

УДК 579.81: 574.36

¹С.А. Джокебаева*, ¹С.Ж. Колумбаева,
¹А.В. Ловинская, ²Д.А. Бегимбетова

¹Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Республика Казахстан, г. Алматы

²Назарбаев Университет, Республика Казахстан, г. Астана

*E-mail: Saule.Jokebayeva@kaznu.kz

Динамика ростовых процессов цианобактерий в моно- и смешанных культурах

Изучена динамика ростовых процессов моно- и смешанных культур цианобактерий. Установлено, что в дикультурах различных видов цианобактерий могут возникать как антагонистические, так и симбиотические взаимовлияния между видами.

Ключевые слова: цианобактерии, дикультуры, биомасса, коэффициент размножения.

С.А. Джокебаева, С.Ж. Колумбаева, А.В. Ловинская, Д.А. Бегимбетова

Моно- және аралас өсінділерде цианобактериялардың өсу процестерінің динамикасы

Моно- және аралас өсінділерде цианобактериялардың өсу процестерінің динамикасы зерттелді. Циано-бактериялар дикультурасының әр түрлерінде түр аралық антогонистік, сонымен бірге симбиоздық өзара әре-кеттесулер пайда болатыны анықталды.

Түйін сөздер: цианобактериялар, дикультуралар, биомасса, көбею коэффициенті.

S.A. Dzhokebayeva, S.Zh. Kolumbayeva, A.V. Lovinskaya, D.A. Begimbetova

The growth dynamics of cyanobacteria in mono and mixed cultures

The growth dynamics of cyanobacteria in mono-and mixed cultures are studied. It is established the two-specific cultures of the cyanobacteria species may arise antagonistic and symbiotic relationships between species.

Keywords: cyanobacteria, two-specific cultures, biomass, breeding ratio.

Для многих регионов мира характерна кризисная экологическая ситуация, обусловленная загрязнением окружающей среды продуктами хозяйственной деятельности человека. Накопление в биосфере тяжелых металлов, пестицидов, красителей, углеводов и других поллютантов приводит к росту заболеваемости населения, снижению численности редких и эндемичных видов растений и животных, к дестабилизации природных экосистем [1-4]. Практически все загрязнители окружающей среды могут оказывать мутагенное и токсическое действие на живые организмы в результате активации процессов

образования внутриклеточных свободных радикалов, ингибирования активности репаративных ферментных систем или непосредственного взаимодействия с молекулами ДНК [5, 6].

Поскольку исключить контакт человека с токсическими и мутагенными факторами практически невозможно, особую актуальность приобретает поиск протекторов природного происхождения от их негативного воздействия. Известно, что перспективными источниками биологически активных веществ, повышающих иммунные реакции организма, могут быть микроводоросли, которые в процессе жизнедеятельности

тельности накапливают в клетках и секретируют в окружающую среду метаболиты с высокой биологической активностью [7].

Межвидовые взаимоотношения цианобактерий (синезеленых водорослей) в сообществах выступают как один из факторов, обуславливающих качественный и количественный состав продуцируемых метаболитов. Имеются сведения об активизации ростовых процессов при совместном культивировании цианобактерий с симбиотическим типом взаимовлияния [8]. В клетках и культуральной жидкости при этом обнаруживаются стимуляторы роста, продуцируемые обоими видами. При антагонистическом типе взаимовлияния один из видов подавляет другие и продуцирует ингибиторы (в том числе и токсины), тормозящие ростовые процессы сопутствующих видов.

Среди водорослевых метаболитов выявлены регуляторы и ингибиторы роста растений (фитогормоны, индольные и фенольные соединения, стероиды, терпеноиды и др.). Обнаружено, что водорослевые экстракты и фильтраты при предпосевной обработке стимулируют развитие семян, ускоряют рост растений и протекание фаз онтогенеза, способствуют увеличению их биомассы и урожайности, повышают иммунитет, а при обработке растений задерживают в них после скашивания развитие процессов старения, разрушения белка, хлорофилла, каротиноидов. Кроме того, у многих цианобактерий обнаружены метаболиты, оказывающие бактерицидное, фунгицидное, гербицидное и противовирусное действие [9, 10].

