

Биоплёнки *Nostoc commune* – особая микробная сфераЛ.И. Домрачева¹, Л.В. Кондакова², О.А. Пегушина¹, А.И. Фокина²¹Вятская государственная сельскохозяйственная академия²Вятский государственный гуманитарный университет

Биоплёнки *Nostoc commune* – природные многовидовые ценозы фототрофных и сапротрофных микроорганизмов. Так, численность цианобактерий и водорослей в данных консорциях составляет миллиарды клеток на 1 г воздушно-сухой плёнки, численность бактерий – сотни тысяч КОЕ/г, длина грибного мицелия – до 2 км/г. Различные партнёры в подобном сообществе обладают разной степенью устойчивости к факторам внешней среды, в том числе к высушиванию и действию токсикантов. Многовидовая структура биоплёнок обеспечивает их полифункциональность и перспективы использования в качестве биоремедиаторов техногенно загрязнённых почв.

Biofilms of *Nostoc commune* are the natural multispecies cenoses of phototrophic and saprotrophic microorganisms. The number of cyanobacteria and algae in these consortiums makes billions cells per 1 gram of air-dry film, number of bacteria – hundred thousand per gram, length of mushroom mycelium – up to 2 km/g. The various partners in similar community have a different degree of stability to the factors of external environment, including to drying and toxic effects. Multispecies structure of biofilms ensures their polyfunctionality and prospects of use as bioremediators of technologically-polluted soils.

Уникальность жизненного цикла почвенных водорослей и цианобактерий (синезелёных водорослей) связана с их способностью к массовому размножению на поверхности, которое получило название «цветение» почвы. Впервые факты наземного развития водорослей были описаны в начале XX века и на целинных, и на пахотных почвах [1, 2, 3]. Среди наиболее активных колонизаторов пространства уже тогда отмечался *Nostoc commune*. Так, выдающийся отечественный геоботаник Б.А. Келлер [4] описал любопытный факт, связанный с размножением *Nostoc commune*, при котором происходит своеобразное почкование целых колоний в виде мелких шариков, достигающих в диаметре 1-1,3 мм. Шарик отделяли от себя новые колонии в сторону почвы, где они и зимовали под некоторой защитой между почвенными частицами. Такие же скопления шариков были обнаружены и на следующую весну. Налёт синезелёных водорослей был настолько обилён, что при хорошем увлажнении весной и осенью почвенная поверхность только проглядывала сквозь тонкую сетку упомянутого налёта. На поверхности полупустынных почв, которые представляются голыми, бурное размножение фототрофных микроорганизмов проявляется как пароксизма жизни, связанная с короткими периодами обильного увлажнения.

Однако распространение *Nostoc commune* характерно не только для степных районов. Фактически данный вид относит-

ся к космополитам, обитающим в любом регионе планеты. Этому во многом способствуют его физиологические особенности. Так, непосредственно в природной обстановке в условиях засухи его корочки содержат всего 1,7% воды. Показано, что при обезвоживании у *N. commune* сохраняется вся организация клетки, происходит гелификация цитоплазмы при полном сохранении жизнеспособности [5]. По классификации Э.А. Штиной и М.М. Голлербаха [6] *N. commune* относится к N-форме, для которой характерны повышенная световыносливость и засухоустойчивость. При этом *N. commune* способен к быстрому набуханию слизи и к удержанию поглощённой воды. Влагоёмкость слоевища *Nostoc commune* может достигать 1400% [7]. Для структурно-функциональной организации микробных популяций в виде биоплёнок межклеточный слизистый матрикс рассматривается как элемент структуры колоний, играющий роль интегрирующего компонента в обеспечении жизнеспособности и нормального функционирования популяций, представляющих собой полиморфные многоклеточные системы [8, 9, 10].

