

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова

Биологический факультет

На правах рукописи

Смирнов Иван Алексеевич

«Модельные ассоциации на основе базидиальных грибов  
и фототрофных микроорганизмов»

Специальность

03.00.24 – микология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва

2010

Диссертационная работа выполнена на кафедре микологии и альгологии  
биологического факультета  
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель: доктор биологических наук,  
профессор  
Е. С. Лобакова

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,  
профессор  
Г. М. Зенова

доктор биологических наук,  
доцент  
Е. Э. Мучник

Ведущая организация: Полярно-альпийский ботанический сад-институт  
КНЦ РАН им. Н. А. Аврорина

Защита состоится «12» марта 2010 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета  
Д 501.001.46 в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по  
адресу: 119991, г. Москва, ГСП-2, Ленинские горы, МГУ, Биологический факультет.  
Факс: (495) 939-43-09

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета  
МГУ им. М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан «11» февраля 2010 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета, к. б. н.

М. А. Гусаковская

**Актуальность проблемы.** Лишайники – классический пример многокомпонентной симбиотической системы, состоящий из гетеротрофного грибного (микобионта) и фототрофного (циано- и/или фикобионта) компонентов, а также ассоциативных бактерий (Ahmadjian, 1973, Ahmadjian, Paracer, 1986; Paracer, Ahmadjian, 2000).

Наименее изученной группой лишайников являются базидиолишайники, прежде всего из-за их меньшей представленности в природных биоценозах (Окснер, 1974; Lutzoni et al., 2004). В качестве микобионтов в них выступают кардициевые, телеферовые или агариковые грибы, а фикобионтами являются те же роды микроводорослей, что входят в состав асколишайников (Lutzoni et al., 2001). Базидиолишайники, обладающие более быстрым ростом, чем асколишайники, могут являться интересным объектом биотехнологии и экспериментальной лихенологии, позволяющим конструировать (создавать) модельные ассоциации доминантных симбионтов в парах в сочетаниях не встречающихся в природе (Gusev et al., 2002). Перспективным направлением таких исследований является создание модельных ассоциаций на основе широко распространенных и легко культивируемых базидиальных агариковых грибов, обладающих ценными пищевыми и лекарственными свойствами, и микроводорослей и/или цианобактерий, выделенных из асколишайников. До настоящего времени аналогичные работы проводились только на основе асколишайников (Ahmadjian, 1961; Ahmadjian, 1973, Ahmadjian, Paracer, 1986; Ahmadjian, 1989; Stocker-Worgotter, Turk, 1989; Ahmadjian, 1990; Yoshimura, Yamamoto, 1991; Yoshimura et al., 1993; Yamamoto et al., 1993; Paracer, Ahmadjian, 2000).

Экспериментальные работы по созданию базидиолишайников могут, с одной стороны, раскрыть новые аспекты взаимодействия партнеров, изучить процессы морфогенеза талломов, селективного узнавания и специфического взаимодействия партнеров, с другой стороны, служить основой для изыскания новых биологически активных веществ.

**Целью** работы явилось создание модельных ассоциаций на основе базидиальных грибов и фототрофных микроорганизмов.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1) изучить особенности распределения микроорганизмов, сопутствующих мико- и фотобионту, внутри и на поверхности талломов лишайников для отработки условий получения монокультур симбионтов;

2) подобрать условия выделения фико- и цианобионтов из талломов лишайников, создать коллекцию фототрофных компонентов лишайников;

3) изучить условия, необходимые для создания модельных ассоциаций на основе базидиальных грибов и фотобионтов лишайника;

4) исследовать физиолого-биохимические особенности полученных модельных ассоциаций.

**Научная новизна.** Впервые показано, что ассоциативные микроорганизмы в таллеме лишайников локализованы на поверхности верхней и нижней коры в слизистом матриксе преимущественно в виде микроколоний. Во внутренних частях слоевища лишайника ассоциативные микроорганизмы не обнаружены. Отработаны методы стерилизации лишайниковых эксплантов, позволяющие снизить процент поражения ассоциативными микроорганизмами. Впервые созданы модельные ассоциации на основе базидиальных грибов и фототрофных микроорганизмов (фикобионтов лишайников и свободноживущих азотфиксирующих цианобактерий). Установлено, что в полученных модельных ассоциациях наблюдаются штаммо- и видоспецифичные взаимодействия партнеров. Показано, что для ряда сочетаний в парах компонентов модельных систем отмечены: индукция взаимного роста партнеров, стимуляция плодообразования, препятствие возрастному лизису микобионта и деградации фотобионта.

В модельных ассоциациях на основе базидиальных грибов и фототрофных микроорганизмов обнаружено: 1) расширение спектра антибиотической активности экстрактов из культуральной жидкости; 2) возрастание целлюлозолитической активности в смешанных культурах симбионтов; 3) увеличение в смешанных культурах числа формирующихся примордиев и плодовых тел по сравнению с монокультурой гриба. В модельной ассоциации на основе фотобионта лишайника *Cetraria islandica* зеленой водоросли *Trebouxia* sp. и гриба *Pleurotus ostreatus* НК-35 отмечено изменение спектра синтезируемых фенольных соединений.

**Практическое значение.** Предложен метод стерилизации лишайниковых эксплантов, значительно снижающий контаминацию их микроорганизмами, который может быть использован в биотехнологии при получении культур симбионтов лишайников. В модельной системе *Pleurotus ostreatus* НК-35 — *Trebouxia* sp. (при диализном сокультивировании) отмечено увеличение целлюлозолитической активности партнеров и расширение спектра антибиотической активности в экстрактах культуральной жидкости, что может найти применение в биотехнологическом производстве лекарств и ферментов.

Полученные в работе результаты используются в курсе лекций по «Лихенологии» и «Симбиологии» для студентов 5 курса кафедры Микологии и альгологии биологического факультета МГУ.

**Апробация работы.** Результаты исследования были представлены и обсуждены на заседании кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ, 8 молодежной конференции ботаников в Санкт-Петербурге (2004), Международной конференции, посвященной 200-летию Казанской ботанической школы (Казань, 2006), конференции «Грибы и водоросли в биоценозах — 2006» (Москва), XIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2006» (Москва), XV Европейском микологическом конгрессе (Санкт-Петербург, 2007), Всероссийской конференции с международным участием

«Фундаментальные и прикладные аспекты исследования симбиотических систем» (Саратов, 2007), юбилейной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения М. В. Горленко «Высшие базидиальные грибы: индивидуумы, популяции, сообщества» (Москва, 2008), II Научно-практической конференции в рамках Третьего Фестиваля науки в городе Москве и Биотехнологической выставки-ярмарки «РосБиоТех-2008».

**Публикации.** Всего по материалам диссертации опубликовано 10 работ, среди них 1 статья в реферируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикации соискателей ученой степени кандидата наук, 1 патент, 3 статьи, опубликованные в материалах международных конференций. Экспериментальные данные, представленные в диссертации получены лично соискателем и опубликованы в соавторстве с руководителем.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на страницах машинописного текста, состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка цитированной литературы, включающего 108 источников (из них 67 на иностранных языках). Работа содержит 13 таблиц и иллюстрирована 62 рисунками.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Глава 1. Обзор литературы.** Обзор посвящен анализу специфики лишайников, как объектов экспериментальной биологии, особенностям используемой в данной области исследований терминологии, истории и классификации основных экспериментальных подходов в лихенологии, выяснению биотехнологического потенциала «культур тканей лишайников».

