

## Эффективность использования цианоризобияльного консорциума при выращивании гороха посевного

© 2009. Л.В. Трефилова, к.б.н., старший преподаватель, М.Н. Патрушева, студент, Вятская государственная сельскохозяйственная академия, e-mail: trefilovaev@rambler.ru

Исследовано действие монокультур *Nostoc paludosum* шт. 18, *Rhizobium leguminosarum* шт. 1022 и цианоризобияльного консорциума *N. paludosum*+ *R. leguminosarum* на развитие растений гороха посевного в лабораторных и полевых опытах. Показан положительный ростстимулирующий эффект консорциума, применяемого в виде цианоризобияльной пасты.

The influence of the monocultures *Nostoc paludosum* 18, *Rhizobium leguminosarum* 1022 and cyanorhizobium consortium *N. paludosum*+ *R. leguminosarum* on pea-plants development in laboratory and field experimental conditions is considered. Positive growth-stimulating effect of the consortium that is used in the form of a cyanorhizobium paste is shown.

Ключевые слова: цианобактерии, ризобиум, цианоризобияльный консорциум, корневые клубеньки

Среди процессов, от которых зависит биологическая продуктивность, одним из важнейших является фиксация микроорганизмами азота атмосферы. Проблема биологической азотфиксации относится к числу основных проблем сельскохозяйственной и биологической науки. Перед учёными стоит задача: изыскать возможности управления процессом азотфиксации и на этой основе увеличить урожайность сельскохозяйственных культур. Биологический азот может служить существенным дополнением азотного фонда почвы, способствуя повышению её плодородия, обеспечивая тем самым более экономное расходование технического азота – азота удобрений [1]. С минеральными удобрениями вносится лишь около 30% азота.

Многолетний отечественный и зарубежный опыт показывает, что эффективный бобово-ризобильный симбиоз – это не только залог получения высокого и качественного урожая бобовых культур, а, следовательно, и возможности решения проблемы пищевого белка, но и наиболее экологичный источник пополнения запасов азота в почве. Для использования дешёвого биологического азота в сельскохозяйственном производстве многих стран увеличивают посевные площади под бобовыми культурами, а также широко применяют предпосевную обработку семян препаратами клубеньковых бактерий, получаемых на основе активных штаммов *Rhizobium* [2].

Для активной симбиотической фиксации азота воздуха одно из главных условий – наличие специфического, вирулентного, активного штамма ризобий. Давно установлена роль клубеньковых бактерий (*p. Rhizobium*) в азотном питании бобовых растений и благодаря последним в формировании азотного фонда почвы. Вместе с тем известны и обстоятельства нестабильности эффекта инокуляции семян, обусловленные рядом причин: генотипом растений и азотфиксирующих микроорганизмов, ингибирующим действием экссудатов семян на бактерии, конкуренцией внесённого инокулята с аборигенными бактериями, потерей бактерий при прорастании семян, несовместимостью протравливания семян и инокуляции, затратами ручного труда, ограниченным временем внесения инокулята [3]. Одним из перспективных путей решения этих вопросов является совместное применение с клубеньковыми бактериями ассоциативных микроорганизмов, увеличивающих возможности использования бобовыми атмосферного азота [4].

Имеются единичные сообщения о том, что клетки цианобактерий (ЦБ), принадлежащие к роду *Nostoc* Vauch, обнаружены в клубеньках клевера египетского – *Trifolium alexandrinum* L. [5] и клубеньках других растений [6, 7]. Это предполагает видовую совместимость клубеньковых бактерий и ностока. Исследования показали, что носток не агрессивен к подсеваемым бактериям. Доказана его возможность

образовывать стабильные искусственные консорциумы.

На примере консорциума *N. paludosum* + *Rh. leguminosarum* показано, что подсеваемые к культуре фототрофа бактерии внедряются в околочлеточную слизь и распределяются вдоль цепочки клеток ностока. Консорциум сохраняется в искусственном состоянии в течение ряда лет при пассажах на свежую среду при разных гидротермических режимах [8].

Длительность их нахождения в клубеньках и роль пока не изучены. По всей вероятности, в искусственном консорциуме ЦБ предназначена роль не только носителя, агента, защищающего своего партнёра от конкурирующей аборигенной микрофлоры и энергогенератора, но и самостоятельное действие на почву и растение в качестве сильного азотфиксатора и стимулятора роста корней [9].

ЦБ находятся вне конкуренции с другими группами азотфиксирующих бактерий, так как благодаря фотолитотрофии не зависят от наличия органического вещества в почве. Размеры накопления ими азота не только соизмеримы, но в определённые периоды развития ЦБ становятся больше, чем у бактерий сапротрофного типа питания, достигая в дерново-подзолистых почвах от 20 до 40 кг/га азота в год [10].

ЦБ толерантны к смене эдафических факторов и к экстремальным условиям. Прижизненные выделения их клеток содержат, помимо продуктов фиксации азота, физиологически активные и фунгистатические вещества, что оказывает благоприятное влияние на рост растений [11, 12].

