

Г. Б. БАЙМАХАНОВА<sup>1</sup>, Б. К. ЗАЯДАН<sup>2</sup>, Д. Н. МАТОРИН<sup>3</sup>, А. К. САДАНОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, Алматы, Казахстан, e-mail: bgulb@mail.ru,

<sup>2</sup>Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан,

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия)

## СОЗДАНИЕ КОНСОРЦИУМОВ НА ОСНОВЕ ЦИАНОБАКТЕРИЙ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В АГРОБИОТЕХНОЛОГИИ

**Аннотация.** В статье представлены данные о создании новых консорциумов на основе выделенных и коллекционных культур цианобактерий, микроводорослей и азотобактерий (ZOB-1 -*Anabaena variabilis*-*Chlorella vulgaris*-*Azotobacter sp.* и ZBOB-2 -*Nostoc calcicola* - *Chlorella vulgaris* - *Azotobacter sp.*).

Подтверждена высокая скорость роста выделенных цианобактерий. Показано, что изучаемые культуры цианобактерий обладают высокой азотфиксирующей и фотосинтезирующей активностью.

**Ключевые слова:** азотфиксация, консорциум, цианобактерия, азотобактерия, микроводоросль.

**Тірек сөздер:** азотфиксациялар, консорциум, цианобактериялар, азотобактерия, микробалдырлар.

**Keywords:** nitrogen fixation, the consortium, cyanobacteria, azotobacteria, microalgae.

Цианобактерии привлекают к себе внимание специалистов разных профилей в связи с древностью их происхождения, особенностями генома и широчайшими адаптационными свойствами, позволившими им сохраниться в течение миллиардов лет. И ныне цианобактерии являются процветающей группой микроорганизмов [1].

В настоящее время известна роль цианобактерий в почве в качестве азотфиксаторов, накопителей органического вещества, центров микрокосмов как автотрофных организмов с удивительными способностями к симбиотрофным взаимоотношениям [2, 3]. Последнее свойство цианобактерий особенно интересно в связи со смещением парадигмы использования в биотехнологии не монокультур микроорганизмов, а консорциумов. В природе цианобактерии никогда не наблюдаются в виде популяций клеток одного вида. В природе они находятся в сообществах и, являясь эдификаторами микросообществ, они могут менять микробный состав, что дает возможность конструирования искусственных микроконсорциумов на основе этих организмов.

Цианобактерии, в качестве партнеров таких ассоциаций, исследованы незначительно. В то же время они являются неизменным компонентом микробиоты почвы с потенциальной способностью давать вспышки размножения на ее поверхности, обладают агрономически значимой азотфиксацией и являются первичными продуцентами органического вещества. Способность к синтезу физиологически активных веществ, стимулирующих корнеобразование у высших растений, делает их объектом пристального внимания микробиологов и биотехнологов. Однако, с точки зрения целенаправленного конструирования микробных консорциумов, практически вне поля зрения осталось необычная коммуникабельность цианобактерий, т.е. их способность вступать в прочные или временные связи с самыми обычными почвенными бактериями. Все вышесказанное обуславливает своевременность исследований по этим организмам, как объектам биотехнологии [4–6].

Целью данной работы было создание консорциумов на основе вновь выделенных цианобактерий.

### Материалы и методы исследований

Объектами исследований служили пробы воды, отобранные на рисовых полях Карауктибинского опорного пункта Казахского НИИ рисоводства им. Ибрая Жахаева г. Кызылорды, а также водные пробы, отобранные из Иссыкского озера и из горячего источника Тургенъ Енбекши-казахского района Алматинской области. Определение видового состава цианобактерий в пробах, отобранных из различных водных экосистем, проводили по методике Сиренко с использованием определителей [7–9]. Для выделения чистой альгологической культуры из накопительной применяли микробиологические методы – разделение, пересевы, чашечный метод на средах Громова №6, BG-11. Культивация проводилась в условиях лабораторного люминостата в непрерывном режиме

при температуре 25–30°C и освещенности 3000–2000 лк. Для оценки активности цианобактерий использовались альгологически и бактериологически чистые формы [10, 11].

