

Симбиоз как основа существования цианобактерий в естественных условиях и в конструируемых системах

Е.М. Панкратова, Л.В. Трефилова

Вятская государственная сельскохозяйственная академия

Цианобактерии как древнейшие организмы первоначально существовали в виде симбиозов, прежде всего с бактериальной гетеротрофной микрофлорой, выполняющей роль редуцентов и стабилизирующей существование первичного ценоза. В настоящее время данная гипотеза подтверждена работами по бактериальной палеонтологии, опытами по моделированию строматолитов и многочисленными наблюдениями за существованием цианобактерий в природных условиях. Способность цианобактерий входить в симбиотические отношения с разнообразными представителями флоры и фауны развилась в процессе эволюции жизни на Земле и послужила основой для их сохранения, широкого распространения и, более того, процветания в определенных экотопах. Это свойство цианобактерий использовано при создании синцианозов.

Cyanobacteria as the oldest organisms have primarily existed in the form of symbioses, most symbioses being formed with heterotrophic bacterial microflora which plays the role decomposers thus stabilizing initial coenosis. This hypothesis has been verified by papers on bacterial paleontology, simulation models for investigation of stromatolites, and numerous cyanobacteria observations in natural environment. Cyanobacteria evolved their ability to form symbiotic relationships with various floral and faunal forms during the evolution of life on Earth. This ability has enabled them to ensure their own survival, widespread occurrence and, moreover, prosperity in certain ecotopes. This property of cyanobacteria was used in creating syncyanoses.

Введение

Симбиоз как совместное существование неродственных организмов – это функциональное явление адаптации каждого партнёра и системы в целом к меняющимся условиям среды обитания. Наиболее общий результат симбиотических отношений состоит в увели-

чении экологических возможностей организмов, что является движущей силой возникновения симбиоза. Как правило, они возникают в среде, обеднённой жизненными ресурсами, а симбиотические взаимоотношения партнёров увеличивают возможности их выживания [1]. Ни одна другая группа микроорганизмов не использовала в таком объёме симбиотические

Таблица 1

Симбиотические ассоциации цианобактерий с прокариотными и низшими эукариотными организмами

В ассоциации с:	Симбионт	Примечание
Суанобактерия гетероцистные и негетероцистные формы	Различные нефотосинтезирующие бактерии (helper-bacteria)	Находятся в слизистых чехлах и околоклеточной слизи в течение всей жизни ЦБ. Видовой состав изменяется в зависимости от среды.
Algae Морские и пресноводные Vaccillariophyta Морские Chlorophyta: <i>Codium fragile</i> , <i>C. adhoerous</i> , <i>C. decorticantia</i>	ЦБС: <i>Richelia</i> , <i>Calothrix</i> , одноклеточные ЦБ ЦБС: <i>Microcoleus</i> , <i>Calothrix</i> , <i>Scytonema</i>	ЦБС находится в периплазматическом пространстве. Эндосимбиоз. ЦБ сначала представлены эпифитами, потом ЦБС локализуется в утриколах, т.е. является эндосимбионтом.
Fungi (цианолишайники) Фикомицет <i>Geosiphon puriforme</i>	ЦБС: <i>Nostoc</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Stigonema</i> , <i>Fischerella</i> , <i>Calothrix</i> , <i>Microcoleus</i> , Одноклеточные ЦБ <i>Nostoc sphaericum</i>	Межклеточный симбиоз. Двухкомпонентный симбиоз только с ЦБС. Трёхкомпонентный – включает и зелёные водоросли. Гриб развивается внутри клеток ностока (сбалансированный паразитизм?).

Примечание. Условные обозначения: ЦБ – цианобактерии; ЦБС – цианобактериальный симбионт.
Ссылки на источник в тексте.

Симбиотические ассоциации цианобактерий с высшими растениями

Ассоциации с:	Цианобактериальный симбионт (ЦБС)	Примечание
<i>Bryophytes</i> <i>Antoceros punctatus</i> <i>Blasia pusilla</i> <i>Cavicularia densa</i> <i>Sphagnum spp.</i> <i>Polytrichum commune</i> <i>Mnium spp.</i> <i>Brium argenteum</i>	<i>Nostoc punctiforme</i> <i>N. sphaericum</i> <i>N. sphaericum</i> <i>N. sphaericum</i> <i>Nostoc</i> <i>Nostoc</i> <i>Nostoc, Anabaena</i>	ЦБС находится в слизистых камерах на внутренней стороне гаметофита. Межклеточный симбиоз. ЦБС в гиалиновых клетках на зелёных верхушках мха.
<i>Pteridophytes</i> <i>Azolla</i> (7 видов)	<i>Nostoc azollae</i> (ранее идентифицировался <i>A. azollae</i>)	ЦБС в камерах на ваях около стебля спорофита.
<i>Lemna</i> <i>L. minuscula</i> <i>L. gibba</i> <i>L. trisulca</i> <i>L. spirodella</i>	<i>Nostoc, Gloeotrichia,</i> <i>Anabaena, Calothrix,</i> <i>Cylindrospermum</i>	ЦБС на поверхности листьев и в эпидермисе на корнях; нитрогеназная активность в десятки раз ниже, чем на листьях.
<i>Gymnosperms</i> <i>Cycads</i> (9 родов и 90 видов)	<i>N. cycadae</i>	ЦБС в апогеотропных корнях и кортикальной зоне корневых клубеньков; в бугорках около основания листа. Много гетероцист. Способен к фотосинтезу.
<i>Angiosperms</i> <i>Gunnera kaalesis</i> <i>G. manigata</i> <i>G. seabra</i> <i>G. magilanica</i>	<i>Nostoc</i> <i>N. punctiforme</i> <i>N. punctiforme</i> <i>N. punctiforme</i>	ЦБС вокруг клеток хозяина, около железок стебля. Теряет фикоцианин.
<i>Orhids</i> <i>Calanthe vestita</i> <i>Dendrobium moshatum</i> <i>Acampe papillosa</i>	<i>Nostoc, Oscillatoria</i> <i>Nostoc</i> <i>Nostoc</i>	ЦБС в слое клеток воламена

отношения, как цианобактерии (ЦБ). Назрела необходимость инвентаризации этих систем. Появился материал, позволяющий использовать эволюционные подходы к объяснению их возникновения. Требуется обсуждения возможность использования естественных и искусственных симбиозов в биотехнологии и, в частности, в агробиотехнологии.

