

АЛЬГИЦИДНОЕ воздействие БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ из альгоцианобактериального КОНСОРЦИУМА оз. ДИЯН ЧИ

Исследована альгицидная активность бактериальных штаммов, выделенных из альгоцианобактериального консорциума эвтрофированного озера Диян Чи (Китай). Наибольший эффект наблюдался в экспоненциальной стадии развития как бактерий, так и автотрофов. Альгицидная активность проявлялась и в отсутствие механического контакта бактерий с автотрофами, что свидетельствует в пользу преимущественно экзометаболического механизма воздействия. Альгицидная активность снижалась при воздействии на автотрофные организмы иног консорциума.



Введение

Эвтрофикация водоемов, приводящая к массовому развитию цианобактерий и микроводорослей, наносит большой вред как экосистеме водоемов, так и хозяйственной деятельности человека. В России эта проблема особенно актуальна в южных регионах. В Китае избыточное размножение цианобактерий на рисовых чеках может привести к попаданию цианобактериальных токсинов по трофической цепи к консументам высших порядков, включая человека.

Избыточное развитие автотрофных микроорганизмов может послужить причиной ухудшения качества очистки сточных вод в специализированных сооружениях. В частности, их численность может повлиять на результаты биологической очистки сточных вод в условиях контролируемого

Д.А. Миняева, аспирант, ФГБОУ ВПО Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева

Фу Йиганг, кандидат технических наук, доцент, Колледж экологии и инженерии при Университете Тон Дзи

оксидативного стресса — в методе, при котором используют воздействие оптимальных доз активных форм кислорода при одновременном освещении содержимого аэротенка или подобного сооружения [1, 2]. Неконтролируемый рост автотрофов может повлечь снижение качества очистки из-за выделения ими части органического вещества, образуемого в процессе фотосинтеза [3].

Для борьбы с автотрофами-эвтрофикаторами используются биопрепараты, тем или иным образом контролирующие численность автотрофов, чаще всего вследствие альгицидной активности бактерий. В больших масштабах таким методом легче смещать биологическое равновесие в сторону преобладания микроводорослей над цианобактериями, т.е. использовать биопрепараты как превентивную меру для предотвращения образования токсинов цианобактерий.

Биопрепараты разрабатываются на основе бактериальных культур, способных

*Адрес для корреспонденции: ae-kuz@yandex.ru

вследствие своих физиологических особенностей сдерживать рост цианобактерий или обладающих альгицидной активностью [4]. Бактериальные культуры могут быть выделены из природных образцов цианобактериальных сообществ, в которые они входят как организмы-антагонисты, осуществляющие тем или иным образом подавление роста автотрофной составляющей. Необходимость в биопрепаратах возникает в том случае, когда вследствие изменений в экосистеме водоема природного количества бактерий-антагонистов становится недостаточно для поддержания биологического равновесия.

Большинство бактериальных антагонистов цианобактерий осуществляют контроль прироста биомассы автотрофов опосредованно: выделяя экзопродукты, способные ингибировать жизненные процессы цианобактерий или оказывающие альголитическое воздействие. Таковой экзопродуктивной альгицидной активностью обладают бактерии рр. *Bacillus* [5-7], *Pseudomonas* [8-11], *Staphylococcus*, *Arthrobacter* [6], *Achromobacter* [12] и др. Видовое разнообразие цианобактерий, подвергающихся альгицидному действию данных бактерий, включает такие распространённые организмы, как *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Scenedesmus*, *Peridinium sp.* Считается, что опосредованный механизм альголитического воздействия является преобладающим [13].

Некоторые исследователи ставят под вопрос значимость экзопродуктивного лизиса в природных условиях, т.к. быстрое разбавление выделяемых бактериями литических агентов приводит к резкому снижению альгицидной активности [14]. В альгоцианобактериальных консорциумах, образующих скопления (гранулы, маты), важную роль играют механизмы контактного и захватного лизиса, требующие контакта бактериальных клеток с клетками автотрофных организмов. Бактерии, осуществляющие лизис цианобактерий по данному принципу, необязательно выделяют экзопродукты литического действия; предположительно, лизис осуществляют ферменты, расположенные на поверхности бактериальных клеток [15]. Известные бактерии, осуществляющие контактный или захватный лизис, относятся к рр. *Mucosoccus* [15, 16], *Cytophaga* [17].

