

## Мікромір живого – очевидність неочевидного

В. А. Кордюм, Е. В. Мошинец, М. В. Цапенко, Н. И. Адамчук-Чалая<sup>1</sup>,  
Д. М. Иродов, В. И. Андриенко, С. П. Шпилевая

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03680, Украина

<sup>1</sup>Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины  
Ул. Терещенковская, 2, Киев, 01601, Украина

moshynets@gmail.com

---

*В современной биологии существует ярко выраженная асимметрия изученности/неизученности живого мира. Все основные результаты молекулярной биологии, молекулярной генетики, биохимии получены на небольшом количестве модельных объектов. На основании этих результатов создается представление о живом. А далее такие представления экстраполируют на всю Биосферу. Для эукариотов (вследствие фундаментального их единства по критерию организации генома) таковое является обоснованным. Но для прокариотов, которые в основной своей массе не растут на питательных средах в лаборатории и плохо доступны в природных субстратах даже для прямых методов анализа, такой подход не оправдан. В работе изложен принцип организации потенциально универсального метода изучения микромира в природных субстратах и приведены первые результаты его применения.*

*Ключевые слова: микроценоз, некультурабельные формы, необычные формы, недеструктивный метод.*

---

В настоящее время в биологии сложилась весьма необычная ситуация. Очень быстрое развитие возможностей изучения фундаментальных основ организации и функционирования живой материи позволило приступить к взаимосогласованным исследованиям в направлении ее полного познания. Но подобная взаимосогласованность требовала максимальной унификации объектов анализа. В результате основные усилия сконцентрировались в крайне узкой области, центром которой (и теперь уже основным объектом в силу очевидных причин) стал человек как главный приоритет в шкале ценностей. Возникла некая многоплановая, но ярко выраженная асимметрия. Асимметрия по градиен-

ту изученности/неизученности. В плане фундаментальном – она почти абсолютна. В большинстве своем сколько-нибудь глубокие исследования (в направлении строения генома, тонких механизмов регуляции, молекулярной структуры, протеома, сигнальных путей, фенотипетики и т. д.) сводятся к единичным «модельным объектам» – кишечной палочке, сахаромицетам, дрозофиле, мышце, арабидопсису, рису и еще несколькими другим. Ну может быть в пределе – к представителям нескольких десятков видов (все зависит от того, «как считать», насколько глубоко изучен объект и как часто его используют, чтобы признать «модельным»). Остальные представители живого мира описаны, в основном, только морфологически и как объекты детального изучения не используются по причине

В. А. КОРДЮМ, Е. В. МОШИНЕЦ, М. В. ЦАПЕНКО, Н. И. АДАМЧУК-ЧАЛАЯ,  
Д. М. ИРОДОВ, В. И. АНДРИЕНКО, С. П. ШПИЛЕВАЯ, 2008

того, что они «неудобны в работе» или «ненужные для практики». Конечно же, это не прихоть исследователей. На то имеются объективные причины. Углубленные исследования очень дорогие, требуют специальных условий, они длительны, выполняются профессионально хорошо подготовленными в узких областях специалистами и т. д. А полученные результаты надо укладывать в некую общую картину, связывать с другими результатами, процессами, структурами, событиями. Просто так отдельно «выдернутый» результат на неизученном объекте никуда и не уложишь. Но это все для объяснения «почему». А фактом остается просто-таки фантастическая асимметрия. Если учитывать все живое, т. е. и эукариотов, и прокариотов, то из существовавших (по разным оценкам) на планете нескольких десятков миллионов видов [1] сколько-нибудь детально изучено всего несколько десятков, другими словами, одна миллионная часть. Несмотря на такую асимметрию, далее идет унификация следующего уровня.

На основании полученных на модельных объектах данных создаются стандартизованные унифицированные методы изучения, которые затем используют как базовую основу для всего остального мира. И неосознанно мы замыкаем его, весь остальной мир (через стандартизованные для модельных объектов методы, технологии, схемы исследований), на том, что присуще именно модельным объектам. А то, что при такой унификации техники, методов, реагентов, программ обработки и интерпретации результатов исследований оказывается для них неадекватным, относят к «нетипичным случаям», «исключениям», «неподдающемуся анализу материалу», «ситуациям, требующим неоправданно больших усилий», «нестабильности объекта», «плохой воспроизводимости» и т. д. То есть весь тот мир, который выходит за рамки аналогии с «модельными объектами» и методами, разработанными для их изучения, плохо идентифицируется (или совсем не определяется), фактически, остается познанным только «визуально». Да и то не всегда. И все наше представление о «единстве» живого мира основано на экстраполяции единиц изученного на всю Биосферу. И, как ни странно это звучит, – все, что в эти рамки не входит, то для нас

не «Биосфера». Или, что более точно отражает реальную ситуацию для объектов «визуализированных», Биосферой является только идентифицируемое «по аналогии». Аналогии с моделями.

Но еще более ярко асимметрия изученности/неизученности выражена по шкале размеров организмов. На этой шкале имеются три крутых перегиба. Участок до первого перегиба охватывает представителей живого мира от максимальных их размеров (в пределе – десятки метров) до величин, измеряемых миллиметрами. Такой размер в силу его соизмеримости с человеком им, человеком, хорошо различим, хорошо причинно-следственно может быть прослежен в различных событиях и процессах, исторически (в силу тех же особенностей размеров) постоянно воспринимался как «свое окружение». С ним боролись, его использовали, его наблюдали, отдельных представителей изучали и т. д. Второй участок шкалы – от первого до второго перегиба – охватывает живое, размеры которого лежат в границах от нескольких миллиметров до 0,1 мм. Эту «мелочь» глаз еще различает, но уже без деталей. В обычной жизни на нее редко обращают внимание (только когда уж очень досаждают), а ее изучение требует специальной аппаратуры. Тем не менее, этот «топоразмер» живого описан морфологически (а в ряде случаев – и цитологически, биохимически) хоть как-то.

С 0,1 мм начинается третий участок шкалы – микромир живого. Его нижней границей (до третьего перегиба) считают 0,2 мкм [2]. В объеме ниже этой величины ( $0,0042 \text{ мкм}^3$ ) уже чисто пространственно не умещается минимально необходимый набор обязательных элементов клетки (геном, хотя бы 2–3 рибосомы, обслуживающие геном и белок-синтезирующий аппарат белки, составляющие энергетический цикл макромолекул, мембрана). Расчетный размер атома водорода (при всей условности понятия «размер» для объектов, относящихся к квантовой механике) определяется величиной диаметром 0,0529 нм. В объеме  $0,0042 \text{ мкм}^3$  при чисто геометрической расстановке без учета взаимодействий и квантовых процессов «поместится» менее 10 млрд атомов водорода. Всего! А даже самое простое, примитивное, редуцированное «живое» (как автономная единица жизни) состоит из

многочисленных и разнообразных биологических макромолекул, молекул «обычного» размера, мелких, которые нужным образом пространственно организованы, ориентированы, между собой взаимодействуют.

Ниже 0,2 мкм (третий перегиб) шкала фактически исчезает. Имеется только «общее представление» о том, что там уже ничего живого нет, потому как быть не может. Там имеются только вирусы. Но они «не живое», а некая транспортная форма информации, реализующаяся только в клетке – минимально самодостаточной единице живого. Таким образом, на «шкале размеров» ниже 0,2 мкм жизнь исчезает как таковая.

Если же провести разделение изученности/неизученности по более укрупненному критерию, то в самом общем виде по величине объектов и степени изученности жизнь на планете Земля можно представить в виде двух очень больших и неравных групп – макромир свыше 0,1 мм и микромир ниже 0,1 мм (но только до 0,2 мкм).

По степени организации весь макромир является эукариотами. Микромир же представлен как низшими эукариотами, так и, в основном, прокариотами. Эукариоты микромира благодаря своим относительно крупным (для микромира) размерам, хорошо различимым разнообразным формам и достаточно сложной организации (в виде присутствующих в их клетках различных надмолекулярных структур), по крайней мере, внешне описаны и систематизированы (по морфологическим и, реже, цитологическим показателям). Это – все то живое, которое визуализировано и в своей совокупности есть «Биосфера по аналогии». Что же касается микромира прокариотов, то его изученность близка к нулю. Даже на уровне визуализации. Объясняется это несколькими причинами.

