

УДК 579.64

Б.К. Заядан*, Г.Б. Баймаханова, Г. Ораз, К. Болатхан, Е.В. Зенина

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

*E-mail: bgulb@mail.ru

Выделение новых штаммов цианобактерий и их консорциумы с микроводорослями

В статье представлены данные о выделенных штаммах цианобактерий из рисовых чеков Карауктибинского опорного пункта Казахского НИИ рисоводства им. Ибрая Жахаева Кызылординской области.

Выделены 4 альгологически и бактериологически чистых культур микроводорослей и цианобактерий: из цианобактерий – *Anabaena* sp.K-1, *Spirulina* sp.K-1, *Oscillatoria* sp.K-1, *Nostoc* sp.K-1 и изучены их морфолого-культуральные свойства. Созданы консорциумы цианобактерий и микроводорослей *Nostoc caldicola* – *Chlorella vulgaris* и *Anabaena* – *Chlorella vulgaris*.

Ключевые слова: микроводоросль, цианобактерия, консорциум.

B.K. Zayadan, G.B. Baimakhanova, G.Oraz, K.Bolathan, E.V. Zenina

Isolation of new stammes of cyanobacteria and their consortium with microalgae

4 stammers of *Anabaena* sp.K-1, *Spirulina* sp.K-1 and *Oscillatoria* sp.K-1, *Nostoc* sp. K-1 cyanobacteria were isolated. Cyanobacteria and microalgae consortium *Nostoc caldicola* – *Chlorella vulgaris*, *Anabaena* sp. K-1 – *Chlorella vulgaris* were created.

Keywords: microalgae, cyanobacteria, consortium.

Б.К. Заядан, Г.Б. Баймаханова, Г. Ораз, К. Болатхан, Е.В. Зенина

Цианобактериялар мен олардың микробалдырлар мен консорциумдарының жаңа штамдарын бөліп алу

Цианобактериялардың 4 штаммы *Anabaena* sp.K-1, *Spirulina* sp.K-1 и *Oscillatoria* sp.K-1 және *Nostoc* sp. K-1 бөлініп алынды. *Nostoc caldicola* – *Chlorella vulgaris*, *Anabaena* sp. K-1 – *Chlorella vulgaris* микробактериялар мен цианобактериялардың консорциумы құрылды.

Түйін сөздер: микробалдырлар, цианобактериялар, консорциум.

Насущной задачей земледелия является его экологизация, которая включает использование ресурсов почвы для сохранения и увеличения их плодородия. Подходы к решению задачи, в частности, заключаются в использовании микробной компоненты почвы. Привлекательна в этом плане непереносимая и многочисленная группа фототрофных микроорганизмов – цианобактерий. Прежде всего, внимание к ним привлечено благодаря азотфиксации и широкому спектру адаптации к различным почвенным и гидротермиче-

ским условиям. В связи с этим начато изучение возможностей использования цианобактерий как консортов сложных микробных сообществ. Цианобактерии могут образовывать стойкие консорциумы с микроводорослями [1, 2, 3, 4].

Целью данной работы было исследование и идентификация цианобактерий, выделенных из рисовых чеков Карауктибинского опорного пункта Казахского НИИ рисоводства им. Ибрая Жахаева Кызылординской области и создание на их основе консорциумов для получения эф-

фективных биопрепаратов используемых в агробiotехнологии.

Материалы и методы исследований

Объект исследований для данной работы послужили пробы, отобранные на рисовых полях Карауктибинского опорного пункта Казахского НИИ рисоводства им. Ибрая Жахаева Кызылординской области, а также водные пробы из Иссыкского озера и с горячего источника Тургень Енбекшиказахского района Алматинской области.

А также использовали штаммы *Chlorella vulgaris* Z-1, *Ankistrodesmus falcatus* взятые из коллекции лаборатории фототрофных микроорганизмов кафедры биотехнологии Казахского Национального Университета им. Аль-Фараби.

Полевые наблюдения и сбор материала производили с марта по июнь 2012 г.