Вносимые в почву ЦБ не только не погибают и сохраняются на семенах, но и мигрируют в окружающую почву. При этом они выступают и как антагонисты к фитопатогенам [13].

### Создание биопрепаратов на основе цианобактерий

На кафедре ботаники, физиологии растений и микробиологии им. Э.А. Штиной ВятГСХА в последнее время ведётся разработка биопрепаратов, активной частью которых являются не только клубеньковые, но и цианобактерии.

Актуальность данной проблемы возрастает в связи с резким снижением производства азотных удобрений, с одной стороны, и с другой – выявлением неблагоприятных экологических последствий высоких доз их

применения: ухудшение свойств почвы, загрязнение окружающей среды, снижение качества сельскохозяйственной продукции из-за накопления в ней вредных для организма человека и животных повышенных концентраций нитратов.

Много негативных последствий имеет и такой процесс, как химизация защиты растений. Миграция пестицидов в окружающей среде – сильнейший фактор риска для благополучия человечества. Поэтому столь необходимы альтернативные, экологически безопасные средства повышения плодородия почвы и защиты растений от инфекций и вредителей. В этом плане огромный интерес представляют биопрепараты на основе бактерий-азотфиксаторов и микробов-антагонистов.

Однако производство препарата клубеньковых бактерий – сложный процесс. До сих пор не везде имеются чёткие представления о технологических и особенно биологических основах производства и применения клубеньковых бактерий. Одним из основных недостатков этих биопрепаратов является то, что они оказывают достоверный хозяйственный эффект лишь в 70% случаев в отличие от почти 100%-ного эффекта минеральных азотных удобрений [14].

Опытным путём было доказано, что ризобии не только совместимы с ЦБ, но и обладают способностью проникать в их околочлеточную слизь и таким образом сохраняться более длительное время в почве при посеве инокулированных семян, защищаясь от конкурирующего действия аборигенной микрофлоры и от экстремальных условий гидротермического режима; кроме того, бактериальная слизь, где находятся ризобии, – прекрасный агент прилипания к семени. Эффективность совместной обработки бобовых культур *N. paludosum* + *Rh. leguminosarum* была проверена и подтверждена на многих бобовых: лядвенце рогатом, клевере луговом и козлятнике восточном [15].

Создание искусственных микробных ассоциаций, обладающих экологической поливалентностью, является одним из перспективных направлений в разработке эффективных биопрепаратов. Интерес к изучению микробных ассоциаций обусловлен тем, что одновидовые системы, как и монокультуры в сельском хозяйстве, неустойчивы по своей природе, поскольку в условиях стрессов уязвимы для конкурентов, возбудителей болезней и других факторов, оказывающих влияние на их функционирование в агроценозах [16].

При изучении возможности культивирования ЦБ с агрономически значимыми бактериями, в том числе и с *Rhizobium leguminosarum* Frank шт. 102, на первом этапе для получения бактериально чистой культуры ЦБ было использовано несколько методов [8, 15, 17 – 20]. Вначале культура максимально очищалась от слизи путём фильтрации через асбестовый фильтр; далее цианобактерии подвергались ультрафиолетовому облучению, интенсивность и длительность которого подбирались экспериментально.

Следующий этап был связан с выделением спутников путём посева на селективные среды, затем чистые колонии пересевали на селективную среду. Далее на газоны накладывались кольца антибиотиков широкого спектра действия на грамположительные и грамотрицательные бактерии. По величине возникающих зон лизиса судили о чувствительности бактерий к данному антибиотику. После этого бактерии исключали с помощью найденного антибиотика, прибавляя его в очищаемую культуру цианобактерии [21]. Таким образом, получали аксеничную культуру ЦБ.

При определении оптимальных доз внесимых цианобактерий было показано, что для разных растений при проращивании семян вне почвы существует своя оптимальная доза инокулята, за нижними пределами которой ризогенный эффект может отсутствовать, за верхними – переходить в фитотоксичное действие. Последнее выражено у разных штаммов ЦБ в различной степени [21].

Третий этап был связан с подсевом к очищенной культуре ЦБ *Rhizobium leguminosarum* и с выяснением длительности жизни консорциума. На этом этапе работы было показано, что указанные бактерии сохраняются в слизи ЦБ, что даёт основу для размножения консорциума [22]. В дальнейшем наличие в слизи цианобактерий антибиотико-устойчивых штаммов бактерий позволило проследить их миграцию в ризоплану и ризосферу растений [20]. И только после этого консорциумы использовались в полевых и вегетационных опытах.

Эта методика приготовления инокулята на основе ЦБ для последующего использования является перспективной, так как иные существующие методы их совместного использования с другими микроорганизмами основаны на механическом смешивании разных культур. При использовании искусственных консорциумов в природных условиях неиз-

бежно происходит контакт ЦБ с аборигенной микрофлорой, то есть нарушение чистоты консорциума по количеству участников. Но без предварительного этапа по очистке ЦБ создание биопрепаратов направленного действия невозможно.

При разработке новых препаратов необходимо уделять внимание не только селекции или подбору штаммов микроорганизмов, но и усовершенствованию технологий их изготовления, применения и хранения. Оптимизация сочетаний различных свойств в биопрепаратах, в том числе и технологических, приводит к необходимости формирования нового направления исследований – «дизайна» микробных биопрепаратов (23).