Все живое где-то обитает. Для микроорганизмов это «где-то» может быть поверхностным или внутренним расположением на/в других организмах (обычно макро-, хотя далеко и не всегда). И тогда говорят о комменсалах, паразитах, симбионтах, контаминантах, «нормальной микрофлоре» и т. д. Но во всех этих случаях ареалом обитания является другое живое. Вся же остальная природа составляет иную сферу обитания микроорганизмов.

Она состоит из разных составляющих, которые по отношению к населяющим их микроорганизмам обозначают термином «субстраты». Однозначного, общепринятого определения его нет. Поэтому для общего понимания того, что вкладывается в смысл упомянутого термина, в данной работе предлагается определение, отражающее развиваемые ниже представления: под субстратом понимается природная или антропогенная материальная субстанция (почва, ил, вода, песок, вермикулит, шлаки, остатки растений и животных и т. д.), в которой существуют живые организмы.

Исторически сложилось так, что для обнаружения, идентификации и изучения микроорганизмы из природных субстратов высевались на различные питательные среды. То, что выросло, становилось предметом исследования. А то, что не выросло, вообще как бы и не существовало – оно не обнаруживалось. Конечно же, пробы рассматривали в микроскоп, начало чему положил еще Левенгук 300 лет тому назад. Для патогенных бактерий даже составляли атласы, в которых изображалось, «как они выглядят» непосредственно в крови, срезах тканей и т. д. В исключительных случаях подобное осуществляли и применительно к природным субстратам (например, для железо- и серебробактерий). Но только как вспомогательные процедуры для последующего выделения (введения в культуру). Для полной корректности следует отметить, что для всего остального, что не росло в лаборатории, т. е. для такого «виртуального» микромира, имелось еще дополнительное, не очень четкое понятие – «общее количество», т. е. «все», что имеется в субстрате. Нечеткость обуславливалась невозможностью ни полностью извлечь то, что имеется в природных субстратах, ни определить, что же собственно извлекалось (из того, что удавалось извлечь) – нечто «живое» или какой-то «детрит». Оценивают – живое или неживое в «общем количестве» – только по «внешнему виду» и нашим представлениям, чему такой «внешний вид» соответствует.

По мере совершенствования методов наблюдения, особенно с внедрением в лабораторную практику электронной микроскопии, удалось посчитать (тоже «на глаз») то, что суммарно извлекается, и

оценить то, что из этой суммы способно расти на питательных средах в лаборатории. Оценку проводили «по разнице». Из субстрата извлекалось розбалтыванием в воде (солевом растворе), растиранием в присутствии воды, мягких детергентов, разбиванием с твердыми частицами (например, мелкими стеклянными шариками) и т. д. то, что такими способами можно было отделить от твердой фазы. Затем аликвоту извлеченного высевали на разные питательные среды и одновременно исследовали (тоже количественно) под микроскопом. Похожие на какой-то вариант клетки (бактерии, L-формы, микоплазмы и т. д.) учитывали. Результаты такого прямого подсчета сравнивали с количеством выросших колоний на питательных средах. Оказалось, что расти может очень мало – 0,1–0,01 %. А что такое 99,9–99,99 % от всего того, что обнаруживают в природных субстратах и прямым подсчетом под микроскопом оценивают как «общее количество» микроорганизмов, «науке неизвестно». И это только для того, что извлекалось. А то, что прочно вросло в субстрат и от него как целое не отделялось или разрушалось до «детрита», вообще никак не учитывали и не «считали». Оно оставалось невидимым даже для «общего количества».

С развитием молекулярных методов исследования такая ситуация неопределенности привела к радикальной смене основ систематики прокариотов. Их начали идентифицировать по гомологии ДНК (либо на основании секвенирования, либо согласно данным цепной полимеразной реакции с какими-то праймерами). Поскольку же в лабораториях почти ничего из имеющегося в природных микроценозах не растет, то на основании того очень немногочисленного, что растет, рассчитывали праймеры. Анализ проводили на материале в тотальных экстрактах ДНК из естественных субстратов, но только с учетом того, что можно изучать, секвенировать, находить консервативные участки и т. д. у 0,1–0,01 % растущих в лаборатории форм. Но так как в наши представления закладывается только известное (что, конечно же, правильно), то праймеры для оценки существующего в субстратах по извлеченной из них тотальной ДНК составляли, основываясь, опять же, только на том, что росло, т. е. известном. О неизвестном, не видя его, судили по известному. Тем не

менее, такой метод экстраполировали на всю совокупность ценоза, из которого суммарно, прямо из субстрата, выделяли общую ДНК, амплифицировали и по амплификатам делали заключение о составе ценоза. И, по сути, живое для исследователей исчезало – оставались только выравненные последовательности, сигналы амплификации (на фореze или непосредственно в амплификате), математические расчеты, шкалы и дендрограммы результатов таких анализов. В итоге, если при классических методах идентификации микромира на основе изучения того, что растет на питательных средах, мы ходили по пятаку площадью 0,1–0,01 % от общего поля, то с новыми методами мы ходим по неопределенному пространству, непонятно как пересекающемуся с реальным полем жизни. По сути – изучают «нечто в чем-то». И опять же, только известное (хотя и самими что ни есть современными методами). Только то, что по праймерам, зондам и т. д. соответствует известному. А все остальное продолжает оставаться невидимым, неизвестным, недоступным.

И здесь мы сталкиваемся с новым критерием асимметрии изученности/неизученности. Он проходит по линии раздела эукариоты–прокариоты. Та унификация методов исследования живого мира, о которой шла речь выше, имеет под собой некую общую основу – мир эукариотов, для которого общим, объединяющим признаком, свидетельством принадлежности к этому миру служит дифференцированный в виде особой структуры (ядро) геном. Практически все объекты живого мира, имеющие размер выше 0,1 мм, – эукариоты. Все объекты микромира с дифференцированным ядром – эукариоты. Это их фундаментальное единство, дающее основание экстраполировать на весь мир эукариотов результаты, полученные на немногих модельных эукариотах. И унифицировать для него методы исследований. И весь опыт всей биологии показывает оправданность такого (применительно ко всем эукариотам) подхода, хотя и отличий, часто весьма значительных, тоже хватает.

Но далее все (методы анализов, технологии исследований, интерпретации результатов и т. д.) переносится и на прокариоты. И те прокариоты, которые такими методами изучаются (и под них «под-

ходят»), нам (в той или иной мере) «видны». Все же остальное, что под унифицированные технологии исследований эукариотов «не подходит», все, что стандартизованными методами не определяется, не идентифицируется, в микромире остается неизвестным. Оно нам «не видно».

Но если в отношении идентификации микромира имеются хоть какие-то представления, хоть «не-что в чем-то», то относительно природной организации реальных микроценозов, т. е. той экологии, которой посвящены миллионы публикаций, нельзя говорить даже о какой-то асимметрии изученности/неизученности, так как здесь полный вакуум. И опять следует обратить внимание на содержание термина – что вкладывается в понятие «микроценоз». Для него тоже (как и для упоминавшегося выше «субстрата») существуют разные определения. Они отвечают профессиональной области деятельности и методическим возможностям (т. е. реальным ограничениям познания) тех, кто этот термин употребляет.

В контексте данной статьи под термином «микроценоз» (в таком же смысле здесь употребляется термин «микробиоценоз») понимается пространственно-локальное, структурно и функционально взаимодействующее, динамически-устойчивое сообщество организмов микроскопических размеров (как правило, от 0,1 мм и менее), существующее в природном или антропогенно-обусловленном субстрате. Любой ценоз пребывает в своей пространственно-временной архитектуре. Там взаиморасположении, взаимоконтактах, взаимовлиянии, взаимодинамике и прочих «взаимо-», которые делают жизнь реальной.

Таким образом, под «архитектурой микроценоза» (микробиоценоза) здесь понимается пространственное взаиморасположение и структурно организованное (в этом пространстве) взаимодействие живых объектов микроскопических размеров относительно самих себя (т. е. живой компоненты) в субстрате и его неживой основы, в которой расположен и функционирует микроценоз. Вне такой пространственной архитектуры со всеми ее «взаимо-» живое превращается в некую абстракцию. А изучить реальный микроценоз в его реальной жизни, в его родном субстрате, в той пространственной

архитектуре «взаимо-», в которой он реально существует, не умеют.

