

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА»

На правах рукописи

**Хуснетдинова
Кира Амировна**

**СТРУКТУРА СООБЩЕСТВ ЭПИФИТНЫХ БАКТЕРИЙ
КУЛЬТУРНЫХ И СОРНЫХ РАСТЕНИЙ**

Специальность 03.02.03 – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Добровольская Татьяна Глебовна

Москва – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ПОНЯТИЕ АГРОФИТОЦЕНОЗА И РОЛЬ СОРНЫХ РАСТЕНИЙ В НЁМ.....	9
ГЛАВА 2. ВЗАИМООТНОШЕНИЯ БАКТЕРИЙ С РАСТЕНИЯМИ	
ГЛАВА 3. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ПОЧВ АГРОЦЕНОЗОВ.....	17
3.1 Бактериальные сообщества овощных культур.....	24
3.2 Бактериальные сообщества зерновых культур.....	24
3.3 Бактериальные комплексы почв агроценозов.....	26
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВЫХ УДОБРЕНИЙ НА РОСТ РАСТЕНИЙ И БАКТЕРИЙ.....	33
4.1 Характеристика гуминовых удобрений.....	36
4.2 Влияние гуминовых веществ на рост и развитие растений.....	36
4.3 Действие гуминовых кислот на рост бактерий.....	43
ГЛАВА 5. СОРНЫЕ РАСТЕНИЯ.....	44
5.1. Полезные свойства сорных растений	44
5.2. Бактериальные сообщества сорных растений.....	48
ГЛАВА 6. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	53
6.1 Объекты исследования.....	53
6.2 Методы исследования.....	56
ГЛАВА 7. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	59
7.1. Динамика численности и таксономической структуры эпифитных и почвенных бактериальных сообществ в процессе вегетации сельскохозяйственных растений.....	59
7.2. Влияние гуминовых удобрений на структуру бактериальных сообществ культурных растений.....	94

7.3. Численность и таксономическая структура эпифитных бактериальных сообществ сорных растений. .	107
7.4 Сравнение структуры бактериальных сообществ культурных и сорных растений.....	138
7.5 Антибиотические свойства бактериальных культур, выделенных из культурных и сорных растений.....	143
ВЫВОДЫ.....	147
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	148

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

В настоящее время изменился взгляд на преобразовательную деятельность в природе, которую считается правильнее называть регулированием, а не управлением. В учебнике В.И. Кирюшина «Экологические основы земледелия» (1996) рассмотрены системы агроэкологической оценки сельскохозяйственных культур и агроландшафтов, агроэкологической типологии и классификация земель. При этом подчёркивается роль биоты как основного фактора стабилизации ландшафтов с неустойчивым равновесием, когда растительность предотвращает эрозию, дефляцию, сдерживает заболачивание и засоление. Агроценоз – это искусственная экосистема, созданная человеком с целью получения сельскохозяйственной продукции, которая включает в себя растения, животных и микроорганизмы. Образцами таких систем могут послужить поля, огороды, сады, парки, пастбища. В агроценозах действует преимущественно искусственный отбор, направленный человеком, прежде всего, на максимальное повышение урожайности сельскохозяйственных культур. По этой причине экологическая устойчивость агроценозов невелика. Они не способны к саморегуляции и самовозобновлению, подвержены угрозе гибели при массовом размножении вредителей или возбудителей болезней. Ассоциированные с растениями микроорганизмы играют важную роль в их развитии, участвуя в снабжении растений элементами питания, фитогормонами, витаминами и другими факторами роста. Многие из ассоциативных микроорганизмов продуцируют соединения, ингибирующие фитопатогенов (Cattelan et al., 1999).

На современном этапе развития научного земледелия парадигма борьбы с сорными растениями сменяется парадигмой управления сорным компонентом агрофитоценоза (Захаренко, 2000). В странах северной Европы, особенно Ирландии, применяется посев специальных полос травянистых растений по обочинам пашен (Marshall, Mooney, 2004).

В числе растений, которые высаживают по краям полей, кроме лесных растений (фиалка, плющ, и др.), используют и рудеральные – бодяк полевой, подмаренник цепкий. Это связано с тем, что в травяных полосах разводятся полезные насекомые-опылители, кроме того, травы могут предохранять посевы в какой-то мере от механических повреждений, которые могут наблюдаться на краю поля, а так же от ветра и пыли.

В последнее время в зарубежной литературе появились сведения об использовании сорных растений в качестве источников бактерий, являющихся стимуляторами роста культурных растений (Kremer et al., 1990; Sturz et al., 2001). Однако в литературе нет сведений, касающихся сравнения состава бактериальных сообществ культурных и сорных растений, а также выделения из сорных растений бактерий, являющихся антагонистами фитопатогенных бактерий.

Цель исследования: изучение в динамике структуры бактериальных сообществ в разных компонентах агроценозов, включая культурные и сорные растения, а также почв под ними и выявление роли бактериальных комплексов в поддержании гомеостаза агрофитоценозов.

Задачи исследования

1. Определить в динамике численность бактерий в филлосфере и ризосфере культурных и сорных растений, а также в почве, используя традиционные методы посева.
2. Создать коллекцию культур, выделенных из разных растений и почвы, определить их таксономическую принадлежность с помощью как фенотипических, так и молекулярно-биологических методов.
3. Сравнить таксономическую структуру эпифитных бактериальных сообществ на разных органах культурных и сорных растений в процессе смены фенологических фаз их развития.
4. Провести дисперсионный многофакторный анализ, который позволит выявить влияние следующих факторов на численность и таксономическую

структуру исследуемых бактериальных комплексов: орган растения, фаза развития, микрониша (лес, окраина поля, середина поля), вид растения.

5. Изучить влияние гуминовых удобрений на урожай и эколого-трофическую структуру бактериальных комплексов культурных растений.

6. Провести поиски среди культур бактерий, выделенных из сельскохозяйственных и сорных растений, антагонистов фитопатогенных бактерий.

Научная новизна

Впервые проведено сравнение структуры эпифитного комплекса бактерий на культурных и сорных растениях. Выявлены различия в их таксономическом составе. На основании проведения дисперсионного многофакторного анализа впервые установлено, что на структуру бактериальных комплексов исследованных растений влияют в порядке убывания: фаза развития, орган растения, микрониша, вид растения. Выявлен большой процент антагонистов фитопатогенных бактерий, выделенных из разных видов культурных, сорных растений и почвы.

Практическая значимость

Нахождение бактерий-антагонистов фитопатогенов в разных ярусах агроценозов позволит рекомендовать их в качестве биопрепаратов для повышения устойчивости сельскохозяйственных культур. Выявлено положительное влияние гуминовых удобрений на урожай и эколого-трофическую структуру бактериальных сообществ, заключающееся в смене эккрисотрофных бактерий на гидролитический комплекс бактерий, способных к разложению удобрений на более простые соединения, которые могут использоваться растениями в качестве питательных веществ.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: Международная научно-практическая конференция «Современные проблемы окружающей среды и пути их

решения» (Москва, 2010), Всероссийская научно-практическая конференция «Актуальные проблемы педагогики, экологии и философии», (Москва, 2011), Всероссийская научно-практическая конференция «Современные проблемы загрязнения окружающей среды и пути их решения» (Москва, 2012), XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012» (Москва, 2012), VI Всероссийский съезд общества почвоведов им. В.В. Докучаева (Петрозаводск, 2012), Международная научно-практическая конференция «Фундаментальные и прикладные науки, проблемы и перспективы» (25 апреля 2014 г.), (Москва, 2014), Международная научная конференция «Роль почв в биосфере и жизни человека»: К 100-летию со дня рождения академика Г.В. Добровольского, к Международному году почв (Москва, 5-7 октября 2015 г.), Международная конференция «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» (Ялта, 6-10 июня 2016 г.), Международная конференция "Современные аспекты сельскохозяйственной микробиологии" (Москва, 2016).

Публикации

По результатам исследования опубликовано 14 печатных работ, из них 5 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, заключение, выводы и список упоминаемых в тексте литературных источников. Работа изложена на 162 страницах текста, иллюстрирована 59 рисунками, содержит 17 таблиц. Список литературы состоит из 134 наименований, из них 49 на иностранном языке.

Благодарности

Автор приносит глубокую благодарность и искреннюю признательность научному руководителю кандидату биологических наук, ведущему сотруднику Т.Г. Добровольской за постоянную помощь и повседневное внимание при выполнении работы. Благодарю сотрудников кафедры Н.А. Манучарову за оказанную помощь в проведении молекулярно-биологических анализов, А.В. Головченко за помощь в проведении дисперсионного многофакторного анализа, А.В. Якушева за помощь при проведении анализа методом главных компонент при сравнении структуры культурных и сорных растений.

Выржаю особую благодарность сотрудникам кафедры общего земледелия и агроэкологии за предоставление данные по характеристике почвы, урожайности сельскохозяйственных культур и отборе образцов для микробиологических исследований.

Спасибо всем сотрудникам кафедры биологии почв за внимательное отношение и ценные советы.

