

УДК 573.6 : 579.844

Е.М. ПАНКРАТОВА, Р.Ю. ЗЯБЛЫХ, А.А. КАЛИНИН,
А.Л. КОВИНА, Л.В. ТРЕФИЛОВАВятская гос. с.-х. академия, кафедра ботаники, физиологии растений и микробиологии,
Россия, 610017 Киров, Октябрьский просп., 133**КОНСТРУИРОВАНИЕ МИКРОБНЫХ КУЛЬТУР НА ОСНОВЕ
СИНЕЗЕЛЕННОЙ ВОДОРОСЛИ *NOSTOC PALUDOSUM* KÜTZ.**

Осуществлено формирование на основе аксеничной культуры *Nostoc paludosum* Kütz. устойчивой искусственной симбиотической ассоциации с популяциями хемоорганотрофных бактерий *Rhizobium leguminosarum*, *Rh. galegae*, *Agrobacterium radiobacter* и *Pseudomonas fluorescens*. Такая ассоциация сохраняла состав и активность при высушивании и длительном культивировании на жидкой минеральной среде в коллекции при стабильных условиях. Установлено, что подселенные к *N. paludosum* бактерии проникают в его околочлеточную слизь, что увеличивает контакт между консортиями и выживание вселенцев. Показана результативность использования искусственных альгобактериальных ассоциаций в агробиотехнологии.

Ключевые слова: синезеленые водоросли, хемоорганотрофные бактерии, искусственные симбиотические ассоциации, устойчивость.

Введение

Синезеленые водоросли являются перспективными объектами биотехнологии. Благодаря наличию фотосинтеза (и у многих видов азотфиксации) их накопительные культуры могут быть получены при минимальных затратах. Они обладают комплексом ростактивирующих веществ и положительно действуют на корневую систему (Романова и др., 1983; Калинин, 1995; и др.), улучшают плодородие почвы, увеличивают в ней содержание азота (Fogget al., 1973; Панкратова 1987; и др.), стимулируют активность почвенной биоты благодаря накоплению органических веществ (Панкратова, Мезенцева, 1985; Мезенцева, 1992), оказывают фитосанитарный эффект (Соколов и др., 1996; Pankratova et al., 2002). Следовательно, синезеленые водоросли могут быть рекомендованы для использования в агробиотехнологии в случае разработки методов и приемов повышения эффекта их функционирования в почве.

В природе синезеленые водоросли существуют в сообществах, включающих различные хемоорганотрофные бактерии. Согласно литературным данным, становление функциональных особенностей синезеленых водорослей происходило в процессе коэволюции с бактериальными спутниками, объединившимися с ними в общую биологическую единицу (Панкратова, 2001; Герасименко, Ушатинская, 2002; Заварзин, 2003; и др.), не утрачивая при этом свою индивидуальность, что характерно для многих типов симбиозов (Douglas, 1994).

Высокая интегрированность альгобактериальных сообществ осложняет их расчленение на хемоорганотрофный и фототрофный консорты (consort = участник), что подтверждается трудностью получения аксеничных культур и сохранения их жизнеспособности.

© Е.М. Панкратова, Р.Ю. Зяблых, А.А. Калинин, А.Л. Ковина, Л.В. Трефилова, 2004

Однако признавая ключевым свойство тесных межорганизменных отношений между фототрофным и гетеротрофным участниками сообщества, исследователи отмечают вариабельность численности и видового состава бактериальных популяций (Андреюк и др., 1990), что направлено на адаптацию сообществ к меняющимся *in situ* условиям среды (Панкратова, 1998, 2001). Непостоянство характеристик бактериальных участников сообщества – одна из причин низкой воспроизводимости результатов экспериментов по использованию *Cyanophyta* в богарном земледелии (Штина и др., 1972).

Можно попытаться полностью заменить естественные бактериальные спутники синезеленых водорослей на заранее запрограммированную микрофлору направленного действия. Этот путь предполагает использование в экспериментах аксеничной культуры водорослей, т.е. методику разделения альгобактериальной ассоциации на компоненты: фототрофный – аксеничная культура водоросли – и гетеротрофный – бактерии спутники, затем снова ресинтезировать его. При этом автотрофный компонент данного сообщества остается тем же, а в гетеротрофном компоненте малоэффективные в биотехнологическом отношении бактериоспутники будут заменены высокоэффективными.

Цель работы – создание на основе аксеничной культуры *Nostoc paludosum* Kütz. искусственных симбиотических ассоциаций с видами бактерий, широко используемых в настоящее время в агrobiопрепаратах *Rhizobium leguminosarum*, *Rh. galegae*, *Azospirillum lipoferum*, *Agrobacterium radiobacter* и *Pseudomonas fluorescens* (Кожемяков, Тихонович, 1998). Предстояло изучить выживаемость партнеров при совместном культивировании, определить структуры формирующихся ассоциаций. Одной из задач было сравнительное исследование их эффективности путем инокуляции семян *Galega orientalis* Lam. созданной бинарной культурой и стандартной монокультурой *Rh. galegae*.

