

Модельные ассоциации актиномицетов и цианобактерии *Anabaena variabilis* Kütz и их способность к преобразованию структуры глинистых минералов

© 2009. Г.М. Зенова¹, д.б.н., профессор, Е.А. Иванова¹, аспирант, Е.О. Омарова¹, к.б.н., м.н.с., Г.М. Николаев¹, к.б.н., с.н.с., Е.С. Лобакова¹, д.б.н., зав. кафедрой, Н.П. Чижикова², д.б.н., в.н.с.,
¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
²Почвенный институт имени В.В. Докучаева РАСХН,
 e-mail: zenova38@mail.ru

Установлено изменение свойств актиномицетов и цианобактерии в экспериментальных цианобактериально-актиномицетных ассоциациях по сравнению с монокультурами. В ассоциациях отмечено увеличение азотфиксирующей активности *Anabaena variabilis* и выявлены морфологические изменения её клеток, не наблюдаемые в монокультуре. Наблюдаются изменения антимикробных свойств таллома ассоциации по сравнению с монокультурами. Методом ядерного магнитного резонанса показано наличие свободной воды в лиофильно высушенных образцах ассоциации и отсутствие воды в монокультурах. Наблюдаются изменения в структуре глинистых минералов под влиянием роста экспериментальных цианобактериально-актиномицетных ассоциаций.

Quality changes of actinomycetes and cyanobacteria in experimental associations in comparison with monocultures were revealed. In the associations the increase of nitrogen fixation activity of *Anabaena variabilis* and morphological changes of its cells were found out, and they do not take place in monocultures. Anti-microbe effect of thallus is changed as compared with monocultures. By means of nuclear magnetical resonance there was shown presence of free water in lyophilic association patterns and absence of water in monocultures. Changes of clay minerals structure under the influence of cyanobacterial-actinomycetes associations growth were found out.

Ключевые слова: актиномицеты, цианобактерии, ассоциации, структурные состояния минералов

Для описания ассоциативных отношений между организмами в многокомпонентных системах применяется термин «ассоциативный симбиоз» [1 – 4]. 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, стабильного существования и продуктивности симбиозов (бобово-ризобияльного, актиноризного, микоризах, синцианозах). Примером многокомпонентного симбиоза может являться и синцианоз саговниковых растений [1]. Установлено, что в бактериальном ассоциативном сообществе микросимбионтов кораллоидных корней (инфицированных доминантным микросимбионтом-цианобактериями) саговниковых растений преобладают бактерии-гидролитики, в том числе актиномицеты [4].

Микробные сообщества с участием цианобактерий (ЦБ) и актиномицетов широко распространены в природе: циано-бактериальные сообщества, формирующиеся в пятнах «цветения» почвы [5], циано-бактериальные маты

гидротерм и лагун [6], альго-бактериальные ассоциации с лишайникоподобным талломом (актинолишайники) в местах первичного почвообразования на осадочных карбонатных породах [7, 8]. Повсеместно распространены как симбиозы азотфиксирующих цианобактерий с эукариотными организмами (простейшими, беспозвоночными животными, грибами, растениями) (синцианозы) [9 – 11], так и симбиозы актиномицетов с растениями (актиноризы) [12, 13], почвенными животными [7].

Принимая участие во многих биохимических процессах – накоплении органического вещества, разрушении минеральных субстратов, распределении и аккумуляции различных элементов – альго-цианобактериальные сообщества обуславливают изменение среды, ведущее к формированию почвы [14]. Почвообразующую деятельность современных цианобактериальных сообществ, проявляющуюся в формировании наскальных обрастаний и преобразовании минеральной части почвообразующей породы, отмечали многие исследователи [15 – 18]. Однако потенциал функ-

циональных проявлений цианобактериально-актиномицетных ассоциаций в природных сообществах полностью не изучен.

Целью настоящей работы является анализ изменения структурного состояния минералов пород под влиянием экспериментальных ассоциаций, состоящих из цианобактерии и актиномицетов.

Материалы и методы

Объектами исследования служили следующие культуры. Аскеничная культура свободноживущей гетероцистообразующей цианобактерии *Anabaena variabilis* Kutz. ATCC 29413, полученная из музея кафедры физиологии микроорганизмов биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Стрептомицеты, выделенные из апогеотропных корней саговникового растения *Strangeria eriopus* (G. Kuntze) Nash., идентифицированные как *Streptomyces cyaneofuscatus* шт. №1 и *Streptomyces pluricolorescens* шт. №2. Саговниковое растение выращивалось в условиях субтропического климата в оранжерее ГБС РАН им. Н.В. Цицина, возраст растения составлял 15 лет. Родовую и видовую принадлежность исследуемых актиномицетов проводили на основании фенотипических и молекулярно-генетических методов секвенирования фрагмента гена 16S рРНК.

В работе использовали образцы глинистых пород из музея кафедры физики и мелиорации почв факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова. Используются образцы тонкопылеватой размерности вермикулита, состоящего из вермикулита (Ca, Mg,...) (Mg, Fe)₃(OH)₂[(Si, Al)₄O₁₀]·4H₂O с примесью слюды; гумбина, со значительным количеством монтмориллонита (Ca, Mg, ...) (Al, Fe³⁺, Mg)₂(OH)₂[(Si, Al)₄O₁₀]·nH₂O.

В работе использовали следующие методические приёмы. Выделение актиномицета проводили из предварительно растертых корней *S. eriopus* методом «рассыпки» на агаризованную питательную среду. Использовали среду минеральный агар 1 (Г1) [19]. Принадлежность актиномицета к роду *Streptomyces* определяли согласно определителю [20] по следующим морфологическим признакам: отсутствие фрагментации мицелия, наличие воздушного и субстратного мицелия, наличие цепочек спор на воздушном мицелии, отсутствие спор на субстратном мицелии. Видовую идентификацию проводили согласно определителю [19] по культуральным, морфологическим и физиологическим признакам.