Для проверки на бактериальную чистоту, культуры пересевались на стерильный 0,25 % мясной бульон. Чистоту культуры определяли по помутнению бульона. Микроскопирование проводили на микроскопе Meiji (Япония). Исследование динамики роста культур проводилось по определению оптической плотности на спектрофотометре PD-303 (Япония) при длине волны 750 нм [12].

Измерения активности фотосинтеза проводили на импульсном флуорометре- WaterPAM (Walz, Германия) [13, 14].

Для создания консорциума, помимо цианобактерий, были использованы штамм *Chlorella vulgaris* Z-1 из коллекции кафедры биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби и штамм *Azotobacter xp.* из коллекции Института микробиологии и вирусологии РК. Культуры водорослей культивировались на среде Громова, культура *Azotobacter xp.* на среде Эшби. Для выращивания консорциумов была составлена среда путем смешивания в равных соотношениях сред Громова и Эшби.

### Результаты исследований и обсуждение

Для выявления способности цианобактерий к азотфиксации обычно исследуют динамику их роста по приросту биомассы на среде без источника азота [15, 16]. Результаты наших экспериментов показали, что при выращивании культур на среде без источника азота наибольшей активностью обладают культуры *Anabaena variabilis* и *Nostoc calcicola* (рисунок 1.). Рост клеток культур *Spirulina sp.* К-1, *Oscillatoria sp.* К-1 был намного ниже.

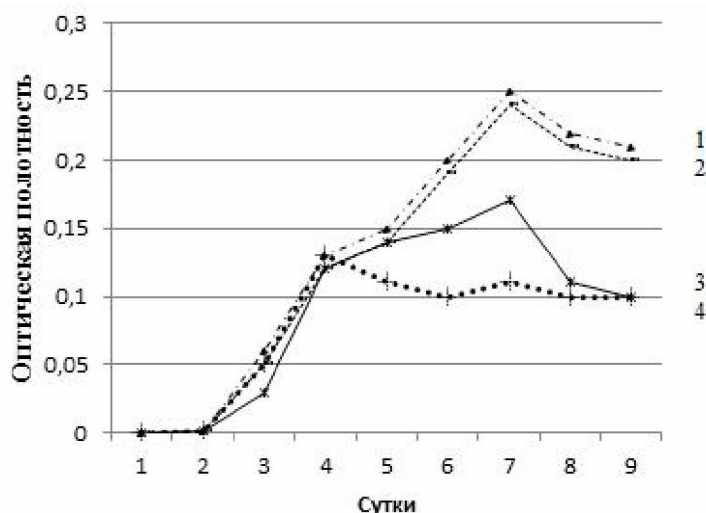


Рисунок 1 – Динамика роста культур цианобактерий *Anabaena variabilis* (1), *Nostoc calcicola* (2), *Spirulina sp.* К-1(4) и *Oscillatoria sp.* К-1(3) в среде без добавления азота

Высокая активность роста культур *Anabaena variabilis* и *Nostoc calcicola* на питательной среде без добавления азота позволяет предполагать, что эти культуры более эффективно получают азот путем его связывания из атмосферы. Известно, что штамм *Anabaena variabilis* характеризуется высокой скоростью роста в безазотистой среде, что коррелирует с большой частотой образования гетероцист и высокой активностью нитрогеназы [12].

Был проведен биохимический анализ количества азота в клетках выделенных азотфиксирующими цианобактериями. Исследовали культуры *Anabaena variabilis* и *Nostoc calcicola*, которые культивировались на среде BG-11 с азотом и без него. Опыт проводили в трех повторностях. При измерении количества азота в качестве контрольного штамма брали мутантный штамм *Chlamydomonas reinhardtii* СС-124 не фиксирующий атмосферный азот (рисунок 2).

Из рисунка видно, что количество азота в культуре *Anabaena variabilis* составляет 10,2 %, а культуры *Nostoc calcicola* 9,9%, тогда как в контрольном штамме *Chlamydomonas reinhardtii* СС-124 количество азота равно 4,2%. Это объясняется тем, что культуры *Anabaena variabilis* и *Nostoc calcicola* являются азотфиксирующими цианобактериями и фиксируют молекулярный азот.