Таким образом, поиск биологически активных веществ природного происхождения для коррекции токсических и мутагенных эффектов, широко используемых в хозяйственной деятельности ксенобиотиков, а также для использования в качестве профилактических средств защиты генетических структур организма от мутагенных воздействий, является актуальной задачей. В пользу актуальности указанной проблемы также свидетельствует крайне малая степень изученности представителей альгофлоры Казахстана на антимутагенную активность. В условиях дефицита отечественных фитопрепаратов испытание биологически активных соединений из микроводорослей на антиоксидантную и антимутагенную активность представляет собой своевременную и перспективную задачу. На первом

этапе такого поиска необходим отбор и сочетание таких видов микроводорослей, которые бы эффективно продуцировали метаболиты, обладающие биологической активностью. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение ростовых процессов микроводорослей в моно- и смешанных культурах, перспективных продуцентов вторичных метаболитов, обладающих протекторной активностью.

Материал и методы исследования

Объектами исследования явились культуры цианобактерий: *Anabaena flos-aquae f.gracilis*, *Anabaenopsis Arnoldii* и *Calothrix parietina f.brevis*. Культивирование проводили на среде Фитцджеральда [11]. Моно и смешанные культуры микроводорослей культивировали в конических колбах объемом 250-500 мл в люминостате при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$ и круглосуточном освещении. Продолжительность культивирования составила 30 дней. Коэффициент размножения культур (КР) определяли через каждые 10 дней как отношение сухой массы клеток в конце опыта к сухой массе в начале опыта. В культуральной жидкости, отделенной от клеток центрифугированием, определяли содержание внеклеточного белка по методу Лоури [11].

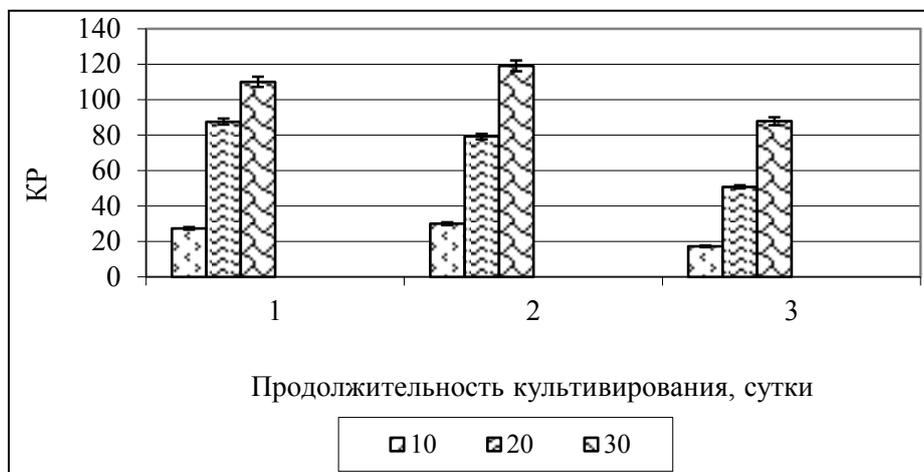
Результаты исследований и их обсуждение

Рост водорослей в культуре существенно отличается от роста в естественной среде обитания. Наличие основных элементов минерального питания, стабильная освещенность и постоянная температура позволяют получать достоверную информацию о ростовых процессах в популяции клеток водорослей в культуре. При неизменных перечисленных условиях культивирования нами изучались ростовые процессы цианобактерий в моно- и диккультурах различных видов. Изучение динамики роста водорослей является важным показателем их адаптации к условиям культивирования. Если данный штамм характеризуется высокими темпами накопления биомассы и увеличения плотности клеток в суспензиях, то можно говорить о достаточной степени приспособленности его к росту в условиях *in vitro*.

С увеличением срока культивирования происходило увеличение значения коэффициента размножения, что свидетельствует о том, что нарастание биомассы продолжалось до конца опыта (30 дней) (рисунок 1).

Изучаемые культуры микроводорослей характеризовались высокой интенсивностью накопления биомассы: КР к 30-му дню культивирования составляло 110,0; 119,0 и 87,8,

соответственно. Это может быть связано с условиями круглосуточного освещения, которое способствовало непрерывной пролиферации культур [12].



1 – *Anabaena flos-aquae*; 2 – *Anabaenopsis arnoldii*; 3 – *Calothrix parietina*

Рисунок 1 – Динамика роста культур цианобактерий

Наибольшая скорость роста наблюдалась в период до 10 дней культивирования. Сухая масса клеток увеличивалась в 17-30 раз. В дальнейшем, во второй декаде сухая масса увеличивалась лишь в 1,8-3,2 раза. В третьей декаде прирост клеток еще более замедлялся: от 1,3 у *Anabaena* до 1,7 у *Calothrix*.