Распространение симбиозов. Эволюционно первородными местообитаниями для ЦБ были океанические воды, поэтому первоначально им дали название растений, растущих в воде, – водорослей. Естественны ожидания и поиски ассоциативных связей с обитателями этих биомов. Они были найдены среди морских диатомей и морских зелёных водорослей (табл. 1), водного папоротника (табл. 2), губок (табл. 3) и даже видов водных насекомых. Самые тесные, по существу эволюционно «первородные», ассоциации у ЦБ возникли с различными нефотосинтезирующими бактериями. В большинстве случаев уже в качестве этого цианобактериального симбиоза они являются партнёрами более сложных построений с другими организмами. ЦБ создали единые организмы с океаническими и пресноводными диатомовыми водорослями (*Bacillariophyta*), имеющими хромато-

фор [2]. К примеру, *Richelia intracellularis* (*Cyanobacteria*) обнаружена в клетках нескольких видов *Rhizosolenia* и *Hemiaulus*: *H. haukii*, *H. membranaceus*. Морские зелёные водоросли (*Chlorophyta*) (табл. 1), в частности, виды *Codium* (*C. fragile*, *C. adhaerous*, *C. decorticatum*) имеют эндофитом также цианеи [3]. Хозяевами в симбиозе могут быть также водорослевые клетки, лишённые пластид, имеющие неопределённое таксономическое положение [4].

К одним из самых известных и распространённых симбиозов относится лишайниковый. Около 8 – 10% от приблизительно 18000 видов являются цианолишайниками [5]. Необычный симбиоз отмечен между фикомицетом *Geosiphon pyriforme* и *Nostoc sphaericum*. Клетки ЦБ имеют нередуцированную, типичную для *Cyanobacteria* клеточную стенку. Гифы оплетают ЦБ и проникают в гормонии, где способны переживать неблагоприятные условия. Номенклатура такого симбиоза устанавливается. Формально его относят к *Glaucophyta* [6]. Не менее широко симбиозы, в которые входят ЦБ, распространены среди более сложных организмов (табл. 2).

Хорошо известны симбиозы печёночников *Blasia* и *Cavicularia* [7] с 7 видами вод-

Симбиотические ассоциации цианобактерий с протистами и животными

Ассоциации с:	Цианобактериальный симбионт (ЦБ)	Примечание
<i>Protists</i> <i>Amoeba</i> <i>Paulinella chromatophora</i> <i>Glaucophyta (Cyanophora)</i>	Цианеллы	Внутриклеточное включение ЦБ, напоминающее одноклеточные формы. Сильный метаморфоз ЦБС.
<i>Sponges</i> <i>Calearea</i> <i>Desmospongia</i>	<i>Aphanocapsa</i> <i>Phormidium</i>	Губки в фотической зоне моря. ЦБС находится между клетками в поверхностных тканях.
<i>Diptera</i> <i>Chironomidae</i> <i>Cricotopus nosticola</i> <i>C. fuscata</i>	<i>Nostoc</i>	Симбиоз с личинками двукрылых насекомых, живущих в небольших открытых водоемах. ЦБС сильно морфологически изменен.

ного папоротника *Azolla* [8], имеющими симбионтом *Anabaena (Nostoc)*.

Виды *Nostoc* и *Hapalosiphon*, наряду с сопутствующими им видами гетеротрофных бактерий, оказываются захваченными гиалиновыми клетками мхов, например *Sphagnum*, *Polytrichum*, *Mnium*, *Brium* [9]. Широко распространённое водное растение ряска (*Lemna*) покрывает часть азотного дефицита за счет симбиоза с ЦБ. Её виды – *L. minuscule*, *L. alba*, *L. gibba*, *L. trisulca*, *L. spirodella* образуют симбиотические ассоциации с разнообразными гетероцистными формами ЦБ. ЦБ находятся в симбиозе с 9 родами и 90 видами *Cycads* [10] и 8 видами *Gunnera* [11], найдены и в группе

орхидных растений [12]. Есть единичные сообщения о нахождении in situ ЦБ в клубеньках *Trifolium alexandrinum* [13, 14].

ЦБ образовали симбиозы с животным (табл. 3). Эти организмы, фактически находясь «на грани двух миров» (растений/животных), – протисты. В них фотобионт превращается во внутриклеточное включение, напоминающее одноклеточные формы цианей, получившие название цианелл [4], под которым они вошли в учебники микробиологии. Не являются протисты наглядным примером из возможной истории возникновения эукариотной клетки. Тем более что на основании молекулярных исследований 16S РНК в настоящее время получены доказательства происхождения пластид растений от общего предка, подобного ЦБ [15].

В большинстве случаев идентификация цианобактериального симбионта затруднена. В настоящее время в таксономических опделителях не приводится различий между родами *Nostoc* и *Anabaena* (принадлежащих одному порядку *Nostocales*) в процессе их нелиза. Помимо этого, при симбиотическом существовании ЦБ модифицируются метаболизм (вплоть до утери фотосинтеза у цианобактериального симбионта *Gunnera*), морфология и структура клетки, часто отмирают вегетативные клетки и увеличивается (не по диагнозу вида) количество гетероцист [16]. Это отражает адаптацию ЦБ в процессе пространственной и метаболической интеграции партнеров в единую симбиотическую систему. Очень часто в симбиозе принимают участие несколько видов, следовательно, популяций ЦБ, что также ложняет идентификацию цианобактериального симбионта. В этом случае авторы часто ограничиваются лишь родовым названием (табл. 1, 2, 3).

Приведённый довольно эклектичный обзор (вопрос требует монографического из

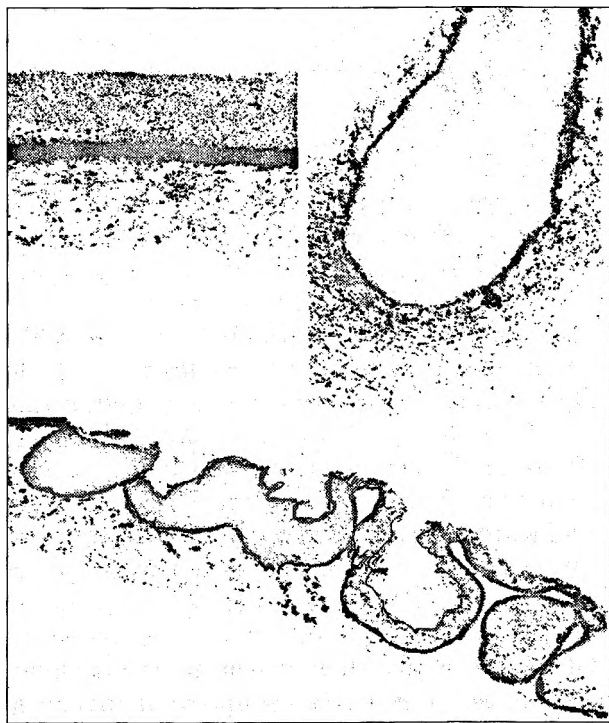


Рис. 1. Структурные модификации внешних покровов *Nostoc commune* Vauch. (По: [19])

жения) всё же позволяет сделать два заключения: во-первых, отметить, что симбиотические связи ЦБ очень обширны (по-видимому, эти организмы использовали все пути для выживания) и, во-вторых, что исследователи цианобактериальных симбиозов находятся только в начале инвентаризации их форм.