Материалы и методы

В работе использовали коллекционный штамм ВГСХА *Nostoc paludosum* Kütz., шт. 18, выделенный в альгологически – чистом состоянии из дерново-подзолистой почвы Кировской обл. (Штина, Панкратова, 1983). Методика получения штамма в аксеничном состоянии описана нами ранее (Панкратова, Калинин, 1994; Калинин, 2000), а контроль за чистотой его от бактериальной микрофлоры проводили прямым микроскопированием и высевом культуральной жидкости на среды МПА и Эшби.

При составлении ассоциативных культур использовали бактерии *Rhizobium leguminosarum*, шт. 1022 и шт.1026; *Rh. galegae*, шт. 0702, *Agrobacterium radiobacter*, шт. 17, *Azospirillum lipoferum*, шт. РИП-22, полученные из коллекции ВНИИСХ микробиологии (С.-Петербург) и *Pseudomonas fluorescens*, шт. АВХ – из коллекции того же института. Критерии их подбора приведены ниже.

Аксеничную культуру *N. paludosum* выращивали на безазотистой среде Громова № 6 (Громов, Титова, 1983) в колбах Эрленмейера на 100 см³ в люминистате при досвечивании 2–3 тыс. лк в течение 10 ч и температуре 23–25 °С. Эту же среду и режим использовали при выращивании синтрофных ассоциаций. Бактерии культивировали на следующих средах: *Rh. leguminosarum* и *Rh. galegae* – на бобовом отваре (Теппер и др., 1987); *A. radiobacter* и *A. lipoferum* – на среде

ДАС (Берестецкий и др., 1985); *P. fluorescens* – на среде Кинг Б (Смирнов, Киприанова, 1990).

Инокуляцию культуры водоросли проводили добавлением стандартизованной по оптической плотности до 10^7 – 10^8 кл/мл монобактериальной водной суспензии. Численность бактерий в процессе опыта определяли чашечным методом и выражали в КОЕ/мл. В зависимости от целей конкретного опыта изменялась его длительность (от 10 дней и нескольких месяцев до 1,5 лет или вегетационного периода в опытах с растением), сроки наблюдения и условия хранения искусственных (смешанных) культур.

Рост аксеничной и смешанных культур определяли по увеличению биомассы (сухое вещество), содержанию хлорофилла *a* (Методы ..., 1975), по оптической плотности на спектрофотометре (VSUZ-G CARL Zeiss. Iena DDR) и содержанию белка (Lowry et al., 1951).

Нитрогеназную активность определяли методом ацетиленовой редукции (Hardy et al., 1973) на хроматографе «Цвет-101» с пламенно-ионизационным детектором и колонкой Rogarak Q. В качестве газа - носителя использовали аргон с подвижной скоростью 50 мл/мин.

Длительное выживание (до 18 месяцев) искусственных симбиотических ассоциаций изучали на примере смеси популяций *N. paludosum* и *Rh. leguminosarum* в стабильных условиях жидкой культуры, при хранении в почве и в лиофилизированном материале. Жидкую культуру выращивали при указанных выше условиях, через каждые 30 дней для определения жизнеспособности проводили высевы бинарной культуры на агаризованную среду Громова № 6. Параллельно исследовали выживаемость организмов при длительном хранении в воздушно-сухой дерново-подзолистой почве в двух вариантах опытов.

В первом варианте в чашку Петри помещали стерильную почву (тепловая стерилизация 1,5 атм. дважды через одни сутки) и вносили суспензию инокулята из расчета 2 г сухой биомассы и $0,9 \times 10^6$ численности бактериальных клеток на мл среды так, чтобы влажность почвы составляла 60 % п.в. Содержимое чашки Петри перемешивали и инкубировали 10 суток, затем доводили до воздушно-сухого состояния в стерильных условиях. Контрольные посевы проводили через 1 и 6 месяцев после инкубации.

Во втором варианте в чашках Петри на почве получали альгобактериальный «газон» путем посева бинарной культуры на поверхность и экспонирования в люминистате около месяца до выраженного «цветения» почвы. «Газон» анализировали через 2 месяца после высушивания почвы до воздушно-сухого состояния. Численность ризобий определяли на бобовом агаре, выживаемость синезеленых – по появлению гормогониев после посева на агаризованную среду Громова № 6 при досвечивании.

Для сохранения искусственных симбиотических ассоциаций в коллекции проводили лиофильную сушку образцов по общепринятой методике с защитной средой: желатин (1 г), сахараза (10 г), вода дистиллированная – 100 мл (Руководство ..., 1983).

Локализацию подселенных к аксеничной культуре ностока бактерий исследовали способом негативного контрастирования слизи с окраской раствором конгорот и с помощью жидкой туши по методу Бурри (Руководство ..., 1983). Препараты просматривали в проходящем свете в фазовом контрасте на

микроскопе МБИ – 15, микрофотосъемку проводили на микропластинах типа «Микро» при инструментальном увеличении $\times 2150$ и $\times 2610$. Прежде всего, внимание было обращено на исследование слизистых чехлов нитей ностока, которое проводили в живом нефиксированном виде двумя методами: 1) с помощью окрашивания раствором конгорот; 2) исследования общепринятым методом Бурри. В первом случае можно было отчетливо видеть нити цианобактерий и светлый ореол вокруг них, принадлежащий слизистому чехлу. При втором способе просмотр проводили в фазовом контрасте, когда нити ностока становились темными, а чехлы – светлыми.