Данная работа посвящена выделению из альгоцианобактериального консорциума эвтрофированного оз. Диян Чи (Dianchi Lake, Kunming, China) бактериальных штаммов, обладающих альгицидной активностью. Выявлялись условия для наибольшей альги-

Л.Л. Вакар, научный сотрудник кафедры биотехнологии Факультета биотехнологии и промышленной экологии, ФГБОУ ВПО Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева

А.Е. Кузнецов*, кандидат технических наук, доцент, старший научный сотрудник кафедры биотехнологии Факультета биотехнологии и промышленной экологии, ФГБОУ ВПО Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева

цидной активности, а также механизм альгицидного воздействия выделенных штаммов — контактный или экзопродуктивный. Кроме того, исследовано, будет ли альгицидная активность в той же степени проявляться по отношению к автотрофной составляющей иноного консорциума, в нашем случае отобранного из лабораторного ферментера.

Материалы и методы исследования

Культивирование и характеристика автотрофной составляющей консорциума. Образцы альгоцианобактериального консорциума были отобраны из оз. Диян Чи в октябре 2010 г. Накопительная культура автотрофной составляющей сообщества была получена путем 5-6 последовательных пересевов на среде BG-11: 1,5 г NaNO_3 , 0,04 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,075 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,036 г CaCl_2 , 0,006 г лимонной кислоты, 0,006 г цитрата железа (II), 0,001 г ЭДТА, 0,02 г Na_2CO_3 , 1 мл раствора микроэлементов A5+Co, 1000 мл дистиллированной воды. Культивирование проводилось в конических колбах общим объемом 250 мл на шейкере при 150 об/мин, круглосуточном освещении 2000-2100 лк и температуре 30-33 °С. Пересев производился на 5 сут культивирования; объем инокулята составлял 5 мл, объем питательной среды — 100 мл.

Для одного из опытов были выбраны автотрофные организмы, развившиеся на освещаемой внутренней поверхности лабораторного ферментера со стеклянной обечайкой, моделирующего аэробную очистку стоков пивоваренного производства. После отбора образец культивировался на среде BG-11.

Видовой состав сообществ автотрофных организмов анализировался под микроскопом с увеличением 16×40, без иммерсии, препарат «раздавленная капля».

Выделение и культивирование бактериальной составляющей консорциума

При помощи рассева Коха, произведенного на агаризованные питательные среды МПБ и Сабуро (40 г глюкозы, 10 г пептона, 1000 мл водопроводной воды), было выделено 12 бактериальных штаммов. Культивирование выделенных штаммов проводилось на агаризованной питательной среде, содержащей 10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г сахарозы и 1000 мл водопроводной воды.

Выделенные штаммы культивировали в колбах (30 мл питательной среды, общий объем колб 100 мл) на шейкере при усло-

виях, аналогичных условиям культивирования автотрофной составляющей сообщества. Длительность культивирования — 1,5–2 сут, в отдельных случаях 3–4 сут. Посевным материалом служила биомасса, отобранная из засеянных пробирок со скошенной агаризованной средой.

Тестирование выделенных бактериальных штаммов на наличие альгицидной активности

О наличии у выделенных штаммов альгицидной активности судили по результатам опытов с использованием метода непосредственного контакта.

В пробирки, содержащие одинаковое количество суспензии автотрофной составляющей консорциума, полученной на среде BG-11, помещали одинаковое количество культуральной жидкости (КЖ) исследуемых бактериальных штаммов без отделения бактериальных клеток. Объемное соотношение суспензий автотрофной и бактериальной составляющих 5:1. В контрольную пробирку к суспензии автотрофной составляющей добавляли воду (водопроводная нестерильная, в том же количестве, что и КЖ бактериальных штаммов). Пробирки оставляли при температуре 20–24 °С, смешанном освещении днем и искусственном — ночью. Спустя 2,5 недели после начала эксперимента во всех пробах измеряли содержание хлорофилла *a*.

Способ измерения содержания остаточного хлорофилла *a* [18].