ГЛАВА 1. ПОНЯТИЕ АГРОФИТОЦЕНОЗА И РОЛЬ СОРНЫХ РАСТЕНИЙ В НЁМ

С возникновением земледелия появились агрофитоценозы. Агрофитоценоз является неотъемлемой частью современного растительного покрова. Одним из первых термин «агрофитоценоз» был определён Н.С. Камышевым (1939) как пашенное растительное сообщество, в котором наблюдается закономерное сочетание культурных и сорнополевых видов, взаимосвязанных и взаимодействующих друг с другом, со свойственными им условиями местообитания. Позднее А.М. Гродзинский (1973) рассматривал в качестве главного объекта агрофитоценоза поле, с присущими ему зоо-, микробо- и фитоценозами, образовавшимися под влиянием природно-климатических условий и хозяйственной деятельности человека, подчеркивая важную роль во взаимоотношениях компонентов агрофитоценоза аллелопатии.

Агрофитоценоз характеризуется определенным флористическим составом, структурой, взаимоотношениями растений друг с другом и окружающей средой. От естественных сообществ агрофитоценоз отличают целенаправленный подбор доминирующих растений, более простая структура, преднамеренная смена другими агрофитоценозами (севооборот) кратковременность существования, отсутствие способности к самовозобновлению. Агрофитоценозы обычно функционируют один сезон: от появления всходов до уборки урожая. Они характеризуются меньшей устойчивостью и динамичностью по сравнению с естественными фитоценозами, постоянным антропогенным воздействием, отчуждением энергии в виде урожая сельскохозяйственных культур. В структуре агрофитоценоза абсолютными доминантами являются культурные растения, а масса сорного компонента распределяется, как правило, между 5-7 основными видами сорняков, представляющих своеобразные группы доминирования.

Несмотря на все многообразие компонентов агрофитоценоза, главными организующими элементами его структуры всегда служат культурные и сорные растения. Культурные растения - виды, формы и сорта растений, возделываемые человеком для получения продуктов питания, сырья для промышленности, кормов, в декоративных целях и т. п. (Большой Энциклопедический словарь, 1993). В отличие от дикорастущих видов, культурные растения не имеют естественного ареала (выращиваются независимо от места происхождения) и не способны к естественному распространению. Искусственный отбор и селекция заметно повлияли на структуру и функции растений, ранее обладавших выраженной виолентностью (конкурентной способностью). Многие виды культурных растений утратили способность к захвату и удержанию экологической ниши и оказались неконкурентоспособными (Уразов, 2000).

История мирового земледелия составляет примерно 10-12 тыс. лет и на протяжении этого времени посеvy и посадки культурных растений сопровождают сорные растения (Витязев, 1991). В процессе эволюции большая часть видов сорных растений хорошо приспособилась к произрастанию в посевах определенных культурных растений (Лошаков В.Г., 2012).

В.В. Туганаев (1984) утверждал, что сорные растения – это закономерные и полноправные компоненты агрофитоценозов, численность которых регулируется степенью антропогенного воздействия. Академик А.И. Мальцев считал сорняками растения других видов, которые развиваются на обрабатываемых землях вместе с культурными растениями или растения, поселяющиеся на необработанных местах, где природный покров нарушен или уничтожен. Согласно Государственному стандарту сорные растения (сорняки) – это дикорастущие растения, обитающие на сельскохозяйственных угодьях и снижающие величину и качество продукции (ГОСТ 16265-89,1990). Сорные растения следует отличать от сорно-полевых растений. Сорно-полевые растения – это растения

естественных ценозов, которые приспособились (экологически и биологически) к произрастанию с культурными растениями в полевых условиях (Витязев, 2005). А.И. Мальцев писал, что сорно-полевыми растениями являются дикорастущие или полукультурные растения, которые приспособились к произрастанию совместно с культурными растениями в полевых условиях (Мальцев, 1933).

Обзор научных публикаций показал, что процесс формирования сорных ценозов начался задолго до зарождения земледелия и продолжается до наших дней. Его интенсивность и направленность в значительной степени зависели от уровня воздействия человека. Биоэкологические особенности сорных растений, их адаптация к антропогенному воздействию не позволили полностью устранить их вредное влияние и реализовать потенциал продуктивности культурных растений.

На современном этапе развития научного земледелия парадигма борьбы с сорными растениями сменяется парадигмой управления сорным компонентом агрофитоценоза. Необходимость разработки научных и практических основ управления сорным компонентом агрофитоценоза весьма убедительно обоснована в книге А.В. Захаренко «Теоретические основы управления сорным компонентом агрофитоценоза в системах земледелия» (2000). Приводим несколько цитат из этой книги. «Развитие научных исследований в области защиты культур от сорных растений долгое время было направлено на разработку комплекса мероприятий с целью полного их уничтожения. Этот путь привел к тупиковой ситуации, так как сорные растения как компонент агрофитоценоза уничтожить не удалось. Более того, многие виды сорняков, благодаря биоценотической приспособляемости на различных уровнях (морфологическом, генетическом и др.), стали резистентными к применяемым агроприемам». Автор высказывает точку зрения, согласно которой сорные растения играют определённую положительную роль в

формировании и развитии эколого-энергетических взаимоотношений в агрофитоценозах. Недаром, в странах северной Европы, особенно Ирландии, применяется посев специальных полос травянистых растений по обочинам пашен (Marshall E.J.P., Moonen A.C., 2002). В числе растений, которые высаживают по краям полей, кроме лесных растений (фиалка, плющ, и др.) используют и рудеральные – бодяк полевой, подмаренник цепкий. Это связано с тем, что в травяных полосах разводятся полезные насекомые-опылители, кроме того, травы могут предохранять посевы в какой-то мере от механических повреждений, которые могут наблюдаться на краю поля, а так же от ветра и пыли.

Научное название сорняков – синантропные растения, что в переводе с греческого языка означает: «синантропос» – вместе с человеком. Второе научное название сорняков – антропофилы, что также в переводе означает: «антропос» - человек, «филио» - люблю. В первой интерпретации «вместе с человеком» имеется ввиду, что именно человек способствует распространению этих растений, во втором – «человек-люблю», что эти растения любят жить и расти возле человека, в местах его деятельности. По своему происхождению сорно-полевые растения делятся на две группы - антропохоры и апофиты. Антропохоры — типичные сорные растения, которые встречаются исключительно на полях вместе с культурными растениями и зависят от хозяйственной деятельности человека. Апофиты являются членами какого-нибудь естественного фитоценоза (чаще лугового).

Сорняки имеют тесную эволюционную связь с предками культурных растений. Считается, что центры происхождения культурных и многих видов сорных растений одни и те же. Некоторые виды современных сорняков Средней и Восточной Европы, например, плевел опьяняющий, кострец ржаной, куколь, овсюг, василек синий, живокость полевая, мак-самосейка, мак гибридный, горчица полевая, дурман, — выходцы из Древнего Средиземноморья. Из Внутренней Азии к нам пришли

крестовник весенний и кардария крупковая. Из Америки в Европу и Азию мигрировали ослинник двулетний, мелколепестник канадский и многие другие виды сорных растений. Процесс передвижения сорняков из одного региона в другой не прекращается до сих пор. Поэтому в составе нашей флоры есть растения-сорняки из всех континентов планеты.

Сорняки, которые расселились по всему земному шару, называют космополитами. Крапива и одуванчик – космополиты, они занимают половину суши земли, их запасы неисчерпаемы.

«Из всех видов растений, произрастающих на территории России, около 1000 видов относятся к сорным. В полевых агрофитоценозах Нечерноземной зоны РФ насчитывается более 300 видов, среди которых около 30 видов характеризуются наиболее интенсивным конкурентным воздействием. Из малолетних видов сорняков в группу наиболее конкурентоспособных входят марь белая, торица полевая, пикульники, горцы, звездчатка средняя, пырей ползучий, бодяк полевой, осот полевой, хвощ полевой» (Захаренко, 2000).

К главным биологическим особенностям сорных растений относятся высокая семенная продуктивность, разнообразные способы распространения, биологические свойства семян (покой, долговечность, разноплодие), способность к вегетативному размножению и др. (Захаренко, 2000).

В последние годы некоторые исследователи стали говорить не о борьбе с сорными растениями, о нежелательных последствиях полного уничтожения сорняков, а о контроле численности популяции (Warcholinska, 1981, Вахрамеева и др., 1995, Wilson, 1994....). «Задача агрономии - не уничтожение сорняков, а контроль за их численностью, поддержание ее на том уровне, который существенно не сказывается на урожае культурных растений. Ни один земледелец не будет стремиться снизить засоренность до нуля, так как это потребует больших материальных и энергетических затрат» (Миркин, Туганаев, 1983). Именно

поэтому, еще в XVIII веке первый русский агроном А.Т. Болотов предлагал ввести севооборот, в котором поле на 3 года отдавалось в полное владение сорнякам, так называемый перегон. Он установил в этом приеме трехкратную пользу: сорняки обогащают почву органическим веществом, служат кормом для скота, который, с вою очередь, удобряют землю навозом (цит. Куликова, 2010). Многие сорные растения активно поглощают питательные вещества из подпахотного слоя и после отмирания оставляют их в пахотном слое. Нередко наблюдается нормализация рН почвы. Так щавель и подорожник, которые любят кислую почву, тянут из глубин почвы магний и кальций, которые способны уменьшить кислотность почвы. Такими же свойствами обладают крестоцветные и марь белая, которые выносят из глубоких слоев почвы много кальция и магния.