Эффективность бинарной культуры *N. paludosum* + *Rh. galegae* изучали в опытах на примере козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.) сорта Гале. Опыт заложен в двух вариантах: контроль – инокуляция семян популяцией *Rh. galegae*, шт. 0702 и вариант с инокуляцией семян бинарной культурой *N. paludosum*, шт. 18 + *Rh. galegae*, шт. 0702. Семена перед посевом скарифицировали. Численность бактерий 10^7 – 10^8 кл/мл. Доза увлажнения на гектарную порцию семян (12 кг) – 1 л. Площадь делянки $1,8 \text{ м}^2$, повторность шестикратная. Почва дерново-подзолистая среднесуглинистая, имеющая следующие агрохимические показатели: pH_{KCl} 5,6; гумус 1,73 %; P_2O_5 36,4 и K_2O 32,8 мг/100 г почвы; сумма поглощенных оснований 6,8 и гидролитическая кислотность 3,4 мг экв./100 г почвы. Объем корневой системы определяли после выкопки монолита почвы с $0,25 \text{ м}^2$ на глубину 0,5 м, путем отмывания корней и определения их объема по вытесненной воде. Клубеньки подсчитывали и отбирали для определения нитрогеназной активности по стандартной методике (Посыпанов, 1991).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили общепринятыми методами (Вознесенский, 1969; Плохинский, 1980).

Результаты и обсуждение

Критерии подбора микроорганизмов при составлении микробных культур

Эдификатором синтрофных ассоциаций являлся *N. paludosum* как первичный продуцент органического вещества, на основе прижизненных выделений которого может существовать искусственный микрокосм. Вид широко распространен в почвах (Штина, 1959). Его физиолого-биохимические особенности и экологические требования достаточно изучены (Гусев, Никитина, 1979). При культивировании отличается от многих других видов синезеленых водорослей высокой азотфиксацией и быстрой скоростью нарастания биомассы (Панкратова, Калинин, 1991). Есть опыт его использования в земледелии (Штина и др., 1971; Калинин, 1995; Трефилова и др., 1998; Ковина, 2001). Ностоку предназначается не только роль носителя, консерватора бактерий и энергогенератора, но и самостоятельное действие на почву и растения в качестве сильного азотфиксатора и стимулятора роста.

Имеются сообщения, что клетки, принадлежащие к роду *Nostoc* Vauch., обнаружены в клубеньках Египетского клевера – *Trifolium alexandrinum* L. (Venkataraman, 1960) и клубеньках других растений (Gallon, 1998). Это предполагает видовую совместимость клубеньковых бактерий и ностока. В

большинстве исследований мы использовали *Rhizobium leguminosarum* как типовой вид семейства *Rhizobiaceae* Conn.

Наряду с этим, *Agrobacterium radiobacter* и *Pseudomonas fluorescens* обнаружены как естественные спутники многих синезеленых (Андреюк и др., 1990). Это дает основу для введения в бинарную культуру отселектированных во ВНИИСХМ штаммов указанных бактерий и делает реальным предположение о преодолении барьера несовместимости, который многими авторами связывается с выделением синезелеными водорослями бактерицидных веществ (Громов, 1996; Сиренко, Кондратьева, 1998). *Azospirillum lipoferum* не был обнаружен в составе естественных сообществ синезеленых водорослей, но штамм этого вида РИП-22, выделенный из дерново-подзолистых почв Ленинградской обл., признан перспективным в агробиотехнологии (Васюк, 1985).

Совместимость микробных популяций в искусственных симбиотических ассоциациях

Результаты опыта с бинарными сочетаниями консортов показали, что *N. paludosum* не является агрессивным по отношению к бактериям *P. fluorescens* (рис. 1), *A. radiobacter* и *Rh. leguminosarum* (рис. 2). В то же время, популяция *A. lipoferum* уже на 15 сутки элиминируется из совместной культуры с *N. paludosum* (см. рис. 1). Судя по динамике содержания хлорофилла *a*, скорость роста ностока в присутствии размножающихся в культуре бактерий увеличивается. Это подтверждает уже установившееся мнение, что аксеничные культуры растут хуже, чем альгологически чистые.

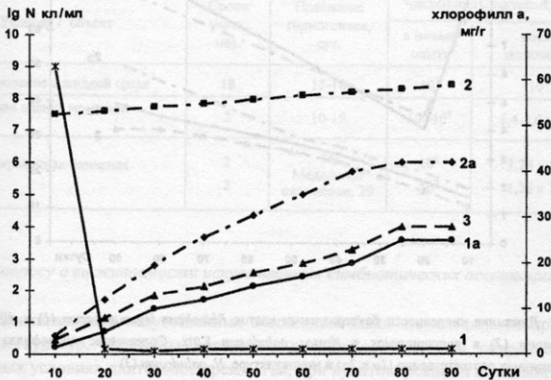


Рис. 1. Динамика численности бактериальных клеток и содержания хлорофилла *a* в композитах *Nostoc paludosum* Kütz + *Azospirillum lipoferum* (1 и 1a); *N. paludosum* + *Pseudomonas fluorescens* (2 и 2a). Динамика содержания хлорофилла *a* в монокультуре (3).

Экстенсивные бинарные культуры могли расти при заданных условиях приблизительно до 80 суток, а затем выходили на стационарную фазу, что, однако, не снижало размножения бактерий.

