

Муниципальное автономное образовательное учреждение  
«Лицей народной дипломатии» г. Сыктывкара

Республика Коми

**Оценка жизнеспособности цианобактерии *Nostoc commune*  
после длительного периода дегидратации с целью выявления  
перспективных штаммов для использования в биотехнологии**

Автор:

**Богдан Арсений Вячеславович,**  
учащийся 10 класса

Руководители:

**Новаковская Ирина Николаевна,**  
к.б.н., научный сотрудник  
Института биологии  
Коми НЦ УрО РАН

**Константинова Татьяна Петровна,**  
педагог-организатор

Сыктывкар, 2020

## Оглавление

	стр.
Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературных источников.....	5
1.1. Значение цианобактерий как биотехнологических объектов.....	5
1.2. Характеристика вида <i>Nostoc commune</i> .....	5
Глава 2. Материалы и методы.....	6
2.1. Методы культивирования цианобактерии.....	6
2.2. Методы оценки жизнеспособности цианобактерии <i>N. commune</i> ..	7
Глава 3. Результаты исследований и обсуждение.....	8
Выводы.....	10
Заключение.....	10
Список использованных источников.....	11

## Введение

Цианобактерии – прокариотические организмы, обладающие свойствами растительных и бактериальных клеток, способные к фотосинтезу и фиксации молекулярного азота, благодаря чему они играют важную роль в круговороте органических веществ и эволюции биосферы. Способность переносить неблагоприятные условия и возможность синтезировать широкий спектр БАВ определяет перспективность использования этих микроорганизмов как объектов для биотехнологических исследований (Минюк и др., 2008; Егорова, Болдина, 2017).

Цианобактерии рассматривают как перспективные организмы, которые могут быть использованы для производства удобрений и биотоплива (<https://ru.wikipedia.org/wiki>), для очистки сточных вод, для освоения антропогенно нарушенных субстратов и повышения урожайности эродированных почв.

В научной литературе широко обсуждается возможность использования цианобактерий для заселения космических объектов и формирования на них начальной биосферы (Кабиров, 2010; Григорян, Казакова, 2017). Многие цианобактерии способны вырабатывать питательные вещества и кислород в составе биорегенеративных систем жизнеобеспечения для длительных космических полетов и колонизации Марса (Кабиров, 2010; Sherman, 2020). В настоящее время активно ведется поиск видов цианобактерий, способных переносить в течение длительного времени экстремальные или неблагоприятные условия (<http://fb.ru/article/240293/vodorosli>).

В нашей работе мы исследовали способность переносить длительное высушивание цианобактерией *Nostoc commune* – вида, обитающего в арктических и высокогорных экосистемах, образующего массовые разрастания, активного азотфиксатора и доминанта сообществ. Вид способен переносить экстремальные температуры, высокую солнечную радиацию и длительное обезвоживание, поэтому является перспективным как биотехнологический объект. Подбор штаммов, наиболее устойчивых и перспективных для использования в качестве биотехнологического объекта, делает нашу работу **актуальной**.

**Цель работы:** изучение восстановления жизнеспособности образцов цианобактерии *Nostoc commune* из коллекции живых культур водорослей Института биологии Коми НЦ УрО РАН (СΥКОА) и Ботанического института РАН (БИН) после длительного периода дегидратации и выявление наиболее перспективных штаммов для использования в качестве биотехнологических объектов.

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

- изучить использование цианобактерий как биотехнологических объектов, в частности, перспективы использования цианобактерии вида *N. commune*;
- освоить метод культивирования цианобактерий (вида *N. commune*);

- исследовать особенности восстановления жизнедеятельности образцов *N. commune*, хранящихся в сухом виде в течение длительного времени;
- провести скрининг образцов *N. commune*, устойчивых к условиям длительной дегидратации, и выявить наиболее перспективные штаммы для использования в качестве биотехнологических объектов.