Филогенетическое положение выделенных актиномицетов определяли на основании секвенирования гена 16S рРНК. Выделение ДНК из актиномицетов осуществляли согласно методу [21]. Концентрация полученных препаратов ДНК составляла 30-50 мкг/мл. РНК в полученных препаратах присутствует в следовых количествах (менее 1%, согласно данным электрофоретического анализа). Всего было получено 2 независимых препарата ДНК. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК была использована система универсальных праймеров [22].

Реакционная смесь для ПЦР включала: праймеры – по 25 пмоль каждого; 10хбуфер – 2,5 мкл; 2ММ dNTP – 2,5 мкл; *BioTag*-полимераза («Диалат», Москва, 5Е/мкл) – 0,2 мкл; ДНК – матрица – 50 нг; Н₂O – 25 мкл. Реакцию проводили по следующей схеме: 30 циклов: 94 °С – 0,5 мин.; 45 °С – 1 мин.; 72 °С – 1 мин.; окончательная полимеризация – 7 мин.

Продукты ПЦР анализировали электрофоретически в 2% геле агарозы при напряжении электрического поля 6 В/см.

Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК изучаемых штаммов был проведён с помощью программы BLAST. Построение бескорневых филогенетических деревьев исследуемых актиномицетов производили с помощью методов, реализованных в пакете программ MEGA 4,0.

Монокультуру ЦБ поддерживали на среде BG-11 (среда Берджи) следующего состава (г/л): NaNO₃ – 1,5; K₂PO₄ – 0,04; MgSO₄·7H₂O – 0,075; CaCl₂·2H₂O – 0,036; лимонная кислота – 0,006; железо аммиачное лимоннокислое – 0,006; ЭДТА – 0,0011; Na₂CO₃ – 0,02; р-р микроэлементов (1мл). Пересев монокультуры ЦБ проводили один раз в месяц (объём инокулята составлял ~ 10% от объёма свежей среды). Культивирование ЦБ проводили на жидких и плотных (2% агара) питательных средах в люминистате при постоянном освещении (780 лк, t⁰ 24+1 °С) в течение 3 недель.

Стрептомицеты, выделенные из апогеотропных корней саговниковых растений и идентифицированные как *Streptomyces cyaneofuscatus* шт. 1 и *S. pluricolorescens* шт. 2, и *Anabaena variabilis* были предварительно проверены на отсутствие взаимного антагонизма методом «блоков» [19] и наличие положительного таксиса цианобактерии к стрептомицетам методом [29].

Для получения ассоциации в жидкой питательной среде смешивали биомассы стрептомицета и ЦБ (1:1), выращенные в погруженной культуре. Использовали среду ВГ-11. Культивирование смешанных культур проводили в люминостате при постоянном освещении (780 лк, $t^{\circ} 24 \pm 1^{\circ}\text{C}$).

Антимикробную активность монокультур цианобактерии, стрептомицета *Streptomyces pluricolorescens* и экспериментальной ассоциации определяли методом «блоков». Использовали следующие тест-культуры микроорганизмов: грибы – *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium* sp.; *Mucor hiemalis*; дрожжи – *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Metchnikowia pulcherrima*; бактерии – *Flavobacterium* sp., *Bacillus brevis*, *Micrococcus* sp., *Jantirobacterium* sp., *Rhodococcus* sp., *Methylobacterium* sp.; актиномицеты – *Streptomyces pluriocolorescens*, *S. cyaneofuscatus*, *S. odorifer*, *Streptomyces* sp. шт. 175.

Микроскопические исследования цианобактерий в монокультуре и ассоциациях со стрептомицетами проводили при помощи оптического Zeiss Axioskop и сканирующего электронного Hitachi 405 S (Япония) микроскопов. Фиксацию проб для изучения материала в сканирующем микроскопе проводили согласно методике [23]. Использовали инструментальное увеличение от 60 до 20000 и ускоряющее напряжение 15 кВ.

Наличие воды в лиофильно высушенной цианобактериально-актиномицетной ассоциации определяли по спектрам ЯМР высокого разрешения (^1H 600 МГц) [24] на томографе ЯМР – Avance 600 фирмы Bruker учебно-научного межфакультетского и междисциплинарного Центра магнитной томографии и спектроскопии МГУ имени М.В. Ломоносова и по кривым спада спинового эха [25]. Для проведения измерений на установке ЯМР-спиновое эхо 0,5 г исследуемого образца помещали в ампулу. Частота работы установки ЯМР-спиновое эхо около 20 МГц, точность измерений 7%. С целью исключения влияния диффузии, измерение времени спин-спиновой релаксации протонов (T_2) проводили с помощью метода Карр-Парселла-Мейбума-Джилла (90° -п 180° импульсов) [26]. Для высушивания исследуемые образцы помещали в лиофильную установку, перед сушкой образцы замораживали – при 20°C , сушили в вакууме (10^{-3} торр, 10 ч.). На последних этапах сушки образцы нагревались до комнатной температуры.

Опыты по разрушению кристаллической решётки минералов проводили в стеклянных

стаканах – фильтрах с впаянной пористой мембраной, на которую сначала накладывали фильтровальную бумагу, затем помещали слой (около 5 мм) измельчённой до состояния порошка породы, на которую наносили в разных вариантах опыта слой биомассы цианобактерии, стрептомицета или ассоциации (около 5 мм). Для поддержания роста ЦБ и развития ассоциации слои прокапывали питательной средой ВГ-11 один раз в 2-3 дня в течение всего опыта. При этом свежая культуральная среда не только обеспечивала рост ЦБ, но и вымывала продукты метаболизма в слои минеральной фазы. Длительность проведения опытов составляла 1,5 месяца.