Динамика численности бактериальных клеток в композитах *N. paludosum* + *Rh. leguminosarum*, *N. paludosum* + *A. radiobacter* была иной (см. рис. 2), чем в композите, созданном при участии *P. fluorescens* (см. рис. 1). В первые дни совместной культуры ностока с ризобиями и агробактериями численность клеток подсеянных бактерий резко снижалась (см. рис. 2, 1, 2). С увеличением биомассы ностока (см. рис. 2, 3) она увеличивалась, что показывает ее зависимость от развития продукционной ветви бинарной культуры. Это становится очевидным, когда две популяции двух видов (*N. paludosum* + *Rh. leguminosarum*) смешиваются не одновременно, т.е. хемоорганотрофный организм подсеивается к культуре фототрофа, вступившего в логарифмическую фазу роста (рис. 3). В этом случае численность популяции ризобий в бинарной культуре увеличивается примерно на порядок. Однако межорганизменные взаимодействия, включающие, вероятно, кооперацию как взаимовыгодные отношения, осуществляются и на ранних стадиях развития бинарной культуры при его низкой оптической плотности (табл. 1). На начальную фазу интеграции партнеров указывает значимое повышение нитрогеназной активности и содержание белка, которые могут служить сигнальными взаимодействиями для дальнейшего развития бинарной культуры.

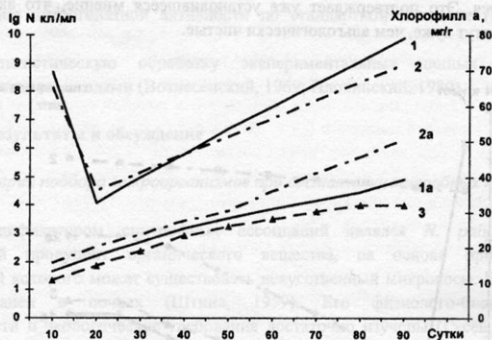


Рис. 2. Динамика численности бактериальных клеток *Rhizobium leguminosarum* (1) и *Agrobacterium radiobacter* (2) в консорциумах с *Nostoc paludosum* Kütz. Содержание хлорофилла в тех же консорциумах соответственно (1а и 2а) и монокультуре *N. paludosum* (3).

Близкое родство видов р. *Rhizobium* и р. *Agrobacterium*, принадлежащих к одному семейству *Rhizobiaceae* Conn, по-видимому, обуславливает сходную динамику развития их популяций в составе искусственных симбиотических ассоциаций на основе фототрофного организма (см. рис. 2).

Бинарная культура *N. paludosum* + *A. radiobacter* была усложнена за счет введения в нее *P. fluorescens* (рис. 4). Условия сосуществования микроорганизмов в поликультуре (3 консорта) вырабатываются в процессе взаимодействия разных популяций. На определенных этапах развития культуры (рис. 4, 1, 2) наблюдается зеркальная динамика численности клеток бактериальных консортов, что не исключает конкуренции за какой-либо фактор. Однако в месячной культуре внутривидовые взаимоотношения хемотрофных бактерий, вероятнее всего, переходят на биологическое взаимодействие по типу кооперации (нейтрализма?), и смешанная популяция достигает гомеостатического состояния.

Таблица 1. Рост, нитрогеназная активность и содержание белка в компонентах и исходной культуре *Nostoc paludosum* Kütz. (10-й день культивирования)

Организмы	Оптическая плотность*	Нитрогеназная активность, нмоль C ₂ H ₄ /мг белка/мин	Содержание белка, мг
<i>Nostoc paludosum</i> , шт. 18	0,93±0,02	0,42±0,09	4,00±0,37
<i>N. paludosum</i> + <i>Rhizobium galegae</i> , шт. 0702	0,98±0,03	1,09±0,17	4,84±0,06
<i>N. paludosum</i> + <i>Agrobacterium radiobacter</i> , шт. 17	0,94±0,04	1,10±0,20	6,28±0,18

* Показания спектрофотометра (мутность, интенсивность окраски).

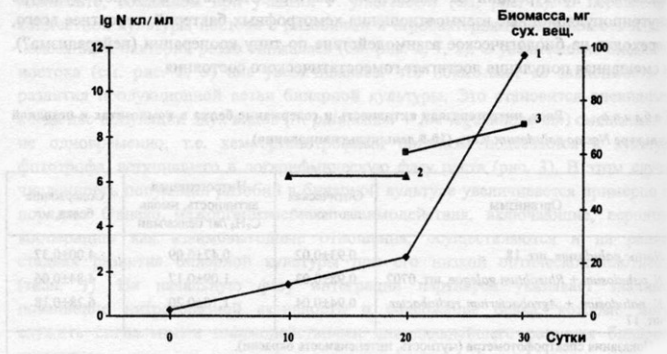
Таблица 2. Выживаемость бинарной культуры *Nostoc paludosum* Kütz. + *Rhizobium leguminosarum* во времени и при разных условиях высушивания

Условия / объект	Сроки учета, мес.	Появление гормонов, сут.	Численность бактерий, кл/мл	
			в начале опыта	после экспозиции
Культивирование в жидкой среде	18	15-18	10 ⁷	10 ⁵
Высушенная пленка месячной культуры	2	10-15	10 ⁶ -10 ⁷	1,4-2,0 × 10 ⁶
Лиофилизированная бинарная культура	2	15 Медленное оживление, 29	10 ⁶	1,24 × 10 ⁴
	2		10 ⁶	1,28 × 10 ³

