

УДК 582.23

Н.Г. МЕНЗЯНОВА, А.И. БОЖКОВ, Т.Ю. ВАНИФАТОВА

НИИ биологии Харьковского национального ун-та им. В.Н. Каразина,

Украина, 61077 Харьков, пл. Свободы, 4, menage@inbox.ru**БАКТЕРИИ, СОПУТСТВУЮЩИЕ *DUNALIELLA VIRIDIS* TEOD. В
ЛАБОРАТОРНОЙ КУЛЬТУРЕ**

Из лабораторной культуры *Dunaliella viridis* Teod. были выделены пигментсодержащие бактерии. Бактерии сохраняли пигментацию на средах с высоким содержанием NaCl (среда Мюнца с 5-10 %-м содержанием NaCl). На средах с низким содержанием NaCl бактерии утрачивали пигментацию. На среде с н-алканами бактерии накапливали значительные количества нейтральных липидов. Активность депонирования нейтральных липидов положительно коррелировала с содержанием пигментов в клетках бактерий.

Ключевые слова: *Dunaliella viridis*, бактерии, пигменты, нейтральные липиды.

Введение

В культуре водорослей *Dunaliella* были выявлены бактерии родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus* (Борисова и др., 1997). Предполагается, что в смешанных альгобактериальных культурах могут происходить существенные изменения физиологии и биохимии бактерий водорослей (Омарова, 2003). Изучение физиологии и биохимии смешанных альгобактериальных культур является перспективным с точки зрения создания новых биотехнологий.

В связи с этим нам предстояло определить: 1) динамику роста бактериальной популяции в культуре *D. viridis*, а также на синтетических средах разного состава; 2) состав биомассы клеток бактерий при культивировании на разных средах.

Материалы и методы

В экспериментах использовали культуру водоросли *Dunaliella viridis* штам IBASU-A 29. Условия культивирования описаны в литературе (Божков, Мензянова, 2002).

Бактерии выделяли из культуральной среды культур *D. viridis* разного возраста (8, 14, 20, 26, 32 дней). Для выделения бактерий супернатант после осаждения клеток микроводорослей (3000 g, 10 мин) повторно центрифугировали (6000 g, 30 мин). Из полученных осадков бактерий готовили препараты для электронной микроскопии по общепринятым методам (Гайер, 1980). Препараты анализировали с помощью электронного микроскопа ЭММА-4. Для определения выхода бактериальной биомассы осадки бактерий отмывали от солей и высушивали. Выход сухой биомассы выражали в мкг/мл культуры. Выделенные бактерии культивировали на жидких и агаризованных средах Реймонда и Мюнца. Содержание пигментов, липидов и белка в биомассе бактерий определяли по мето-

© Н.Г. Мензянова, А.И. Божков, Т.Ю. Ванифатова, 2007

дам, описанным в литературе (Финдлей, Эванз, 1990; Bozhkov, Menzyanova, 1997; Божков, Мензянова, 2002).

Полученные результаты обрабатывали статистически, рассчитывая стандартную ошибку и достоверные различия с помощью критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Электронно-микроскопический анализ показал, что бактериальная популяция культуры *D. viridis* представлена двумя морфологическими классами: 1 – палочки различной длины; 2 – кокки. Оба типа клеток содержали в цитоплазме электронно-прозрачные вакуоли (возможно, липидные капли) (рис. 1).

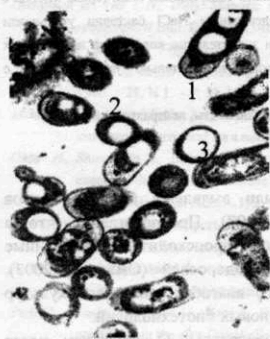


Рис. 1. Бактерии, выделенные из культуральной среды *Dunaliella viridis* Teod. Клетки бактерий представлены двумя морфологическими классами: палочки различной длины (1) и кокки (2). В цитоплазме клеток обоих морфологических классов содержится электронно-прозрачные вакуоли (липидные капли) (3). x25000.

Экспоненциальный рост популяции бактерий наблюдался на стационарной фазе роста микроводорослей (рис. 2). Вероятно, это обусловлено тем, что в процессе роста водоросли значительно модифицируют среду культивирования, экскретируя различные экзометаболиты (Ермилова и др., 1994; Гладышев и др., 1996; Плеханов, Максимова, 1996; Клайн, Уморин, 1990; Божков, Мензянова, 2002), которые могут использоваться клетками бактерий в качестве нутриентов. Об этом свидетельствует ингибирование роста выделенных бактерий на чистой среде Артари.