Проведенный анализ литературных данных показал (рис. 1), что экспериментальные подходы («микрклональное размножение лишайников», «суспензионные культуры», «калусные культуры») применимы для исследования морфогенеза лишайников, изучения влияния на их рост различных экологических факторов, поддержания в культуре *in vitro* и реинтродукции в природу редких и исчезающих видов, а также перспективны для создания модельных систем с целью получения биологически активных веществ.

## Глава 2. Материалы и методы.

**Объекты исследования.** Объектами исследования служили 10 видов лишайников различных экологических и морфологических групп (см. табл. 1). Материал для исследований собирали в 2004 – 09 гг.

Для синтеза модельных ассоциаций использовали моноспоровые культуры **базидиальных грибов** *Pleurotus ostreatus* L. (HK-35), *Pleurotus citrino-pileatus* Singer (3040), *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Voedijn (штамм фирмы Sylvan), *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel., *Agaricus bisporus* L. (U3) — из коллекции кафедры микологии и альгологии МГУ. В качестве фотобионтов при синтезе модельных ассоциаций использовали свободножи-

вущие азотфиксирующие **цианобактерии** *Anabaena variabilis* ATCC 29413 и *Nostoc* sp. CALU 526 (из коллекции кафедры физиологии микроорганизмов МГУ) и **фикобионты**, выделенные из лишайников *Cladonia coniocraea*, *Cetraria islandica*, *Nephroma arcticum* и *Peltigera aphthosa*.

Табл. 1. Характеристика лишайников — объектов исследования.

Вид лишайника	Экологическая группа	Фотобионт	место сбора
<i>Cladonia coniocraea</i> (Florke) Sprengel	эпифит	зеленая водоросль	Московская обл.
<i>Lecanora symmicta</i> (Ach.) Ach.	эпифит	зеленая водоросль	Московская обл.
<i>Xanthoria parietina</i> (L.) Th. Fr.	эпифит	зеленая водоросль	Московская обл.
<i>Alectoria sarmentosa</i> (Ach.) Ach.	эпифит	зеленая водоросль	Карелия, ББС
<i>Physcia stellaris</i> (L.) Nyl.	эпифит	зеленая водоросль	Московская обл.
<i>Nephroma arcticum</i> (L.) Torss	эпигеиод	зеленая водоросль и цианобактерия	Карелия, ББС
<i>Bryoria fuscescens</i> (Gyeln.) Brodo & D. Hawksw.	эпифит	зеленая водоросль	Карелия, ББС
<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.	эпигеиод	зеленая водоросль	Карелия, ББС
			Московская обл.
			Тверская обл.
<i>Parmelia saxatilis</i> (L.) Ach.	эпилит	зеленая водоросль	Карелия, ББС
<i>Peltigera aphthosa</i> (L.) Willd	эпигеиод	зеленая водоросль и цианобактерия	Карелия, ББС

Микроскопические методы. Изучение интактных лишайников и модельных ассоциаций проводили на **световом микроскопе** Axioskop 40FL (Carl Zeiss, Германия) с ртутной лампой HBO-50AC методами «светлого поля» (при увеличениях  $\times 10$ ,  $\times 40$ ,  $\times 90$ ), **люминесцентной микроскопии** и методом «фазового контраста» ( $\times 40$ ). Для фильтрации возбужденного света использовался интерференционный фильтр с максимумом пропускания при 546 нм и полушириной полосы 12 нм, эмиссию флуоресценции регистрировали через граничный фильтр, блокирующий излучение с длиной волны менее 590 нм. Подготовка препаратов к **сканирующей электронной микроскопии** включала фиксацию образцов 0,5% глутаровым альдегидом на кокадилатном буфере, обезвоживание в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне, высушивание в атмосфере углекислого газа в аппарате LPB 4800 и изучение в микроскопе Hitachi 405S при ускоряющем напряжении 75 кВ.

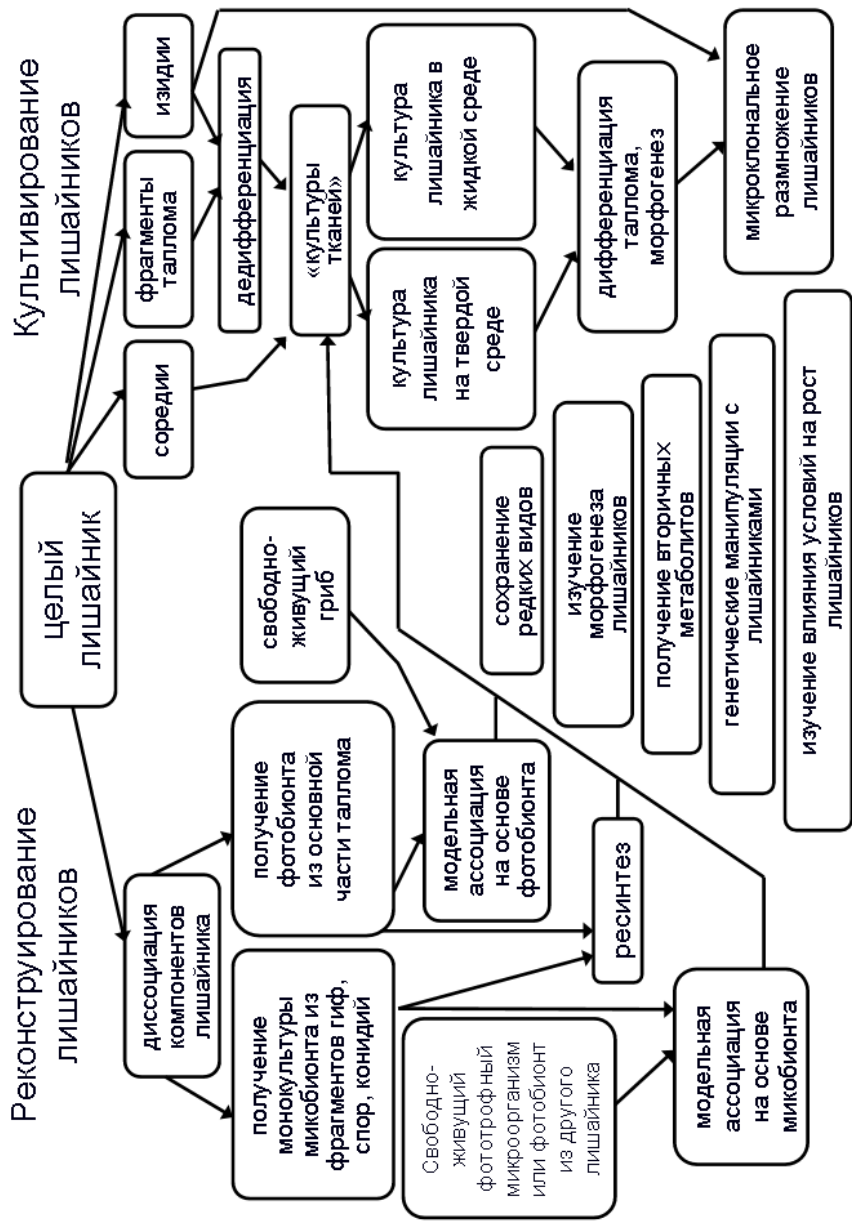


Рис. 1. Экспериментальные подходы в лихенологии.