Минералогический состав пород определяли рентгендифрактометрическим методом с помощью универсального рентгендифрактометра XZG фирмы Carl Zeiss Yena (Германия). Режим работы аппарата в процессе съёмки сохраняли постоянным. Для выявления изменений структурного состояния минералов съёмка проведена при 30 кВ, 25 мА. Использовано медное излучение, фильтрованное никелем. Рентгендифрактограммы получены для образцов: воздушно-сухих, для насыщенных этиленгликолем образцов и прокалённых при температуре 550°C в течение 2 часов. Диагностику минералов проводили по общепринятым руководствам [27, 28].

Результаты и их обсуждение

Исследуемые штаммы актиномицетов на основании фенотипических признаков принадлежали к роду *Streptomyces* и были идентифицированы как *S. cyaneofuscatus* шт. 1. и *S. pluricolorescens* шт. 2. Проведение предварительного BLAST- анализа секвенированного фрагмента гена 16S рРНК штаммов 1 и 2, соответствующего (*E. coli*) позициям с 36 по 1450, подтвердило, что исследуемые штаммы принадлежат к роду *Streptomyces* актиномицетной линии грамположительных бактерий. Наиболее близкими к полученной последовательности для штамма 1 были аналогичные последовательности типового штамма *Streptomyces cyaneofuscatus* и для штамма 2 – последовательности типового штамма *S. pluricolorescens* (рис. 1).

Ассоциации стрептомицетов и цианобактерии давали активный рост как на жидких, так и агаризованных питательных средах, образуя таллом, состоящий из переплетённых нитей цианобактерии и гиф стрептомицета. При росте ассоциаций, сформированных из А.

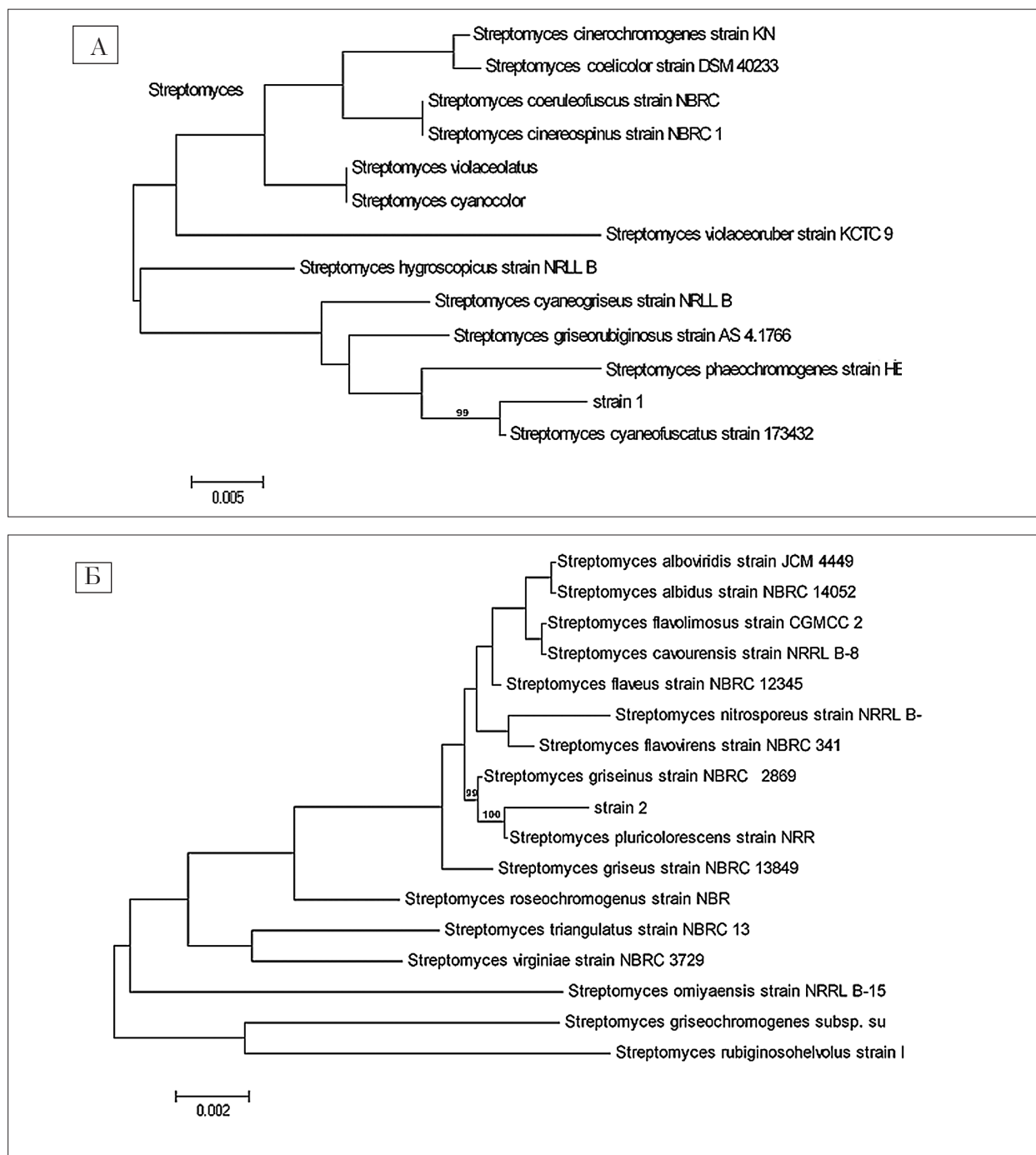


Рис. 1. Филогенетическое положение изучаемых штаммов актиномицетов, выделенных из апогеотропных корней саговниковых растений. А – *S. cyanofuscatus* шт. 1, Б – *S. pluricolorescens* 2 шт. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 2-м нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов. Цифрой показана достоверность ветвления, установленная с помощью «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев (значимыми признаются значения больше 70)