На одном и том же участке производился отбор проб с различной глубины. Отобранные пробы были доставлены в лабораторию с соблюдением всех требований к перевозке отобранного материала.

Определение видового состава микроводорослей в пробах из различных водных экосистем проводили по методике Сиренко с использованием определителей для сине-зеленных водорослей [5, 6, 7, 8].

Для выделения альгологически чистой культуры из накопительной использовали обычные

микробиологические методы – разделения, пересевов. Для оценки активности водорослей использовали альгологически и бактериологически чистые формы [9, 10].

Для проверки на чистоту, культуры пересевались на стерильный 0,25 % мясной бульон. По помутнению бульона определяли чистоту культуры.

Определение оптической плотности и динамику роста на разных синтетических средах проводилось в течении 7 суток на спектрофотометре PD-303 (Япония). Микрофотосъемка производилась на цифровой фотоаппарат *CANON PowerShot A 800 Silver*.

Результаты исследований и обсуждение

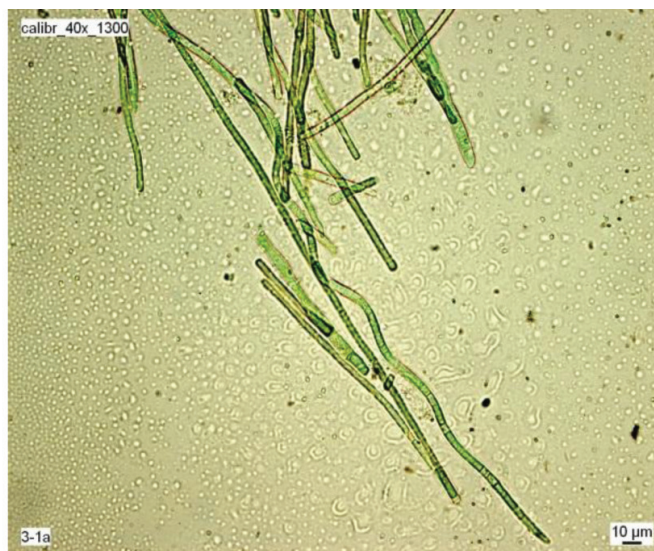
В ходе проведенных исследований были выделены 4 бактериологически чистые культуры цианобактерий, которые идентифицированы как представители родов *Anabaena* sp.K-1, *Spirulina* sp.K-1, *Oscillatoria* sp.K-1 и *Nostoc* sp.K-1.

1. *Nostoc* sp.K-1

Относится к группе цианобактерий, класс *Hormogoneae*, порядок *Nostocales*, род *Nostoc*. Трихомы одиночные, прямые, состоят из шарообразных клеток, среди которых встречаются гетероцисты и реже акинеты. Для культивирования используется среда Громова. Хорошо растут при температуре 25°-30°С. (1-рисунок, а).



а



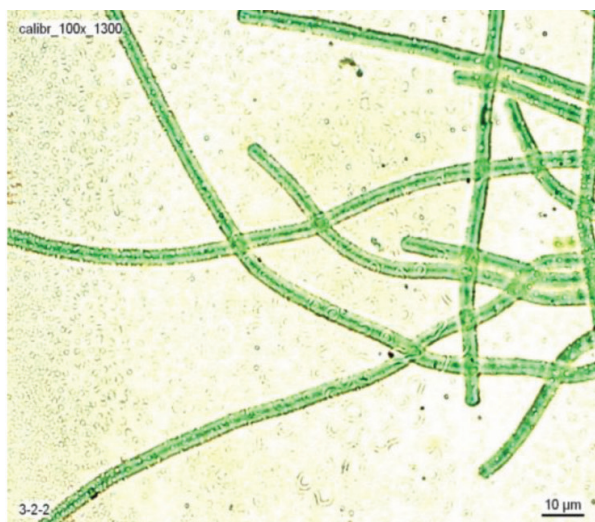
б

Рисунок 1 – Морфология культур *Noctoc* sp. K-1 (а) и *Spirulina* sp.K-1(в)