Реальные субстраты (например почва) непрозрачны, состоят из разной прочности и размеров агрегатов, элементы которых обладают разной плотностью, твердостью, пористостью, извилистостью, искривленностью поверхностей и т. д. Со всем этим совмещена архитектура микроценоза. Ее в природных субстратах ни невооруженным глазом, ни в микроскоп, ни на томографе не увидишь. Ее можно только разрушить «до основания, а затем» извлечь (да и то, только то, что извлекается) и, как-то отделив от всего остального, что в своей сложной совокупности (и по химическому составу, и по скорости седиментации, и по плавучей плотности и т. д. и т. п.) перекрывает все аналогичные показатели всех живых компонентов этого микроценоза, изучать в таком «разобранном виде». Это как если бы какой-то природный ареал (например, участок тайги, джунглей или сельвы) после максимально возможного землетрясения смыть с той площади, на которой он существовал, в какой-то гигантский котлован, потом сгрести туда же не смытое бульдозерами, затем перемешать все, что там оказалось, чудовищными мешалками при новом землетрясении, которое еще раз все (но теперь уже в водно-растительно-животно-почвенной жиже) перемешает, а затем «расфракционировать» и по тем фрагментам, которые образовались и попали во фракции, представлять себе реальность и абсолютно серьезно на основании полученных результатов обсуждать жизнь тайги, джунглей или сельвы.

В этой связи интересны результаты прямых наблюдений, которые можно было провести (и которые были проведены) с использованием таких разрушительных методов. Как пример – исследование «редких форм» микроорганизмов методом электронной микроскопии [3]. Попасть «на стол исследователя» после радикального разрушения структуры ценоза вместе со структурой субстрата, в котором он был размещен, последующего смыва и фракционирования могли лишь достаточно устойчивые к механическим воздействиям объекты и только в виде отдельных, никак не связанных между собой, образований. А все, что как-то было объе-

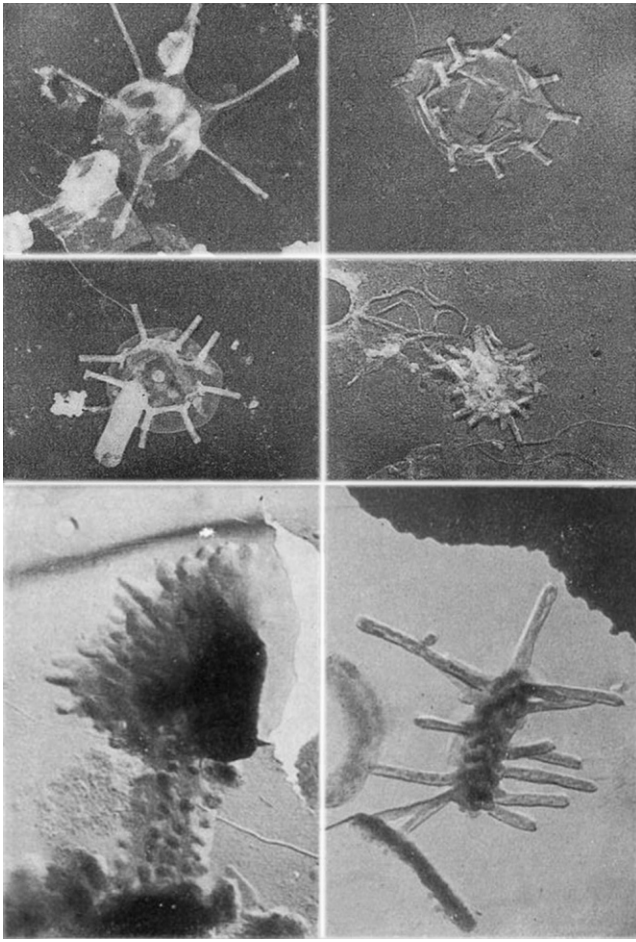


Рис. 1. «Редкие формы» микроорганизмов неизвестной таксономической принадлежности, обнаруженные при электронной микроскопии материала, полученного из природных субстратов вследствие разрушения микроценоза смывом и фиксацией. Фотографии взяты из монографии Никитина с соавт.

динено хоть во что-то, могло восприниматься не иначе, как случайная агрегация после всех разрушительно-перемешивающих процедур. Ибо процедуры по изъятию из субстрата «объектов изучения» предусматривали дезагрегацию, без которой с частиц, гранул, полостей и т. д. ничего достать невозможно. Оно, живое, с субстратом и между собой образует единую пространственную архитектуру. И то, что потом, после всех разрушительных процедур и фракционирований слиплось, агрегировало, наслоилось и т. д., природными образованиями считать уже не приходится. Поэтому на рис. 1 представлены отдельные клетки. Но их общая морфология и поверхностные образования удивительны. Морфология поверхности обычных прокариотов,

выросших в лаборатории и на питательных средах, ограничена, в основном, жгутиками и пилиями. Функции и тех и других вполне понятны. А остальная поверхность – для обмена веществ. В клетку из окружающей среды – то, что надо клетке. Из клетки в окружающую среду – то, что клетке не надо (а также для сигнальных связей с другими клетками на расстоянии). В «редких» же формах имеются явно выраженные образования для контактов. И можно было бы даже представить их, такие контакты. Но разрушительные методы исследования микроценозов возможностей для реконструкции архитектуры ценозов не оставляют. Любые «представления» будут чисто умозрительными. Их даже не пытаются описывать.

Для того чтобы понять, увидеть, сделать открытой для изучения жизнь микроценозов в природных субстратах (и те 99,99 % «общего количества» клеток, его составляющих), нужна адекватная, неразрушительная технология доступа к ним.

В силу очевидной необходимости в течение последних 100 лет велись поиски методических преодолений недостатков, присущих разрушительным методам изучения ценозов. К ним относятся стекла обрастания, предложенные Виноградским [4], плоско-параллельные капилляры Перфильева (рис. 2) и т. д. Принципиально решая ряд вопросов, эти методы, тем не менее, не получили широкого распространения, так как их невозможно было совместить с возникшими во второй половине прошлого века высокоинформативными технологиями исследований (электронная микроскопия, молекулярная диагностика, ультрацитохимия и др.). Кроме того, чисто процессуально с неэластичным, хрупким, ломким материалом (стекло) было неудобно работать. А жесткость стекла не позволяла разместить его в природном субстрате таким образом, чтобы он стал его органически единым элементом. При внесении любой жесткой конструкции архитектура субстрата искажалась, микротоки жидкости, микроциркуляция газа в нем менялись, передвижение микроорганизмов нарушалось и т. д. Соответственно менялся и микроценоз, и его архитектура. Блестящие идеи не нашли широкого применения вследствие ограниченности технологического уровня их воплощения.

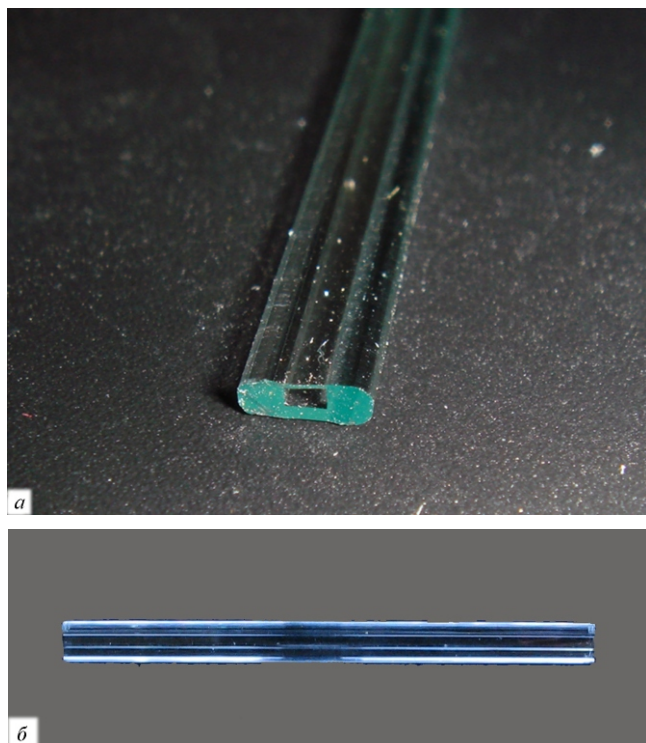


Рис. 2. Плоско-параллельный капилляр Перфильева [5] – общий вид (а) и вид с торца (б)