Благодаря корневой системе сорняки рыхлят даже самую твердую почву, способствуют улучшению почвенной структуры, можно сказать, что это самая настоящая природная вспашка, «биологический плуг» (цит. Шайхисламова, 2005). Например, мощные корни лопуха хорошо рыхлят почву, снабжают её питательными веществами и дают после отмирания пищу микроорганизмам и другим обитателям почвы. Сорным растениям в гораздо большей степени, чем культурным, присуще свойство накапливать микроэлементы. Так, ромашка и тысячелистник аккумулируют серу, мокрица — цинк, белый клевер — молибден (Комаровский, 2007).

Сорные растения способствуют накоплению в почве органического вещества, тем самым улучшают гумусное состояние почвы. Они способствуют накоплению микроорганизмов, увеличивают численность полезной фауны, в том числе дождевых червей. Сорняки бобовой природы обогащают ее азотом. Даже самый вредный сорняк – это, кроме всего, еще и неограниченный запас органического вещества и отличный компонент для компостной кучи. Сорные растения улучшают водный режим почвы за

счет накопления влаги в пахотном слое, что ведет к использованию ее культурными растениями и повышает их засухоустойчивость.

Присутствие на полях некоторого количества сорняков препятствует эрозии почвы в периоды, когда на полях не возделываются культурные растения. Эрозия намного слабее в засоренных посевах пропашных культур, чем в чистых. Наконец, некоторые сорняки снижают пораженность культурных растений вредителями, обеспечивая им кров и пищу (в виде листвы, пыльцы, нектара, семян), или оказывают положительное влияние на популяции полезных насекомых (например, пчел). Некоторые сорняки, такие как полынь горькая, предотвращают поражение культурных растений вредителями и болезнями. Такой сорняк как вьюнок полевой способен предотвращать появление плесени, и культурные растения, которые с ним соседствуют, намного реже подвергаются грибковым заболеваниям. Часто вредителей отпугивают лук, чеснок, петрушка. Некоторые растения служат основой для приготовления настоев, отваров и порошков, успешно используемых для борьбы с вредителями овощных культур. Пижма – это сорняк, который не только притягивает полезных насекомых, но и отпугивает колорадского жука. Почти универсальной в этом смысле является горькая полынь. Посаженная по периметру сада, она защищает его от многих вредителей.

Многие сорные растения являются индикаторами почв, по которым можно говорить о структуре почвы, ее водном режиме и балансе питательных веществ. Так, на самых плодородных почвах любят расти мокрица, крапива, лебеда и пастушья сумка; на засоленных часто встречается солянка русская; на пересушенных - липучка ежевидная, полынь горькая и щирица запрокинутая; на влажных и глинистых – хвощ, дикая мята, подмаренник цепкий и мать-и-мачеха; на нейтральной или слабокислой почве растет ромашка, красный клевер и мать-мачеха; на кислых почвах произрастает хвощ полевой, вереск, осока, папоротник, фиалка трехцветная и белоус.

Сорные растения увеличивают биоразнообразие агрофитоценоза, тем самым возрастает устойчивость агрофитоценозов. Корневая система сорных растений выделяет в окружающую среду большое количество органических и неорганических соединений - экссудатов. Экссудаты содержат широкий набор углеводов, аминокислот, органических кислот. Процессы, которые протекают в этой зоне - корневое дыхание (поглощение O_2 и выделение CO_2), выделение ионов H^+ , потребление воды и элементов питания - модифицируют почвенную среду, изменяют подвижность минеральных элементов и активность микроорганизмов в ризоплане и ризосфере. Растворимые корневые экссудаты содержат сахара (около 50%), органические кислоты (около 40%), аминокислоты, фенольные соединения, бензойную кислоту, витамины, тиофены и др. Образующиеся в почве полисахариды могут взаимодействовать с частицами глины и участвовать в стабилизации почвенных агрегатов (Кузнецов, 2012).

В настоящее время все чаще вместо ранее использовавшегося термина «борьба с сорняками» предпочитают термин «контроль засоренности» (Куликова, 2010). Поэтому в существующей Интегрированной системе защиты растений одной из целей является не полное уничтожения сорняков, а поддержание их численности на определенном уровне. (Интегрированная защита растений, 2010). Сорные растения рассматриваются как естественный элемент агрофитоценозов, который при контроле оказывается полезным в силу способности сорных видов активизировать биогеохимический оборот с более глубокими горизонтами почвы, выступать в роли пулов (запасников) минеральных удобрений (Горбатко, Кудрин, 1980), способствовать формированию системы полезных симбиотических связей.

Проблема уничтожения сорных растений является очень сложной, а в случае ее успешного решения сельское хозяйство может столкнуться с

большим числом не прогнозируемых отрицательных экологических последствий (Прижуков, 1991, Шайхисламова, 2005).

ГЛАВА 2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИЙ С РАСТЕНИЯМИ

До сих пор нет однозначности в определении группы эндофитных и эпифитных микроорганизмов. Одни исследователи полагают, что к эндофитам следует относить представителей тех видов микроорганизмов, которые инициируют болезнь растений и способны расти и сохраняться в межклеточном пространстве и внутри тканей растений. Они характеризуются чёткой приуроченностью к видам растений-хозяев. Другие предлагают относить к эндофитам любые микроорганизмы, обнаруживаемые в растительных тканях, что характерно также для сапротрофных, а не только для фитопатогенных видов (Hirano, Upperg, 2000). Долгое время полагали, что ткани растения абсолютно стерильны. Позже было выяснено, что проводящие ткани растений постоянно заселены микроорганизмами, в том числе, псевдомонадами и метиловыми бактериями. Эпифитные микробные сообщества служат первичным барьером для защиты растений от попадающих из окружающей среды условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, что делает перспективным и актуальным исследование по данной проблеме. В работе Стукенброка с соавторами (Stukenbrock et al., 2008) описаны механизмы появления патогенов на культурных растениях. Высоко эффективный 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. Предполагается, что агроэкосистемы отбирают новые патогены из-за генетического единообразия сельскохозяйственных экосистем. Отбор

новых патогенов будет продолжаться, пока агроценозы не будут изменены таким образом, что они станут менее способствующими отбору патогенов. Сорные растения, так же, как и культурные растения, могут поражаться патогенными бактериями (Гвоздяк и др. 2005).

Патогенные бактерии используют стратегию эндофитной колонизации растений (Beattie et al., 1995; Sabaratnam et al., 2003; Wilson et al., 1999). Областью первичного проникновения являются поры на листьях. Однако различные растения в разной степени подвержены эндофитной колонизации (Sabaratnam et al., 2003). Например, кукуруза менее чувствительна к такой колонизации, чем фасоль. Лабораторные исследования, проведенные авторами, позволили выдвинуть гипотезу о том, что патогенные бактерии (*Pseudomonas syringae*) могут образовывать небольшие эпифитные колонии на устойчивых к ним растениях, а затем переселяться на растения-хозяева, образуя эндофитные колонии. Непатогенные бактерии (*Pantoea agglomerans*) используют эпифитный механизм колонизации растений. Фитопатогенные бактерии *Erwinia amylovora* и *Pseudomonas syringae* образуют эпифитные колонии на сорных растениях (Гвоздяк, Лукач, 2001).

В обзоре, посвященном изучению бактериальных эндофитов и их связи с растениями хозяевами (Rosenblueth, Martinez-Romero, 2006), приводится длинный список бактерий-эндофитов, в который входят широко известные в качестве эпифитов протеобактерии, бациллы, актинобактерии.

Бактериальное сообщество филлосферы рассматривается, как правило, изолированно от ризосферного сообщества, хотя оба они тесно связаны друг с другом и имеют много общих представителей. В обзоре, посвященном анализу численности, таксономического состава и методам исследования эпифитных бактерий (Jacques, Morris, 1995), приводится перечень родов и видов бактерий, изолированных разными исследователями в разное время из филлосферы наземных растений

умеренной зоны. В перечень родов аэробных грациликот входят следующие роды: *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Methylobacterium*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Chryseomonas*, *Flavobacterium*, *Janthinobacterium*. Из факультативно-анаэробных грамотрицательных бактерий перечислены следующие роды: *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Rahnella*, *Serratia*, *Chromobacterium*, *Zymomonas*. Наибольшее число видов бактерий перечисленных выше родов, выделенных из максимального числа растений, принадлежат к родам *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Klebsiella*. Фирмакуты представлены родами: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Cellulomonas*, *Curtobacterium*, *Clavibacter*. Постоянными обитателями филлосферы разнообразных как дикорастущих, так и культурных растений, являются метилотрофные бактерии. Связь розовоокрашенных факультативно метилотрофных бактерий (РОФМ) с растениями была установлена рядом авторов (Corpe, Rheem, 1984; Малашенко и др., 1996; Holland, 1997).