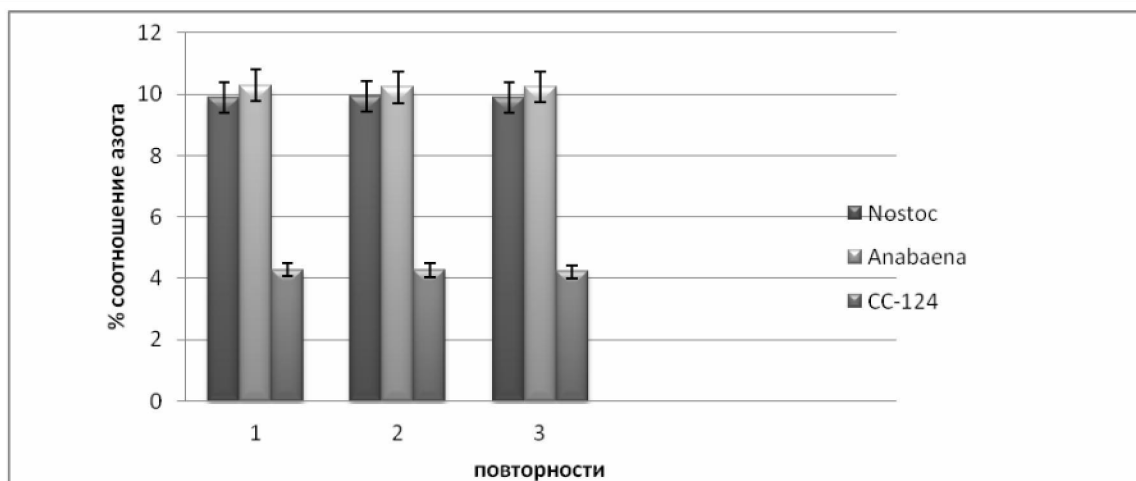


Рисунок 2 – Количественное содержание азота в исследуемых культурах азотфиксирующих цианобактерий *Anabaena variabilis*, *Nostoc calcicola* и цианобактерии *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124

Создание микробных консорциумов на основе азотфиксирующих цианобактерий и азотобактерий открывает новые перспективы в агробиотехнологии и может быть использовано для экологических целей, когда возникает потребность в стабильно работающих микробных сообществах [17]. Для создания консорциумов были выбраны цианобактерии с высокой азотфиксирующей активностью *A. variabilis* и *N. calcicola*. Для усиления процесса азотфиксации в консорциумы добавлялся штамм *Azotobacter xp.* При создании консорциума, для нейтрализации pH среды вносили микроводоросль *Chlorella vulgaris*. Показано, что штаммы *A. variabilis* и *N. calcicola* защелачивают среду до pH 8, а микроводоросль *Chlorella vulgaris* нейтрализует pH среды в течение 3-4 суток.

В результате проведенных исследований были созданы новые консорциумы цианобактерий, микроводорослей и азотобактерий – ZOB-1 (*A. variabilis*- *Chlorella vulgaris*- *Azotobacter xp.*) и ZBOB-2 (*N. calcicola* - *Chlorella vulgaris*-*Azotobacter xp.*).

Высокая фотосинтетическая активность цианобактерий в составе созданных консорциумов ZOB-1 и ZBOB-2 была подтверждена при изучении фотосинтеза с использованием флуоресцентных методов. На рисунке 3 представлены световые кривые относительной скорости нециклического электронного транспорта (rETR) у чистых культур цианобактерий *A. variabilis* и *N. calcicola* и созданных на их основе консорциумов ZOB-1 и ZBOB-2.