Цианобактериальный симбионт. В настоящее время формируется мнение, что сами ЦБ изначально, т. е. в процессе возникновения жизни на нашей планете, образовали тесные ассоциативные связи с гетеротрофными нефотосинтезирующими бактериями, т. е. представляют собой типичный сложный коэволюционно возникший организм. Согласно современной парадигме, основа которой была заложена в трудах В.И. Вернадского [17], многие организмы появились на Земле сразу в виде экосистем со структурой первичных продуцентов, консументов и редуцентов. Существование ЦБ датировано бактериальной палеонтологией [18] эпохой докембрия в составе сложно организованных сообществ (биоплёнок, цианобактериальных матов, древних и современных строматолитов). ЦБ являлись эдификаторами таких систем, как фототрофы, выполняющих основную функцию «кормильца» (снабженца). Этот симбиоз сохранился до нашего времени. Определение «свободноживущие» ЦБ не соответствует реалиям. Доказательства того, что ЦБ нельзя рассматривать как дискретные целостные организмы сводятся к следующим соображениям. В природе ЦБ всегда находятся в биологической системе с гетеротрофными бактериями, заселяющими структурированную слизь, окружающую одиночные клетки и чехлы нитей. Слизистые обёртки на поверхности у некоторых видов переходят в кожистые плёнки, называемые перидермом. Исследование слизи у *N. commune* (рис. 1) показало в ней радиально ориентированные фибриллы, внешние слои её трансформируются в

видимые инвагинации, которые могут быть для бактерий «ловчими мешками».

Наряду с многочисленными функциями (физико-химические способы сорбции, участие в хелатинизации, облегчение движения гормогониев, защита от высыхания и избыточной инсоляции, роли запасного вещества, уменьшения парциального давления кислорода, защиты от фагоцитоза, механического повреждения и др.) слизь играет роль инкубационной камеры для бактериальных спутников, сферы их обитания, которая существует, вероятнее всего, миллионы лет.

Итак, целесообразно признать, что слизистые обёртки и чехлы ЦБ – это элементы структуры цианобактериальной особи, отличные от капсул эубактерий тем, что в них находятся бактериальные вселенцы – спутники ЦБ, составляющие вместе цианобактериальное сообщество. Ещё классик альгологии А.А. Еленкин писал: «Культуры синезелёных благодаря обилию выделяемой ими слизи чрезвычайно трудно освободить от бактерий, так как эти последние, живущие в симбиозе с синезелёными водорослями, не только ютятся на поверхности их тела, но и глубоко проникают в слизь колоний и влагалища нитей» [20].

Для ряда физиолого-биохимических работ необходимо иметь аксеничные (pure culture) культуры ЦБ. По нашим данным, они не могут долго жить в этом состоянии: сначала организм отстаёт в росте и в проявлении определённых функций (табл. 4), а затем гибнет или «заражается» новыми спутниками (возможно, сохранившимися в слизи в персистентном состоянии во время очистки).

Сохранить в коллекции аксеничные штаммы ЦБ очень трудно. Многие ЦБ до сих пор не удаётся получить в аксеничном состоянии, например, *Gloeothrichia natans* и *Microcoleus chthonoplastes*. У последней была обнаружена облигатная зависимость от *Pseudomonas*

Таблица 4

Сравнительный рост и азотфиксация цианобактериальных и чистых культур Cyanobacteria

Цианобактерия, штамм	Состояние культуры	Накоплено мг/100 мл среды	
		Сухое вещество	Азот
<i>Anabaena cylindrica</i> , 527*	Цианобактериальная	80.0±1.01	4.91±0.12
Та же	Аксеничная	38.5±0.28	3.72±0.08
<i>Nostoc muscorum</i> , 137	Цианобактериальная	91.2±0.99	5.60±0.17
Та же	Аксеничная	87.3±1.03	3.20±0.22
<i>A. variabilis</i> , 305*	Цианобактериальная	22.4±0.22	1.59±0.15
Та же	Аксеничная	15.3±0.25	1.30±0.11
<i>N. paludosum</i> , 18	Цианобактериальная	60.2±0.28	5.01±0.08
Та же	Аксеничная	30.1±1.02	2.95±0.09

Примечание. Отмечены культуры коллекции CALU (Collection Algal in Leningrad University, Громов). Экспозиция в люминестате на безазотистой среде Громова №6 [21] в течение месяца.

nautica; её отсутствие приводило к ингибированию цианей продуктами фотосинтеза, такими как перекись водорода и кислород, т. к. она не имеет каталазной активности [22].

Мировые коллекции ЦБ скромно умалчивают о количестве бактериально-чистых культур (исключение *Pasteur collection*. Париж. [23]). В то же время, находясь в коллекциях в виде одновидовых популяций в присутствии бактерий-спутников, они при регулярном пересеве на свежую среду сохраняются активными десятилетия. Образование стабильных ассоциаций между ЦБ и нефотосинтезирующими бактериями невозможно без взаимной регуляции партнёров, что является ключевым механизмом взаимодействия. Так, численность бактериальных клеток в культуральной среде (жидкая культура ЦБ) всегда больше, чем в околклеточной слизи. С возрастом численность бактерий в околклеточной слизи в условиях замкнутых жидких культур уменьшается, что свидетельствует об установлении гомеостаза. Биомасса бактерий составляет только 2% от массы азотфиксирующих ЦБ [24].

Бактерии-спутники представлены всеми физиологическими группами: аммонификаторами, олигонитрофилами, денитрификаторами, актиномицетами [24]. Принципиальное значение имеет вопрос об уровнях близости бактерий-спутников к цианобактериальной клетке. Как отличить вселенцев в слизистые обёртки от обычных спутников этих организмов в любой среде обитания? Каковы основы упорядоченного взаимодействия и взаимозависимости партнёров, образующих единую систему?

Исследования начались с изучения видового состава *helper-bacteria*. Он оказался непостоянен как по численности клеток, так и по видовому разнообразию, что определялось экологическими условиями биотопа. Наиболее постоянны (так называемые «сквозные виды») только некоторые слизевые олигонитрофильные бактерии: беспоровые грамтрицательные палочки, относящиеся к родам *Chromobacterium* и *Pseudomonas*. Значительно меньше, но постоянно встречаются бактерии из родов *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Bacillus* [25]. Видовой состав и численность клеток меняются без строгой пролиферации к клеткам ЦБ в зависимости от изменяющихся условий. Создаётся впечатление, что клетки фототрофа «рекрутируют» в сообщество бактерии, помогающие ему выжить в конкретных условиях, ограничивая доступ другим, т. е. регулируют их состав. Среди них могут обнаружиться и совершенно случайные

виды бактерий – холерный вибрион [26], легионелла [27]. Партнёры цианобактериальных комплексов (ЦБК) взаимосвязаны так, что конечные продукты жизнедеятельности одного вида служат ресурсом (энергии либо вещества) для другого, а изъятие этих ресурсов есть необходимое условие поддержания разности концентраций субстрата и продукта. ЦБК, в отличие от многих других симбиозов, очень динамичен.