Исследуемые пробы фильтровали через бумажные фильтры. Хлорофилл экстрагировали из клеток автотрофов смесью хлороформ:этанол в соотношении 2:1 до полного обесцвечивания экстракта. Оптическую плотность совокупной смеси экстрактов определяли с помощью КФК-3 при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения измеряемых пигментов. Содержание хлорофилла *a* рассчитывали для каждой пробы по формуле:

$$Chla = \frac{k_a D_{644} - k_b D_{647} - k_c D_{630}}{m \times 1000} \times V \times 100\%,$$

где D — оптическая плотность при длинах волн 644, 647, 630 нм, соответственно,

V — объем экстракта, мл,

m — масса навески, мг (во всех образцах принята за 1),

$k = 1/(\varepsilon \cdot l)$ — объединенный коэффициент, для хлорофилла *a* равный 11,85 мг/л, хлорофилла *b* — 1,54 мг/л, хлорофилла *c* — 0,08 мг/л,

ε — постоянная, зависящая от свойств растворенного вещества и длины световой волны, л/(мг*см),

l — длина оптического пути, см (0,5 см — ширина кюветы).

По описанному выше методу непосредственного контакта проводили опыты:

- с использованием автотрофной составляющей консорциума и бактериальных штаммов в разных фазах развития — экспоненциальной и стационарной;

- с использованием бесклеточной КЖ бактерий (клетки удалены центрифугированием при 7000 об/мин в течение 30 мин);

- с использованием КЖ бактерий, разбавленной стерильной водопроводной водой в 2, 5, 10 и 100 раз;

- с использованием автотрофов, развившихся на стенках лабораторного ферментера.

Результаты и их обсуждение

Культивирование и характеристика автотрофной составляющей консорциума. Разнообразие автотрофных организмов в полученной из исходного образца накопительной культуре насчитывает около трех десятков разных родов, в том числе *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Microcystis*, *Pinnularia*, *Synedra*, *Oocystis*, *Oscillatoria*.

Нитчатые автотрофные организмы, такие как *Oscillatoria sp.*, являются каркасом для образования конгломератов (рис. 1 а). Окрашивание тушью показало, что конгломераты образованы за счет выделения веществ полисахаридной природы, образующих «капсулы» (рис. 1 б). Вокруг свободных участков нитчатых автотрофов «капсулы» не наблюдаются. Такие особенности отмечены при образовании гранул активного ила, в частности, при метаногенерации в процессе анаэробной переработки стоков в реакторах с восходящим потоком (UASB, EGSB) [3].

Определение бактериальных штаммов, обладающих альгицидной активностью

Из исследованного альгоцианобактериального консорциума были выделены четыре бактериальных штамма, обладающих альгицидной активностью по отношению к автотрофной составляющей консорциума.

При длительном непосредственном контакте бактериальной биомассы с автотрофной составляющей исходного консорциума каждый из выбранных штаммов снижал уро-

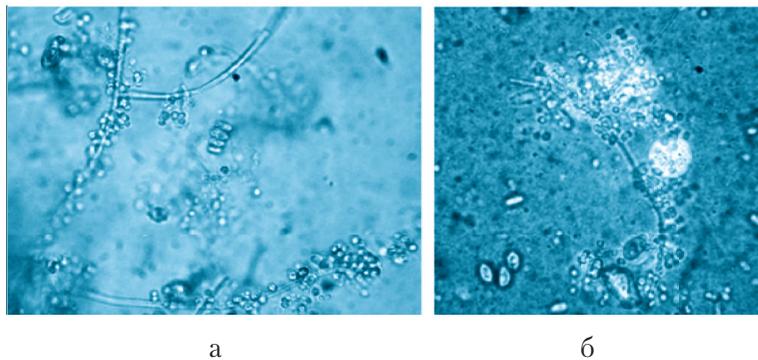


Рис. 1. а) Образование конгломератов на каркасе, которым служат нитчатые фототрофы; б) Формирование полисахаридных «капсул» (окраска тушью). Увеличение 16х40.