Целью нашей работы было исследовать ростаивающий и ризогенный эффект цианоризобияльного консорциума на горохе посевном (*Pisum sativum* L.). В ходе исследования решали следующие задачи: 1. Исследовать оптимальные способы приготовления цианоризобияльных препаратов; 2. Выявить наиболее эффективные методы культивирования и применения ЦБ.

### Объекты и методы культивирования

В работе использовали ЦБ *Nostoc paludosum* шт. 18, который был выделен Перминовой Г.Н. из дерново-подзолистой почвы в 1969 году. Коллекционные штаммы поддерживали путём пересева через 1 – 2 месяца на свежие питательные среды и дальнейшем культивировании при освещённости 2 – 3 тыс. люкс и температуре не выше 20 °С на агаризованной (2%) среде Громова №6 без азота [24].

Накопительные культуры цианобактерий выращивали в колбах Эрленмейера объёмом 100 – 250 мл в зависимости от целей опыта (в жидкой безазотистой среде Громова №6) в люминостате при освещённости 2 – 3 тыс. люкс и 22 – 25 °С.

В опытах использовали 1,0-1,5-месячные культуры ЦБ в зависимости от целей опыта. Оптимальным сроком для вегетации ЦБ является период с марта до ноября. Систематически осуществляли контроль за чистотой культуры и её состоянием путём микроскопирования. На жизнеспособность ЦБ указывает отсутствие разрушенных лизированных клеток, характерная пигментация, высокое содержание гетероцист (клеток, в которых идёт процесс азотфиксации), малое содержание спор. В лабораторных и вегетационных опытах исполь-

зовали бактериально чистую культуру *Nostoc paludosum* (Kütz.) Elenk шт. 18 и природную смешанную цианобактериальную популяцию в полевых опытах.

ЦБ применяли в виде суспензии клеток, плёнок, культуральной жидкости (пропускали культуры через бактериальный фильтр), а также в виде смеси нескольких культур ЦБ, которую получали путём механического смешивания.

Для разработки технологии приготовления биопрепаратов рост ЦБ изучали на полужидкой (0,5% агара) среде Громова №6 без азота – цианобактериальной пасте.

Технология приготовления её следующая. Цианобактериальная паста готовилась в пластиковых контейнерах ёмкостью 200 мл, в которые помещали стерильную полужидкую (0,5% агара) безазотистую среду Громова №6 по 150 мл и в условиях микробиологического бокса вносили по 5 мл тщательно разбитой на горизонтальном шейкере суспензии клеток *N. paludosum* (титр –  $10^5$  кл/мл) на контейнер.

Обработанные цианобактериальной пастой семена быстро подсыхают, не теряют сыпучести, хорошо хранятся, агаризованная цианобактериальная плёнка, покрывающая семена, на наш взгляд, препятствует заражению не только в период посева и прорастания, но и в период хранения зерна [25, 26].

Сапротрофная культура бактерии *Rhizobium leguminosarum* шт. 1022 является перспективной для целей агробιοтехнологии, на основе которой во ВНИИСХМ созданы биопрепараты. Все указанные хемотрофные бактерии являются типичными представителями ризосферы большинства растений. Уже известная к началу нашей работы совместимость агробактерий в ассоциативных культурах облегчала задачу составления консорциумов на основе ЦБ. Количественный учёт ЦБ проводили под микроскопом на мазках [27].

Опыт снимали через неделю, подсчитывая число колоний *Rhizobium*, при этом предполагали, что каждая отдельная колония *Rhizobium* выросла из одной отдельной клетки. Поэтому, подсчитав число выросших колоний, мы можем узнать, сколько клеток попало в каждую чашку при посеве. Кроме *Rhizobium*, даже при очень чистом посеве, могут вырасти другие бактерии, которые являются спутниками ЦБ. Их мы считали отдельно, отличая от колоний *Rhizobium*. Колонии клубеньковых бактерий на бобовом агаре имеют округлую форму, вы-

пуклые, блестящие, слизистые, беловатые. Колонии другого вида и цвета к *Rhizobium* не относятся.

При составлении консорциумов (цианобактерии + ризобиум) брали наиболее благоприятную для доминантной формы ЦБ безазотистую среду Громова №6, но с добавлением бобового отвара 1-2 мл на 100 мл. Режим инокуляции был выбран исходя из результатов предыдущих опытов сотрудников кафедры [22]. Массу консорциумов определяли путём высушивания отфильтрованного материала.