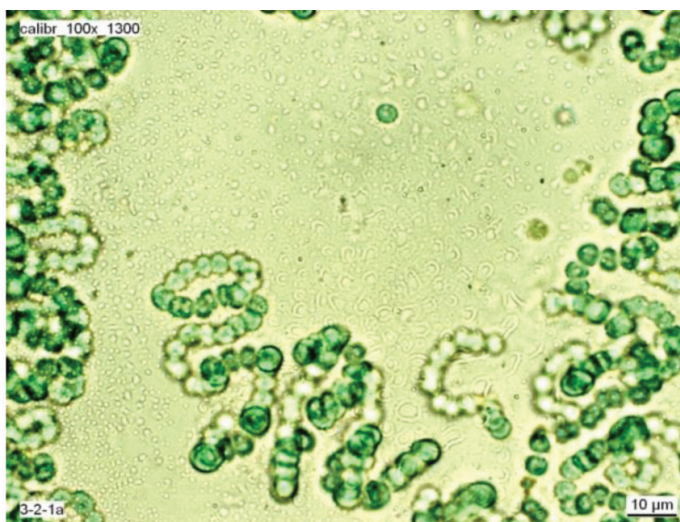
2. *Spirulina sp.* K-1

По систематическому положению относятся к цианобактериям, класс *Hormogoneae*, род *Spirulina*. нитчатые. Клетки образуют правильные спирали. Трихомеры светлые, сине-зеленые, их

диаметр 1-2 мкм, расстояние между спиралями 2,7-5 мкм. В основном, растут, образуя скопления на стенках посуды. Хорошо растут при температуре 25⁰-30⁰С в среде Заррука на свету (1-рисунок, в).



a



b

Рисунок 2 – Морфология культур *Oscillatoria sp.* K-1(а) и *Anabaena sp.* K-1(в)

3. *Oscillatoria sp.* K-1

Трихомы синева-зеленого цвета, прямые, у поперечных перегородок не перешнурованные, к концам не утонченные, длина больше ширины. Выделены на питательной среде Громова. Для культивирования используется среда Громова. Оптимальный рост происходит при температуре 25⁰-28⁰С (2-рисунок, а).

4. *Anabaena sp.* K-1

Относится к группе цианобактерий, класс *Hormogoneae*, порядок *Nostocales*, род *Anabaena*. Трихомы одиночные, очень часто в клубках, состоят из шарообразных клеток, среди которых встречаются гетероцисты и реже акинеты. Трихомы своим строением очень напоминают трихомы ностока. Большей частью они спирально или кольцеобразно свернуты, реже прямые. Для культивирования используется среда Громова. Оптимальный рост происходит при температуре 25⁰-30⁰С (2-рисунок, в).

Влияние азота на рост выделенных штаммов цианобактерий

В дальнейшем, с целью проведения скрининга полученных бактериологически чистых куль-

тур цианобактерий по способности азотфиксации, все выделенные культуры цианобактерий выращивали на среде Громова без добавления источника азота. Для этого изучалось влияние данного элемента на их динамику роста.

Результаты опыта показали, что из всех выделенных цианобактерий (*Spirulina sp.* K-1, *Anabaena sp.* K-1, *Oscillatoria sp.* K-1) наибольшей активностью роста клеток обладает культура *Anabaena sp.* K-1 (3-рисунок). Рост клеток культур *Spirulina sp.* K-1, *Oscillatoria sp.* K-1 в среде без азота был на много ниже в сравнение с ростом культуры *Anabaena sp.* K-1.