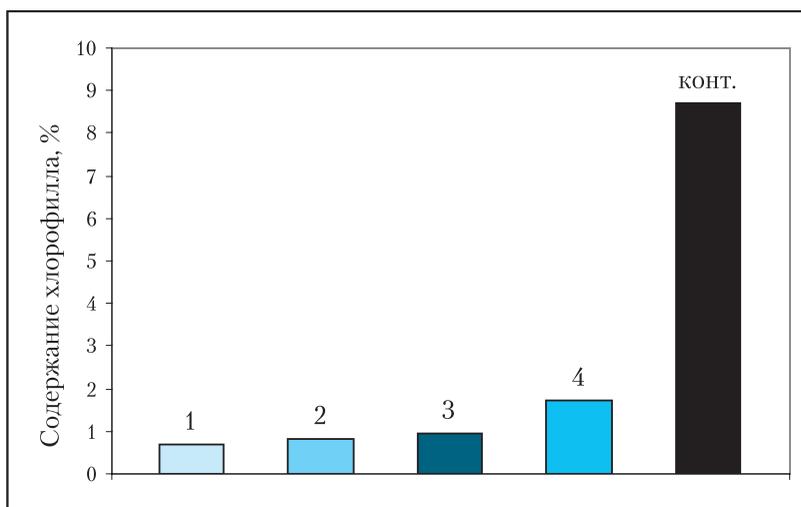


Рис. 2. Уровень содержания хлорофилла в пробах, обработанных wybranными бактериальными штаммами, по сравнению с контрольной пробой (время контакта 17 сут).

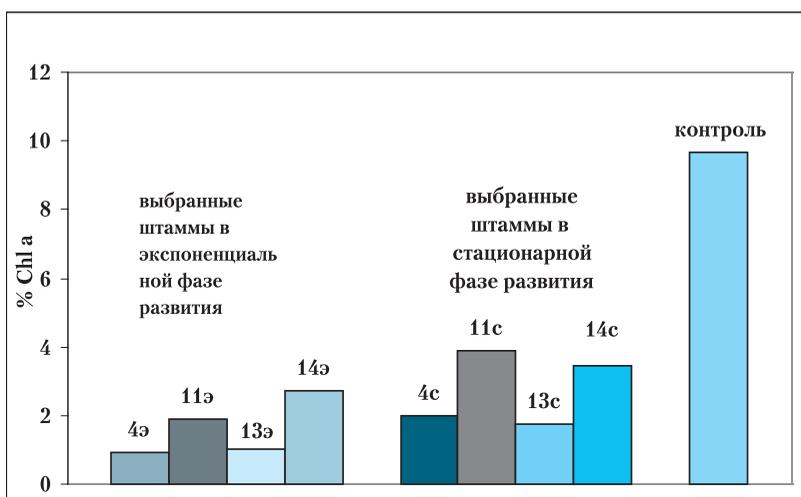


Рис. 3. Содержание остаточного хлорофилла в пробах при обработке автотрофов исследуемыми бактериальными штаммами, находящимися в экспоненциальной и стационарной фазах развития (время контакта 17 сут).

вень содержания хлорофилла более чем на 80 % (рис. 2).

Определение фазы развития бактерий, характеризующейся наибольшей альгицидной активностью

Экспоненциальная фаза развития выbrанных бактериальных штаммов при периодическом культивировании приходится на 1,5–2 сут культивирования, стационарная – на 3–4. В большинстве случаев бактерии, находящиеся ко времени начала эксперимента в экспоненциальной фазе развития, демонстрируют немного более высокую активность, чем находящиеся в стационарной фазе. Однако и в экспоненциальной, и в стационарных фазах развития выbrанные штаммы демонстрируют высокий уровень альгицидной активности (рис. 3).

Влияние фазы развития автотрофов на альгицидную активность бактерий

Автотрофная составляющая консорциума, находящаяся в стационарной фазе развития (возраст 1,5–2 месяца и более), отличается от таковой в экспоненциальной фазе (возраст около 2 недель) значительно более высокой оптической плотностью суспензии, образованием большего количества конгломератов, большим значением рН среды пребывания.

При проведении опыта с автотрофами в стационарной фазе развития уровень содержания остаточного хлорофилла в пробах после контакта с бактериями, обладающими альгицидной активностью, составляет приблизительно две трети от такового в контрольной пробе, тогда как для экспоненциальной фазы – приблизительно одну треть (рис. 4).