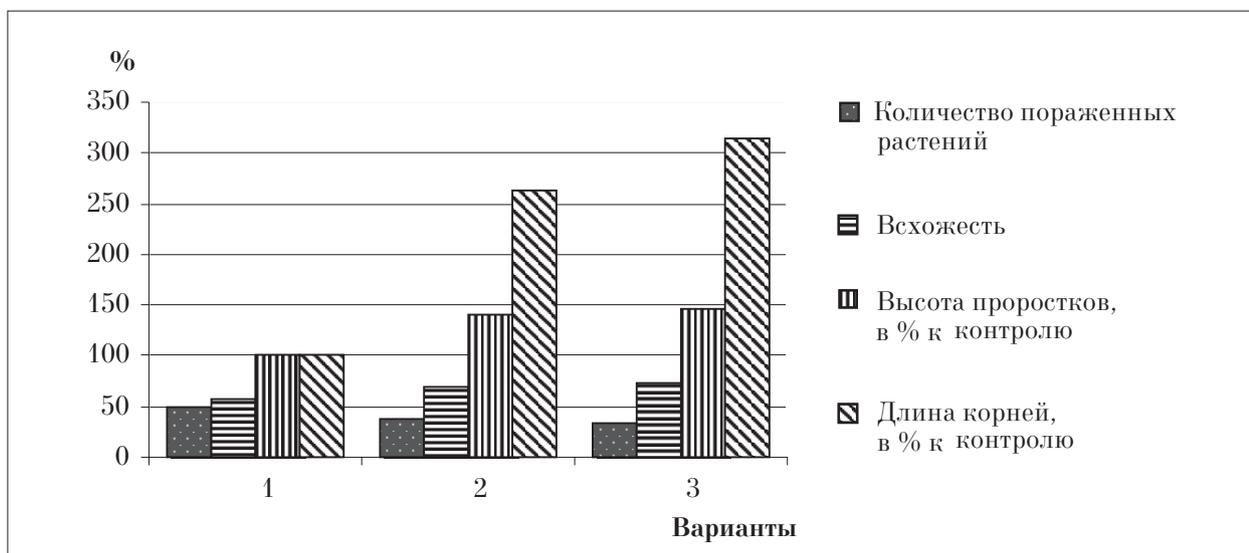
Для постановки лабораторных опытов использовали семена гороха сорта Альфа ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова. Сорт Луцильный раннеспелый. Период от полных всходов до технической спелости 46 – 53 дня. Растение полукарликовое, высотой 50 – 55 см. Товарная урожайность бобов 8,5 – 20,8 т/га, горошка – 4,8 – 9,0 т/га. Относительно устойчив к фузариозу.

В полевых опытах использовали семена гороха сорта Лучезарный. Оригинатором является Фалёнская селекционная станция. Сорт Лучезарный районирован и предназначен для зернофуражного и укосного использования, а благодаря хорошим вкусовым качествам зерна и равномерной его разваримости может применяться в пищевой промышленности. Максимальная урожайность зерна 5,4 т/га, зелёной массы 49,2 т/га. Содержание белка в зерне 20 – 26,6%. Сорт среднеспелый, вегетационный период длится 73 – 86 дней. Главным достоинством является сочетание высокой урожайности зерна и зелёной массы с мелкосемянностью, что существенно снижает расход посевного материала, особенно при посеве на зелёный корм.

### Исследование влияния цианобактерий на рост растений гороха в лабораторных опытах

Варианты опыта в чашечных культурах были следующие: 1. Контроль без обработки. 2. Обработка семян культуральной жидкостью цианобактерий. 3. Обработка семян клетками цианобактерий *Nostoc paludosum* шт.18.

Семена гороха сорта Альфа после обработки их культуральной жидкостью (вариант 2) и клетками *Nostoc paludosum* шт.18 (вариант 3) выращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге и рулонным методом в люминостате. Через неделю проводили измерения высоты проростков и длины корней.



**Рис. 1.** Влияние цианобактериальной обработки семян гороха на развитие проростков. Варианты: 1 – контроль (полная питательная среда Кнопа); 2 – обработка культуральной жидкостью цианобактерий; 3 – цианобактериальная обработка семян

Самым удачным оказался третий вариант, в котором цианобактерии наносили непосредственно на семена. В чашках Петри, где было равномерное освещение семян и ЦБ, наиболее проявился ризогенный эффект в третьем варианте (рис. 1). Длина корней оказалась почти в три раза больше по сравнению с контролем.

#### Изучение ростстимулирующего эффекта цианобактерий на проростках гороха в рулонных культурах

В рулонных культурах при недостаточном освещении из-за фильтровальной бумаги ростактивирующий эффект цианобактерий выразился в меньшей степени. Тем не менее по сравнению с контролем длина корней и высота проростков в третьем варианте были больше на 26 и 36%, соответственно (рис. 2).

#### Изучение ростстимулирующего эффекта цианобактерий на проростках гороха в песчаных культурах

Опыт был заложен в пластиковых контейнерах с песком на горохе сорта Альфа. Контейнеры выдерживали в люминистате. Лабораторная всхожесть семян – 98%. При закладке опыта почву увлажняли средой Громова №6: полной в контроле, в остальных вариантах без азота.

Повторность опыта 3-кратная. В зависимости от способов обработки семян колебалась

и величина адгезии ЦБ. Так, во втором варианте количество прилипших клеток цианобактерий на 1 семя было  $0,5 \times 10^8$ , в третьем –  $1,5 \times 10^8$ , а в четвертом –  $3,28 \times 10^8$  (рис. 3). Инокуляция семян *Rh. leguminosarum* во всех вариантах проведена одинаково по общепринятой методике.