Экспериментальные данные свидетельствуют о высокой продуктивности культуры *Anabaena sp.* K-1 на питательной среде, без добавления азота. При сравнении роста культур *Spirulina sp.* K-1 и *Oscillatoria sp.* K-1 на двух средах показано, что на среде с отсутствием азота наблюдается наименьший прирост биомассы. Полученные результаты позволяют предполагать, о том, что культура *Anabaena sp.* K-1 получает азот путем его связывания из атмосферы. Штамм *Anabaena sp.* K-1 характеризуется высокой скоростью роста в безазотистой среде, что

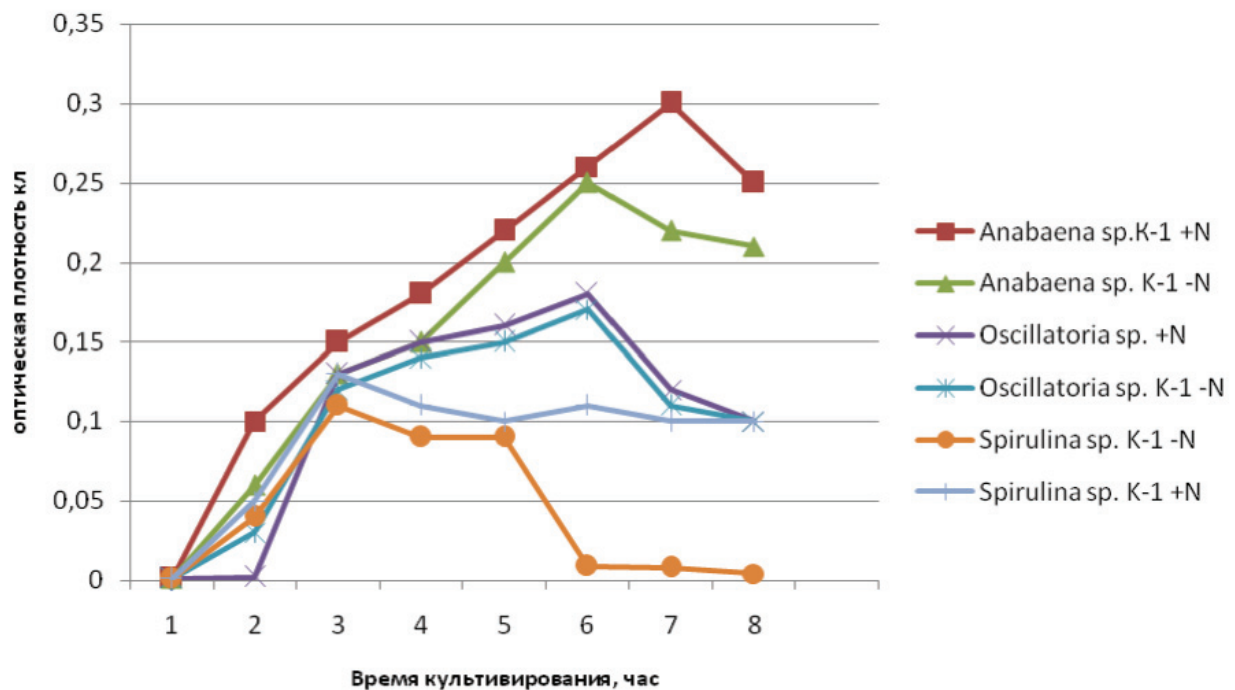


Рисунок 3 – Влияние азота на динамику роста цианобактерий

коррелирует с большой частотой образования гетероцист и высокой активностью нитрогеназы.

Известно что, цианобактерии – одни из немногих живых существ, способных фиксировать атмосферный азот, переводя его в доступную для всего живого форму.

Использование в агробиотехнологии азотфиксирующих цианобактерий может решить проблемы структуризации, плодородия почв, соответственно, увеличить урожайность сельскохозяйственных растений.

Влияние pH среды на рост клеток цианобактерии *Anabaena sp. K-1*

Цианобактерии подвергаются воздействию целого ряда экологических факторов, важнейшими из которых являются температура, pH и реакция среды.

Для достижения высоких результатов при культивировании цианобактерий показатель pH среды должен быть оптимальным для их роста. При приготовлении питательных сред необходимо вести контроль за концентрацией ионов водорода. Кислотность воды является лимитирующим фактором. Устойчивость разных таксонов к изменениям кислотности различна. Для многих цианобактерий характерна нейтральная либо слабощелочная среда, оптимальный пока-

затель pH среды составляет 7,0 -7,6. Кислотность среды влияет на устойчивость компонентов питательной среды, на их доступность для живых организмов, в особенности на усвояемость факторов роста, витаминов.