Определение механизма альгицидного воздействия

При проведении опыта с использованием КЖ, освобожденной от бактериальных клеток центрифугированием, существенной разницы в альгицидной активности в пробах с бактериальными клетками и бесклеточной не наблюдалось (рис. 5).

Однако при удалении бактериальных клеток путем центрифугирования некоторое их количество неизбежно остается в фугате и, теоретически, способно к дальнейшему размножению. В таком случае результаты эксперимента могли быть интерпретированы просто как следствие уменьшения начальной концентрации бактерий. Для выяснения роли данного фактора концентрацию бакте-

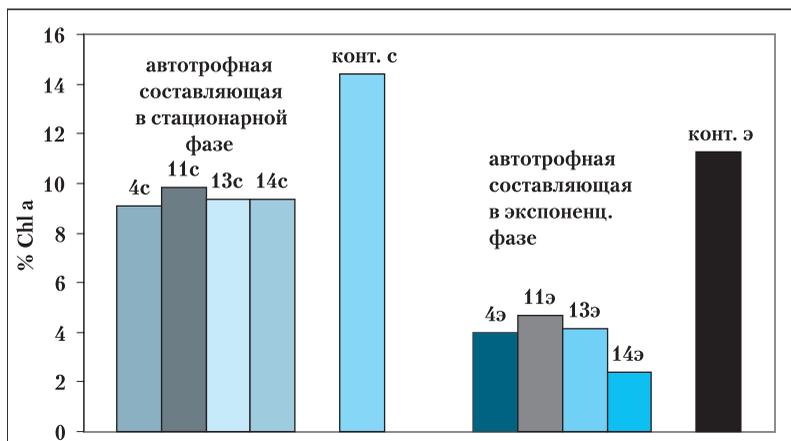


Рис. 4. Содержание остаточного хлорофилла в пробах при обработке исследуемыми бактериальными штаммами автотрофов, находящихся в стационарной и экспоненциальной фазах развития (время контакта 17 сут).

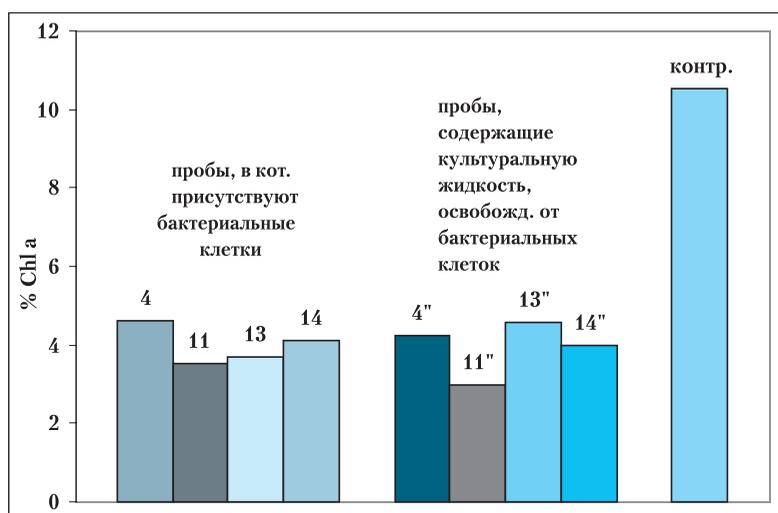


Рис. 5. Содержание остаточного хлорофилла в пробах при обработке автотрофов КЖ исследуемых бактериальных штаммов в присутствии и отсутствии бактериальных клеток (время контакта 17 сут).

риальных клеток уменьшали путем разбавления КЖ, содержащей бактериальные клетки, водопроводной водой. В большинстве случаев наблюдалось существенное снижение альгицидной активности (рис. 6). На основании этого можно предположить, что в освобожденной от клеток КЖ присутствуют определенные бактериальные метаболиты, обеспечивающие наличие альгицидной активности.

Испытание альгицидной активности бактерий по отношению к автотрофным организмам консорциума, развивающегося в техногенных условиях

Видовой состав сообщества автотрофных организмов, развивающихся на освещаемых

поверхностях лабораторного ферментера, беднее, чем видовой состав природного консорциума. В основном, организмы техногенного консорциума относятся к рр. *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Microcystis*, *Oocystis*. У организмов, адсорбирующихся на стенках ферментера в условиях очистки модельного стока, наблюдается интенсивное образование слизистых чехлов и капсул.