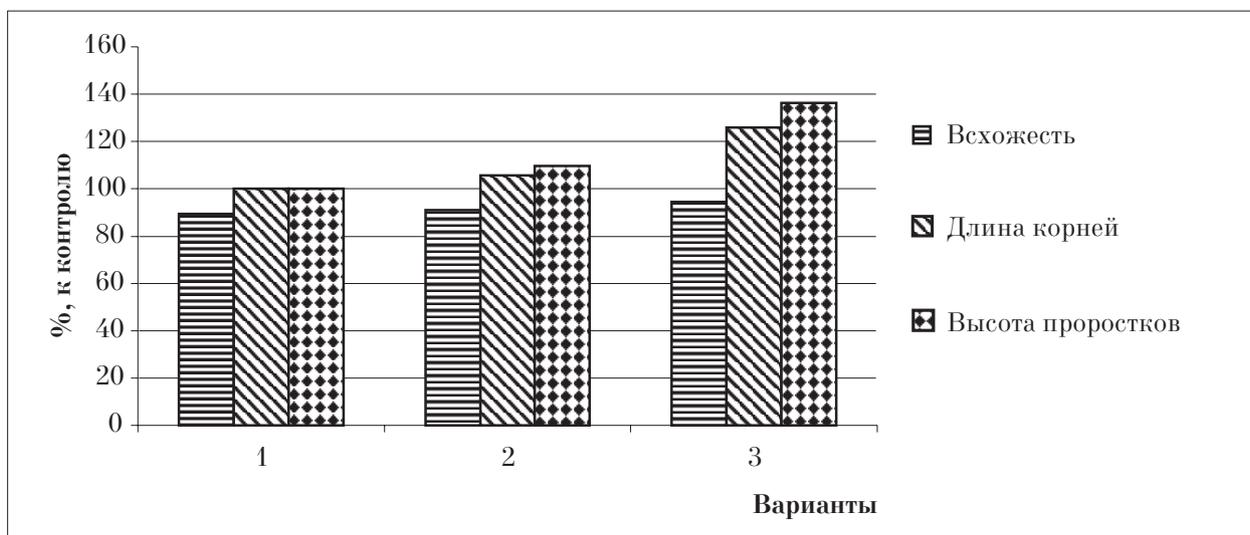
Первое измерение проводили через неделю, каждое последующее также через неделю.

Опыт снимали через 6 недель, при этом анализировали и степень развития корневой системы. Показатели объема корневой системы оказались практически одинаковы во всех вариантах, по сравнению с контролем отклонение составило  $\pm 1,33\%$  (рис. 4).

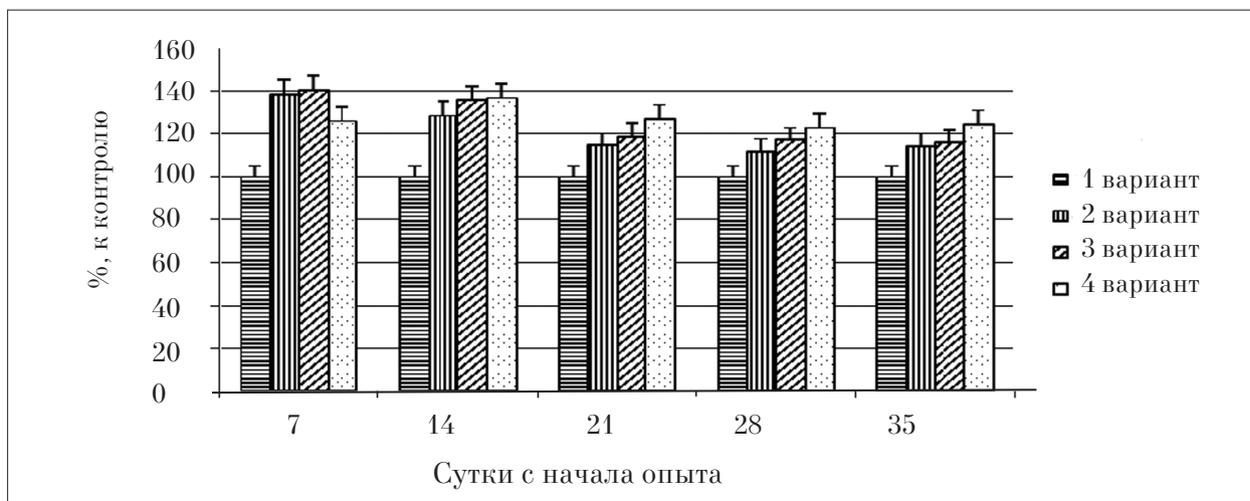
Таким образом, обработка семян цианобактериальной пастой привела к увеличению высоты проростков на 25% по сравнению с контролем.

#### Изучение ростстимулирующего эффекта цианоризобияльного консорциума на растениях гороха в полевых экспериментах

В ходе исследования влияния цианобактерий и цианоризобияльного консорциума на рост гороха в 2008 г. был проведен полевой опыт, включающий следующие варианты (втрехкратной повторности): 1. Контроль без обработки. 2. Обработка семян *Rh. leguminosarum*. 3. Обработка семян *Rh. leguminosarum* + *N. paludosum* шт. 18 (цианоризобияльная паста). 4. Обработка семян *N. paludosum* шт. 18 (цианобактериальная паста).