В качестве стерилизующих агентов в экспериментах использовали 0,05% водный раствор биглюконата хлоргексидина, 70% и 98% этиловый спирт и перекись водорода в концентрации 3, 10, 15, 20, 30, 33% и их сочетания, а также усниновую кислоту (концентрация – 100 мкг/мл).

Выделение симбионтов проводили методом талломного обрастания в жидких средах (Ahmadjian, 1961). Цианобионты выделяли на твердой среде BG-11 (Stainer et al., 1971), используя их способность к формированию гормоцитов (Пеневиц, 2006). Микобионт выделяли из апотечий лишайников по стандартной методике (Ahmadjian, 1967).

Культивирование изолятов фотобионтов и базидиальных грибов проводили на следующих средах: Чапека (СЧ), сусло-агаре (СА), голодным агаре (ГА) (Семенов, 1990), Мурасиге и Скуга (MS) (Бутенко, 1999), крахмало-глюкозо-пептонной среде (R) (Лысак и др., 2003), «С» (Kratz, Myers, 1955) и BG-11. Последняя среда была также использована в следующих модификациях: с 50% (BG<sub>0</sub><sup>1/2</sup>-11), 25% (BG<sub>0</sub><sup>1/4</sup>-11) содержанием солей азота и в безазотной модификации (BG<sub>0</sub>-11).

Для иммобилизации фикобионтов в жидких питательных средах использовали клеточно-структурированный материал (КСМ), полученный из ряски мелководной (*Lemna minuscula* L.), выращенной в стерильных условиях (Echwald, Titel, 1999).

Синтез модельных ассоциаций проводили: 1) в жидких питательных средах «С», BG-11, BG<sub>0</sub>-11 и сусле 50 мл/л; 2) на агаризованных средах СЧ, СА, ГА, MS, BG-11, BG<sub>0</sub>-11, BG<sub>0</sub><sup>1/2</sup>-11 и BG<sub>0</sub><sup>1/4</sup>-11 (с концентрацией агара 1 – 2%); 3) на стерильном предметном стекле, один конец которого был помещен в жидкую питательную среду СЧ (Ahmadjian, 1967). В случае жидких сред культивирование проводили в конических колбах объемом 150 – 200 мл (количество среды — 50 – 60 мл) и качалочных колбах объемом 750 мл (количество среды 150 – 250 мл) при температуре +20 °С в нескольких вариантах: качалочная культура на свету (освещенность 2000 Лк), стационарная культура на свету (освещенность 2000 Лк), стационарная культура световой режим с чередованием день/ночь – 12/12 часов (освещенность 600 Лк).

Диализное сокультивирование проводили по стандартной методике (Лебедева и др., 2002). Фотобионты (микроводоросли и цианобактерии) помещали в диализный мешок (пленка Orange Scientific производства Биомед с диаметром пор 12 – 14 кДа), который помещали в качалочную колбу с жидкой питательной средой (СА, BG<sub>0</sub><sup>1/2</sup>-11, стерильная вода) инокулированной грибом. Культивирование проводили в стационарных условиях в люминистате (освещенность 2000 Лк, температура +25 °С).

Изучение состояния фототрофных микроорганизмов в модельных системах проводили на основании оценки пигментных систем по сравнению с монокультурами. Экстракцию пигментов из биомассы модельных ассоциаций и монокультур фототрофных организмов осуществляли смесью хлороформ:метанол (Соловченко и др., 2001). Изучение пигментов проводили в хлороформной фазе на спектрофотометре Hitachi 150-20 с интегрирующей сферой (Merzlyak, 2000).



Фенольные соединения определяли спектрофотометрически в экстрактах (водно-метанольная фаза) на спектрофотометре Hitachi 150-20 (Marcham, 1989).

Восстанавливающие сахара в питательных средах определяли с антроновым реактивом (Методы химии углеводов, 1971).

Целлюлозолитическую активность монокультур симбионтов и модельных ассоциаций определяли с карбоксиметилцеллюлозой – КМЦ (Вассер и др., 1981)

Определение антимикробной активности проводили на базе НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАМН двумя методами: из культуральной жидкости и из метаноловых экстрактов концентрата культуральной жидкости. Тест-объектами служили 10 культур микроорганизмов (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 (=RIA 445), *Bacillus pumilis* NCTC 8241, *Micrococcus luteus* NCTC 8340, *Staphylococcus aureus* FDA 209P (MSSA), *S. aureus* INA 00761 (MRSA), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Comamonas terrigena* ВКПМ-7571 =ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Aspergillus niger* INA 00760, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259).

Статистическая обработка. Результаты морфометрических измерений подвергались статистической обработке в пакете программ Statistica 5.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **Глава 3. Особенности распределения ассоциативных микроорганизмов в талломе интактных лишайников.**

Методом сканирующей электронной микроскопии установлено, что ассоциативные микроорганизмы в талломе лишайников *Nephroma arcticum* с внутриталломными цефалодиями и *Peltigera aphthosa* с поверхностными цефалодиями, в основном, находятся на поверхности верхней и нижней коры (рис. 2). Во внутренних частях слоевища микроорганизмы не выявлены (рис. 3).

В апикальных частях талломов изученных лишайников бактерии распределяются на поверхности достаточно равномерно, тогда как в медиальной и базальной зонах – в виде микроколоний частично или полностью погруженных в гомогенный поверхностный матрикс.

При помещении нестерилизованных фрагментов талломов (эксплантов) разных видов лишайников на твердые питательные среды СА, СЧ, MS, R наблюдалась 100% их контаминация различными группами микроорганизмов. Наибольшая контаминация эксплантов микроорганизмами была характерна для поверхностных цефалодий (включающих циано- и микобионт) и гомогенатов талломов (содержащих фото- и микобионт), а наименьшая – для изидий (фико- и микобионт) и апотечий (микобионт).