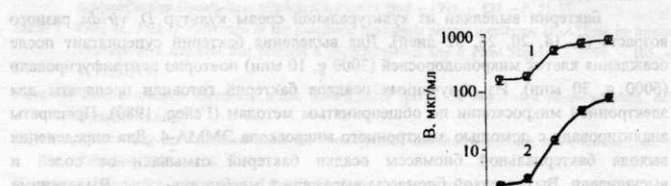


Рис. 2. Выход сухой биомассы (мкг/мл) культуры водорослей (*Dunaliella viridis* Teod.) (1) и бактерий (2), выделенных из культуры *D. viridis* на разных этапах культивирования.

Однако нельзя исключать и того, что интенсивный рост бактериальной популяции и увеличение концентрации бактериальных экзопродуктов в смешанных альгобактериальных культурах может быть одним из факторов, угнетающих дальнейший рост популяции микроводорослей

Окраска выделенных бактерий была обусловлена двумя красными пигментами с различными спектральными характеристиками (рис. 3). Интенсивность накопления пигментов в клетках бактерий зависела от концентрации NaCl в среде культивирования: активность накопления пигментов в клетках бактерий была значительно выше на среде Мюнца с 10 %-м содержанием NaCl (см. таблицу). На средах с низким содержанием NaCl (среда Реймонда) клетки бактерий утрачивали пигментацию. Известно, что способность адаптироваться к высоким концентрациям солей положительно коррелирует с интенсивностью пигментации бактерий (Красильников, 1970). Можно полагать, что метаболизм пигментов вносит определенный вклад в процессы адаптации к высоким концентрациям NaCl в среде.



Рис. 3. Колонии бактерий на агаризованной среде Мюнца (2 % n-алканов, 10 % NaCl). Колонии окрашены в розово-красный цвет и расположены на поверхности застывшего парафина (указано стрелками).

Таблица. Концентрация клеток бактерий в 50-дневной культуре (млн/мл), содержание пигментов (отн. ед.) и фракций нейтральных липидов (мкг/10⁸кл.) в клетках бактерий при культивировании на средах различного состава

| Вещество | Среда Реймонда | Среда Мюнца, 5 % NaCl | Среда Мюнца, 10 % NaCl |
|----------------|----------------|-----------------------|------------------------|
| C, млн/мл | 1449±84 | 427±47 | 107±12 |
| Пигменты, о.е. | 0 | 9,29±0,70 | 27,07±0,60 |
| Стероиды | 0 | 0 | 2,26±0,16 |
| НЭЖК | 1,22±0,10 | 0 | 0 |
| ТГ | 1,03±0,08 | 2,45±0,14 | 5,21±0,32 |
| ЭСт | 1,03±0,11 | 10,59±0,75 | 15,03±2,32 |

Ст – стероиды, НЭЖК – неэстерифицированные жирные кислоты, ТГ – триацилглицериды, ЭСт – эфиры стероидов.

Активация синтеза пигментов на среде с высоким содержанием NaCl сопровождалась депонированием в клетках бактерий нейтральных липидов (см. таблицу). Одновременное депонирование пигментов и липидов в клетках бактерий может свидетельствовать о существовании общих метаболитов-предшественников. Например, для одноклеточных водорослей показана взаимосвязь между депонированием триацилглицеридов и активацией синтеза каротиноидных пигментов (Rabbani et al., 1998).

Депонирование пигментов и нейтральных липидов сопровождалось снижением интенсивности роста бактерий (см. таблицу). Известно, что ингибирование роста у одноклеточных водорослей связано с депонированием триацилглицеридов и пигментов (Масюк, 1973; Gucker, Cooksey, 1990). Возможно, что и в клетках бактерий нейтральные липиды вместе с пигментами включаются в реализацию адаптивно-компенсаторных перестроек в условиях ингибирования роста.

Предполагается, что выделенные бактерии могут принадлежать к роду *Rhodococcus*. Это предположение основано на том, что депонирование нейтральных липидов на средах с алканами является характерной особенностью бактерий *Rhodococcus* sp., причем неэстерифицированные жирные кислоты в этом случае накапливаются в незначительном количестве (Kim et al., 1990; Alvarez et al., 1996).

Выводы

1. Экспоненциальный рост популяции сопутствующих бактерий наблюдался на стационарной фазе роста микроводорослей *Dunaliella viridis*.