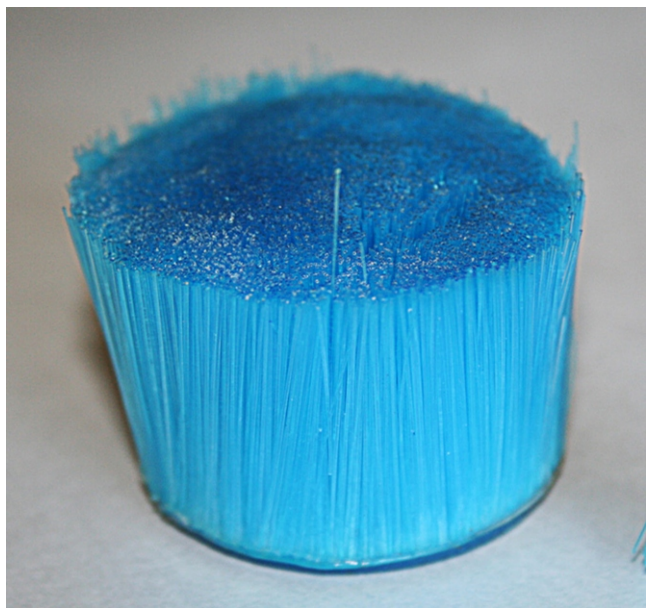


Рис. 3. Субстрат «полного разрешения» в виде вертикально расположенного пучка пластмассовых волокон, вплавленных с торца в пластинку

Исходя из современных возможностей в нашей лаборатории сделана попытка создать необходимую технологию, начавшаяся из составления пере-

чня тех свойств, которыми должна обладать подобная технология (некий аналог «технического задания на проектирование»). Для обеспечения полного разрешения в идеале надо совмещать и выращивание растений, и формирование ценоза, и доступ к нему. И тогда этот перечень сводится к следующему:

- основой технологии должен быть особый субстрат для выращивания растений и установления в нем соответствующего ризосферного микроценоза, т. е. субстрат, который был бы одновременно и субстратом, и носителем ценоза, и объектом для исследований сформировавшегося на нем ценоза;

- субстрат не должен иметь щелей, полостей, а его поверхность полностью должна быть доступной для изучения;

- субстрат, являясь материальной основой как для роста растений, так и для формирования микроценозов, должен обеспечивать во всех диапазонах пространства возможность проведения всех существующих для изучения микроорганизмов информативных методов исследования.

В соответствии со сформулированными свойствами субстрат и был создан.

В общей форме наиболее широкими возможностями для любых манипуляций обладают пластмассы. Они были взяты за основу при выборе материала субстрата. Организация субстрата таким образом, чтобы он был полностью доступен для анализа и к тому же обеспечивал сохранность архитектуры микроценозов во всем ее диапазоне, возможна только в виде ориентированных в пространстве элементов. А для водного питания растений они должны обеспечить еще и необходимую капиллярность. При этом должна быть гарантирована биологическая нейтральность субстрата и его стойкость к деградирующим воздействиям как растений, так и микроорганизмов.

Конструктивно это было решено в виде ориентированного пучка волокон полиэтилена (в одном из вариантов), вплавленного с торца в полиэтиленовую пластинку (рис. 3). В пучке создана своеобразная «коллективная» капиллярность, обуславливающая как водный, так и газовый режим, которыми можно управлять по желанию. Гладкая поверхность волокон и их сплошная (без пор, ще-

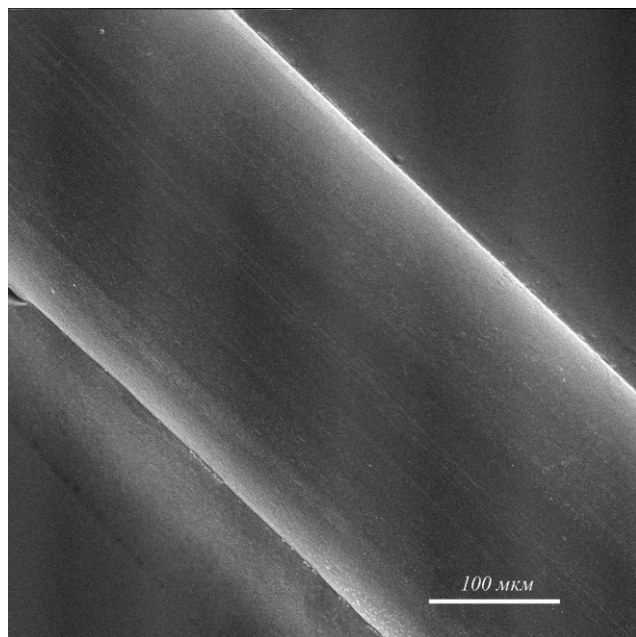


Рис. 4. Одиночное волокно. Его можно использовать как изолированно, так и в качестве элемента субстрата «полного разрешения». Гладкая поверхность исключает возможность появления зон, не являющихся доступными для непосредственного исследования

лей и т. д.) литая структура обеспечивала полную доступность ко всем участкам субстрата (рис. 4). Ни микрофлора, ни корни, обрастая волокна при такой поверхности, не могут уйти от непосредственного контроля (им негде «спрятаться»). А состав – пластик (в данном случае полиэтилен, хотя может быть и любой иной) позволял совмещать все методы исследования, так как в отличие от стекла, вермикулита, силикатов почвы и т. д., мог быть порезан на микротоме и исследован в электронном микроскопе, разделен на фрагменты любых размеров для специальных анализов и т. д. Наконец, непрерывность нитей пучка на всю высоту субстрата давала возможность изучения архитектуры микроценозов по всему их объему – как в продольном, так и поперечном направлениях. Дальнейшую работу проводили в плане исследования технологических особенностей и возможностей созданного субстрата для анализа микроценозов.

В качестве модельного растения выбран арабидопсис, выращиваемый в условиях лабораторной оранжереи.

Природные субстраты (почвы) имеют свою равновесно-устойчивую микрофлору (сформировав-

шиеся ценозы). Искусственным, да еще таким, в которых сформированных микроценозов нет, присущ случайный (и крайне бедный) состав микроорганизмов. Поэтому, если начинать «с нуля», т. е. с чистого пучка волокон, то начинается сукцессия с некоторой «нулевой» отметки – того случайного состава микроорганизмов, который контаминировал субстрат. И первые попытки выращивания таких растений, как арабидопсис, обычно «не идут». Хороший рост наступает лишь через несколько генераций растений (да и то неполных – вначале они до конца цикла развития не доходят). Но можно использовать, адаптировать, воссоздать (из природной заготовки) в предлагаемом субстрате прообразы уже готовых ценозов (да к тому же любые). Для этого волокна помещают в природный или искусственный субстрат со сформированной микрофлорой, которую хотят воспроизвести как исходную. Субстрат обрастает микрофлорой, а затем уже в сформированной системе происходит выращивание растений. При этом сукцессия все равно будет иметь место, так как физическая основа субстрата иная. Но начнется сукцессия с уже имеющейся, базовой микрофлоры, которая и станет основой.