Изучено влияние реакции среды в диапазоне от 2 до 10 с интервалом 2 на клетки цианобактерии *Anabaena sp. K-1*. Культуру цианобактерии выращивали на жидкой питательной среде Громова. Необходимые для эксперимента значения pH получали с использованием концентрированной щелочи (KOH) или кислоты (HCl). При определении использовали pH метр. Градиент pH в незабуференнй среде задавали в начале опыта и далее не корректировали.

Результаты испытаний роста штамма цианобактерии на питательных средах с разными значениями pH показали, что оптимальное значение pH для исследованной культуры составляет в пределах 6-8 (4-рисунок).

При значении pH среды 2 наблюдалось полное разрушение клеточного содержимого. Сдвиг pH среды в сторону подщелачивания от 2 до 4 и от 8 до 10 вызвали изменение формы у 50-60% клеток с эллипсоидной на круглую, повреждения клеточных стенок, а также происходило обесцвечивание цитоплазмы. В диапазоне pH от



Рисунок 4 – Интенсивность роста культур цианобактерии *Anabaena sp.* К-1 при различных значениях pH среды

6 до 8 клетки сохраняли морфологический статус (5-рисунок).

Таким образом, область значений pH от 6 до 8 была наиболее оптимальной для роста клеток

Anabaena sp. К-1, при изменении pH среды в сторону кислой среды наблюдалось изменение морфологии клеток. А при pH свыше 8 число неподвижных, разрушенных клеток резко возрастало.

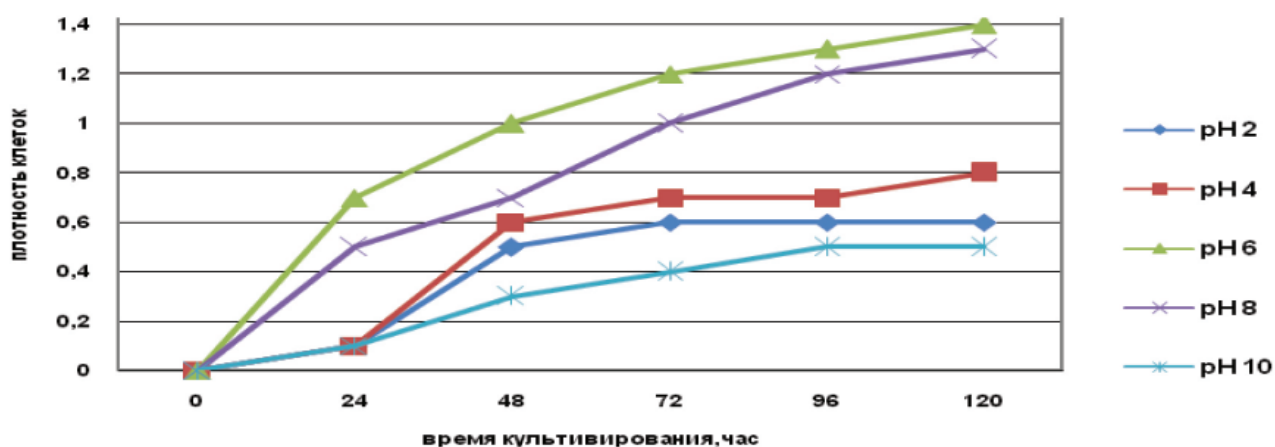


Рисунок 5 – Динамика роста клеток *Anabaena sp.* К-1 на питательной среде Громова при различных значениях pH

Создание консорциума цианобактерий и микроводорослей, определение их динамики роста

Для создания консорциумов выбрана азотфиксирующая цианобактерия с наибольшей азотфиксирующей активностью *Anabaena sp.* К-1. И взяты три культуры микроводорослей *Nostoc caldicola*, *Ankistrodesmus falcatus* и *Chlorella vulgaris* из коллекции лаборатории фототрофных микроорганизмов кафедры биотехнологии

Казахского Национального Университета им. Аль-Фараби.