Есть ещё одно неоспоримое доказательство, что ЦБ образуют единый комплекс с нефотосинтезирующими бактериями. ЦБК тиражирует себя в условиях симбиозов с различными организмами. Так, *Azolla pinnata* фактически представляет трехкомпонентный симбиоз: папоротник + носток + гетеротрофные бактерии-спутники. Последние как минорный компонент обеспечивают устойчивость симбиотической ассоциации [28]. У орхидных в слизи, где находятся ЦБ, присутствует большое число кокко- и палочковидных бактериальных клеток [12]. Утверждается участие именно ЦБК в развитии симбиоза с саговниками [29].

Таким образом, можно заключить, что пока неизвестна специфичность сопутствующей цианобактериальной микрофлоры, границы изменчивости ЦБК в разных условиях, однако изучение последнего позволяет считать, если не генетическую определенность состава *helper-bacteria*, то, по крайней мере, генетическую предрешённость их вселения.

Становится очевидной неисчерпаемость объекта понятием *Cyanobacteria*, если принять эталоном только их клетки. Парадокс, но сложившееся совершенно по другим принципам определение, подчеркивающее сходство этих организмов с бактериями, оказалось удачным с точки зрения симбиоза их с бактериями, и термин должен писаться через дефис циано-бактерии (*Cyano-bacteria*). Только консервативность научного мышления отвергает мысль, что циано-бактериальные клетки – это изначально природный симбиоз.

Взаимоотношения цианосимбионта с партнёрами симбиоза. Даже при поверхностном обзоре цианобактериальных симбиозов загадочным остаётся факт почти одностороннего участия в них ЦБ, относящихся к порядку *Nostocales*, преимущественно к роду *Nostoc*. Представители этого рода обладают гетероцистами и связанной с ними азотфиксацией. Остаётся невыясненным до конца вопрос: кто ког и как выбирает – ЦБ хозяина или наоборот.

Чаще всего наличие гетероцистных форм ЦБ в синцианозах связывают с улучшением азотного статуса хозяина за счёт азотфиксации партнёра. Этим и объясняют комплектацию различных организмов в бедных по питательным свойствам местообитаниях. Вместе с тем довлеющая парадигма, что усваивать молекулярный азот могут лишь гетероцистные формы ЦБ (оказавшаяся, кстати, в своё время очень плодотворной), оставляет без внимания многие виды этой группы организмов, хотя фактический материал заставляет часто признать их участниками симбиоза (табл. 1 и 2). В последние годы фиксация азота обнаружена у ЦБ, не образующих гетероцисты. У большинства из них найден нитрогеназный белок. Его активность сравнима с белком гетероцистных форм ЦБ, но он не всегда функционирует по пути восстановления N_2 [2].

Наши исследования показали на примере безгетероцистной ЦБ *Phormidium inundatum* Kutz наличие в её внешне недифференцированных нитях зон с повышенной нитрогеназной активностью, функционально сходных с гетероцистами. Блокирование этих зон кристаллами формазана резко уменьшало усвоение $^{15}N_2$. Наличие азотфиксации у безгетероцистных форм ЦБ обычно происходит в микроаэрофильных и в микроаэробных условиях или при пониженной интенсивности света [30, 31].

Значительный объем исследований посвящён изучению взаимоотношений партнёров в естественных синцианозах (Inter. Symp. of Cyanobacterial biotechnology, September 18-21, 1996, New Delhi Calcutta). Наиболее общая картина высвечивается в том случае, когда цианобактериальный симбионт (ЦБС) является азотфиксатором, а партнёр этим свойством не обладает: ЦБС усваивает молекулярный азот, транспортирует его в виде аммиака к нефиксирующему азот партнёру, что увеличивает резервы его роста.

Фиксация CO_2 и обмен её продуктами между партнёрами отличаются в различных симбиозах. У диатомовых оба симбионта фиксируют углекислый газ. У цианолишайников процесс фотосинтеза сосредоточен в ЦБС, но его продукт в виде глюкозы передвигается к грибам только в бисистемных лишайниках.

Оба партнёра мохообразных фиксируют CO_2 и продукты фотосинтеза и того, и другого направляются в русло азотфиксации и роста. Оба партнёра азотлового симбиоза обладают фотосинтезом, часть продуктов которого направляется к азотфиксирующему ЦБС. У зелёной морской водоросли *Codium fragile subsp.*

tomentosoides Silva, где ЦБ составляют до 20% от её общей биомассы, фиксированный азот достигает только 15% от азота, ассимилированного хозяином (источники литературы приведены ранее). По-видимому, ЦБ находят преимущества обитания в микроразонах угрикол, но не во взаимозависимой метаболической активности [3].

Некоторые симбиозы, например цианолишайники, концентрируют многие элементы питания. Уровень N, P, K, Fe и Mg в них значительно выше, чем в окружающей среде, что положительно сказывается на растениях, растущих рядом с ними [32].

На характер взаимоотношений влияют рН среды обитания, гидротермический режим, освещённость, доступность элементов питания, газовый режим и состояние доминантного партнёра.

Таким образом, в какой-то мере сложилось представление об аутоэкологии ЦБ и синэкологии их в синцианозах, прежде всего, в плане приспособления к физической среде. Но эти симбиозы в совместной деятельности партнёров оказывают в свою очередь влияние на среду обитания.

Экологическое влияние цианобактериальных симбиозов. Цианобактериальные симбиозы могут оказывать влияние на уровне микроразона в почвенных микроразонах [33]. Особенно ощутимо их действие в аридных и полуаридных территориях в Северной Америке, Южной Африке и Австралии. Хотя климат и растительность в этих регионах резко различны, сукцессионная последовательность до развития наземной растительности начинается с ЦБ, входящих впоследствии в состав биологически сложных комплексов. Образуется сложная мозаика из цианей, зелёных водорослей, мхов, цианолишайников, микроскопических грибов и разнообразных бактерий. Живой ковер начального корочкообразования покрывает до 70% и создаёт до 95% биомассы в местах, свободных от высшей растительности. Полисахаридный материал цианобактериальных нитей прикрепляется к поверхности почвенных частиц, связывая их и предотвращая в какой-то мере ветровую эрозию. Скорость азотфиксации была определена в пределах от 2 до 365 кг/га в год. Однако потери связанного азота составляют до 77% в результате ветровой эрозии, улетучивания аммиака, денитрификации, поэтому содержание азота ниже в пустынных почвах по сравнению с другими экосистемами. Во всяком случае, высшая растительность в этих местообитаниях существует за счёт азотфиксирующей способности ЦБ и их симбиозов [32].

