

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Факультет почвоведения

На правах рукописи

Леонтьевская Елена Алексеевна

**СТРУКТУРА ЭПИФИТНО-САПРОТРОФНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ
КОМПЛЕКСОВ ЗЕРНОВЫХ И ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР**

Специальность 03.02.03 – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель к.б.н. Добровольская Т.Г.

Москва-2014

Содержание:

Введение	3
Глава 1. Обзор литературы	8
1.1. Общая характеристика агроценозов	8
1.2. Влияние сельскохозяйственных мероприятий на микробные сообщества почв	10
1.3. Эпифитные бактериальные сообщества овощных и зерновых культур	14
1.4. Ростостимулирующие ризосферные бактерии сельскохозяйственных растений	20
1.5. Фитопатогенные микроорганизмы	24
1.6. Биологические методы борьбы с фитопатогенами	27
Глава 2. Объекты и методы	36
2.1. Характеристика объектов исследования	36
2.2. Питательные среды	37
2.3. Методы родовой и видовой идентификации бактерий	38
2.4. Методы определения антибиотической активности	41
2.5. Определение бактериолитической активности	42
2.6. Идентификация антибиотически активных соединений	43
Глава 3. Результаты исследований	44
3.1. Характеристика бактериальных сообществ филлосферы овощных культур ...44	44
3.2. Анализ бактериальных сообществ овощных культур и почв при нарушении режимов землепользования	50
3.3. Структура бактериальных сообществ зерновых культур	52
3.4. Антибиотическая активность бактерий	63
3.5. Природа антибиотической активности	67
3.6. Бактериолитическая активности бактерий	74
Глава 4. Заключение	75
Выводы	77
Список литературы	78

Введение

Актуальность проблемы

Агроценозы – это искусственно созданные и поддерживаемые человеком экосистемы (поля, сенокосы, огороды, лесные посадки). Они обладают плохими динамическими качествами, малой экологической надежностью, но характеризуются высокой урожайностью. Занимая около 10 % площади суши, агроценозы производят 2,5 млрд. т сельскохозяйственной продукции.

До сих пор не существует однозначного ответа на вопрос – как влияет стадия онтогенеза и вид сельскохозяйственных растений на состав и функционирование микробных комплексов агроценозов. Для ответа на этот вопрос представляется необходимым использование системного подхода, заключающегося в микробиологическом анализе всех компонентов агроценоза.

Последнее время большое внимание уделяется развитию экологически устойчивых сельскохозяйственных систем, в которых продуктивность растений обеспечивается использованием их биологических возможностей, при минимальном применении экологически опасных агрохимикатов – минеральных удобрений, пестицидов, регуляторов роста (Reganold et al., 1990; Vance, 2001). Один из основных способов достижения этой цели – частичное или полное замещение агрохимикатов препаратами симбиотических или ассоциативных микроорганизмов, которые в природе успешно обеспечивают своих хозяев питательными веществами и защищают их от биотических и абиотических стрессов (Higa, Parr, 1994; Тихонович, Проворов, 2009). Повышение жизнестойкости и выносливости растений в агроценозах за счёт внесения биологических активизаторов почвенного плодородия (концентратов микроорганизмов и биоудобрений), способных активизировать почвенную биоту (Тихонович, Проворов, 2011; Симонович, 2011). Для достижения этой цели необходимо комплексное изучение таксономического состава

микроорганизмов в агроценозах в филлосфере, ризосфере и почве под сельскохозяйственными культурами. Однако, таких исследований явно недостаточно. Большинство из них связано с анализом разнообразия либо ризосферных бактерий зерновых культур (Гордеева, Масленникова, 2012; Johansen, Binnerup, 2002; Joshi, Bhatt, 2011), либо овощей (Шильникова и др., 2006; Berg et al., 2005.; Enya et al., 2007).

Цель и задачи исследования

Целью диссертационной работы явилась оценка таксономической структуры эпифитных и сапротрофных бактериальных сообществ в разных ярусах агроценозов и выявление их роли в поддержании гомеостаза агрофитоценозов.

В рамках этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определение и сравнение численности бактериальных комплексов в филлосфере, ризосфере и почве под овощными и зерновыми культурами;
2. Анализ динамики таксономической структуры сообществ эпифитных и сапротрофных бактерий в разных ярусах исследуемых агроценозов;
3. Определение родовой и видовой принадлежности культур бактерий, доминирующих на разных органах растений и в почве;
4. Оценка влияния нарушения режимов землепользования на состав бактериальных комплексов почв;
5. Поиск антагонистов фитопатогенных бактерий, среди культур, выделенных из разных ярусов агроценозов;
6. Изучение механизма выявленной антагонистической активности.

Положения, выносимые на защиту

1. Состав и численность эпифитных бактериальных сообществ овощных и зерновых культур изменяется в процессе вегетации растений и зависит от временных и климатических показателей.
2. Санитарная роль микробных сообществ почв проявляется при нарушении режимов землепользования – запашке овощей в почву.
3. Среди обитателей филлосферы и ризосферы находятся полезные для растений бактерии, проявляющие антагонистическую активность к фитопатогенным бактериям.

Место проведения работы

Исследования проводились в Каширском и Солнечногорском районах Московской области.

Научная новизна работы

Впервые проведено комплексное исследование разнообразия бактериальных комплексов овощных и зерновых культур в разных типах агроценозов на опытных полях Московской области. Показано, что таксономический состав бактерий практически не зависит от вида растения, но изменяется в процессе онтогенеза растения и смены экологических условий.

Выявлен большой процент антагонистов к фитопатогенным бактериям среди культур бактерий, выделенных из исследуемых агроценозов. Впервые бактерии-антагонисты идентифицированы до вида с помощью метода времяпролетной масс-спектрометрии. Определена природа антибиотиков.

Практическая значимость

Результаты, полученные в работе, расширяют представления о разнообразии бактерий, формирующихся на зерновых и овощных культурах и могут быть использованы в дальнейшем для управления продуктивностью сельскохозяйственных культур. Выделенные нами культуры бактерий, являющиеся антагонистами по отношению к 3 видам фитопатогенных бактерий, могут быть рекомендованы для получения биопрепаратов, повышающих устойчивость сельскохозяйственных культур. Продемонстрирована санитарная роль почвы, заключающаяся в ингибировании фитопатогенных бактерий, попадающих при запашке овощей в почву.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: V Всероссийский съезд общества почвоведов, (Ростов-на-Дону, 2008), V Международная научно-практическая конференция «Экология речных бассейнов» (Владимир, 2009), VI Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2011), IX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012» (Москва, 2012), Международная научная конференция «Дни Науки», (Болгария, 2012), VI Всероссийский съезд общества почвоведов им. В.В. Докучаева (Петрозаводск, 2012), Международная конференция «Биодиагностика в биологической оценке почв и сопредельных сред» (Москва, 2013).

Публикации

По результатам исследования опубликовано 11 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации результатов диссертационных работ.

Соответствие диссертации паспорту научных специальностей

В соответствии с формулой специальности 03.02.03 «Микробиология».

Объем и структура работы

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание объектов и методов исследования, изложение результатов экспериментов и их обсуждение, выводы и список упоминаемых в тексте литературных источников. Работа изложена на 89 страницах текста, иллюстрирована 29 рисунками, содержит 9 таблиц. Список литературы состоит из 112 наименований, из них 61 на иностранном языке.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Общая характеристика агроценозов

Агроценозы – это искусственно созданные и поддерживаемые человеком экосистемы (поля, сенокосы, парки, сады, огороды, лесные посадки). Агроценозы создают для получения сельскохозяйственной продукции. Они обладают плохими динамическими качествами, малой экологической надежностью, но характеризуются высокой урожайностью. Занимая около 10 % площади суши, агроценозы производят 2,5 млрд. т. сельскохозяйственной продукции.

Как правило, в агроценозе культивируют небольшое количество видов растений, поэтому взаимосвязи организмов не могут обеспечить устойчивости такого сообщества. Действие естественного отбора в агроценозах ослаблено вмешательством человека в естественные процессы для реализации задач своей хозяйственной деятельности. Искусственный отбор действует в направлении сохранения организмов с максимальной продуктивностью. Численность популяции в агроценозе поддерживается и контролируется человеком борьбой с сорняками и вредителями, орошением, сменой культур, повышением плодородия почвы.

В агроценозе значительная часть питательных веществ постоянно выводится из круговорота – при сборе урожая, поэтому происходит прерывание естественного круговорота веществ. Для того, чтобы скомпенсировать эти потери, кроме природного притока солнечной энергии в агроценоз искусственно вносятся вода, минеральные и органические удобрения (Петросова и др., 2007). Удобрения создают оптимальный режим питания растений макро- и микроэлементами, направленно регулируют обмен органических и минеральных соединений, что позволяет реализовать потенциальную продуктивность растений по количеству и качеству урожая. Наибольший эффект от удобрений получается в условиях орошения при оптимальном сочетании водного режима и питательных элементов. Поэтому

культуры, возделываемые при орошении, прежде всего обеспечиваются удобрениями в соответствии с научными рекомендациями. В этих условиях отмечается наибольшая окупаемость применяемых удобрений (Минеев, 2004).

В агроценозе, как и в естественном биоценозе, складываются пищевые цепи. Обязательным звеном в этих цепях является человек, причем здесь он выступает как консумент I порядка, и на нем пищевая цепь прерывается. Без участия человека агроценозы существуют от 1 года (зерновые, овощные) до 20-25 лет (плодово-ягодные). Один из путей повышения продуктивности агроценозов – мелиорация почв. Она оказывает долговременное воздействие на почву, создает благоприятные условия для роста растений, улучшает водный режим и т. д. Мелиорация включает в себя очистку земель от камней, мусора, вспашку, известкование кислых почв, внесение удобрений, борьбу с эрозией, осушение переувлажненных почв, постройку оросительных систем, природоохранные мероприятия.

Человек постоянно заботится о повышении продуктивности агроценозов, сохранении плодородия земель, охране культур от неблагоприятных воздействий. (Петросова и др., 2007). Для получения высоких урожаев большое значение имеет правильный выбор агротехнических методов, соответствующих типу почв, виду и сорту возделываемых растений. За счет длительного воздействия различных способов обработки почвы изменяется ее структура, физико-химические показатели. Все это не может не влиять на состояние микробных почвенных сообществ, которые в свою очередь влияют на урожайность и сохранность возделываемых растительных культур. В частности, происходят изменения в метаболизме и функциональном состоянии ризосферной и всей почвенной биоты: перегруппировка, или появление доминантных видов, изменение стратегии роста, путей микробной трансформации гумуса, активизируется процесс дегумификации (Благодатский и др., 2006, 2008; Гордеева, 2004). Таким образом, характеристика микробных сообществ окультуренных почв дает необходимую информацию для достижения наилучшего эффекта использования почв.

1.2. Влияние сельскохозяйственных мероприятий на микробные сообщества почв

Распашка целинных земель, длительная обработка почвы с оборотом пласта, несбалансированное внесение удобрений приводит к нарушению экологического равновесия в почве – изменению путей трансформации гумуса, его качественного состава, биогенности почвы (Благодатский и др., 2008). Вследствие этого общее количество микробной биомассы в пахотной почве снижается на 25 % по сравнению с залежной уже через десять лет после распашки, а через 36 лет использования уменьшается на 40 %. Более длительный период эксплуатации земельных угодий под пашней приводит к уменьшению микробной биомассы вдвое по сравнению с десятилетним использованием, что подтверждается данными количества микробной биомассы и содержания почвенной микробной ДНК. В естественных биогеоценозах микробная биомасса в почве не претерпевает значительных колебаний вследствие установившегося равновесия между поступающим и минерализующимся количеством органического вещества (Иутинская и др., 2010). Потеря содержания гумуса в результате десятилетней вспашки чернозема и дерново-подзолистых целинных земель составляет 25-36%. На землях с более длительным периодом использования (37-70 лет) процесс деградации замедляется и его содержание стабилизируется на более низком уровне (Безуглова и др., 1995). Альтернативой вспашке с оборотом пласта могут быть приемы обработки почвы, снижающие негативные последствия как для почвенной микробиоты, так и для структуры и состава почвы: безотвальная вспашка, чизельная обработка, дискование, минимальная и нулевая обработка (Иутинская и др., 2010).

В экологическом земледелии одним из основных приемов увеличения плодородия почвы является севооборот – система чередования сельскохозяйственных культур. Применение интенсивных технологий, сокращение севооборота и введение монокультур ценных сельскохозяйственных растений на

фоне использования несоответствующих типу почвы способов обработки отрицательно влияют на микробные комплексы почв. В монокультуре создаются условия, неблагоприятные для функционирования ризосферной микробиоты, в результате чего наблюдается угнетение аборигенных видов почвенной биоты и активное развитие фитопатогенов. Оптимальным считается возделывание интенсивных культур в системе севооборота таким образом, чтобы они попадали на то же поле через 5-6 лет после восстановления плодородия и нормального микробиологического фона (Иутинская и др., 2010). Характер воздействия монокультур на микробные сообщества почвы различается при возделывании разных видов растений. В качестве примера можно привести изучение особенностей почвенных микробных сообществ полей, где происходила смена культуры картофеля другими культурами: ячменем, клевером, зеленой фасолью, соей и просом (Larkin, 2003). Контролем служила почва, на которой в течение нескольких лет выращивали только картофель. Оказалось, что высокая численность бактерий наблюдалась в почвах под ячменем и кукурузой, самая низкая – в почвах, на которых постоянно возделывался картофель. В почвах под ячменем наблюдалось самое высокое содержание актиномицетов и флюоресцирующих псевдомонад. Наивысшая микробная активность была характерна для почв под ячменем и кукурузой. Отношение грибы / бактерии было наивысшим в почвах под ячменем и самым низким – в почвах под соей и картофелем. Эти данные демонстрируют, что различные культуры по-разному влияют на микробные сообщества.

Активность и состав микробных сообществ изучали также при бессменном способе возделывания сельскохозяйственных культур в сравнении с возделыванием в севообороте. Полученные результаты показали, что при чередовании культур под кукурузой и озимой пшеницей преобладают микроорганизмы, участвующие в распаде легкогидролизуемого органического вещества, в основном растительных остатков, тогда как при бессменном возделывании – микроорганизмы, участвующие в разложении труднодоступных соединений. Сравнение ферментативной и

биологической активности почв под бессменными культурами: озимой пшеницы, кукурузы, люцерны, подсолнечника, а также паром и залежью показало, что численность микроорганизмов подвергалась большим колебаниям. Биологическая активность почвы, определяемая по сумме микробиологических и биохимических показателей, под бессменными культурами была ниже на 7-30 % по сравнению с залежью, а ферментативные процессы протекали интенсивнее в почве залежи (Назарько, 2008).

Установлено, что длительное выращивание полевых культур на одних и тех же участках снижает активность биологических процессов и приводит к формированию особых микробных ассоциаций. Под культурами сплошного посева активизируются процессы разложения органического вещества растительных остатков. Под пропашными культурами усиливаются процессы деструкции органического вещества самой почвы. Это подтверждает отрицательное влияние выращивания однотипных культур на почву, снизить которое можно путем чередования их при севооборотах или при внесении удобрений.

Результаты исследований свидетельствуют также о более разнообразном количественном и качественном составе бактериальных сообществ почвы и ризосферы совместных посевов по сравнению с чистыми, что можно объяснить большим разнообразием корневых выделений в почву. Обнаружено снижение численности условно патогенных микромицетов в почве и ризосфере растений, возделываемых совместно (Назарько, 2008).

На процессы, связанные с деятельностью микроорганизмов в почве, видовой состав растений агроценоза может влиять не только качественно, но и количественно. Поэтому очень важно изучать внутреннюю динамику бактериальных сообществ не только для характеристики биологической системы, но и как возможность влияния на экологическую систему в целом (Buckley, Shmidt, 2001).

Микробиологические исследования почвы в разных системах севооборота позволяют оценить состояние плодородия почв, подобрать растения с учетом

сведений о возможном их влиянии на почвенную и ризосферную микробиоту, что в значительной мере повышает урожайность и качество продукции растениеводства.

В мировом земледелии применяется широкий ассортимент различных видов и форм удобрений. По характеру воздействия на почву и рост растений удобрения подразделяются на прямые и косвенные. Внесение прямых удобрений способствует улучшению питания растений в отношении азота, фосфора, калия и других элементов (соответственно, азотные, фосфорные, калийные и другие удобрения). К косвенным относят известь, гипс и другие удобрения, улучшающие, прежде всего структуру и др. физические характеристики почв (Минеев, 2004).

Постоянное внесение различных удобрений на протяжении длительного срока позволяет стабилизировать микробное сообщество агроценозов так, что его структура имитирует природную экосистему и остается неизменной в течение десятков лет. На основе анализа метагенома образцов почвы, подвергавшихся внесению удобрений в течение 100 лет, была определена структура бактериальных сообществ, включавшая *Pseudomonas* spp., альфа-, бета- и гамма- протеобактерии, ацидобактерии, бактериоиды, нитроспирсы и *Firmicutes* spp.. На основании полученных результатов авторы предположили, что такая структура бактериальных сообществ типична для агроэкосистем, сформировавшихся в течение 70 лет, и сохраняется в течение длительного времени (Sun et al., 2004). Это заключение подтверждается и другими методами. При характеристике стабильности почвенной микробиоты определением границы колебаний численности микроорганизмов по коэффициенту флуктуаций было установлено, что в экосистеме целинных почв и агроценоза при длительном использовании органических удобрений почвенная микробиота находится в состоянии экологического равновесия и характеризуется незначительным колебанием численности (Иутинская и др., 1993).

При этом внесение в почву высоких доз минеральных удобрений приводит к перестройке метаболизма почвенной биоты, уменьшению биоразнообразия, резкому всплеску численности автохтонных микроорганизмов, снижающих плодородие за

счет минерализации гумусовых веществ (Андриук и др., 2001). Длительное применение высоких доз минеральных удобрений снижает устойчивость микробного ценоза почвы, из-за чего значительно возрастает диапазон колебаний численности микроорганизмов (Иутинская и др., 1993).

На состав бактериальных сообществ также влияет влажность среды обитания. При избыточном увлажнении в качестве доминантов выделяется род *Aquaspirillum* (Добровольская, 2002).

Как видно из приведенных данных, влияние агротехнологий на микробиоту при выращивании сельскохозяйственных культур весьма значительно. Это обстоятельство делает необходимым разработку научных основ для получения сельскохозяйственной продукции и воспроизведения почвенного плодородия с учетом состояния микробных ценозов почвы (Иутинская и др., 2010).

1.3. Эпифитные бактериальные сообщества овощных и зерновых культур

Надземные части живых растений, включая листья, стебли, бутоны, цветы и плоды, называются филлосферой и являются средой обитания микроорганизмов. Филлосфера играет большую роль в экологии и сельском хозяйстве (Whipps et al., 2008). Однако в исследованиях, посвященных выяснению значения микроорганизмов в жизни растений, основное внимание, до настоящего времени, обращалось на почвенную и ризосферную микробиоту, а также на эндофитов, симбиотически сожительствующих с растениями. По эпифитным микробным комплексам, обитающим на поверхности всех органов здоровых вегетирующих растений, капитальных трудов не существует. Это объясняется в основном тем, что эпифитным микроорганизмам не придавали большого значения, считая, что их присутствие на поверхности листьев никак не отражается на жизнедеятельности растений и что их состав ограничивается несколькими видами (Заикина, 2008).

Численность популяций бактерий филлосферы определяется доступностью влаги и питательных веществ, источником которых служат вымываемые водой из листа вещества, секреты и экссудаты растения. В качестве питательных субстратов также могут служить оседающие на поверхность листьев частицы, пыльца, вещества, растворенные в дождевой воде (Громов, Павленко, 1989).

Систематический состав бактерий филлосферы разнообразен. На различных растениях могут преобладать различные виды, однако специфичность видового состава филлосферы не доказана (Иванова, 2007). Однако в результате опытов, проведённых на овощных культурах, было показано, что состав и численность микроорганизмов зависят от вида и сорта растения, степени зрелости плодов и овощей, расстояния от почвы в период вегетации, природно-климатической зоны (Шильникова и др., 2006). Наиболее распространены в филлосфере растений умеренной зоны бактерии родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clavibacter*.

Численность эпифитов и их специфичность обусловлены химическим составом, количеством и степенью доступности экссудатов, выделяемых растениями и используемых бактериями в качестве питательных веществ. Например, груши и яблоки, выращенные в одном саду, существенно различаются по количеству микроорганизмов, обитающих на их поверхности. На грушах численность микроорганизмов достигает 10^5 КОЕ/г (колониеобразующих единицах на 1 г субстрата), а на яблоках она не превышает 10^2 КОЕ/г. Подобные различия можно объяснить значительно более высоким содержанием углеводов в плодах груши, интенсивным выделением их с экссудатами и доступностью для микроорганизмов. На яблоках присутствует восковидный налет, затрудняющий питание микроорганизмов. Большое значение имеет степень зрелости плодов и овощей. На зрелых плодах и овощах численность микроорганизмов резко возрастает.

Содержание микроорганизмов в филлосфере плодов и овощей в значительной степени определяется расстоянием их от почвы в период вегетации. Почва – естественная среда обитания многих видов микроорганизмов. Численность их в почве достигает нескольких миллионов КОЕ/г. Безусловно, почва – постоянный источник инфекции. На плоды и овощи микроорганизмы из почвы могут попадать с брызгами поливной воды, переноситься воздушными потоками, а также насекомыми, птицами, грызунами. Чем ближе плоды и овощи расположены к поверхности почвы, тем больше на них выявляется микроорганизмов. Поэтому, содержание микроорганизмов на овощах, как правило, значительно выше, чем на плодах. Особенно высока численность микроорганизмов на клубне- и корнеплодах – 10^5 - 10^6 КОЕ/г, в том числе, бактерий группы кишечной палочки – 10^2 КОЕ/г.

Спектр бактериальных таксонов особенно разнообразно представлен на овощах. В составе эпифитов практически всегда выявляются факультативно-анаэробные бактерии *Erwinia herbicola*. Широко распространены молочнокислые бактерии. Они обитают на капусте, салате, огурце, укропе, малине, яблоках, винограде. Из кокковых форм преобладают *Lactococcus lactis* и *L. cremoris*. Среди палочковидных форм доминируют *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*. Доля молочнокислых бактерий среди эпифитов зависит от вида растения. Численность этих бактерий на белокочанной и краснокочанной капусте, плодах огурца и на укропе колеблется в пределах 10^4 - 10^6 КОЕ/г. Немногочисленность молочнокислых бактерий в филлосфере ряда растений объясняют тем, что некоторые представители эпифитов продуцируют антибиотические вещества, подавляющие их жизнедеятельность. Сами же молочнокислые бактерии выделяют соединения, ингибирующие развитие протеолитических бактерий. На многих овощах часто встречаются бактерии родов *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, а на плодах и ягодах с повышенной кислотностью – уксуснокислые бактерии. На поверхности клубней картофеля и корнеплодов моркови, свеклы, репы и др. в большом количестве обнаруживаются бактерии родов *Bacillus* и *Clostridium*.

