукции [51], по сравнению с монокультурой. Стимуляция азотфиксирующей активности ЦБ *A. variabilis* в ассоциативном талломе со стрептомицетом по сравнению с монокультурой ЦБ коррелировала с увеличением доли специализированных азотфиксирующих клеток – ГЦ в нитях ЦБ в ассоциации со стрептомицетом *S. pluricologrescens* 1FR837629 по сравнению с монокульту-

рой цианобактерии. Доля ГЦ от среднего числа клеток в трихомах ЦБ в монокультуре составляла $3,9 \pm 2,4\%$, в ассоциации со стрептомицетом – $9,5 \pm 2,9\%$ [39, 48].

Следует подчеркнуть, что исследуемые штаммы стрептомицетов были изолированы из апогеотропных корней саговниковых растений – синцианоза, где они являются ассоциативными микросимбионтами наряду с доминантными симбионтами – азотфиксирующими ЦБ.

Сравнительный анализ антагонистической активности монокультур цианобактерии *A. variabilis* и стрептомицетов *S. pluricologrescens* 1FR837629 и *S. cyaneofuscatus* 2FR837630, а также двучленных ассоциативных талломов (ЦБ – актиномицет) демонстрирует изменение антимикробных свойств талломов ассоциаций по сравнению с монокультурами их компонентов [48]. Отмечено усиление антимикробной активности ассоциативных талломов с каждым из двух актиномицетов в отношении бактерий *Rhodococcus* sp. шт. 1, *Micrococcus* sp. шт. 8, *Aquaspirillum* sp. шт. 19, *Bacillus brevis* шт. Т, актиномицетов *Streptomyces* sp. шт. 175, грибов *Fusarium* sp. шт. 3. Показано, что в случае таллома, в котором в качестве мицелиального компонента присутствовал актиномицет *S. pluricologrescens* 1FR837629, происходит расширение антимикробного спектра и проявление антибиотической активности в отношении следующих тест-культур микроорганизмов: бактерий *Methilobacterium* sp. шт. 9, *Flavobacterium* sp. шт. 21, *Janthinobacterium* sp. шт. Т; грибов *Penicillium* sp. шт. 2; дрожжей *Metchnokowia pulcherrima* шт. 25. Монокультуры ЦБ и актиномицетов и цианобактериально-актиномицетной ассоциации *A. variabilis* и *S. cyaneofuscatus* 2FR837630 подобных свойств к перечисленным тест-культурам не проявляли.

Наблюдение за изменением значений рН культуральной жидкости показало подщелачивание среды в процессе роста ассоциативного таллома и монокультур *S. pluricologrescens* 1FR837629 и *A. variabilis*. При этом значения рН среды при развитии ассоциативного таллома находились между значениями, наблюдаемыми при культивировании монокультур актиномицета и ЦБ. Таким образом, в процессе роста ассоциации значение рН среды становится всё более оптимальным для жизнедеятельности одновременно обоих компонентов ассоциативного таллома [39, 48].

В зрелом ассоциативном талломе (21 сут.), по сравнению с талломом более молодого возраста (10 сут.), обнаружено изменение хода процесса фотосинтеза, зафиксированное

с помощью метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Отмечено медленное снижение сигнала ЭПР1 (сигнал от окисленных центров хлорофилла P700) исследуемого образца зрелого таллома. Подобный характер спектра может свидетельствовать о нарушении потока электронов от фотосистемы (ФС) II к ФС I, т. е. об изменении фотосинтеза в ЦБ, входящей в состав ассоциативного таллома. Известно, что ФС II не работает в ГЦ [47]. Очевидно, полученные результаты можно объяснить увеличением количества ГЦ в нитях ЦБ и, возможно, более быстрым старением ЦБ в ассоциации с актиномицетом по сравнению с монокультурой, т. к. известно [47], что с возрастом количество ГЦ в нитях ЦБ возрастает (как следствие истощения со временем питательной среды и, в частности, уменьшением в ней минерального азота).

Сравнение сигналов ЭПР1 в талломе ассоциации и в монокультуре ЦБ демонстрирует 6-кратное увеличение амплитуды сигнала в случае ассоциативного таллома, что может свидетельствовать о соразмерном увеличении биомассы ЦБ под влиянием актиномицета в талломе по сравнению с монокультурой.

