



МГУ им. Ломоносова, БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра Физиологии Микроорганизмов

Тел. секретаря кафедры (495) 939-41-69, заведующего (495) 939-38-07

Действие исследуемых образцов материалов на рост и физиологические параметры клеток цианобактерии *Anabaena* sp.

В процессе роста и развития клетки фототрофных микроорганизмов обмениваются со средой различными веществами. Важными параметрами среды являются такие электрохимические показатели как рН и окислительно-восстановительный потенциал (E_h) среды. При росте клетки поглощают протоны, защелачивая среду и выделяют низкопотенциальные тионеин-подобные соединения, которые значительно снижают редокс-потенциал среды, особенно в лаг-фазный период развития культур микроорганизмов, что связано с подготовкой популяций к клеточному делению и активному накоплению биомассы [1].

Материалы и методы

В работе использовали аксеничную культуру цианобактерии *Anabaena* sp. из коллекции кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ. Клетки собраны в трихомы, образованные вегетативными клетками и гетероцистами – специализированными клетками, способными к фиксации атмосферного азота. Клетки цианобактерии культивировали на среде BG11(Табл. I) [2] при естественном освещении и температуре 18-20° в конических колбах с объемом среды 50 мл. Микроэлементы (Табл. I) добавляли в количестве 1 мл раствора на 1 л среды культивирования; среду и микроэлементы стерилизовали при 1 атм. 1 час. Наряду с клетками в опытах

использовали исследуемые образцы материалов под номерами 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 (образцы 2 и 4 – магнитные). Образцы инкубировали в среде BG11 как в отсутствии клеток, так и в процессе культивирования клеток цианобактерии.

Таблица I. Состав среды «BG11» (pH 6,8) и микроэлементов

№ п/п	Ингредиенты среды	Концентрация, г/л	Микроэлементы	Концентрация, г/л
1	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,075	H ₃ BO ₃	2,86
2	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0,052	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,222
3	NaNO ₃	1,5	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,079
4	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,036	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,049
5	Лимонная кислота	0,006	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,039
6	FeNH ₄ – цитрат	0,006	MgCl ₂ · 4H ₂ O	1,81
7	ЭДТА NaMg соль	0,001		
8	Na ₂ CO ₃	0,02		

Биомассу клеточных суспензий в среде определяли по оптической плотности хлорофилла *a* при 680 нм за вычетом светорассеяния клеток на спектрофотометре Hitachi-220 (Япония).

pH среды измеряли комбинированным электродом на приборе pH410, а редокс-потенциал среды - на электрометре фирмы “Cole-Parmer” (США), модель DigipHase с использованием Pt-электрода и Ag/AgCl-электрода сравнения (все электроды российского производства). Погрешности измерений оптической плотности и величин pH и E_h не превышали 15-20%.

Результаты и их обсуждение

Исследуемые образцы, помещенные в конические колбы со средой ВJ, оказывают заметное влияние на величину рН (Рис. 1А) и E_h (Рис. 1Б). Причем под действием всех образцов, кроме № 6, наблюдается снижение величины рН от 6,8 до 6,4 за первые 2 сут, а затем рН увеличивается во времени, достигая на 6-9 сут величины 7,4-7,6. Шестой образец монотонно увеличивает рН среды в интервале времени 0-6 сут; затем величина рН стабилизируется (Рис. 1А).