В северных и умеренных широтах играют значимую роль цианолишайники. Особенно обильны они в открытых пространствах тундры и лесотундры, где часто ими определяется характер ландшафта.

Нам удалось исследовать активность двух цианолишайников в более южном регионе – Кировской области: *Peltigera canina* (L.) Wild и *P. aphthosa* (L.) Wild. (табл. 5). Местообитание – сосновый лес, вдоль дороги и на опушках. Цианобионт – *Nostoc*, до вида не идентифицирован, так как нити редуцированы. Клетки ЦБС капсулируются толстым слоем слизи.

Биомассу лишайников *in situ* определяли в конце сентября при возврате тепла после осенних заморозков. Оказалось, что она весьма значительна, содержит высокий процент азота и обладает азотфиксирующей способностью даже при низких температурах почвы. Принимая во внимание, что *пельтигера* отличается медленным ростом, увеличиваясь за год всего на 20-45 мм, вряд ли она играет большую экологическую роль.

В практическом плане большое внимание уделяется азолла-анабеновому (ностоковому) симбиозу, играющему большую роль в земледелии рисосеющих регионов.

Стала более ясна роль ЦБС в мире саговников и орхидных, способствующих сохранению биоразнообразия флоры [34].

В противоположность этому известно печальными экологическими последствиями «цветение» воды в зарегулированных водоемах под влиянием бурного размножения циановых.

Способность ЦБ и растений образовывать многочисленные симбиозы, в основе которых лежит свойство азотфиксации и фототрофности, привлекло мысль к их целенаправленному созданию (конструированию) в целях практического использования.

Практические подходы к использованию синцианозов. Работа идёт по двум направле-

ниям. Первое – конструирование микробных консорциумов на базе ЦБК. Это направление оформилось в виде приоритетного на кафедре ботаники, физиологии растений и микробиологии Вятской государственной сельскохозяйственной академии (ВГСХА) [35, 36, 37, 38, 39, 40].

Второе – изучение способности к совместному росту ЦБ с более чем десятком видов растительных партнёров, имеющих разный уровень организации, – от культивируемых клеток, тканей до интактных растений. Это направление развивается на кафедре физиологии микроорганизмов биологического факультета МГУ и достаточно обобщено [34]. При создании микробных синцианозов первоначально нами преследовалась цель чисто утилитарная: разработать на основе ЦБ новый подход к приёму инокуляции бобовых растений ризобиями. Известно, что он даёт нестабильные результаты, часто из-за плохой приживаемости инокулята и конкурентных отношений с аборигенной микрофлорой. Требовалась защита инокулята в момент его внесения, для чего предполагалось использовать мощные адаптационные возможности ЦБ, которые сами по себе, обладая ризогенным эффектом, стимулировали развитие корневой системы растения и способствовали заражению молодых корешков.

Затем задача была расширена до создания на основе ЦБ микробных консорциумов с агрономически полезной микрофлорой, опять-таки предназначенной для инокуляции почвы и семян. Здесь могли преследоваться разные цели биотехнологии, а с агрономических позиций – усиление роста растений.

Принцип использования сложных микробных консорциумов в агробиотехнологии основан на том, что в последние десятилетия микробиологи пришли к выводу о малой эффективности инокуляции почвы и семян мо-

Таблица 5

Азотфиксирующая активность и биомасса лишайников в сосновом лесу (Кировская область)

Лишайник	Избыток $^{15}\text{N}_2$ в талломах после инкубации, ат. %		Масса лишайника, ц/га за сезон	Содержание азота в талломах	
	При 20°C	При 2°C		В %	В массе, кг/га
<i>Peltigera canina</i>	0.18	0.08	18.9	4.5	85.3
<i>Peltigera aphthosa</i>	0.11	0.05	15.4	4.0	61.6

Примечание. Для инкубации использован вакуум-эксикатор и чашки Петри, куда на увлажнённую фильтровальную бумагу помещали образцы. Экспозиция 5 суток. Освещение аппаратуры 3-4 тыс.лк. Состав атмосферы: 30% N_2 с обогащением ^{15}N 30 ат.%; 20% O_2 , 5% CO_2 . Давление выравнивали аргоном. Анализ $^{15}\text{N}_2$ проводили спектрально-изотопным методом.

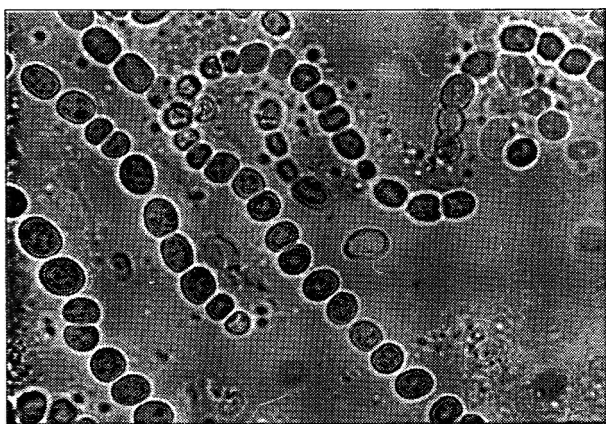


Рис. 2. Муцигель, окружающий вегетативные клетки *N. paludosum*, содержащий бактерии *Rhizobium leguminosarum* (фазово-контрастный микроскоп x2150).

нокультурами (популяциями одного вида) микроорганизмов и перспективности использования для этих целей их ассоциаций.

ЦБ как возможные компоненты и эдификаторы таких ассоциаций имеют следующие привлекательные черты:

- они могут существовать только при условии присутствия в их слизи helper-bacteria. В то же время непостоянство их видового состава оставляет возможность вселения в слизь программируемой микрофлоры;

- они легко вступают в ассоциативные связи и прочно их сохраняют при флуктуациях гидротермических условий среды;

- ЦБ приспособляются к вариации разнообразных почвенных условий благодаря многофункциональности процессов, заложенных в их геноме: могут осуществлять кислородный или анаэробный фотосинтез, расти в широком диапазоне содержания кислорода в микроразонах почвы – от анаэробных, микроанаэробных до аэробных условий;

- изменять процессы питания, переходя от автотрофии на миксотрофию и, в ряде случаев, на гетеротрофию;

- перестраивать физиолого-биохимические процессы при вариации гидротермических условий. Все это отличает их от остальных представителей царства прокариот.

Уникальные свойства ЦБ могут быть использованы для выживания бактериальных вселенцев, внедрённых в слизистые обёртки их клеток и нитей.