В наших исследованиях методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения и ЯМР-спиновое эхо показано, что в лиофильно высушенных образцах таллома цианобактериально-актиномицетной ассоциации, сформированной из *A. variabilis* и *S. pluricolorescens* 1FR837629, присутствует фракция подвижных протонов (2,7% от веса образца, $T_2 = 16$ мс), которая сохраняется и при низких температурах. На кривой спектра протонного резонанса лиофильно высушенного образца таллома отмечен химический сдвиг около 5 миллионных долей (м.д.) от тетраметилсилана (соответствующий нулевой отметке, или 0 м.д.), характерный для протонов «свободной» воды [52]. В лиофильно высушенных монокультурах стрептомицетов и ЦБ, используемых для формирования ассоциативного таллома, «свободная» вода отсутствует.

Установлено, что присутствие «свободной» воды в микроорганизмах способствует их адаптации к экстремальным условиям обитания [53]. Так, в лиофильно высушенных монокультурах стрептомицета и зелёной водоросли *Chlorella vulgaris* с очень низким титром клеток не обнаруживали свободную воду, в то время как в жизнеспособном лиофильно высушенном лишайникоподобном талломе, экспериментально сформированном из этих организмов, регистрировали присутствие под-

вижных протонов воды (около 3%) [54, 55, 4]. Общей закономерностью является повышенная устойчивость к стрессовым факторам микроорганизмов, развивающихся в составе бинарных и более сложных микробных консорциумов – биоплёнок [56]. Можно предположить, что в данном случае, в условиях развития ЦБ в ассоциации с актиномицетом происходят значительные структурные изменения клеточных биополимеров, которые и обуславливают появление фракции подвижной воды в лиофильно высушенных образцах ассоциативного таллома.

Установлено, что адаптивным преимуществом ЦБ, ассоциированных с актиномицетами, является сохранение жизнеспособности и функциональной активности при высушивании. В клетках ЦБ в талломе, экспонируемом в условиях экстремально низком давлении влаги (-96,4 МПа, a_w 0,50), сохранялся хлорофилл, о чём свидетельствовала собственная флуоресценция клеток ЦБ, наблюдаемая в люминесцентном микроскопе. В монокультуре ЦБ в адекватных условиях флуоресценции клеток в большинстве случаев не наблюдалось, что может быть объяснено деградацией хлорофилла в условиях экстремально низкой влажности. Причём если в недельном ассоциативном талломе количество флуоресцирующих клеток ЦБ превышало таковое в монокультуре в среднем лишь на 20%, то в 2-недельном талломе эта разница составляла уже около 70%.

Подобная устойчивость микроорганизмов к стрессовым факторам среды известна в микробных консорциумах – биоплёнках [56], экспериментальных лишайникоподобных талломах актинолишайников [4]. Можно предположить, что в условиях ассоциации происходят значительные структурные изменения, которые и обуславливают появление фракции подвижных протонов в лиофильно высушенных образцах ассоциативного таллома.

Таким образом, сформированы экспериментальные цианобактериально-актиномицетные талломы, в которых выявлены специфические адаптивные физиолого-биохимические изменения (расширение и усиление антимикробного спектра актиномицетов, присутствие «свободной» воды в лиофильно высушенном талломе, нарушение работы второй фотосистемы в тилакоидах ЦБ) по сравнению с монокультурами актиномицета и ЦБ. В экспериментальном ассоциативном талломе обнаружены ультраструктурные изменения (L-подобные формы актиномицета,

клетки ЦБ с дефектной клеточной стенкой), не отмеченные в монокультурах актиномицета и ЦБ и свидетельствующие о симбиотическом характере взаимодействия партнеров в талломе.

Отмечено существенное увеличение биомассы ЦБ в талломе ассоциации по сравнению с монокультурой ЦБ.

Установлено сохранение собственной флуоресценции хлорофилла в клетках ЦБ при экспонировании ассоциативного таллома в условиях экстремально низкого давления влаги (-96,4 МПа, a_w 0,50) и отсутствие флуоресценции при экспонировании монокультуры ЦБ в адекватных условиях. Очевидно, ксеротолерантность ЦБ в талломе ассоциации связана с присутствием «свободной» воды в ассоциативном талломе, обнаруженной методом ЯМР.