Полная доступность субстрата и всех компонентов ценоза во всем объеме возможностей – от «болтушки» до нетронутой архитектуры – позволяет проводить изучение и контроль с исчерпывающей полнотой на всю глубину субстрата (от поверхности, контактирующей с атмосферой, «до дна»), на всю теоретически возможную шкалу увеличений, т. е. используя электронную оптику, и во всем диапазоне уже имеющихся молекулярных микроанализов. Субстраты такого типа могут стать перспективной основой для искусственных систем, поскольку обеспечивают полное разрешение – оценку, изучение и контроль всеми имеющимися методами. Кроме полностью искусственного субстрата, данная технология принципиально позволяет изучать структуру ценозов в естественных условиях. Из волокон можно изготовить пучок любого размера и длины, в том числе и для одного («одной штуки») растения (рис. 5, см. вклейку). Посеянное в него семя с предварительным или одновременным размещением пучка в природном субстрате обеспечивает свободное проникновение между во-



локнами всех компонентов такого субстрата (от растворов и коллоидов до микрофлоры). Растение будет расти практически в природных условиях, а изучение можно проводить на всю глубину при полном разрешении, обеспечиваемом элементами искусственного субстрата. Это обусловлено тем, что при использовании подобного материала в виде отдельного элемента (отдельного волокна, полоски, перфорированного листа и т. д.) такой элемент по отношению к природному субстрату становится неким его аналогом – «квазисубстратом». Любой природный субстрат гетерогенен по составу. И если в нем имеются биологически нейтральные микровключения (осколки стекла, керамики, кусочки пластмасс, шлаков и т. д.), то на них адсорбируются растворимые компоненты природного субстрата и поверхность таких нейтральных включений (по данному показателю – составу поверхности) через некоторое время уже не отличается от поверхности резидентных минеральных частиц.

Благодаря тому, что «квазисубстрат» пространственно может располагаться, облегать, проникать и т. д. в природный субстрат, он становится совместимым с ним, превращаясь в его составную часть. И образующийся на нем фрагмент микроценоза, по масштабам микроценоза, будет полноразмерным. А после изъятия «квазисубстрата» и изучения того, что на нем образовалось, все это – весь микроценоз в его ненарушенной архитектуре – становится полностью доступным на всю желаемую глубину (толщину) субстрата с градиентом существующих в нем условий.

Так появляется возможность изучать адекватный природному (фактически, его фрагмент любого размера) микроценоз в адекватной архитектуре. Становится он доступным и на всю ширину субстрата, т. е. по любому «размеру доступности». А сама организация размещения «квазисубстрата» в реальном природном субстрате может быть как непрерывной (сплошная пленка между, внутри, облегающая неоднородности реального субстрата и т. д.), так и квазинепрерывной, в виде пучка нитей; расположенных локально-кучно полосок или организованных в линию; перфорированной пленки. А затем это преобразуется в сплошную (после выравнивания вне субстрата) квазиплоскость, удобную

для изучения всего того и «всех тех», что на ней сформировались. Все это обеспечивает полную доступность для любого исследования в любом размере по площади и объему субстрата.

Уже первый анализ картин микроценозов при их визуализации по разработанной сохранной технологии позволил установить ряд определенных особенностей. Их можно сгруппировать в два крупных кластера, один из которых может быть обозначен как «особые состояния и взаимоотношения». Они оказываются достаточно необычными.

Пространственно-локальные микрозоны микроценоза состоят из «открытых» и «закрытых» участков, взаимодействующих между собой. «Открытые» участки микрозоны представлены микрообществами клеток, не отгороженных от окружающего пространства слизистым барьером (рис. 6, см. вклейку). При этом капсулы в таких системах могут присутствовать, но они окружают отдельные клетки, а не весь микроценоз. Благодаря открытости доступ других членов ценоза (из других участков) в такие зоны не имеет механических препятствий и образуются крайне гетерогенные контакты, которые особенно хорошо видны на гифах грибов (рис. 7). И это не артефактные «налипания», так как, по сути метода, налипание в процессе приготовления препарата исключалось (не было перемешивания, разбалтывания, растирания). Необычно выглядят и сами гифы. То ли под влиянием взаимодействующих с ними негрибных организмов, то ли под действием собственных внутренних процессов на их поверхности образуются выпячивания и создается впечатление, что это приводит к анастомозам, почкованию и каким-то вообще ни на что не похожим процессам (рис. 8). Для утверждения того, что вырост отпочковывается от гифы мицелия, пока данных недостаточно. Здесь необходимо проследить динамику процесса. Тем не менее, обратить на это внимание как на очень уж правдоподобное предположение стоит.

Но открытыми зонами микроценоз не ограничивается. Другой его вариант – «закрытые зоны». Эти зоны могут состоять из идентичных объектов и представлять собой изогенные (по составу) «зоны самоизоляции» (рис. 9). Конечно, самоизоляция таких зон весьма условна. Они даже пространственно

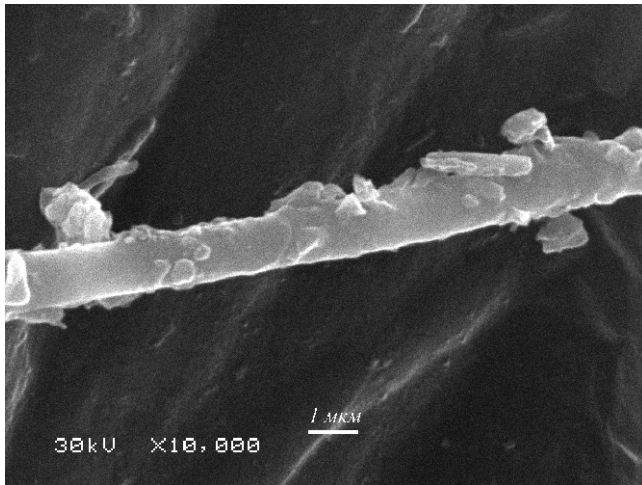


Рис. 7. Концентрация на гифе разных минеральных (по форме) образований и отдельных клеток бактерий (сканирующая электронная микроскопия)

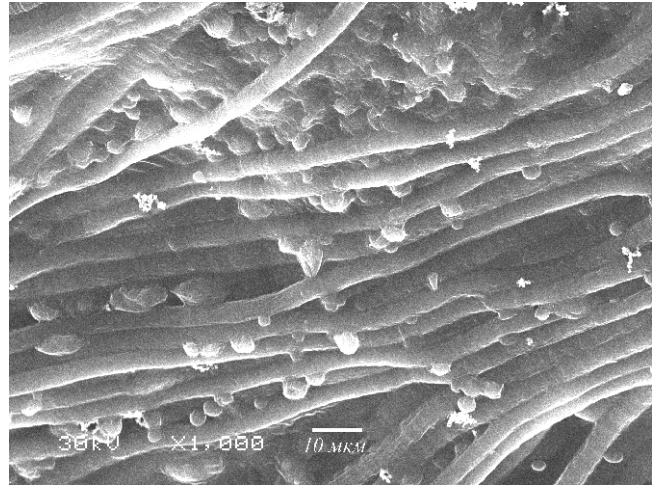


Рис. 8. Компактное расположение гиф грибов с образованиями – выпуклостями, анастомозами и т. д. (сканирующая электронная микроскопия)

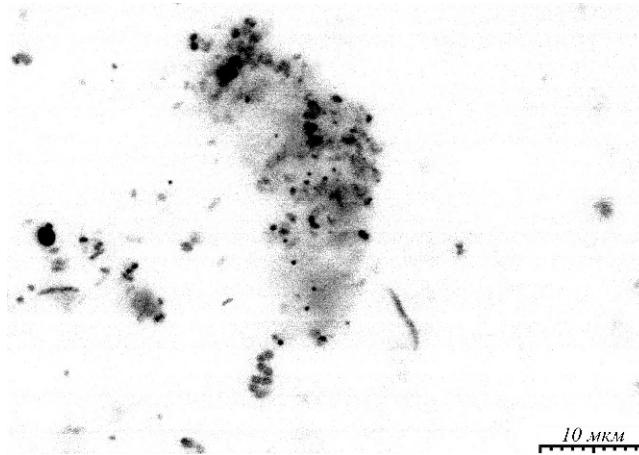


Рис. 9. «Закрытые зоны». Они организованы в виде общей слизистой капсулы, где находятся клетки микроорганизмов (сканирующая электронная микроскопия)

взаимодействуют, как закрытые зоны с открытыми, располагаясь в них (рис. 10, см. вклейку). Или как закрытые с закрытыми, контактируя (но без слияния) слизистыми капсулами (рис. 11, см. вклейку).

Закрытые зоны могут состоять из разных объектов, представляя собой в таких случаях гетерогенные зоны самоизоляции (рис. 12, см. вклейку). Внутри такой зоны ее компоненты ведут себя так, как если бы зона была открытая, а с внешними зонами взаимодействие может осуществляться и через слизистую капсулу, и через образование «межзонных» контактов.