variabilis и *S. pluricolorescens* шт. 2, а также из *A. variabilis* и *S. cyanofuscatus* шт. 1, в жидкой питательной среде в условиях стационарного культивирования отмечали образование коагрегатов, состоящих из комочков стрептомицетного мицелия, оплетённых нитями ЦБ. Коагрегаты не разрушались при отмывании.

Сравнительный анализ антагонистической активности монокультур ЦБ *A. variabilis*

и стрептомицета *S. pluricolorescens*, а также таллома цианобактериально-актиномицетной ассоциации, состоящей из этих культур, демонстрирует изменение антимикробных свойств ассоциации по сравнению с монокультурами компонентов. Традиционно продуцентами антибиотиков считались актиномицеты. Однако в настоящее время известно образование широкого спектра токсинов цианобактериального

происхождения, обладающих антимикробным действием [9].

Отмечено проявление антимикробных свойств ассоциацией в отношении следующих тест-культур *Methilobacterium* sp., *Flavobacterium* sp., *Rhodococcus* sp., *Metchnikowia pulcherrima*, в то время как монокультуры цианобактерии и стрептомицета подобных свойств к перечисленным тест-объектам не проявляли (табл.). В случае использования в качестве тест-культур *Bacillus brevis*, *Micrococcus* sp., *Streptomyces* sp. шт. 175, *Saccharomyces cerevisiae* отмечается усиление антибиотической активности таллома ассоциации по сравнению с монокультурами.

Наблюдение за изменением значения рН культуральной жидкости в процессе роста ассоциации и составляющих её компонентов – стрептомицета *S. pluricologrescens* и ЦБ *A. variabilis* – показало, что в процессе роста цианобактериально-актиномицетной ассоциации происходит значительное подщелачивание среды: значения рН изменяются от 7,7 в начале опыта до 8,7 на 21-е сутки роста ассоциации.

В культуральной жидкости монокультур стрептомицета и цианобактерии значительных изменений рН среды в процессе роста не

происходит. Можно предположить, что интенсивность метаболических процессов в ассоциации усиливается по сравнению с монокультурами стрептомицета и ЦБ.

Отмечена стимуляция азотфиксирующей способности ЦБ *A. variabilis* в модельных ассоциациях со стрептомицетами по сравнению с монокультурой. Азотфиксирующая активность ЦБ в экспериментальных цианобактериально-актиномицетных ассоциациях оказалась в десятки раз выше азотфиксирующей способности монокультуры.

Стимуляция азотфиксирующей активности цианобактерии *A. variabilis* в ассоциации со стрептомицетами по сравнению с монокультурой ЦБ коррелирует с увеличением доли специализированных азотфиксирующих клеток – гетероцист в нитях ЦБ в ассоциации со стрептомицетом *S. pluricologrescens* шт. 2 по сравнению с монокультурой ЦБ. Доля (%) гетероцист от среднего числа клеток в трихомах цианобактерии в монокультуре составляет $3,9 \pm 2,4$, в ассоциации со стрептомицетом – $9,5 \pm 2,9$.

Таким образом, показано, что в экспериментальных ассоциациях, сформированных из цианобактерии *A. variabilis* со стрептомицета-

Антагонистические свойства монокультур цианобактерии *Anabaena variabilis*, стрептомицета *Streptomyces pluricologrescens* и таллома ассоциации

Таблица

Тест-культуры	<i>Streptomyces pluricologrescens</i>	<i>Anabaena variabilis</i>	Ассоциация
<i>Propionibacterium</i> sp.	0	0	0
<i>Janthinobacterium</i> sp.	11	4	12,5
<i>Methilobacterium</i> sp.	0	0	8
<i>Flavobacterium</i> sp.	0	0	9
<i>Rhodococcus</i> sp.	0	0	2
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0
<i>Bacillus brevis</i>	10	6	15
<i>Micrococcus</i> sp.	5	11	15
<i>Streptomyces. odorifer</i>	8	7	9
<i>S. cyaneofuscatus</i>	0	0	0
<i>S. pluricologrescens</i>	0	0	0
<i>Streptomyces</i> sp. шт. 175	6	0	13
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	0	0
<i>Metchnikowia pulcherrima</i>	0	0	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13	9	16,5
<i>Penicillium</i> sp.	0	0	0
<i>Fusarium</i> sp.	0	0	0

Примечание: цифры обозначают радиус (мм) зоны отсутствия роста тест-микроба вокруг «блока» с ростом испытуемой культуры.