**Гипотеза:** исследуемые образцы вида *N. commune* способны восстанавливать жизнедеятельность после длительного периода дегидратации, и могут в перспективе быть использованы в качестве биотехнологических объектов перспективных для космических миссий по освоению новых планет.

## ГЛАВА 1. Обзор литературных источников

### 1.1. Значение цианобактерий как биотехнологических объектов

Цианобактерии обладают полноценным фотосинтетическим аппаратом, характерным для кислородовыделяющих фотосинтетиков. При определенных условиях они могут в качестве энергетических субстратов использовать не только воду, но и соединения серы, и органические соединения преимущественно для переживания неблагоприятных условий ([ru.wikipedia.org/wiki/Цианобактерии](http://ru.wikipedia.org/wiki/Цианобактерии)).

Цианобактерии, по общепринятой версии, явились «творцами» современной кислородсодержащей атмосферы на Земле, что, в свою очередь, привело к последующей перестройке биосферы. Эти организмы способны преобразовывать запасенную энергию в конкретные виды биотоплива:  $H_2$ , липиды и алканы. В настоящее время цианобактерии служат важнейшими модельными объектами исследований в биологии.

### 1.2. Характеристика вида *Nostoc commune*

Колониальная цианобактерия *Nostoc commune* относится к классу *Cyanophyceae* (Guiry & Guiry, 2020). Род *Nostoc* включает 18 видов: *N. azollae*, *N. caeruleum*, *N. carneum*, *N. comminutum*, *N. commune* и другие.

*N. commune* образуют колонии с крепким перидермом, по мере роста сначала шаровидные, затем имеют вид плоско-распростёртых слоевищ, до нескольких десятков сантиметров в поперечнике, складчатые или волнистые, тёмной, иногда почти чёрной окраски (рис. 1). Нити тесно переплетающиеся, 4-6 мкм ширины, бледнооливково-зелёной окраски. Гетероцисты почти шаровидные, около 7 мкм в диаметре. Споры такой же величины, как и вегетативные клетки с гладкой бесцветной оболочкой, очень редкие (Голлербах, Косинская, 1953).



Рис. 1. Колония *N. commune* в природных условиях

Вид является космополитом, обитает от полярных пустынь северного полушария до Антарктики, встречается в высокогорьях всех горных систем мира, а также обитает в сухих степных или полупустынных местах. Встречается на почве, на поверхности каменистых обнажений, на стволах деревьев, образует симбиоз с грибами и папоротниками. Переносит длительное высушивание и высокую солнечную радиацию.

## ГЛАВА 2. Материалы и методы

### 2.1. Методы культивирования цианобактерии

В качестве объектов для экспериментов были взяты высушенные образцы колоний цианобактерии *N. commune*, собранные в разных местах и хранящиеся в коллекции Института биологии Коми НЦ УрО РАН и Ботанического института РАН.

В работе исследовали 10 образцов:

№1 – *N. commune f. crispum*, выделен на территории реки Тай Тонг (США), 11500 футов над уровнем моря, 01.05.1886, из коллекции Ботанического института РАН (БИН).

№2 – *N. commune f. crispum*, выделен на территории Алтай, сырой луг, оз. Богут, хребет Сайлюгем, 30.07.1926, БИН.

№3 – *N. commune f. ulvaceum*, выделен на территории о. Земля Франца-Иосифа, 24.07.1938, БИН.

№4 – *N. commune f. ulvaceum*, выделен на неизвестной территории, 24.07.1938, БИН.

№5 – *N. commune f. ulvaceum*, выделен на территории Памира, биологическая станция, 3800 м над уровнем моря, 06.05.1905, БИН.

№6 – *N. commune*, выделен на территории Дарвазский хребет, р. Зирако, Памир, Таджикистан, 2175 м над уровнем моря, южный склон, луг, 11.07.1966, коллекция Института биологии (СҮКОА).