Предполагают, что химическая природа гелеобразных экстрацеллюлярных полимеров, формирующих чехлы и колониальный матрикс, сходна с межклеточным матриксом животных и, соответственно, аналогична их роли в межклеточном транспорте метаболитов [11, 12, 13]. Гликокаликс (вы-

деляемая цианобактерией слизь) может рассматриваться как иммобилизованная вода в матрице полимера с очень высокой механической плотностью сообщества, соответствующей примерно 1-2% агаризованной среды. Экзополимеры в подобных сообществах удерживают организмы внутри локального пространства и обеспечивают макростабильность по отношению к физическим факторам, обеспечивают макроструктуру сообщества с оптимальными диффузными расстояниями, создают транспортные колодцы для проникновения питательных веществ, связывают питательные вещества, ограничивают проникновение вредных факторов как химической природы, так и мелких хищников – протист. Следовательно микробное сообщество с доминированием цианобактерий за счет образования экзополимеров создает нечто вроде ткани [14].

Возобновление физиологических функций в таких сообществах происходит очень быстро. Например, азотфиксирующая активность возобновляется через 1-3 часа после увлажнения [15].

Выявлена и высокая устойчивость *N. commune* к поллютантам. Показано, что вид способен расти и развиваться при дозах нефти до 10% от массы почвы. Концентрация нефти от 1 до 4% не подавляет рост плёнок на поверхности, усиливает интенсивность спорообразования. Частичное изменение морфометрических параметров, подавление

роста колоний и образование обильной слизи отмечено при дозах 8 и 10% [16].

Во многом уникальные экологические особенности *N. commune* обусловлены его способностью становиться эдификатором многовидовых альго-цианобактериальных ценозов с богатым спектром гетеротрофных спутников [17, 18]. Однако детальное изучение структурированности автотрофного блока цианобактериальных матов проведено только в отношении водных цианобактериальных биоплёнок [19,14]. Хотя в условиях прогрессирующего загрязнения почвы именно природные наземные пленки *N. commune* могут сыграть роль биофильтров – поглотителей поллютантов.

Цель работы – изучение в видовом, групповом и количественном аспектах фототрофного и сапротрофного блоков биопленок *N. commune* с выявлением компонентов, наиболее устойчивых к определенным токсикантам.

Методика

Природные корочки *N. commune* собраны в октябре 2006 г. вдоль обочины шоссе на окраине г. Дзержинска Нижегородской области, который является одним из экологически неблагополучных городов России. Изучение альго-цианобактериальной микрофлоры проводили путем прямого микроскопирования в сочетании с методами чашечных и водных культур [20]. Численность микрофототрофов и длину грибного мицелия учитывали на мазках методом прямого микроскопирования [21]. Численность сапротрофных микроорганизмов определяли методом посева на агаризованные селективные среды мясо-пептонный агар (аммонификаторы), Эшби (олигонитрофилы), крахмало-аммиачный агар (актиномицеты) и Чапека (грибы).

При изучении влияния мышьяка на сапротрофный блок хлористый мышьяк (As) в концентрациях 0,01% и 0,001% добавляли в питательную среду. Влияние свинца (Pb) на групповой состав биоплёнок выявляли в опытах с жидкой безазотистой средой Громова №6, в которую был добавлен свинец в виде ацетата в концентрациях 1, 2, и 8 ммоль/л.

Результаты и их обсуждение

Флористический анализ выявил 23 вида цианобактерий и водорослей, входящих в фототрофный блок природных био-