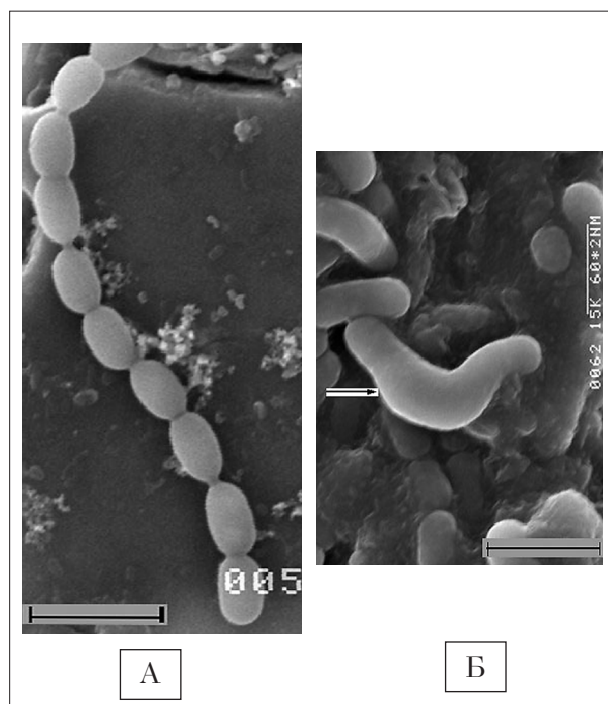


Рис. 2. Морфологические формы цианобактерии *A. variabilis* ATCC 29413 в монокультуре (А) и формы несбалансированного роста цианобактерии *A. variabilis* ATCC 29413 в ассоциации со стрептомицетом *S. pluricolorescens* шт. 2 (Б). Стрелками обозначены ромбовидные (Б) клетки цианобактерии. Шкалы на фотографиях соответствуют 5 мкм.

ми, выделенными из природных синцианозов саговниковых растений – *S. cyanofuscatus* (шт.1) и *S. pluricolorescens* (шт.2) обнаружены черты симбиотического взаимодействия компонентов, проявляющиеся в увеличении азотфиксирующей активности цианобактерий, изменении антимикробных свойств таллома по сравнению с монокультурами.

В коагрегатах модельной ассоциации *A. variabilis* и *S. pluricolorescens* (шт. 2) при изучении в сканирующем электронном микроскопе, наряду с вегетативными клетками и гетероцистами, обнаружены формы несбалансированного роста цианобактерии в виде гигантских, дисковидных, изогнутых и ромбовидных клеток (рис. 2, Б). В монокультуре *A. variabilis* подобных морфологически измененных клеток не обнаружено (рис 2, А).

В коагрегатах ассоциаций доля гетероморфных клеток в трихомах цианобактерии составляла до 34% от среднего их числа в образце.

В экспериментальных ассоциациях на поверхности коагрегатов обнаружена гиперпродукция слизистого матрикса в виде мелковолоконистой сеточки, в которую оказываются погружены нити цианобактерии и гифы

стрептомицета, что свидетельствует о возникновении специфической ассоциативной морфоструктуры. Наличие поверхностного слизистого матрикса затрудняет диссоциацию таких агрегатов на компоненты при многократном отмывании.

Таким образом, морфологические особенности цианобактерий в составе модельных цианобактериально-актиномицетных ассоциаций свидетельствуют о том, что у ЦБ изменяются физиологические свойства, определяющие особенности их функционирования в составе симбиоза по сравнению со свободноживущими цианобактериями.

Морфологические изменения ЦБ (укорочение нитей, увеличение размеров клеток, возрастание доли гетероцист от числа вегетативных клеток) наблюдаются как в природных симбиозах с грибами (лишайники) [10, 29], высшими растениями [11], так и в модельных ассоциациях с культурами растительных клеток при компартиментации внутри тканей макросимбионтов [29, 30]. При росте в ассоциациях у цианобактерий обнаруживаются также признаки нарушения клеточного деления. В зонах локализации симбиотических цианобактерий в растительных синцианозах микросимбионты образуют клеточные формы, специализирующиеся на гиперпродукции слизеподобного вещества. Предполагается, что экстрацеллюлярные полимеры (преимущественно полисахаридной природы) играют роль в межклеточном транспорте метаболитов [11, 31, 32]. Такие изменения цианобионтов считаются типичными для природных симбиозов с высшими растениями. Можно предположить, что в сконструированных нами модельных ассоциациях в условиях тесного контакта с актиномицетом и воздействия его метаболитов у цианобактерий происходят сходные морфофизиологические изменения.

В наших исследованиях методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения и ЯМР-спиновое эхо показано, что в лиофильно высушенных образцах цианобактериально-актиномицетной ассоциации, сформированной *A. variabilis* и стрептомицетом *S. pluricolorescens* шт. 1, 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 цианобактериально-актиномицетной ассоциации отмечен химический сдвиг от тетраметилсилана около 5-миллионных долей (м. д), характерный для протонов воды.

В лиофильно высушенных монокультурах стрептомицетов и цианобактерии, используемых в нашей работе для формирования цианобактериально-актиномицетных ассоциаций, вода отсутствует.

Известно (33, 34), что в лиофильно высушенных монокультурах стрептомицета и зелёной водоросли *Chlorella vulgaris* вода отсутствует, в то время как в лиофильно высушенном лишайникоподобном таллеме, экспериментально сформированном этими организмами, регистрируется присутствие подвижных протонов воды (около 3%).

Присутствие подвижной воды в высушенных цианобактериально-актиномицетных ассоциациях способствует адаптации ассоциации к экстремальным факторам среды обитания [35]. Известна устойчивость микроорганизмов к стрессовым факторам в микробных консорциумах – биоплёнках [36]. Можно предположить, что в условиях ассоциации происходят значительные структурные изменения, которые и обуславливают появление фракции подвижных протонов в лиофильно высушенных образцах ассоциативного таллома.

Полученные данные морфолого-физиологических изменений компонентов модельных цианобактериально-актиномицетных ассоциаций свидетельствуют о симбиотическом характере их взаимодействия.

Актиномицеты как ассоциативные симбионты могут оказывать позитивное воздействие

на развитие растения хозяина и на симбиоз в целом за счёт стимулирующего влияния на азотфиксирующую способность цианобактерии, защиты растения и симбиоза в целом от патогенных микроорганизмов за счёт выделения антибиотиков.