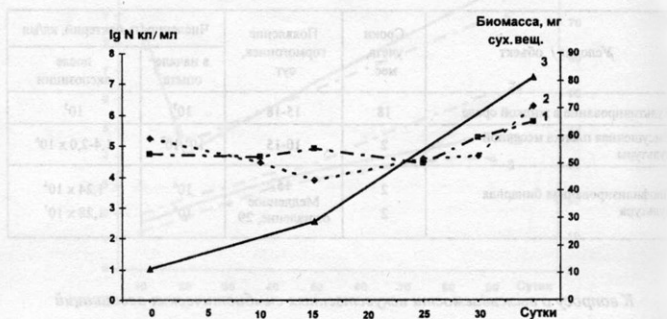
К вопросу о выживаемости искусственных симбиотических ассоциаций

Выживаемость искусственных ассоциаций была исследована на примере бинарных культур. Культуры ностока с ризобиями способны сохраняться в стерильных условиях длительное время. Так, при культивировании в жидкой среде целостность системы *N. paludosum* + *Rh. leguminosarum* сохранялась в течение всего срока наблюдения – 18 месяцев (табл. 2). Анализ жизнеспособности при культивировании в этих условиях бинарной популяции *N. paludosum* + *Rh. galegae* не обнаружил отличий от предыдущей бинарной культуры с *Rh. leguminosarum* (данные не приведены).

Полученные консорты хорошо переносили высушивание: фототрофный консорт с неизменной скоростью возобновлял рост после высыхания до воздушно-сухого состояния в пленке; будучи диффузно распространенным в почве; и при высушивании «газонов», развившихся на ее поверхности (см. табл. 2).



Фиг. 3. Влияние количества биомассы *Nostoc paludosum* Kütz. (1) на численность клеток при разных сроках его подсева в культуру: на 10-е (2) и 20-е сутки (3).



Фиг. 4. Динамика численности клеток *Pseudomonas fluorescens* (1) и *Agrobacterium radiobacter* (2) в совместной культуре с *Nostoc paludosum* Kütz. (3). Инокуляция популяций проведена на 15-е сутки культивирования *N. paludosum*.

Сохранение жизнеспособности ностока при высушивании не удивительно, ибо известна его способность к оживлению после хранения десятков лет в гербарии и в эксикаторе над серной кислотой (Панкратова, 1987). Медленное оттаивание отмечено после лиофильной сушки бинарной культуры и анализа после двухлетнего хранения (появление гормогониев через месяц после посева).

Жизнеспособность консорт сохранялась во всех модификациях при высушивании, но численность бактерий (КОЕ) со временем снижалась по сравнению с началом опыта почти на порядок при длительном культивировании в жидкой среде, при высушивании пленок и лиофилизации материала. Напротив, при хранении бинарной культуры в диффузном состоянии в стерильных условиях воздушно-сухой почвы и в виде «газонов» на ее поверхности численность бактериальных вселенцев оставалась постоянной.

Структура искусственных симбиотических ассоциаций

Стабильность бинарной культуры подтверждает предположение о том, что при его создании возникает упорядоченная структура. В качестве примера приводим результаты работы с бинарной культурой, составленной из азотфиксирующей культуры *N. paludosum* и *Rh. leguminosarum*. Для определения местонахождения бактериального консорта опыт проводили по следующей очередности процедур.

После совместного культивирования бинарной популяции в течение одного месяца культуру дважды центрифугировали при 1000 г в течение 5 мин, отмывая клетки фототрофа от среды путем ресуспензирования в свежую среду. Затем биомассу заливали 15 см³ свежей среды и подвергали встряхиванию на качалке в течение 1 ч. Таким образом, старались освободиться от той части бактерий, которая находилась в культуральной среде или была адсорбирована. В исходной культуре (биомасса + культуральная среда) численность клеток бактерий была 10⁸/мл; после двойного промывания и встряхивания на качалке — 1,75 · 10⁵ кл/мл суспензии; после двойного промывания, центрифугирования, встряхивания на качалке и растирания до суспензии в ступке с 15 см³ свежей среды Громова № 6 — 0,3 · 10⁴ кл/мл. Следовательно, основное количество клеток ризобий сосредотачивается в биомассе ностока, причем часть их, вероятнее всего, прочно удерживается. Подтверждение было получено с помощью микрофотографирования и фотографирования «промывтой» бинарной культуры. На рис. 5 видно, что бактерии находятся в слизи, окружающей клетки ностока. Они сосредотачиваются преимущественно вдоль нити и гетероцист и, наконец, форма бактерий, несомненно, кокковая, а не палочковидная, как это свойственно клеткам ризобий. Однако контрольные посева на бобовый отвар обнаружили трансформацию ее в обычные подвижные граммотрицательные палочки размером 0,5-0,9х1,2-3,0 мкм.

Цитологические изменения клеток *Rh. leguminosarum*, выделенных из корней *Vicia faba* L, отмечены в совместной культуре, правда, с зеленой водорослью *Chlamydomonas reinhardi* Dang. (Dryanovska, Zakova, 1985). Следует отметить, что в неблагоприятных для роста условиях клетки *Rhizobium* обычно плеоморфны (Краткий ..., 1980).