Этапы создания искусственных консорциев включали следующие ступени.

Прежде всего, проведён скрининг коллекционных культур ЦБ, представляющих одновидовую популяцию с нативными гетеротрофными спутниками. В критерии отбора входила скорость роста на минеральной безазотистой среде, размеры накопления азота (метод Къельдаля) и биомассы (по сухому веществу). После изучения 98 коллекционных штаммов (коллекция ВГСХА) по этим критериям выделили *Nostoc paludosum* Kutz., шт. 18; *N. linckia* (Roth.) Born et Flah., шт. 271, *Microchaete tenera* (Thur.) Elenk, шт. 265.

Затем следовала очистка отселектированных штаммов от бактерий-спутников.

Третий этап работы включал подбор новых, программируемых бактерий для образования искусственного консорциума. Мы исходили из принципа работы с теми видами, которые были отселектированы во ВНИИСХ микробиологии и уже использовались для приготовления агробиопрепаратов: виды рр. *Rhizobium* (Frank.), *Agrobacterium* (Conn.), *Pseudomonas* (Migula.) и *Arthrobacter* (Conn).

Заключительным этапом было изучение совместимости вселенцев с ЦБ, определение оптимального соотношения клеток партнёров, сроков подсева инокулята к культурам ЦБ, выбор субстрата для культивирования, определение жизнеспособности искусственных консорциумов при разных условиях и сроках.

В результате работы были получены искусственные консорциумы, названные нами агро-

Таблица 6

Влияние инокуляции семян бобовых культур на образование клубеньков и нитрогеназную активность (сводные данные по опытам А.А. Калинина, А.А. Ковиной, Е.М. Панкратовой, И.А. Устюжанина)

Культура	Состав инокулята	Количество клубеньков, шт.
Горох	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	577 на одно растение
	<i>Nostoc paludosum</i> + <i>Rhizobium leguminosarum</i>	977 на одно растение
Козлятник	<i>R. galegae</i>	13735 на м ²
	<i>N. paludosum</i> + <i>R. galegae</i>	26240 на м ²
Клевер	<i>R. trifolii</i>	6820 на м ²
	<i>N. paludosum</i> + <i>R. trifolii</i>	8980 на м ²

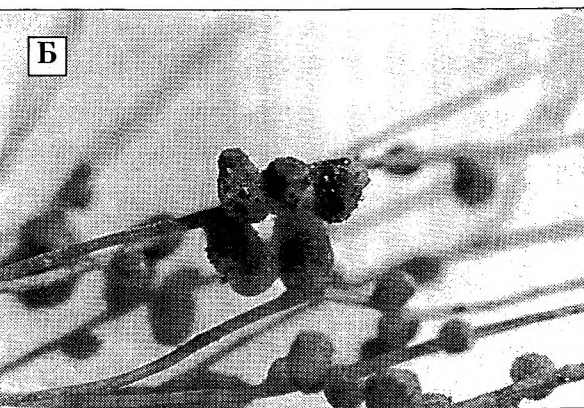
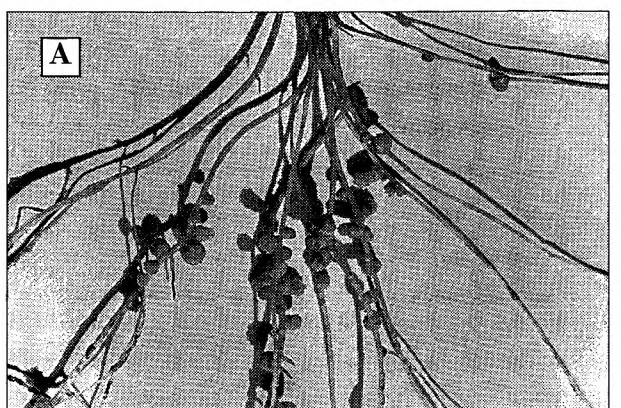


Рис. 3. А – образование клубеньков на корнях гороха при инокуляции консорциумом *N. paludosum* + *R. leguminosarum*; Б – обрастание корней и клубеньков гороха цианобактерией *N. paludosum*. (По: Панкратова и др., 2004)

цианами, самыми перспективными из которых оказались симбиозы между *Nostoc paludosum* и видами *Rhizobium*. Удалось показать, что клетки ризобий проникают в слизь, окружающую клетки ностока (рис. 2) [38, 39].

Бинарные консорции ностока с ризобиями оказались структурами, способными сохраняться длительное время в коллекции.

При инокуляции растений искусственными микробными системами на их корнях образовывалось больше клубеньков, чем при стандартной инокуляции семян *Rhizobium* (табл. 6), при этом увеличивалась нитрогеназная активность.

В водных культурах хорошо была заметна концентрация ЦБ на клубеньках (рис. 3. А, Б), поэтому их цвет менялся от бледно-розового до зеленоватого.

Удалось показать, что ЦБ проникали внутрь клубеньков, что хорошо видно на приведённой фотографии (рис. 4).

Кроме того, нужно отметить, что ЦБК обладают фитосанитарным эффектом, угнетая или

уничтожая некоторые виды грибов рода *Fusarium* (*F. nivale* на озимой ржи, *F. culmorum* на капусте), а также возбудителей килы (*Plasmodiophora brassicae*) и черной ножки. Примером может быть материал, представленный на рисунке 5.

В перспективе на основе ЦБ могут быть созданы более сложные микробные консорциумы, состоящие из 3 – 4 консортов, для выполнения целенаправленных агрономических или экологических действий.

Можно прогнозировать, что консорциумы на основе ЦБ, учитывая широкий диапазон распространения последних, адаптационные возможности и легкость образования ассоциативных связей с гетеротрофной микрофлорой, в недалёком будущем могут быть использованы не только в агробиотехнологии, но и для различных целей, где требуется многостороннее микробиологическое воздействие на окружающую среду.

Синцианозы на уровне высших растений. Настоящая работа не преследовала цель освещения очень перспективного направления, созданного на кафедре физиологии фототрофных микроорганизмов МГУ по образованию искусственных синцианозов между высшими растениями и ЦБ. Эти пионерные исследования являются интеллектуальной собственностью коллектива названной кафедры. Наиболее подробный современный обзор сделан в работе М.В. Гусева [34], что освобождает нас от необходимости обобщения этих работ. Достаточно указать, что сообщено об искусственных синцианозах на примере клеток, тканей и целых растений: ряски, люцерны, рапса, бобов, табака, риса, паслена, чёрной смородины, женьшеня и раувольфии.

Создание синцианозов с высшими растениями заманчиво практически перспективами внедрения азотфиксирующего начала.