Детальное обследование бактериальной микрофлоры листьев цикория было выполнено с помощью метода «fingerprint» (Van Outryve et al., 1989). Были изучены протеиновые профили 590 штаммов. Преобладающими были грамотрицательные бактерии (105 штаммов, 101 тип «fingerprint»), среди них преобладали флюоресцирующие и нефлюоресцирующие *Pseudomonas*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia sp.*, и *Flavobacterium*. Грамположительные бактерии составили 17 % штаммов, выделенных из сорта цикория Alba, который был выращен на почве в отличие от других сортов, выросших на гидропонике. Авторы делают вывод о том, что значительная доля грамположительных бактерий в филлоплане цикория Alba связана с контактом растения с почвой, в которой до 60 % могут составлять такие фирмакуты как бациллы и артробактер. Сравнение состава бактериальных сообществ листьев, корней и семян цикория, выполненных этими же авторами, показало, что одни и

те же виды псевдомонад и ксантомонад обнаруживались как на листьях, так и на корнях всех типов изученных растений.

В последнее время появляется все больше данных о внедрении бактерий, которые считались настоящими эпифитами, в корни растений без особого вреда для последних. Среди эндофитов найдены представители протеобактерий всех подклассов. Чаще всего выделяются *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*. Некоторые из этих бактерий выделяются только из растений, в то время как выделить их из почвы не удается. Это - *Herbaspirillum seropedicae*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus* sp. Предполагается, что эти бактерии существуют в почве в «некультивируемой форме». В связи с этим предложено называть такие формы ассоциативных бактерий облигатными эндофитами, прочие - факультативными эндофитами (Каменева, Муромец, 1999).

По данным большинства исследователей в ризосфере, и тем более эндоризосфере, доминируют разнообразные протеобактерии как аэробные, так и факультативно-анаэробные..

Перечень родов бактерий-эндофитов, обнаруженных на корнях клевера и картофеля (Sturz et al., 1998) включает более 30 родов, из которых 80% составляют протеобактерии. С наибольшей частотой встречаемости выделялись роды: *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas*, *Variovorax*, *Curtobacterium* - с корней клевера, в то время как с клубней картофеля - *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Curtobacterium*. В список таксонов входят также факультативно-анаэробные бактерии - *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Serratia*, *Shewanella*, *Vibrio*, *Comamonas*. Большинство представителей бактерий самых разных родов оказались нейтральными по отношению к тем растениям, на корнях которых они обитают. Некоторые из них проявили антагонистическую активность по отношению к фитопатогенным грибам.

Развитию исследований в области изучения бактериальных сообществ, ассоциированных с растениями, способствовал новый этап,

связанный с обнаружением повышенной азотфиксирующей активности в ризосфере и филлосфере небобовых растений. Многочисленные эксперименты, проведенные с использованием новых методов определения азотфиксации, продемонстрировали широкое распространение азотфиксации в фитоплане растений различных семейств в разных типах экосистем. Такой тип азотфиксации, в отличие от симбиотической, осуществляемой бактериями в клубеньках бобовых растений, был назван ассоциативным (Умаров, 1984,1986). Доминирующими представителями ассоциативных diaзотрофов, изолированных из ризопланы овощных культур, оказались факультативно-анаэробные бактерии рода *Klebsiella*. Был получен штамм *Klebsiella planticola* ТСХА-91, который постоянно размножался на корнях овощных культур и сохранял при этом высокую азотфиксирующую активность, а так же способность к биосинтезу ростовых и антибиотических веществ. Инокуляция овощных культур этим штаммом приводила к существенному повышению их урожайности и получению экологически чистой продукции (Емцев, 1994).

Установленная зависимость ассоциативной азотфиксации от активности фотосинтетической деятельности растения свидетельствует о тесном сопряжении двух уникальных биологических процессов - азотфиксации и фотосинтеза. В настоящее время считается, что к фиксации азота из атмосферы способны 80-90% от всех известных бактерий.

Анализ приводимых разными исследователями списков бактериальных таксонов, выделенных из филлосферы и ризосферы разных видов растений за последние годы, позволяет все же выделить в качестве общих и наиболее типичных для этих биотопов следующие: *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Klebsiella*. В результате изучения таксономического состава бактерий, ассоциированных с разными видами растений в разных природно-климатических зонах, предложено (Добровольская, 2002) включить в этот

список бактерии родов *Aquaspirillum*, *Cytophaga* и порядка Мухососcales. Все эти бактерии являются типичными обитателями как филло- так и ризосферы. Следует учитывать также приуроченность бактерий некоторых родов преимущественно к определенным частям растений. Так, известно, что основным природным местообитанием бактерий рода *Gluconobacter*, требующих высокой концентрации сахара, являются пыльца и сок цветов, пчелы, мед, (Павленко, Лойцянская, 1978).

Таким образом, источником бактерий для формирования бактериальных сообществ филлосферы являются семена, насекомые и почва. В меньшей степени оказывают влияние такие факторы как перенос бактерий из других биотопов с ветром, дождем, животными и т.д. Состав бактериальных сообществ ризосферы складывается как из почвенных, так и находящихся на семенах бактерий, которые колонизируют корень по мере его роста. Следует учитывать при этом, что одни виды бактерий в равной степени характерны и постоянно выделяются из всех частей растения, другие приурочены к определенным органам растения.

Вопрос о сходстве и различиях в составе прокариотных сообществ растений в его надземной и подземной сферах до настоящего времени является нерешенным. Это связано, на наш взгляд, с тем, что прежде всего существуют лишь единичные работы, в которых один и тот же исследователь одними и теми же методами анализирует и сравнивает бактериальные комплексы растения с учетом всех экониш (семена, листья, цветы, плоды, корни), которые предоставляет растение в процессе его вегетации.

Представляется, что состав бактериальных комплексов, ассоциированных с растениями и характер их пространственной дифференциации в надземной и подземной частях растения, во многом определяется влажностью. Так, в филлоплане разных типов болотных растений всегда доминируют протеобактерии. Они представлены родами *Aquaspirillum* и *Klebsiella*. Большинство других родов бактерий, доля

которых в сообществе составляет менее 30%, также представлены в основном протеобактериями. В лесных биогеоценозах Окского заповедника, где периоды избыточного увлажнения чередуются с быстрым высушиванием почв, благодаря их легкому механическому составу, в спектр потенциальных доминантов бактериальных комплексов филлопланы входят как грамотрицательные бактерии (роды *Aquaspirillum*, *Cytophaga*, порядок Мухобacterales), так и грамположительные (роды *Cellulomonas*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*) (Добровольская и др., 1995). Следует отметить, что доля коринеподобных бактерий в бактериальном комплексе филлосферы увеличивается при переходе от лесных к луговым экосистемам. Так, в пойменных ландшафтах они составляют более 30% наряду со скользящими бактериями (миксобактерии и цитофаги). Процентное содержание актинобактерий продолжает нарастать по мере увеличения аридности экосистем при переходе к степным и пустынным экосистемам. Все это лишний раз подтверждает, что актинобактерии - континентальная ветвь прокариот. Таким образом, спектр бактериальных таксонов в фитосфере зависит от очень многих факторов. На результаты анализа будет влиять: в какой почвенно-климатической зоне и в каком типе биогеоценоза (лес, болото, луг, агроценоз) проводятся исследования, в какое время года и при какой погоде проводится отбор образцов (Добровольская, 2002).

О том, что существование эпифитных микроорганизмов на здоровом растении в значительной мере связано с климатом, обсуждается в учебнике В.Т.Емцева и Е.Н.Мишустина (2005). «Во влажную погоду их численность возрастает, в сухую, наоборот, уменьшается. У тех растений, которые интенсивнее выделяют продукты обмена на поверхность тканей, эпифитная микрофлора богаче и разнообразнее. Микроорганизмы обитают не только на стеблях, листьях и других надземных органах растений, но и на семенах. Исключение составляют семена, плотно закрытые плодовыми или семенными оболочками, например плоды бобовых культур. В таких

случаях до момента раскрытия оболочек семена практически лишены микрофлоры. Во время уборки и обмолота такое зерно сильно загрязняется микроорганизмами. Большое значение при этом имеют пыль и почва. Степень обсеменения различного зерна микроорганизмами неодинакова. Сказываются индивидуальные особенности растения, условия созревания зерна и его морфологические признаки. Так, бороздка, шероховатая поверхность эпидермиса или цветковые пленки способствуют скоплению на поверхности зерна большого количества пыли и микрофлоры. Поэтому на зерне злаковых больше микроорганизмов, чем на семенах некоторых масличных или бобовых с гладкой поверхностью»

ГЛАВА 3. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ПОЧВ АГРОЦЕНОЗОВ

3.1. Бактериальные сообщества овощных культур

Микробное население свежих фруктов и овощей характеризуется специфичностью и большим разнообразием видов. Состав и численность микроорганизмов зависят от вида и сорта растения, степени зрелости плодов и овощей, расстояния от почвы в период вегетации, природно-климатической зоны. Наиболее распространены в филлосфере растений умеренной зоны бактерии родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clavibacter*.