**Рис. 2.** Влияние цианобактериальной обработки семян гороха на рост и развитие проростков. Варианты: 1 – контроль (полная питательная среда Кнопа); 2 – обработка культуральной жидкостью ЦБ; 3 – цианобактериальная обработка семян



**Рис. 3.** Динамика роста надземной части растений гороха при разных способах инокуляции семян. Варианты опыта: 1. Контроль (обработка семян *Rh. leguminosarum*). 2. Обработка семян культуральной жидкостью *Nostoc paludosum* шт. 18. 3. Обработка семян *Rh. leguminosarum*+суспензия *N. paludosum* шт. 18. 4. Обработка семян *Rh. leguminosarum*+цианобактериальная паста на основе *N. paludosum* шт. 18.

Место проведения полевого опыта – Ботанический сад ВятГСХА.

При снятии опыта с каждой делянки произвольно выкапывали вместе с корневой системой по 10 растений гороха. Таким образом, для исследований использовали по 10 растений каждой повторности или по 30 растений каждого варианта.

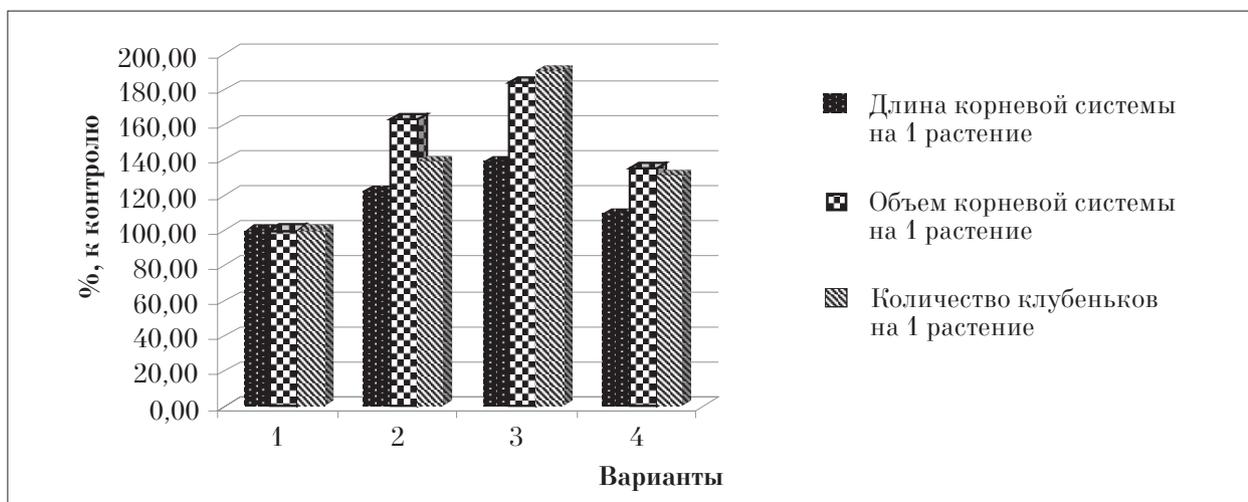
Результаты наблюдений показали, что наибольший эффект на всхожесть семян достигается при обработке цианоризобийным консорциумом (табл. 1).

ЦБ и ризобиум оказывают положительное влияние на рост и развитие корневой системы, а также на образование и форми-

рование клубеньков, тем самым увеличивая способность растений гороха к азотфиксации (рис.4).

Максимальный результат по анализируемым показателям был обнаружен в 3-м варианте (обработка цианоризобийным консорциумом). Здесь длина корневой системы превышала контроль почти на 40%, а её объём – на 83,52%, прибавка по клубенькам составила около 90% (рис. 4).

На формирование урожая оказывает большое влияние такой показатель, как площадь фотосинтетической поверхности листа и, как следствие, продуктивность фотосинтеза. Воздействие микробиологических препаратов на



**Рис. 4.** Влияние бактериальной обработки на корневую систему растений гороха. Варианты: 1. Контроль без обработки. 2. Обработка семян *Rh. leguminosarum*. 3. Обработка семян *Rh. leguminosarum* + *N. paludosum* шт. 18 (цианоризобияльная паста). 4. Обработка семян *N. paludosum* шт. 18 (цианобактериальная паста)

динамику листовой поверхности связано с ускорением формирования у растений гороха ассимиляционной поверхности и сохранением её в активном состоянии в ответственные периоды вегетации. При анализе данных, полученных по результатам полевого опыта, обнаружено, что наибольшая площадь листовой поверхности на 1 растение характерна для растений в 3-м варианте (обработка *Rh. leguminosarum* + *N. paludosum*), почти на 20% больше по сравнению с контролем (табл. 2).

Таким образом, цианобактерии и ризобиум при совместном использовании улучшают физиологическое состояние растений гороха, способствуя росту листовой поверхности и тем самым продуктивности фотосинтеза.