Численность и состав микроорганизмов на клубнях и корнеплодах в значительной степени зависят от типа почвы и погодных условий в день сбора урожая. На 1 г клубней картофеля, корнеплодов свеклы, репы, моркови приходится десятки и даже сотни миллионов клеток спорообразующих бактерий. Из представителей рода *Bacillus* часто встречаются следующие виды: *B. mesentericus* (картофельная палочка), *B. subtilis* (сенная палочка), *B. mycoides* (грибовидная палочка). Клубнеплоды легко обсеменяются в почве мезофильными бактериями рода *Clostridium*, отдельные виды которого, например *C. butyricum*, обнаруживаются в 100% проб. Промывание овощей с последующей сушкой на солнце (или просто просушивание на солнце) значительно снижает численность бактерий на клубнях и корнеплодах (Шильникова и др., 2006). На семенах овощных культур часто встречаются факультативно-анаэробные бактерии вида *Erwinia herbicola*. На созревших семенах моркови, собранных в поле, бактерии этого вида составили до 90 % от общего числа эпифитных бактерий (Кононков и др., 1980). Сохранение эрвиний на семенах в процессе хранения рассматривается в качестве индикатора благоприятного режима хранения семян. При нарушении режимов хранения (увеличении влажности воздуха) наблюдается вытеснение аборигенов бациллами и грибами, в результате чего происходит загнивание и гибель семенного материала (Добровольская, 2002). Интересным представляется установленная связь эрвиний с опыляющими цветы насекомыми. Из тысячи проанализированных насекомых 40 % содержали в своём организме в качестве доминирующего вида *Pseudomonas herbicola* (этот вид претерпевал последовательные таксономические изменения: *Ps. herbicola* – *Erwinia herbicola* – *Enterobacter agglomerans* – *Pantoea agglomerans*). В модельных опытах было доказано перенесение бактерий этого вида из насекомых на соцветия кок-сагыза (*Taraxacum kok-saghyz*) (Новикова, 1963). Из кишечника насекомых, поверхности их тела и филлопланы растений всегда выделялись флюоресцирующие псевдомонады. Таким образом, одной из экологических ниш, где обитают и сохраняются эрвинии и псевдомонады, являются насекомые, с которыми при

опылении цветущих растений эти бактерии попадают и в агроценозы. При этом следует учитывать перенос вышеназванных протеобактерий с ветром и осадками. На состав эпифитных бактериальных сообществ оказывает влияние влажность среды обитания. При избыточном увлажнении в качестве доминантов часто выделяются бактерии рода *Aquaspirillum* (Добровольская, 2002).

Число бактерий в ризосфере – почве, прилегающей к корням, превышает их число в зоне почвы, удаленной от корней в десятки, а часто в сотни раз. Толщина ризосферного слоя может составлять от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров в зависимости от почвенных условий и типа растений. Это называется ризосферным эффектом. В ризосферу поступают выделяемые корнями растворенные органические вещества, которые являются источниками питания для микробного сообщества ризосферы. Состав микробных сообществ ризосферы отличается у разных растений, хотя строгой приуроченности обнаружить не удастся. По данным одних исследователей (Thomashow, 1996) в ризосфере пшеницы наиболее часто встречаются бактерии, представленные родами *Bacillus* и *Pseudomonas*. Другие авторы (Velázquez et al., 2012) показали, что кроме бацилл и псевдомонад часто обнаруживаются представители родов *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Xantomonas*, *Agrobacterium* и *Enterobacter*. (Иванова, 2007) Кроме того, и в филлосфере и в ризосфере культурных растений выделяются бактерии рода *Methylobacterium*. (Corpe, Rheem, 1989; Holland, 1997; Доронина и др., 2000, 2004). В отличие от патогенов, метилобактерии не оказывают негативного воздействия на растения. Наоборот, они регулируют рост и развитие растений посредством синтеза фитогормонов, повышают устойчивость растений при различных стрессах, способствуют выживаемости (Доронина и др., 2009). С поверхности семян также выделяются метилобактерии. Например, метилотрофные бактерии *Methylobacterium* sp., выделенные с поверхности семян овса (*Avena sativa* L.), ячменя (*Hordeum vulgare* L.) и листьев ярового тритикале (*Triticale*) были способны синтезировать индолил-3-уксусную кислоту (от 3 до 14 мкг/мл в зависимости от штамма). Было выявлено

стимулирующее действие метиловобактерий на рост проростков яровой пшеницы в лабораторных условиях. В монокультурах метиловобактерии не оказали антагонистического действия на фитопатогенные бактерии *Erwinia rhapontici*, *Er. herbicola*, *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus sp.*, тогда как искусственные ассоциации, в состав которых попарно включали природные изоляты метиловобактерий и эпифитных бактерий, не использующих метанол, подавляли рост фитопатогенов. На основании комплекса выявленных свойств изученные штаммы метиловобактерий включены в коллекцию культур для поддержания биотехнологически перспективных штаммов (Широких А., Широких И, 2007).

Наиболее интенсивное размножение бактерий в ризосфере наблюдается перед цветением растений (Иванова, 2007). Это подтверждается результатами экспериментов Гордеевой (Гордеева, Масленникова, 2012), в которых исследовалась ризосфера зерновых культур. Исследования показали, что характер изменений численности однотипен для всех исследованных растений: в стадию кущения численность минимальна, она достигает максимальных величин в фазу колошения. В этот период возрастает активность целлюлозоразрушающих микроорганизмов, принимающих активное участие в разложении отмирающих корневых остатков.

Количественный состав эпифитных бактерий закономерно отражает физиолого-биохимическое состояние растительного организма в процессе онтогенеза. Анализ динамики численности бактерий по сезонам в течение нескольких лет показал, что у растений открытых экосистем, несмотря на влияние внешних факторов, происходит внутренняя смена жизнедеятельности. В результате максимальная численность микроорганизмов наблюдается в конце лета, снижение числа бактерий происходит в осенний период, меньше всего показатели численности зафиксированы в зимний период (Заикина, 2008).

1.4. Ростостимулирующие ризосферные бактерии сельскохозяйственных растений

Микроорганизмы, активно размножающиеся на корнях и получившие название ризобактерий, состоят из нескольких групп: 1. «нейтральные» бактерии – не оказывающие влияния на растения; 2. вредные (их от 8 до 15%) – угнетающие прорастание семян, уменьшающие длину корней, вызывающие на них некрозы и усиливающие инфекцию корней грибами и бактериями; 3. полезные (их всего 2-5 %) – стимулирующие рост растений (Романенко и др., 2008).

Бактерии, способствующие значительному улучшению роста и развитию растений, в настоящее время принято обозначать как PGPR (от Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) – ризобактерии, способствующие росту растений (Боронин, 1998).

Было предложено (Gray, Smith, 2005) разделить эти ризобактерии на 4 группы: 1) внеклеточные (ePGPR), существующие в ризосфере; 2) ризоплановые, обитающие между клетками корневой коры; 3) внутриклеточные (iPGPR); 4) существующие за пределами клеток корня в специализированных узловых структурах. Спектр таксонов PGPR включает в настоящее время большое количество родов как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий: *Acinetoobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Thiobacillus* и другие (Figueiredo et al., 2010). Бактерии под названием PGPR получили широкую известность во всем мире из-за важности и значимости в сельском хозяйстве. Это связано с политикой, направленной на уменьшение использования химических удобрений и необходимости стабильного земледелия в рамках охраны окружающей среды. Научные исследования в этой области используют междисциплинарные подходы, чтобы понять способы адаптации PGPR, а также объяснить – как они воздействуют на физиологию и рост растений. В силу их быстрой ризосферной колонизации и стимуляции роста растений, в настоящее

время PGPR вызывают все больший интерес, т.к. использование таких бактерий может оказать положительное влияние на растениеводство.

Точный механизм, с помощью которого PGPR могут стимулировать рост растений, четко не установлен, хотя и существует несколько гипотез: 1) синтез фитогормонов; 2) подавление вредных организмов; 3) активация растворения фосфатов; 4) усиление поглощения минеральных питательных веществ (Боронин, 2000; Штерншис и др., 2000; Benizri et al., 2001; Figueiredo et al., 2010).

Существенную роль в проявлении биоконтрольных функций ризобактерий играет синтез фитогормонов. Например, максимальная активность, проявляемая *Pseudomonas* в ризосфере редиса, может быть связана с синтезом индолилуксусной кислоты (ИУК) из триптофана корневых экссудатов, количество которого у редиса в 30-100 раз выше, чем у пшеницы или томатов. В проявлении защитных свойств ризобактерий участвует также фермент АЦК-деаминаза, катализирующий катаболизм АЦК (1-аминоциклопропан-1-карбоксилата) – предшественника фитогормона этилена. Путем анализа способности PGPR утилизировать АЦК в качестве источника азота, было показано, что этим ферментом обладают лишь некоторые штаммы PGPR. Перенос структурных генов АЦК-деаминазы из *Erwinia cloacae* в *Ps. fluorescens* сопровождается существенным возрастанием способности рекомбинантов подавлять патогенные грибы (Фундаментальная фитопатология, 2012).

Наиболее изученные механизмы связаны с конкурентным исключением фитопатогенов, которое определяется их прямым подавлением бактериальными антибиотиками. Многие штаммы *Pseudomonas* продуцируют феназины, которые обладают широким спектром антимикробного действия относительно грибов и бактерий, в основе которого лежит нарушение клеточного дыхания, что приводит к избыточному накоплению O_2 и H_2O_2 и, в конечном счете, к гибели клетки. (Феклистова, Максимова, 2009).

Конкуренционное исключение фитопатогенов наиболее успешно происходит тогда, когда PGPR бактерии проявляют высокую активность колонизации корней. Основными экологическими нишами, которые занимают PGPR, являются зоны активного выделения корневых экссудатов (Фундаментальная фитопатология, 2012). Некоторые ризосферные микроорганизмы способны усиливать поступление фосфора в растения. Бактерии могут использовать две системы повышения концентрации экзогенного фосфата: 1) за счет гидролиза органических фосфатов под действием фосфатаз; 2) путем растворения минеральных фосфатов за счет продукции кислот (Боронин, 1998). Важный механизм подавления фитопатогенов биоконтрольными микробами заключается в конкуренции за источники питания. Эффективными орудиями в ней являются бактериальные сидерофоры, выполняющие функцию связывания и транспорта железа в клетки бактерий.

Ризобактерии являются эффективными конкурентами в ризосфере. Они могут закрепляться и сохраняться на агрономически выращенных растениях (Клоергер, Metting, 1993; Medeiros et al., 2005; Zehnder et al., 1997; Keel, Maurhofer, 2009) в качестве эпифитов и эндофитов. Установлено, что эндофитные бактерии, участвующие в биологическом контроле, делят одну экологическую нишу с фитопатогенами и могут защищать растения от различных абиотических воздействий (Hallman et al., 1997). Следует отметить, что один штамм ризосферных бактерий может использовать несколько механизмов воздействия на фитопатогены одновременно. Однако есть и те, что не продуцируют метаболитов против фитопатогенов и отделены от них пространственно (Figueiredo et al., 2010).

В результате контакта с патогенными или непатогенными микроорганизмами у растения может развиться системная устойчивость, защищающая его от последующих вирусных, грибковых или бактериальных инфекций. Иммунитет, развившийся после воздействия фитопатогена, называется приобретенной системной устойчивостью. В растении при этом накапливается салициловая кислота и синтезируются белки, необходимые для защиты растения (Hunt et al., 1996).

Примером таких белков является фермент 1,3-глюканаза, участвующий в разрушении структурных полисахаридов клеточной стенки грибов. Механизм защиты растений, вызванный непатогенными биоконтрольными бактериями и грибами, известен как индуцированная системная устойчивость (van Wees et al., 2008). При этом в растении синтезируется жасминовая кислота и этилен, индуцируется синтез белков, подавляющих развитие фитопатогенов (отмечается усиление лигнификации корневой ткани и повышение содержания фитоалексинов в стеблях (van der Ent et al., 2009). Индуцированная устойчивость, вызываемая PGPR *Pseudomonas*, описана у ряда растений: у арабидопсиса против поражения листовым патогеном *Peronospora parasitica* (Iavicoli et al., 2003), у огурцов против *Colletotrichum orbiculare* (Wei et al., 1991), у табака против вируса табачной мозаики (Maurhofer et al., 1998), у редиса, гвоздики и бобов против *Fusarium oxysporum* (Leeman et al., 1995). Бактериальные сигналы, вызывающие системную устойчивость, имеют самую различную природу. Это могут быть убитые нагреванием бактериальные клетки или препараты внешней мембраны, очищенные от белков и состоящие из липополисахаридов (Bakker et al., 2003), сочетание сидерофоров, О-антигенов, некоторых вторичных метаболитов (Audenaert et al., 2002), салициловая кислота (Maurhofer et al., 1998) и феназиновый антибиотик пиоцианин (de Vleeschauwer et al., 2006).

Положительные эффекты PGPR на растения обычно объясняются эффектом ростостимуляции, а также биологическим контролем (Mariano, Клоергер, 2000). На практике эти эффекты часто бывают вызваны штаммовой активностью PGPR. Поэтому некоторые штаммы PGPR – бактерий выбраны для стимуляции роста, но имеют возможность и контролировать заболевания растений и наоборот: наличие PGPR в ризосфере обеспечивает растение-хозяина устойчивостью к фитопатогенам. PGPR – являются потенциальным инструментом для обеспечения устойчивого сельского хозяйства. По этой причине, существует необходимость изучения того, какие именно свойства бактерий являются необходимыми в различных условиях

окружающей среды и растений. Сочетания штаммов, оказывающих благоприятное воздействие, могут быть использованы в будущем в составе технологий по улучшению урожайности сельскохозяйственных растений.

1.5. Фитопатогенные микроорганизмы

Несмотря на то, что многие фитопатогенные бактерии встречаются на поверхности растений, их отличительной чертой является способность поражать растения. В работе Стукенброка с соавторами (Stukenbrock, McDonald, 2008) описаны механизмы появления патогенов на культурных растениях. Высокоэффективный сиквенс ДНК в сочетании с другими аналитическими методами делает возможным дифференцировать эти механизмы. Авторы считают, что в ряде случаев, патогены уже были на хозяевах, когда их начали выращивать (около 10 тыс. лет назад). В других случаях патогены появились совсем недавно, и почти сразу последовал горизонтальный перенос генов. Авторы полагают, что агроэкосистемы отбирают новые патогены из-за генетического единообразия сельскохозяйственных экосистем. Отбор новых патогенов будет продолжаться, пока агроценозы не будут изменены таким образом, чтобы сделать их менее способствующими отбору патогенов (Гвоздяк и др., 2005).

Среди эпифитных сапрофитов найден ряд видов, которые эволюционируют в сторону паразитизма. К ним принадлежат представители следующих видов бактерий: *Pseudomonas fluorescens*, *Ps. herbicola*, *Bacillus mesentericus*. Это очень распространенные на различных растениях виды, но пока они живут эпифитно, у них нет возможности преодолевать факторы иммунитета и питаться живыми тканями (Заикина, 2008).

Болезнь растений – это процесс, в основе которого лежит взаимодействие между растением, болезнетворным агентом, вызывающим болезнь и условиями внешней среды (Попкова, 2005). Одной из распространенных болезней является

бактериальная гниль. Чаще всего возбудителями являются бактерии следующих видов: *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas marginalis*, *Bacillus mesentericus*. Овощи при хранении поражаются и бактериями и грибами, но экономический ущерб от бактериальных гнилей существенно выше. Мокрые (мягкие гнили), вызываемые бактериями *Erwinia carotovora* или *Xantomonas campestris*, можно наблюдать при хранении моркови, сельдерея, салата, томатов, капусты, лука, картофеля и других овощей. Бактерии выделяют гидролитические ферменты, разрушают пектин срединных пластинок растительных тканей и превращают овощи в кашицеобразную водянистую массу с неприятным запахом. У белокочанной капусты первый симптом бактериальной гнили – почернение сосудов на пожелтевших, а позднее приобретающих вид пергамента, высохших листьях – сосудистый бактериоз. Наиболее быстро заболевание развивается при температуре хранения выше 20°C.

Бактериальная мокрая гниль – основная болезнь картофеля в хранилищах. Возбудителем ее служит *Erwinia carotovora var. atroseptica*. В гниющих клубнях развиваются так же *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens*. Мокрая гниль поражает картофель обычно еще в поле, особенно если он болен «черной ножкой». При этом стебель в основании сначала покрывается черной гнилью, а затем разрушается. Если заболевание передалось на клубни, то при хранении они превращаются в мягкую, гниющую, с резким затхлым неприятным запахом кашицеобразную массу, которая легко отстает от твердой кожицы. При повышенных температуре и влажности, недостатке кислорода в хранилище заболевание протекает с невероятной быстротой. Выделяющийся клеточный сок, содержащий возбудителя заболевания, инфицирует окружающие клубни, прежде всего, через поврежденные участки (Шильникова и др., 2006).

Еще одним распространенным заболеванием картофеля является кольцевая гниль. По данным Европейской и Средиземноморской организации по защите растений (ЕРРО) наибольшее распространение и вредоносность эта болезнь имеет в США, Канаде и России. Возбудитель кольцевой гнили – это бактерии вида

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicum* (Cms). Болезнь поражает листья, стебли, столоны и клубни. При посадке сильно инфицированных клубней часть из них сгнивает, а из остальных вырастают растения, на которых первые признаки появляются на листьях в ранние сроки (Анисимов и др., 2009).

Помимо овощных сельскохозяйственных культур фитопатогены поражают и зерновые. Например, бактерии вида *Pseudomonas syringae* в естественных условиях поражают пшеницу, рожь, ячмень и овес. Симптомы заболевания проявляются у 15% растений, но в благоприятные для развития возбудителя годы это число увеличивается до 30-80% (Пасичник и др., 2011).

Бактерии вида *Rathayibacter tritici* поражают растения посредством личинок пшеничной нематоды *Anguina tritici*. В почве она способна сохранять жизнеспособность 5-7 лет, а в сухом зерне – более 20 лет. Заболевание распространяется на посевах пшеницы в виде очагов. Наиболее характерные признаки заболевания проявляются в фазе созревания пшеницы. Незначительно пораженные растения отстают в развитии и образуют карликовые колоски. При сильном поражении пшеница часто не выколашивается, и колос остается в пазухе листа, растения практически не дают урожая. Этому заболеванию подвержена только пшеница, а возбудитель этого заболевания сохраняется в семенах и галлах пшеничной нематоды более 2 лет (Пасичник и др., 2011).

Заболевание растений не возникает, если между растением и микроорганизмом устанавливается равновесие, когда оно нарушается – растение заболевает. Прогноз подобных нарушений равновесия – основа контроля фитопатогенных бактерий. Возникают также новые заболевания. Их появление может быть объяснено рядом причин – это быстрое генетическое изменение бактерий благодаря горизонтальному переносу генов. Использование фитопатогеном новых возможностей адаптации, отбор культур – хозяев, осуществляемый человеком, изменение окружающей среды и применение новой агротехники – всё это может изменять равновесие между растением-хозяином и фитопатогенными бактериями (Scortichini, 2005).

1.6. Биологические методы борьбы с фитопатогенами

Сущность биологического метода борьбы с фитопатогенами заключается в использовании микроорганизмов или продуктов их жизнедеятельности для подавления развития возбудителей болезней. Последнее время этому методу уделяют все большее внимание в связи с тем, что широкое применение химического метода представляет опасность для здоровья людей и нарушает экологические процессы в природе. Еще в 19 в. многие исследователи у нас в стране и за рубежом обращали внимание на антагонистические свойства микроорганизмов. Однако их наблюдения носили случайный характер и не могли быть обобщены в целостную систему. Впервые проанализировал отдельные факты микробного антагонизма И.И. Мечников. Он же наметил пути использования этого явления на практике. Работы Мечникова заложили основу учения об антагонизме микроорганизмов, получившего сейчас широкое практическое применение (Попкова, 2005).

Антагонизм широко распространен среди различных групп микроорганизмов. Он установлен у бактерий, актиномицетов, грибов, водорослей и др. Причины явления антагонизма очень разнообразны. Оно может быть обусловлено использованием разными организмами, развивающимися вместе, одних и тех же питательных веществ. В этом случае между видами происходит конкурентная борьба за источники питания. При совместном развитии на одном и том же субстрате жизненных форм, имеющих одинаковые потребности в питательных веществах, преимущество будет у той из них, которая обладает более высокой скоростью роста (Попкова, 2005).

Например, при совместном одновременном высеве бактерий и актиномицетов на субстрат, одинаково ими используемый, наблюдается вытеснение актиномицетов бактериями. Бактерии, как организмы с более высоким темпом размножения (роста), быстрее заселяют субстрат и интенсивнее

используют питательные вещества. Вследствие этого актиномицеты лишаются возможности роста и постепенно будут вытеснены с субстрата (Попкова, 2005).

Однако угнетение роста актиномицета может и не произойти, если он способен выделять специфические продукты обмена веществ, подавляющие развитие бактерий. В естественных условиях антагонизм такого типа наблюдается чаще всего в почве, где между микроорганизмами идет конкурентная борьба за источники питания. В этом процессе участвуют и фитопатогенные микроорганизмы, жизнедеятельность которых часто подавляется в связи с активным размножением сапротрофных микроорганизмов (Попкова, 2005).

Известно, что внесение в почву зеленого удобрения, особенно измельченных растений ржи, тормозит развитие возбудителя обыкновенной парши картофеля *Streptomyces scabies*. Это объясняется тем, что в присутствии зеленой массы удобрения в почве идет быстрое накопление микроорганизмов-сапротрофов, использующих его в качестве питательного субстрата. В почве существенно возрастают как грибная, так и бактериальная популяции микроорганизмов. В результате в микробоценозе усиливаются конкуренция за питательные вещества и антагонистические взаимоотношения. В этой конкуренции патоген – возбудитель парши картофеля – не получает благоприятных условий для роста и развития, и его численность в почве сокращается (Попкова, 2005).

Антагонизм микроорганизмов может быть обусловлен образованием антибиотических веществ. Такая форма антагонизма наиболее распространена среди микроорганизмов. Специфические продукты обмена одних видов, угнетающие или полностью подавляющие развитие других, получили название антибиотики. Антибиотики – специфические продукты жизнедеятельности, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам организмов (вирусам, бактериям, актиномицетам, грибам и т.д.) (Попкова, 2005).

В отличие от других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов,

антибиотики характеризуются двумя основными признаками. Во-первых, они обладают высокой биологической активностью по отношению к чувствительным к ним организмам, т.е. антибиотические вещества высокоэффективны даже в очень низких концентрациях. Во-вторых, для антибиотиков характерна избирательность действия, т.е. каждый антибиотик проявляет биологическое действие лишь по отношению к отдельным определенным организмам или к их группам, не оказывая никакого воздействия на другие организмы (Попкова, 2005).

Антагонизм между микроорганизмами используют в борьбе с фитопатогенами. Наиболее приемлемы следующие направления использования антагонистов для подавления возбудителей болезней сельскохозяйственных культур:

- 1) создание условий, благоприятных для накопления в почве микробов-антагонистов;
- 2) использование культур антагонистов для подавления фитопатогенов;
- 3) применение препаратов антибиотиков (Попкова, 2005).

Наиболее хорошо изученными антибиотиками, играющими важную роль в супрессии болезней растений, являются антибиотики группы феназинов, флороглюцинов, пиолютеорин, пирролнитрин и оомицин А (Боронин, 1998). Химические формулы этих антибиотиков приведены в таблице 1.

Пирролнитрин является одним из самых мощных антифунгальных агентов, продуцируемых *Ps. fluorescens*. В работах Хоуэлла и Стипановича показано, что *Pseudomonas fluorescens* PF-5 синтезировал два антибиотика – пирролнитрин, угнетающий рост фитопатогенного гриба *Rhizoctonia solani*, и пиолютеорин, ингибирующий рост *Phitium ultimum* – важного патогенна сеянцев хлопчатника. Обработка семян штаммом или антибиотиками увеличивала выживаемость растений на 28-71 % (Романенко, 2008).