Спектр бактериальных таксонов особенно разнообразно представлен на овощах. В составе эпифитов практически всегда выявляется неспорообразующая палочка *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 1г 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 *Cl. 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).

Бактерии родов *Pantoea*, *Klebsiella*, *Enterobacter* были выделены из стеблей сладкого картофеля (Asis, Adachi, 2004). В последнее время появилась тенденция к выращиванию культур без использования удобрений и химикатов. Овощи, выращенные таким образом, были исследованы на присутствие патогенов человека: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia*

coli, *Listeria*, *Aeromonas*. Не было найдено патогенов, кроме *Aeromonas*. Виды *Aeromonas* были изолированы с 34% исследуемых овощей. Самым распространенным был *Aeromonas schubertii* (McMachon, 2000).

Показано, что от вида растений зависит и композиция ризопланового сообщества бактерий, т.е. растение влияет на состав бактериального сообщества (Nunan et al., 2005). Бергом с коллегами (Berg et al, 2005) было показано, что в ризосфере, филлосфере, эндосфере, эндоризосфере картофеля обитают бактерии, обладающие антагонистическим потенциалом к патогенам: *Verticillium dahliae* и *Rhizoctonia solani*. Ризосфера и эндосфера были основным источником антагонистических бактерий. С поверхности бобов были изолированы бактерии, проявляющие антагонизм в отношении *Xanthomonas campestris pv. phaseoli*, также обитающего на поверхности бобов (Membreno et al., 2001). Показано, что бактериальный эндофит *Pantoea agglomerans* защищает растение фасоли от заражения патогенной бактерией *Curtobacterium flaccumfaciens* (Hsieh et al., 2005).

Обитающие на листьях томата, выращиваемого в поле и в теплице, бактерии проявляли антифунгальную активность против грибных патогенов томата: *Botrytis cinerea*, *Fulvia fulva*, *Atletnaria solani*. Бактериальные штаммы с антифунгальной активностью принадлежали к родам *Bacillus* и *Pantoea* (Erya et al., 2007).

3.2. Бактериальные сообщества зерновых культур.

В процессе изучения микробиологического состава ризосферы пшеницы, ячменя и овса было показано, что численность микроорганизмов изменяется в процессе роста и развития этих растений (Гордеева и др., 2012). Характер изменения численности оказался однотипным для всех исследованных растений: в стадию кущения общая численность микроорганизмов была минимальной и достигала максимальных величин в фазу колошения. На этой стадии вегетации численность бактерий в

ризосфере пшеницы достигала 11млн. КОЕ/г, ризосфере ячменя и овса – 25 млн. КОЕ/г. Это связано, по мнению многих исследователей, с изменением состава и количества корневых выделений у растений, служащих источником питания для микроорганизмов (Мергель и др., 1996., Иванов, 1982., Веселов, 1998). По фазам развития растений изменялась не только численность, но и соотношение непорочных и спорных форм бактерий. В фазах выхода в трубку и колошения доминировали представители рода *Pseudomonas*, в фазе формирования зерна в ризосфере всех исследованных зерновых культур преобладали бактерии рода *Bacillus* и возрастала доля целлюлозоразрушающих микроорганизмов. Такой характер сукцессии связан со сменой бактерий, питающихся продуктами экзоосмоса растений (эккрисотрофами), на гидролитиков, разлагающих растительные остатки (Гордеева и др., 2012).

В результате изучения влияния влажности почвы на бактериальное разнообразие в ризосфере пшеницы (Arshad et al., 2006) были выявлены бактерии, которые доминировали при всех уровнях влажности (от 55 до 133%). Это грамположительные бактерии видов *Bacillus subtilis* (25%) и *Staphylococcus aureus* (30%). Всего было выявлено 9 видов бактерий. Кроме выше перечисленных в этот список вошли: *Enterobacter aerogenes* (11%), *Bacillus megaterium* (8%), *Klebsiella aerogenes* (8%), *Escherichia coli* (6%), *Kluyvera cryocrescens* (6%), *Providencia rettgeri* (3%), *Proteus vulgaris* (3%). Следует отметить преобладание факультативно-анаэробных бактерий в этом списке, которые были выделены на питательном агаре (NA) и пептонно-декстрозном агаре с дрожжевым экстрактом (PYDA) при температуре культивирования 37 градусов. Возможно, что именно температура способствовала выявлению тех родов энтеробактерий, которые отсутствуют в списке таксонов бактерий, характерных для ризосферы зерновых культур, приводимых другими авторами.

Из ризосферы пшеницы, ячменя и овса, произрастающих на полях в Греции, были выделены азотфиксирующие бактерии (Venieraki et al.,

2011). В результате идентификации изолятов на основании молекулярно-биологических методов было установлено, что они принадлежат к видам *Azospirillum brazileense*, *Az. zeae* и *Pseudomonas stutzeri*. Выделенные diaзотрофные бактерии были отнесены к группе ростстимулирующих (RPGPR) так как они образовывали индолилуксусную кислоту, стимулирующую рост растений. Кроме того, эти бактерии оказались способными к растворению фосфатов. В результате анализа состава бактериальных сообществ в ризосфере ячменя (*Hordeum vulgare* L.) были выявлены две доминирующие группы – цитофаги и флюоресцирующие псевдомонады (Johansen, Binnerup, 2002). При этом цитофаги составляли до 25% от изолятов бактерий, выделенных из ризосферы ячменя в мае, в то время как доля псевдомонад не превышала 10%. Общее количество бактерий, выявленных на питательных средах при высеве из ризосферы, увеличивалось в 3 раза от мая к августу. При этом численность бактерий в окружающей почве не изменялась. Установлено, что среди выделенных культур цитофаги оказались наиболее активными, участвуя в превращениях углерода, азота и фосфора в ризосфере.

В северных Гималаях изучали разнообразие и функции ризобактерий, выделенных из ризосферы пшеницы (Joshi, Bhatt, 2011). На основании фенотипических признаков были определены 133 штамма бактерий, среди которых 44% были отнесены к роду *Bacillus* и 24% - к роду *Pseudomonas*. Далее в порядке убывания в перечне родов следуют: *Serratia* и *Flavobacterium* (по 7%), *Micrococcus* (3%), *Klebsiella* (4%), *Azotobacter* (6%), *Enterobacter* (4%). В качестве минорных компонентов выделялись представители родов *Xanthomonas* и *Staphylococcus*. Все выделенные культуры были проверены на их способность стимулировать рост растений благодаря способности к образованию сидерофоров, индолилуксусной кислоты, антибиотиков и растворению фосфатов. Было установлено, что 29% штаммов были способны образовывать сидерофоры,

22% - растворять фосфаты и 12% - образовывать индолилуксусную кислоту.

Бактериальное разнообразие в ризосфере пшеницы было изучено и молекулярно-биологическими методами (Velazquez-Sepulveda et al., 2012). В исследуемом бактериальном сообществе были обнаружены представители всех классов протеобактерий, а также актинобактерии, бациллы, клостридии и некультивируемые бактерии. Доминировали бактерии родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Bacillus*. Они составляли до 40% от всей «ribosomal library». Далее в порядке убывания в перечень родов входили: *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Microbacterium*, *Geobacter*, *Cellulomonas*, *Achromobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gallionella*, *Herbaspirillum*, *Sinorhizobium*, *Xanthomonas*, *Pantoea*, *Mycobacterium*, *Nocardia*.

Из корневых тканей озимой ржи были изолированы актиномицеты и коринеформные бактерии, которые оказались способными продуцировать в среду индолил-3-уксусную (Мерзаева, Широких, 2010). Актиномицеты были представлены родами *Streptomyces* и *Micromonospora*, коринеформные бактерии – *Curtobacterium plantarum* и *Cellulomonas sp.* Изоляты коринеформ продуцировали индолилуксусную кислоту (ИУК) в количестве от 9 до 95 мкг/мл, штаммы актиномицетов – от 39 до 83 мкг/мл. Максимальное накопление ИУК происходило в период стационарной фазы роста культур. Обработка семян озимой ржи ауксинообразующими культурами актинобактерий способствовало повышению всхожести и более интенсивному росту проростков.

В диссертации Е.Г. Ивановой (2006) выявлено таксономическое разнообразие аэробных метилотрофных бактерий, ассоциированных с растениями. Впервые показано, что наряду с представителями рода *Methylobacterium* с растениями ассоциированы также представители родов *Methylovorus*, *Paracoccus*, *Xanthobacter*, *Methylophaga*, *Methylocystis*, *Methylococcus*. Электронно-микроскопические исследования показали

наличие мезоризотрофов внутри тканей колонизованных растений, культивируемых *in vitro*. Выделены и охарактеризованы мезоризотрофные изоляты, отнесенные к новому таксону *Schlegelia plantiphila* gen. nov., sp. nov. Впервые показана стимуляция мезоризобактериями и метанотрофами роста, морфогенеза и регенерации гнотобиотических растений табака, картофеля, льна и пшеницы, культивируемых *in vitro*. Впервые установлена способность метанотрофов и мезоризобактерий различного таксономического положения синтезировать и поставлять растениям фитогормоны ауксины (от 5 до 120 мкг/мл) и цитокинины (10-50 нг/л), а также витамин B12 (до 800 нг/л). Мезоризотрофы помогают растениям: участвуют в азотном обмене, поставляют витамины, регулируют рост и развитие растений посредством синтеза фитогормонов - цитокининов и ауксинов, повышают устойчивость растений при различных стрессах, способствуют выживаемости. По-видимому, мезоризотрофы поставляют растениям фитогормоны в оптимальном соотношении цитокинины/ауксины, что необходимо для правильного роста корней и побегов.