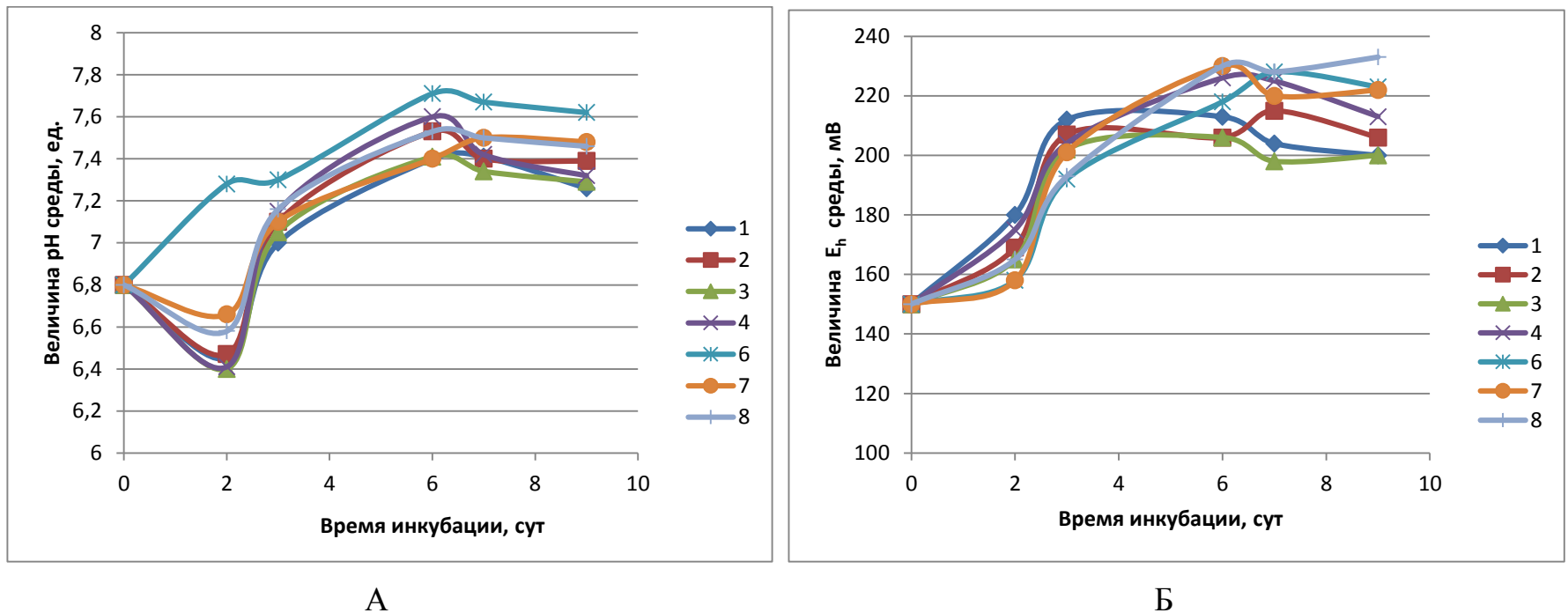


Рис. 1. Эффект исследуемых образцов на изменения во времени рН (А) и E_h (Б) среды.

Величина E_h среды под действием образцов нарастает за 2-4 сут от 150 до 180-210 мВ, а затем стабилизируется на уровне 200-230 мВ (Рис 1Б). Следует отметить, что увеличение E_h среды определяется окислением компонентов среды, а снижение E_h среды – их восстановлением, поскольку редокс-потенциал среды определяется равновесным состоянием электронного потока между платиновым электродом и компонентами среды, способными к окислительно-восстановительным реакциям. Таким образом, потенциал платинового электрода, измеренный электрометром относительно стабильного Ag/AgCl-электрода сравнения, отражает редокс-состояние среды. Увеличение рН среды свидетельствует об уменьшении концентрации ионов водорода в 10 раз на каждую единицу рН.

Через 9 сут в колбы со средой и образцами была добавлена культура цианобактерии *Anabaena* sp. Известно, что цианобактерии и микроводоросли активно размножаются в водоемах при наличии оптимальной освещенности и температуры. На Рис. 2-3 представлены данные по влиянию исследуемых образцов на рост и развитие клеток цианобактерии (рис. 2), а также на величину рН (Рис. 3А) и E_h среды (Рис. 3Б). Культура начинает расти после лаг-фазы длительностью 4-5 сут. Скорость роста культуры с образцами 1, 3 и 6 несколько ниже, чем таковая для культуры с образцами 7 и 8, тогда как биомасса клеток цианобактерии с образцами 2 и 4 после 10 сут культивирования не только перестает накапливаться, но ее содержание к 30 сут снижается почти до нуля. Следует отметить, что рост клеток мы определяли по оптическому поглощению хлорофилла *a*, содержание которого в клетках коррелирует с их биомассой. Кроме того, почти полное отсутствие клеток в вариантах 2 и 4 в конце опыта наблюдается визуально.

Через 29 сут культивирования цианобактерии из колб были удалены образцы. Как видно из Рис. 2, некоторое время биомасса клеток продолжает увеличиваться, а через 10-25 сут – культура переходит в стационарную фазу роста, что является обычной ситуацией при периодическом культивировании микроорганизмов. В тех же вариантах, где

присутствовали образцы 2 и 4, содержание биомассы близко к нулю и, вероятно определяется обесцвеченными разрушенными клетками.