Продуцирование феназинов ризосферными псевдомонадами представляет

очевидную таксономическую ценность, однако одно и то же производное может синтезироваться разными бактериальными видами. Например, представители вида *Ps. fluorescens* синтезируют только феназин-1-карбоновую кислоту, а *Ps. aureofaciens*, *Ps. chlororaphis* и *Ps. aeruginosa*, наряду с феназин-1-карбоновой кислотой, продуцируют и другие феназиновые производные (Смирнов, Киприанова, 1986).

Таблица 1. Антибиотики, супрессирующие рост и развитие фитопатогенных микроорганизмов

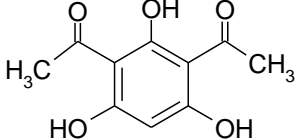
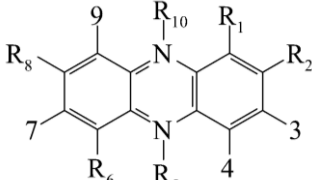
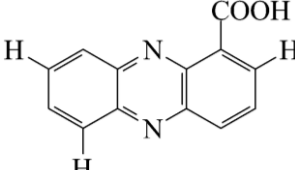
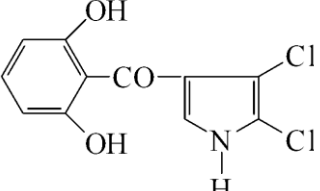
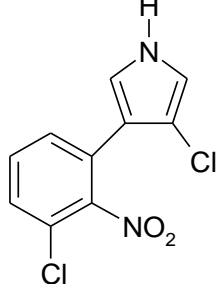
Название	Химическая формула
2,4-диацетилфлороглюцин	
Феназины	
Феназин-1-карбоновая кислота	
Пиолотеорин	
Пирролнитрин	

Таблица 2. Антибиотически активные метаболиты псевдомонад, участвующие в защите растений от фитопатогенов (Анохина, 2011).

Анти-биотик	Механизм действия на фитопатоген	Штамм-антагонист	Фитопатоген	Болезни растения хозяина	Ссылка
2,4-диацетил-флоро-глюцин	Повреждение мембран фитопатоген-ных грибов	<i>P. fluorescens</i> CHA0, Q2-87, Q8r1-96	<i>Gaeuman-nomyces graminis var. tritici</i>	Корневая гниль пшеницы	Keel et al., 1992; Raaijmakers, Weller, 1998
		<i>Pseudomonas</i> spp. F113	<i>Pythium ultimum</i>	Корневая гниль сахарной свеклы, хлопчатника, лесных пород	Fenton et al., 1992
		<i>P. fluorescens</i> CHA0	<i>Thielaviopsis basicola</i>	Черная корневая гниль табака, гороха, хлопчатника	Keel et al., 1990
Феназин-1-карбоновая кислота	Образование активных форм кислорода	<i>P. fluorescens</i> 2-79, <i>P. aureofaciens</i> 30-84	<i>Gaeuman-nomyces graminis var. tritici</i>	Корневая гниль пшеницы	Thomashow, Weller, 1988; Price-Whelan et al., 2006
Пиолютеорин	Не выяснен	<i>P. fluorescens</i> CHA0 <i>P. fluorescens</i> Pf-5	<i>Pythium ultimum</i>	Корневая гниль огурцов, хлопчатника, сахарной свеклы	Howell, Stipanovic, 1980
Пирролнитрин	Ингибирование ферментов дыхательной цепи грибов	<i>P. fluorescens</i> Pf-5, <i>P. Fluorescens</i> BL915	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pyrenophora tritici-repens</i>	Корневая гниль хлопчатника, сахарной свеклы и множества других видов травянистых и древесных растений	Howell, Stipanovic, 1979; Pfender et al., 1993; Kirner et al., 1998

Феназины являются окрашенными азотсодержащими гетероциклическими соединениями, которые продуцируются исключительно бактериями. В настоящее время известно свыше 100 феназиновых производных. К синтезу феназиновых производных способны представители родов *Pseudomonas*, *Burckholderia*, *Brevibacterium*, *Xanthomonas*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Microbispora*, *Micrococcus*, *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Pectobacterium* и *Methanosarcina* (Turner, Messenger, 1986; Pierson L., Pierson E., 2010).

Действие феназинов на фитопатогены связано с образованием активных форм кислорода, губительных для клеток и с ингибированием ферментов, необходимых для защиты организма от окислительного стресса (Price-Whelan et al., 2006).

Феназин-1-карбоновая кислота (кристаллы желто-зеленого цвета) является ключевым антибиотиком феназинового ряда, из которого в результате различных ферментативных модификаций образуются другие производные. Способность к синтезу феназин-1-карбоновой кислоты широко распространена среди флуоресцирующих псевдомонад (Табл. 2). Наибольшее количество этого соединения (до 1 г/л) синтезируется на средах, содержащих глюкозу и дрожжевой экстракт или глицерин, пептон и минеральные соли. Феназин-1-карбоновая кислота – сравнительно слабый антибиотик. Она полностью угнетает рост *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Mycobacterium* в концентрации 50 мкг/мл, *Fusarium avenaceum* – 200 мкг/мл. В тоже время рост некоторых фитопатогенных грибов, например *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, вызывающего заболевания ячменя и пшеницы, подавляется этим антибиотиком в дозе 1 мкг/мл. Феназин-1-карбоновая кислота мало токсична для животных, но обладает значительной токсичностью по отношению к некоторым высшим растениям и водорослям (Анохина, 2011).

Продукция феназиновых антибиотиков зависит от условий культивирования в природных условиях, от факторов окружающей среды. Большое значение имеют источники углеродного питания (состав корневых экссудатов растений), наличие ионов металлов и аэрация (Duffy, Défago, 1999).

Еще одним механизмом защиты растений от фитопатогенов является синтез литических ферментов. Первым ферментом, обладающим литическим действием на клеточные стенки бактерий, был лизоцим, открытый в 1922 году знаменитым английским микробиологом Александром Флемингом, который впервые обнаружил лизоцим во многих тканях и выделениях животных организмов. Он предположил, что лизоцим является защитным средством, позволяющим бороться высшим организмам с имеющимися в среде их обитания патогенными бактериями. Первые сообщения о том, что бактерии обладают способностью вырабатывать бактериолитические ферменты, начали появляться уже в начале 50-х годов. К настоящему времени они обнаружены у всех исследованных бактерий (Кулаев, 1997). По месторасположению ферментов в бактериальной культуре выделяется три группы. Первую группу составляют автолизины - бактериолитические ферменты, присутствующие всегда (в активном или неактивном состоянии) в самой клеточной стенке. Они принимают участие в процессе роста и дифференцировки бактериальных клеток. В клетке бактерий, по-видимому, в норме имеется взаимосвязь между активностями ферментов, разрушающих и синтезирующих компоненты клеточной стенки. Процессы лизиса и биосинтеза стенки происходят одновременно с ростом и развитием бактериальной клетки, и только на поздних стадиях развития, когда биосинтетические процессы затихают, а активность литических ферментов остается на прежнем уровне, происходит лизис клетки бактерий. (Захарова, Павлова, 1985; Rogers et al., 1980).

Ко второй группе можно отнести литические ферменты бактериальных спор. Они активируются наряду с другими ферментами, участвующими в деградации биополимеров в период образования спор и при прорастании спор бактерий. Данные ферменты принимают участие в процессах разрушения оболочки и, как автолизины, в процессах роста и морфогенеза бактериальной клетки (Boland et al., 2000; Smith et al., 2000).

Третья группа – это внеклеточные литические ферменты. Биологическая роль их заключается, по-видимому, в том, что бактерии, синтезирующие и секретирующие такие ферменты в среду, имеют преимущество перед другими бактериями, прежде всего в источниках питания. Разрушая клетки других бактерий, бактерия – продуцент литических ферментов, использует аминокислоты, углеводы и другие компоненты лизированной клетки для собственных нужд. Кроме того, данная группа бактериолитических ферментов играет безусловно важную роль для защиты клеток, секретирующих эти ферменты в среду, от других бактерий, обитающих в той же экологической нише (Кулаев, 1997). Способность секретировать внеклеточные бактериолитические ферменты широко распространена как у грамотрицательных, так и у грамположительных бактерий. У грамотрицательных бактерий наибольшее количество активных культур встречается среди представителей рода *Pseudomonas*, а у грамположительных – *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* и *Clostridium* (Звягинцева, 1981; Shockman, Holtje, 1994; Smith et al., 2000). Внеклеточные бактериолитические ферменты бактерий, с одной стороны выполняют защитные функции, а с другой – являются факторами агрессии и участвуют в завоевании бактерией-продуцентом области обитания и в снабжении ее пищей (Strominger, Ghuysen, 1967; Кулаев и др., 1984; Степная и др., 1999).

Многие ризосферные бактерии способны продуцировать гидролитические ферменты, такие как хитиназы (Wang, Chang, 1997; Watanabe et al., 1999), глюканазы (Jijakli, Lepoivre, 1998), целлюлазы (Dunne et al., 1996), липазы (Dunne et al., 1998) и протеазы (Sacherer et al., 1994). Первое место в супрессии грибных инфекций отводится хитиназам, поскольку хитин, линейный полимер β -(1,4)-*N*-ацетилглюкозамин, является главным компонентом клеточной стенки многих фитопатогенных грибов. Было показано, что очищенные хитиназы *Bacillus subtilis* AF1 (Manjula et al., 2004) и *Serratia marcescens* (Ordentlich et al., 1988) проявляли ярко выраженное антифунгальное действие. Другая важная группа гидролитических ферментов, глюканазы, деградирует β -(1,3)-глюканы клеточных стенок грибов.

Штамм *Ps. seracia* продуцировал β -(1,3)-глюканазу и ингибировал развитие в ризосфере таких важных фитопатогенов как *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfii* и *Pythium ultimum* (Fridlender et al., 1993). Данные ферменты вначале вызывают локализованный лизис клеточной стенки фитопатогенных грибов в местах контакта бактерии-продуцента с гифами гриба. Способность бактерий быстро размножаться вдоль всей поверхности гифов зачастую приводит к повсеместному разрушению клеточных стенок и гибели фитопатогена. У некоторых PGPR *Pseudomonas* гидролитические ферменты играют большую роль в биоконтроле, чем вырабатываемые ими антибиотики, а в ряде случаев они усиливают действие антифунгальных метаболитов (Dunne et al., 1998).

Глава 2. Объекты и методы исследования

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования были почвы интенсивных агроэкосистем Каширского района Московской области, а также почвы Солнечногорского района Московской области.

Участки Каширского района распаханы под овощные и кормовые культуры (капуста, морковь, картофель, свекла, лук). В результате длительного использования почв в земледелии аллювиальные луговые почвы эволюционировали в агропочвы. В настоящее время, в почвенном покрове поймы преобладают аллювиальные агротемногумусовые и аллювиальные агротемногумусовые глеевые средне- и тяжелосуглинистые почвы (Классификация, 2004). Аллювиальные агротемногумусовые почвы характеризуются следующими показателями: $pH_{\text{водн}}$ 7,2; содержание гумуса 2,5-3 %; сумма поглощенных оснований ($Ca^{2+} + Mg^{2+}$) 44-50 мг-экв./100 г почвы; содержание обменного фосфора 25-40 мг/100 г почвы; содержание подвижного калия 9-17 мг/100 г почвы (Кораблева, 1969; Шишков, 2007).

Образцы почвы и растений – морковь посевная (*Daucus sativus*), капуста огородная (*Brássica olerácea*), свекла обыкновенная (*Béta vulgáris*), лук репчатый (*Allium cepa* L.), картофель (*Solánium tuberósum*) были отобраны в июне и августе 2012 г.

Исследования проводились также в Солнечногорском районе Московской области, на территории Учебно-опытного почвенно-экологического центра МГУ имени М.В. Ломоносова «Чашниково» (УОПЭЦ «Чашниково»). Участок для полевого опыта одинаков по рельефу, почвенным условиям – генезису, морфологии и свойствам почвы и входит в состав 4-х польного севооборота: 1. вика + овес (на сено); 2. озимая пшеница; 3. картофель; 4. ячмень. Исследовались: пшеница (листья, колосья, корни), ячмень (листья, колосья, корни), а так же образцы почвы под этими

сельскохозяйственными культурами. Почва опытного поля дерново-подзолистая хорошо окультуренная среднесуглинистая, на покровных суглинках, подстилаемых красно-бурой суглинистой мореной. Исследуемая почва имеет следующие характеристики: $pH_{\text{сол.}}$ 6,5; содержание гумуса 4,7 %; сумма поглощенных (Ca^{2+} , Mg^{2+}) 25 мг-экв/100 г почвы; содержание K_2O 6,7 мг/100 г почвы, P_2O_5 – 98 мг/100 г почвы; содержание общего азота 0,22 % (Почвенно..., 1986, 1988).

Вегетационные органы культурных растений: ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare*), пшеница мягкая (*Triticum aestivum L.*) и образцы почвы отбирались в июне и августе 2012 г.

Для предварительной десорбции микроорганизмов из почвенной суспензии применяли встряхиватель Vortex в течение 5 мин. Численность и таксономический состав бактериального комплекса исследовали методом посева на глюкозо-пептонно-дрожжевую среду в пятикратной повторности. Высевы проводились из разведений 10^3 - 10^8 . Статистическая обработка выполнена в соответствии со стандартными методами. Стандартное отклонение рассчитывалось в соответствии с рекомендациями Дмитриева (Дмитриев, 1972).

2.2. Питательные среды

Для выращивания бактерий использовалась глюкозо-пептонно-дрожжевая среда, содержащая в г/л: пептон – 1; глюкоза – 1; дрожжевой экстракт – 1; гидролизат казеина – 1; $CaCO_3$ – 1; агар-агар – 20.

Среда Кинг Б (для культивирования бактерий рода *Pseudomonas*), г/л: бактопептон – 20; глицерин – 10; K_2HPO_4 – 1,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 1,5; агар – 15.

Среда Хью-Лейфсона с глюкозой, г/л: Пептический перевар животный ткани – пептон – 2; дрожжевой экстракт – 0,5; натрия хлорид – 30; глюкоза – 10; бромкрезоловый пурпурный – 0,015; агар-агар – 3. Конечное значение pH (при 25 °C) $7,4 \pm 0,2$.

2.3. Методы родовой и видовой идентификации бактерий

Для ингибирования грибов в среду вносили 5 г нистатина. Культивирование вели в течение 7-10 суток при комнатной температуре. После подсчета общего числа колоний и предварительной микроскопии из большинства колоний готовили препараты и просматривали их в световом микроскопе с фазово-контрастным устройством. Основных представителей всех групп выделяли в чистую культуру. Морфологические признаки изучали у молодых (24-часовых) и 3-5-суточных культур. Данные по численности бактерий выражали в колониеобразующих единицах на г субстрата (КОЕ/г), которые были вычислены по формуле: млн. КОЕ/г=средняя численность×разведение×20 (количество капель в пипетке). Родовую принадлежность выделенных бактерий устанавливали на основании морфологических, культуральных и хемотаксономических признаков, используя "Определитель бактерий Берджи" (Определитель..., 1997), а также «Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий» (Лысак и др., 2003).

Для дифференциации микроорганизмов до рода были использованы диагностические системы, которые позволяют определить такие биохимические свойства как: утилизация цитрата натрия, малоната натрия, глюкозы, лактозы, манита, сахарозы, инозита, сорбита, арабинозы, мальтозы, образование индола, сероводорода, ацетилметилкарбинола (реакция Фогес-Проскауэра), наличие уреазы, β-галактозидазы, декарбоксилаз орнитина и лизина, дегидролазы аргинина, дезаминазы фенилаланина. Диагностическая система представляет собой панель с лунками с соответствующими субстратами с индикатором, стабилизированные поливиниловым спиртом. Учет результатов был произведен визуально в соответствии с цветовым указателем через 18-24 ч после инкубации при температуре 37 °С. Идентификацию культур проводят с помощью таблицы биохимических свойств, каталога кодов для интерпретации результатов идентификации с

использованием математического метода классификации. Для дифференциации микроорганизмов до рода были проведены следующие тесты:

1. Тест на оксидазу. На отрезок фильтровальной бумаги наносили несколько капель свежеприготовленного 1 % раствора дигидрохлорида тетраметилфенилен-диамида. Выросшую культуру наносили на увлажненную бумагу. При положительной реакции происходит развитие фиолетовой или пурпурной окраски в течение 10 секунд;
2. Окислительно-ферментативный тест на использование глюкозы (тест Хью-Лейфсона). В пробирки с полужидкой средой помещали бактериальную суспензию. В одной пробирке на среду Хью-Лейфсона наслаивали 10мм стерильного минерального масла (анаэробная пробирка). Среду во второй пробирке ничем не покрывали. Результаты интерпретируют следующим образом: если кислота образовалась в аэробной пробирке, то клетки катаболизируют углевод с использованием O_2 . В этой пробирке рост должен быть заметен. Если подкисление происходит в обеих пробирках, то клетки способны так же к брожению (Лысак и др., 2003).

Для идентификации микроорганизмов были использованы следующие методы:

1. Метод выделения ДНК с последующим проведением ПЦР и секвенированием. Геномную ДНК штаммов выделяли при помощи набора Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Германия) согласно инструкции производителей. ПЦР амплификацию ДНК проводили в смеси для ПЦР с добавлением матрицы ДНК (0,25 мкг/мл) и универсальных праймеров 27F и 1492R (5 мкМ каждый), согласно стандартному режиму: 1. Первичная денатурация – 95 °С, 5 мин; 2. Денатурация – 95 °С, 30 сек; 3. Отжиг праймеров – 62 °С, 45 сек; 4. Элонгация – 72 °С, 45 сек, 5. Конечная элонгация – 72 °С, 2 мин. Количество циклов – 30. Указанные праймеры позволяют получать последовательность гена 16S РНК величиной 1465 пар нуклеотидных оснований. Анализ и выравнивание последовательностей осуществлялось с помощью программы BioEdit v.7.2.5

(<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.zip> (дата обращения: 11.06.2014)).

Построение дендрограмм осуществлялось с помощью метода связывания ближайших соседей neighbor-joining (NJ) в программе MEGA v.6 (Tamura et al., 2013). Статистическую достоверность филогенетических реконструкций оценивали методом «складного ножа» («Bootstrap») путем построения 1000 альтернативных деревьев.

2. Метод времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS).

Идентификацию микроорганизмов проводили на основе сопоставления данных о составе и соотношении пептидов, полученных гидролизом белков в колонии исследуемого микроорганизма, с аналогичными данными типовых штаммов из базы данных MALDI Biotyper v. 2.0.4., (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

Колонии микроорганизмов наносили на три точки поверхности мишени и высушивали при комнатной температуре. Сверху наносили 1 мкл раствора α -циано-4-гидрокси-циннамовая кислота (α -HCCA, Bruker Daltonik GmbH) в концентрации 5 мг/мл в смеси 50 % ацетонитрила и 2,5 % трифторуксусной кислоты в качестве матрицы. Раствор матрицы совместно с образцом перекристаллизовывался и высушивался при комнатной температуре на поверхности металлической мишени. Мишень вводили в масс-спектрометр и проводили анализ.

Для получения спектров пептидов использовали масс-спектрометр MALDI-TOF Autoflex speed (Bruker Daltonik GmbH). Прибор был откалиброван с использованием коммерческой смеси белков (Bruker Daltonics). Спектры записывали в линейном режиме положительных ионов при соотношении м/з (масса/заряд) от 2000 до 20000 дальтон.

Полученные спектры импортировали в программу MALDI Biotyper . Программа сравнивала полученный спектр со спектрами 4400 микроорганизмов, записанных в базе данных прибора, и подсчитывала показатель «сходства» (score value) между ними. На основе этих данных оценивалось сходство (принадлежность одному и тому же виду и роду) исследуемого организма с организмами,

представленными в базе данных. Результат выводился в сравнении с 10 наиболее близкими по составу белков (пептидов) микроорганизмами.

В программе использованы следующие уровни показателя «сходства»: при показателе равном 3 сравниваемые микроорганизмы были идентичными; при показателе равном или выше 2 – сравниваемые микроорганизмы были одного рода и вида; при значениях показателя ниже 2 и выше 1,7 – сравниваемые микроорганизмы были одного рода; при показателе ниже 1,7 – принадлежность сравниваемых микроорганизмов одному роду и виду была малодостоверна (Koubeck et al., 2012).

2.4. Определение антибиотической активности

Метод агаровых блоков. Поверхность питательного агара, пригодного для развития испытуемого организма и образования им антибиотического вещества, засеивается сплошным «газоном» антагониста. После того, как этот организм хорошо разовьется и образует антибиотическое вещество, которое диффундирует в толщу агара, стерильным пробочным сверлом вырезают агаровые блоки и переносят их на поверхность другой агаровой пластинки в чашке Петри, предварительно засеянной тест-организмом. Для проведения этого эксперимента использовались следующие штаммы фитопатогенных бактерий: *Rathayibacter tritici* Ас – 1603 Тур., *Pseudomonas syringae* ВКМ – 1546, *Clavibacter michiganensis* Ас – 1146.

После 18-20 часов инкубации в термостате с температурой, благоприятной для развития тест-организмов, вокруг агаровых блоков образуются зоны отсутствия или задержки роста тест-организмов. По диаметру зон судят об антибиотической активности изучаемого организма (Егоров, 1957).

2.5. Определение бактериолитической активности

Бактериолитическое действие бактериальных штаммов определяли по их способности лизировать автоклавированные клетки *Staphylococcus aureus* 209P в концентрации 1 мг/мл в 50 мМ Трис-НСl, рН 7,5-8,0, вплавленные в 1 % агарозный гель. Исследуемые штаммы наносили штрихом и инкубировали при 29 °С до появления зон лизиса (Васильева, 2010).

Общую бактериолитическую активность определяли турбидиметрическим методом. Для этого в 0,6 мл суспензии автоклавированных клеток *S. aureus* 209P в 10 мМ Трис-НСl, рН 7,5-8,0, с $A_{540} = 0,5$ о.е. (оптические единицы) вносили 10-25 мкл ферментного препарата (0,11-0,28 мкг фермента Л5) и инкубировали при 37 °С в течение 5-20 мин. Реакцию останавливали помещением пробирок в лед и измеряли поглощение суспензии при длине волны 540 нм. За единицу бактериолитической активности (ЛЕ) принимали такое количество фермента, которое приводило к уменьшению поглощения клеточной суспензии на 0,01 о.е. при 37 °С за 1 мин (Васильева, 2010).

Определение бактериолитической активности производили по формуле (1):

$$ЛЕ = \frac{(E_k - E_0) \times K \times V_{\text{реакц. смеси}}}{t \times V \times 0,01} \quad (1)$$

где, E_k – поглощение в контроле; E_0 – поглощение в опыте; K – коэффициент разведения; t – время реакции; $V_{\text{реакц. смеси}}$ – объем реакционной смеси; V – объем ферментного препарата.

2.6. Идентификация антибиотически активных соединений

Качественный анализ феназиновых антибиотиков проводили с использованием метода ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии). Для экстрагирования феназинов бактериальные культуры выращивали в течение 72 ч при 24 °С в 10 мл триптозно-соевого бульона или среды КБ. После осаждения клеток (5 мин, 8000 об/мин) супернатант подкисляли с помощью HCl до pH 2 и экстрагировали равным объемом хлороформа. После центрифугирования отбирали хлороформенную фракцию и выпаривали.