Таблица 1
Видовой состав фототрофов биоплёнок *N. commune*

Группы фототрофов	Виды
Азотфиксирующие гетероцистные (ГЦ) цианобактерии	1. <i>Nostoc commune</i> 2. <i>Nostoc punctiforme</i> 3. <i>Tolythrix tenuis</i> 4. <i>Calothrix elenkinii</i> 5. <i>Microchaete tenera</i>
Безгетероцистные (БГЦ) цианобактерии	6. <i>Phormidium autumnale</i> 7. <i>Ph. boryanum</i> 8. <i>Ph. formosum</i> 9. <i>Leptolyngbya frigidum</i> 10. <i>L. fragilis</i> 11. <i>L. foveolarum</i> 12. <i>L. angustissima</i> 13. <i>Oscillatoria sp.</i> 14. <i>Oscillatoria spp.</i>
Одноклеточные зелёные водоросли	15. <i>Clorella vulgaris</i> 16. <i>Chlamydomonas gloeogama</i> 17. <i>Clorococcum sp.</i> 18. <i>Coenocystis planctonica</i>
Нитчатые зелёные водоросли	19. <i>Stichococcus bacillaris</i> 20. <i>Klebsormidium flaccidum</i> 21. <i>K. rivulare</i>
Желтозелёные водоросли	22. <i>Characiopsis minima</i> 23. <i>Eustigmatos magna</i>

Численность, млрд. клеток/г

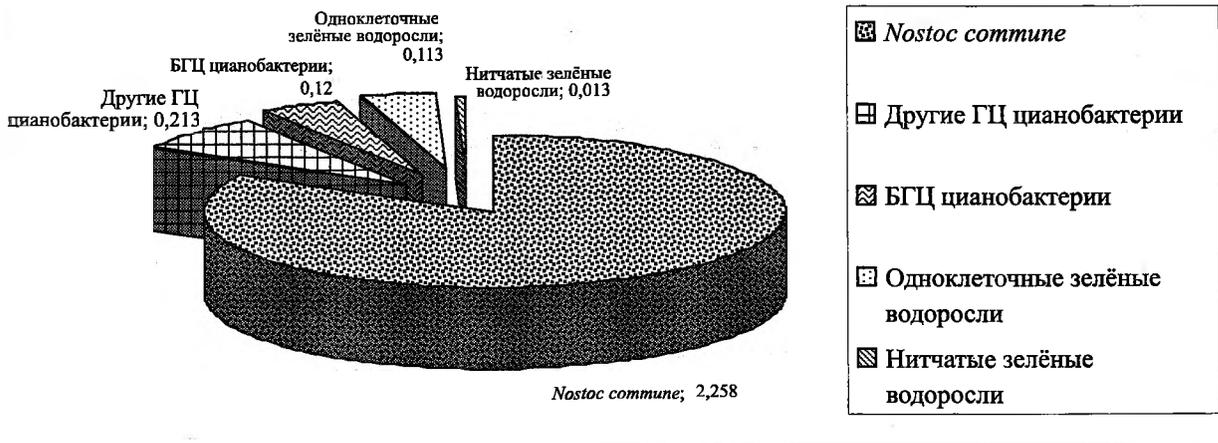


Рис. 1. Групповой состав фототрофного комплекса *Nostoc commune*

плёнок *N. commune*, в том числе 14 видов цианобактерий (ЦБ), 7 видов зеленых водорослей и 2 вида – желтозелёных (табл. 1).

Аналогичные исследования, проведённые в Республике Башкортостан [18], выявили до 27 видов фототрофов в биоплёнках *N. commune*. Общими были следующие: *Phormidium autumnale*, *Clorella vulgaris*, *Chlamydomonas gloegama*, *Eustigmatos pagna*. Кардинальные различия заключаются в отсутствии в степных биоплёнках других азотфиксирующих ЦБ, помимо *N. commune*. В то же время в изученных нами биоплёнках не обнаружены диатомовые водоросли и гораздо беднее представительство зелёных водорослей. Хотя общее видовое обилие близко в обоих случаях (23 и 27 видов фототрофов), в степных пленках доминируют представители Chlorophyta – 13 видов, структурированность биопленок умеренной зоны определяется цианобактериями – 14 видов.

Результаты по численности фототрофных и сапротрофных микроорганизмов в пересчёте на 1 г воздушно-сухих корочек *N. commune* представлены на рисунках 1 и 2.