Таким образом, бактериальный вселенец распределяется в культуральной жидкости, адсорбируется на нитях ностока и проникает в его околочлеточную слизь. Последнее, по-видимому, и способствует самовозобновлению бинарной культуры.

Эффективность действия бинарной культуры на растения

Приводим один из результатов опыта по сравнению эффективности бактериализации семян монобактериальной популяцией *Rh. galegae* и искусственной симбиотической ассоциацией *N. paludosum* + *Rh. galegae* (табл. 3).

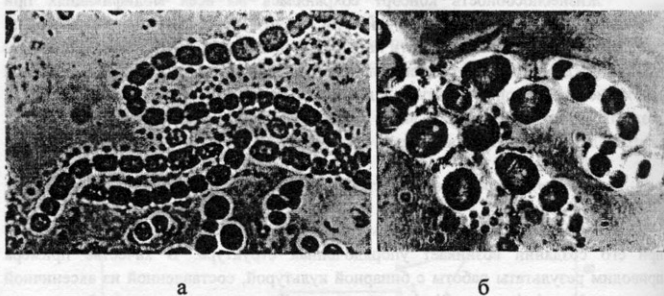


Рис. 5. Капсулирование клеток *Rhizobium leguminosarum* в слизи, образуемой *Nostoc paludosum* Kütz.: а - x2150, б - x261110.

Из данных таблицы видно, что действие бинарной культуры было более эффективно, чем прием стандартной инокуляции семян. Присутствие в ризобии ностока способствовало нодуляции корней, и как следствие этого, происходило повышение нитрогеназной активности клубеньков, увеличение роста корневой системы, надземной массы и урожая семян.

Таблица 3. Влияние разных способов бактеризации семян (*Rhizobium galegae* и *Nostoc paludosum* Kütz. + *Rh. galegae*) на козлятник (*Galega* L.) восточный

Обработка семян	Надземная часть за 2 укоса (сух. вещ.), ц/га	Корневая система на 1 м ²		Клубеньки		Урожай семян, кг/га
		Объем, см ³	Вес сух. вещ., г	шт./м ²	C ₂ H ₄ нмоль/мг сух. вещ.	
<i>Rh. galegae</i> (контроль)	79,79	2090	680	13735	2,71	18,41 ± 2,2
<i>N. paludosum</i> + <i>Rh. galegae</i>	97,30	4020	1080	26240	3,76	24,20 ± 1,0

Примечание: разница между контролем и опытом достоверна на уровне 99,9%.

Лучшему приживлению бактериального консорта на корнях благоприятствовали слизистые покровы бинарной культуры, способствующие его прилипанию к семенам в процессе инокуляции, что обеспечивало желательный контакт биопрепарата с растением. Приживаемость бактериального консорта на корнях бобовых было ранее нами доказано с помощью меченного антибиотиками штамма ризобий (Калинин, 1995).

Положительная роль ностока, кроме капсулирования бактериальной популяции, может быть связана с тем, что виды этого рода являются сильными стимуляторами роста корней, т.е. вызывают ризогенный эффект (Панкратова, Калинин, 1991; Романова и др., 1992), что в свою очередь способствует их нодуляции.

Заключение

При создании искусственных симбиотических ассоциаций на основе синезеленых водорослей можно использовать две их особенности: способность входить в физиологически-кооперативные связи с хемоорганотрофными бактериями, составляющими фактически общую с ними функциональную систему, и отсутствие строгой специфики микрофлоры по отношению к видам *Cyanophyta*. Последнее позволяет заменить определенную бактериальную популяцию в сообществе с целью введения в него отселектированных по хозяйственным показателям видов бактерий. Доказательства успешной процедуры становятся очевидными на фоне аксеничной культуры фототрофа. Удалось показать выживаемость в стационарных условиях лабораторных культур (при наблюдении в течение 18 месяцев) искусственных симбиотических ассоциаций на базе *N. paludosum*, шт. 18/ *A. radiobacter*, шт. 17/ *P. fluorescens*, шт. АВХ в бинарных и триплетном состоянии, бактериальные консорты которых в настоящее время вошли в агрономические препараты (Кожемяков, Тихонович, 1998).

Эти же виды бактерий неоднократно упоминались в качестве спутников ностоков в естественных альгобактериальных ассоциациях (Андреюк и др., 1990). Попытка составления бинарной культуры с популяцией *A. lipoferum* РИП-22 оказалась неудачной. Этот вид не отмечен исследователями в составе естественных популяций. В то же время создание «химерных» искусственных ассоциаций *N. paludosum* + *Rh. leguminosarum/Rh. galegae* было успешным. Ризобии внедрялись в околклеточную слизь ностока и развивались в ней как в инкубационной камере (капсулировались в ней), служащей источником энергии, что способствовало их сохранению и самовоспроизведению искусственной симбиотической ассоциации. В полевом опыте на примере козлятника восточного показано, что искусственная альгоризобияльная ассоциация по сравнению со стандартной обработкой семян популяцией ризобий оказалась более эффективной. В нашей работе получены положительные результаты по применению в агробиотехнологии искусственных альгоризобияльных ассоциаций при инокуляции семян лядвенца рогатого, гороха посевного, клевера красного (Панкратова, Калинин, 1991; Калинин, 1995). Искусственные симбиотические ассоциации на основе популяции ностока и отселектированных штаммов агробактерий и псевдомонад применялись нами с успехом при выгонке рассады капусты в защищенном грунте (Трефилова и др., 1998; Ковина, 2001).