При ВЭЖХ в качестве подвижной фазы использовали систему метилен хлорид: этилацетат (9:1). Анализ образцов проводили на жидкостном хроматографе, оборудованном УФ-детектором с переменной длиной волны и интегратором (LKB-Priog A, Швеция). Была использована хроматографическая колонка 150 мм × 4,6 мм, заполненная носителем Супелко LC-18DB. Размер частиц 5 мкм (Supelco, США). Рабочая длина волны 210 нм. Температура анализа 25 °С. Расход подвижной фазы 0,8 мл/мин. Элюирование проводили линейным градиентом, применяя систему метанол-99%, уксусная кислота-1% в течение 5 минут. Анализ проводили в изократическом режиме (Анохина, 2011).

Глава 3. Результаты исследований

3.1. Характеристика бактериальных сообществ филлосферы овощных культур

В зависимости от стадии развития растения и климатических условий численность бактерий овощных культур изменялась в пределах 10^6 - 10^9 КОЕ/г. Динамика численности бактериальных сообществ в процессе онтогенеза растения представлена на примере картофеля (Табл. 3). Наивысшие показатели численности наблюдались в период бутонизации, минимальные – на стадии всходов.

Таблица 3. Динамика численности бактерий на картофеле в процессе вегетации (КОЕ/г).

Органы растения	Всходы	Стадия бутонизации	Стадия цветения	Уборка картофеля
Листья	$4,2 \times 10^4$	$2,7 \times 10^9$	$5,8 \times 10^7$	$4,2 \times 10^9$
Стебли	$4,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^8$	$1,5 \times 10^6$	$3,8 \times 10^8$
Цветы	-	-	$5,3 \times 10^8$	-
Корни	-	$5,0 \times 10^9$	$5,2 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$
Клубни	-	$3,0 \times 10^8$	-	-

Перейдём к анализу таксономической структуры бактериальных сообществ на разных овощных культурах. Через месяц после высева культур в агроценозах наблюдали одинаковую таксономическую структуру бактериальных комплексов в филлосфере, ризосфере исследуемых растений и в почве. Так на листьях и корнях лука, а так же в почве в качестве доминанта выделились бактерии рода *Aquaspirillum* – типичные гидробионты, свидетельствующие о высокой влажности почв в момент

отбора образцов. На корнях лука и в почве около 20 % (субдоминант) составили типично почвенные бактерии рода *Arthrobacter*, в качестве минорных компонентов были выявлены миксобактерии и бациллы. Доля миксобактерий была несколько выше на листьях лука (Рис. 1).

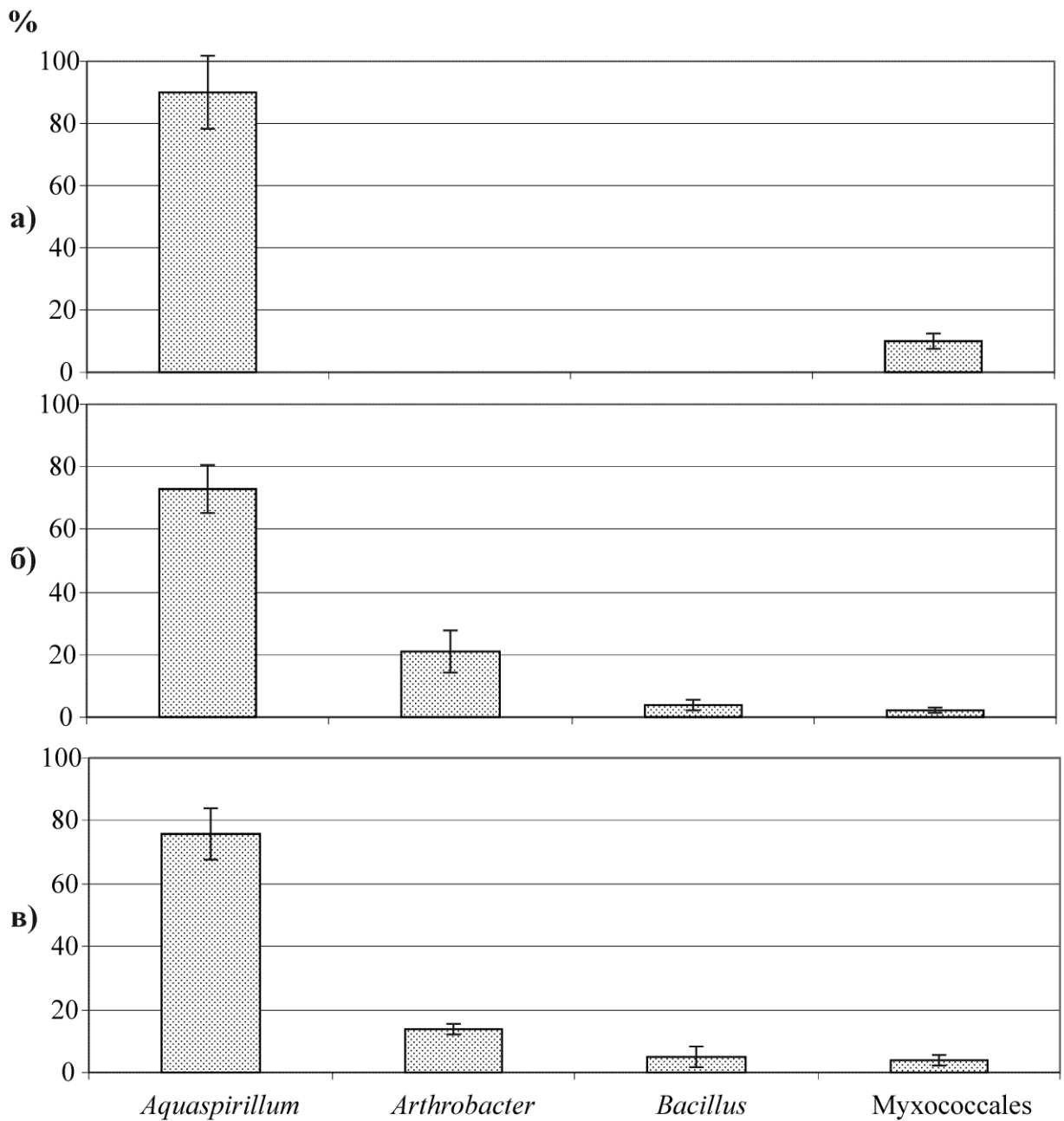


Рисунок 1. Таксономическая структура бактериальных сообществ лука.

а - листья, б - корни, в - почва (июнь).

Анализ бактериальных сообществ в посевах моркови выявил иное соотношение таксонов (Рис. 2). В качестве доминанта во всех ярусах были обнаружены бактерии рода *Arthrobacter*. Следует также отметить выявление на листьях моркови, кроме артобактера, других родов актинобактерий: *Rhodococcus* и *Streptomyces*. Влаголюбивые спираиллы были выделены в качестве субдоминантов на листьях и, как минорные компоненты - на корнеплодах моркови. Таким образом, доминирование артобактера и присутствие других родов актинобактерий свидетельствует о значительно меньшей влажности почвы под морковью, по сравнению с почвой под луком, во время отбора образцов.

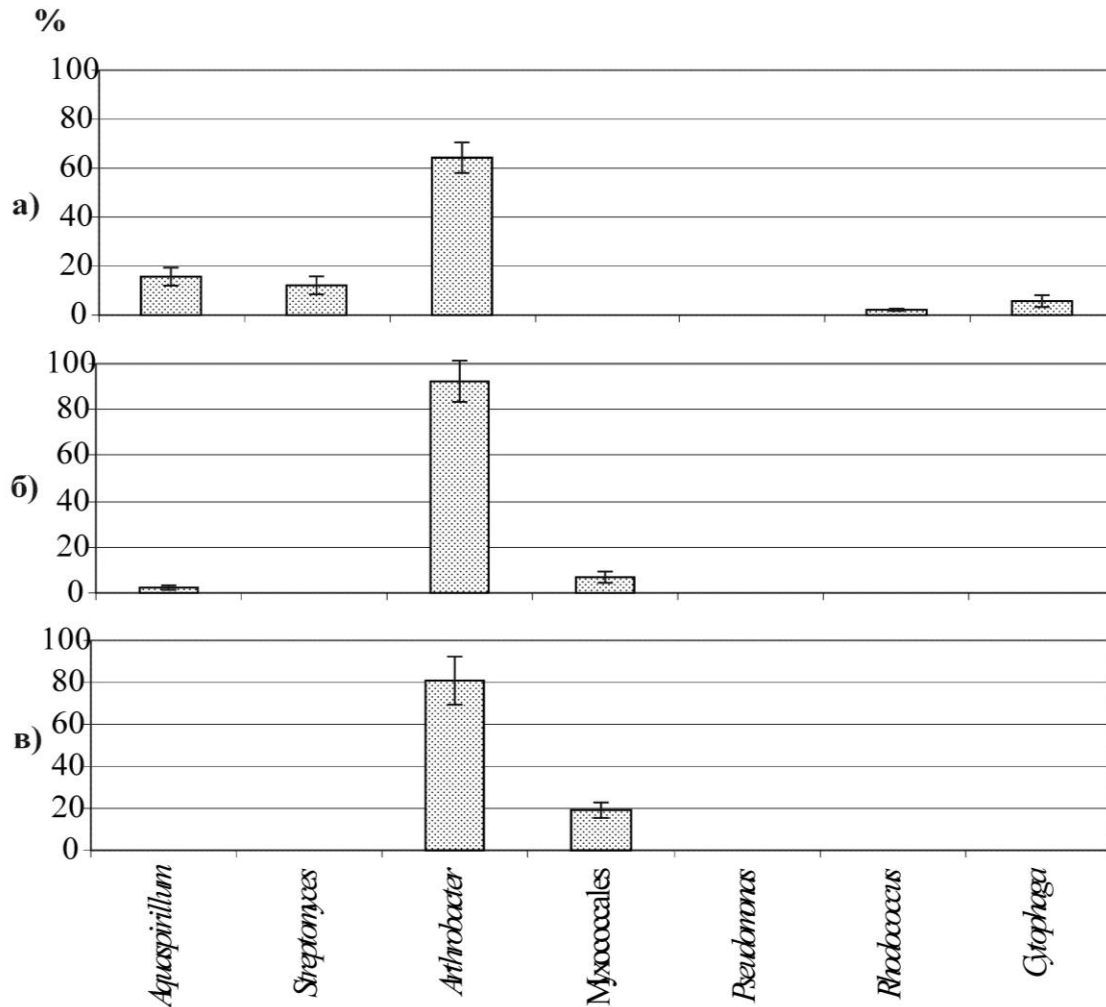


Рисунок 2. Таксономическая структура бактериальных сообществ моркови.

а - листья, б - корни, в - почва (июнь).

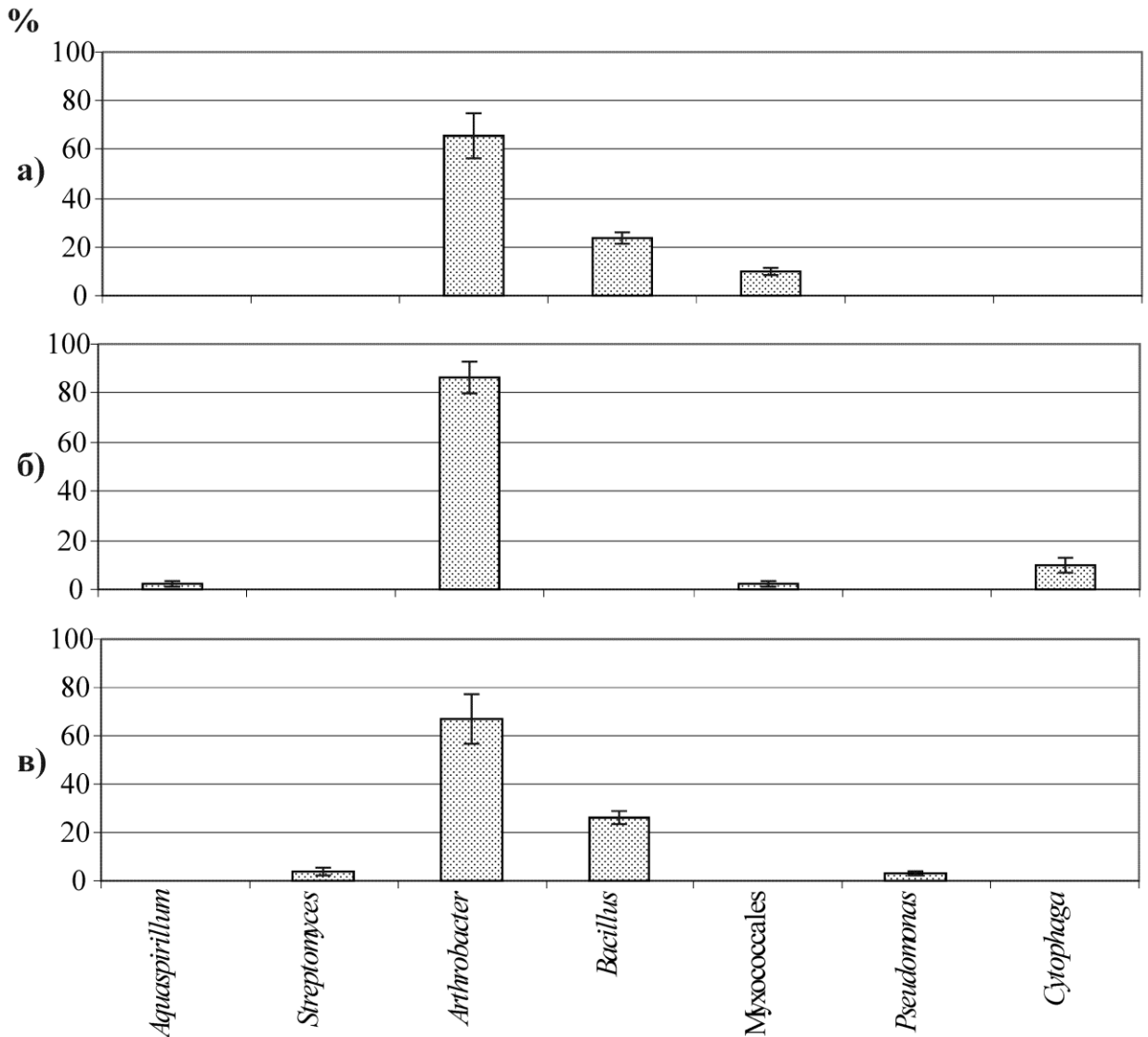


Рисунок 3. Таксономическая структура бактериальных сообществ картофеля (Каширский район).

а - листья, б - корни, в - почва (июнь)

На картофельном поле Каширского района Московской области таксономическая структура исследуемого бактериального комплекса во всех ярусах была очень близка к таковой под посевами моркови (Рис. 3). Так же доминировал род артробактер, а в качестве субдоминанта на листьях картофеля и в почве были обнаружены бациллы – устойчивые к высушиванию, как и актинобактерии. Спириллы выделялись только на корнях как минорные компоненты.

Таким образом, анализ таксономической структуры бактериальных сообществ в агроценозах с посевами лука, моркови и картофеля позволил выявить как общие закономерности, так и некоторые различия. Для всех исследованных овощных культур выявлена монодоминантная структура бактериальных комплексов и отсутствие различий в составе доминантов между филлосферой, ризосферой и почвой. Однако эти выводы касаются начальных этапов в онтогенезе растений (1 месяц после высева). Следует также отметить, что различия в соотношении таксонов бактерий исследованных овощных культур связаны, вероятно, с разной влажностью почвы под этими культурами в те сроки, когда отбирались образцы.

Наиболее чёткие различия в структуре бактериальных сообществ картофеля проявляются во всех ярусах, когда происходят последовательные изменения в онтогенезе растений – цветение, образование клубней (Рис. 4). На цветках картофеля доминировали подвижные протеобактерии родов *Aquaspirillum* и *Pseudomonas*. В качестве минорных компонентов были выделены представители родов *Erwinia* и *Arthrobacter*. На листьях картофеля в период цветения появляются и доминируют факультативно-анаэробные бактерии рода *Erwinia*. Они представлены типичным для овощных культур видом *Erwinia herbicola* (*Pantoea agglomerans*). Группу минорных компонентов составили актинобактерии родов *Arthrobacter*, *Curtobacterium*, *Micrococcus* (Рис. 4 б). На корнях и клубнях картофеля в качестве монодоминантов были выявлены типичные для ризосферы целлюлозоразрушающие бактерии – цитофаги. В ризосфере картофеля были обнаружены также артробактер и азотобактер (по 10 %). Нахождение спирилл на корнях (25 %) свидетельствует о проникновении этих водных форм бактерий с влагой в подземные органы растения. На клубнях картофеля всё сообщество было представлено исключительно целлюлолитическими бактериями – цитофагами и миксобактериями (Рис. 4 в, г).

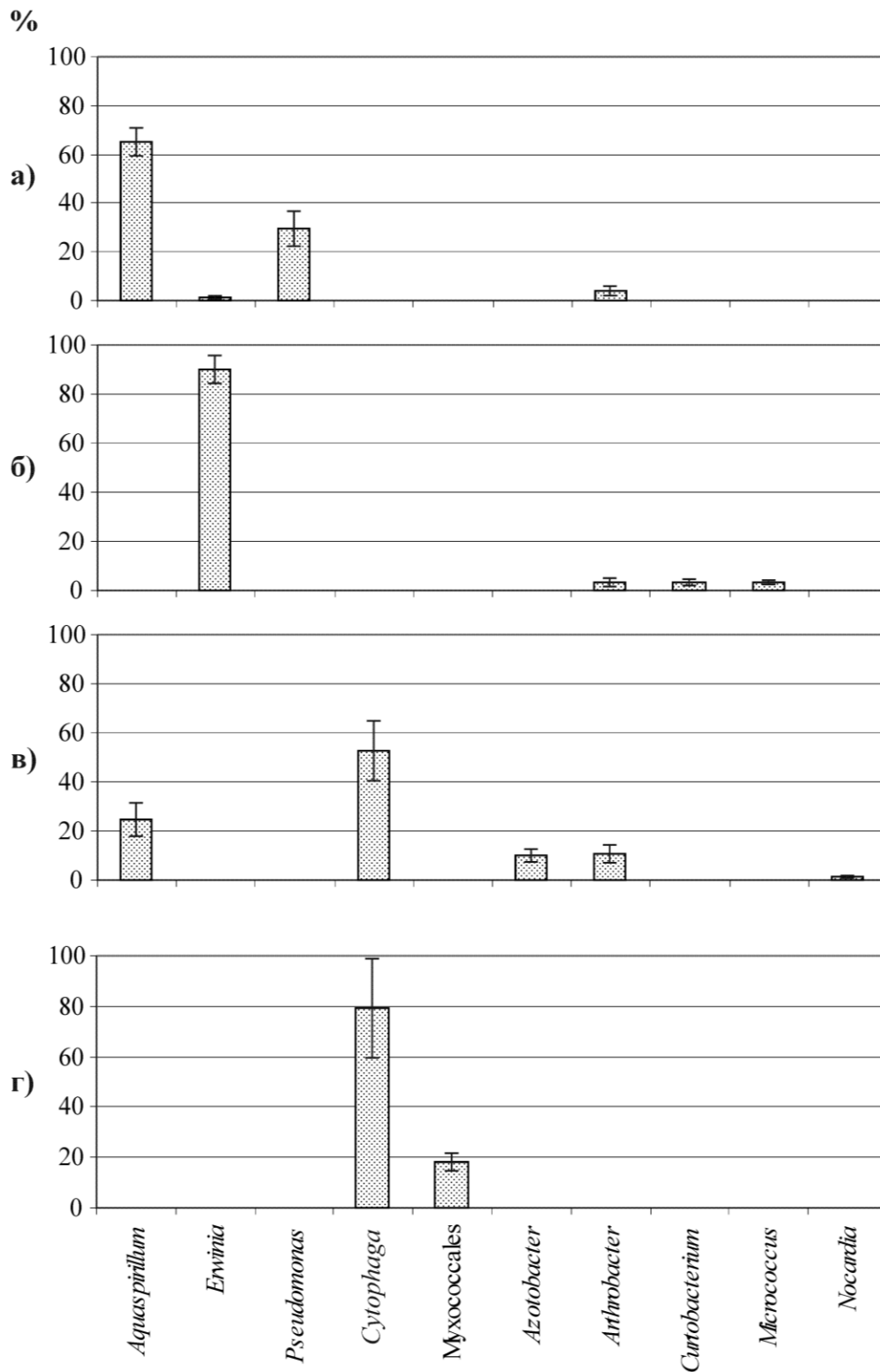


Рисунок 4. Таксономическая структура бактериальных сообществ картофеля в процессе онтогенеза.

а - цветки, б - листья, в - корни, г - клубни.

3.2. Анализ бактериальных сообществ овощных культур и почв при нарушении режимов землепользования

В Каширском районе был нарушен режим землепользования: овощи запахивались в почву. Поэтому нами были проведены исследования по определению реакции микробных сообществ почв на подобные мероприятия. Для того чтобы определить состав бактериальных сообществ на территориях, используемых с нарушениями, необходимо было определить состав бактериальных сообществ корнеплодов, попадающих в почву. Это было сделано на корнеплодах моркови.

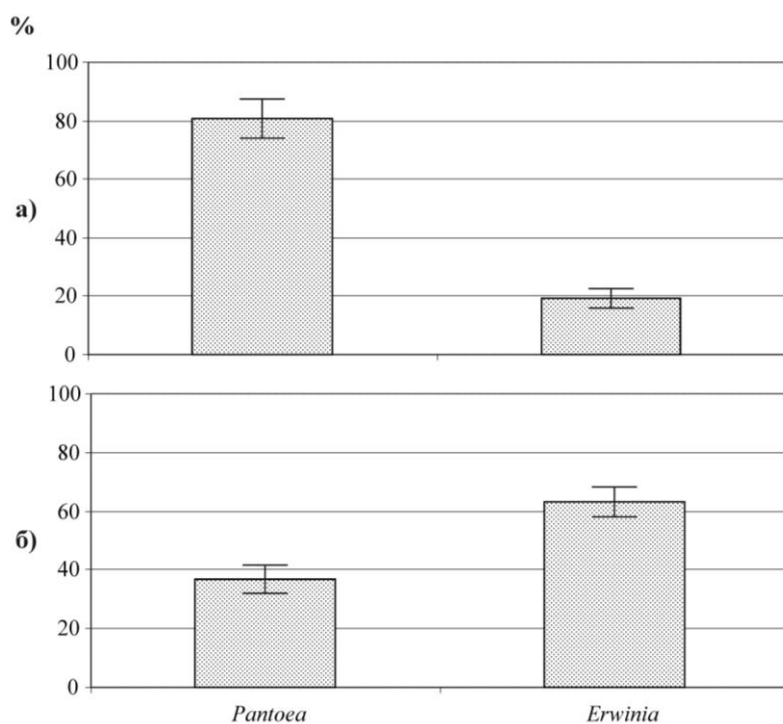


Рисунок 5. Таксономическая структура бактериальных сообществ моркови.

а) здоровой, б) гнилой.

На плодах моркови спектр доминантов отличается от флоры этих растений. Доминировали факультативно - анаэробные бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. На корнеплодах здоровой моркови доминировали бактерии рода

Pantoea (ранее определяемая как *Erwinia*). На корнеплодах гнилой моркови доминировали представители рода *Erwinia*, вызывающие мягкую гниль овощей (Рис. 5).