Как видно из рисунка 1, суммарная численность клеток цианобактерий и водорослей в плёнке составляет около 3 млрд. на 1 г. При этом на долю эдификатора *Nostoc commune* приходится свыше 80% численности популяций фототрофов. Вклад водорослей невелик – 4,63%. Обильна сапротрофная микрофлора (свыше 5 млн. КОЕ/г). Хотя грибы имеют минимальную численность (по результатам количественного учёта методом посева на питательные среды), тем не менее, суммарная длина их мицелия составляет 2000 м/г, и, следовательно, можно говорить об их существенном вкладе в формирование ностокового ценоза, приобретающего в данном случае структуру лишайниковоподобной «псевдоткани».

Численность, млн. КОЕ/г

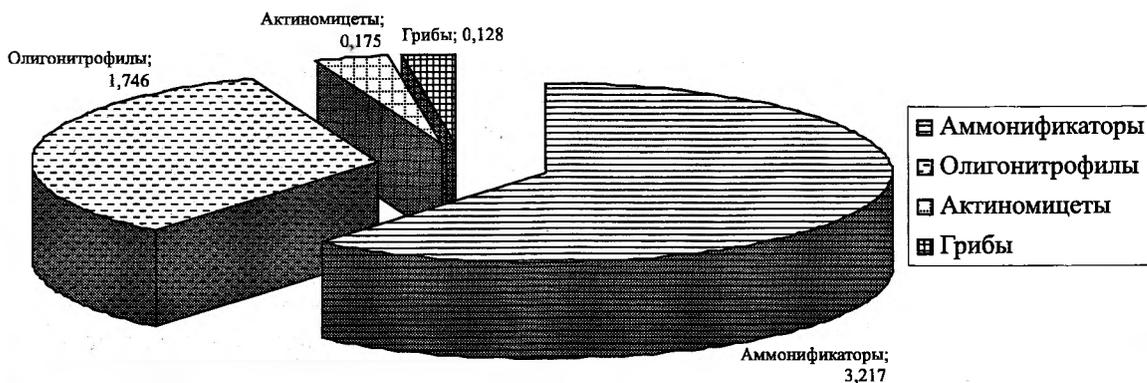


Рис. 2. Групповой состав сапротрофного комплекса *Nostoc commune*

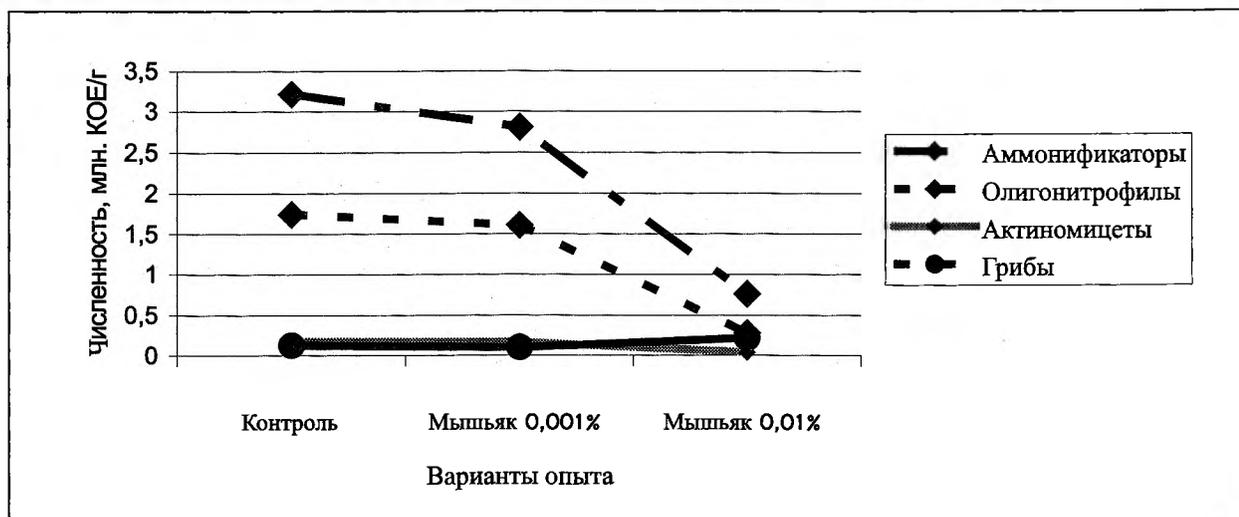


Рис. 3. Изменения состава сапротрофного комплекса *Nostoc commune* под действием мышьяка

Агрегация клеток в подобной псевдоткани чрезвычайно прочна. Её разрушение возможно только при использовании гомогенизатора, иные методы разрушения плёнок «цветения» (например, широко применяемое растирание в ступке) для биоплёнок *Nostoc commune* оказываются неприемлемыми. Результаты качественного и количественного анализа показывают, что в данном случае мы имеем дело с особой формой сожительства организмов различной систематической принадлежности, в котором, наряду с метаболическим, обеспечен чрезвычайно высокий уровень физических контактов особей, имеющих прямую аналогию с водными цианобактериальными матами. Представляя в сухом виде сморщенные буровато-коричневые корочки, увлажнённые ностоковые ценозы превращаются в биоплёнки разнообразных оттенков зелёного цвета, в которых, в зависимости от наличия в окружающей среде различных соединений, может происходить заметное изменение состава как сапротрофного, так и автотрофного блоков (рис. 3, табл. 2).

Среди сапротрофов наиболее устойчивыми являются микромицеты. Их числен-