Маловероятно, что *in situ* такая ассоциация сохраняется, но она «услеваает» оказать нужный эффект (скорость инокуляции семян в случае с бобовыми, ростовой или санитарный эффект). В последнее время уделяется значительное внимание использованию *Cyanophyta* в биотехнологии (*Cyanobacterial ...*, 1998). В нашей работе показана эффективность использования искусственных симбиотических ассоциаций на основе *Cyanophyta* в агробиотехнологии.

Благодарности

Авторы благодарят д. б. н., профессора, заведующего отделом фототрофных организмов ИПП (Пущино) И.Н. Гоготова за помощь в проведении некоторых экспериментов.

Je.M. Pankratova, R.Ju. Zyablii, A.A. Kalinin, A.L. Kovina, L.V. Treflova

Vyatka State Agricultural Academy, Department of Botany, physiology plants and microbiology,
610017, Kirov, Oktyabrskii prospect, 133, Russia

CONSTRUCTION OF THE MICROBIAL CULTURE ON THE BASE OF BLUE-GREEN
ALGAE *NOSTOC PALUDOSUM* KÜTZ.

Results of investigation confirm a possibility of forming construction of artificial microbial culture on the base of blue-green algae *Nostoc paludosum*. Compatibility of blue-green algae with *Rhizobium leguminosarum*, *Rh. galegae*, *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum lipoferum* is discussed. We have demonstrated the stability of artificial double and triple mixed cultures and arrangement of the partners in them without *Azospirilla*. The comparison of treating the seeds of *Galega orientalis* by *Rh. galegae* only with treating by consortia *Nostoc paludosum* + *Rh. galegae* showed the significant advantage of the consortia inoculation.

К е у о р д с : blue-green algae, chemotrophic bacteria, artificial consortia, stability.

Андрейко Е.Н., Коптева Ж.П., Запина В.В. Цианобактерии. – Киев: Наук. думка, 1990. – 195 с.

Берестецкий О.А., Васюк Л.Ф., Элисашвили Т.А. и др. Эффект инокуляции тимофеевки луговой и овсяницы тростниковой диатрофами из природной азотфиксирующей ассоциации // С.-х. биология. – 1985. – № 3. – С. 48-52.

Васюк Л.Ф. Ассоциативные азотфиксаторы и условия их эффективного применения // Биол. ВНИИ с.-х. микробиологии. – 1985. – № 42. – С. 16-19.

Вознесенский В.А. Первичная обработка экспериментальных данных. – Л.: Наука, 1969. – 83 с.

Герасименко Л.М., Ушатинская Г.Т. Цианобактерии, циано-бактериальные сообщества, маты, биопленки // Бактериальная палеонтология / Под ред. А.Ю. Розанова. – М.: ПИН РАН, 2002. – С. 36-47.

Грамов Б.В. Биологически активные вещества (БАВ) цианобактерий // Автотрофные микроорганизмы. – М.: Диалог, 1996. – С. 8.

Грамов Б.В., Титова Н.Н. Коллекция культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического института Ленинградского университета // Культивирование коллекционных штаммов водорослей. – Л.: ЛГУ, 1983. – С. 3-27.

Гусев М.В., Никитина К.А. Цианобактерии (физиология и метаболизм). – М.: Наука. 1979. – 228 с.

Заварзин Г.А. Эволюция геосферно – биосферной системы // Природа. – 2003. – № 1. – С. 27-35.

Калинин А.А. Цианобактерии как возможные компоненты диатрофных микробных ассоциаций и их влияние на растение: Автореф. дис... канд. биол. наук. – М., 1995. – 23 с.

Калинин А.А. Методические подходы к аксенизации цианобактерий // Автотрофные микроорганизмы: Тез. докл. Междунар. науч. конф. – М.: МГУ, 2001. – С. 92-93.

Ковина А.Л. Микробные агроконсорциумы на основе цианобактерий // Автореф. дис... канд. биол. наук. – М., 2001. – 23 с.

Кожмяков А.П., Тихонович И.А. Использование инокулянтов бобовых и биопрепаратов комплексного действия в сельском хозяйстве // Докл. РАСХН. – 1998. – № 6. – С. 7-10.

Краткий определитель бактерий Берги. – М.: Мир, 1980. – 444 с.