2. Интенсивность пигментирования бактерий зависела от концентрации NaCl в среде культивирования. На средах с низким содержанием NaCl клетки бактерий утрачивали пигментацию.

3. Интенсивность пигментирования бактерий положительно коррелировала с депонированием нейтральных липидов.

4. Снижение интенсивности роста бактерий сопровождалось увеличением содержания пигментов и нейтральных липидов в клетках.

N.G. Menzyanova, A.I. Bozhkov, T.Yu. Vanifatova

Research Institute of Biology, V.N. Karazin Kharkov National University,
4, Svobody sq., Kharkiv, 61077, Ukraine, menage@inbox.ru

BACTERIA ASSOCIATED WITH *DUNALIELLA VIRIDIS* TEOD. IN LABORATORY CULTURE

The pigment containing bacteria have been isolated from laboratory culture *Dunaliella viridis* Teod. The bacteria retained red pigmentation on mediums with high concentration NaCl (medium Munz with 5-10 % NaCl). The red pigmentation of bacteria disappeared on mediums with low NaCl concentrations. Pigment content positive correlated with concentration NaCl in medium. The bacteria accumulated neutral lipids in medium with n-alkanes. Degree of lipid accumulation positive correlated with pigment content in bacterial cells.

Keywords: *Dunaliella viridis*, bacteria, pigments, neutral lipids.

- Божков А.И., Мензьянова Н.Г. Влияние этилового спирта на метаболизм водорослей. Метаболизм нуклеиновых кислот и белка в клетках *Dunaliella viridis* Teod. // Альгология. – 2002. – 12, № 3. – С. 300-308.
- Борисова Е.В., Нозина Т.М., Ступина В.В. Бактерии, сопутствующие *Scenedesmus acutus* Meuep в лабораторных культурах // Альгология. – 1997. – 7, № 7. – С. 358-364.
- Гайер Г. Электронная гистохимия. – М.: Мир, 1974. – 488 с.
- Гладышев М.И., Суцук Н.Н., Калачева Г.С. Внеклеточные свободные жирные кислоты в периодической культуре *Spirulina platensis* при пониженной и повышенной температуре // Докл. РАН. – 1996. – 347, № 6. – С. 834-836.
- Ермилова Е.В., Крутинов К.Р., Громов Б.В. Зооспоры зеленой водоросли *Chlorococcum minutum* Stair Calu 746 выделяют авторегуляторный фактор, влияющий на их белковый синтез // Физиол. раст. – 1994. – 41, № 2. – С. 220-222.
- Клайн Н.П., Уморин П.П. О механизме выделения водорослями органических экзометаболитов // Биол. науки. – 1990. – № 7. – С. 52-58.
- Красильников Н.А. Лучистые грибки. – М.: Наука, 1970. – 310 с.
- Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. и перспективы его практического использования. – Киев: Наук. думка, 1973. – 243 с.
- Омарова Е.О. Цианобактерии и стрептомицеты – компоненты микробного сообщества // Биология – наука 21 века. – Пушчино, 2003. – С. 287.
- Плаханов С.Е., Максимова И.В. Функциональное состояние культур хлорококковых водорослей и накопление внеклеточных органических веществ // Физиол. раст. – 1996. – 43, № 1. – С. 116-123.
- Финдлей Дж., Эванс У. Биологические мембраны. Методы. – М.: Мир, 1990. – 424 с.
- Alvarez H.M., Mayer F., Fabritius D., Steinbuechel A. Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD 630 // Arch. Microbiol. – 1996. – 165, N 6. – P. 377-386.
- Bozhkov A.I., Menzhanova N.G. Age dependence of lipid metabolism and beta-carotene content in cells of *Dunaliella viridis* Teod. // Hydrobiol. J. – 1997. – N 6. – P. 132-138.
- Gucker J.B., Cooksey K.E. Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* during high pH-induced cell cycle inhibition // J. Phycol. – 1990. – 26, N 1. – P. 72-79.
- Kim J.S., Powalla M., Lang S., Wagner F. Microbial glycolipid production under nitrogen limitation and resting cell conditions // J. Biotechnol. – 1990. – 13, N 4. – P. 257-266.
- Rabbani S., Beyer P., Lintig J., Hugueney P., Kleinig H. Induced beta-carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawill* // Plant Physiol. – 1998. – 116, N 4. – P. 1239-1248.

Поступила 17.02.04,

повторно 17.11.05

Подписал в печать С.П. Вассер