В смешанных культурах характер роста водорослей менялся. К абиотическим факторам, влиявшим на рост водорослей в ассоциированных культурах, добавлялся биотический, заключающийся в межвидовом взаимовлиянии партнеров. В смешанной культуре *A.flos-aquae* и *Anabaenopsis sp.* происходило более интенсивное накопление биомассы, чем в монокультурах данных видов. По истечении 20 суток происходило замедление роста культур и снижение темпов прироста биомассы. Совместное культивирование этих видов вызывало более интенсивный прирост биомассы, чем в их монокультурах (рисунок 2,А).

В смешанной культуре *Anabaena flos-aquae* и *Calothrix parietina* (рисунок 2,Б), на первый взгляд, идет параллельное развитие видов (КР в смешанной культуре к 20-му дню культивирования составляет среднее значение между величинами КР обеих монокультур). Только к концу опыта (30 дней) количество накопленной био-

массы незначительно снижается по сравнению с монокультурами. Однако определение уровня жизнеспособности клеток обоих видов показывает, что в смешанной культуре *A.flos-aquae* и *C.parietina* происходит торможение роста калотрикса и постепенное уменьшение вследствие этого количества живых клеток, в то время как в монокультуре этого вида уровень жизнеспособности клеток значительно выше. *Anabaena*, наоборот, в смешанной культуре более жизнеспособна, чем в монокультуре. Возможно, она потребляет экзогенные метаболиты калотрикса, что способствует активизации ее роста. Сама же при этом продуцирует такие соединения, которые подавляют рост калотрикса.

Величина накопления белковых веществ в клетках и культуральной жидкости цианобактерий может служить дополнительной характеристикой интенсивности ростовых процессов в моно- и смешанных культурах. Прижизненное выделение в окружающую среду белковых соединений, а также других метаболитов является широко распространенным процессом в жизнедеятельности водорослей, их неотъемлемой жизненно важной функцией. Очевидно, это обусловлено тем, что обмен у водорослей в значительной мере осуществляется через окружающую среду [14]. В связи с этим выделение

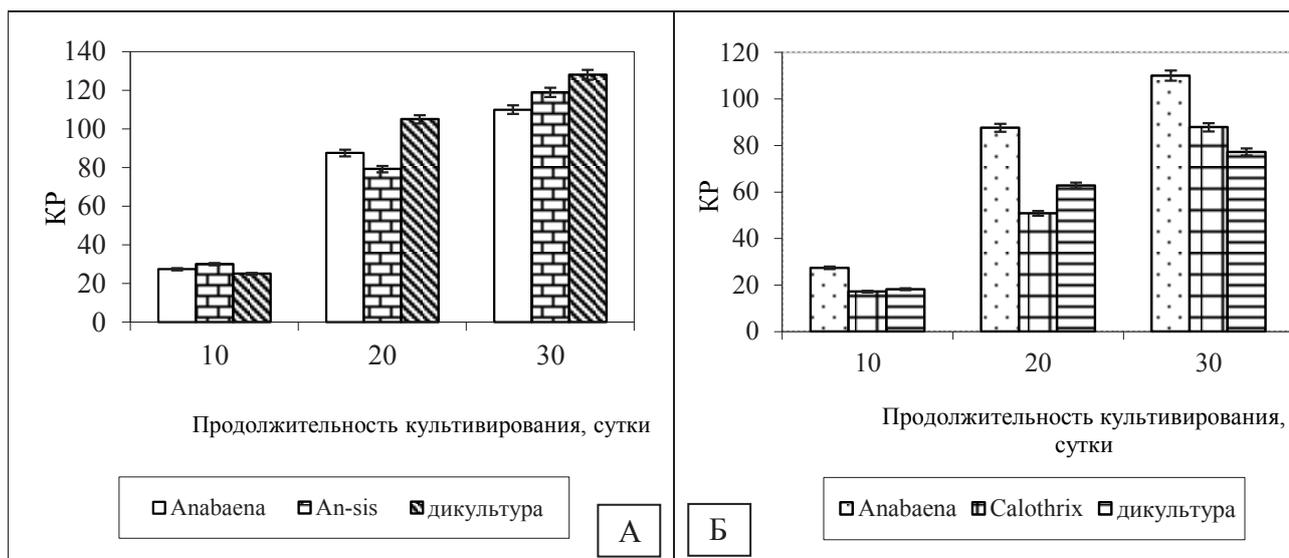


Рисунок 2 - Динамика изменения коэффициента размножения при культивировании цианобактерий в моно- и дикультурах