Культивировали ассоциацию, сформированную из *S. cyaneofuscatu* шт. 1 и *A. variabilis*, на породе, состоящей главным образом из двух компонентов – вермикулита и биотита. Диагностика вермикулита основана на наличии интенсивного отражения первого порядка, соответствующего межплоскостному расстоянию 14,4 Å и серии базальных рефлексов с наиболее сильными рефлексами 4-го и 5-го порядков, соответственно 3,64 и 2,88 Å (рис. 3, I, а). Насыщение образцов этиленгликолем не изменяет величин базальных межплоскостных расстояний (рис. 3, I, б). Прокаливание при 550 °С в данном случае не привело к полному сжатию до 10,0 Å решётки минерала, сохранился остаточный продукт, отличающийся значительным снижением интенсивности первого рефлекса (рис. 3, I, в).

Биотит диагностирован по наличию целочисленной серии отражений кратных 10,2 Å, а именно $d_{002} = 5,07$ Å, $d_{003} = 3,38$ Å (рис. 3, I, а). Эти отражения не изменяются при насыщении образца этиленгликолем (рис. 3, I, б) и при прокаливании образца при 550 °С в течение 2-х часов (рис. 3, I, в). Выращивание ассоциации, состоящей из *S. cyaneofuscatu*

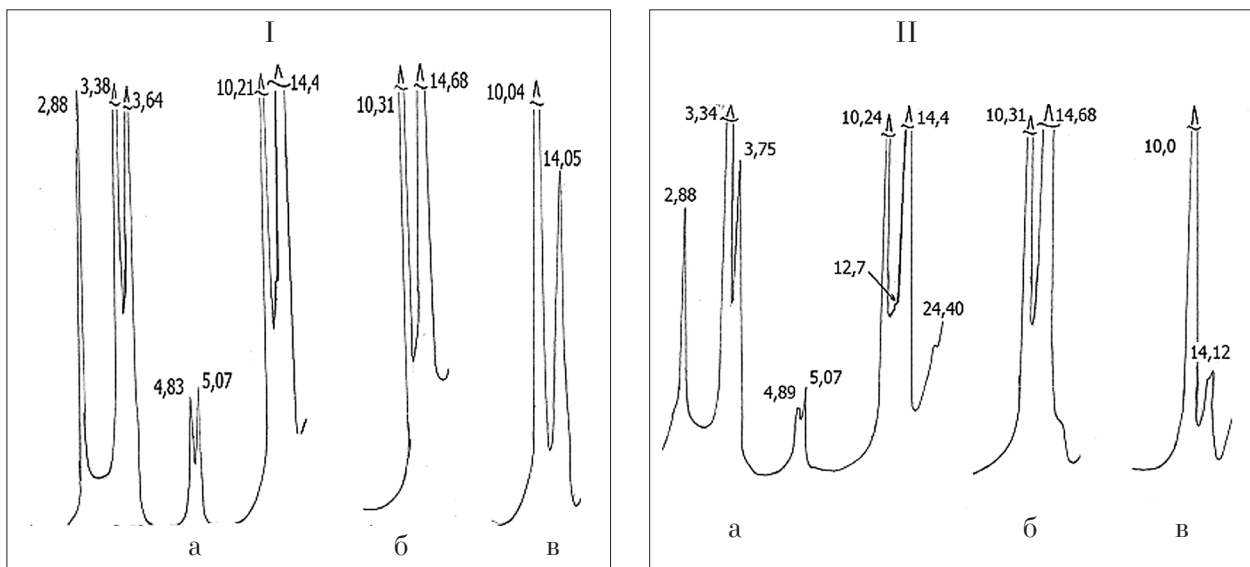


Рис. 3. Рентген-дифрактограмма глинистых минералов в породе вермикулита: I – исходный образец вермикулита; II – образец после выращивания таллома ассоциации цианобактерии *Anabaena variabilis* и стрептомицета *Streptomyces cyaneofuscatu*. Условные обозначения здесь и далее: а – воздушно-сухой образец породы; б – образец после сольватации этиленгликолем; в – образец после прокаливании при 550 °С в течение 2 ч. Высота и ширина пика – интенсивность рефлекса минерала, цифры – межплоскостное расстояние минералов, выраженное в ангстремах

шт.1 и *A. variabilis*, привело к преобразованиям минералов, выраженным в уменьшении интенсивности рефлексов как вермикулита, так и биотита. Снижение интенсивности базальных отражений в области d_{001} , d_{004} и d_{005} в три раза свидетельствует о процессе разрушения этого компонента породы (рис. 3, II, а). Интенсивность рефлексов биотита по сравнению с вермикулитом изменилась в меньшей степени. Однако здесь отмечается образование набухающей фазы – продукта трансформации биотита в смешаннослойное слюда-сметитовое образование, что диагностируется по наличию рефлексов 12,7 Å и 24,4 Å (рис. 3, II, а).

Сравнение результатов, полученных в экспериментах с вермикулитом, с данными, полученными ранее [37] в наших опытах с каолинитом, свидетельствует о различии в процессах преобразования глинистых минералов под влиянием продуктов жизнедеятельности ассоциации, компонентами которой являются *S. cyaneofuscatus* и *A. variabilis*, что связано с кристаллохимией минералов и их устойчивостью к процессам выветривания. По сравнению с каолинитом процесс преобразования вермикулита произошёл более интенсивно. Значительно сократилось количество вермикулита (уменьшилась интенсивность основных рефлексов).

Выявлено, что скорость процесса трансформации слюд в смешаннослойное образование зависит от их строения – триоктаэдрические слюды (биотит, входящий в состав вермикулита) трансформируются значительно быстрее, чем диоктаэдрические слюды (слюда, входящая в состав породы каолина [37]).