Вначале исследовали динамику роста всех четырех культур в течении 7 суток.

Из таблицы видно, что максимальный прирост биомассы на седьмые сутки культивирования наблюдался у культуры микроводорослей *Chlorella vulgaris*. Чуть меньше *Nostoc caldicola* и *Anabaena sp.* Были созданы четыре ассоциации *Nostoc caldicola* – *Ankistrodesmus falcatus* и

Таблица 1 – Динамика роста цианобактерий и микроводорослей

Сутки	Оптическая плотность (D530)			
	<i>Anabaena sp</i>	<i>Nostoc caldicola</i>	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
0	0,077	0,096	0,043	0,123
1	0,189	0,231	0,121	0,291
2	0,342	0,396	0,206	0,515
4	0,654	0,701	0,354	0,712
7	0,784	0,794	0,563	0,801

Nostoc caldicola – *Chlorella vulgaris*; *Anabaena* – *Ankistrodesmus falcatus* и *Anabaena* – *Chlorella vulgaris*. Консорциумы цианобактерий и микроводорослей выращивались в течении 7 суток.

Из рисунка 6 видно, что *Ankistrodesmus falcatus* сильно подавляет рост цианобактерий. Хороший рост показали два консорциума *Nostoc caldicola* – *Chlorella vulgaris* и *Anabaena* – *Chlorella vulgaris*.

Особая ценность этих консорциумов в том, что штаммы *Anabaena sp.* К-1 и *Nostoc caldicola*

защелачивают среду до pH 8, а под действием микроводоросли *Chlorella vulgaris* pH меняется в сторону нейтральной, при культивировании консорциума *Nostoc caldicola* – *Chlorella vulgaris* через 3 суток, а консорциума *Anabaena sp.* К-1 – *Chlorella vulgaris* через 4 суток.

Было проведено микроскопическое исследование искусственного консорциума на основе цианобактерий и зеленых водорослей их морфологии (7-рисунок). Показана возможность консорциумов при совместном культивировании исследуемых штаммов.

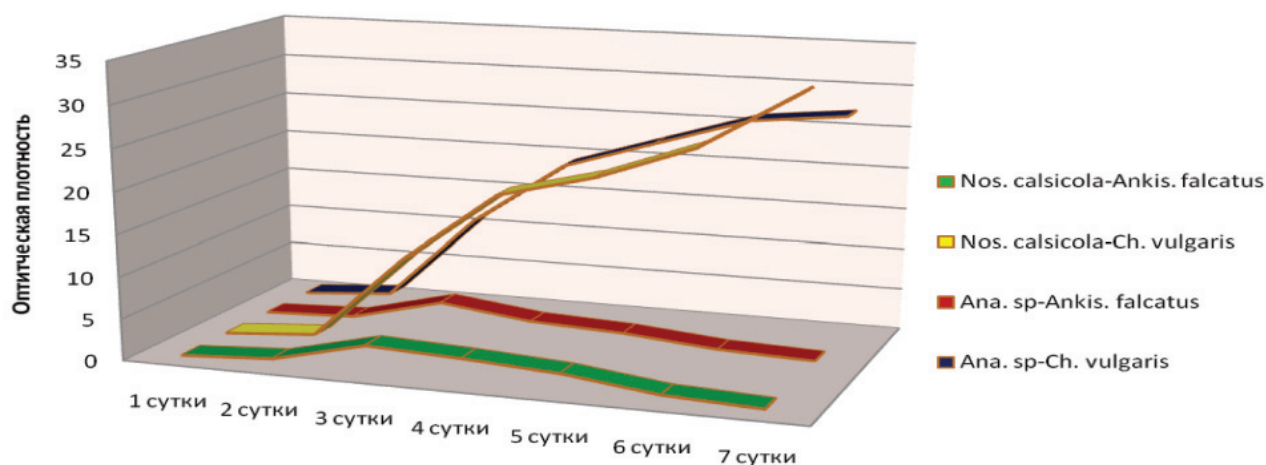


Рисунок 6 – Динамика роста консорциумов цианобактерий и микроводорослей

Таким образом созданы два новых консорциума цианобактерий и микроводорослей (*Anabaena sp.* – *Chlorella vulgaris* и *Nostoc caldicola* с- *Chlorella vulgaris*), которые

могут быть предложены для использования в агробиотехнологии для обогащения почв связанным азотом, а также для регуляции pH среды (нейтрализации).