Наконец, следует обратить внимание на достаточно часто встречающиеся отдельные клетки (рис. 13, см. вклейку). Оценить их статус пока не представляется возможным. Они могут вести активный образ жизни именно как отдельные клетки. Но могут являться лишь своеобразной «транспортной» формой, мигрируя между разными зонами, а могут быть и «посадочным материалом», создавая новые очаги роста зон.

Другой кластер – «кластер особенностей» связан с выявлением необычных и новых морфологических образований, которые (по их «внешнему виду», как это общепринято при оценках «общего количества») можно отнести к живым объектам. Это тот общепринятый субъективизм, который молчаливо узаконен при визуальном описании микрообъекта.

Очень необычно смотрятся некоторые простейшие. Так, на отдельных препаратах присутствуют, так и хочется написать, «наноинфузории» (рис. 14). Их размеры, конечно же не нано-, а микро-. Однако инфузории (судя по их морфологии), имеющие размеры в диапазоне 10 мкм и общий объем  $500 \text{ мкм}^3$  (это всего пять десятимиллионных кубического миллиметра!), – объекты весьма любопытные и «хорошо смотрятся».

Когда пишут о нанобактериях, то, как правило, описывают их после изоляции разрушительными

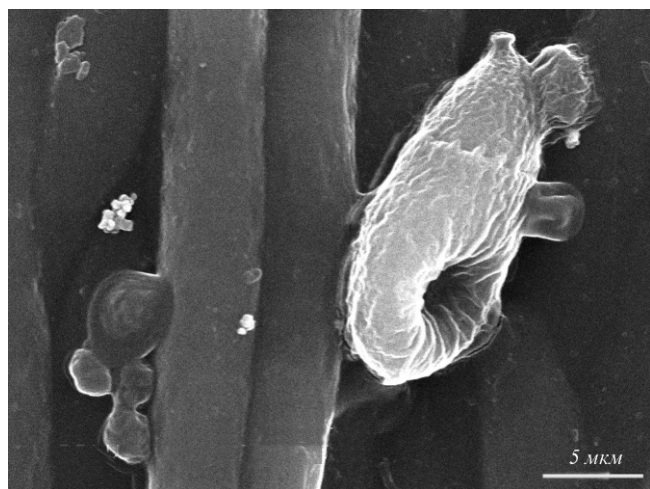


Рис. 14. «Наноинфузория». На «нано-» они не «тянут». Но они слишком мелкие и для инфузорий (сканирующая электронная микроскопия)

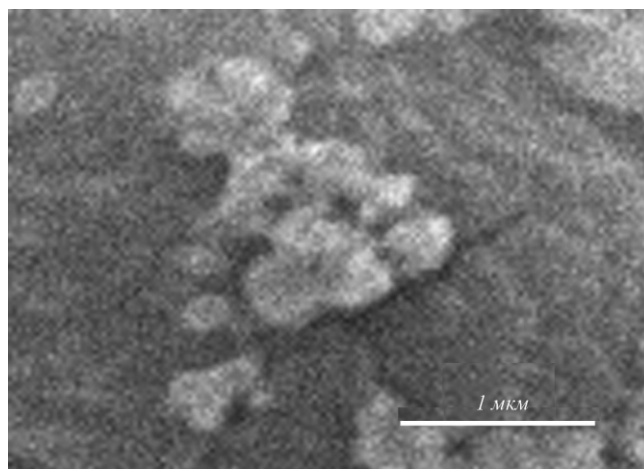


Рис. 15. Микроколония наноккокков. Или, чтобы отойти от занятого термина «кокки» с его морфологическими и молекулярными параметрами, – наноккоккоиды, то есть наноклетки округлой формы (сканирующая электронная микроскопия)

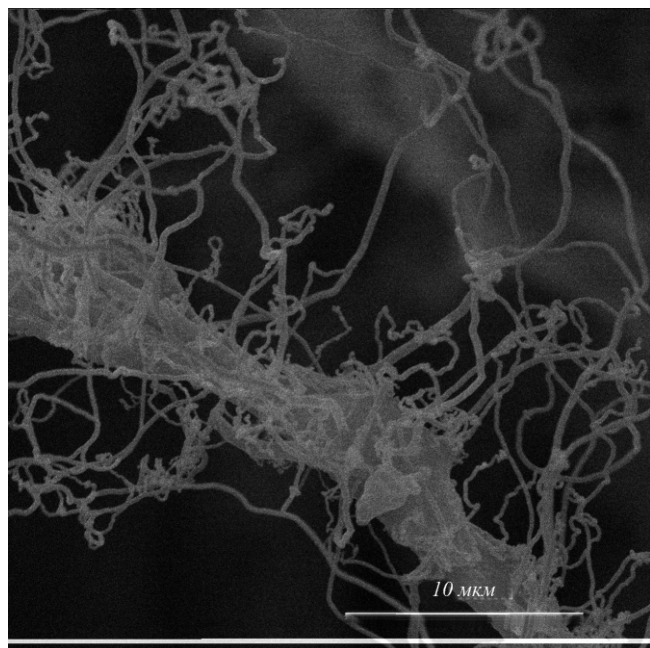


Рис. 16. Мицелий, который и для актиномицетов, и для грибов слишком тонкий. Очень интересны разветвления (ответвления) от более толстого (но тоже наноразмеров) до совсем тонкого – ниже критических 0,2 мкм (хотя за счет длины его объем будет выше критического) (сканирующая электронная микроскопия)

методами. При сохранной технологии их можно наблюдать в естественном пространственном расположении. И в тех случаях, когда они представлены микроколонией (рис. 15), можно утверждать, что имеет место их мультипликация именно как на-

ноформ, а не переход бактерий обычных размеров в наносостояние.

Интересны не такие уж и редкие разрастания наномицелия (рис. 16). Любые разрушительные методы разорвут его на мельчайшие фрагменты, которые уже невозможно будет идентифицировать как живое. Поэтому наномицелий в природных субстратах и не описывают. А он (по-видимому, за счет длины гиф, увеличивающей общий объем содержимого) может быть представлен нитями и менее критических 0,2 мкм в диаметре. Но, пожалуй, наиболее интересно то, что такой мицелий отрастет от более толстого, и происходит это как естественный процесс. Можно ожидать, что его тонкая ультраструктурная организация окажется весьма «нестандартной».

Приведенные выше формы (при всей их необычности), тем не менее, можно было теоретически предсказать (а наноккокки описаны и ранее).

Но благодаря сохранности архитектуры микроценозов при использовании новой технологии удалось визуализировать не просто новые «нано-», а геометрически новые нанообъекты. Один из них условно можно назвать «рожки улитки» (рис. 17). Ее «ножка» имеет толщину 0,2 мкм, «головка» 0,3 мкм, а общая длина приближается к 1 мкм. Наноформы сложной геометрии, да еще с морфологической дифференциацией являются полной нежиз-

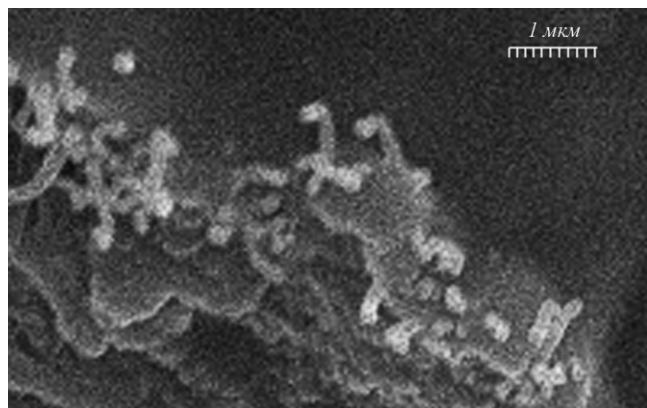


Рис. 17. Морфологически дифференцированное нанобразование – «рожки улитки» (сканирующая электронная микроскопия)

данностью. Тонкая ультраструктура здесь может оказаться столь же необычной и неожиданной.

Другой обнаруженный нанобъект еще более необычен – это какое-то «нанополостное» образование (рис. 18). Оно представляет собой некую структуру тонкого ( $0,1\text{--}0,2\text{ мкм}$ ) покрова, внутри которого имеется обширная полость, открывающаяся наружу. На некоторых участках препарата образование имеет вид торроида. Что это может быть, представить сложно, а согласно существующим «общепринятым» представлениям, вообще невозможно. При любом разрушительном методе такие формы либо полностью деградировали бы, либо превратились бы в нечто фрагментарно-аморфное. А по частоте встречаемости такие «нечто» представлены совсем не как исключения.