При запашке моркови в почву, представители энтеробактерий были обнаружены и в почве. Кроме того, 60 % от всех бактериальных таксонов составили псевдомонады, среди которых также много фитопатогенных форм. Однако через год после запахивания и получения нового урожая эрвинии и псевдомонады выделялись только как минорные компоненты. Появились целлюлозоразрушающие бактерии, представленные миксобактериями, цитофагами, которые, по-видимому, принимают участие в деструкции запаханных овощей (Рис. 6).

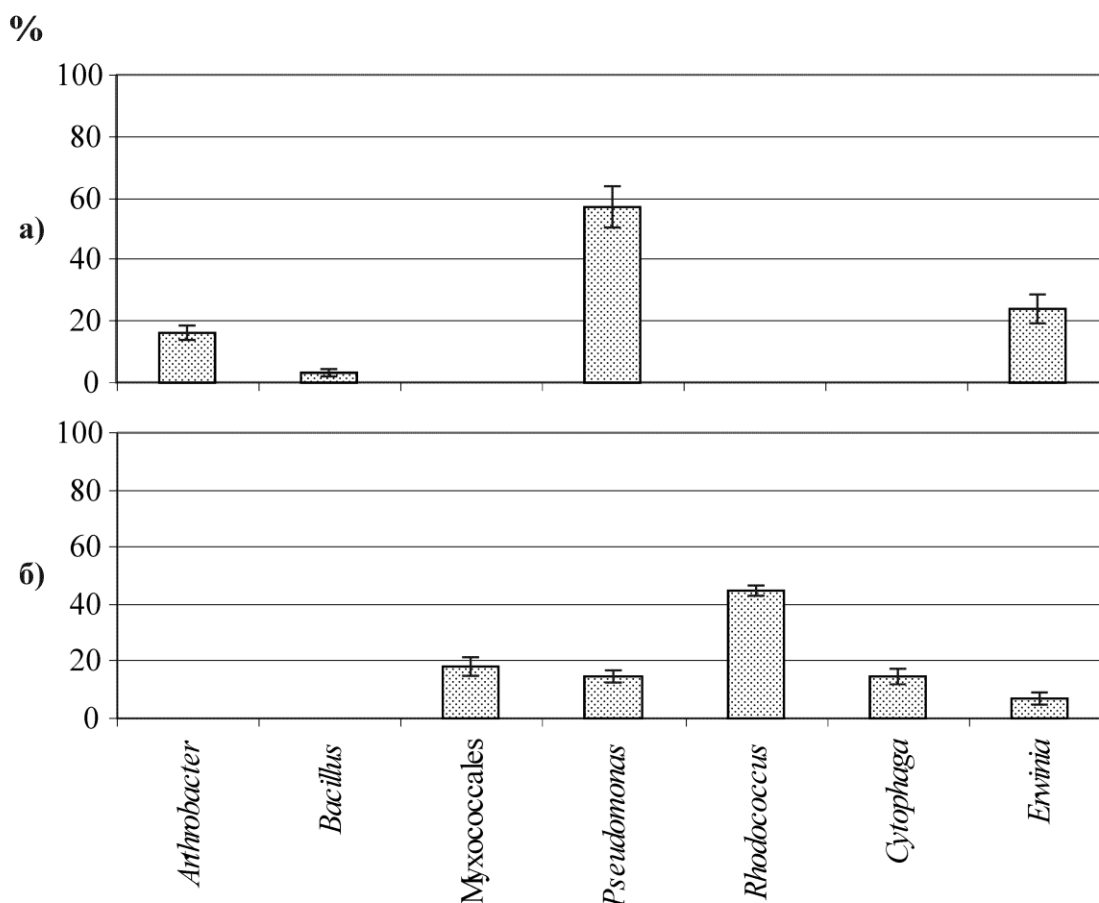


Рисунок 6. Изменение структуры бактериальных сообществ в почве под морковью.

а) сразу после запашки, б) через год после запашки.

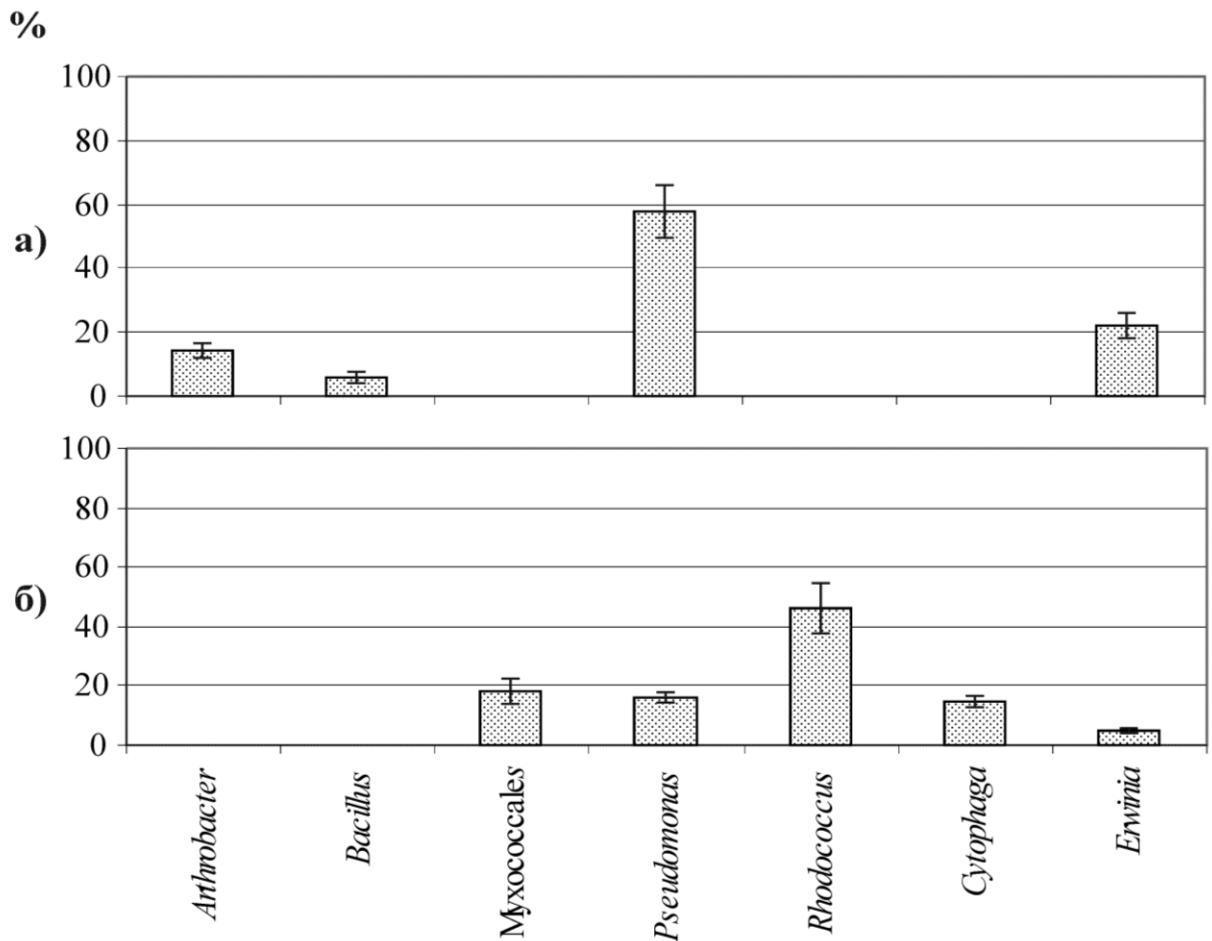


Рисунок 7. Изменение структуры бактериальных сообществ в почве под капустой.

а) сразу после заправки, б) через год после заправки.

3.3. Структура бактериальных сообществ зерновых культур.

Численность бактериальных сообществ пшеницы в процессе вегетации колебалась от 10^6 до 10^9 и была максимальной на листьях в период образования колосьев, на корнях – на всходах растений. В почве плотность бактериальных популяций была самой низкой и практически не изменялась (табл. 4).

Таблица 4. Динамика численности бактерий на пшенице в процессе вегетации (КОЕ/г).

Органы растения, почва	Всходы	Образование колосьев
Листья	$1,6 \times 10^7$	$1,4 \times 10^9$
Зерна	-	$0,8 \times 10^7$
Корни	$2,5 \times 10^8$	$1,4 \times 10^7$
Почва	$1,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$

Таксономическая структура бактериальных сообществ на молодых растениях пшеницы была монодоминантной, как и на овощных культурах (Рис. 8). В филлосфере, ризосфере и почве доминировали бактерии рода *Pseudomonas*. На листьях пшеницы, кроме псевдомонад были обнаружены родококки. На корнях пшеницы в качестве второго доминанта были выявлены миксобактерии, субдоминанта – бациллы, т.е. бактерии гидролитического блока. В почве под пшеничным полем в структуре бактериальных сообществ преобладали бактерии рода *Pseudomonas*, в качестве минорных компонентов были обнаружены представители тех таксонов бактерий, которые были выделены из филлосферы и ризосферы пшеницы.

На листьях пшеницы в июне в качестве монодоминанта выделялись типичные эпифиты – псевдомонады. В роли субдоминанта были обнаружены родококки. (Рис. 9 а). В сентябре при старении листьев появлялись целлюлозоразрушающие бактерии – представители порядка Мухососсаles, псевдомонады оставались в качестве второго доминанта. Были выявлены также характерные для филлосферы различных растений метиловобактерии (Рис. 9 б).

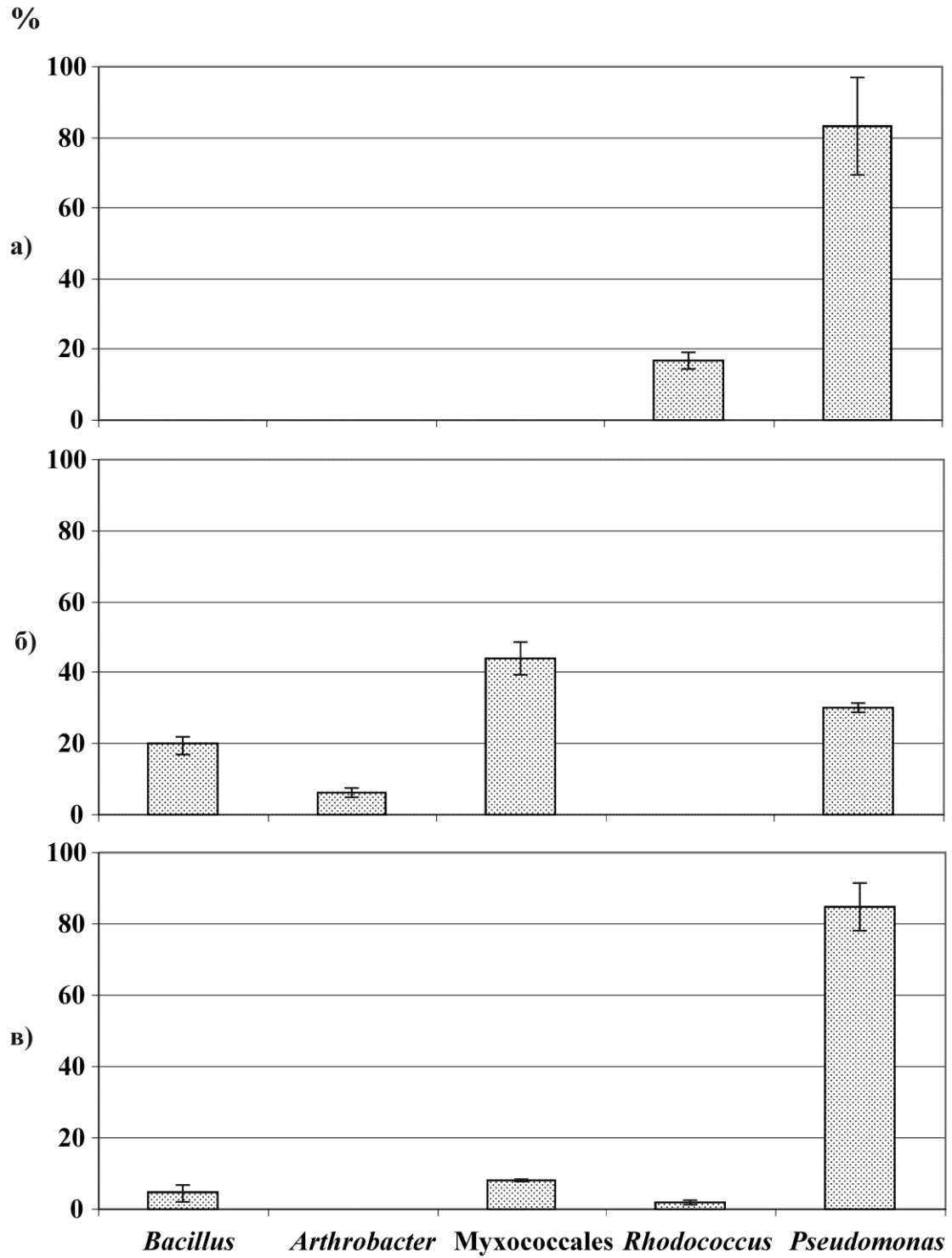


Рисунок 8. Структура бактериальных сообществ пшеницы.

а) листья, б) корни, в) почва.

Аналогичная таксономическая структура бактериальных комплексов была выявлена и в колосьях – на зёрнах пшеницы (Рис. 9 в). Отличие заключалось лишь в увеличении доли миксобактерий в колосьях по сравнению с листьями.

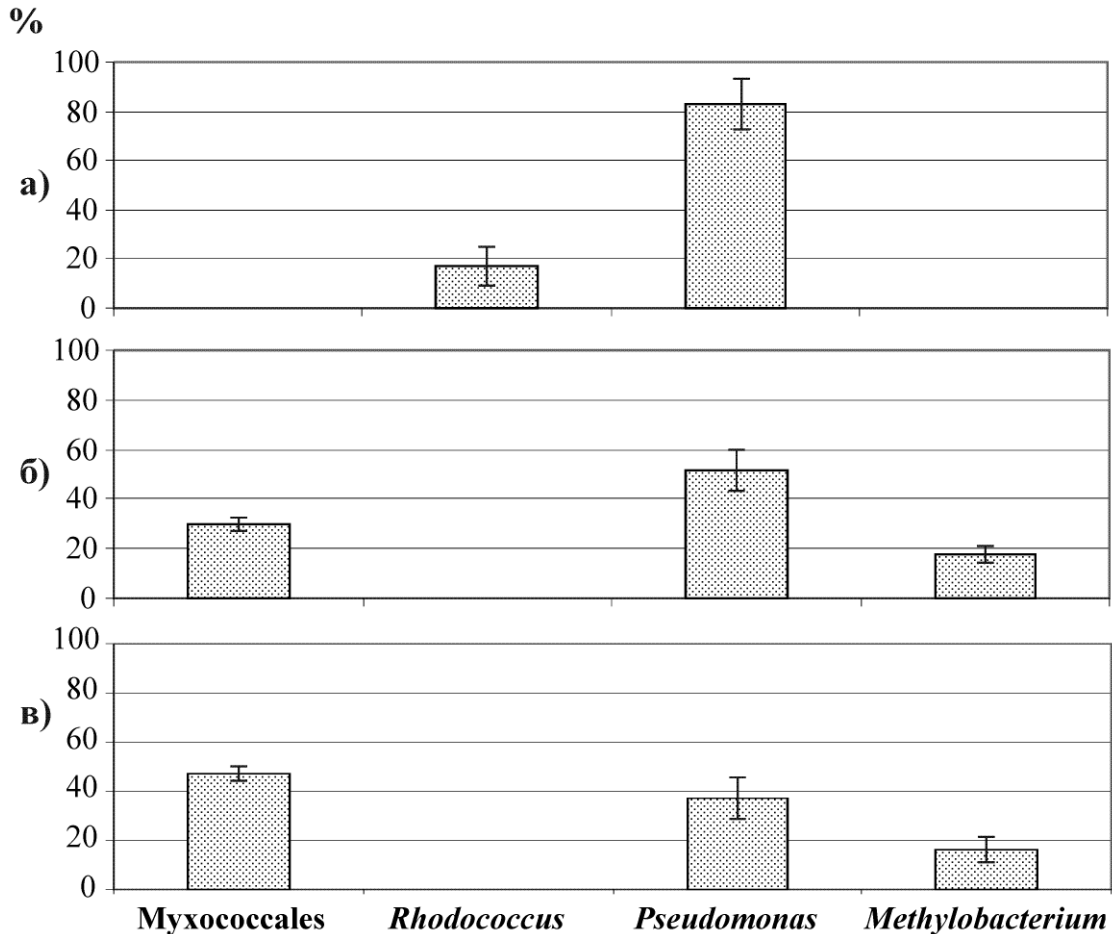


Рисунок 9. Таксономическая структура бактериальных сообществ пшеницы в процессе онтогенеза.

а) листья (июнь), б) листья (сентябрь), в) зерна в колосе (сентябрь).

Численность бактериальных сообществ ячменя в процессе вегетации колебалась от 10^6 до 10^9 КОЕ/г. Максимальный показатель численности был отмечен на стадии всходов на листьях, однако, в период образования колосьев показатели численности были более стабильны в вертикально-ярусном ряду и составляли 10^7 - 10^8 КОЕ/г (табл. 5).

Таблица 5. Динамика численности бактерий на ячмене в процессе вегетации (КОЕ/г).

Органы растения, почва	Всходы	Образование колосьев
Листья	$1,4 \times 10^9$	$0,9 \times 10^8$
Зерна	-	$1,1 \times 10^7$
Корни	$1,1 \times 10^6$	$0,9 \times 10^7$
Почва	$1,6 \times 10^6$	$0,6 \times 10^7$

Анализ таксономической структуры бактериальных сообществ ячменя в фазе 3-4 листа показал, что в филлосфере и ризосфере доминировали типично почвенные бактерии – бациллы и артробактер, в почве – миксобактерии. На листьях были обнаружены так же представители рода *Pseudomonas*, на корнях – *Rhodococcus*, в почве – *Bacillus* (Рис. 10). Эти бактерии составляли около 20 %, т.е. были субдоминантами в исследуемом сообществе.

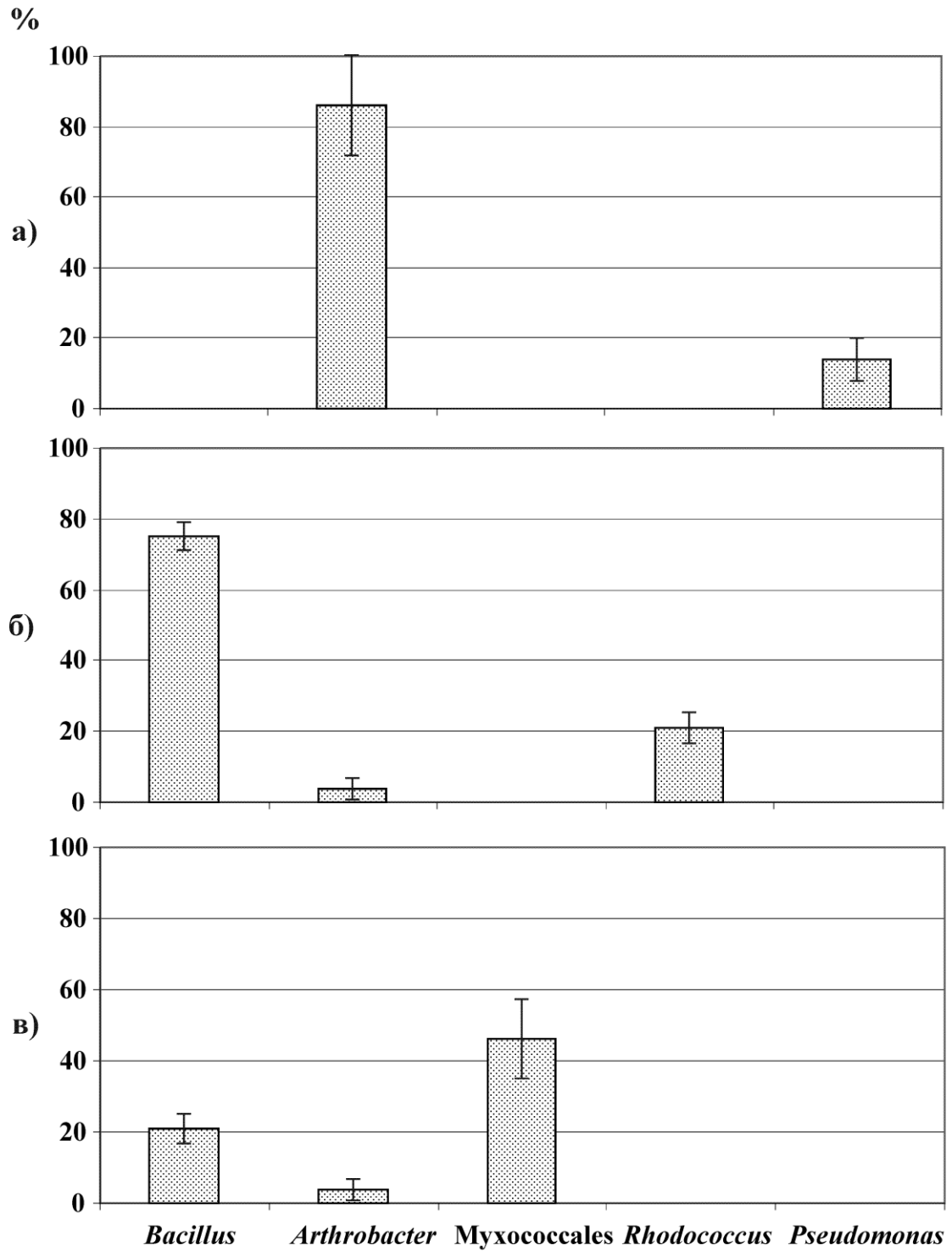


Рисунок 10. Структура бактериальных сообществ ячменя.

а) листья, б) корни, в) почва.

В таксономической структуре бактериальных сообществ ячменя в процессе онтогенеза наблюдались те же изменения, что характерны для пшеницы.

На листьях ячменя в июне в качестве монодоминанта выделялись бактерии рода *Arthrobacter*, также были обнаружены представители рода *Pseudomonas* (около 10 %) (Рис. 11 а). В сентябре на стареющих листьях доминировать стали бактерии гидролитического комплекса – бациллы. В качестве второго доминанта сохранились актинобактерии (*Arthrobacter*) (Рис. 11 б). При созревании колосьев, в зернах, как ячменя, так и пшеницы, доминировали целлюлозоразрушающие миксобактерии, в качестве субдоминантов выделялись типичные для филлосферы метилобактерии (Рис. 11 в, Рис. 12).