Основной целью использования бактериальной обработки семян при выращивании сельскохозяйственных культур является повышение урожайности, а также получение экологически чистой продукции. Данные по урожайности гороха отражены на рис. 5.

Максимальный результат по продуктивности был обнаружен в 3-м варианте (обработка *Rh. leguminosarum* + *N. paludosum* шт. 18). В данном варианте урожайность по зелёной массе превышала контроль на 13,25%, а по сухой массе – на 26,38% (рис. 5).

### Выводы

1. В ходе проведённых исследований было выявлено, что наиболее эффективным методом культивирования цианобактерий является цианобактериальная паста.
2. Оптимальной формой приготовления и применения цианоризобияльных препаратов является цианобактериальная паста на основе цианобактерий и ризобиума.
3. Наилучшие показатели по развитию надземной части в лабораторных опытах были выявлены в вариантах с обработкой семян гороха цианоризобияльной пастой.

Всхожесть семян гороха

Таблица 1

Вариант	Количество растений	
	шт./делянку	% к контролю
1. Контроль	81,00 ± 5,29	100,00
2. Обработка семян <i>Rh. leguminosarum</i>	88,33 ± 1,15	109,05
3. Обработка семян <i>Rh. leguminosarum</i> + <i>N. paludosum</i> шт. 18	91,00 ± 2,65	112,35
4. Обработка семян <i>N. paludosum</i> шт. 18	87,33 ± 2,08	107,82

Таблица 2

Влияние бактериальной обработки на площадь фотосинтетической поверхности листа растений гороха

Вариант	Количество листьев на 1 растение		Площадь листьев на 1 растение	
	шт.	% к контролю	см <sup>2</sup>	% к контролю
1. Контроль	87,77 ± 10,15	100,00	444,37 ± 8,54	100,00
2. Обработка семян <i>Rh. leguminosarum</i>	97,73 ± 13,81	111,35	510,42 ± 2,76	114,86
3. Обработка семян <i>Rh. leguminosarum</i> + <i>N. paludosum</i> шт.18	108,73 ± 14,67	123,88	536,76 ± 2,07	120,79
4. Обработка семян <i>N. paludosum</i> шт.18	94,70 ± 19,02	107,9	505,76 ± 1,04	113,82

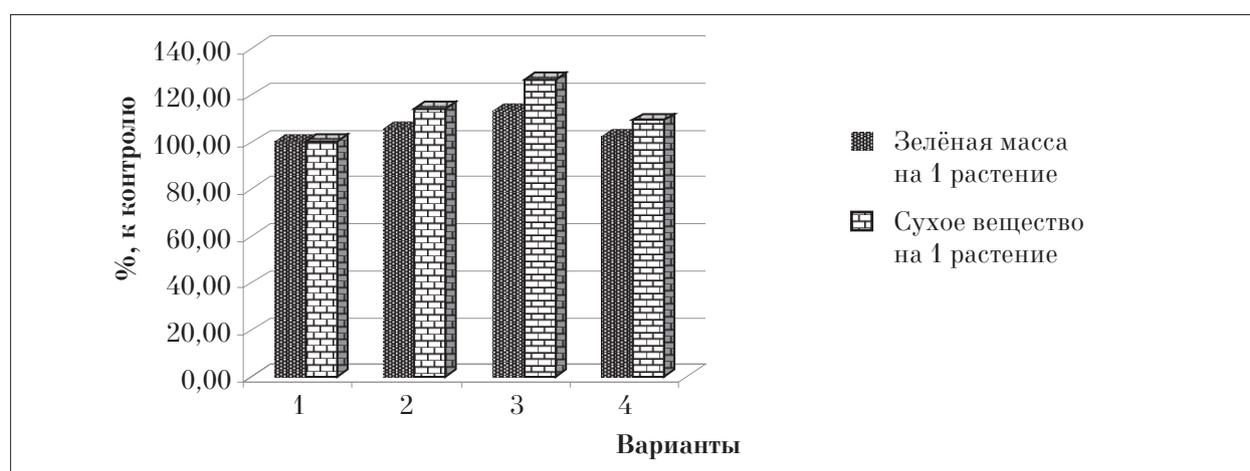


Рис. 5. Продуктивность гороха по зелёной массе и сухому веществу. Варианты: 1. Контроль без обработки. 2. Обработка семян *Rh. leguminosarum*. 3. Обработка семян *Rh. leguminosarum* + *N. paludosum* шт. 18 (цианоризобияльная паста). 4. Обработка семян *N. paludosum* шт. 18 (цианобактериальная паста)

4. В полевых опытах было установлено, что применение цианоризобияльного консорциума привело к повышению всхожести семян, роста и развития корневой системы, увеличению количества клубеньков на корнях, возрастанию площади листьев и повышению урожайности растений.