Рентгенографирование ориентированных препаратов породы гумбрин свидетельствует о том, что порода мономинеральна и состоит из минерала группы смектитов, а именно из монтмориллонита. В исходном воздушно-сухом состоянии минерал даёт отражения с межплоскостным расстоянием 14 Å. Этот рефлекс всегда интенсивен, последующая целочисленная серия рефлексов имеют незначительную интенсивность (рис. 4, I, а). Сольватация образца этиленгликолем привела к увеличению межплоскостного расстояния с 14 Å до 16,9 Å, здесь отмечается новая целочисленная серия отражений, чётко диагностируется рефлекс в области 8,6 Å (рис. 4, I, б). Прокаливание образца при 550° С привело к сокращению межплоскостного расстояния до 10,0 Å (рис. 4, I, в). Наличие рефлекса при 4,07 Å свидетельствует о примеси кристобалита, рефлекс 3,35 Å – о примеси кварца.

Исследование влияния жизнедеятельности микробных ассоциаций на минералы породы гумбрин проводили с использованием двух ассоциаций: ассоциации *A. variabilis* и *S. pluricologrescens* шт. 2 и ассоциации *A. variabilis* и *S. cyaneofuscatus* шт.1. Использование в качестве мицелиального компонента стрептомицета *S. pluricologrescens* привело к существенному снижению интенсивности основного (14 Å) рефлекса минерала (рис. 4, II, а). Одновременно в образце резко увеличилась интенсивность рефлексов 4,4; 4,07; 3,35 Å. Можно предположить, что произошло разупорядочивание структуры минералов, снижение ориентации кристаллов по оси с за счёт агрегирования минералов с продуктами

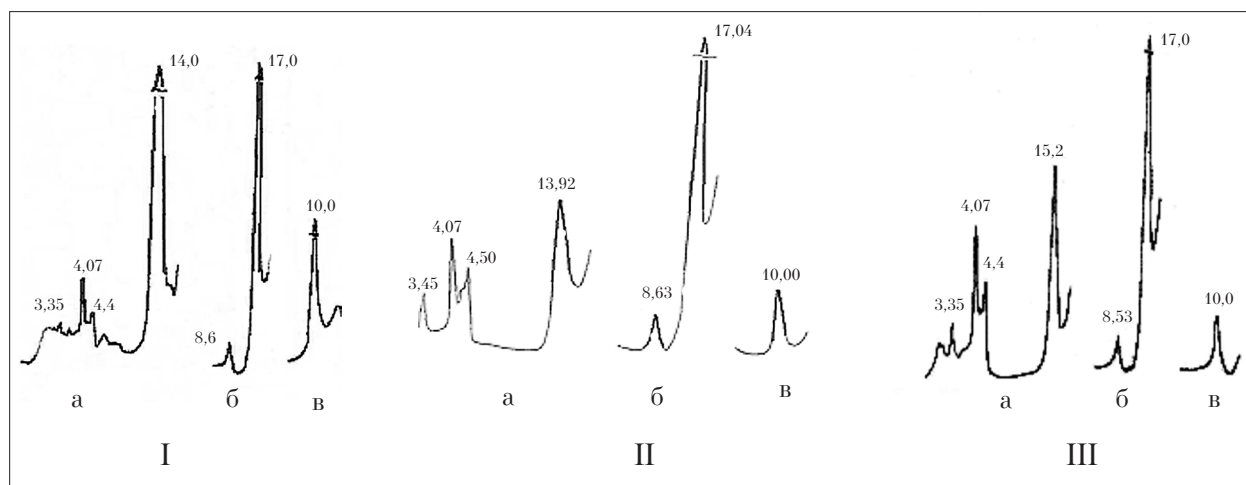


Рис. 4. Рентген-дифрактограмма глинистых минералов в породе гумбрин: I – исходный образец гумбрин; II – образец после выращивания таллома ассоциации цианобактерии *Anabaena variabilis* и стрептомицета *Streptomyces pluricologrescens*; III – образец после выращивания таллома ассоциации цианобактерии *Anabaena variabilis* и стрептомицета *Streptomyces cyaneofuscatus*. Другие обозначения см. рис. 3.

жизнедеятельности микробных сообществ. В пользу этого довода говорит увеличивающаяся интенсивность общего рефлекса 4,4 Å. Относительное снижение количества монтмориллонита также подтверждается увеличением кварца и кристобалита в образце (рис. 4, II, а). Сольватация образца этиленгликолем приводит к расширению, а прокаливанию при 550°C – к сжатию указанного выше межплоскостного расстояния до значений 17,04 и 10,00 соответственно (рис. 4, II, б, в).

Цианобактериально-актиномицетная ассоциация, в которой в качестве мицелиального компонента использовался стрептомицет *S. cyaneofuscatius*, оказала меньшее влияние на структурное состояние минеральной составляющей. Это выражается в уменьшении интенсивности и большей чёткости рефлекса монтмориллонита $d_{001} = 15,2 \text{ \AA}$ (рис. 4, III, а). Результаты, полученные при сольватации и прокаливании образца, аналогичны описанным в предыдущем варианте (рис. 4, III, б, в).

Таким образом, показана способность экспериментальных ассоциаций цианобактерий с актиномицетами изменять структурные параметры глинистых минералов (вермикулита, биотита, монтмориллонита). Преобразования глинистых минералов происходят и в современных почвах. Взаимодействие почвенных организмов с минералами приводит к разупорядочиванию структуры минералов, совершаются трансформационные преобразования деградиационного типа и освобождение минеральных элементов, которые становятся достоянием микробных сообществ почв.