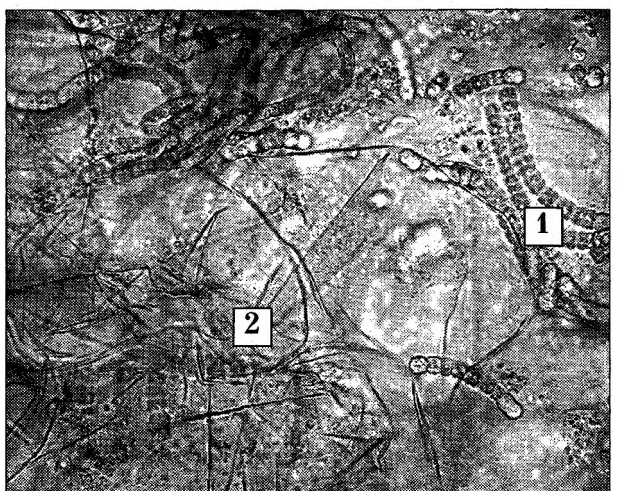


Рис. 4. Цианобактерии в клетках клубенька гороха: 1 – нить *Nostoc paludosum*; 2 – клеточная стенка клетки клубенька

Проведённые исследования по искусственным синцианозам позволили найти подходящие пути к очень перспективному направлению биотехнологии, в частности, к агробиотехнологии. Возможно, развитие именно ассоциативной симбиологии ближе всего стоит к осуществлению мечты земледельца – созданию растений, обладающих способностью усваивать молекулярный азот.

Заключение

ЦБ – одна из наиболее изучаемых в настоящее время групп микроорганизмов, с которой связывается появление кислорода в атмосфере Земли, образование клетки как основной структурной единицы всего живого, создание генетического кода, ставшего универсальным для всех обитателей планеты. На основании метаболизма этих организмов развились два кардинальных процесса в биосфере – фотосинтез и усвоение молекулярного азота прокариотами. В основе дыхания также лежат процессы окислительного фосфорилирования, сформировавшиеся в те далёкие эпохи. ЦБ поражают наше воображение тем, что, возникнув миллиарды лет назад (какая форма жизни предшествовала этому – неизвестно), они преодолели условия «обнажённой» планеты, не экранированной от жёсткого излучения космоса, бурной тектоники и движения материков, повторяющихся оледенений и колебания температур в океане от 0 до 90 °С. При всех этих катастрофах и катаклизмах они сохранили с тех пор до нашего летоисчисления узнаваемые морфологические особенности. Удивительная их устойчивость

всегда озадачивала исследователей. Изучение закономерностей вхождения ЦБ в состав различных симбиозов в природе и в искусственно созданных консорциях дают доказательство в пользу гипотезы, что сохранение их в миллиардолетиях во многом обусловлено способностью вступать в тесные взаимоотношения с самыми разнообразными организмами. В одних случаях ЦБ, являясь эдификаторами сообщества, например, в симбиозах с нефотосинтезирующими прокариотами, «рекрутируют» в их состав бактерий-спутников, помогающих «пришлифоваться» к конкретному местообитанию и навязывая им свой режим выживания. В других, способные к экто- и эндосимбиозу ЦБ находят для себя защитную экологическую нишу в специальных полостях корней, листьев и стеблей, развиваясь по типу межклеточного и внутриклеточного симбиоза. В этих случаях они встраиваются в метаболические процессы хозяина.

Исследования естественных и модельных симбиозов обнаружило гораздо большее распространение этого явления с участием ЦБ, чем предлагалось ранее.

Последние десятилетия показали необходимость и перспективность изучения и использования в практике синцианозов. Таким образом, рожденные в симбиозе ЦБ, что, по видимому, эволюционно предопределено в генетической программе этих организмов, в нём и живут в природе. В то же время это определяет перспективность конструирования на основе ЦБ синцианозов *de novo*, что может оказать большое влияние на биотехнологию.

Литература

1. Проворов Н.А. Генетико-эволюционные основы учения о симбиозе // Ж. общая биология. – 2001. Т. 62. – №6. – С. 472-495.
2. Rai A.N. Cyanobacterial nitrogen metabolism: relevance in agricultural biotechnology // In: Cyanobacterial biotechnology. Proceed. Int. Sympos. (Sept. 14-21. 1996) – Publ. Oxford a. IBN. – 1998. – P. 223-231.
3. Gerard V.A., Durgam S.E., Rosenberg G. Nitrogen fixation by cyanobacteria associated with *Codium fragile* (Chlorophyta): experimental effects and transfer of fixed nitrogen // Marine Biology. – 1990. – V. 105. – P. 1-8.
4. Reisser W. Endosymbiotic cyanobacteria and cyanellae // Cell interact. – Berlin e.a. – 1984 – P. 91-112.
5. Nath T.H. Lichen Biology. Cambridge University Press. Cambridge., 1996 – 303 p.
6. Mollenhauer D. Weihere untersuchungen an *Geosiphon puriforme*-einer Lebensgemeinschaft vor Pilz und Blaualgae // Natur und Mus. – B.118. – 1988. – № 10 – P. 289-309.
7. Stewart W.D.P., Rogers G.A. The cyanophyta – hepatic symbiosis. II. Nitrogen fixation and the

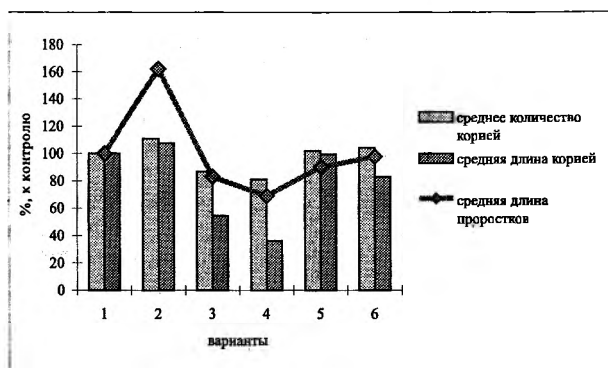


Рис. 5. Действие цианобактериальной обработки ржи, инфицированной фузариумом, на рост и развитие проростков. Варианты: 1 – контроль без обработки семян; 2 – обработка семян ЦБК; 3 – обработка семян *F. culmorum*; 4 – обработка семян *F. nivale*; 5 – обработка семян, инфицированных *F. culmorum*, ЦБК; 6 – обработка семян, инфицированных *F. nivale*, ЦБК.

interobange of nitrogen and carbon// *New Phytol.* – 1977. – V. 78. №2. – P. 458-474.

8. Ding-Li Shi, Hall D.O. The Azollae-Anabaena association: historical perspective symbiosis and energy metabolism// *Bot. Rev.* – 1988. – V. 54. – №4. – P. 353-386.