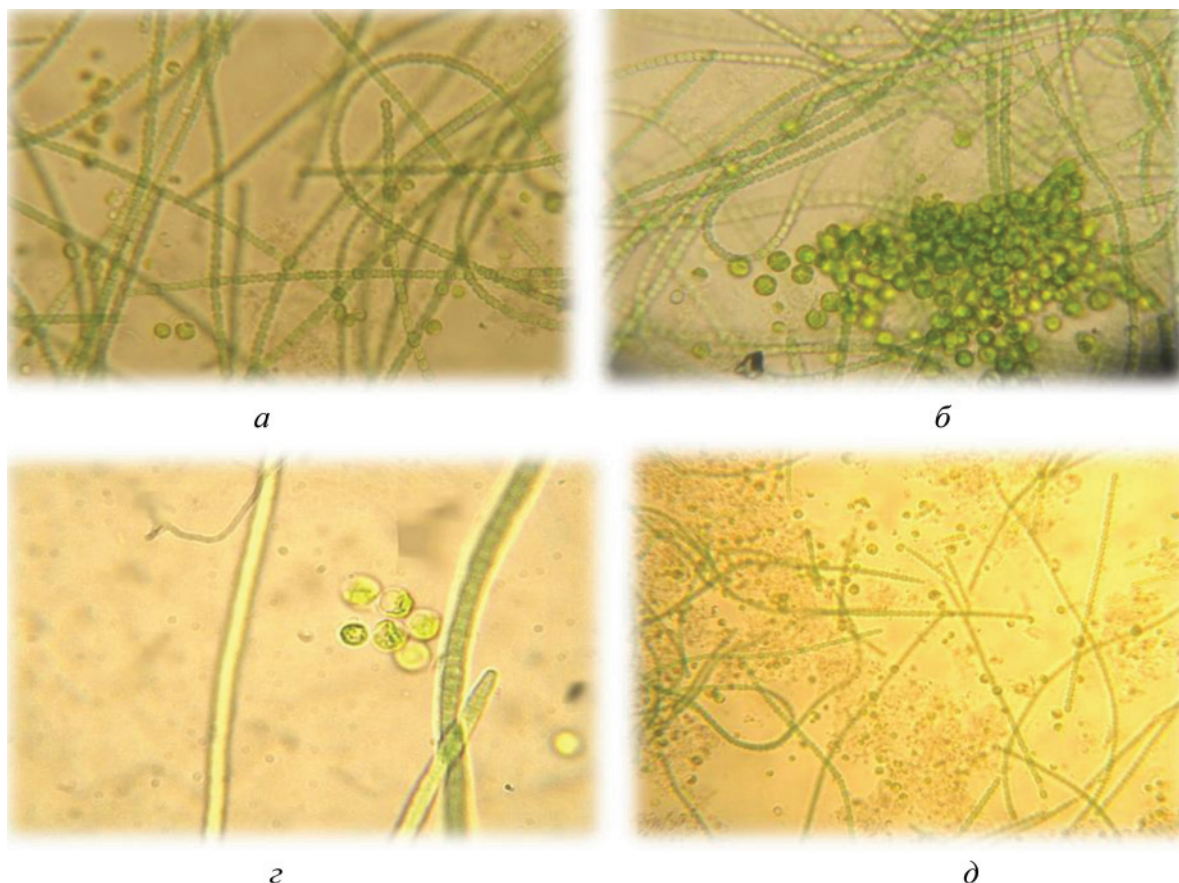


Рисунок 7 – Морфология культур в искусственных консорциумах *Anabaena* sp. с *Chlorella vulgaris* (а, б) и *Nostoc caldicola* с *Chlorella vulgaris* (г, д)