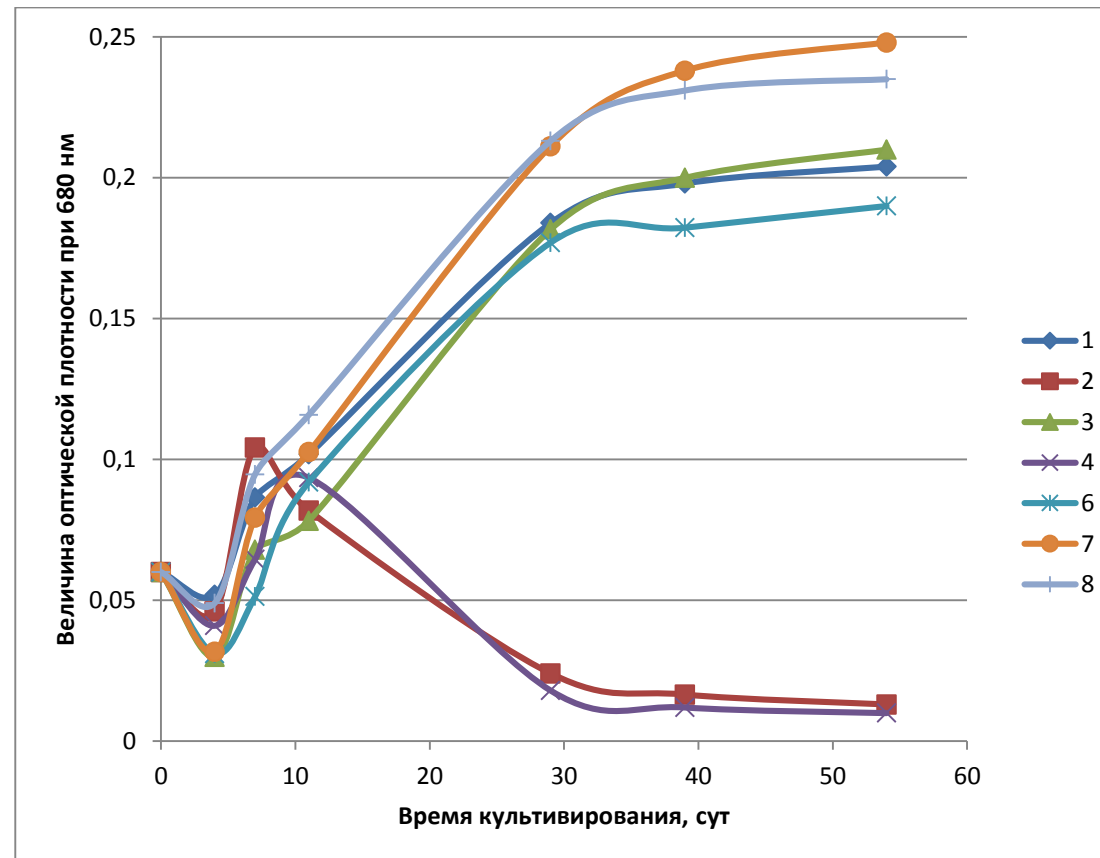


Рис. 2. Действие образцов на рост клеток культуры *Anabaena* sp.