### Литература

1. Лесной Н.Н. Производство экологически чистых продуктов растениеводства. Учебно-практическое пособие. М. 2001. 34 с.
2. Спиридонов А.М. Многолетние бобовые травы как источник биологического азота в земледелии // Земледелие. 2007. № 3. С. 14-15.
3. Кожемайков А.П., Тихонович И.А. Использование инокулятов бобовых и биопрепаратов комплексного действия в сельском хозяйстве // Докл. РАСХН. 1998. № 6. С. 7-10.
4. Тихонович И.А. Создание высокоэффективных микробно-растительных систем // Сельскохозяйственная биология. 2000. № 1. С. 28-33.

5. Venkataraman G.S. Nitrogen fixation 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 Agricul. Res. New Delhi. 1979. P. 119.
6. Лобакова Е.С. Ассоциативные микроорганизмы растительных симбиозов: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Москва. 2004. 44 с.
7. Баулина О.И. Ультраструктурная пластичность цианобактерий: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. М. 2005. 48 с.
8. Панкратова Е.М., Зяблых Р.Ю., Калинин А.А., Ковина А.Л., Трефилова Л.В. Конструирование микробных культур на основе синезелёной водоросли *Nostoc paludosum* Kütz // Альгология. Т. 14. № 4. 2004. С. 445-458.
9. Гусев М.В., Никитина К.А. Цианобактерии. М.: Наука, 1979. 227 с.
10. Панкратова Е.М. Роль азотфиксирующих синезелёных водорослей (цианобактерий) в накоплении азота и повышении плодородия почвы // Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М. 1981. 39 с.

11. Панкратова Е.М., Трефилова Л.В., Домрачева Л.И., Третьякова А.Н. Подавление микопаразитов ели и грибных заболеваний сельскохозяйственных культур с помощью цианобактерий // Проблемы лесной фитопатологии и микологии: Матер. междунар. конгресса. М. 2002. С. 172-175.
12. Калинин А.А., Домрачева Л.И., Третьякова А.Н., Трефилова Л.В. Антагонистическое действие почвенных цианобактерий на фитопатогенный гриб *Fusarium culmorum* и перспективы их использования для биологической защиты растений от заболеваний // Здоровье – Питание – Биологические ресурсы: Матер. междунар. науч.-практ. конф. посвящ. 125-летию со дня рожд. акад. Н.В. Рудницкого. Киров. 2002. Т. 1. С. 377-383.
13. Панкратова Е.М. Основы и результаты функционирования цианобактерий в почвенных экосистемах // Экология и почвы. Пуцдино. 2006. С. 202-210.
14. Хотянович А.В. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применения препаратов на их основе (Методические рекомендации). Л.: ВНИИСХМ, 1991. 60 с.
15. Панкратова Е.М. Использование клубеньковых бактерий и цианобактерий в агробиотехнологии // Перспективы использования биологических технологий в животноводстве и растениеводстве Кировской области: Матер. междууз. науч.-практ. конф. Киров. 2005. С. 8-12.
16. Суховицкая Л.А., Сафронова Г.В., Клышко Г.М., Короленок Н.В. Выживаемость *Rhizobium* в монокультуре и бинарных популяциях с ризосферными бактериями // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 1. С. 73-78.
17. Патрушева М. Н., Трефилова Л.В. Цианобактерии как стимуляторы роста гороха // Экология родного края – проблемы и пути их решения: Матер. I обл. науч.-практ. конф. молодёжи. Киров. 2006. С. 160-161.
18. Панкратова Е.М., Трефилова Л.В. Симбиоз как основа существования цианобактерий в естественных условиях и в конструируемых системах // Теоретическая и прикладная экология. 2007. № 1. С. 4-14.
19. Панкратова Е.М., Трефилова Л.В. Новый метод использования цианобактерий в агробиотехнологии в виде сложных микробных ассоциаций // Фундаментальные достижения в почвоведении, экологии, сельском хозяйстве на пути к инновациям: Тез. докл. I Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участ. М.: Макс Пресс, 2008. С. 86-88.
20. Панкратова Е.М., Трефилова Л.В., Зяблых Р.Ю., Устюжанин И.А. Цианобактерия *Nostoc paludosum* Kütz как основа для создания агрономически полезных микробных ассоциаций на примере бактерий р. *Rhizobium* // Микробиология. 2008. Т. 77. № 2. С. 266-272.
21. Калинин А. А. Цианобактерии как возможные компоненты diaзотрофных микробных ассоциаций и их влияние на растение: Автореф. дисс. ...канд. биол. наук. М. 1995. 23 с.
22. Ковина А.Л. Микробные агроконсорциумы на основе цианобактерий: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. М. 2001. 23 с.
23. Патыка В.Ф. Микробные биотехнологии в современном растениеводстве // Биотехнология – состояние и перспективы развития: Матер междунар. конгресс. М. 2002. С. 345.
24. 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.
25. Трефилова Л.В. Использование цианобактерий в агробиотехнологии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саратов. 2008. 25 с.
26. Панкратова Е. М., Калинин А. А. Цианобактерии как возможные организмы для создания бактериальных препаратов // Роль научных исследований в развитии сельскохозяйственного производства Кировской обл. Киров. 1991. С. 25-33.
27. Домрачева Л.И. «Цветение» почвы в агроэко-системах и закономерности его развития: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М. 1998. 45 с.