№7 – *N. commune*, выделен на территории Омская обл, Учхоз, ОСХИ, корковый (содовый) солонец, 29.05.1905, СҮКОА.

№8 – *N. commune f. ulvaceum*, выделен на территории полуостров Югорский Шар, Белый Нос, номер 5, моховые лужи, 05.08.1993, СҮКОА.

№9 *N. commune f. ulvaceum*, выделен на территории о. Новая Земля, м. Меньшикова, лужа моховая, 16.08.1993, СҮКОА.

№10 – *N. commune f. ulvaceum*, выделен на территории Северный Урал, бас. Р. Тельпосиз, на мхах в болоте, 16.07.2018, СҮКОА.

Исследования проводили с 28 октября 2019 года в течение 12 недель: в лабораторных условиях культивировали 10 образцов *N. commune* на твердой питательной среде BG 11 (Семененко, 1991). Посев проб цианобактерий проведен в стерильных условиях ламинарного бокса в чашки Петри. Состав питательной среды и раствор микроэлементов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Состав питательной среды для культивирования цианобактерии *Nostoc commune*

Ингредиенты	g l <sup>-1</sup>	mM
NaNO <sub>3</sub>	1.5	17.65
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0.04	0.18
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.075	0.30
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.036	0.25
Лимонная кислота	0.006	0.03
Цитрат железа(III)-аммония	0.006	0.03
EDTA (Этилендиаминтетрауксусная кислота)	0.001	0.003
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02	0.19
Следы смеси металлов А5+Со	1 мл	
Дистиллированная вода	1 л	

Эксперимент проводили в чашках Петри диаметром 10 сантиметров. Образцы цианобактерии, помещенные в чашки, содержали в течение двенадцати недель при температуре  $t = 20^{\circ}\text{C}$ . Для инициации роста клеток во всех экспериментах использовали люминесцентную лампу Sylvania GRO-Lux F36W/Gro, с плотностью потока фотонов  $35 \text{ мкМоль м}^{-2}\text{с}^{-1}$ . Соотношение периодов свет/темнота составляло 12/12 часов. Еженедельно просматривали под бинокляром в ламинар-боксе чашки Петри с исследуемыми образцами на предмет наличия молодых колоний.

## 2.2. Метод определения молодых колоний

В течение двенадцати недель культивирования еженедельно просматривали образцы *N. commune*, оценивали жизнеспособность клеток и колоний (рис. 2). Жизнеспособность – способность особи сохранять свое существование в меняющихся условиях окружающей среды. Исследование образцов проводили на бинокулярном микроскопе ЛОМО (рис. 3) при увеличении в  $\times 50$ ,  $\times 100$  раз.



Рис. 2. Просмотр чашек Петри с образцами в ламинарном боксе



Рис. 3. Бинокулярный микроскоп ЛОМО

Кроме того, выполнено сравнение размеров клеток и формы выращенных разрастаний с живыми штаммами из коллекции водорослей Института биологии Коми НЦ УрО РАН (рис. 4-6).



Рис. 4-6. Разные штаммы *N. commune*: молодые колонии и клетки

### ГЛАВА 3. Результаты исследований и их обсуждение

На первом этапе эксперимента часть клеток *N. commune* поместили в чашки Петри на твёрдую питательную среду для дальнейшего изучения. После двух недель культивирования осуществлялось определение молодых колоний в образцах при помощи бинокулярного микроскопа ЛОМО.

Еженедельно чашки Петри проверяли на появление молодых нитей *N. commune* (рис. 7-8).