При непосредственном контакте бактериальных штаммов и изолята автотрофных организмов, развившихся в лабораторном ферментере, уровень содержания хлорофилла в пробах снизился не более чем на 76 % за 3 недели (рис. 7).

Заключение

Из альгоцианобактериального консорциума оз. Диян Чи (Китай) выделено 4 штамма, обладающих альгицидной активностью по отношению к накопительной культуре автотрофной составляющей консорциума. Уровень содержания остаточного хлорофилла в пробах, обработанных данными штаммами, снижался по сравнению с контрольной пробой, не подвергавшейся бактериальной обработке, более чем на 80 %. В пробах, обработанных другими штаммами, выделенными из консорциума, в некоторых случаях также наблюдалось снижение уровня остаточного хлорофилла, связанное, возможно, с потреблением бактериями некоторого количества биогенных элементов, необходимых для развития автотрофных организмов. В других случаях, напротив, наблюдалось повышение содержания хлорофилла, и, соответственно, прирост численности автотрофов.

Освобожденная от бактериальных клеток КЖ также демонстрировала высокий уровень альгицидной активности в контакте с накопительной культурой автотрофов. Это позволяет охарактеризовать механизм альгицидного воздействия выбранных бактериальных штаммов как экзометаболитный. Метаболиты, обеспечивающие альгицидное действие бактерий, нельзя с уверенностью причислить к первичным либо вторичным, т.к. при обработке автотрофной составляющей по отдельности бактериями в экспоненциальной и стационарной фазах не наблюдалось существенных различий в уровне альгицидной активности.

Автотрофы в стационарной фазе развития оказались более устойчивы к альгицидному воздействию бактерий, чем автотрофы

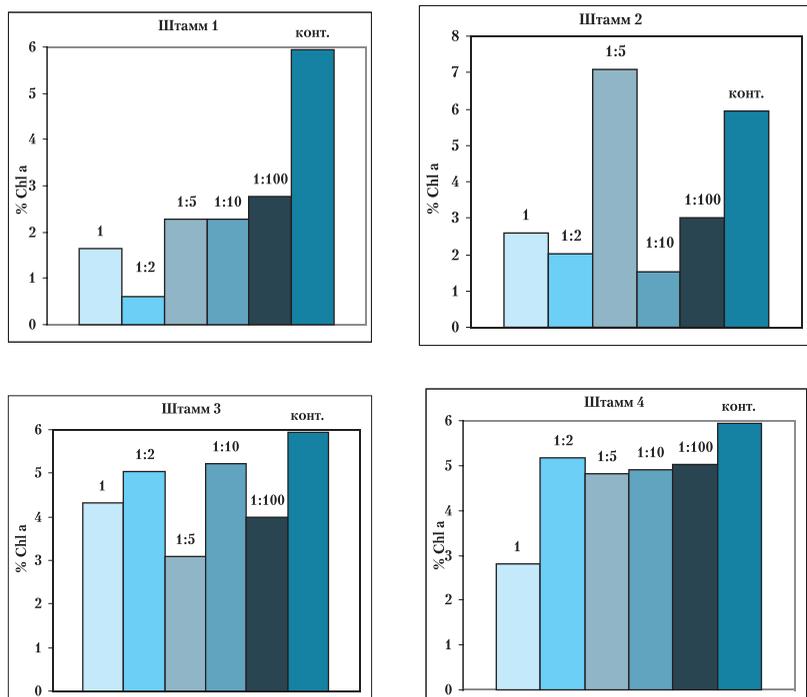


Рис. 6. Содержание остаточного хлорофилла в пробах при обработке автотрофов разбавленной КЖ исследуемых бактериальных штаммов. Обозначение «1» — неразбавленная КЖ; дробные обозначения соответствуют разведениям в 2, 5, 10 и 100 раз (время контакта 17 сут).

в экспоненциальной фазе. Это подтверждает то, что выбранные бактериальные штаммы являются антагонистами по отношению к цианобактериям и микроводорослям, а не сапрофитами, осуществляющими разложение мертвого биоматериала автотрофов.