В работе микробиологов из Индии (Deu et al., 2012) изучалось влияние вида растения, стадии его вегетации и типа почвы на структуру бактериального сообщества ризосферы. Было установлено, что в одних случаях на состав сообщества большее влияние оказывает вид растения, в других – тип почвы. Известно, что в ризосферу поступают самые разнообразные вещества, включающие этилен, сахара, аминокислоты, органические кислоты, витамины, полисахариды и ферменты. Состав корневых экссудатов варьирует в зависимости от вида растения и стадии его развития (Jaeger et al., 1999.). В бактериальном сообществе ризосферы молодых растений доминируют r-стратеги, характеризующиеся высокой скоростью роста и использующие простые водорастворимые вещества. По мере роста корней начинают преобладать бактерии с относительно низкой скоростью роста и способностью использовать более сложные соединения

- К-стратеги. Так, соотношение популяций *Burkholderia cepacia* и *Paenibacillus azotofixans* в ризосфере маиса резко изменялось в течение роста растения (Nacamulli et al., 1997).

Одним из актуальных направлений развития экологического земледелия в настоящее время является использование микробиологических факторов, что даёт возможность существенно повысить урожай сельскохозяйственных культур. «Перспективным с этой точки зрения является создание в почве многокомпонентных систем, воспроизводящих оптимальные природные агрофитоценозы, обеспечивающих высокую устойчивость земледелия» (Моргун и др., 2009). Выше приведённая цитата взята из обзора, в котором обобщены литературные данные и результаты исследований авторов об агрономически полезной группе ростстимулирующих ризобактерий. Среди положительных эффектов этих бактерий рассмотрены: способность к фиксации азота, синтез веществ гормональной и антибиотической природы, мобилизация труднорастворимых фосфатов и разложение вредных химических соединений в почве. В спектр бактерий, способных к образованию гиббереллинов, входят представители таких типичных эпифитных бактерий как: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Clostridium*, *Agrobacterium*. Интересным представляется факт продуцирования большего количества фитогормонов в смешанных культурах, например – *Azospirillum brasilense* и *Arthrobacter diacomelloi* (Цавкелова и др., 2006). Предпосевная обработка семян бактериями выше перечисленных таксонов существенно стимулирует всхожесть и прорастание семян, рост и урожайность растений (Патыка, 2004).

В ризосфере, в отличие от свободной от корней почвы, доминируют грамотрицательные бактерии, причем преобладают флуоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas*. Некоторые штаммы бактерий *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. aureofaciens* (*chlororaphis*), *P. corrugata* и др. способствуют значительному улучшению роста и развития растений. В

настоящее время бактерии, обладающие совокупностью полезных для растений свойств, принято обозначать как PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) - ризобактерии, способствующие росту растений. Исследования этой перспективной для практического использования группы ризобактерий вызывают большой интерес, чем обусловлено регулярное проведение международных симпозиумов по проблеме изучения и практического использования PGPR. Среди PGPR различных таксономических групп выделяются широким набором полезных для растений свойств ризосферные PGPR *Pseudomonas*, которые являются потенциальными объектами агробιοтехнологии для разработки на их основе биологических средств защиты растений от фитопатогенов, а также биопрепаратов, стимулирующих рост и повышающих продуктивность растений (Боронин, 1998).

В спектр бактерий, которые наиболее часто выделяются из ризосферы в качестве антагонистов фитопатогенных микроорганизмов, входят следующие таксоны: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Serratia*, *Actinomycetes* (Dey et al., 2012). При этом в экологическом земледелии особое внимание в плане положительного воздействия на урожай растений обращается на представителей родов *Bacillus*, *Paenibacillus* и *Pseudomonas*. Установлено, что спорообразующие бактерии обладают множеством функций, обеспечивающих здоровье и урожай сельскохозяйственных культур. Они способны к образованию антибиотиков, стимуляторов роста, активной фиксации азота, положительно влияют на образование ризобиального и микоризного симбиозов. Среди наиболее широко распространённых видов бацилл – *Bacillus cereus*, *Bac. subtilis*, *Paenibacillus azotofixans*, *P. polymyxa* обнаружены культуры с наибольшей антибиотической активностью в отношении фитопатогенов (McSpadden Gardener., 2004).

По данным Недорезкова (2003) более 30 видов бактерий-эндофитов, например, *Aureobacterium*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*,

Enterobacter, *Erwinia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Yersinia* и другие могут служить в качестве основы биофунгицидов. Однако практическое применение, как правило, нашли препараты на основе *Bac. subtilis*. Это объясняется рядом их полезных свойств, таких как: высокая степень антагонизма к фитопатогенам, спорообразование, термостабильность, длительность хранения препаративных форм, низкая себестоимость производства и другие (Недорезков, 1998, 2003).

Таким образом, изучены многие полезные свойства бактерий, обитающих в ризосфере и филлосфере сельскохозяйственных растений и защищающих их от болезней, вредных химикатов и стимулирующих рост растений. Однако до сих пор считается недостаточно изученным вопрос о формировании бактериальных сообществ в процессе вегетации растений, их циркуляции по органам растений – от семян к корням и листьям, к цветкам и плодам. Практически отсутствуют данные о таксономическом составе бактериальных сообществ на родовом уровне в разных ярусах агроценоза.

3.3. Бактериальные комплексы почв агроценозов.

Характеристика микробных сообществ окультуренных почв проводится в разных странах, где развито интенсивное земледелие. Исследуются микробные комплексы различных частей возделываемых растений и почв. Для характеристики используются молекулярные методы и методы посева.

В штате Мичиган (США) исследовали участки, находившиеся в сельскохозяйственном обороте. Контролем служили участки, никогда не подвергавшиеся сельскохозяйственному использованию. Молекулярными методами исследования были выявлены заметные различия в бактериальных сообществах на участках, находившихся в сельскохозяйственном обороте и целинных почвах. Среди микробных сообществ почв, подвергавшихся различным режимам воздействия:

пахоте, действию удобрений, высеву новых растений, не обнаружено различий. Это говорит о том, что образовавшиеся микробные сообщества сохраняются в течение ряда лет, проявляя определенный консерватизм (Buckley, Schmidt, 1999). В более поздней работе авторы изучали структуры микробных сообществ в почве на серии земельных участков, которые включали культивируемые поля, поля на которых прекращено возделывание растений, и поля, никогда не культивируемые. Полученные данные показали, что почвенные микробные сообщества являются динамичными, способными к значительным изменениям во времени в связи с сезонностью. Однако они находились под влиянием местных условий окружающей среды и формировали узнаваемые типы структуры микробных сообществ (Buckley, Schmidt, 2003).

Ларкин (Larkin, 2003) изучал влияние различных севооборотов на микробные сообщества почв (США). Анализировались почвенные сообщества полей, на которых происходила смена культуры картофеля другими культурами: ячменем, клевером, зеленой фасолью, соей, просом. Контролем служила почва, на которой в течение нескольких лет выращивали только картофель. Самая 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. Исследования подобного рода важны для изучения распространения растительных заболеваний и для получения высоких урожаев здоровых растений (Larkin, 2003).

Методами культивирования микроорганизмов, а также молекулярными методами было проанализировано сезонное изменение микробного сообщества в почве под пшеницей на экспериментальной ферме в Голландии. Используя методы культивирования, выявили, что доминирующими являются грамположительные бактерии. Представители родов *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* выявлялись в течение всего года, тогда как *Bacillus* были обнаружены только в июле. Микробное разнообразие достигло минимума в июле. Молекулярными методами было выявлено, что в почве доминировали пять основных групп бактерий: *Acidobacterium*, *Proteobacteria*, *Nitrospira*, цианобактерии и зеленые серные бактерии. Не было обнаружено клонов, принадлежащих к грамположительным бактериям, которые доминировали в культивируемых изолятах. Результаты обоих методов выявили, что сообщество июля сильно отличается от сообществ других месяцев. Основываясь на собственных данных и анализах литературы, авторы предположили, что соотношение между количеством *Proteobacterium* и *Acidobacterium* может быть индикативным при определении окультуренности почв: в целинных почвах доминируют ацидобактерии, в окультуренных – протеобактерии (Smit, Leeflang, 2001).

Голландские исследователи в условиях теплицы изучили влияние ризосферы растения-хозяина и истории предыдущей обработки участка (монокультура кукурузы, севооборот, постоянное выращивание трав) на разнообразие видов и штаммов рода *Burkholderia*. Авторы показали, что главное влияние на состав сообщества *Burkholderia* оказывает режим предварительного использования земельного участка. Влияние видов культивируемых растений было меньшим (Salles et al, 2004).