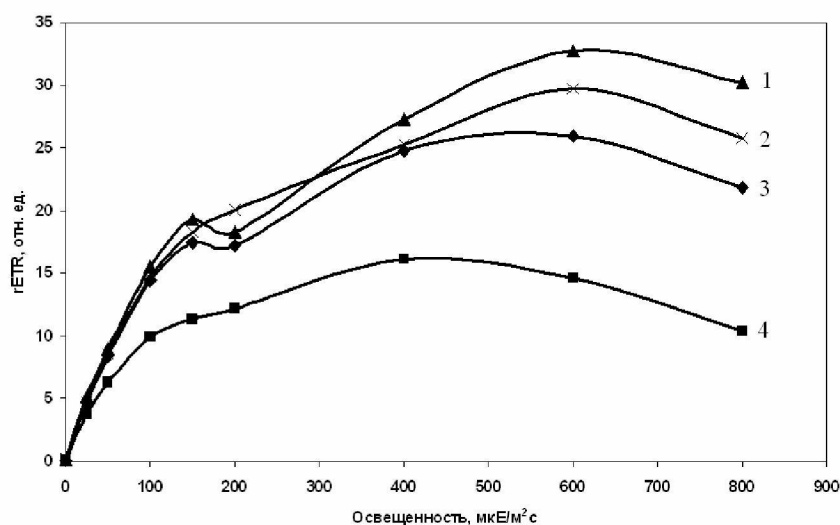


Рисунок 3 – Световые кривые относительной скорости нециклического электронного транспорта (rETR) у чистых культур цианобактерий *Nostoc calcicola* (4) и *Anabaena variabilis* (3) и созданных на их основе консорциумов ZOB-1 (2) и ZBOB (1) при длительном 7-дневном культивировании в среде без азота

На рисунке видно, что при длительном культивировании в средах, не содержащих азот, скорость нециклического транспорта, связанная с выделением кислорода и фиксацией CO<sub>2</sub>, резко увеличивается у цианобактерий в составе консорциумов ZOB-1 и ZBOB-2. Возможно, это связано с улучшением условий для связывания азота из атмосферы в созданных консорциумах. Таким образом, при длительном культивировании консорциумов на средах, не содержащих азот, цианобактерии не испытывают азотного голодания. Зависимость фотосинтеза микроводорослей от содержания азота в среде была ранее нами продемонстрирована в работах [18, 19].

По результатам проведенных исследований можно сделать заключение, что вновь созданные консорциумы обладают высокой азотфиксирующей и фотосинтезирующей активностью и могут быть предложены для обогащения почв, связанными азотом.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Franche C., Lindström K., Elmerich C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants // *Plant Soil*. – 2009. – Vol. 321. – P. 35-59.
- 2 Prasanna R., Soodb A., Jaiswala P., Nayaka S., Gupta V., Chaudharya V., Joshia M., Natarajana C. Rediscovering Cyanobacteria as Valuable Sources of Bioactive Compounds (Review) // *Appl. biochem. and microbiol.* – 2010. – Vol. 46, N 2. – P. 119-134.
- 3 Панкратова Е.М., Зяблых Р.Ю., Калинин А.А., Ковина А.Л., Трефилова Л.В. Конструирование микробных культур на основе синезеленой водоросли *Nostoc paludosum* Kiitz. // *Альгология*. – 2004. – Т. 14, № 4. – С. 445-458.
- 4 Bergman B. *Nostoc* Gunnerasymbiosis. In: Rai A.N., Bergman B, Rasmussen U (eds) *Cyanobacteria in symbiosis* // Dordrecht: Kluweracademic. – 2002. – P. 207-232.
- 5 Pawlowski K., Sprent J.I. Comparison between actino-rhizal symbiosis and legumesymbiosis. In: Pawlowski K., Newton W.E. (eds) *Nitrogen-fixing actinorhizal symbioses* // Dordrecht: Springer. – 2008. – P. 261-288.
- 6 Acea, M.J., Diz N., Prieto-Fernández A. Microbial populations in heated soils inoculated with cyanobacteria // *Biology and Fertility of Soils*. – 2001. – Vol. 33. – P. 118-125.
- 7 Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф., Лукина Л.Ф. и др. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – Киев: Наука думка, 1975. – 247 с.
- 8 Определитель бактерий Берджи. Т. 1. – Изд. 9 / Под ред. Дж. Холта и др. – М.: Мир, 1997. – 520 с.
- 9 Музафаров А.М., Эргашев А.Э., Халилова С.Х. Определитель сине-зеленых водорослей Средней Азии. – Ташкент: Фан, 1987. – 88. – Т. 1, Т. 3. – С. 3-1405.
- 10 Rai A.N. (ed.). *Handbook of Symbiotic Cyanobacteria*. Boca Raton. – Florida: CRC, 1990. – 253 p.
- 11 Заядан Б.К., Акмуханова Н.Р., Садвакасова А.К. Коллекция микроводорослей и методы их культивирования. – Алматы, 2013. – 158 с.
- 12 Jones K.M., Haselkorn R. Newly Identified cytochrome c oxidase operon in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 specifically induced in heterocysts // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – May. – P. 2491-2499.
- 13 Schreiber U. Pulse-Amplitude (PAM) fluorometry and saturation pulse method // In: Papageorgiou G and Govindjee (eds) *Chlorophyll fluorescence: A signature of Photosynthesis*, Springer, Dordrecht. The Netherlands. – 2004. – P. 279-319.
- 14 Маторин Д.Н., Каратеева А.В., Осипов В.А., Лукашев Е.П., Сейфуллина Н.Х., Рубин А.Б. Влияние углеродных нанотрубок на параметры флуоресценции хлорофилла зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // *Российские нанотехнологии*. – 2010. – Т. 5, № 5-6. – С. 71-76.
- 15 Цоглин Л.Н., Пронина Н.А. Биотехнология микроводорослей. – М.: Научный мир, 2012. – 184 с.
- 16 Лобакова Е.С., Дольникова Г.А., Корженевская Т.Г. Особенности цианобактериально-бактериальных комплексов микросимбионтов растительных синцианозов // *Микробиология*. – 2001. – Т. 70, № 1. – С. 111-116.
- 17 Elmerich C, Newton W.E. *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*. Springer. The Netherlands. – 2007. – 234 p.
- 18 Маторин Д.Н., Рубин А.Б. Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей. – М.: Ижевск, ИКИ-РХД, 2012. – 256 с.
- 19 Antal T.K., Matorin D.N., Piyash L.V., Volgusheva A.A., Osipov V.A., Konyuhov I.V., Krendeleva T.E., Rubin A.B. Probing of photosynthetic reactions in four phytoplanktonic algae with a PEA fluorometer // *Photosynthesis Research*. – 2009. – Vol. 102. – P. 67-76.

