

**Е.В. Куприянова, Н.А. Пронина**  
**СО<sub>2</sub>-КОНЦЕНТРИРУЮЩИЙ МЕХАНИЗМ АЛКАЛОФИЛЬНЫХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ ИЗ**  
**СОДОВЫХ ОЗЕР**

(Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук)

*В данном обзоре обсуждается история возникновения механизмов, дающих возможность осуществления эффективного фотосинтеза в данную геологическую эпоху. Обсуждается необходимость СО<sub>2</sub>-концентрирующего механизма для цианобактерий, обитающих в условиях содовых озер.*

Цианобактерии являются одними из «старожилов» на нашей планете. Остатки первых прокариот, в том числе напоминающих современные нитчатые цианобактерии, обнаруживаются в древнейших из известных на Земле осадочных породах, возраст которых составляет 3.8 млрд. лет [1]. С тех пор цианобактерии не претерпели существенных изменений с точки зрения морфологии и ультраструктуры. И их древние остатки можно с успехом классифицировать по современным альгологическим справочникам [2].

После своего возникновения прокариоты безраздельно господствовали на нашей планете в течение 2 млрд. лет, что составляет больше половины от истории жизни на Земле в целом. При этом они формировали сообщества, так называемые циано-бактериальные маты, состоящие соответственно из цианобактерий и бактерий. Считается, что расцвет прокариот случился после «изобретения» цианобактериями примерно 3.5 млрд. лет назад окислительного фотосинтеза, использующего в качестве источника электрона воду [3]. А поскольку вода – очень доступный субстрат, это и дало возможность такой широкой экспансии.

Ранняя атмосфера Земли, образовавшаяся в Архее в результате дегазации магмы, была восстановительной. В то время она состояла из паров воды, большого количества СО<sub>2</sub> и других газов, таких как метан, азот, окись углерода и др. По некоторым оценкам, содержание СО<sub>2</sub> в то время достигало примерно 80% [4]. Именно в период господства на Земле прокариот огромное количество СО<sub>2</sub>, находящегося в ранней атмосфере, оказывается связанными в виде строматолитов – слоистых отложений, состоящих в основном из карбоната кальция, и представляющих собой минерализованные циано-бактериальные сообщества [2].

Одновременно со стоком СО<sub>2</sub>, фотосинтетический кислород, выделявшийся в результате жизнедеятельности цианобактерий, постепенно насыщал атмосферу. Примерно 2 млрд. лет назад уровень его содержания достиг 1% от современного, что считается началом атмосферы нового, окислительного типа. К середине Протерозоя (1.7-1.8 млрд. лет назад) атмосфера Земли стала полностью аэробной. Этот глобальный процесс затронул перестройку всей геосферно-биосферной системы Земли [2, 5]. Таким образом, именно прокариоты дали возможность эволюции развиваться по тому сценарию, который нам сегодня известен. С появлением кислорода в атмосфере стало возможно использовать энергетически более выгодный процесс кислородного дыхания вместо анаэробного брожения, и получать 38 молекул АТФ вместо двух из одной молекулы глюкозы. Одновременно возник озоновый слой, преграждающий путь ультрафиолету. Все это дало возможность появления высокоорганизованных эукариот, выхода жизни на сушу, и появления всех основных групп известных ныне животных и растений [1].

Вместе с тем, широкое использование окислительного фотосинтеза привело около 350 млн. лет назад к критической ситуации для самих фотосинтетиков [6]. В результате неуклонного снижения концентрации СО<sub>2</sub> в атмосфере Земли с одновременным повышением содержания в ней кислорода, СО<sub>2</sub> стал лимитирующим ресурсом, а оксигеназная реакция РБФК/О приобрела статус серьезной проблемы. Таким образом, формирование механизмов, позволяющих сохранять фотосинтетическую активность, стало в этот период важным условием дальнейшего существования и развития фотосинтетических организмов. Преодолеть возникшую ситуацию можно было двумя путями: 1) увеличить количество ключевого фермента фиксации СО<sub>2</sub> – РБФК/О и ее сродство к диоксиду углерода: по этому пути пошло большинство растений С<sub>3</sub>-типа; 2) увеличить внутриклеточную концентрацию СО<sub>2</sub> – то есть, создать СО<sub>2</sub>-концентрирующий механизм. Эта стратегия привела к появлению С<sub>4</sub>- и САМ-метаболизма. Перед цианобактериями, вклад которых в преобразование ранней атмосферы был наиболее существенный, также встала задача сохранения эффективности фотосинтеза. Наряду с другими водными С<sub>3</sub>-фотосинтетиками – микроводорослями, придерживаясь второй адаптационной стратегии, цианобактерии «изобрели» СО<sub>2</sub>-концентрирующий механизм, отличный от С<sub>4</sub>- и САМ-путей, известный сейчас под аббревиатурой ССМ (от англ. – «carbon concentration mechanism») [6, 7]. Работу ССМ обеспечивает фермент карбоангидраза (КА, КФ 4.2.1.1) совместно с

переносчиками соединений неорганического углерода ( $C_i$ ). В результате их слаженной работы в районе активного сайта РБФК/О создается концентрация  $CO_2$ , в 1000 раз превышающую таковую в среде, окружающей клетку. КА участвует во всех этапах ССМ (поглощение  $C_i$ , предотвращение утечки  $C_i$  из клетки, внутриклеточное преобразование форм  $C_i$ ) [8].