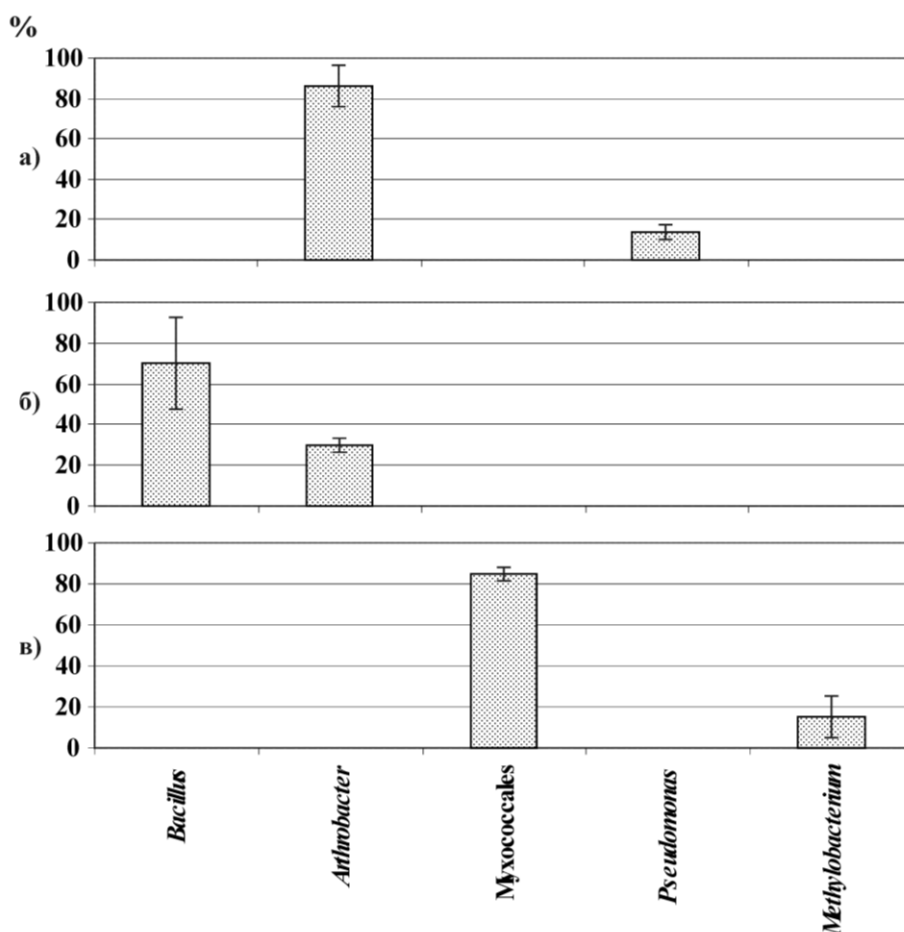


Рисунок 11. Таксономическая структура бактериальных сообществ ячменя в процессе онтогенеза.

а) листья (июнь), б) листья (сентябрь), в) зерна в колосе (сентябрь)

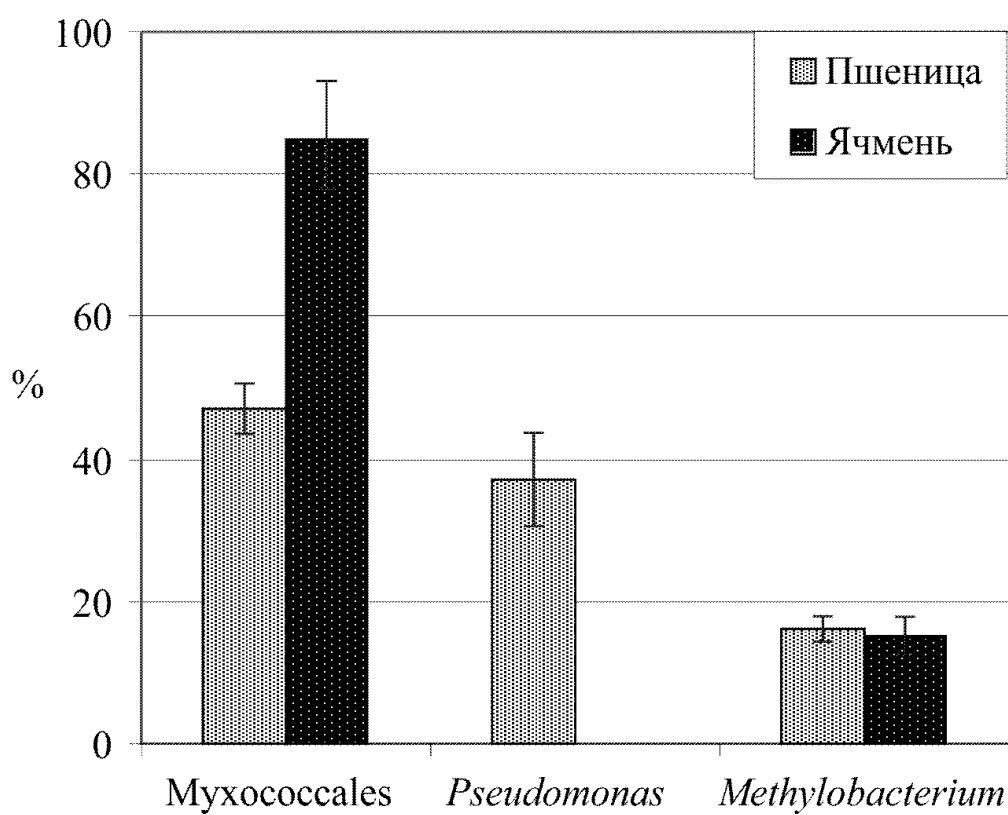


Рисунок 12. Таксономическая структура бактериальных сообществ колосьев зерновых.

Анализ перечня всех таксонов бактерий, которые были обнаружены нами при изучении таксономического состава бактериальных комплексов овощных и зерновых культур позволил нам подсчитать частоту встречаемости и частоту доминирования разных родов бактерий в изученных эконисах. Из 14 выявленных нами таксонов бактерий первое место по частоте встречаемости (50 %) заняли артробактер и миксобактерии, второе место – псевдомонады, акваспириллы и бациллы (30-40 %). Следующую группу бактерий в порядке убывания составляют: эрвинии, родококки и цитофаги (20 %), азоспириллы и метилобактерии (около 10 %), стрептомицеты, куртобактерии, нокардии (<10 %) (Рис. 13).

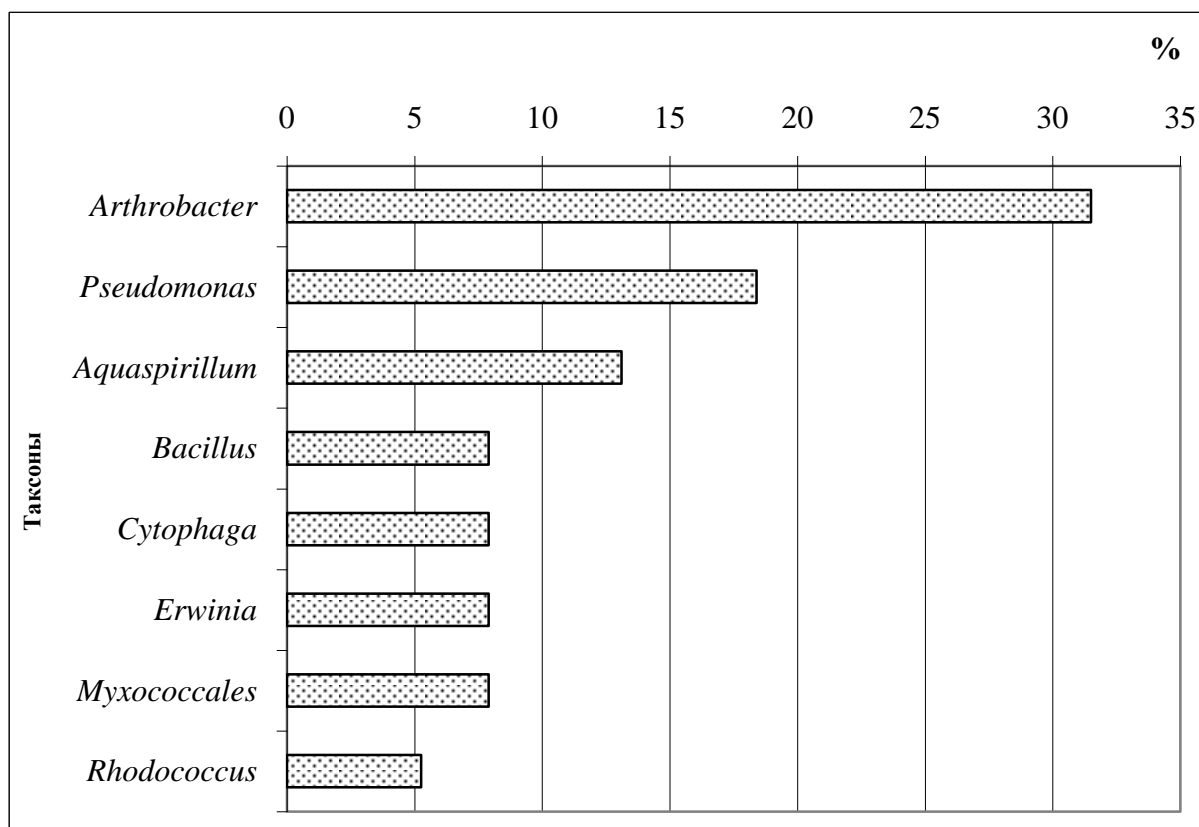


Рисунок 13. Частота встречаемости бактериальных таксонов исследуемых агроценозов.

По частоте доминирования максимальную долю составили представители тех же родов, что перечислены на 1-2 местах в списке таксонов по встречаемости. Это бактерии родов *Arthrobacter* (>30 %), *Pseudomonas* (около 20 %), *Aquaspirillum* (15 %). Далее в порядке убывания следуют таксоны *Bacillus*, *Erwinia*, *Myxococcales* (5-10 %), затем – *Cytophaga* и *Rhodococcus* (<5 %) (Рис. 14). Следует отметить, что факультативно-анаэробные бактерии рода *Ewinia* были обнаружены нами только на овощных культурах, где в качестве доминантов они выявлялись большей частью на корнеплодах. Представители всех других перечисленных выше родов бактерий встречались как на овощных, так и на зерновых культурах.

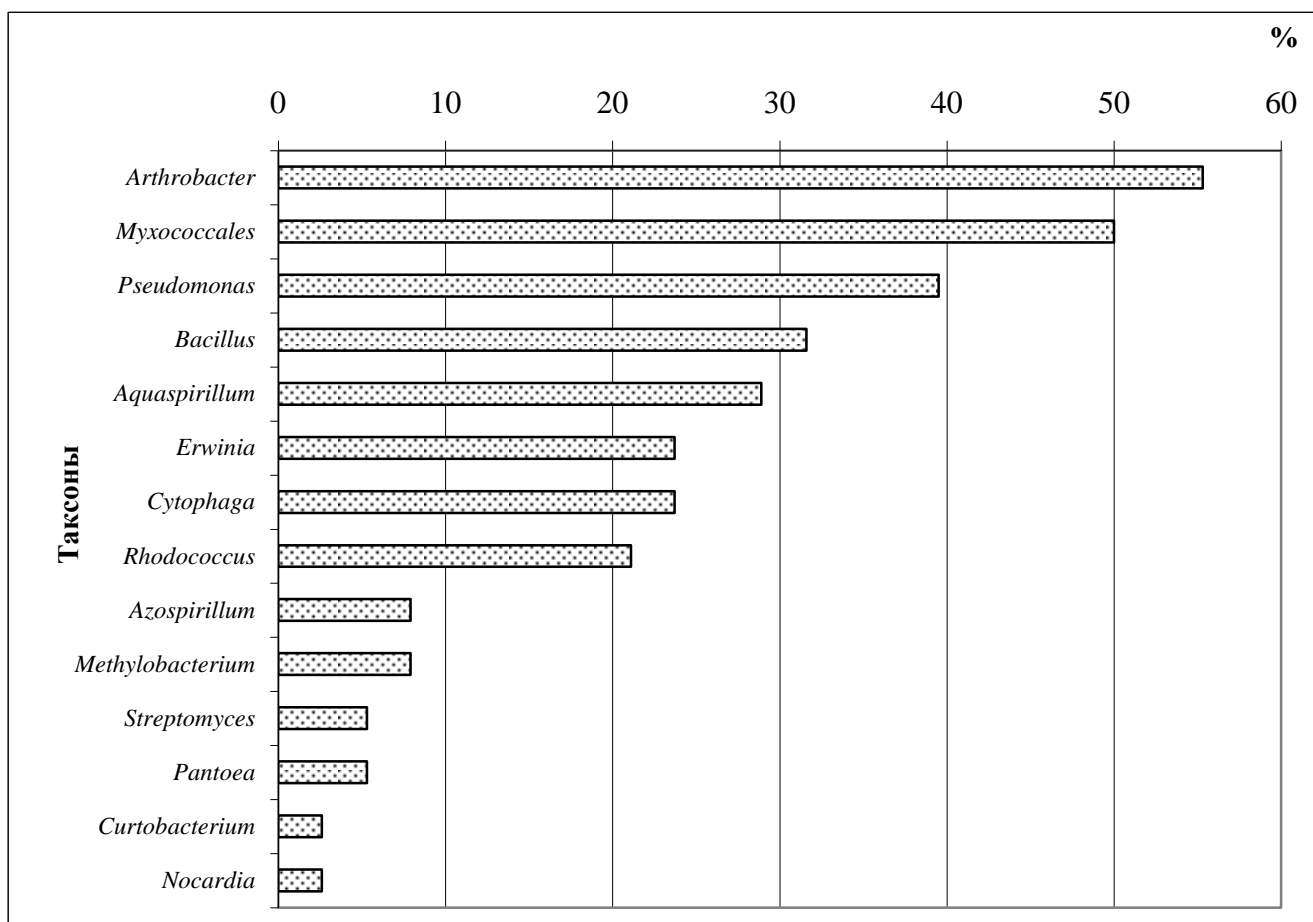


Рисунок 14. Частота доминирования бактериальных таксонов исследуемых агроценозов.

Таким образом, доминирующее положение в бактериальных комплексах исследуемых агроценозов занимают как типично почвенные бактерии – артробактер и бациллы, так и типичные эккрисотрофы – псевдомонады. Представители рода *Aquaspirillum* часто обнаруживаются как на растениях, так и в почве при высокой влажности (Добровольская, 2002).

В настоящее время грамотрицательные подвижные палочки по фенотипическим признакам весьма условно можно отнести к роду *Pseudomonas*, так как описано значительное количество новых родов, близких к псевдомонадам и отличающихся от них по составу липидов, либо молекулярно-биологическим признакам. Использование метода сиквенирования 16s РНК позволило уточнить

принадлежность протеобактерий, которые трудно определяются фенотипическими методами, к роду *Pseudomonas* (Рис. 15, 16). Что касается рода *Aquaspirillum*, то бактерии, отнесенные нами к этому роду на основании фенотипических признаков, были идентифицированы как представители рода *Pseudomonas*.

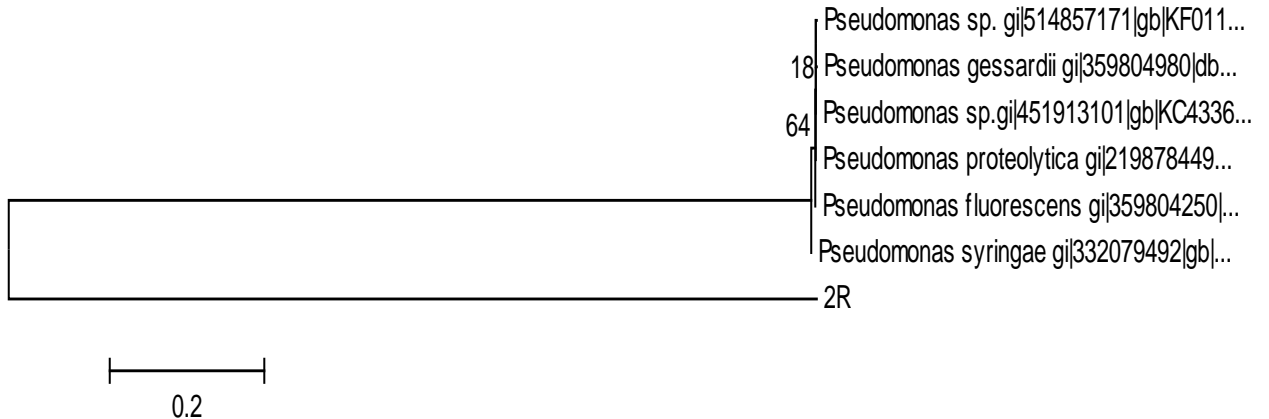


Рисунок 15. Филогенетическое положение доминирующего штамма бактерии в прокариотном комплексе филлосферы ячменя.

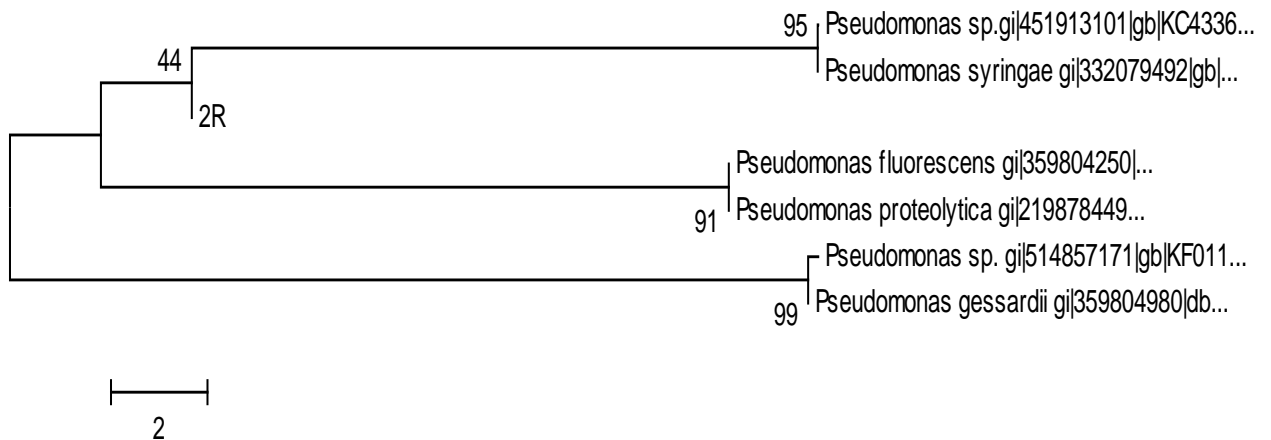


Рисунок 16. Филогенетическое положение доминирующего штамма бактерии в прокариотном комплексе дерново-подзолистой почвы.

Поскольку родовой состав доминирующих в исследуемых агроценозах бактерий оказался довольно банальным, т.е. о наличии бактерий этих родов

сообщали и другие авторы (Sun et al., 2004; Иутинская и др., 1993), мы решили провести идентификацию доминантов на видовом уровне. В таблице 6 дан список видов бактерий, определённых на основании использования метода MALDI-TOF MS. В результате бактерии рода *Arthrobacter* представлены 2 видами, *Bacillus* – 3 видами. Максимальное количество видов (4) было выявлено среди бактерий рода *Pseudomonas*. 2 Штамма, отнесённые нами к роду *Pseudomonas* по фенотипическим признакам, на основании метода MALDI были определены как *Sphingobacterium faecium* и *Stenotrophomonas rhizophila*.

3.4. Антибиотическая активность бактерий

В результате проведенной работы нами была собрана коллекция микроорганизмов (56 штаммов), в которую, кроме выше названных видов, вошли представители других таксонов. Все бактерии из этой коллекции были проверены на антагонизм по отношению к 3 видам фитопатогенных бактерий с помощью метода агаровых блоков. В результате было показано, что 25 % культур из этой коллекции обладают антагонистической активностью. Штаммы, проявившие антагонистические свойства, были определены до вида с помощью метода MALDI-TOF MS (табл. 6).

Таблица 6. Результаты видовой идентификации бактерий с помощью метода MALDI-TOF MS

№ штамма	Вид бактерий	Показатель «сходства»
1	<i>Arthrobacter castelli</i>	1,45
2	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	1,96
3	<i>Bacillus atrophaeus</i>	1,51
4	<i>Bacillus muralis</i>	1,82
5	<i>Bacillus simplex</i>	1,99
6	<i>Bacillus simplex</i>	1,95
7	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	1,90
8	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	2,39
9	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	2,03
10	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2,30
11	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	2,16
12	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	1,94
13	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	2,15
14	<i>Sphingobacterium faecium</i>	1,62
15	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	1,83
16	<i>Variovorax paradoxus</i>	2,12

Из анализа данных, представленных в таблице 7, следует, что бактерио-антагонисты обнаружены среди разных таксонов как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Зоны ингибирования роста составляли от 1 до 7 мм. Максимальные зоны ингибирования были обнаружены вокруг блоков культур разных видов *Pseudomonas*. Только один вид этого рода – *Pseudomonas frederiksbergensis* – подавлял рост всех трёх видов фитопатогенных бактерий.

Таблица 7. Антагонистическая активность бактерий разных видов по отношению к фитопатогенам.

№ штамма	Бактерии-антагонисты	Фитопатогенные бактерии		
		<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Rathayibacter tritici</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>
1	<i>Arthrobacter castelli</i>	1	0	0
2	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	3	0	0
3	<i>Bacillus atrophaeus</i>	1	2	0
4	<i>Bacillus muralis</i>	3	0	0
5	<i>Bacillus simplex</i>	0	1	1
7	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	1	0	0
8	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	3	0	2
9	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	2	0	4
10	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	0	2	2
11	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	2	4	3
12	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	0	3	7
13	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	0	3	2
14	<i>Sphingobacterium faecium</i>	3	0	0
15	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	3	0	3
16	<i>Variovorax paradoxus</i>	3	0	2

Для штаммов, проявивших наибольшую активность (6 штаммов), было решено подтвердить их родовую и видовую принадлежность на основании последовательности 16S рРНК. На филогенетическом древе, где показана принадлежность исследуемого нами штамма к роду *Pseudomonas* (Рис. 16) указаны 3 вида, которые наиболее близки к этому штамму. Среди них вид *Pseudomonas*

frederiksbergensis – это тот вид, который был определён методом MALDI-TOF MS и который оказался наиболее активным антагонистом среди других видов *Pseudomonas*. На рисунках (17, 18) видно, что другие исследуемые нами штаммы бактерий ближе всего расположены на филогенетическом древе к видам *Variovorax paradoxus* и *Curtobacterium flaccumfaciens*. Именно под такими видовыми названиями приводятся в табл. 7 штаммы бактерий-антагонистов. В этой таблице все названные виды определены на основании метода MALDI-TOF MS. Таким образом, анализ филогенетических древ, представленных на рисунках (16, 17 и 18), позволяет сделать вывод об идентичности родов и видов, определённых по методу MALDI-TOF MS и методу ПЦР.