Заключение

Мицелиальные актинобактерии (актиномицеты) широко распространены в природе как ассоциативные компоненты альгобактериальных, цианобактериальных сообществ и симбиозов. Однако за пределами пристального внимания исследователей оставался до последнего времени вопрос о том, какая роль принадлежит актиномицетам в процессах формирования и функционирования симбиозов. Для выяснения этого вопроса предпринимались попытки формирования экспериментальных цианобактериально-актиномицетных ассоциаций. Микроскопические исследования экспериментального ассоциативного таллома, компонентами которого служили гетероцистообразующая цианобактерия *A. variabilis* и актиномицеты *Str. pluricolorescens* или *S. cyanofuscatus*, выявили морфологические изменения клеток ЦБ (формы несбалансированного роста ЦБ в виде гигантских, дисковидных, изогнутых и ромбовидных клеток), что не отмечено для монокультур ЦБ, но типично для синцианозов с растениями. В экспериментальных ассоциативных талломах была обнаружена гиперпродукция слизистого матрикса в виде мелковолокнистой сеточки, в которую оказывались погруженными нити ЦБ и гифы стрептомицета. В ассоциативном экспериментальном талломе наблюдались ультраструктурные изменения компонентов, отсутствующие в монокультурах: ЦБ (формирование клеток с дефектной клеточной стенкой, характеризующейся частичной утратой пептидогликанового слоя и спороподобных клеток – акинет), что в литературе отмечается для природ-

ных синцианозов растений, и стрептомицета (появление L-подобных форм).

Отмечены физиологические изменения ЦБ и актиномицетов в экспериментальном талломе: замедление спада электронно-парамагнитного резонансного (ЭПР) сигнала, что свидетельствует о нарушении потока электронов от ФС II к ФС I тилакоидов ЦБ, то есть об изменении фотосинтетической работы тилакоидов ЦБ в ассоциации по сравнению с монокультурой ЦБ; отмечено существенное увеличение биомассы ЦБ в талломе ассоциации по сравнению с монокультурой ЦБ. Установлено сохранение собственной флуоресценции хлорофилла в клетках ЦБ в ассоциации при экспонировании ассоциации в условиях экстремальной влажности (a_w 0,50) при отсутствии флуоресценции в клетках монокультуры ЦБ в адекватных условиях, предположительно связанное с установленным присутствием «свободной» воды в талломе ассоциации, обнаруженной методом ЯМР. Установлено расширение спектра антимикробного действия и усиление антагонистического влияния на тест-культуры микроорганизмов ассоциативного таллома по сравнению с монокультурами ЦБ и актиномицетов.

Появление L-подобных форм у актиномицета, наличие изменений в ультраструктуре клеток и в работе фотосинтетического аппарата ЦБ, наряду с изменением экофизиологических свойств компонентов ассоциации, свидетельствует о симбиотическом характере взаимодействия компонентов в экспериментальном ассоциативном талломе. Очевидно, актиномицеты как ассоциативные симбионты могут оказывать позитивное воздействие на экосистему в целом вследствие стимулирующего влияния на азотфиксирующую способность ЦБ и повышения защиты всей системы от патогенных микроорганизмов за счёт выделения антибиотиков.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 13-04-00269.

Литература

1. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Немцева Н.В., Черкасов С.В. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург: УрО РАН. 2007. 264 с.
2. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Перунова Н.Б., Усвяцов Б.Я., Черкасов С.В. Симбиоз и его роль в инфекции. Екатеринбург: УрО РАН, 2011. 301 с.
3. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение в прикладную микробиологию. М.: Университет. 2001. 255 с.