Сформированная древними цианобактериями окислительная атмосфера дала толчок к развитию и распространению эукариот. Со временем последние постепенно вытеснили прокариотические сообщества в экологические ниши с экстремальными условиями обитания: соленые лагуны, гидротермы или содовые озера с высоким содержанием карбонатов и показателем рН. Именно в этих условиях они развиваются и в наши дни. Поскольку в таких местах обитания отсутствуют высшие организмы, подобные микробные сообщества называются «реликтовыми» и считаются аналогами экосистем прошлого [2].

С точки зрения изучения появления и эволюции ССМ особенный интерес представляют алкалофильные цианобактерии содовых озер. На настоящее время не существует единого мнения по поводу функционирования у них механизма концентрирования  $C_i$ . С одной стороны, эти организмы развиваются в среде с высоким содержанием бикарбоната. Теоретически подобные условия не требуют создания или поддержания ССМ. С другой стороны, наличие у алкалофильных цианобактерий всех компонентов ССМ, а именно КА и переносчиков  $C_i$ , было показано экспериментально [9-12]. Кроме того, нами было продемонстрировано накопление внутриклеточного пула  $C_i$  до величин, сравнимых с пресноводными цианобактериями, у одного из представителей содовых озер - *Rhabdoderma lineare* [9]. Мы также наблюдали увеличение числа карбоксисом у этого организма при низкой концентрации экзогенного  $C_i$  (неопубликованные данные). Именно в карбоксисомах цианобактерий происходит преобразование внутриклеточного пула  $C_i$ , существующего в форме бикарбоната, в  $CO_2$ , являющийся субстратом для РБФК.

Таким образом, ССМ может существовать у цианобактерий содовых озер как артефакт, сохранившийся у клеток с тех времен, когда они еще не были вытеснены эукариотами в экстремальные условия обитания. В этом случае ССМ может активироваться при неблагоприятных условиях: известно, что гидрохимические показатели воды содовых озер подвержены периодическим изменениям вследствие сезонных циклов опреснения [11].

Второй причиной сохранения функционально активного ССМ у цианобактерий содовых озер может служить недостаток подходящей формы экзогенного  $C_i$ : избыток карбоната или низкая концентрация бикарбонат-ионов при высоких рН может служить спусковым механизмом для индукции ССМ [9].

Еще одна гипотеза состоит в том, что бентосные цианобактерии, обитающие в условиях плотного циано-бактериального мата, могут испытывать необходимость в ССМ из-за возможного дефицита в экзогенном  $C_i$  как вследствие низкой скорости диффузии  $C_i$  в воде, так и из-за наличия толстого экзополисахаридного слоя у самих клеток, препятствующего проникновению к ним субстрата [6, 13]. Для кальцифицирующих цианобактерий, таких как *Microcoleus*, диффузия  $C_i$  может быть также осложнена из-за отложения нерастворимого осадка карбоната кальция во внешних слоях клетки [10].

Однако, несмотря на то, что функционирование ССМ у алкалофильных цианобактерий из содовых озер еще оставляет неразрешенные вопросы, уже на данном этапе исследования можно заключить следующее. Поскольку в клетках «реликтовых» цианобактерий, предки которых имеют возраст около 3.8 млрд. лет, были обнаружены все компоненты ССМ, это может указывать на более древнее происхождение этого механизма, чем относящееся к 350 млн. лет назад, как это принято считать в настоящее время.

1. Еськов К.Ю. Удивительная палеонтология: история Земли и жизни на ней. - Москва: ЭНАС.- 2008.- 312 с.
2. Заварзин Г.А. Становление Биосферы // Вестник РАН.- 2001.- Т. 71. - С. 988-1001.
3. Konhauser K. Biogeochemistry: deepening the early oxygen debate // Nature Geoscience.- 2009.- V. 2.- P. 241-242.
4. Сорохтин О.Г., Ушаков С.А. Развитие Земли.- Москва: МГУ.- 2002.- 560 с.
5. Заварзин Г.А. Эволюция геосферно-биосферной системы // Природа.- 2003.- Т. 1.- С. 27-35.
6. Price G.D., Badger M.R., Woodger F.J., Long B.M. Advances in Understanding the Cyanobacterial  $CO_2$ -Concentrating-Mechanism (CCM): Functional Components,  $C_i$  Transporters, Diversity, Genetic Regulation and Prospects for Engineering into Plants // J. Exp. Bot.- 2008.- V. 59.- P. 1441-1461.
7. Пронина Н.А. Организация и физиологическая роль  $CO_2$ -концентрирующего механизма при фотосинтезе микроводорослей // Физиология растений. - 2000. - Т. 47. - С. 801-810.
8. Куприянова Е.В., Пронина Н.А. Карбоангидраза – фермент, преобразивший биосферу // Физиология растений. - 2011. - Т. 58. - С. 163-176.
9. Dudoladova M.V., Kupriyanova E.V., Markelova A.G., Sinetova M.P., Allakhverdiev S.I., Pronina N.A. The thylakoid carbonic anhydrase associated with photosystem II is the component of inorganic carbon accumulating system in cells of halo- and alkaliphilic cyanobacterium *Rhabdoderma lineare* // Biochim. Biophys. Acta.- 2007.- V. 1767.- P. 616-623.