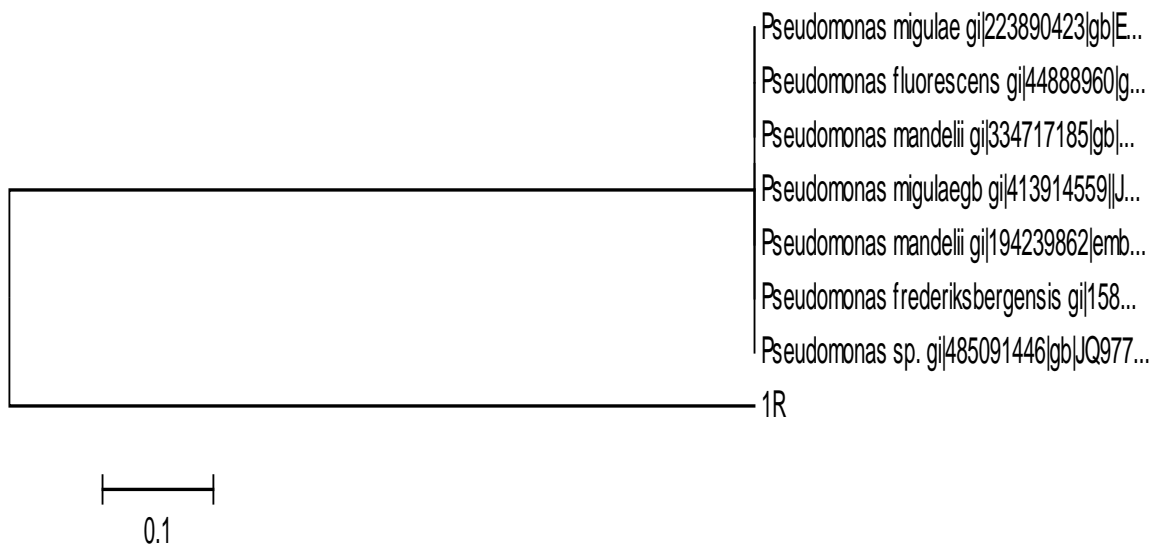


Рисунок 16. Филогенетическое положение доминирующего штамма бактерии в прокариотном комплексе дерново-подзолистой почвы.

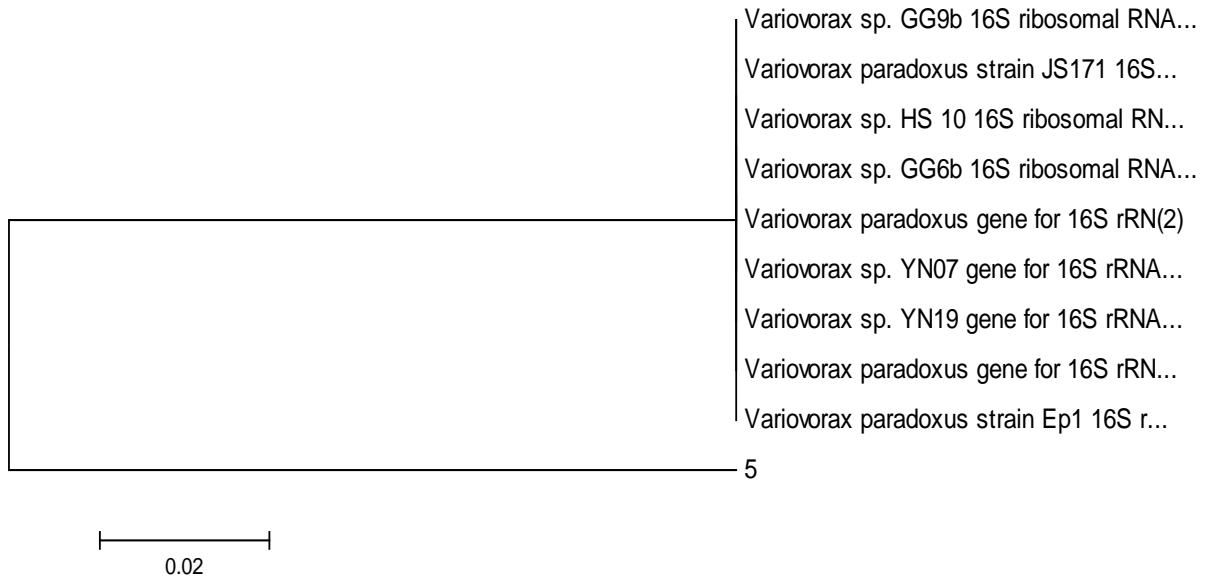


Рисунок 17. Филогенетическое положение доминирующего штамма бактерии в прокариотном комплексе ризосферы пшеницы.

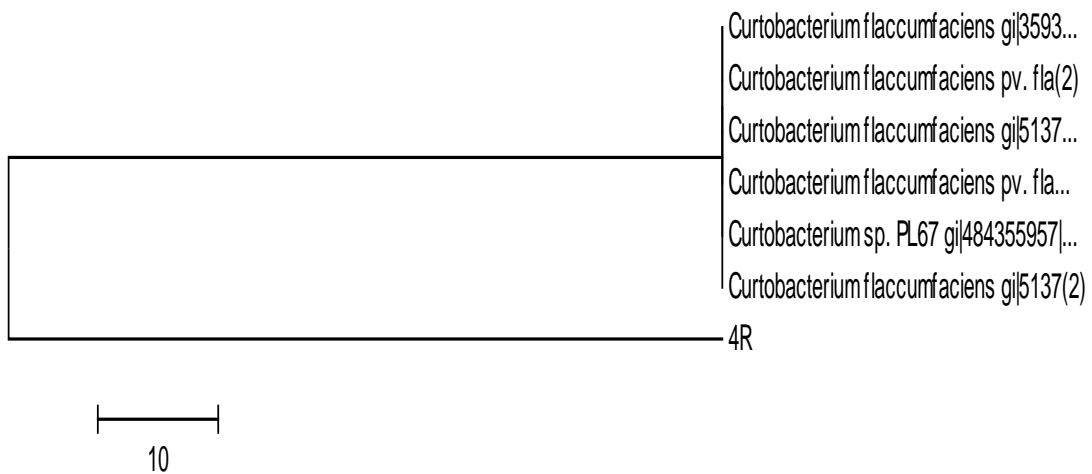


Рисунок 18. Филогенетическое положение доминирующего штамма бактерии в прокариотном комплексе филлосферы ячменя.

3.5. Природа антибиотической активности.

Для определения антибиотической активности исследуемых нами культур, направленной на ингибирование роста фитопатогенных бактерий, был использован метод ВЭЖХ. В результате было установлено, что антибиотическая активность культур обусловлена образованием ими антибиотиков феназиновой природы. Выделение антибиотиков этого типа оказалось свойственным как грамположительным, так и грамотрицательным бактериям, представленных разными таксонами (табл. 8). В большинстве случаев для приведённых в табл. видов бактерий характерно образование как феназина, так и феназин-1-карбоновой кислоты. Представители видов *Pseudomonas frederiksbergensis* и *Pseudomonas brassicacearum* выделяли только феназин-1-карбоновую кислоту.

Таблица 8. Наличие антибиотиков феназиновой природы у исследуемых штаммов бактерий.

№ штамма	Вид бактерии	Антибиотические вещества	
		Феназин	Феназин-1-карбоновая кислота
1	<i>Arthrobacter castelli</i>	+	+
3	<i>Bacillus atrophaeus</i>	+	+
4	<i>Bacillus muralis</i>	+	+
5	<i>Bacillus simplex</i>	+	+
7	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	+	+
9	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	-	+
11	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	-	+
12	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	+	+
14	<i>Sphingobacterium faecium</i>	+	+
16	<i>Variovorax paradoxus</i>	+	+

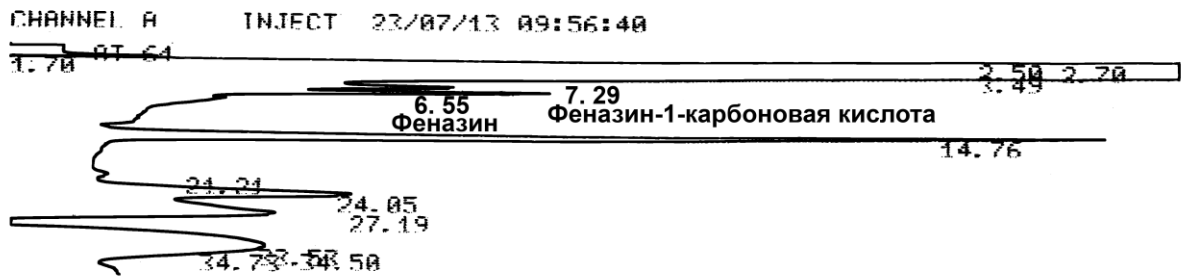


Рисунок 19. Хроматограмма экстракта культуральной жидкости штамма №1 *Arthrobacter castelli*.

Пик со временем удерживания 6,55 мин. идентифицирован как феназин, пик со временем удерживания 7,29 мин. - как феназин-1-карбоновая кислота.

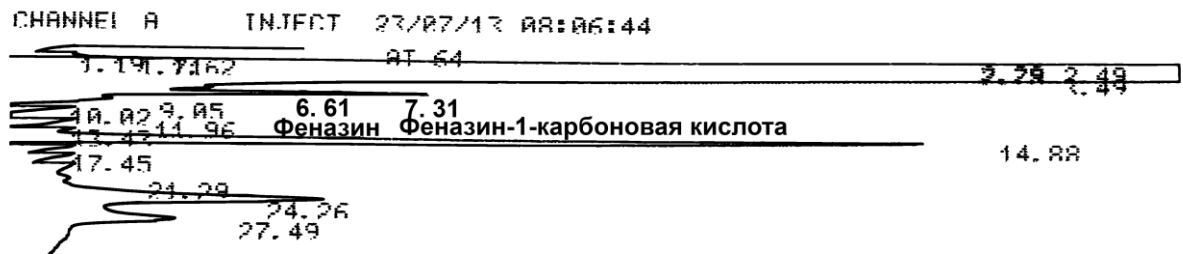


Рисунок 20. Хроматограмма экстракта культуральной жидкости штамма №3 *Bacillus atrophaeus*.

Пик со временем удерживания 6,61 мин. идентифицирован как феназин, пик со временем удерживания 7,31 мин – как феназин-1-карбоновая кислота.

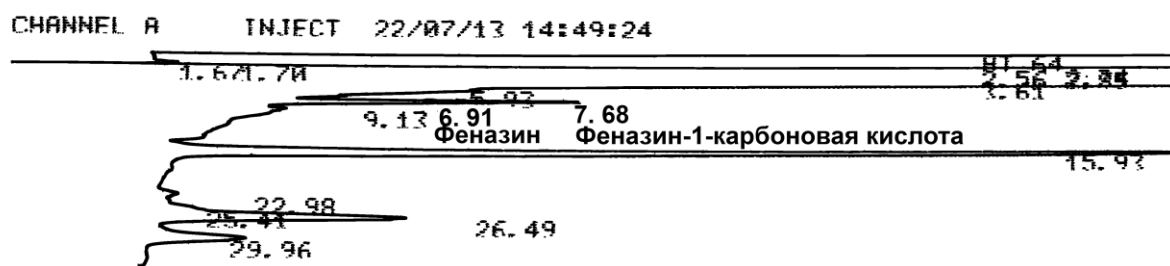


Рисунок 21. Хроматограмма экстракта культуральной жидкости штамма №4 *Bacillus muralis*.

Пик со временем удерживания 6,91 мин. идентифицирован как феназин, пик, со временем удерживания 7,68 мин. - как феназин-1-карбоновая кислота.

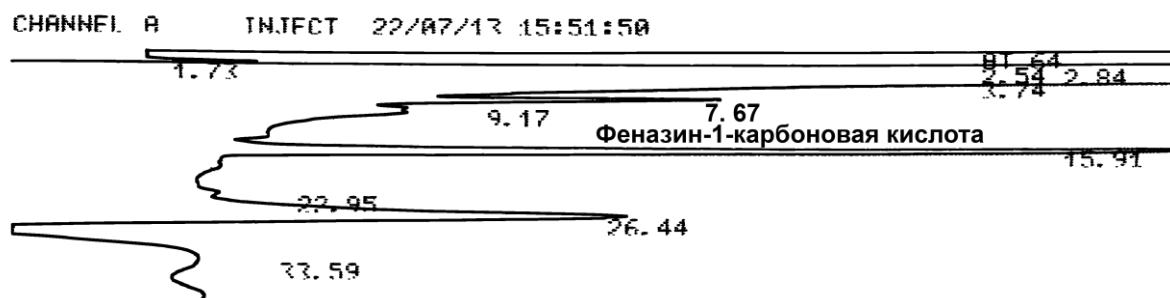


Рисунок 22. Хроматограмма экстракта культуральной жидкости штамма №5 *Bacillus simplex*.

Пик со временем удерживания 7,67 мин. идентифицирован как феназин-1-карбоновая кислота.

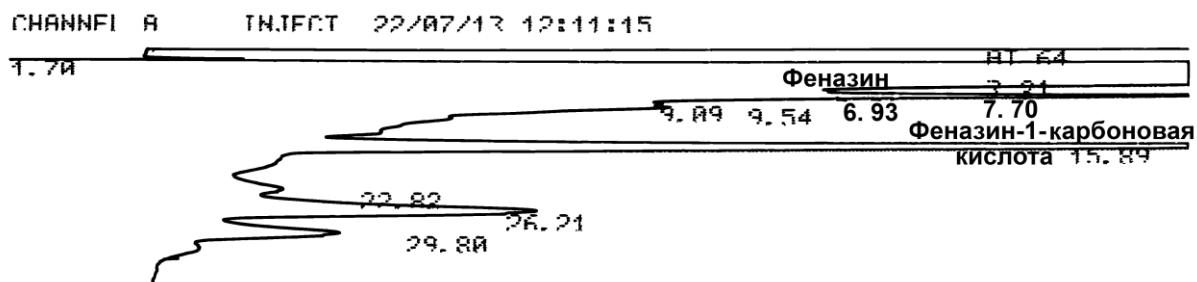


Рисунок 23. Хроматограмма экстракта культуральной жидкости штамма №7 *Curtobacterium flaccumfaciens*.

Пик со временем удерживания 6,93 мин. идентифицирован как феназин, пик, со временем удерживания 7,70 мин. – как феназин-1-карбоновая кислота.

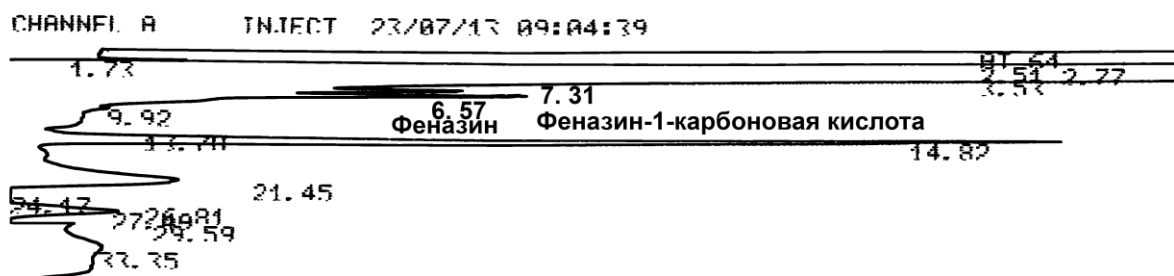


Рисунок 24. Хроматограмма экстракта культуральной жидкости штамма №9 *Pseudomonas brassicacearum*.

Пик со временем удерживания 6,57 мин. идентифицирован как феназин, пик, со временем удерживания 7,31 мин. – как феназин-1-карбоновая кислота.

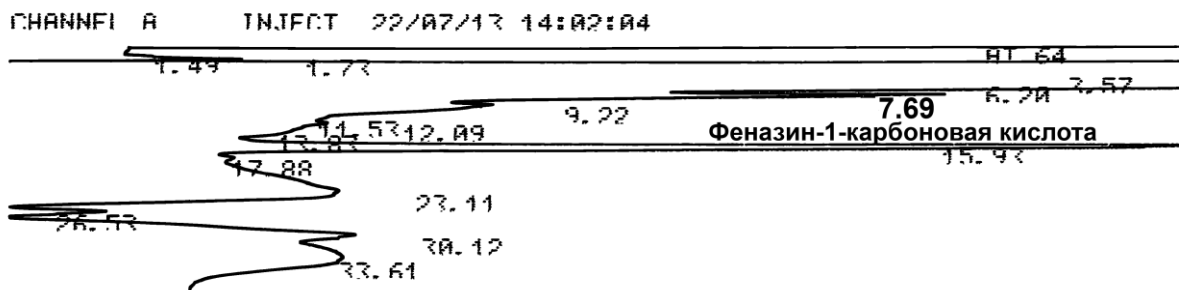


Рисунок 25. Хроматограмма экстракта культуральной жидкости штамма №11 *Pseudomonas frederiksbergensis*.

Пик со временем удерживания 7,69 мин. идентифицирован как феназин-1-карбоновая кислота. Условия анализа см. в разделе объекты и методы.

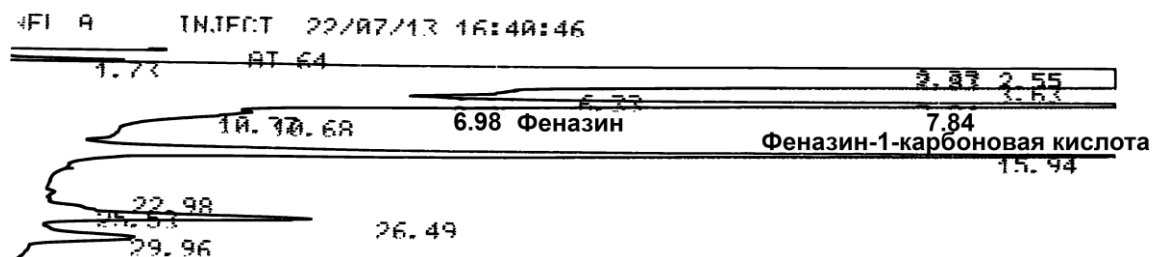


Рисунок 26. . Хроматограмма экстракта культуральной жидкости штамма №12 *Pseudomonas kilonensis*.

Пик со временем удерживания 6,98 мин. идентифицирован как феназин, пик, со временем удерживания 7,84 мин. – как феназин-1-карбоновая кислота.

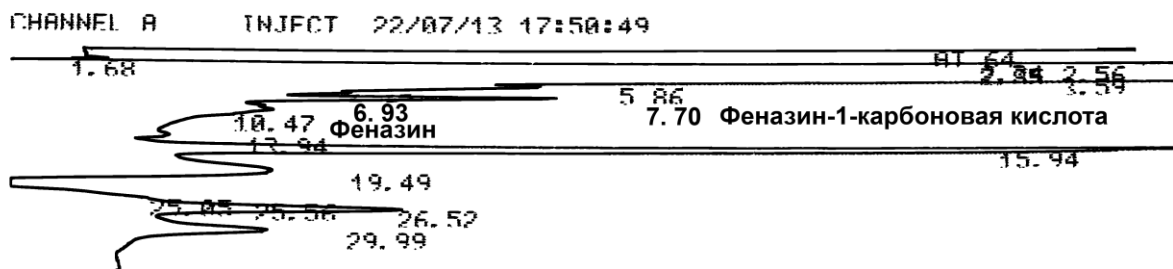


Рисунок 27 Хроматограмма экстракта культуральной жидкости штамма №14 *Spingobacterium faecium*.

Пик со временем удерживания 6,93 мин. идентифицирован как феназин, пик, со временем удерживания 7,7 мин. – как феназин-1-карбоновая кислота.

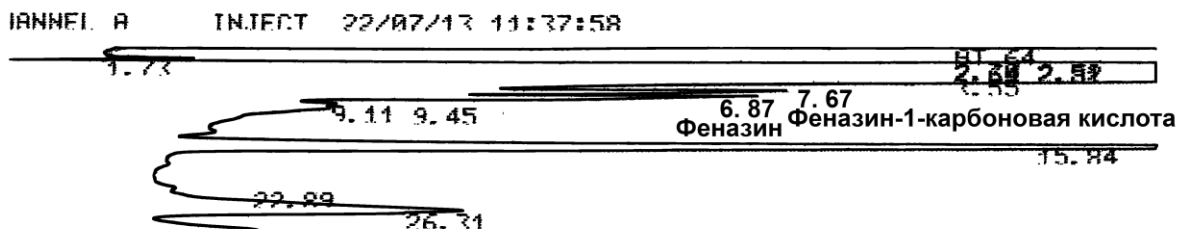


Рисунок 28. Хроматограмма экстракта культуральной жидкости штамма №16 *Variovorax paradoxus*.

Пик со временем удерживания 6,87 мин. идентифицирован как феназин, пик, со временем удерживания 7,67 мин. – как феназин-1-карбоновая кислота.

3.6. Бактериолитическая активность бактерий

Бактериолитическая активность исследуемых штаммов была определена по их возможности лизировать автоклавированные клетки *S. aureus* 209P. Из 16 проверяемых штаммов, 5 проявили литическую активность. (Рис. 29)

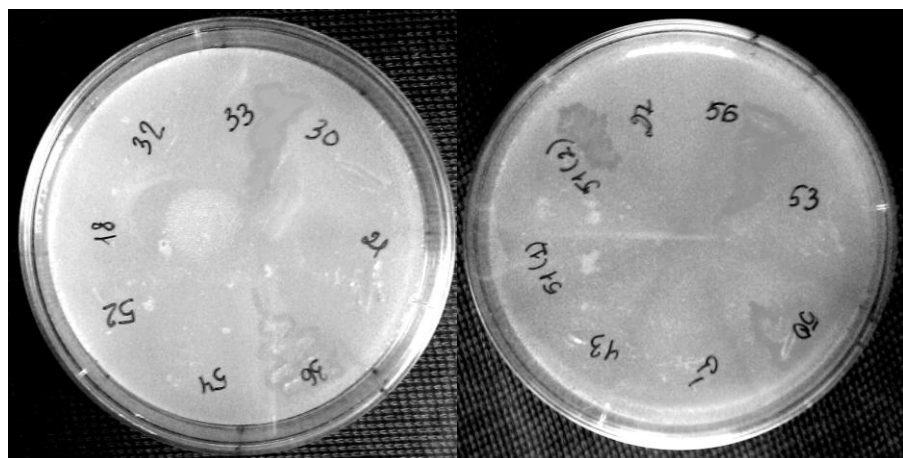


Рисунок 29. Бактериолитическая активность штаммов по отношению к автоклавированным клеткам *S. aureus* 209P

Таблица 9. Общая литическая активность бактерий по отношению к штамму *Staphylococcus aureus*.

№ штамма	Вид бактерии	Литическая активность, ЛЕ/мл
2	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	19,2
3	<i>Bacillus atrophaeus</i>	8,7
9	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	5,3
15	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	2,7
5	<i>Bacillus simplex</i>	0,6

Литическая активность культур была максимальной у *Arthrobacter chlorophenolicus* и составляла 19,2 ЛЕ/мл, и минимальной у *Bacillus simplex* – 0,6 ЛЕ/мл (табл. 9).

Заключение

В результате изучения численности бактерий эпифитно-сапротрофного блока бактерий в агроценозах с посевами овощных и зерновых культур было установлено, что численность бактерий колебалась в пределах 10^4 - 10^{11} КОЕ/г на овощных и 10^6 - 10^9 КОЕ/г на зерновых культурах. Максимум значений наблюдался на стадии бутонизации у овощных культур и на стадии колошения у зерновых. Самые высокие показатели плотности бактериальных популяций – 10^{11} КОЕ/г – были зафиксированы только однажды – на листьях и корнях картофеля в период, когда 2 фактора явились определяющими – очень жаркое лето и обильный полив культур на опытных полях.