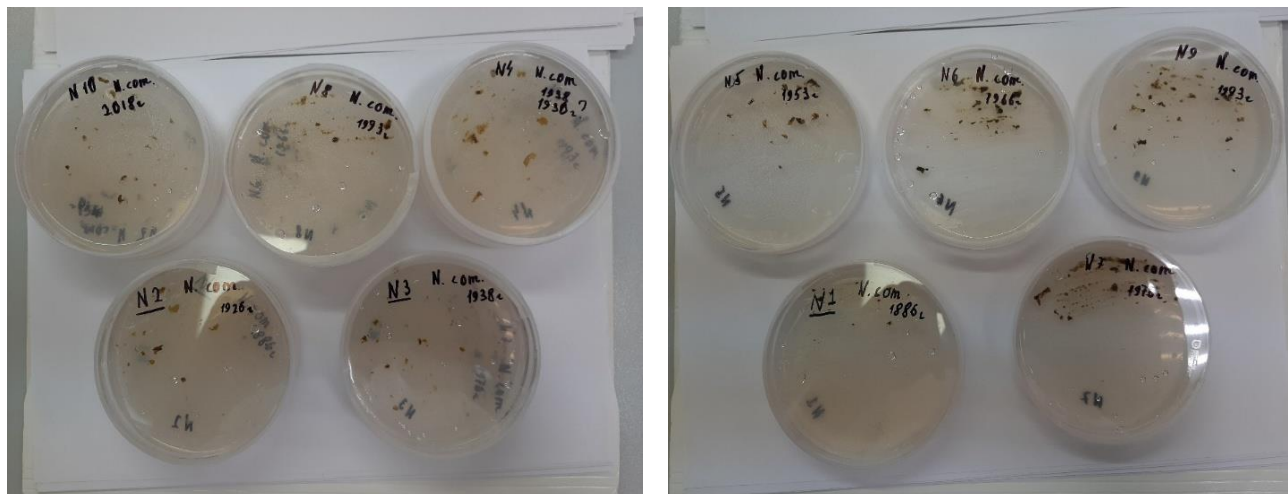


Рис.7-8. Чашки Петри с пробами *N. commune*.  
Номера на чашках соответствуют номерам проб.

Появление цветных пятен, наличие нитей и молодых колоний представлены в таблице 2.

Таблица 2

#### Характеристика роста образцов *Nostoc commune*

Образец и срок хранения	Образование новых колоний	Неделя, на которой образовалась первая колония	Сопутствующие виды	Размер колонии, мм	Азотфиксация в первые дни (метод ацетиленовой редукции)
№1 (134 года)	отсутствует	-	-	неизвестен	-
№2 (94 года)	отсутствует	-	-	неизвестен	-
№3 (82 года)	отсутствует	-	-	неизвестен	-
№4 (82 года)	присутствует	6	-	0.2 ± 0.02	-
№5 (67 лет)	присутствует	5	-	0.25 ± 0.02	-
№6 (54 года)	присутствует	7	присутствуют	0.2 ± 0.02	-
№7 (44 года)	присутствует	5	присутствуют	2 ± 0.2	-
№8 (27 лет)	присутствует	8	-	0.3 ± 0.02	-
№9 (27 лет)	присутствует	5	-	0.2 ± 0.02	+
№10 (2 года)	присутствует	4	присутствуют	2.4 ± 0.2	+

В результате оценки жизнеспособности образцов, хранящихся в условиях длительной дегидратации, показано, что образцы, хранящиеся более 80 лет, утратили способность к восстановлению, за исключением одного образца. Возможно, что для их появления необходим более длительный период реанимации. Следует отметить, что эти образцы были разбухшими и ослезнёнными, в дальнейшем, возможно, и их разрастание. В трёх образцах наблюдалось разрастание не только образцов *N. commune*, но и сопутствующих видов. Сопутствующие виды могут использовать колонии *N. commune* для поселения и находят там благоприятные условия для своего развития, что также может быть в перспективе использовано при расселении водорослей на осваиваемых субстратах. У двух колоний, хранившихся менее 30 лет, отмечено восстановление способности фиксировать молекулярный азот.

Полученные результаты показывают, что исследованные штаммы цианобактерии *N. commune* могут переносить длительный период дегидратации и после длительного хранения в коллекции способны развивать новые клетки и колонии.