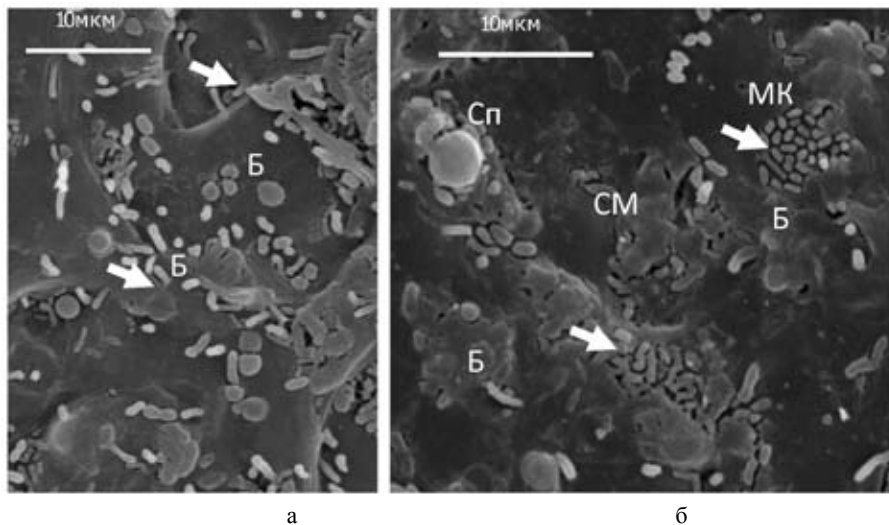


Рис. 2. Особенности поверхности лишайника *P. apthosa* в апикальной (а) и медиальной (б) частях таллома. Б — бактерии различных морфологических групп, МК — микроколони (микроразноличный рост колоний сопутствующих микроорганизмов), СМ — слизистый матрикс. Стрелками указаны места погружения ассоциативных бактерий в слизистый матрикс.

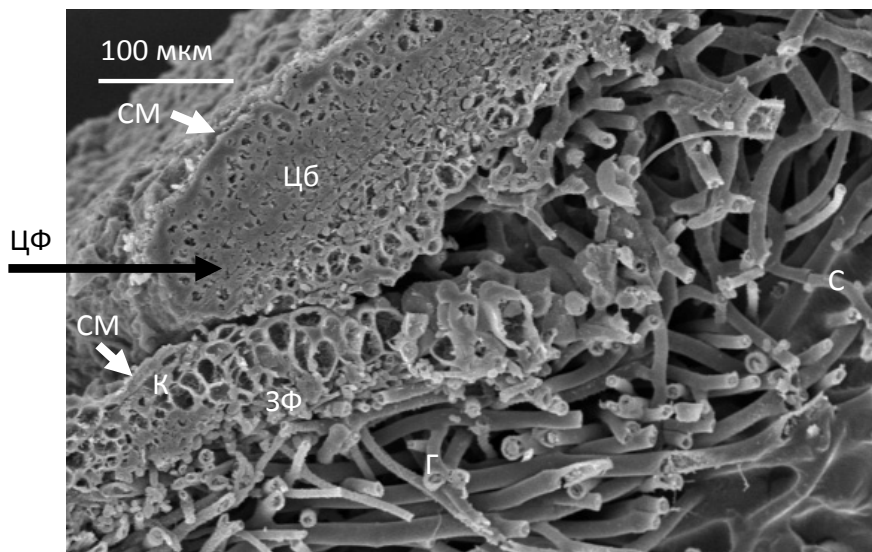
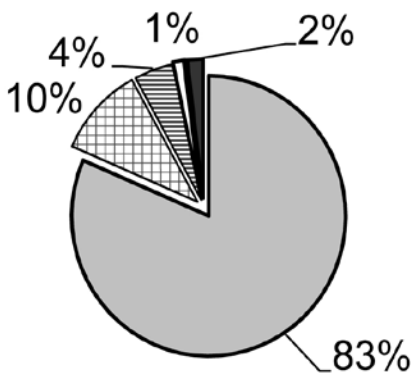
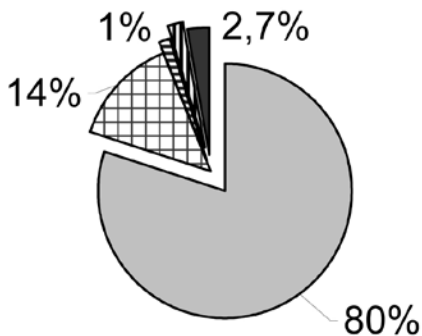


Рис. 3. Фрагмент среза медиальной части таллома лишайника *P. apthosa* (ЦФ — цефалодий, К — коровый слой, ЗФ — зона фикобионта, С — сердцевина, Г — гифы микобионта, СМ — слизистый матрикс, ЦБ — цианобактерии).



□ дейтеромицеты  
 ▨ аскомицеты  
 ▤ зигомицеты

а



□ базидиомицеты  
 ▨ актиномицеты  
 ■ бактерии

б

Рис. 4. Соотношение различных групп сопутствующих микроорганизмов в талломах лишайников *Cetraria islandica* (а) и *P. aphthosa* (б).

Минимальная относительная контаминация микроорганизмами фрагментов таллома среди изученных видов лишайников была у двухкомпонентных (фикобионт – зеленая водоросль), а максимальная у трехкомпонентных лишайников. Эпифитные лишайники были менее подвержены контаминации, чем эпилитные и эпигейные виды. Кустистые формы контаминировались меньше, чем листоватые, а листоватые меньше, чем накипные.

Преобладающей группой сопутствующих организмов как у двухкомпонентных (фикобионт – зеленая водоросль, рис. 4а), так и трехкомпонентных (рис. 4б) лишайников были дейтеромицеты. Среди бактерий доминировали окрашенные грамположительные формы, по совокупности признаков определенные (совместно с Т. Г. Добровольской, ф-т почвоведения МГУ, каф. Биологии почв) как представители рода *Rhodococcus*.

#### Глава 4. Отработка методов стерилизации эксплантов лишайников.

Основная часть микроорганизмов, выделяемых из талломов нестерилизованных лишайников, — это несовершенные и сумчатые грибы, доля бактериального заражения относительно невелика (рис. 4), поэтому применение фунгицидных антибиотиков не эффективно вследствие воздействия на микобионты, которые также принадлежат к аскомицетам.

Последовательная обработка фрагментов талломов лишайников разных видов 70% этанолом в течение 5 минут и перекисью водорода различных концентраций (3 – 35%) в течение 15 – 30 минут позволяла снизить контаминацию эксплантов микроорганизмами

некоторых видов лишайников в 5 раз. Процент контаминации образцов микроорганизмами убывал линейно при увеличении времени обработки (рис. 5).

Аналогичные результаты можно было получить, используя в качестве стерилизующего агента перекись водорода возрастающей концентрации. Более того, процент контаминации образцов микроорганизмами при этом убывал по гиперболе, а потому данный

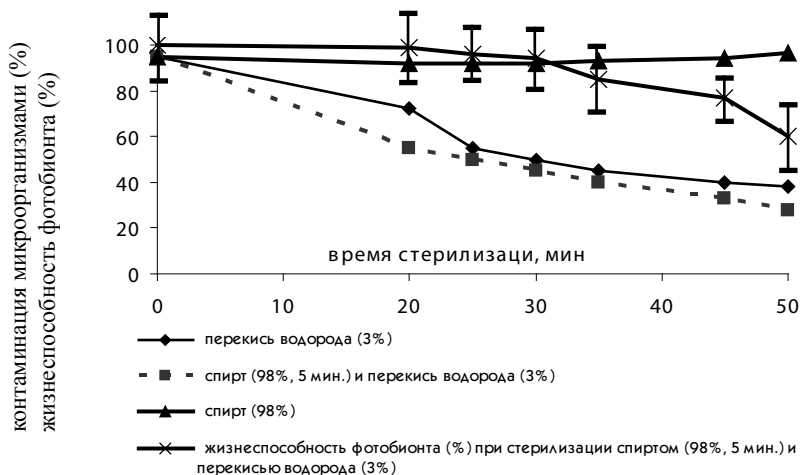


Рис. 5. Эффективность стерилизации фрагментов таллома лишайника *C. islandica*.