9. Meeks J.C. Symbiosis between nitrogen fixing cyanobacteria and plant// *Bio Science.* – 1998. – V.48. – P. 266-276.

10. Lindblad P., Bergman B. The cysad-cyanobacterial symbiosis// In: A.N. Rai (ed.). *Handbook of Symbiotic Cyanobacteria.* – CRC Press Boca Raton. Florida. – 1990. – P. 137-159.

11. Towato E.M. Morphometric and cytochemical ultra structural analyses of *Gunnera kaalensis* Nostoc symbiosis// *Bot. Gaz.* – 1985. – V. 146. – P. 293-301.

12. Цавкелова Е.А., Лобакова Е.С., Коломейцева Г.Л., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Особенности локализации ассоциативных цианобактерий на корнях эпифитных орхидей// *Микробиология.* – 2003. – т. 72, № 1. – с. 99-104.

13. Vencataraman 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

14. Панкратова Е.М., Зяблых Р.Ю., Ковина А.Л., Трефилова Л.В., Устюжанин И.А. Исследование формирования и эффективность в агробиотехнологии цианобактериальных консорциумов// 60 лет высш. аграр. образ. Северо-Востока Нечерноземья. Материалы I Всерос. научн.-практ. конф. – Киров, 2004. – С. 151-156.

15. Douglas S.E., Turner J. Molecular evidence for the origin of plastids from a cyanobacterium-like ancestor// *S. Mol. Evol.* 1991. – V.33. – № 3. – P. 267-276.

16. Горелова О.А. Растительные синцианозы: изучение роли макропартигнера на модельных системах. Автореф. дисс....докт. биол. наук. М. 2005. – 47 с.

17. Вернадский В.И. Живое вещество и биосфера. – М. – Наука. 1994. – 669 с.

18. Бактериальная палеонтология. М.: ПИН РАН. 2002. 188 с.

19. Bazzichelli G., Abdelahad N. Structural modifications in the extracellular investment of *Nostoc commune* Vauch. during the life cycle. III Macrocolonies // *Arch. Microbiol. Sypl. (Algological studies).* 1989. – V. 82, №3. – P. 365-370.

20. Еленкин А.А. Синезелёные водоросли СССР. Общая часть. – 1936. – М.-Л. – Наука: Изд. АН СССР. – 545 с.

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

22. Дубинин А.В., Герасименко Л.М., Ванецкая С.Л., Гусев М.В. Отсутствие роста цианобактерии *Microcoleus chthonoplastis* в чистой культуре // *Микробиология.* 1992. Т. 60. № 1. С. 57 – 63.

23. Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y. Genetic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria // *J. Gen. Microbiol.* – 1979. – V.111. – N1. – P. 1 – 61.

24. Штина Э.А., Панкратова Е.М. Взаимодействие азотфиксирующих синезелёных водорослей с микроорганизмами-спутниками // *Актуальные проблемы биологии синезелёных водорослей.* – М. – 1974. – С. 61-78.

25. Андреев Е.И., Коптева Ж.П., Занина В.В. Цианобактерии. – Киев: Наукова думка, 1990. – 195 с.

26. Сиренко Л.А., Кондратьева Н.В. Роль Cyanophyta в природе // *Альгология, Т.8, №2, 1998.* – С. 117-132.

27. Григорьев А.А., Панкратова Е.М., Миронин А.В. и др. Применение гидролизата биомассы из синезелёных водорослей в качестве стимулятора роста при выращивании культуры *Legionella pneumophila*// *Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний.* Киров: научно-иссл. ин-т микроб. МО РФ, 1998. – С. 296-297.

28. Лобакова Е.С., Дольникова Г.А., Корженевская Т.Г. Особенности цианобактериально-бактериальных комплексов микросимбионтов растительных синцианозов / *Микробиология, 2001 а, Т.70, № 1, с. 128 – 134.*

29. Peters G.A., Meeks J.C. The Azolla-Anabaena symbiosis: basis biology // *Ann. Rev. Pl. Physiol Pl. Mol. Biol., 1989.* – V. 40. – P. 193 – 210.

30. Калининская Т.Ф., Панкратова Е.М., Хохлова В.Ф. Усвоение молекулярного азота цианобактериями не образующими гетероцист// *Микробиология.* – 1981. – Т.50. – Вып. 3. – С. 550-555.

31. Панкратова Е.М., Калинин А.А., Ковина А.Л., Зяблых Р.Ю., Трефилова Л.В. Создание на основе цианобактерий стабильных микробных консорциумов// *Тез. докл. Всеросс. конф. 13-17 апреля 1998. «Микробиология почв и земледелие».* С.-Пб. 1998. – С. 28.

32. Belnap J., Kaltenesker J.H., Kosenreter R., Williams J., Leonard S., Eldridge D. Biological soil crusts: ecology and management. Technical Reference. 1730 – 2.USGS. 2001. 119p.

33. Панкратова Е.М. Участие цианобактерий в круговороте азота в почве и создании её плодородия // *Успехи микробиологии.* Т. 21. М.: Наука, 1987. С.212-242.

34. Gusev M.V., Baulina O.I, Gorelova O.A., Lobakova E.S. Korzhenevskaya T.G. Artificial cyanobacterium-plant symbioses// *Cyanobacteria in Symbiosis. Dordrecht/ Boston/ London/– 2002.* – P. 253-312.

35. Панкратова Е.М., Калинин А.А. Цианобактерии как возможные организмы для создания бактериальных препаратов // *Роль научн. исслед. в развитии с.-х. производства Кировской обл.* – Киров, 1991. – С. 25-33.

36. Pankratova Ye.M., Kalinin A.A., Kovina A.L. Growth interaction between *Nostoc* and *Rhizobium* // *Proc. of the 10th Inter. Cong. on Nitrogen Fixation (May 28-June 3, 1995). Saint-Peterburg. Russia. 1995.* – P. 65.

37. Трефилова Л.В., Зяблых Р.Ю., Ковина А.Л., Калинин А.А. Эффективность цианобактериальных консорциумов при выгонке рассады капусты в защищённом грунте // *Всеросс. научн.-практ. конферен. ученых и спец. АПК: «80 лет с.х. образованию и науки на Урале: Итоги и перспективы».* – Пермь: Аграрный вестник, вып. 11, 1998. – С. 116-117.

38. Панкратова Е.М., Зяблых Р.Ю., Калинин А.А., Ковина А.Л., Трефилова Л.В. Конструирование микробных культур на основе синезелёной водоросли *Nostoc paludosum* Kutz.// *Альгология, Т. 14, № 4. 2004.* – С. 445-458.

39. Pankratova Je. M., R. J. Zyablykh, A. A. Kalinin, A. L. Kovina, L. V. Trefilova. Designing of microbial binary cultures based on blue-green algae (Cyanobacteria) *Nostoc paludosum* Kutz. // *International Journal on Algae.* – 2004. – P. 290-304.