4. Звягинцев Д. Г., Зенова Г. М. Экология актиномицетов. М.: ГЕОС, 2001. 258 с.
5. The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space / Whitton B.A., Potts M. (Eds.). Kluwer Acad. Publ. 2000. 669 p.
6. Бактериальная палеонтология. 2002 / Под ред. А. Ю. Розанова. М. 188 с.
7. Заварзин Г.А. Становление биосферы // Микробиология. 1997. Т. 66. №. 6. С. 725–734.
8. Домрачева Л.И. «Цветение» почвы и закономерности его развития. Сыктывкар: Изд-во Коми научный центр УрО РАН, 2005. 333 с.
9. Kalakoutskii L.V., Zenova G.M., Soina V.S., Likhacheva A.A. Associations of Actinomycetes with Algae // Actinomycetes. 1990. V. 1(2). P. 27–42.
10. Cyanobacteria in symbiosis / Ed. by Rai A.N., Bergman B., Rasmussen U., Dordrecht Kluwer Acad. Publ. 2002. 368 p.
11. Rai A.N. Cyanobacterial-fungal symbioses: the cyanolichens // In: Handbook of symbiotic cyanobacteria. Rai A.N. (Ed.). // CRC Press, Boca Raton: Florida. USA. 1990. P. 9–41.
12. Adams D.G. Symbiotic Interactions. //The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. Whitton B.A., Potts M. (Eds.). Kluwer Acad. Publ. 2000. P. 523–561.
13. Калакуцкий Л.В., Шарая Л.С. Актиномицеты и высшие растения. Успехи микробиологии. 1990. Т. 24. С. 26–65.
14. Huss-Danell K. Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation // New Phytol. 1997. V. 136. P. 375–405.
15. Мерзаева О.В., Широких И.Г. Образование ауксинов эндофитными актинобактериями озимой ржи // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 45. № 1. С. 51–57.
16. Аристовская Т. В. Микробиология процессов почвообразования. Л.: Наука, 1980. 187 с.
17. Сушкина Н.Н., Цюрупа И.Г. Микрофлора и первичное почвообразование. М.: Изд-во Московск. ун-та, 1973. 158 с.
18. Чижилова Н.П., Зенова Г.М., Манучаров А.С., Омарова Е.О., Орлеанский В.К. Изменения в структуре глинистых минералов под влиянием альгобактериальных сообществ // Почвоведение. 2005. № 8. С. 1012–1015.
19. Чижилова Н.П., Омарова Е.О., Зенова Г.М., Манучаров А.С. Взаимодействие циано-актиномицетных сообществ с глинистыми минералами // Бюллетень Почвенного института имени В.В. Докучаева. 2008. Т. 61. С. 50–56.
20. Чижилова Н.П., Омарова Е.О., Лобакова Е.С., Зенова Г.М., Манучаров А.С. Кристаллохимические преобразования в слоистых силикатах под влиянием ассоциаций цианобактерий и актиномицетов // Почвоведение. 2009. № 1. С. 79–85.
21. Зенова Г.М., Чижилова Н.П., Омарова Е.О., Иванова Е.А. Экологическая роль цианобактериально-актиномицетных ассоциаций в изменении структуры глинистых минералов // Проблемы экологии и агрохимии. 2009 а. № 4. С. 25–31.
22. Зенова Г.М., Иванова Е.А., Омарова Е.А., Николаев Г.М., Лобакова Е.С., Чижилова Н.П. Модельные ассоциации актиномицетов и цианобактерии *Anabaena variabilis* Kutz. и их способность к преобразованию структуры глинистых минералов // Теоретическая и прикладная экология. 2009 б. № 3. С. 79–88.
23. Иванова Е. А., Чижилова Н.П., Зенова Г.М., Омарова Е.О., Манучаров А.С. «Биодеградация глинистых минералов под влиянием цианобактериально-актиномицетных ассоциаций» // Вестник Московск. ун-та. Сер. 17. Почвоведение. 2009. № 3. С. 12–16.
24. Budel B., Weber B., Kuhl M., Planz H., Sultermeyer D., Wessels D. Reshaping of sandstone surfaces by cryptoendolithic cyanobacteria bioalkalization causes chemical weathering in arid landscapes // Geobiology. 2004. V. 2(4). P. 261–268.
25. Емцев В.Т. Ассоциативный симбиоз почвенных diaзотрофных бактерий и овощных культур // Почвоведение. 1994. № 4. С. 74–84.
26. Проворов Н.А. Генетико-эволюционные основы учения о симбиозе // урн. общ. Биологии. 2001. Т. 62. С. 472–495.
27. Collins M., Lawson P.A., Labrenz M., Tindall B.J., Weiss N., Hirsch P. Nesterenkonia lacusekhoensis sp. Nov., isolated from hypersaline Ekho Lake, East Antarctica, and emended description of the genus Nesterenkonia // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. № 4. P. 1145–1150.
28. Papineau Dominic, Walker, Jeffrey J. Mojzsis, Stephen J. Pace, Norman R. Composition and structure of microbial communities from stromatolites of Hamelin pool in shark bay, Western Australia // Appl. And Environ. Microbiol. 2005. 712, № 8. P. 4822–4832.
29. Jungblut A.D., Hawes I., Moutfort D., Hitzfeld B., Dietrich D.R., Burns B.P., Neilan B. Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity melt-water ponds of MC Murdo Ice Shelf, Antarctica // Environ. Microbiol. 2005. 7. № 4. P. 519–529.
30. Selbmann L., Zucconi L., Ruisi S., Grube M., Cardinale M., Onofri S. Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance // Polar Biol. 2010. V. 33. P. 71–83.
31. Лобакова Е.С., Оразова М.Х., Добровольская Т.Г. Структура микробных комплексов апогеотропных корней и прикорневой зоны саговниковых растений // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 707–713.
32. Миходюк О.С., Орлеанский В.К., Шадрин Н.В., Герасименко Л.М. Современные циано-бактериальные маты как аналоги биоценозов докембрия // Современная палеонтология: классические и новейшие методы. М.: ПИН РАН, 2005. С. 15–28.
33. Зенова Г.М., Омарова Е.О., Курапова А.И., Орлеанский В.К., Шадрин Н.В. Модельные ассоциации *Cyanoprokaryota* и актиномицетов // Альгология. 2010. Т. 20. № 3. С. 312–317.