Литература

- 1 Панкратова Е.М., Калинин А.А. Цианобактерии как возможные организмы для создания бактериальных препаратов // Роль научн. исслед. в развитии сельского хозяйства. производства Кировской области. Киров, 1991. – С.25-33.
- 2 Калинин А.А. Цианобактерии как возможные компоненты дизатрофных микробных ассоциаций и их влияние на растения: Автореферат.дисс. канд.биол. наук. М., 1995. – 23 с.
- 3 Ковина А.Л. Микробные агроконсорциумы на основе цианобактерий: Автореферат.дисс. канд. биол. наук М., 2001.-23 с.
- 4 Панкратова Е.М., Зяблых Р.Ю., Калинин А.А., Ковина АЛ., Трефилова Л.В. Конструирование микробных культур на основе синезеленой водоросли *Nostocpaludosum* Kiitz.il Альгология, 2004. Т.14 №4.-С.445-458.
- 5 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. -247с.
- 6 Эргашев А.Э. Определитель протококковых водорослей Средней Азии. – Ташкент: Фан, 1979. – Ч.І. – 343с.
- 7 Эргашев А.Э. Определитель протококковых водорослей Средней Азии. – Ташкент: Фан, 1979. – Ч.ІІ. -383с.
- 8 Овсеникова М. Н. Методы получения бактериологически чистых культур одноклеточных зеленых водорослей // Бот.журн. – 1971. – №58. – С.1141-1147.

9 Заядан Б.К., Өнерхан Г. Микробалдырлардың таза дақылдарын бөліп алу және оларды белсенді өсіру тәсілдері. – Көкшетау, 2008. – 95 б.

10 Заядан Б.К., Акмуханова Н.Р., Садвакасова А.К Коллекция микроводорослей и методы их культивирования. – Алматы, 2013. – с. 158.

Reference

1 Pankratova E.M., Kalinin A.A. Cianobakterii kak vozmozhnye organizmy dlya sozdaniya bakterialnyx preparatov // Rol Nauchn. issled. v razvitii selskogo khozyajstva. proizvodstva Kirovskoj oblasti. Kirov, 1991. -s.25-33.

2 Kalinin A.A. Cianobakterii kak vozmozhnye komponenty dizatrofnyx mikrobnnyx asociacij i ix vliyanie na rasteniya: avtoreferat.diss. kand.biol. nauk. M., 1995. – 23 s.

3 Kovina A.L. Mikrobnnye agrokonsorciumy na osnove cianobakterij: avtoreferat.diss. kand.biol. nauk M., 2001.-23 s.

4 Pankratova E.M., Zyablyx R.Yu., Kalinin A.A., Kovina Al., Trefilova L.V. Konstruirovaniye mikrobnnyx kultur na osnove sinezelenoj vodorosli nostocpaludosumkiitz.il algologiya,2004. t.14 №4.-s.445-458.

5 Sirenko L.A., Sakevich A.I., Osipov L.F., Lukina L.F. I Dr. Metody fiziologo-bioximicheskogo issledovaniya vodoroslej v gidrobiologicheskoy praktike. – Kiev: Nauka Dumka, 1975. -247s.

6 Ergashev A.E. Opredelitel protokokkovyx vodoroslej Srednej Azii. – Tashkent: Fan, 1979. – ch.i. – 343s.

7 Ergashev A.E. Opredelitel protokokkovyx vodoroslej Srednej Azii. – Tashkent: Fan, 1979. – ch.ii. -383s.

8 Ovsenikova M. N. Metody polucheniya bakteriologicheskii chistykh kultur odnokletochnykh zelenykh vodoroslej // Bot.Zhurn. – 1971. – №58. – s.1141-1147.

9 Zayadan B.K. G. Өнерханмикробалдырлардың таза дақылдарын бөліп алу және оларды белсенді өсіру тәсілдері көкшетау 2008ж, 95б.

10 Zayadan B.K., Akmuxanova N.R., Sadvakasova A.K Kolleksiya mikrovodoroslej i metody ix kultivirovaniya.- Almaty, 2013 s. 158