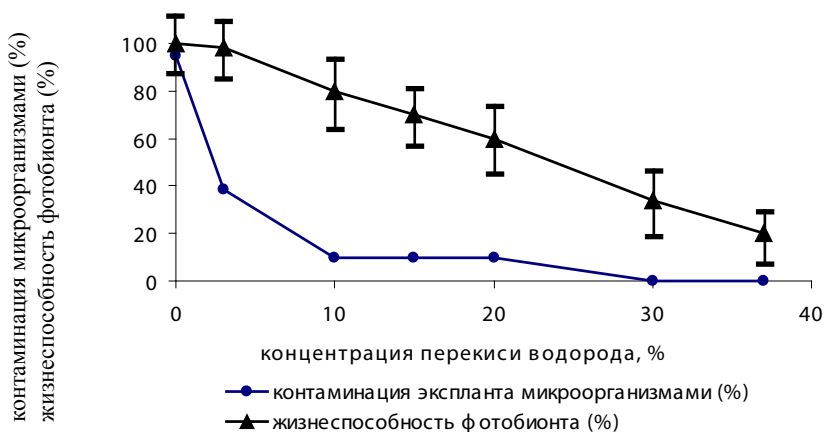


Рис. 6. Влияние концентрации перекиси водорода на эффективность стерилизации фрагментов таллома лишайника *C. islandica* (время обработки 20 минут).

путь представлялся более эффективным по сравнению с увеличением времени воздействия агента (рис. 6). Жизнеспособность симбионтов контролировали по автофлуоресценции хлорофилла у фикобионта и по сохранению целостности гиф и ядер у микобионта при выбранном режиме стерилизации.

Стерилизация фрагментов таллома *P. aphthosa* биглюконатом хлоргексидина в течение 5 – 15 минут не давала положительных результатов: процент контаминированных ассоциативными микроорганизмами эксплантов на СЧ был 100%. Увеличение времени стерилизации (до 20 – 40 мин.) снижало контаминацию эксплантов *C. islandica* до 80 – 94 %. Оптимальные результаты были получены при комплексной обработке образцов биглюконатом хлоргексидина с этанолом: при одновременном воздействии агентов на фрагменты таллома *C. islandica* в течение 20 минут контаминация снижалась до 75%, а при последовательном (5 минут этанолом, а потом 15 минут биглюконатом хлоргексидина) — до 55%.

Попытки использования в качестве стерилизующих агентов лишайникового вещества – усниновой кислоты, которая обладает выраженным антибактериальным действием, показали, что во всех случаях (апикальные и базальные участки) фрагменты таллома *C. islandica*, обработанные усниновой кислотой (концентрация 100 мкг/мл, время обработки – 20 мин.), поражались сильнее, чем образцы без обработки, что проявлялось в усиленном развитии микромицетов. Основными сопутствующими микромицетами во всех образцах были грибы рода *Trichoderma*. Большинство микобионтов лишайников относится к аскомицетам (рис. 4), возможно поэтому преобладающей группой ассоциативных микроорганизмов в составе лишайников и являются аскомицеты.

Помимо бактерицидного действия усниновая кислота в лишайниках регулирует отношения между мико- и фикобионтом, существенно изменяющем физиологию последнего (Вайнштейн и др., 1991). Воздействие усниновой кислоты выбранной концентрации на полученную монокультуру фотобионта *Trebouxia* s. f. *cladonii* приводило к ее постепенному обесцвечиванию, связанному с уменьшением числа жизнеспособных клеток водоросли. Таким образом, усниновая кислота, с одной стороны, не подавляла роста сопутствующих микромицетов, а, с другой, угнетала рост монокультуры изолятов *Trebouxia* s. f. *cladonii*. Это позволило предположить, что использование лишайниковых веществ в качестве стерилизующего агента не эффективно.

## **Глава 5. Выделение и культивирование симбионтов лишайника.**

Проведено сравнение двух подходов по выделению микобионта из таллома лишайников *Lecanora symmicta*, *Xanthoria parietina*, *Physcia stellaris*, *Nephroma arcticum*, *Cetraria islandica* и *Peltigera aphthosa*: 1) из апотечий *Lecanora symmicta*, *Xanthoria parietina*, *Physcia stellaris*, *Nephroma arcticum*, *Cetraria islandica* на агаризованную среду (ГА, СА, MS) в чашки Петри (по стандартной методике В. Ахмаджана (Ahmadjian, 1973)) и 2) ме-

тодом талломного обростания (*Cetraria islandica* и *Peltigera aphthosa*) в жидких средах BG 11, «С» (Stocker-Worgotter, Turk, 1989; Yoshimura, Yamamoto, 1991; Yoshimura et al., 1993; Yamamoto et al., 1993). Несмотря на многочисленные попытки, использование выбранных методов не позволило получить монокультуры микобионтов указанных видов лишайников.

Используя метод талломного обростания, удалось выделить фикобионты из лишайников *C. coniocraea*, *C. islandica*, *P. aphthosa* и *N. arcticum*, которые по совокупности признаков (морфологических – особенности строения клеток и физиологических – набор пигментов, а также по видовой принадлежности лишайника, из которого выделен фикобионт) относятся к *Trebouxia* с. f. *cladonii* — из *C. coniocraea* и *Coccomyxa* с. f. *peltegerinae* — из *P. aphthosa* и *N. arcticum*. Кроме того, из *P. aphthosa* получено 4 штамма цианобионтов — трихонных гетероцистобразующих цианобактерий, которые по совокупности морфологических и физиологических признаков можно отнести к роду *Nostoc*.

При помещении фрагментов талломов различных видов лишайников на питательные среды Чапека, BG-11, BG<sub>1/2</sub>-11, BG<sub>0</sub>-11, MS первичный рост циано- и фикобионтов не наблюдали в течении 2 месяцев. Т. е. как для про-, так и для эукариотных фотобионтов характерен длительный период адаптации к апосимбиотическому росту. Оптимальной средой для выделения и культивирования фикобионтов являлась среда BG<sub>1/2</sub>-11.

Кондиционирование сред культивирования фикобионтов метаболитами выделенных ассоциативных бактерий стимулировало рост фикобионтов лишайников, сокращало лаг-фазу роста и делало возможным их рост на безазотных средах (BG<sub>0</sub>-11).



Рис. 7. Культивирование *Trebouxia* с. f. *cladonii* в жидкой среде («С») с КСМ.

А — опыт, Б — контроль. 4 мес. культивирования.

Интенсивный рост изолятов водорослей отмечен на полужидких средах, содержащих 0,5% – 0,7% агара. Жидкие, а также твердые среды с высоким содержанием агара были неблагоприятны для роста полученных культур фотобионтов. Известно, что фотобионт в со-

ставе таллома лишайника иммобилизован в гифах микобионта и межклеточном матриксе. Перенесение фотобионтов в жидкую среду с фрагментами агаризованной среды приводило к активизации их роста. В таких условиях уже на 2 – 10 сутки наблюдалось окрашивание бесцветных фрагментов агаризованной среды в зеленый цвет.