34. Омарова Е.О. Экспериментальные циано-актиномицетные ассоциации. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. 2007. М. 26 с.
35. Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М., Лобакова Е.С., Николаев Г.М., Омарова О.И., Иванова Е.А. Савельев И.Б. Морфолого-физиологические изменения цианобактерии в экспериментальных цианобактериально-актиномицетных ассоциациях // Микробиология. 2010. Т. 79. № 3. С. 329–336.
36. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. М.: Наука. 1983. 245 с.
37. Зенова Г.М. Почвенные актиномицеты редких родов. М.: Изд-во Московск. ун-та, 2000. 81 с.
38. Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chlorococcales). // Bacteriol. Rev. 1971. V. 35. P. 171–205.
39. Лобакова Е.С., Зенова Г.М., Селях И.О., Николаев Г.М., Тимофеев К.Н., Иванова Е.А., Соина В.С., Омарова Е.О., Рубин А.Б. Экофизиологические особенности модельных цианобактериально-актиномицетных ассоциаций // Известия РАН. Серия биологическая. 2013.
40. Омарова Е.О., Зенова Г.М., Орлеанский В.К., Лобакова Е.С. Экспериментальные циано-актиномицетные ассоциации // Вестник Московск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2007. № 1. С. 3–8.
42. Rai A.N., Bergman B., Rasmussen U. (Eds.) Cyanobacterial – plant symbiosis/ Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2002. 355 p.
43. Adams D.G., Bergman B., Nierzwicki-Bauer S.A., Rai A.N., Schubler A. Cyanobacterial-Plant Symbioses // The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria 3-d ed./ Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. New York: Springer, 2006. V. 1. Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology. P. 331–363.
44. Gusev M.V., Baulina O.I., Gorelova O.A., Lobakova E.S., Korzhenevskaya T.G. Artificial Cyanobacterium-Plant Symbioses. // Cyanobacteria symbiosis / Ed. By A.N. Rai, B. Bergman, U. Rasmussen. Kluwer Acad. Publ.: Dordmoot. 2002. P. 253–313.
45. Korzhenevskaya T.G., Baulina O.I., Gorelova O.A., Lobakova E.S. et al. Artificial Syncyanoses: the potential for modeling and analysis of natural symbioses // Symbiosis. 1993. V. 15. P. 77–103.
46. Баулина О.И., Лобакова Е.С. Необычные клеточные формы с гиперпродукцией экстрацеллюлярных веществ в популяциях цианобионтов саговниковых // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 792–805.
47. Баулина О.И. Ультроструктурная пластичность цианобактерий. М.: Научный мир, 2010. 239 с.
48. Иванова Е.А. Модельные ассоциации цианобактерии *Anabaena variabilis* и актиномицетов и их роль в изменении структуры глинистых минералов. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. 2013. М. 26 с.
49. Горелова О.А. Растительные синцианозы: изучение роли макропартнера на модельных системах: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.: МГУ. 2005. 47 с.
50. Innes C.M.J., Allan E.J. Induction, growth and antibiotic production of *Streptomyces viridifaciens* l-form bacteria // J. Appl. Microbiol. 2001. V. 90. P. 301–308.
51. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ. 1991. 303 с.
52. Лундин Ф.Г., Федин Э.И. ЯМР-спектроскопия. М. Наука, 1986. 222 с.
53. Аксенов С.И., Николаев Г.М., Горячев С.Н. Изолированная подвижная вода как показатель устойчивости организмов к высушиванию. Торможение жизнедеятельности клеток. Рига: Зинатне, 1987. С. 71–84.
54. Зенова Г.М., Николаев Г.М., Сумарукова И.Г., Калакуцкий Л.В. Сохранение жизнеспособности компонентов актиномицетно-водорослевой ассоциации при низкой влажности // Биологические науки. 1986. № 6. С. 79–83.
55. Николаев Г.М., Зенова Г.М., Николаева Ю.Г., Савельев И.Б. Влияние высушивания и низких температур на водоросли, лишайники и искусственные ассоциации с лишайникоподобным талломом // Современные проблемы альгологии: Материалы международной научной конференции и VII Школы по морской биологии. Ростов-на-Дону. 2008. С. 248–249.
56. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биоупленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма // Микробиология. 2007. Т. 76. № 2. С. 149–163.