Можно предположить, что процессы преобразования породы могли происходить и в докембрии, когда начался гидрозёмный процесс почвообразования – первый этап единого почвообразовательного процесса на Земле, так как возраст циано-бактериальных сообществ, сохранившихся в виде литифицированных строматолитов, составляет примерно 3,5 млрд. лет. В результате этих процессов на сформированных субстратах поселялись более высокоразвитые организмы, в частности, растения, ускоряющие процесс почвообразования.

Литература

1. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Немцева Н.В., Черкасов С.В. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2007. 264 с.

2. Емцев В.Т. Ассоциативный симбиоз почвенных diaзотрофных бактерий и овощных культур // Почвоведение. 1994. № 4. С.74-84.

3. Проворов Н.А. Генетико-эволюционные основы учения о симбиозе // Журн. общ. биологии. 2001. Т. 62. С. 472-495.

4. 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.

5. Домрачева Л.И. «Цветение» почвы и закономерности его развития. Сыктывкар. 2005. 333 с.

6. Бактериальная палеонтология. / Под ред. А.Ю. Розанова. М. 2002. 188 с.

7. Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. Экология актиномицетов. М. ГЕОС. 2001. 257 с.

8. 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.

9. Cyanobacteria in symbiosis / Eds. Rai A.N., Bergman B., Rasmussen U. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. 368 p.

10. Rai A.N., Bergman B. Cyanolichens. // Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy. 2002. V. 102B (1). P. 19-22.

11. 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 3d 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.

12. Калакуцкий Л.В., Шарая Л.С. Актиномицеты и высшие растения. Успехи микробиологии. 1990. Т. 24. С. 26-65.

13. Huss-Danell K. Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation // New Phytol. 1997. V.136. P. 375-405.

14. Браун Т. Рентгеновские методы изучения структуры глинистых минералов. М.: Мир, 1965. 600 с.

15. Аристовская Т.В. Микробиология процессов почвообразования // Ленинград: Наука, 1980. 187 с.

16. Сушкина Н.Н., Цюрупа И.Г. Микрофлора и первичное почвообразование. М.: Изд-во МГУ, 1973. 158 с.

17. Чижикова 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.

18. Budel B., Weber B., Kuhl M., Planz H., Sultemeyer D., Wessels D. Reshaping of sandstone surfaces by cryptoolithic cyanobacteria bioalkalization causes chemical weathering in arid landscapes // Geobiology. 2004. V. 2(4). P. 261-268.

19. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983. 245 с.

20. Определитель бактерий Берджи. М.: Мир. 1997.
21. Булыгина Е.С. Выделение ДНК из бактерий // Микробиология. 2002. Т. 71. № 4. С. 500-508.
22. Edwards U., Rogall T., Bloeker H., Ende M.D., Boeettge E.C. Isolated and direct complete nucleotide determination of entire genes, characterization of gene coding for 16 S ribosomal RNA // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. P. 7843 – 7853.
23. Baulina O.I., Lobacova E.S., Korzhenevskaya T.G., Gusev M.V. Ultrastructure of ginseng cells and the cyanobacteria *Chlorogloeopsis fritschii* in the association cultivated in the dark // Moscow University Biological Sciences Bulletin (Vestnik Moskovskogo Universiteta/ Biologiya)/ 1995. V. 50. № 2. P.1-11.
24. Лундин Ф.Г., Федин Э.И. ЯМР- спектроскопия. М.: Наука, 1986. 222 с
25. Фаррар Т., Беккер Э. Импульсная и Фурье-спектроскопия ЯМР. М.: Мир, 1973. 162 с.
26. Зорин В.Е., Лундин А.Г. Ядерный магнитный резонанс как метод исследования структуры и динамики в конденсированных средах // Вестник РФФИ. № 4 (54) июль-август. 2007. С. 25-49.
27. Градусов Б.П. Смешаннослойные минералы в почве. М.: Наука, 1976. 126 с.
28. Соколова Т.А., Дронова Т.Я., Толпешта И.И. Глинистые материалы в почвах. Тула: Гриф и К, 2005. 336 с.
29. Stewart W.D.P., Rowell P. Modifications of nitrogen-fixing algae in lichen symbioses // Nature. 1977. V. 265. P. 371-372.
30. Gusev M.V., Baulina O.I., Gorelova O.A., Lobakova E.S., Korzhenevskaya T.G. Artificial Cyanobacterium-Plant Symbioses // In: Cyanobacteria symbiosis. A.N. Rai, B. Bergman, U. Rasmussen (Eds.). Kluwer Acad. Publ.: Dordmoot. 2002. P. 253-313.
31. Korzhenevskaya T.G., Baulina O.I., Gorelova O.A., Lobakova E.S. et al. Artificial Sycyanoses: the potential for modeling and analysis of natural symbioses. // Symbiosis. 1993. V. 15. P. 77-103.
32. Баулина О.И., Лобакова Е.С. Необычные клеточные формы с гиперпродукцией экстрацеллюлярных веществ в популяциях цианобионтов саговниковых // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 792-805.
33. 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.
34. 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.
35. Аксёнов 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.
36. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биоплёнка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма // Микробиология. 2007. Т. 76. № 2. С. 149-163.
37. Иванова Е.А., Чижикова Н.П., Зенова Г.М., Омарова Е.О., Манучаров А.С. Биодegradация глинистых минералов под влиянием цианобактериально-актиномицетных ассоциаций // Вестник Московск. ун-та. Сер. 17. Почвоведение. 2009. № 3.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 08-04-90201-Монг-а, а также при частичном финансировании грантом Президента для поддержки ведущих научных школ РФ № НШ-8797. 2006.4