#### REFERENCES

- 1 Franche C., Lindström K., Elmerich C. *Plant Soil*. 2009, 321, 35-59 (in Engl.)
- 2 Prasanna R., Soodb A., Jaiswala P., Nayaka S., Gupta V., Chaudharya V., Joshia M., Natarajana C. Rediscovering *Appl. biochem. and microbiol.* 2010. 46, 2. 119-134 (in Engl.)
- 3 Pankratova E.M., Zjablyh R.Ju., Kalinin A.A., Kovina A.L., Trefilova L.V. *Al'gologija*. 2004. 14, 4. 445-458 (in Engl.)
- 4 Bergman B. *Nostoc* Gunnerasymbiosis. In: Rai A.N., Bergman B, Rasmussen U (eds) *Dordrecht: Kluweracademic*. 2002. 207-232 (in Engl.)
- 5 Pawlowski K., Sprent J.I. *Dordrecht: Springer*, 2008. 261-288 (in Engl.)
- 6 Acea, M.J., Diz N., Prieto-Fernández A. *Biology and Fertility of Soils*. 2001. 33: 118-125. (in Engl.)
- 7 Sirenko L.A., Sakevich A.I., Osipov L.F., Lukina L.F. i dr. *Metody fiziologo-biohimicheskogo issledovanija vodoroslej v gidrobiologicheskoy praktike*. Kiev: Nauka dumka, 1975. 247 (in Russ.)