- Мезенцева Г.В. Трансформация органического вещества азотфиксирующих *Cyanoophyta* в почве // Альгология. – 1992. – 2, №4. – С. 27-32.
- Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике/ Под ред. А.В.Топачевского. – Киев: Наук. думка, 1975. – 246 с.
- Панкратова Е.М. Участие цианобактерий в круговороте азота в почве и создании ее плодородия // Усп. микробиол. – 1987. – 27. – С. 212-242.
- Панкратова Е.М. Экологическое влияние цианобактерий на почву и растение при различном сочетании естественных и антропогенных факторов // Экология и почва. Избр. лекции I – VII школ (1991-1997 гг.) – Пушкино, 1998. – Т.2. – С. 84-104.
- Панкратова Е.М. Почвенные цианобактерии в прошлом Земли, их экологическая роль в настоящем и возможная в будущем // Экология и почва. Избр. лекции X Всерос. shk. – Пушкино, 2001. – Т. 4. – С. 39-78.
- Панкратова Е.М., Калинин А.А. Цианобактерии как возможные организмы для создания бактериальных препаратов // Роль научных исследований в развитии с.-х. производства Кировской области. – Киров: Киров. с.-х. ин-т., 1991. – С. 25-33.
- Панкратова Е.М., Калинин А.А. Аксенизация цианобактерий // Агрономическая наука – достижения и перспективы // Тез. докл. науч. конф. КСХИ. – Киров, 1994. – С. 19-20.
- Панкратова Е.М., Мезенцева Г.В. Деструкция клеток синезеленых водорослей в почве // Биол. науки. – 1985. – № 3. – С. 95-100.
- Плохинский Н.А. Алгоритмы биометрии. – М.: МГУ, 1980. – 150 с.
- Посыпанов Г.С. Методы изучения биологической фиксации азота воздуха. – М.: Агропромиздат, 1991. – 299 с.
- Раманова Н.И., Селях И.О., Семенова Л.Р., Гусев М.В. Перспективы использования синезеленых водорослей для повышения продуктивности сельскохозяйственных растений // Микроорганизмы в сельском хозяйстве: Тез. докл. IV Всесоюз. науч. конф. (Пушкино, 20 – 24 окт. 1992 г.). – С. 171.
- Руководство к практическим занятиям по микробиологии. 2-е изд. / Ред. Н.С. Егоров. – М.: Изд-во МГУ, 1983. – 221 с.
- Соколов О.А., Гоготов И.Н., Амелин А.А. Экологически безопасные технологии повышения продуктивности и улучшения качества урожая растений // Проблемы экологической безопасности агропромышленного комплекса. – Сергиев Посад, 1996. – 2. – С. 92-93.
- Сиренко Л.А., Кондратьева Н.В. Роль *Cyanoophyta* в природе // Альгология. – 1998. – 8, № 2. – С. 117-131.
- Теплер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. – М.: Агропромиздат, 1987. – 248 с.
- Трефилова Л.В., Зяблых Р.Ю., Ковина А.Л., Калинин А.А. Эффективность цианобактериальных консорциумов при выгонке рассады капусты в защищенном грунте: Всерос. научно-практ. конф. ученых и спец. АПК // Аграр. вестник (Пермь). – 1998. – Вып. 11. – С. 116-117.
- Штина Э.А. Сообщества водорослей основных типов почв СССР и их диагностическое значение // Ботан. журн. – 1959. – 43, № 8. – С. 1062-1074.
- Штина Э.А., Панкратова Е.М. Коллекция культур микроскопических водорослей Кировского сельскохозяйственного института // Культивирование коллекционных штаммов водорослей. – Л.: ЛГУ, 1983. – С. 81-86.

- Штина Э.А., Юнг Л.А., Перминова Г.Н. и др. Пути и методы использования водорослей для повышения плодородия неорошаемых почв // Методы изучения и практического использования почвенных водорослей. – Киров, 1972. – С. 208-221.
- Cyanobacterial biotechnology // Proc. Intern. Symp. (Sep.18-21, 1996)/ Ed. G. Subramanian, B.D. Kaushik, G.S. Venkataraman. – New Delhi; Calcutta: Oxford et IBN Publ. Co., 1998. – 465 p.
- Douglas A.E. Symbiotic interaction. – Oxford, etc.: Oxford Univ. Press, 1994. – 148 p.
- Dryanovska O.A., Zakova N.S. Combined cultivation of Rhizobium leguminosarum with Chlamydomonas reinhardi // Докл. болг. АН. – 1985. – 38, № 10. – P. 1383-1385.
- Fogg G.E., Stewart W.D.P., Fay P., Walsby A.E. The blue-green algae – London: Academe, 1973. – 459 p.
- Gallon J.P. N₂ – fixation in photoautotrophs adaptation to a specialized way of life // Third European Nitrogen Fixation Conf. (Sept. 20-24, 1998). – De Blije Werelt Lunteren (The Netherlands). – L.39. – S. 10.
- Hardy R.W.F., Burns R.C., Holsten R.D. Applications of the acetilen-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation // Soil. Biol. Biochem. – 1973. – № 5. – P. 47-81.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folinphenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, № 1/2. – P. 265-275.
- Pankratova E.M., Trephylava L.V., Domracheva L.I., Tretyakova A.N. Suppression of Picea abies parasitic fungi and fungal infections of agricultural plants using cyanobacteria // Problems of forest phytopathology and mycology: Proc. of the 5th Intern. Conf. (Moscow, 2002). – P. 172-177.
- Venkataraman G.S. Nitrogen fixation and production of extracellular nitrogenous substance by an endophytic Nostoc strain, isolated from the root nodules of Egyptian clover (*Trifolium alexandrinum*) // Proc. Symp. Algology Indian Council of Agricultural Res. (New Delhi, 1960). – P. 119.
- Venkataraman G.S. Algalization // Phykos. – 1966. – 5, № 1/2. – P. 164-174.

Получена 01.04.04

Подписала в печать Л.А. Сиренко