ность практически не меняется под влиянием мышьяка, тогда как происходит существенное понижение численности бактерий. Именно грибы остаются формообразующей структурой и при действии свинца. Так, его возрастающие концентрации с 1 до 8 ммоль/л постепенно выбивают из ностокового ценоза водоросли и цианобактерии, вплоть до полного их исчезновения при 8 ммоль/л. Визуально, при просмотре колб с биоплёнками явно заметно их постепенное обесцвечивание от синевато-зелёных в контроле до белесых с отдельными зелёными вкраплениями при 2 ммоль/л и полностью бесцветных медузоподобных образований при 8 ммоль/л Pb. Микроскопирование этих структур выявляет стерильный, в основном меланизированный, мицелий грибов. Среди наиболее устойчивых фототрофов отмечены только цианобактерии *Tolypothrix tenuis* *Phormidium boryanum* и *Leptolyngbya foveolarum*.

На морфологическом уровне деструктивное действие Pb проявляется в сокращении числа трихомов, в более активном продуцировании клетками рыхлой слизи. Чехлы ЦБ становятся более толстыми с неровными краями.

Таким образом, биоплёнки *Nostoc commune* – многовидовые структурированные сообщества с большой плотностью клеток организмов различных систематических уровней. Связь организмов обеспечивает высоким уровнем физических контактов за счёт выделяемой слизи, а также агрегации вследствие наличия нитчатых (цианобактерии, зелёные водоросли) и мицелиальных (актиномицеты, микромицеты) форм. Ср

Таблица 2
Изменение видового состава фототрофов биоплёнок *Nostoc commune* под влиянием свинца

Концентрация свинца (ммоль/л)	Количество видов фототрофов
0	23
1	6
2	3
8	0

ди партнёров подобного консорциума существуют виды, устойчивые к различным неблагоприятным воздействиям. Причины устойчивости имеют разнообразные механизмы, которые обсуждались нами ранее [22]. Совокупность предполагаемых механизмов устойчивости микроорганизмов, входящих в состав биоплёнок *Nostoc commune*, делает эти уникальные природные комплексы перспективным объектом в разработке методов и технологий биоремедиации техногенно загрязнённых почв.