В конце эксперимента проведено сравнение выращенных разрастаний с штаммами *N. commune* из коллекции живых культур водорослей Института биологии Коми НЦ УрО РАН. Выявлено, что размеры клеток и форма разрастаний соответствуют диагностическим признакам этого вида.

## Выводы

По результатам работы нами сделаны следующие выводы:

- Цианобактерия *Nostoc commune* широко распространена в природе, имеет высокую адаптацию к условиям окружающей среды и играет значительную роль в функционировании наземных экосистем, что делает возможным её использование в качестве биотехнологического объекта, в том числе в космической биотехнологии.

- *N. commune* может переносить длительный период высушивания и способна развить новые клетки и колонии после длительного хранения. После восьми недель наблюдений все образцы, хранящиеся более 80 лет в условиях дегидратации, утратили способность к восстановлению, исключение представляет собой один образец. В пробах возрастом менее 80 лет отмечено появление живых клеток и формирование молодых колоний. У двух колоний, хранившихся менее 30 лет, отмечено восстановление способности фиксировать молекулярный азот. В трёх образцах наблюдалось разрастание не только образцов *N. commune*, но и сопутствующих видов, которые совместно с ностоком могут быть использованы при освоении новых территорий.

- Скрининг образцов цианобактерии *N. commune* и оценка их жизнеспособности показали, что наиболее перспективными образцами для использования их в качестве биотехнологических объектов является штамм, который восстановил жизнеспособность после 80 лет хранения (№4) в сухом виде и те штаммы *N. commune*, которые в первые сутки эксперимента показали способность к азотфиксации (образцы №9, 10).

## Заключение

В результате проведенных исследований наша гипотеза о том, что исследуемые образцы вида *N. commune* способны восстанавливать жизнедеятельность после длительного периода дегидратации, и могут в перспективе быть использованы в качестве биотехнологических объектов, перспективных для создания биорегенеративных систем жизнеобеспечения при длительных космических миссиях по освоению новых планет, частично подтвердилась.

Автор работы благодарит за помощь в проведении исследований научного сотрудника Института биологии Коми НЦ УрО РАН, к.б.н. И.Н. Новаковскую, а также педагога-организатора МАОУ «Лицей народной дипломатии» г. Сыктывкара Т.П. Константинову.

### Список использованных источников

1. Голлербах М.М., Косинская Е.К., Полянский В.И. Синезеленые водоросли (Определитель пресноводных водорослей. Вып. 2). М.: Советская наука, 1953. – 653 с.
2. Григорян О.Г., Казакова Н.Ю. Особенности дизайн-проектирования предметно-пространственной среды поселений на планете Марс. Академическая наука-проблемы и достижения, 2017. С. 14-16.
3. Егорова И. Н., Болдина О.Н. О размножении зеленых микроводорослей (*Chlorophyta*) // Проблемы изучения и сохранения растительного мира Евразии // Материалы II Всероссийской научной конференции – Иркутск, 2017. – С. 61-63.
4. Кабиров Р.Р., 2010. Альгологические аспекты космической экологии. Современные наукоемкие технологии, (8), С. 12-15.
5. Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н., Терентьева Н. В., Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс: Обзор // Морський екологічний журнал, 2008. № 2, Т. VII.С. 5-23.
6. Семеновко В.Е. Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. М.: РАН, 1991. – 228 с.
7. Guiry & Guiry, 2020 // <http://www.algaebase.org/search/species/detail/>
8. Sherman L. Модификация цианобактерий для длительных космических миссий// <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01773652/document>
9. <http://fb.ru/article/240293/vodorosli-jivuschie-v-neobyichnyih-usloviyah-vidyi-vodorosley-ih-osobennosti-i-znachenie-v-prirode>
10. <https://ru.wikipedia.org/wiki/> (Цианобактерии)