10. Kupriyanova E., Villarejo A., Markelova A., Gerasimenko L., Zavarzin G., Samuelsson G., Los D.A., Pronina N. Extracellular carbonic anhydrases of the stromatolite-forming cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* // Microbiology.- 2007.- V. 153.- P. 1149-1156.

11. Миходюк О.С., Заварзин Г.А., Ивановский Р.Н. Транспортные системы для карбоната у экстремально натронофильной цианобактерии *Euhalotheca* sp. // Микробиология. - 2008. - Т. 77. - С. 465-471.

12. Kupriyanova E.V., Sinetova M.A., Markelova A.G., Allakhverdiev S.I., Los D.A., Pronina N.A. Extracellular  $\beta$ -class carbonic anhydrase of the alkaliphilic cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* // J. Photochem. Photobiol. B: Biology.- 2011.- V. 103.- P. 78-86.

13. Raven J.A., Cockell C.S., De La Rocha C.L. The evolution of inorganic carbon concentrating mechanisms in photosynthesis // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.- 2008.- V. 363.- P. 2641-2650.

**Т.Д. Мукашева, Р.Ж. Бержанова, М.Х. Шигаева, Р.К. Сыдыкбекова,  
Л.В. Игнатова, Д. Даутова, А.А. Сартаева**

## **СТАБИЛИЗАЦИЯ ПОПУЛЯЦИИ И СЕЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ - ДЕСТРУКТОРОВ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ**

(Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г.Алматы)

*Проведена сравнительная оценка методов отбора активных вариантов у штамма *Rhodococcus equi* 51КС. Установлено, что для селекции вариантов с повышенной деструктивной активностью можно рекомендовать два метода – метод продленного культивирования в жидкой среде с ПАУ и метод продленного культивирования с постепенным возрастом ПАУ в среде.*

Подверженность микроорганизмов, применяемых в микробиологической промышленности, популяционным изменениям приводит к снижению их продуктивности и эффективности технологического процесса. Это вызывает необходимость проведения исследований по стабилизации популяции и отбору культур с высокой стабильной активностью.

К числу ценных в практическом отношении культур относятся углеводородоокисляющие микроорганизмы, способные утилизировать углеводороды. Важность отбора вариантов, обладающих высокими способностями к деструкции, представляет большой интерес с точки зрения создания полноценных и высококачественных препаратов для экобиотехнологических целей [1].

Использование новых селекционных подходов, направленных на повышение адаптивных возможностей и получение преимущественно полезных мутаций получило развитие сравнительно недавно. Традиционно для получения продуктивных штаммов микроорганизмов использовали индицированный мутагенез с последующим отбором полезных мутантов, который применяется до сих пор. В настоящее время применяют новые методы, основанные на технологии рекомбинантных ДНК (генетическая инженерия). Однако использование рекомбинантных штаммов микроорганизмов для экологических целей не целесообразно. Поэтому необходимо разрабатывать иные подходы для отбора высокоактивных вариантов у микроорганизмов - деструкторов. Одним из таких является использование методов, основанных на повышении адаптивных возможностей микроорганизмов-деструкторов.

При хранении промышленных штаммов микроорганизмов, помимо потери жизнеспособности клеток, наблюдается также процессы популяционной изменчивости. При этом доминантный фенотип замещается другими измененными исходными свойствами и продуктивной активностью, происходит потеря штаммами приоритетных свойств. Это обусловило необходимость проведения работ по разработке подходов повышения деструктивной активности микроорганизмов, входящих в состав препаратов для биоремедиации загрязненных экосистем после их хранения.

В этой связи были проведены исследования по разработке методических рекомендации для отбора перспективных микроорганизмов-деструкторов полициклических ароматических углеводородов.

### **Материал и методы**

В работе использовали штамм *Rhodococcus equi* 51КС [3-4]. Рост микроорганизмов на твердых полициклических ароматических углеводородах изучали при выращивании микроорганизмов на агаризованной минеральной среде с добавлением ПАУ на поверхность питательной среды. Способность штаммов к трансформации полиароматических углеводородов изучали на агаризованной минеральной среде 8Е по методике [5]. Микроорганизмы выращивали на агаризованной минеральной среде на чашках Петри с нафталина (50 мг/л, 100 мг/л и 150 мг/л) и антрацена (25 мг/л, 50 мг/л и 100 мг/л). Углеводороды растворяли в хлороформе, равномерно распределяли по поверхности среды, затем наливали второй тонкий слой среды. Колонии микроорганизмов, способные использовать