При обсуждении размеров биологических объектов (особенно мелких) может возникнуть вопрос о вкладе усыхания за счет испарения воды. Действительно, в случае значительной обводненности усыхание может сильно исказить истинность результатов измерений. Однако в случае нанобъектов ситуация совсем иная. Даже если бы обсуждалось состояние чистой воды в капилляре  $0,2\text{ мкм}$ , то и тогда ее поведение (в том числе и способность к испарению) отличалось бы от свободной воды радикально. Но в нанобъектах, соответственно их размерам и обязательному набору составляющих, для того чтобы жизнь могла реализовываться, свободной воде места не остается уже чисто простран-

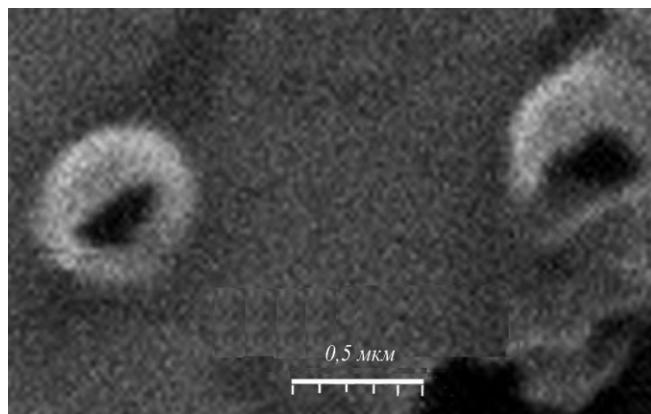


Рис. 18. Необычное образование с общим (внешним) диаметром  $0,5\text{ мкм}$ , основной объем которого составляет внутренняя полость, преимущественно открытая наружу (сканирующая электронная микроскопия)

ственно. И проблема усыхания как процесс, меняющий линейные размеры объекта, отсутствует. В жестких условиях, вакууме, даже прочно адсорбированная вода может испариться. Но упаковка макромолекул, липидов, минеральных составляющих и т. д., если конформационно в вакууме и изменится, то на общих размерах это уже отразиться не сможет. Кроме того, макро- и макромолекулы при плотной упаковке даже пространственно между собой взаимодействуют в основном не через воду. Так что измеряемые линейные размеры нанобъектов (величиной в первые десятые микрометра или, что то же самое, первые сотни нанометров) при той обработке, которая необходима для их наблюдения как в оптическом, так и электронном микроскопах, сколько-нибудь значительно измениться не смогут. Да и в литературе их принимают как истинные, без каких бы то ни было поправок «на усыхание».

Эластичный квазисубстрат позволяет делать ультратонкие срезы для трансмиссивной электронной микроскопии.

На рис. 19 приведена одна из таких фотографий только как доказательство возможности получения желаемых объектов микроценоза в виде препаратов для трансмиссивной электронной микроскопии. Для анализа же конкретного объекта необходимы его послойные срезы с последующей объемной реконструкцией.

При использовании таких терминов, как «полное разрешение», «возможность исчерпывающего

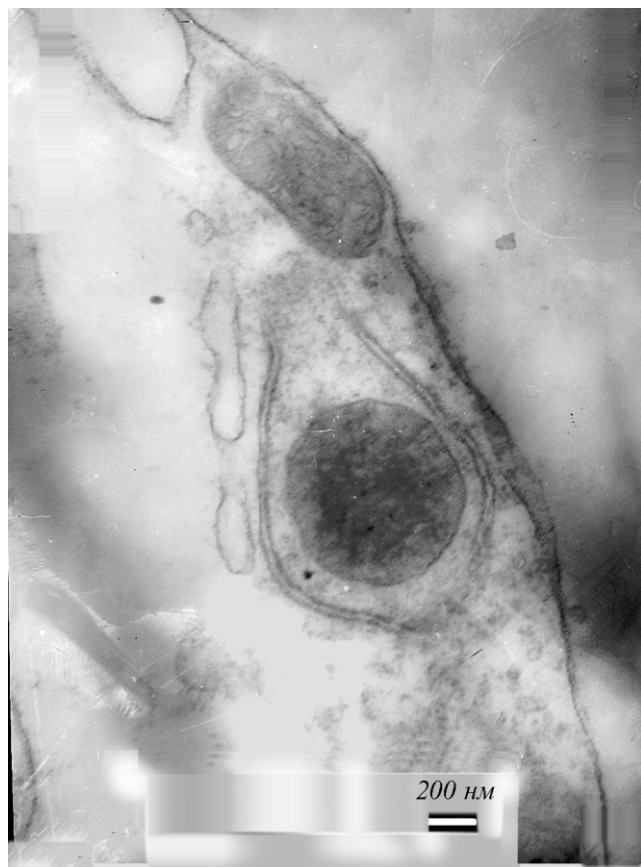


Рис. 19. Часть микроценоза в трансмиссивном электронном микроскопе. Срез мелкой эукариотной клетки и фрагмент слизистой капсулы, в которой эта клетка находится (трансмиссивная электронная микроскопия)

изучения» и др., следует определиться, что за ними стоит, что реально можно сделать, т. е. какое понятие, смысл этих терминов и не «вообще», а применительно к конкретно рассматриваемой проблеме. По отношению к микроценозам природных субстратов это означает принципиальную возможность, по логике исследования, последующих этапов (процедур).

Первой задачей является увидеть реальную архитектуру микроценоза и получить к ней доступ – всей целиком, отдельным участкам, отдельным клеткам. Только тогда можно и оценить то, что подлежит дальнейшему изучению и методической конкретизации такого изучения.

Следующим этапом как по логике исследования, так и по исторически сложившейся последова-

тельности этапов идет изучение морфологии, ультраструктуры конкретных компонентов ценоза.

Поскольку ценоз является сложной, по многим параметрам «взаимо-» многокомпонентной системой, то очевидным представляется максимальная визуализация такого «взаимо-» сначала на уровне «удерживающих» связей, «взаимо-» – на цитоморфологическом уровне, выявления непосредственных прямых, контактно-организованных вариантов гомо- и гетероклеточных «взаимо-».

Дальнейшим этапом может быть совмещение таксономии «по гомологии» с конкретными, теперь уже визуализированными представителями ценоза (например, фиш-методом).

Поскольку современная технология позволяет работать с отдельными клетками (изолировать их, изымать поштучно из общей массы и переносить «куда надо» – при помощи микроманипуляторов или лазерных пинцетов; определять последовательности участков генома при помощи моноклеточных ПЦР-систем, капиллярного электрофореза, последующих клонирования и секвенирования и т. д.), то любая выбранная из них в составе архитектуры может быть изолирована и изучена с любой степенью исчерпанности.

Определение биохимического состава как клеточных, так и неклеточных компонентов микроценоза может быть обеспечено возможностями оптической и электронной цито- и иммунохимии.

Наконец, в «острых опытах» (т. е. относительно кратковременных) непосредственно в живом материале под микроскопом или после фиксации можно определить трофические реакции компонентов ценоза за счет предварительного добавления *ex vivo* различных веществ и изучения реакции на них. Это – возможная и доступная для выполнения логика исследований микроценозов в их природной архитектуре. Пока из всего этого осуществлены только создание новой технологии полного разрешения природных микроценозов и первый этап их изучения – визуализация, определение расположения, взаиморасположения, контактов, форм и размеров компонентов микроценозов, т. е. этап феноменологический. Но с создания новых технологий доступа к объектам, а затем феноменологии

начинається все и всегда. Именно эти два первых шага сделаны.