Выбранные бактериальные штаммы были протестированы на альгицидную активность по отношению к автотрофным организмам, отобранным из аппарата, моделирующего очистку сточных вод пивоваренного производства. Альгицидная активность по отношению к аллохтонным автотрофам была ниже, чем по отношению к автотрофам исходного консорциума (уровень содержания остаточного хлорофилла снижался на 50-56 %, лишь в одном случае на 76 %), и требовалось больше времени для ее проявления.

В дальнейшем целесообразно проверить альгицидную активность выделенных бактериальных штаммов при их совместном воздействии, а также выяснить влияние на альгицидную активность физико-химических факторов окружающей среды — температуры, показателя pH, различной концентрации биогенных элементов; установить наименьшую действующую концентрацию бактериальных клеток и экзометаболитов.

Работа поддержана госконтрактом Минобрнауки «Биоинженерия и биологическая основа новых высокоэффективных методов культивирования микроорганизмов и их применение в микробиологическом синтезе, при переработке отходов и биологической очистке» ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (ГК № 02.740.11.0784).

Литература

1. Пат. 2209186 РФ / Кузнецов А.Е., Сафронов В.В. Способ биологической очистки сточных вод от органических соединений. Заявлено 26.12.2000. Опубликовано 27.07.2003. Бюл. №7. Приоритет 26.12.2000.
2. Кузнецов А.Е. Ресурсосберегающий метод совершенствования технологий биологической очистки загрязненных вод с использованием контролируемого окислительного стресса / А.Е. Кузнецов, Фу Йиганг, Л.Л. Вакар, А.В. Белодед, В.Д. Смирнова, С.В. Каленов // Мат. Моск. междунар. конф. «Биотехнология: экология крупных городов». Москва, 2010. М.: ЗАО Экспо-биохимтехнологии, 2010. С. 74–75.
3. Кузнецов А.Е. Прикладная экобиотехнология: учебное пособие, в 2 т. / А.Е. Кузнецов, Н.Б. Градова, С.В. Лушников, М. Энгельхарт, Т. Вайссер, М.В. Чеботаева. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. Т.1 629 с.
4. Sigeo D.C. Biological control of cyanobacteria: principles and possibilities / D.C. Sigeo, R. Glenn, M.J. Andrews, E.G. Bellinger, R.D. Butler, H.A.S.

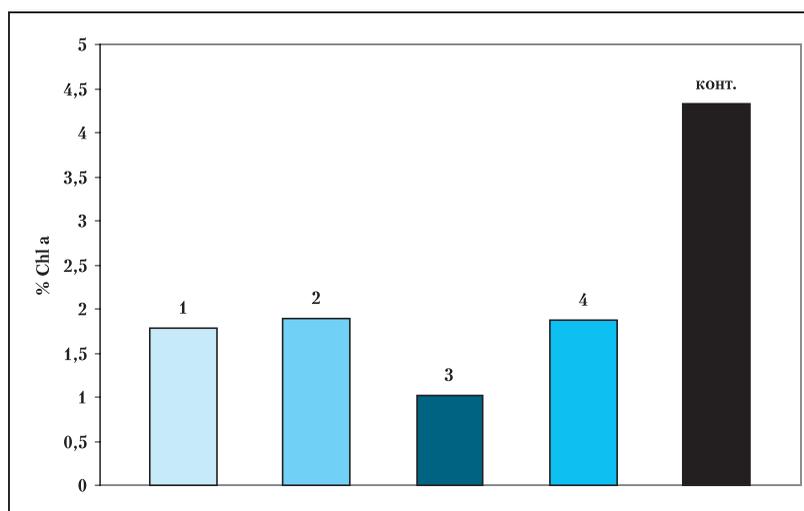


Рис. 7. Содержание остаточного хлорофилла в пробах в опыте с автотрофными организмами, отобранными с поверхности лабораторного ферментера (время контакта 21 сут, температура культивирования 20-24 °С).

Epton, R.D. Hendry // *Hydrobiologia* 1999. V. 395–396. P. 161–172,

5. Fukami K. Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense* / K. Fukami, A. Yuzawa, T. Nishijima, Y. Hata // *Nippon Suisan Gakkaishi* 1992. V. 58. P. 1073–1077.