- 8 *Opređitel' bakterij Berdzhii*. Т. 1. Изд. 9. Под ред. Houltia Dzh. i dr. М.: Mir, 1997. 520 s (in Russ.)
- 9 Muzafarov A.M., Jergashev A.Je., Halilova S.H. *Opređitel' sine-zelenyh vodoroslej Srednej Azii*. Tashkent: Fan, 1987.88. Т. 1, Т. 3. S. 3-1405. (in Russ.)
- 10 Rai A.N. (ed.). *Handbook of Symbiotic Cyanobacteria*. Boca Raton. Florida: CRC. 1990. 253 p. (in Engl.)
- 11 Zajadan B.K., Akmuhanova N.R., Sadvakasova A.K. *Kollekcija mikrovodoroslej i metody ih kul'tivirovanija*. Almaty, 2013. 158 s. (in Russ.)
- 12 Jones K. M., Haselkorn R. *Journal of Bacteriology*. 2002. May. R. 2491-2499. (in Engl.)
- 13 Schreiber U. In: *Papageorgiou G and Govindjee (eds) Chlorophyll fluorescence: A signature of Photosynthesis*, Springer, Dordrecht. The Netherlands . 2004. 279-319. (in Engl.)
- 14 Matorin D.N., Karateeva A.V., Osipov V.A., Lukashev E.P., Sejfullina N.H., Rubin A.B. *Rossijskie nanotehnologii*. 2010. Т. 5, № 5-6. S. 71-76. (in Russ.)
- 15 Coglin L.N., Pronina N.A. *Biotehnologija mikrovodoroslej*. М.: Nauchnyj mir, 2012. 184 s. (in Russ.)
- 16 Lobakova E.S., Dol'nikova G.A., Korzhenevskaja T.G. *Mikrobiologija*. 2001. Т. 70. № 1. S. 111-116. (in Russ.)
- 17 Elmerich C, Newton W.E. *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*. Springer. The Netherlands. 2007. 234 p. (in Engl.)
- 18 Matorin D.N., Rubin A.B. *M. Izhevsk, IKI-RHD*. 2012. 256 s. (in Russ.)
- 19 Antal T.K., Matorin D.N., Ilyash L.V., Volgusheva A.A., Osipov V.A., Konyuhov I.V., Krendeleva T.E., Rubin A.B. *Photosynthesis Research*. 2009. Vol. 102. P. 67-76. (in Engl.)

### Резюме

Г. Б. Баймаханова<sup>1</sup>, Б. К. Заядан<sup>2</sup>, Д. Н. Маторин<sup>3</sup>, А. К. Саданов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ҚР БҒМ ҒК «Микробиология және вирусология институты» РМК, Алматы, Қазақстан,

<sup>2</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан,

<sup>3</sup>М. В. Ломоносов атындағы Мәскеу мемлекеттік университеті, Мәскеу, Ресей)

### АГРОБИОТЕХНОЛОГИЯДА ҚОЛДАНУ ҮШІН ЦИАНОБАКТЕРИЯЛАР НЕГІЗІНДЕ КОНСОРЦИУМДАР ҚҰРУ

Мақалада цианобактериялардың, микробалдырлардың және азотбактериялардың (ZOB-1 –*Anabaena variabilis*- *Chlorella vulgaris*- *Azotobacter sp.* И ZBOB-2 –*Nostoc calcicola* – *Chlorella vulgaris* – *Azotobacter sp.*) коллекциялық культураларының негізінде бөлініп алған жаңа консорциумдарды құру туралы мәліметтер келтірілген. Бөліп алынған цианобактериялардың өсуінің жоғарғы жылдамдығы дәлелденген. Зерттелінген цианобактериялар жоғары азотфиксациялаушы және фотосинтездеуші белсенділікке ие екендігі, көрсетілген.

**Тірек сөздер:** азотфиксациялар, консорциум, цианобактериялар, азотбактерия, микробалдырлар.

### Summary

G. B. Baimakhanova<sup>1</sup>, B. K. Zayadan<sup>1</sup>, D. N. Matorin<sup>2</sup>, A. K. Sadanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology and virology, Almaty, Kazakhstan,

<sup>2</sup>Al-Farabi Kazakh national university, Almaty, Kazakhstan,

<sup>3</sup>Lomonosov Moscow state university, Moscow, Russia)

### THE CREATION OF CONSORTIA ON THE BASIS OF CYANOBACTERIA FOR USE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

In the article new consortium based on isolated and collectible cultures of cyanobacteria, microalgae and azotobacteria were presented (ZOB-1 - *Anabaena variabilis* - *Chlorella vulgaris* - *Azotobacter sp.* and ZBOB - 2 - *Nostoc calcicola* - *Chlorella vulgaris* - *Azotobacter sp.*) was created.

The high rate of growth and photosynthetic activity of algae in these consortiums was confirmed.

**Keywords:** nitrogen fixation, the consortium, cyanobacteria, azotobacteria, microalgae.

Поступила 10.0.2014 г.