Молекулярными методами были исследованы микробные сообщества почв, подвергавшихся внесению удобрений в течение длительного времени. Из почвенных образцов, подвергавшихся внесению удобрений в течение 100 лет, было получено 99 клонов, 2 клон были

определены как *Pseudomonas* spp., 56 из оставшихся 97 были сгруппированы в пять основных групп: альфа-, бетта- и гамма-протеобактерии, ацидобактерии, бактериоиды, нитроспиры и Firmicutes. 41 клон не был идентифицирован. 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, Deng, 2004).

На растениях могут встречаться микроорганизмы, вызывающие их заболевания, а также микроорганизмы, составляющие нормальную микрофлору. Численность эпифитов и их специфичность обусловлены химическим составом, количеством и степенью доступности экссудатов, выделяемых растениями и используемых бактериями в качестве питательных веществ.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВЫХ УДОБРЕНИЙ НА РОСТ РАСТЕНИЙ И БАКТЕРИЙ

4.1. Характеристика гуминовых удобрений

В последние годы за рубежом (Италия, Канада) и в нашей стране возрос интерес к удобрениям гуматного типа. Этот интерес объясняется, с одной стороны, той ролью, которую органическое вещество играет в повышении плодородия почв, и, с другой, появившимися многочисленными публикациями о положительном влиянии гуматных препаратов на рост и развитие растений, качество растениеводческой продукции.

Гуматы легко усваиваются растением, мобилизует его иммунную систему, стимулируют развитие мощной корневой системы, способствуют усиленному поступлению питательных веществ, интенсифицируют обменные процессы в растительной клетке, снижая содержание нитратов в 2 раза, но увеличивая содержание хлорофилла, витаминов, сахаров и

других ценных веществ (например, в пшенице – клейковины, в картофеле - крахмала). Эти вещества стимулируют развитие всех почвенных микроорганизмов, что способствует интенсивному восстановлению/образованию гумуса в почвах, перегноях и компостах. Совокупность указанных факторов приводит к росту урожайности на 20-40% и сокращению сроков созревания на 10-12 дней.

Положительный эффект от действия гуминовых веществ особенно возрастает в экстремальных условиях (высокие и низкие температуры, недостаток или избыток влаги, высокие концентрации минеральных компонентов, ядохимикатов). Эффективность использования гуминовых препаратов на практике подтверждена при обработке семян и рассады, корневых и некорневых подкормках, внесении гуматов в почву. Все эти агроприемы позволяют повысить урожайность и существенно улучшить качество сельхозпродукции. По данным из различных регионов России, прибавка урожая достигала по картофелю - 10-36%, капусте - 10-33%, моркови - 10-20%, свекле - 13-17,4%, льну - 16-30,7%, многолетним травам- 38,5-52,6%, зерновым - 10-16%.

Гуматы – это группа естественных высокомолекулярных веществ, которые, благодаря особенностям строения и физико-химическим свойствам характеризуются высокой физиологической активностью.

Механизм действия гуминовых веществ заключается в стимулировании всех биохимических процессов в организме растения не только на начальном этапе прорастания семян и образования корневой системы, но и дальнейшего роста и развития растения. Они изменяют проницаемость клеточных мембран, повышают активность ферментов, содержание хлорофилла и продуктивность фотосинтеза, а также стимулируют дыхание, синтез белков, сахаров, аминокислот и витаминов. Наряду с этим гуматы не токсичны, не канцерогенны и не обладают мутагенным действием, что в свою очередь создает предпосылки получения экологически чистой продукции (Христева, 1951; Фокин и др.,

1975). Гуминовые препараты получают из природного сырья: торфа, бурого угля, сапропеля.

Органическое удобрение БИОУД-1 (сертификат Госстандарта России № РОСС, ИХП 19. СОО36) - это продукт переработки навоза крупного рогатого скота в газовых установках, которые обеспечивают переработку до 3-х тонн навоза в сутки с получением до 180 м³ биогаза и до одной тонны органического удобрения (Панцхава и др., 2001, 2003 г).

Органическое жидкое удобрение БИОУД-1 получено путем переработки органических сельскохозяйственных отходов с помощью биогазовой установки по технологии разработанной ЗАО центр «Экономии ресурсов окружающей среды». Удобрение БИОУД-1 является экологически чистым концентрированным органическим удобрением, продуктом переработки навоза крупного рогатого скота в биотермических реакторах. В процессе переработки навоза уничтожаются семена сорных растений, а также фитопатогенные микроорганизмы, яйца гельминтов, отрицательно влияющие как на плодородие почвы, так и на рост и развитие растений. В состав жидкого органического удобрения входят, практически, все необходимые компоненты минерального питания: минерализованный азот в виде аммонийных солей органических кислот, окись фосфора, окись калия, микроэлементы в доступном виде и в соотношениях необходимых для растений. Содержание органического вещества достигает 72 % . В состав удобрений входят также биологически активные соединения - ферменты, весь набор аминокислот, витамины, ростовые вещества (ауксины, гиббереллины), антибиотики, фитонциды, многократно повышающие эффективность удобрений, а также содержит гуминоподобные соединения, способствующие оструктурированию почвы.

Жидкие удобрения получают путем сбраживания органической смеси в биореакторах при анаэробных, термофильных условиях (температура +42-57 градусов Цельсия) метановой среды. В продукте отсутствуют болезнетворная патогенная микрофлора, яйца гельминтов, семена

сорняков, нитриты, нитраты, фекальные запахи. Процесс воздействия на садовые растения начинается сразу же, как только БИУД внесли в почву. Его можно использовать как жидкое удобрение круглый год — при помощи инъектирования, поверхностного полива, опрыскивания. Подходит для комнатных и декоративных растений. Поскольку имеет слабую щелочную среду, способен снижать кислотность почв.

Препарат Гумистим - жидкое органическое удобрение, содержит в себе все компоненты гуминовых удобрений в растворенном состоянии: гумины, фульвокислоты, витамины, природные фитогормоны, микро- и макроэлементы в виде биодоступных органических соединений и споры полезных почвенных микроорганизмов. Фунгицидные и бактерицидные свойства препарата обусловлены присутствием природных фунгицидов и антибиотиков, выделяемых микрофлорой кишечника дождевого червя в процессе вермикультивирования (Ториков и др., 2009). Препарат выпускается по техническим условиям Российской Федерации ТУ – 0392-002-41267614-2004 предприятием ООО «ССХП «Женьшень» (РФ). Номер государственного регистра 019/002744. Введен в государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации с 2004 года. Гумистим, выпускаемый этой фирмой, имеет ряд положительных преимуществ: содержит живую бактериальную флору, включает ряд макро и микроэлементов, имеет в своем составе янтарную кислоту.

Препарат Гумистим - это комплекс натуральных экологически чистых и безопасных стимуляторов роста для развития растений. Его использование оказывает положительное действие на процессы роста, обмена и фотосинтеза, что способствует повышению урожая сельскохозяйственных культур. Препарат обладает следующими свойствами: повышает всхожесть и энергию прорастания семян, стимулирует корнеобразование у растений, способствует быстрому укоренению черенков, стимулирует рост и ускоряет развитие растений, снижает содержание нитратов в плодах и

овошах, препятствует поступлению тяжелых металлов и радионуклидов в растения, увеличивает содержание сахаров, белков и витаминов, устраняет хлороз и стимулирует цветение и плодоношение, усиливает устойчивость растений к заболеваниям, повышает качество урожая и продляет сроки его хранения, полноценный урожай созревает на 2-3 недели раньше срока.

В препарат Гумистим входят суммарно до 30 грамм/литр микроэлементы: сера, медь, цинк, бор, марганец, присутствует янтарная кислота.

4.2. Влияние гуминовых веществ на рост и развитие растений.

В настоящее время накоплено большое количество опытных данных, указывающих на положительное влияние гуминовых веществ на различные сельскохозяйственные культуры. Установлено, что при правильном использовании гуминовых веществ с учетом индивидуального подхода к различным культурам, к особенностям почв и свойств самих стимуляторов не только повышается урожайность культур, но улучшается качество при значительном снижении их себестоимости; увеличивается зимостойкость растений и их сопротивляемость болезням (Kulikova et al., 2006).

Гуминовые вещества обладают стимулирующим и адаптогенным действием на клеточном и субклеточном уровнях. Поэтому закономерным было предположить влияние этих веществ на ростовые процессы. Экспериментальное подтверждение этому было получено в многочисленных лабораторных и полевых опытах с различными по происхождению ГВ на разных с/х растениях. В этих опытах определялся диапазон концентраций, оказывающих положительный эффект на рост растений, и изучалось их влияние на продуктивность растений и качество урожая.