6. Peng C. Isolation and identification of three algae-lysing bacteria and their lytic effects on blue-green algae (Cyanobacteria) / C. Peng, G. Wu, Y. Xi, Y. Xia, T. Zhang, Y. Zhao // *Res. Environ. Sci.* 2003. V. 16. P. 37–40

7. Pei H. Lytic characteristics and identification of two alga-lysing bacterial strains / H. Pei, W. Hu // *Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research)*. 2006. V. 5. No 4. P. 368–374.

8. Kang Y.K. Isolation, identification and characterization of algicidal bacteria against *Stephanodiscus hantzschii* and *Peridinium bipes* for the control of freshwater winter algal blooms / Y.K. Kang, S.Y. Cho, Y.H. Kang, T. Katano, E-S. Jin, K-S. Kong, M-S. Han // *J. Appl. Phycol.* 2008. V. 20. P. 376–386

9. Shi S. The algae-lytic ability of bacterium DC10 and the influence of environmental factors on the ability / S. Shi, Y. Liu, Y. Shen, G. Li // *Science in China Ser. C Life Sciences*. 2005. V.48. No.3. P. 250–255.

10. Ren H. The potential use of bacterium strain R219 for controlling of the bloom-forming cyanobacteria in freshwater lake / H. Ren, P. Zhang, C. Liu, Y. Xue, B. Lian // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 26. P. 465–472.

11. Kim J. (2007). Alga-lytic activity of *Pseudomonas fluorescens* against the red tide causing marine alga

Ключевые слова: эвтрофикация, альгоцианобактериальные консорциумы, альгицидная активность бактерий

Heterosigma akashiwo (Raphidophyceae) / J. D. Kim, B. Kim, C.G. Lee // *Biol. Control*. 2007. V. 41. No 3. P. 296–303.

12. Wang H. Investigations of the characteristics and mode of action of an algalytic bacterium isolated from Tai Lake / H. Wang, L. Liu, Z.P. Liu, S. Qin // *J. Appl. Phycol.* 2010. V. 22. P. 473–478.

13. Dakhama A. Isolation and identification of antialgal substances produced by *Pseudomonas aeruginosa* / A. Dakhama, J. Delanoue, M.C. Lavoie // *J. Appl. Phycol.* 1993. V. 5. P. 297–306.

14. Daft M. Algal blooms: consequences and potential cures / M.J. Daft, J. C. Burnham, Y. Yamamoto // *J. Appl. Bact.* 1985. V.59. P. 175S–186S.

15. Daft M. Bacterial pathogens of freshwater blue-green algae / M. J. Daft, W. D. Stewart // *New Phytol.* 1971. V. 70. P. 819–829.

16. Burnham, J. C. Entrapment and lysis of the cyanobacterium *Phormidium luridum* by aqueous colonies of *Myxococcus xanthus* PCO2 / J. C. Burnham, S. A. Collart, B. A. Highison // *Archives of Microbiology*. 1981 V. 129. P. 285–294.

17. Mitsutani, A. Lysis of *Skeletonema costatum* by *Cytophaga* sp., isolated from the coastal water of the Ariake sea / A. Mitsutani, K. Takesue, M. Kirita, Y. Ishida // *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1992, V. 58. P. 2158–2167.

18. Тренкеншу Р.П. Основы промышленного культивирования дуналиеллы солоноводной (*Dunaliella salina* teod.) / Р.П. Тренкеншу, Р.В. Геворгиз, А.Б. Боровков. Севастополь, 2005. 104 с.

D.A. Minyaeva, Fu ligang, L.L. Vakar, A.E. Kuznetsov

ALGICIDAL IMPACT OF BACTERIAL SPECIES ISOLATED FROM CYANOBACTERIAL COMMUNITY OF THE DIYAN CHI LAKE

The article represents results on algicidal activity of bacterial species isolated from cyanobacterial community of the eutrophicated Diyan Chi Lake (China). Maximum effect was observed in exponential growing cells of bacteria and autotrophs. The activity also appears without mechanical contact between bacteria and autotrophs that demonstrates exo-metabolic mechanism of the impact. Algicidal activity decreased after influence of other community on autotroph organisms.

Key words: eutrophication, cyanobacterial communities, bacterial algicidal activity.