Для всех исследованных овощных и зерновых культур выявлена монодоминантная структура исследуемых бактериальных комплексов, характерная для молодых культур (через месяц после высева). При этом практически не наблюдалось различий в составе доминантов между филлосферой, ризосферой и почвой. Следует также отметить, что различия в составе бактериальных доминантов между разными культурами определялись разной влажностью почвы под этими культурами в те сроки, когда отбирались образцы, а не видом растения. Установлено, что в процессе онтогенеза растений изменяется структура бактериальных сообществ во всех ярусах, связанная с формированием других органов - цветы, колосья, корнеплоды. При этом в колосьях и корнеплодах увеличивается доля целлюлозоразрушающих бактерий. Для овощных культур характерно так же увеличение доли и выход в доминанты факультативно-анаэробных бактерий рода *Erwinia* на цветах и клубнях картофеля, корнеплодах моркови. Доминирование

эрвиний на плодах овощных культур подтверждается литературными данными (Шильникова и др., 2007). Анализ частоты доминирования бактерий разных таксонов на разных субстратах в исследуемых агроценозах позволил выявить преобладание как на растениях, так и в почве, бактерий, представленных как протеобактериями (*Pseudomonas*, *Aquaspirillum*) так и грамположительными бактериями (*Arthrobacter* и *Bacillus*). При этом артробактер и бациллы попадают на поверхность растений из почвы, псевдомонады – типичные эккрисотрофы, спириллы – характерные гидробинты, попадающие с водой на растения и в почву. Эти факты подтверждаются данными и других авторов (Заикина, 2008, Иванова 2007).

Использование молекулярно-биологических методов позволило уточнить принадлежность протеобактерий, которые трудно определяются фенотипическими методами, к родам *Pseudomonas*. Что касается рода *Aquaspirillum*, то бактерии, отнесенные нами к этому роду на основании фенотипических признаков, были идентифицированы как представители рода *Pseudomonas* на основании метода ПЦР. На основании метода MALDI-TOF MS была проведена не только родовая, но и видовая идентификация культур из собранной нами коллекции. В результате было выявлено 17 видов бактерий. Проверка представителей этих видов на антагонизм по отношению к 3 видам фитопатогенных бактерий позволила выявить антагонистические свойства у 25-30 % из проверенных штаммов. Наиболее активными оказались представители рода *Pseudomonas*. Установлена природа антибиотиков – это феназин и феназин-1 карбоновая кислота. Кроме антибиотической активности у культур, обладающих антибиотической активностью была обнаружена и литическая активность. Из этого факта следует, что доминирующие на овощных и зерновых культурах бактерии-антагонисты способны защищать растения от фитопатогенов. Одним из интересных результатов, полученных нами, представляется также подтверждение санитарной роли почвы в результате нарушения землепользования и заправки овощей в почву. Установлено,

что через год после запашки, попавшие в почву фитопатогенные бактерии рода *Erwinia* практически не выделялись.

Выводы

1. Установлено, что для бактериальных сообществ фазы 3-4 листа овощных и зерновых культур характерно низкое разнообразие и монодоминантная структура. Состав бактерий однотипен в разных ярусах, практически не зависит от вида растения, но изменяется и усложняется в процессе онтогенеза.

2. Доминирующие в эпифитных бактериальных сообществах исследуемых агроценозов бактерии представлены характерными для растений эккрисотрофными и целлюлозоразрушающими протеобактериями, а так же попадающими из почв актинобактериями и бациллами. В колосьях зерновых культур доминантами были целлюлолитики и метиловобактерии, на корнеплодах овощных культур – целлюлозоразрушающие бактерии и эрвинии.

3. Установлено, что нарушение землепользования, проявляющееся в запашке овощей в почву приводит к увеличению численности фитопатогенных энтеробактерий. Однако, в течение последующего года их титр снижался до нормальных значений, что свидетельствует о санитарной роли почвы.

4. На основании метода MALDI-TOF MS установлена видовая принадлежность выделенных бактерий агроценозов. Они представлены семнадцатью видами, большинство которых являются характерными обитателями филлосферы и ризосферы.

5. Из исследованной коллекции бактерий 25 % штаммов проявили антагонистическую активность к бактериальным фитопатогенам.

Идентифицированы антибиотики, продуцируемые штаммами-антагонистами. Это феназин и феназин-1-карбоновая кислота.

б. Выявлена бактериолитическая активность в культуральной жидкости 6 штаммов бактерий, которая составляла от 0,6 до 19,2 ЛЕ/мл.

Список литературы

1. Андриюк К.І., Иутинська Г.О. Антипчук А.Ф., Валагурова А.В., Козирицька В.Э., Пономоренко С.П. (2001) Функціонування мікробних ценозів в умовах антропогенного навантаження. К.: Обереги, 240 с.
2. Анисимов Б.В., Белов Г.Л., Варицев Ю.А., Еланский С.Н., Журомский Г.К., Завриев С.К., Зейрук В.Н., Иванюк В.Г., Кузнецова М.А., Пляхневич М.П., Пшеченков К.А., Симаков Е.А., Склярора Н.П., Сташевски З.А., Усков А.И., Яшина И.М. (2009). Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. М.: Картофелевод. 272 с.
3. Анохина Т.О. (2011). Ризосферные плазмидсодержащие бактерии рода *Pseudomonas*, стимулирующие рост растений и деградирующие полициклические ароматические углеводороды. Диссертация канд. биол. наук. Пущино. 146 с.
4. Безуглова О.С., Звягинцева Н.В., Горянова Н.В (1995). Потеря гумуса в почвах Ростовской области. *Почвоведение*. 2. 175-183.
5. Благодатский С.А., Благодатская Е.В., Андерсон Т.Х., Вайгель Х.Й. (2006). Кинетика дыхательного отклика микробных сообществ почвы и ризосферы в полевом опыте с повышенной концентрацией атмосферного CO₂. *Почвоведение*. 3. 325-333.
6. Благодатский С.А., Богомолова И.Н., Благодатская Е.В. (2008). Микробная биомасса и кинетика роста микроорганизмов в чернозёмах при различном сельскохозяйственном использовании. *Микробиология* 77(1). 113-120.

7. Боронин А.М. (1998). Ризосферные бактерии рода *pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений. *Соросовский образовательный журнал*. 10. 25-31.
8. Боронин А.М., Кочетков В.В. (2000). Биологические препараты на основе псевдомонад. *АГРО XXI*. 3. 3-5.
9. Васильева Н.В. (2010). Роль внешнемембранных везикул в секреции бактериолитических ферментов *Lysobacter* sp.. Диссертация канд. биол. наук. Пущино. 126 с.
10. Гвоздяк П.И., Яковлева Л.М., Пасичник Л.А., Щербина Т.Н., Огородник Л.Е. (2005). Бактерии рода *Pseudomonas* на сорняках. *Микробиология*. 67(2). 63-69.
11. Гордеева Т.Х. (2004) Разнообразие бактериальных комплексов в дерново-позолистой почве агроценоза. Принципы и способы сохранения биоразнообразия. *Материалы Всерос. науч. конф. Тез. докл.* с. 80-81.
12. Гордеева Т.Х., Масленникова С.Н. (2012) Формирование микробно-растительных сообществ ризосферы в онтогенезе зерновых культур. *Научный журнал КубГАУ*. 81(7). 377-386.
13. Громов Б.В., Павленко Г.В. (1989). Экология бактерий: учебное пособие Л: Изд-во ЛГУ 246 с.
14. Дмитриев Е.А. (1972). Математическая статистика в почвоведении. М.: Изд-во МГУ 297 с.
15. Добровольская Т.Г. (2002) Структура бактериальных сообществ почв. М.: ИКЦ Академкнига. 282 с.
16. Доронина Н.В., Иванова Е.Г., Сузина Н.Е., Троценко Ю.А. (2004). Метанотрофы и метиловобактерии обнаружены в тканях древесных растений в зимний период. *Микробиология*. 73(6). 817-824.
17. Доронина Н.В., Кудинова Л.В., Троценко Ю.А. (2000). *Methylovorus mayi* — новый вид аэробных облигатных метиловобактерий, ассоциированных с растениями. *Микробиология*. 69(5). 599-603.

18. Доронина Н.В., Федоров Д.Н., Троценко Ю.А. (2009). Стимуляция облигатными метилотрофными бактериями морфогенеза и антигрибной устойчивости китайской капусты *Brassica chinensis* L. *Биотехнология*. 6. 57-61.
19. Егоров Н.С. (1957). Выделение микробов-антагонистов и биологические методы учета их антибиотической активности. М: Изд-во МГУ 77 с.
20. Заикина И.А. (2008). Экологическая роль бактериального сообщества эпифитов филлосферы в жизнедеятельности растений. Автореф. дис. на соискание уч. ст. к.б.н. Ставрополь. 150 с.
21. Захарова И.Я., Павлова И.Н. (1985). Литические ферменты микроорганизмов, К.: Наукова думка, 215 с.
22. Звягинцева И.С. (1981). Внеклеточные гидролазы грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов. *Успехи микробиологии*. 16. 81-103.
23. Иванова Е.Ю. (2007). Микробиология. Издательско-полиграфический центр Воронежского Государственного университета. 101 с.
24. Иутинская Г.А., Остапенко А.Д., Андреюк Е.И. (1993) Устойчивость микробных сообществ почвы под озимой пшеницей при разных агротехнологиях ее выращивания. *Микробиология*. 55(2). 3-12.
25. Иутинская Г.А., Пономаренко С.П., Андреюк Е.И., Антипчук А.Ф., Бабаянц О.В., Белявская Л.А., Бровко И.С., Валагурова Е.В., Галкин А.П., Галкина А.Л., Гладун А.А., Грицаенко З.М., Драговоз И.В., Икин Д.Д., Козырицкая В.Е., Крючкова Л.А., Леонова Н.О., Моисеева Т.В., Мусатенко Л.И., Петрук Т.В., Пиндрус А.А., Терек О.И., Титова Л.В., Цыганкова В.А., Ху Вень Ксю, Яворская В.К., Амборко Н.А. (2010). Биорегуляция микробно-растительных систем. К.: Ничлава 464 с.
26. Классификация и диагностика почв России. (2004). Смоленск. Ойкумена 342 с.
27. Кононков П.Ф., Дудина З.Н., Добровольская Т.Г. (1980). Изменение микрофлоры и всхожести семян овощных культур при хранении. *Сельскохозяйственная биология*. 15(4). 510-513.

28. Кораблева Л.И. (1969). Плодородие, агрохимические свойства и удобрение пойменных почв Нечерноземной зоны. Изд-во Наука. 276 с.
29. Кулаев И.С. (1997). Бактериолитические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине. *Соросовский образовательный журнал*. 3. 23-31.
30. Кулаев И.С., Северин А.И., Абрамочкин Р.В. (1984). Бактериолитические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине. Вестник АМН СССР. 8. 64-69.
31. Лысак Л.В., Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н. (2003). Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий. М: Макс пресс. 120 с.
32. Минеев В.Г. (2004) Агрохимия. М.: Изд-во МГУ, Изд-во "КолосС", 720 с.
33. Назарько М.Д. (2008). Теоретические и экспериментальное обоснование использования микробиологических показателей почв для оценки экосистемы Краснодарского края. Автореф. дис. на соискание уч.ст. д.б.н. Ставрополь 25с.
34. Новикова Н.С. (1963). Бактериальная флора надземных органа растений. К.: Изд-во АН УССР. 87 с.
35. Определитель бактерий Берджи. В 2 т./под ред. Дж. Хоулта и др.; Пер. с англ. под ред. Заварзина Г.А. (1997). 1. 436 с., 2. 362 с. М.: Мир.
36. Пасичник Л., Ходос С., Буценко Л., Патыка В. (2011). Бактериальные болезни пшеницы. *Зерно*. 2. 72-81.
37. Петросова Р.А., Голов В.П., Сивоглазов В.И., Страут Е.К. (2007). Естествознание и основы экологии. М.: Дрофа. 303 с.
38. Попкова К.В. (2005). Общая фитопатология. М.: Дрофа. 445с.
39. Почвенно-агрономическая характеристика АБС Чашниково. Под ред. Карпачевского Л.О., Головкова А.М. (1986) 95 с., (1988). 149 с.
40. Романенко Н.Д., Попов И.О., Таболин С.Б., Бугаева Е.Н., Заец В.Г. (2008). Перспективы использования бактерий-антагонистов против наиболее

фитопатогенных видов нематод, вирусов и грибов. Издательство «Агрорус». АГРО XI . 1-3. 23-27.

41. Симонович Е.И. (2011). Экологические аспекты применения биологических активизаторов почвенного плодородия. Автореф. дис. на соискание уч.ст. д.б.н. Ростов-на-Дону. 50 с.
42. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. (1986). Бактерии рода *Pseudomonas* – продуценты новых антибиотиков. Механизмы биосинтеза антибиотиков. М.: Наука. 149-161
43. Степная О.А., Ледова Л.А., Кулаев И.С. (1999). Бактериолитические ферменты. *Успехи биологической химии*. 39. 327-354.
44. Тихонович И.А., Проворов Н.А. (2009). Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего.
45. Тихонович И.А., Проворов Н.А. (2011). Сельскохозяйственная микробиология как основа экологически устойчивого агропроизводства: фундаментальные и прикладные аспекты. *Сельскохозяйственная биология*. 3. 3-9.
46. Феклистова И.Н., Максимова Н.П. (2009). Применение синтезирующих антибиотики феназинового ряда бактерий *Pseudomonas aurantiaca* для биологического контроля заболеваний пшеницы. *Вестник БГУ*. 2(3). 32-36.
47. Фундаментальная фитопатология (2012). Под ред. Ю.Т. Дьякова. – М.: КРАСАНД. 512 с.
48. Шильникова В.К., Ванькова А.А., Годова Г.В. (2006). Микробиология. М.: Дрофа. 138-154.
49. Широких А.А., Широких И.Г. (2007). Изучение полезных для растений свойств метилотрофных бактерий. *Агрехимия*. 9. 53-57.
50. Шишков С.А. (2007). Минералогические и органические компоненты аллювиальных почв центральной поймы р. Ока Автореф. дисс. на соиск. уч. степени к.б.н. М: 24 с

51. Штерншис М.В., Джалилов Ф.С., Андреева И.В., Томилова О.Г. (2000). Биопрепараты в защите растений. Новосибирск. Изд-во НГАУ 128 с.
52. Audenaert K., Pattery T., Cornelis P., Höfte M. (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15(11). 1147-1156.
53. Bakker P.A.H.M., Ran L.X., Pieterse C.M.J., Van Loon L.C. (2003). Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 25(1). 5-9.
54. Benizri E., Baudoin E., Guckert A. (2001). Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology*. 11(5). 557-574.
55. Berg G., Krechel A., Ditz M., Sikora R.A., Ulrich A., Hallmann J. (2005). Endophytic and ectophytic potato associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*. 51(2). 215-229.
56. Boland F.M., Atrih A., Chirakkal H., Foster S.J., Moir A. (2000). Complete spore-cortex hydrolysis during germination of *Bacillus subtilis* 168 requires SleB and YpeB. *Microbiology*. 146(1). 57-64.
57. Buckley D.H., Schmidt T.M. (2003). Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agroecosystems. *Environmental Microbiology*. 5(6). 441-452.
58. Corpe W.A., Rheem S. (1989). Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. *FEMS Microbiology Letters*. 62(4). 243-249.
59. De Vleeschauwer D., Cornelis P., Hofte M. (2006). Redox-active pyocyanin secreted by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 triggers systemic resistance to *Magnaporthe grisea* but enhances *Rhizoctonia solani* susceptibility in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 19(12). 1406-1419.

60. Duffy B.K., Defago G. (1999). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(6). 2429-2438.
61. Dunne C., Delany I., Fenton A., O'Gara F. (1996). Mechanisms involved in biocontrol by microbial inoculants. *Agronomie*. 16(10). 721-729.
62. Dunne C., Moenne Locozy Y., McCarthy J., Higgins P., Powell J., Dowling D.N., O'Gara F. (1998). Combining proteolytic and phloroglucinol producing bacteria for improved biocontrol of *Pythium* mediated damping off of sugar beet. *Plant Pathology*. 47(3). 299-307.
63. Enya J., Shinohara H., Yoshida S., Tsukiboshi T., Negishi H., Suyama K., Tsushima S. (2007). Culturable leaf-associated bacteria on tomato plants and their potential as biological control agents. *Microbial Ecology*. 53(4). 524-536.
64. Figueiredo M.D.V.B., Seldin L., de Araujo F.F., Mariano R.D.L.R. (2010). Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. *Plant growth and health promoting bacteria*. 18. 21-43.
65. Fridlender M., Inbar J., Chet I. (1993). Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1, 3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biology and Biochemistry*. 25(9). 1211-1221.
66. Gray E.J., Smith D.L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*. 37(3). 395-412.
67. Hallman, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895-914.
68. Heyrman J., Verbeeren J., Schumann P., Swings J., De Vos P. (2005). Six novel *Arthrobacter* species isolated from deteriorated mural paintings. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55(4). 1457-1464.

69. Higa T., Parr J.F. (1994). Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment (Vol. 1). Atami, Japan: International Nature Farming Research Center. 16.
70. Holland M.A. (1997). Occam's Razor Applied to Hormonology (Are Cytokinins Produced by Plants?). *Plant Physiology*. 115(3). 865.
71. Hunt M. D., Neuenschwander U.H., Delaney T.P., Weymann K.B., Friedrich L.B., Lawton K.A., Ryals J.A. (1996). Recent advances in systemic acquired resistance research – a review. *Gene*. 179(1). 89-95.
72. Iavicoli A., Boutet E., Buchala A., Métraux J.P. (2003). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16(10). 851-858.
73. Jijakli M.H., Lepoivre P. (1998). Characterization of an exo- β -1, 3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology*. 88(4). 335-343.
74. Johansen J.E., Binnerup S.J. (2002). Contribution of cytophaga-like bacteria to the potential of turnover of carbon, nitrogen, and phosphorus by bacteria in the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Microbial ecology*. 43(3). 298-306.
75. Joshi P., Bhatt A.B. (2011). Diversity and function of plant growth promoting rhizobacteria associated with wheat rhizosphere in North Himalayan region. *International Journal of Environmental Sciences*. 1(6). 1135-1143.
76. Keel C., Maurhofer M. (2009). Insecticidal activity in biocontrol pseudomonads. In: Weller D., Thomashow L., Loper J., Paulitz T., Mazzola M., Mavrodi D., Landa B.B., Thompson J. (eds) 8th International PGPR Workshop. Portland, USA, 51.
77. Keel C., Schnider U., Maurhofer M., Voisard C., Laville J., Burger U., Wirthner P., Haas D., Défago G. (1992). Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 5. 4-13.

78. Keel C., Wirthner P., Oberhänsli T., Voisard C., Haas D., Défago G. (1990). Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. *Symbiosis*. 9. 327-41.
79. Kloepper J.W., Metting Jr F.B. (1993). Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management. Marcel Dekker. 255-274.
80. Koubek J., Uhlik O., Jecna K., Junkova P., Vrkoslavova J., Lipov J., Kurzawova V., Macek T., Mackova M. (2012). Whole – cell MALDI – TOF: Rapid screening method in environmental microbiology. International biodeterioration biodegradation. *Journal of Environmental Microbiology* 69. 82-86.
81. Larkin R.P. (2003). Characterization of soil microbial communities under different potato cropping systems by microbial population dynamics, substrate utilization, and fatty acid profiles. *Soil Biology and Biochemistry*. 35(11). 1451-1466.
82. Leeman M., Van Pelt J.A., Den Ouden F.M., Heinsbroek M., Bakker P.A. H.M., Schippers B. (1995). Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*. 85(9). 1021-1027.
83. Manjula K., Kishore G.K., Podile A.R. (2004). Whole cells of *Bacillus subtilis* AF 1 proved more effective than cell-free and chitinase-based formulations in biological control of citrus fruit rot and groundnut rust. *Canadian Journal of Microbiology*. 50(9). 737-744.
84. Mariano R.L.R., Kloepper J.W. (2000). Metodo alternativo de biocontrole: resistencia sistematica induzida por rizobacterias. *Revisao Anual de Patologia de Plantas*. 8. 121-137.
85. Maurhofer M., Reimann C., Schmidli-Sacherer P., Heeb S., Haas D., Défago G. (1998). Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain

- P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology*. 88(7). 678-684.
86. Medeiros F.H.V., Silva G., Mariano R.L.R., Barros R. (2005). Effect of bacteria on the biology of diamondback moth (*Plutella xylostella*) on cabbage (*Brassica oleraceae* var. capitata) cv. Midori. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*. 2. 204–212.
 87. Ordentlich A., Elad Y., Chet I. (1988). The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology (USA)*. 78, 84-88.
 88. Pierson L.S., Pierson E.A. (2010). Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86(6). 1659-1670.
 89. Price-Whelan A., Dietrich L.E., Newman D.K. (2006). Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chemical Biology*. 2(2). 71-78.
 90. Reganold J.P., Papendick R.I., Parr J.F.(1990) Sustainable agriculture. *Scientific American Journal*. 262. 112-120.
 91. Ribbeck-Busch K., Roder A., Hasse D., De Boer W., Martinez J.L., Hagemann M., Berg G. (2005). A molecular biological protocol to distinguish potentially human pathogenic *Stenotrophomonas maltophilia* from plant associated *Stenotrophomonas rhizophila*. *Environmental Microbiology*. 7(11). 1853-1858.
 92. Rogers H.J., Perkins H.R., Ward J.B. (1980). Microbial cell walls and membranes. Chapman and Hall., 541.
 93. Sacherer P., Défago G., Haas D. (1994). Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiology Letters*. 116(2). 155-160.
 94. Scortichini M. (2005). The population structure of some plant pathogenic bacteria: an ecological and adaptive perspective. *Journal of Plant Pathology*. 87(1). 5-12.

95. Shockman G.D., Holtje J.V. (1994). Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. *New Comprehensive Biochemistry*. 27. 131-165.
96. Smith T.J., Blackman S.A., Foster S.J. (2000). Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology*. 146(2). 249-262.
97. Strominger, J.L., Ghuysen, J.M. (1967). Mechanisms of enzymatic bacteriolysis. *Science*. 156(3772). 213-221.
98. Stukenbrock E.H., McDonald B.A. (2008). The origins of plant pathogens in agroecosystems. *Annual Review of Phytopathology*. 46. 75-100.
99. Sun H.Y., Deng S.P., Raun W.R. (2004). Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(10). 5868-5874.
100. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30. 2725-2729.
101. Thomashow L.S. (1996). Biological control of plant root pathogens. *Current Opinion in Biotechnology*. 7(3). 343-347.
102. Thomashow L.S., Weller D.M. (1988). Role of phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Bacteriology*. 170. 3499-3508.
103. Turner J.M., Messenger A.J. (1986). Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Advances in Microbial Physiology*. 27. 211-275.
104. Van der Ent S., Van Wees S., Pieterse C.M. (2009). Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry*. 70(13). 1581-1588.
105. Van Wees S., Van der Ent S., Pieterse C.M. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*. 11(4). 443-448.

106. Vance C.P. (2001). Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant physiology*. 127(2). 390-397.
107. Velázquez-Sepulveda I., Orozco-Mosqueda M.C., Prieto-Barajas C.M., Santoyo G. (2012). Bacterial diversity associated with the rhizosphere of wheat plants (*Triticum aestivum*): Toward a metagenomic analysis. *Phyton, International Journal of Experimental Botany*. 81. 81-87.
108. Wang S.L., Chang W.T. (1997). Purification and characterization of two bifunctional chitinase/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 63. 380-386.
109. Watanabe T., Kanai R., Kawase T., Tanabe T., Mitsutomi M., Sakuda S., Miyashita K. (1999). Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiology*. 145(12). 3353-3363.
110. Wei G., Kloepper J.W., Tuzun S. (1991). Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology*. 81. 1508-1512.
111. Whipps J.M., Hand P., Pink D., Bending G.D. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of applied microbiology*. 105(6). 1744-1755.
112. Zehnder G., Kloepper J., Yao C., Wei G. (1997). Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) by plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Economic Entomology*, 90(2), 391-396.