и поглощение, являясь двумя составляющими обмена веществ между внешней средой и клеткой, определяют накопление органических веществ в среде их обитания [15]. Биологический смысл выделения различных метаболитов Дж. Фогг видит в “подготовке” питательной среды к “потреблению”, так как при участии выделений водорослей происходит растворение, комплексообразование, восстановление различных элементов, получение готовых экзогенных комплексов и т.д. Известно, что доля выделенных водорослями азотсодержащих веществ составляет от 30 до 60% фиксированного азота [16].

Внеклеточный белок у изучаемых видов цианобактерий определяли в 15-дневных культурах, когда ростовые процессы замедляются, а процессы антагонизма в большинстве культур еще только разворачиваются. *Anabaenopsis Arnoldii* в монокультуре выделяет белка почти в два раза больше (60,5 мкг/мл), чем *Anabaena flos-aquae* (37,5 мкг/мл). В смешанной культуре этих видов величина экскретируемого обоими видами белка занимает промежуточное положение между зна-

чениями величин, обнаруженных у монокультур. В смешанной культуре *Anabaena* + *Calothrix* продуцируется меньше экзосметаболитов, чем в монокультурах этих же видов.

Если учесть, что в данной смеси культур *Anabaena flos-aquae* интенсивно размножается, то факт уменьшения белка в фильтратах смешанной культуры позволяет предположить, что она, возможно, переходит на гетеротрофное питание, поглощая выделяемые калотриксом экзосметаболиты белковой природы. Сама же, по-видимому, в процессе аллелопатического взаимодействия выделяет ингибиторы роста, имеющие небелковую природу.

Таким образом, интенсификация роста цианобактерий в двухвидовой культуре, сопровождающаяся увеличением накопления сухой массы по сравнению с монокультурами, позволяет предположить возникновение мутуалистических взаимодействий между видами *Anabaenopsis Arnoldii* и *Anabaena flos-aquae*. В дикультуре *Anabaena flos-aquae* + *Calothrix parietina* возможно установление антагонистических взаимоотношений.

Литература

- 1 Курляндский Б.А., Филова В.А. Общая токсикология. – М.: Медицина, 2002. – 608 с.
- 2 Худoley В.В., Мизгирев И.В. Экологические опасные факторы. - С.-Пб., 1996. - 186 с.
- 3 Артюхов В.Г., Калаев В.Н. Цитогенетический мониторинг состояния окружающей среды на территориях, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС (на

примере пос. Уразово Белгородской области) // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2006. - Т. 46, № 2. - С. 208-215.

4 Калаев В.Н., Карпова С.С. Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма: учебное пособие. - Воронеж: Изд-во ВГУ, 2004. - 80 с.

5 Natarajan A., Molnar P., Sieverdes K., Jamshidi A., Hickman J.J. Microelectrode array recordings of cardiac action potentials as a high throughput method to evaluate pesticide toxicity // Toxicol. in Vitro. - 2006. - Vol. 20, № 3. - P. 375-381.

6 Holland N.T., Duramad P., Rothman N., Figgs L.W., Blair A. et al. Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in vitro and in vivo // Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. - 2002. - Vol. 521, No. 1-2. - P. 165-178.

7 Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Симбиотические взаимоотношения человека и микроорганизмов // Физиология человека. - 2012. - N 1. - С.128-138.

8 Rai A., Bergman B., Rasmussen U. Cyanobacteria in Symbiosis. - New York: Kluwer Academic Publishers, 2004. - 319 pp.

9 Kulik M.M. The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi // European Journal of Plant Pathology. - 1995. - P.585-599.

10 Madhumathi V., Deepa P., Jeyachandran S. Antimicrobial Activity of Cyanobacteria Isolated from Freshwater Lake // International Journal of Microbiological Research. - 2011. - 2 (3). - P. 213-216.

11 Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.В. и др. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. - Киев: Наук. думка, 1975. - 248 с.

12 Bouterfas R., Belkoura M., Dauta A. The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake // Limnetica, 2006, 25 (3). - Pp. 647-656.