Для подтверждения данного предположения в культуральные среды в качестве иммобилизирующего субстрата добавляли клеточно-структурированный материал (КСМ) *Lemna minuscula* L. Скорость роста изолятов фикобионтов, оцененная по числу клеток, в данных условиях увеличивалась по сравнению с контролем в 14 раз (рис. 7).

Используя отработанные методы стерилизации фрагментов талломов лишайников и подобранные условия выделения и культивирования фотобионтов, удалось создать коллекцию альгологически чистых культур фико- и цианобионтов из 8 штаммов.

## Глава 6. Создание модельных ассоциаций на основе свободноживущих базидиальных грибов и фототрофных микроорганизмов.

В наших экспериментах создание модельных ассоциаций проводили на полужидких агаризованных средах (с пониженным содержанием агара — 0,7%), что отличается от использованных ранее методов экспериментальной лихенологии в школах Ахмаджана (Ahmadjian, 1993), Галун (Galun, 1986) и Ямамото (Yamamoto et al., 1993).

Синтез модельных ассоциаций лучше всего проходил на обедненных по азоту средах (BG<sup>1/4</sup>-11, СЧ<sup>1/4</sup>, ГА) и на СА, после продолжительного (от 2 до 4 недель) прекультивирования грибного компонента.

Табл. 2. Характер взаимодействия базидиальных грибов и цианобактерии *Anabaena variabilis* ATCC 29413 в смешанных культурах.

потенциальный фотобионт	потенциальный микобионт				
	<i>Pleurotus ostreatus</i> (все штаммы)	<i>Pleurotus djamor</i>	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	<i>Agaricus bisporus</i> (все штаммы)
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	+++	+ / 0	0 / 0	- / --	-- / --

- / -- — слева от косой черты указано воздействие на грибной компонент, справа – на фототрофный компонент
- — сильное негативное воздействие (лизис культуры)
- — слабое негативное воздействие (угнетение роста)
- 0 — отсутствие влияния
- + — слабое положительное воздействие (индукция роста)
- ++ — сильное положительное воздействие (индукция образования плодовых тел, примордиев и др.)

В модельных системах базидиальных грибов и фототрофных микроорганизмов рост и взаимодействие партнеров в парах видо- и штаммоспецифичны (табл. 2). Показано, что в смешанных культурах грибов *A. bisporus* и *P. citrino-pileatus* и азотфиксирующей цианобактерии *A. variabilis* ATCC 29413 на жидкой и твердых средах формирования ассоциации не происходило, так как рост обоих партнеров отсутствовал (табл. 2).

Табл. 3. Штаммоспецифическое взаимодействие грибов *Pleurotus* spp. с различными видами фотобионтов в модельных ассоциациях.

микобионт	штамм	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	<i>Nostoc</i> sp. CALU 526	<i>Trebouxia</i> с. f. <i>cladonii</i>	<i>Trebouxia</i> sp. (из <i>C. islandica</i> )	<i>Coccomyxa</i> с. f. <i>peltegerina</i>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	НК-35	Препятствует лизису гриба, индукция плодобразования гриба	Препятствует лизису гриба	Взаимная индукция роста	1. индукция плодобразования гриба; 2. появление антибиотической активности в экстрактах КЖ; 3. изменение спектра биохимической продукции; 4. усиление целлюлолитической активности ассоциации	Препятствует лизису гриба
	тканевые изоляты	Взаимная индукция роста			Взаимная индукция роста	
	споровые изоляты					
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	тканевые изоляты	Препятствует лизису гриба	Не проводилось	Не проводилось	Индукция плодобразования гриба	

В течении 10 дней после начала совместного культивирования наблюдалась постепенная деградация, как мико-, так и фотобионта: нити цианобактерий укорачивались, а их клетки обесцвечивались. В экстрактах из клеток цианобактерий по спектрам поглощения наблюдали возрастание доли каротиноидов и уменьшение содержания хлорофиллов и фикобилинов, что свидетельствует о деградации их фотосинтетического аппарата (Merzlyak, 2000). На агаризованных средах в местах контакта партнеров наблюдали лизис грибного компонента и деградацию клеток цианобактерий.

В смешанных культурах разных штаммов *P. ostreatus* с *A. variabilis* ATCC 29413 на жидких (BG<sup>1/4</sup>-11) и твердых (СА, ГА) средах цианобактерии сохраняли свою жизнеспособность, и наблюдалась взаимная стимуляция роста партнеров, которая носила штаммоспецифический характер (табл. 2, 3).



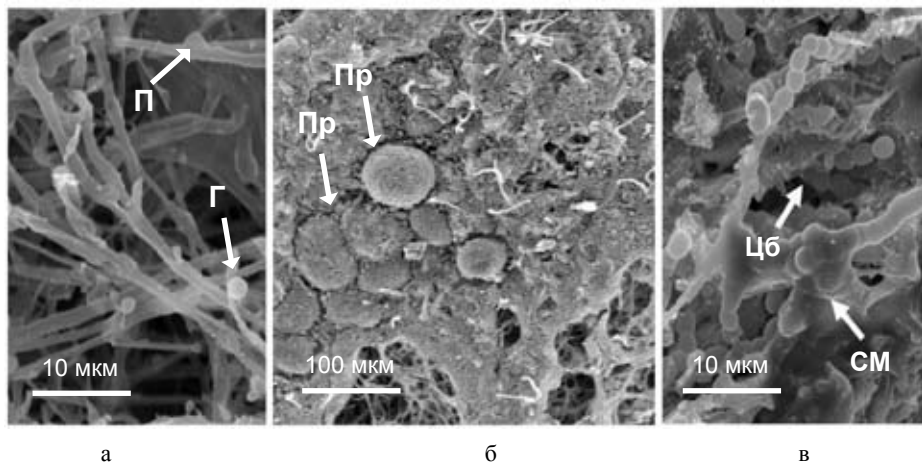


Рис. 8. Фрагменты модельной ассоциации *Pleurotus ostreatus* НК-35 — *Anabaena variabilis*: а – начальная стадия развития ассоциации (заметны пряжки (П) и головчатые выросты (Г)), б – формирование примордий (Пр) в зоне контакта, в – формирование слизистого матрикса (стрелками показаны клетки цианобактерий (Цб), заключенные в слизистый матрикс (СМ)).

При изучении модельной ассоциации *P. ostreatus* шт. НК-35 и *A. variabilis* в сканирующем электронном микроскопе в зонах роста монокультур партнеров каждый из компонентов сохранял особенности, свойственные монокультурам: на клетках толстого мицелия *P. ostreatus* выявлялись пряжки и головчатые выросты, отмечено формирование тонкого мицелия (рис. 8а). Цианобактерия *A. variabilis* представлена длинными нитями, в которых выявлялись гетероцисты.