Литература

1. Fritsch F.E. The Role of algae growth in the colonization of new ground and in the determination of scenery // *The geographical Journal*. 1907. V. 30. № 5.
2. Bristol-Roach B.M. On the algae some normal English soils // *J. Agric Sci*. 1927. V. 17. № 4.
3. Рихтер А., Орлова Н. Опыт учета флоры водорослей в почвах г. Саратова // *Научно-аграрный журнал*, 1928. № 5-6.
4. Келлер Б.А. Растительный мир русских степей, полупустынь и пустынь. Воронеж, 1926.
5. Генкель П.А., Пронина Н.Д. Физиология анабиоза при высыхании у некоторых водорослей, лишайников и мхов // *Методы изучения и практического использования почвенных водорослей*. Тр. Кировского с.-х. ин-та. Киров, 1972. С. 106-113.
6. Штина Э.А., Голлербах М.М. Экология почвенных водорослей. М.: Наука, 1976. 143 с.
7. Большев Н.Н. Водоросли и их роль в образовании почв. М.: Изд-во МГУ, 1968. 83 с.
8. Sutherland I.W. A natural terrestrial biofilms // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 1996. V.17(3/4). P.281-283.
9. Azam F., Fonda U.S., Funari E. Significance of bacteria in the mucilage phenomenon in the northern Adriatic sea // *Ann. Ist. super. Sanita*. 1999. V.35. №3. P.411-419.
10. Surette M.G. Interaction and communication in mixed microbial communities // *Euresco conf. Bacterial neural net works*. 2002. P.14.
11. Баулина О.И., Лобакова Е.С. Необычные клеточные формы с гиперпродукцией экстрацеллюлярных веществ в популяциях цианобактерий // *Микробиология*, 2003. Т.72. №6. С. 792-805.
12. Dittman E., Glaub Y., Hisbergues M., Marsac N., Burner T. Microcystin – a cyanobacterial toxin with intercellular signaling function? // *Euresco conf. Bacterial neural networks*. Abstr. Overnai. 2002. P.30.
13. Sutherland I.W. Biofilms-formation, structure and interactions // *Euresco conf. Bacterial neural networks*. 2002. P.4.
14. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. М.: Наука, 2003. 348 с.
15. Панкратова Е.М. Роль азотфиксирующих синезелёных водорослей (цианобактерий) в накоплении азота и повышении плодородия почв: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Москва, 1981. 39 с.
16. Киреева Н.А., Кузяхметов Г.Г., Водопьянов В.В. Фитотоксичность антропогенно загрязнённых почв. Уфа: Гилем. 2003. 266 с.
17. Закирова З.Р., Дубовик И.Е. Влияние нефтепродуктов на морфологическую характеристику *Nostoc commune* // *Альгологические исследования: современное состояние и перспективы на будущее*. Матер. 1-й Всероссийской научно-практической конф. Уфа. Изд-во БГПУ, 2006. С. 49-51.
18. Закирова З.Р., Дубовик И.Е., Киреева Н.А. Распространение *Nostoc commune* в антропогенно-нарушенных почвах республики Башкортостан и сопутствующие ему организмы // *Особь и популяция – стратегии жизни*. Матер. докл. 9-го Всеросс. популяционного семинара. Уфа. Издательский дом ООО «Вили Окслер». 2006. Ч.1. С. 337-342.
19. Заварзин Г.А. Анти-Рынок в природе // *Природа*. 1995. № 3. С. 46-60.
20. Голлербах М.М., Штина Э.А. Почвенные водоросли. Л.: Наука, 1969. 228 с.
21. Домрачева Л.И. «Цветение» почвы и закономерности его развития. Сыктывкар, 2005. 336 с.
22. Domracheva L.I., Dabakh E.V., Kondakova L.V., Varaksina A.I. Algal-micological complexes in soils upon their chemical pollution // *Eurasian Soil Science/ 2006/ V.39*. P. 91-97.