13 Сачкова О.П. Некоторые физиолого-биохимические особенности азотфиксирующих синезеленых водорослей *Anabaena oscillarioides* и *Hapalosiphon fontinalis*: дисс.... канд. биол.наук.- Алматы, 1969.-129 с.

14 Kearns K. D. Hunter, M. D. Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium // Environmental Microbiology. - 2000. - 2(3). - P. 291-297.

15 My-Linh Nguyen; Westerhoff P., Baker L. et al.. Characteristics and Reactivity of Algae-Produced Dissolved Organic Carbon // Journal of environmental engineering, 2005. Pp.1574-1582.

16 Fogg G.E. Extracellular products. - In: Physiol. And Biochemistry of Algae / Ed. By R. Lewin. Acad. Press. - New York, 1962. - P. 475-489.

References

- 1 Kurljanskij B.A., Filova V.A. Obshhaja toksikologija. - M.: Medicina, 2002. - 608 s.
- 2 Hudolej V.V., Mizgirev I.V. Jekologicheskie opasnye faktory. - S.-Pb.-1996. -186 s.
- 3 Artjuhov V.G., Kalaev V.N. Citogeneticheskij monitoring sostojanija okruzhajushhej sredy na territorijah, podvergshihsj radioaktivnomu zagrjazneniju v rezul'tate avarii na Chernobyl'skoj AJeS (na primere pos. Urazovo Belgorodskoj oblasti) // Radiacionnaja bio-logija. Radiojekologija. - 2006. - Т. 46, № 2.- S. 208-215.
- 4 Kalaev V.N., Karpova S.S. Citogeneticheskij monitoring: metody ocenki zagrjazne-nija okruzhajushhej sredy i sostojanija geneticheskogo apparata organizma. Uchebnoe posobie. - Voronezh: Izd-vo VGU. - 2004. - 80 s.
- 5 Natarajan A., Molnar P., Sieverdes K., Jamshidi A., Hickman J.J. Microelectrode array re-cordings of cardiac action potentials as a high throughput method to evaluate pesticide toxicity // Toxicol. in Vitro. - 2006. - Vol. 20, № 3. - P. 375-381.
- 6 Holland N.T., Duramad P., Rothman N., Figgs L.W., Blair A. et al. Micronucleus frequen-cy and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in vitro and in vivo // Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. - 2002. - Vol. 521, No. 1-2. - P. 165-178.

- 7 Buharin O.V., Perunova N.B. Cimbioiticheskie vzaimootnosheniya cheloveka i mikro-organizmov // Fiziologija cheloveka. – 2012, N 1.- S.128-138.
- 8 Rai A., Bergman B., Rasmussen U. Cyanobacteria in Symbiosis. New York: Kluwer Academic Publishers, 2004.-319 pp.
- 9 Kulik M M. The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the bio-logical control of plant pathogenic bacteria and fungi//European Journal of Plant Pathology.- 1995.-101.-P.585-599.
- 10 Madhumathi V., Deepa P., Jeyachandran S. Antimicrobial Activity of Cyanobacteria Isolated from Freshwater Lake// International Journal of Microbiological Research.-2011.-2 (3).- P.213-216.
- 11 Sirenko L.A., Sakevich A.I., Osipov L.V. i dr. Metody fiziologo-biohimicheskogo issledovanija vodoroslej v gidrobiologicheskoj praktike. - Kiev: Nauk. dumka, 1975.-248 s.
- 12 Bouterfas R., Belkoura M., Dauta A. The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake // Limnetica, 2006, 25 (3).-rr. 647-656.
- 13 Sachkova O.P. Nekotorye fiziologo-biohimicheskie osobennosti azotfiksirujushhih sinezelenyh vodoroslej Anabaena oscillarioides i Nabalosiphon fontinalis // Diss.... Kand. Biol.nauk.- Almaty, 1969.-129 s.
- 14 Kearns K. D. Hunter, M. D. Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium // Environmental Microbiology, 2000, 2(3). R. 291-297.
- 15 My-Linh Nguyen; Westerhoff P., Baker L. et al.. Characteristics and Reactivity of Algae-Produced Dissolved Organic Carbon// Journal of environmental engineering, 2005. Rr.1574-1582.
- 16 Fogg G.E. Extracellular products. – In: Physiol. And Biochemistry of Algae / Ed. By R. Lewin. Acad. Press, New York, 1962, 475-489.