В местах смешанного роста партнеров отмечено интенсивное образование слизистого матрикса и изменение морфологии партнеров. Укороченные трихомы цианобактерий наблюдались не только на поверхности мицелия, но и внутри скоплений гиф гриба (рис. 8в). Размеры клеток цианобактерий значительно увеличивались. В местах контакта гиф гриба с клетками цианобактерий гифы уплощались, отсутствовало образование на клетках толстого мицелия головчатых выростов. В местах роста культур и контакта клеток обоих партнеров у гриба образовывались светлые вертикальные приподнимающиеся над поверхностью субстрата гифы. У основания этих гиф обнаруживались клетки и укороченные трихомы цианобактерий. В зонах смешанного роста *P. ostreatus* и *A. variabilis* установлено формирование примордиев (рис. 8б). Следует отметить, что цианобактерии всегда располагались в центре формирующихся примордий и/или у их основания.

В смешанных культурах *Trebouxia* sp. (выделенной из *C. islandica*) с *P. ostreatus* и *P. pulmonarius* на среде СА (концентрация суслу 50 г/л) было отмечено увеличение числа образующихся у грибов примордий в 2 и 3 раза, соответственно.

Для изучения физиолого-биохимических особенностей взаимодействия партнеров в модельных ассоциациях проводили диализное сокультивирование *P. ostreatus* НК-35 — *Trebouxia* sp. В полученной системе при отсутствии прямого контакта между клетками партнеров и обмена низкомолекулярными экзометаболитами наблюдали изменение размеров клеток обоих партнеров фикобионта *Trebouxia* sp. (выделенного из *C. islandica*) и гриба *P. ostreatus* НК-35: клетки микроводоросли становились более вытянутыми (около 6×4 мкм, а в контроле 5×5,5 мкм), а средний диаметр гиф – толще. Изменение размеров клеток наблюдали как у *Trebouxia* (выделенных из *C. islandica* и *C. coniocraea*), так и у *Coccomyxa* s. f. *peltigerinae* в системах с различными видами грибов (*P. ostreatus*, *P. pulmonarius*) на разных средах (СА, BG-11, ГА).

В модельной ассоциации *P. ostreatus* НК-35 — *Trebouxia* sp. (выделенной из *C. islandica*) при диализном сокультивировании отмечено изменение спектров антибиотической активности экстрактов из культуральной жидкости. Культуральная жидкость (КЖ) из монокультур тробуксии и вешенки и экстракты из нее не проявляли антибиотической активности. Экстракты из КЖ диализной культуры после двух недель сокультивирования также не проявляли антибиотическую активность. В экстрактах КЖ из трехнедельного диализного сокультивирования была выявлена антибиотическая активность против тест-культуры *Micrococcus luteus*.

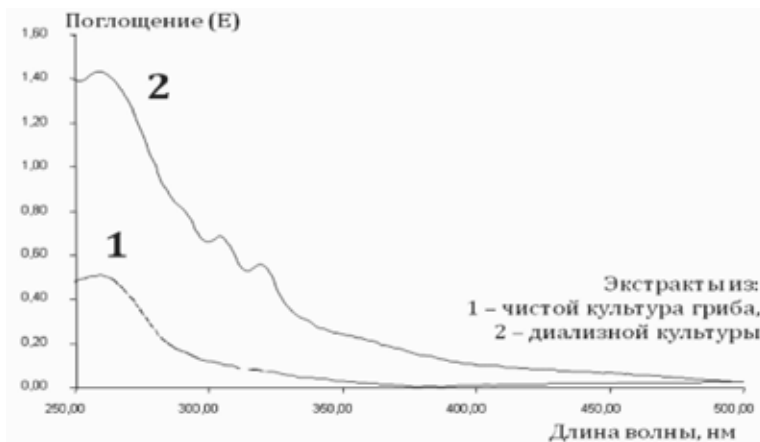


Рис. 10. Спектры-поглощения водно-метанольной фазы экстрактов по Фолчу из монокультуры *Pleurotus ostreatus* НК-35 и диализной культуры модельной ассоциации *Pleurotus ostreatus* НК-35 – *Trebouxia* sp.

На спектрах поглощения водно-метанольной фазы экстрактов по Фолчу (Соловченко и др., 2001) биомассы 4-недельной диализной культуры модельной ассоциации *P. ostreatus* НК-35 – *Trebouxia* sp. (выделенной из *C. islandica*) присутствовали полосы поглощения при ~280, 310, 330 нм, которые могут быть предположительно отнесены на счет феноль-

ных соединений, скорее всего фенольных кислот и фенилпропаноидов (Markham, 1989; Dixon, Paiva, 1995). В спектрах экстрактов монокультуры *P. ostreatus* НК-35 присутствовала только 1 полоса с максимумом поглощения при 280 нм, амплитуда которой была в 3 раза ниже, чем в модельной ассоциации (рис. 10).

Сравнение целлюлозолитической активности модельной ассоциации и монокультур *Trebouxia* sp. и *P. ostreatus* НК-35 показало, что ЦА в модельной ассоциации была в 1,5 раза выше, чем в монокультурах (в монокультуре гриба –  $37,8 \pm 12,2$  мм, в модельной ассоциации –  $54,2 \pm 5,8$  мм).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ литературных данных позволил выделить 2 группы экспериментальных подходов в лихенологии – реконструирование и культивирование лишайников (рис. 1). Проблемой каждого подхода является высокая контаминация «эксплантов» лишайников сопутствующими микроорганизмами.

В нашей работе методом сканирующей электронной микроскопии установлено, что ассоциативные микроорганизмы в талломах изученных видов лишайников *Nephroma arcticum* и *Peltigera aphthosa* находятся, в основном, на поверхности верхней и нижней коры в слизистом матриксе, в виде микроколоний. Во внутренних частях слоевища микроорганизмы не выявлены. При помещении нестерилизованных фрагментов талломов разных видов лишайников на твердые питательные среды наблюдали 100% контаминацию эксплантов различными микроорганизмами. Нами проведен анализ величины контаминации микроорганизмами талломов лишайников разных экологических групп, морфологических типов, состоящих из двух или трех доминантных компонентов. Для разных экологических групп можно выстроить следующий ряд в сторону уменьшения контаминации: эпилиты > эпигеоиды > эпифиты; для разных морфотипов: накипные > листоватые > кустистые. Минимальная контаминация микроорганизмами фрагментов таллома была у двухкомпонентных, а максимальная у трехкомпонентных лишайников. Наибольшая контаминация была характерна для наружных цефалодий и гомогенатов талломов, а наименьшая – для изидий и апотеций. Установлено, что преобладающей группой сопутствующих организмов как двухкомпонентных, так и трехкомпонентных лишайников были дейтеромицеты.

Решением проблемы контаминации микроорганизмами фрагментов талломов лишайников может стать их поверхностная стерилизация. Последовательная обработка фрагментов талломов лишайников разных видов 70% этанолом в течение 5 минут и перекисью водорода различных концентраций (3 – 35 %) в течение 15 – 30 минут позволяет снизить контаминацию эксплантов микроорганизмами в 5 раз. Аналогичные результаты можно было получить, используя в качестве стерилизующего агента перекись водорода 20% и более высокой кон-

центрации при меньшем времени обработки, поэтому данный путь представлялся более эффективным по сравнению с увеличением времени воздействия агентов. Указанные условия стерилизации обеспечивают сохранение жизнеспособности симбионтов лишайника.