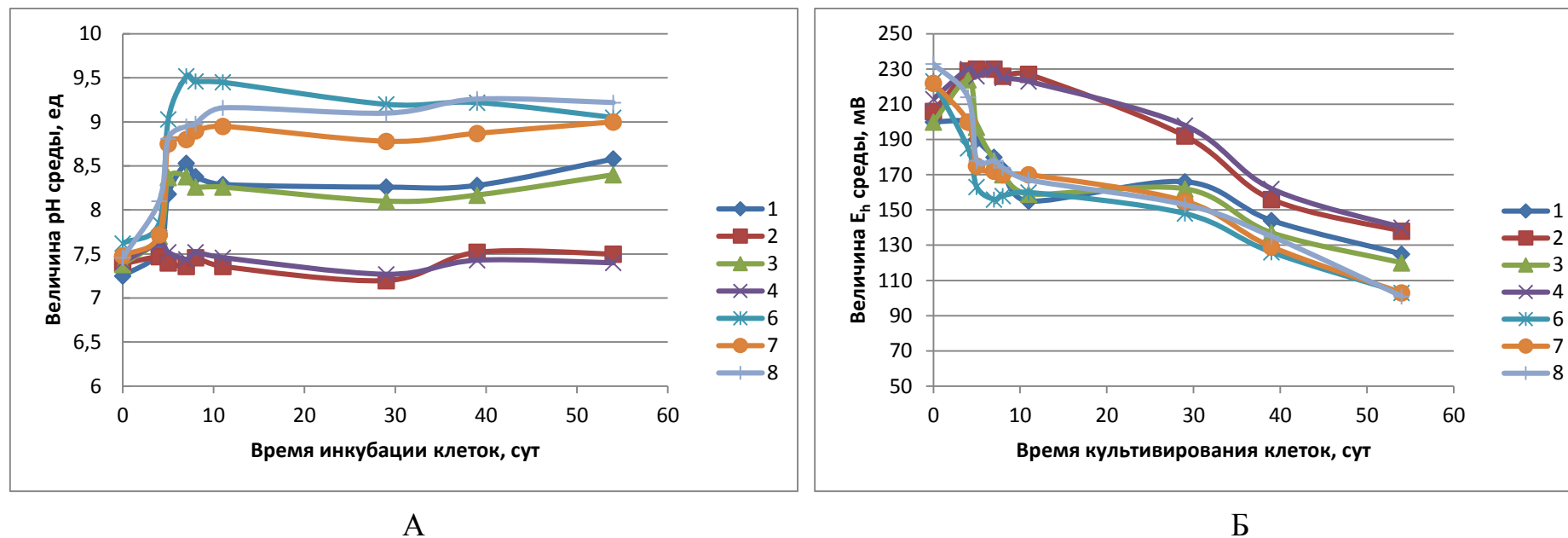


Рис. 3. Действие исследуемых образцов на изменения рН (А) и E_h (Б) среды культивирования клеток цианобактерии *Anabaena* sp.

Исследуемые образцы различным образом влияют на изменения рН и E_h среды при культивировании *Anabaena* sp. (Рис. 3). В присутствии образцов 1 и 3 рН растет от 7,3-7,5 до 8,3-8,5 в течение первых 3-5 сут и далее почти не меняется во времени. С образцами 6, 7, 8 рН среды увеличивается до 9-9,5 и в дальнейшем также слабо меняется.

Однако, в случае образцов 2 и 4 рН среды при культивировании цианобактерии практически не меняется в течение всего опыта.

Изменения E_h среды культивирования *Anabaena* sp. отличаются для разных образцов не столь кардинально как изменения рН. В процессе роста культуры в случаях вариантов 1, 3, 6, 7, 8 наблюдается быстрое снижение редокс-потенциала в лаг-фазный период от 200-230 мВ до 150-170 мВ и более медленное падение в последующий период до 100-130 мВ. Для образцов 2 и 4 наоборот происходит незначительное увеличение E_h среды в лаг-фазный период, а затем плавное снижение до 140-150 мВ. Снижение редокс-потенциала среды культивирования обусловлено выделением из клеток низкопотенциальных метаболитов, таких как низкомолекулярные, содержащие цистеин тионеины и другие, обогащенные SH-группами олигопептиды, как это было показано ранее [1, 3]. Характер зависимости величины рН и E_h среды от времени культивирования цианобактерии после удаления образцов из среды меняется несущественно.

Таким образом, на основании проведенного исследования можно заключить, что использованные в опытах образцы по своему эффекту на культивирование цианобактерии *Anabaena* sp. делятся на три группы. Образцы 1 и 3, а также 6-8, отличаются друг от друга по степени стимулирующего действия на рост клеток, увеличение рН и снижение E_h среды, тогда как образцы 2 и 4 полностью подавляют рост и развитие культуры, следствием чего, по-видимому, является отсутствие изменений рН среды культивирования цианобактерии. В нормальных условиях рост клеток цианобактерий и микроводорослей всегда сопровождается значительным (на 2-3 ед.) увеличением рН среды. Что касается снижения величины E_h среды, то это обусловлено, главным образом, выделением в среду тиоловых соединений, как в экспоненциальной фазе развития культуры цианобактерии, так и особенно при деградациии клеток в стационарной фазе роста культуры.

Литература

1. Барский Е.Л., Лебедева А.Ф., Саванина Я.В. 1999. Изменения окислительно-восстановительного потенциала среды культивирования устойчивой к тяжелым металлам бактерии *Pseudomonas diminuta*: взаимосвязь с выделением из клеток металотионеино-подобных белков // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. № 2. С. 11-15.
2. Stanier R., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). // Microbiology and Molecular Biology Reviews. V 35. №2. P. 171-205.
3. Лебедева А.Ф., Саванина Я.В., Барский Е.Л. 2002. Изменения редокс-потенциала и содержания углеводов в среде при периодическом и диализном культивировании цианобактерии *Anacystis nidulans* и бактерии *Pseudomonas diminuta* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. № 2. С. 24-29.