V. A. Kordium, E. V. Moshynets, M. V. Tsapenko,  
N. I. Adamchuk-Chalaya, D. M. Irodov, V. I. Andrienko,  
S. P. Shpilevaya

Microcosm of living: evidence of nonobviousness

Summary

*In current biology there is a pronounced asymmetry in our knowledge of life. All essential results in molecular biology, molecular genetics, and biochemistry are accomplished on rather limited model objects. Thus, a general concept of life is based on these few results, and this inadequate understanding of life has been extrapolated to the whole Biosphere. Such approach is reasonable for eukaryotes due to their fundamental universality in genome organization. However, for prokaryotes, which are mainly uncultivable and hardly accessible in their natural substrata even for direct observation, such approach is unjustified. The concept of a potentially universal method for studying micro-world in natural substrata is formulated in the article, the results of method application are shown.*

*Keywords: micro-community, uncultivable forms, unusual forms, nondestructive method.*

В. А. Кордюм, О. В. Мошинець, М. В. Цапенко,  
Н. І. Адамчук-Чала, Д. М. Іродов, В. І. Андрієнко,  
С. П. Шпильова

Мікросвіт живого – очевидність неочевидного

Резюме

*У сучасній біології існує яскраво виражена асиметрія вивченості/невивченості живого світу. Всі основні результати молекулярної біології, молекулярної генетики, біохімії отримано*

*на невеликій кількості модельних об'єктів. На базі цих результатів і створюється уявлення про живе. А далі такі уявлення екстраполюють на всю Біосферу. Для еукаріотів (завдяки їхній фундаментальній єдності за критерієм організації геному) це є обґрунтованим. Але для прокаріотів, які в основній своїй більшості не ростуть на живильних середовищах в лабораторії та мало доступні в природних субстратах навіть для прямих методів аналізу, подібний підхід не виправданий. В роботі викладено принцип організації потенційно універсального методу вивчення мікросвіту в природних субстратах і наведено перші результати його застосування.*

*Ключові слова: мікроценоз, некультурабельні форми, незвичайні форми, недеструктивний метод.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaplan R. W. On the numbers of external, extinct and possible species of organisms // Biol. Zbl.–1985.–**104**.– P. 647–653.
2. Громов Б. В. Строение бактерий.–Л.: Изд-во ЛГУ, 1985.–190 с.
3. Никитин Д. И., Васильева Л. В., Лохмачева Р. А. Новые редкие формы почвенных микроорганизмов.–М.: Наука, 1966.
4. Виноградский С. Н. Микробиология почвы.–М.: Изд-во АН СССР, 1952.–792 с.
5. Perfil'ev B. V., Gabe D. R. Capillary methods of investigating micro-organisms [translated from the Russian] by J. M. Shewan].–Edinburgh: Oliver & Boyd, 1969.
6. Buckley D. H., Schmidt T. M. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems // Environ. Microbiol.–2003.–**5**.–P. 441–452.
7. Gregory P. J. Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science?// Eur. J. Soil Sci.–2006.–**57**.– P. 2–12.

УДК 573.4

Надійшла до редакції 03.04.08

Рисунки до статті В. А. Кордюма та співавт.



Рис. 5. Пример возможного размещения элементов «квазисубстрата» в природном субстрате. Вокруг (на разном расстоянии от растения) расположены волокна. Любое из них можно легко вынуть из почвы в любое время и исследовать на всю глу-

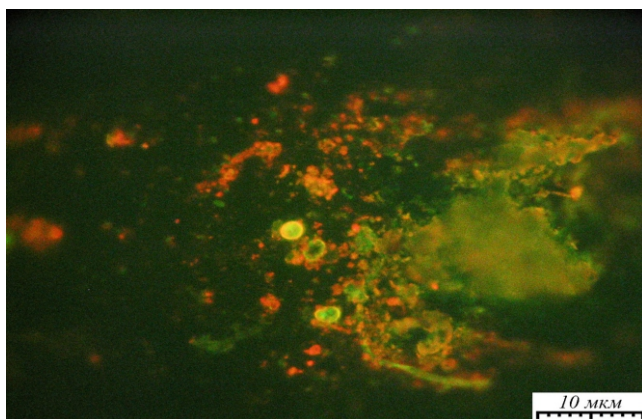


Рис. 6. «Открытые ценозы». В них клетки расположены компактно, но открыто по отношению к внешнему пространству. Окраска акридиновым оранжевым

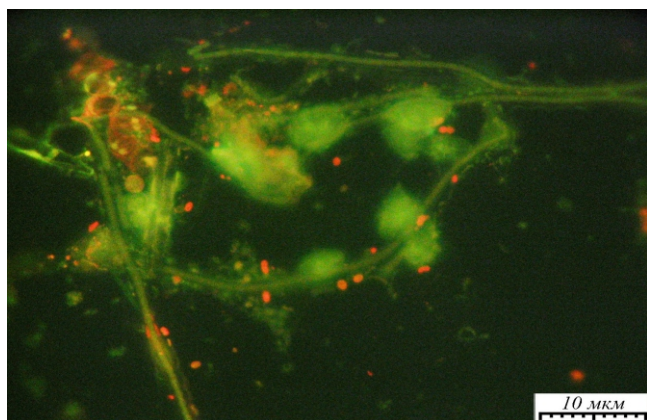


Рис. 10. Взаиморасположение закрытых зон в открытых зонах может быть результатом особенного взаимодействия. Обращает на себя внимание отсутствие резких контрастных границ между зонами. Окраска акридиновым оранжевым

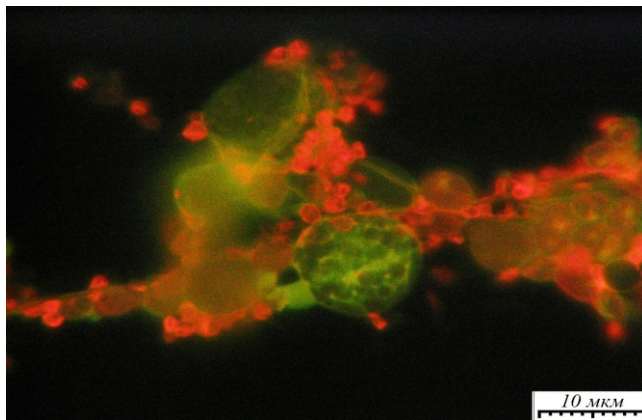


Рис. 11. Взаимодействие между собой закрытых зон. Обращает на себя внимание то, что сомы не сливаются, для их взаимодействия формируются специальные соединительные структуры. Окраска акридиновым оранжевым

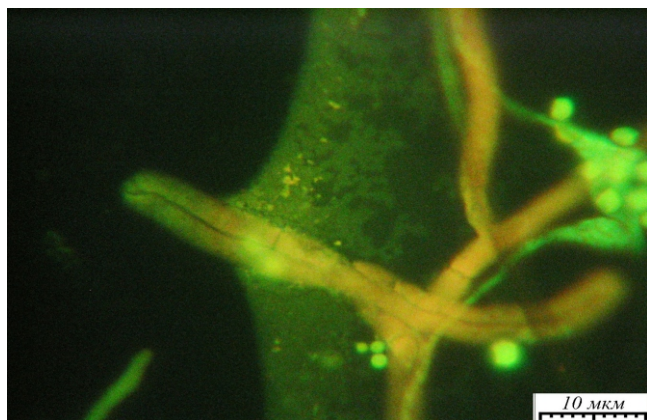


Рис. 12. Закрытые гетерогенные зоны. Они состоят из общей слизистой капсулы, где расположены взаимодействующие (контактно и дистанционно) клетки разных микроорганизмов. Окраска акридиновым оранжевым

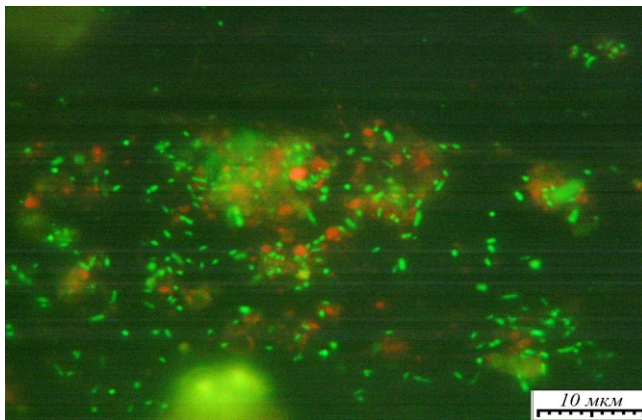


Рис. 13. Отдельно расположенные клетки в микроценозе. Это не колония (слишком большое расстояние между клетками), но и не случайное распределение (слишком большое микропространство они занимают и уж слишком не среднестатистически)