Попытки использования в качестве стерилизующих агентов лишайниковых веществ оказались не эффективными. Ассоциативные микроорганизмы лишайников не восприимчивы к их действию.

Используя предварительную поверхностную стерилизацию и метод талломного обрастания, удалось выделить фикобионты из лишайников *C. coniocraea*, *C. islandica*, *P. aphthosa* и *N. arcticum* (2 штамма *Trebouxia sp.* и 2 штамма *Coccomyxa sp.*) и 4 штамма цианобионтов (*Nostoc spp.* из *P. aphthosa*). Кондиционирование сред культивирования фикобионтов метаболитами выделенных ассоциативных бактерий рода *Rhodococcus* стимулировало рост фикобионтов лишайников, сокращало лаг-фазу роста и делало возможным их развитие на безазотных средах (BG<sub>0</sub>-11). Интенсивный рост изолятов фотобионтов отмечен на полужидких средах, содержащих 0,5% – 0,7% агара, а также в жидких средах с добавлением клеточно-структурированного материала из растений *L. minuscula*.

В наших экспериментах впервые для создания модельных ассоциаций были использованы полужидкие агаризованные среды. Используемые нами варианты сред обладают рядом преимуществ: позволяют долго сохранять влажность и создавать периодические циклы увлажнения/осушения и обеспечивают возможность создания неоптимальных условий роста для каждого из партнеров, что является одним из важнейших условий ассоциативного роста (Емцев, Чумаков, 1988; Корженевская, 1991).

В полученных модельных системах на основе базидиальных грибов и фототрофных микроорганизмов рост и взаимодействие партнеров в парах видо- и штаммоспецифичны. В смешанных культурах разных штаммов *P. ostreatus* с *A. variabilis* ATCC 29413 на жидких и твердых средах цианобактерии сохраняли свою жизнеспособность, наблюдалась взаимная стимуляция роста партнеров, которая носила штаммоспецифический характер, проявлявшийся в индукции взаимного роста, стимуляции плодообразования у грибного компонента и препятствии возрастному лизису гриба.

В модельных ассоциациях базидиальных грибов и фототрофных микроорганизмов обнаружено появление антибиотической активности экстрактов из культуральной жидкости, увеличение целлюлозолитической активности смешанных культур, увеличение числа примордий и плодовых тел гриба по сравнению с контролем. В модельной ассоциации *P. ostreatus* НК-35 — *Trebouxia sp.* (выделенной из *C. islandica*) отмечено изменение спектра биохимической продукции предположительно фенольной природы, возможно, обусловленное синтезом фенольных кислот и фенилпропаноидов.

## ВЫВОДЫ

1. Изучены особенности морфоструктурной организации трехкомпонентных лишайников *Nephroma arcticum* и *Peltigera aphthosa*. Установлено, что ассоциативные микроорганизмы располагаются в поверхностном матриксе верхней и нижней коры таллома в виде микроколоний. Во внутренних частях слоевища ассоциативные микроорганизмы не обнаружены.

2. Предложенные методы стерилизации талломов лишайников позволяют снизить процент контаминации «эксплантов» микроорганизмами. Смешанный вариант обработки (этиловым спиртом в течение 5 минут, затем 30% перекисью водорода или хлоргексидином в течение 20 – 30 минут) является оптимальным для изученных видов лишайников. Использование лишайниковых веществ (усниновой кислоты) в качестве стерилизующих агентов не является эффективным.

3. Отработаны методы выделения фотобионтов из талломов лишайников, и создана их коллекция, насчитывающая 8 штаммов. Селективной средой для выделения и культивирования фотобионтов лишайников является полужидкая модифицированная среда BG<sup>1/2</sup>-11.

4. Установлено, что в полученных модельных ассоциациях базидиальных грибов и фототрофных микроорганизмов взаимодействие партнеров в парах видо- и штаммоспецифично. Для ряда сочетаний партнеров в парах отмечено положительное взаимовлияние: индукция роста, увеличение плодообразования у грибного компонента, замедление возрастного лизиса гриба.

5. В модельных ассоциациях базидиальных грибов и фототрофных микроорганизмов отмечен синтез новых видоспецифических продуктов.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

#### Статьи в реферируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикации соискателей ученой степени кандидата наук

1. Лобакова Е. С., Смирнов И. А., 2008. Экспериментальная лишайнология // Журнал общей биологии. Т. 69, №5. С. 364 – 378.

#### Патенты и изобретения

2. Лобакова Е. С., Смирнов И. А., 2008. Метод стерилизации эксплантов лишайника исландский мох (*Cetraria islandica*). Рег. номер. заявки 2008111282/13(012197) от 26.03.2008

## В статьях, опубликованных в материалах международных конференций

3. Смирнов И. А., Лобакова Е. С., 2006а. Способы стерилизации талломов лишайников // Вопросы общей ботаники: традиции и перспективы. Матер. Междунар. науч. конф., посвященной 200-летию Казанской ботан. шк. Казань: Графити-групп. С. 220 – 222.
4. Смирнов И. А., Лобакова Е. С., 2006б. Эффективность действия стерилизующих агентов на ассоциативные микроорганизмы лишайников // Грибы и водоросли в биоценозах — 2006: Матер. Междунар. науч. конф., посвященной 75-летию Биол. ф-та МГУ им. М. В. Ломоносова. М.: МАКС Пресс. С. 149 – 150.
5. Lobakova E. S., Smirnov I. A., 2007. Synthesis of the model associations on the base of agaricoid basidiomycetes and cyanobacteria // Abstracts of the XV Congress of European Mycologists. St Petersburg: TREEART LLC. P. 231.

## Прочие публикации

6. Смирнов И. А., Лобакова Е. С., 2004. «Культуры тканей» лишайников. Тезисы 8 молодежной конференции ботаников в Санкт-Петербурге. С. 121 – 122.
7. Смирнов И. А., 2006. Комплексы микромицетов, ассоциированные с лишайником *Cetraria islandica* // Тез. докл. XIII Междунар. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2006». Секция Биология. М.: МАКС пресс. С. 211.
8. Смирнов И. А., Лобакова Е. С., 2007. Особенности культивирования фотобионтов лишайников // Материалы всероссийской конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты исследования симбиотических систем». Саратов: Научная книга. С. 32.
9. Смирнов И. А., Лобакова Е. С., 2008. Морфофизиологическая характеристика смешанной культуры *Pleurotus ostreatus* и азотофиксирующей цианобактерии *Anabaena variabilis* // Матер. юбилейной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения М. В. Горленко «Высшие базидиальные грибы: индивидуумы, популяции, сообщества». М.: Восток-Запад. С. 198 – 199.
10. Савельева Д. Н., Смирнов И. А., 2008. Культивирование съедобных грибов *Pleurotus spp.* совместно с дрожжами и цианобактериями // Перспективы развития инноваций в биологии: Материалы II Научно-практической конференции в рамках Третьего Фестиваля науки в городе Москве и Биотехнологической выставки-ярмарки «РосБиоТех-2008». М.: Инноватика. С. 80 – 83.

Подписано в печать 09.02.2010  
Заказ № 02-2010  
Тираж 100 экз. Усл. печ. л. – 1,25  
Печать трафаретная  
Издательство «Экопресс»