Результаты исследований свидетельствовали о наличии высокого

стимулирующего действия ГВ на ростовые процессы растений в начальную фазу развития. При этом выяснилось, что: усиливается корнеобразование растений, сопровождающееся развитием ассимиляционного аппарата и повышенным ростом надземной части растения (Комиссаров, Климова, 1971, Наумова и др, 1993); изменяется фосфорный обмен, что выражается в увеличении количества фосфорорганических соединений, принимающих участие в реакциях переноса и трансформации энергии, т.е. в растении накапливаются сахара при активном использовании поглощенного фосфора и усилении синтеза нуклеиновых кислот (Наумова 1993); ускоряется белковый обмен, что сопровождается усилением роста растений, снижением содержания нитратов в готовой продукции и улучшением ее качества (Sowden 1977); повышается интенсивность процессов дыхания, фотосинтеза и водообмена, растет концентрация хлорофилла и аскорбиновой кислоты. Отмечается четкая корреляция интенсивности дыхания и фотосинтеза растений, энергетического потенциала и активности окислительно - восстановительных ферментов с действием физиологически активных веществ, особенно в начальные фазы развития растения (Христева 1968, Бобырь 1984).

Еще в 70-е годы XX века были проведены первые научные исследования, показавшие, что гуминовые вещества оказываются во много раз эффективнее, нежели какие-либо другие известные до сих пор человеку - как органические, так и искусственные. Препараты, изготовленные на основе гуматов, содержат аминокислоты, полисахариды, углеводы, витамины, макро и микроэлементы, гормоноподобные вещества. Они относятся к высокомолекулярным соединениям, характеризуются устойчивостью, полидисперсностью. Гуматы обладают сорбционными, ионообменными и биологически активными свойствами. Гуминовые соединения способны усиливать защитные функции растительного организма. Защитное действие гуматов с наибольшей силой проявляется в

экстремальных условиях (высокая или низкая температура, засуха или переувлажнение, недостаточное количество света и кислорода в почве, накопление ядохимикатов). Благоприятно влияют гуматы не только на количественные показатели роста, но и на качество растительной продукции. В зависимости от культуры прирост составляет от 25 до 100%. Увеличивается также содержание белка, крахмала, нуклеиновых кислот, сахаров, что благоприятно сказывается на качестве сельхозпродукции (Городовая, 1995).

Исследования Горовой А.И. (1988г.) показали: обработка гуматом семян ярового ячменя резко активизировали поглощение семенами воды и набухание зерновок при проращивании. Усилилось дыхание, по сравнению с контролем на 100-150%, ускорилось прорастание, сформировалась более мощная корневая система.

Параллельный положительный эффект применения - повышение устойчивости растений к болезням и неблагоприятным погодным условиям. Особенно это эффективно для калиелюбивых растений (сахарная свекла, картофель, томат, морковь, капуста) - прибавка урожая до 50%.

Гуминовые удобрения, используемые в овощных, зернопропашных севооборотах снижают уровень кислотности, что дает со временем возможность снизить поступление тяжелых металлов в растения. Под влиянием гуматов растения лучше переносят избыточные дозы удобрений, особенно азотных, и повышенные дозы пестицидов (Куликова, 2008).

Применение жидкого органического удобрения существенно сказывается на увеличении урожайности сельскохозяйственных культур. Так урожайность картофеля увеличивалась на 18-20%, яровой пшеницы на 15-16% (Головков, 2001). По данным П.Н. Балабко двукратная внекорневая подкормка жидким органическим удобрением «БИОУД-1» позволила увеличить урожайность картофеля сорта Удача в среднем на

28-42 ц/га, сорта Сантэ на 32 ц/га, сорта Брянский деликатес на 17 ц/га (Балабко, 2012).

В результате полевых испытаний применение гумистима увеличило урожайность картофеля на 15-24% (Марухленко, 2008), а применение удобрения Гумистим для обработки семян дозой 5 л/т и растений дозой (2 л/га) в 2012 и 2013 гг. повышало урожайность зеленой массы гибридов кукурузы на 6,9-9,4%, зерна – на 4,0-12,2% (Шматко, 2015).

4.3. Действие гуминовых кислот на рост бактерий

Исследовали влияние гуминовых кислот разного происхождения на рост широкого круга культур бактерий из разных таксонов, выделенных из контрастных по условиям местообитаний: почвы и пищеварительных трактов дождевых червей *Aporrectodea caliginosa*. Более половины почвенных и кишечных изолятов из 170 протестированных штаммов росли на гуминовой кислоте из бурого угля как на единственном источнике углерода. Бактерии, выделенные из кишечника червей, росли с большей максимальной удельной скоростью на гуминовой кислоте, чем почвенные. Использование кишечными бактериями гуминовых кислот подтверждает возможность симбиотического пищеварения у дождевых червей с участием бактериальных симбионтов. Гуминовая кислота в концентрации 0.1 г/л стимулировала рост 66 из 161 штамма как почвенных, так и кишечных бактерий, на среде Чапека с глюкозой (1 г/л), вероятно, выступая в качестве регуляторов клеточного метаболизма. Бактерии из кишечника росли с большей максимальной удельной скоростью на среде с добавкой гуминовой кислоты, чем почвенные изоляты. Наиболее активный рост среди кишечных изолятов наблюдался у *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas putida*, *Delftia acidovorans*, *Microbacterium terregens*, *Aeromonas* sp., а среди почвенных – у представителей рода *Pseudomonas*. На примере бактерии рода *Pseudomonas* показано, что реакция бактерий на действие гуминовых кислот проявлялась на штаммовом уровне.

Гуминовый препарат “Флексом” стимулировал рост углеводород-окисляющей бактерии *Acinetobacter sp.* Этот эффект может быть использован для создания нового препарата с повышенной активностью бактерий-деструкторов нефти и нефтепродуктов (Тихонов и др., 2010).

ГЛАВА 5. СОРНЫЕ РАСТЕНИЯ

5.1. Полезные свойства сорных растений

Несмотря на то, что мы уже описывали в 1-ой главе полезные свойства сорняков, представляется уместным перед описанием их лечебных свойств напомнить о наиболее значимой их роли в агроценозах. Благодаря корневой системе сорные растения рыхлят даже самую твёрдую почву, способствуют накоплению в почве органического вещества, тем самым улучшают гумусное состояние почвы. Сорные растения улучшают водный режим почвы за счет накопления влаги в пахотном слое, что ведет к использованию ее культурными растениями и повышает их засухоустойчивость. Они увеличивают численность полезной фауны, в том числе насекомых-опылителей и дождевых червей. На разных органах сорных растений формируются сообщества микроорганизмов, среди которых найдены представители, которые стимулируют рост культурных растений. Многие сорные растения являются хорошими медоносами и источниками получения лекарственного сырья.

Таким образом, не следует относиться к сорнякам как к растениям, приносящим исключительно вред. Всегда необходимо помнить о том, что сорняки – неотъемлемая часть агробиоценоза, участвующая в поддержании природного равновесия.

В настоящем разделе лечебные свойства будут описаны только для тех сорных растений, которые изучались в настоящей работе.

Лебеда раскидистая (*Atriplex patula*) - однолетнее травянистое растение семейства Маревых. Лебеда – очень полезное растение, в траве содержится немалое количество сапонинов, аскорбиновой кислоты, эфирных масел, бетаина, каротина, белков, клетчатки, рутина, минеральных солей, микро- и макроэлементов и витаминов групп А, С, Е, Р. Лебеда помогает в излечении: неврозов и депрессий, кашля и простуды, запоров и пищевых отравлений, радикулита, подагры и геморроя.

Вещества, содержащиеся в растении, способствуют устранению болезненных ощущений, очищению кожи, а также снятию воспалительных процессов. (Трухачев, 2006).

Осот полевой (*Sonchus arvensis*) - многолетнее травянистое растение семейства Астровых. Сок осота используют для лечения печени, а все растение – при геморрое и подагре. «Млечный» сок осота является мощным мочегонным средством, а также им выводят бородавки. Измельченным свежим листом лечат кровоточащие раны. Молодые листья (их предварительно вымачивали для удаления горечи) применяют как витаминное средство (готовят салаты и супы), особенно ранней весной. Надземную часть осота в виде настоев или отваров используют как тонизирующее, противохолерное, противовоспалительное. Корни применяют при нефрите, а также как общеукрепляющее и кровеостанавливающее средство. Вареные корни по вкусу похожи на топинамбур, поэтому их тоже используют в салатах (Трухачев, 2006).

Пастушья сумка обыкновенная (*Capsella bursa-pastoris*) – однолетнее травянистое растение семейства Крестоцветных. Отвар из надземной части растения в народной медицине используют при дизентерии, гастрите, кровотечениях, туберкулезе легких, малярии, заболеваниях сердца, печени, гинекологических и венерических болезнях, при простудных заболеваниях, нарушении обмена веществ, для лечения гнойных ран; настой - при гипертонической болезни, колитах. Экстракты пастушьей сумки понижают артериальное давление, усиливает моторику

кишечника и матки, ускоряют свертывание крови. Сок используется при злокачественных язвах и раке желудка, опухолях, раке и фиброме матки, при поносах, желчно- и мочекаменной болезнях, подагре, ревматизме, малярии, болезнях сердца, печени, болях в костях, нарушении обмена веществ, для лечения гнойных ран (Путырский, 2010).

Пикульник обыкновенный (*Galeopsis tetrahit*) – однолетнее травянистое растение семейства Яснотковых. Пикульник – растение, которое официальной медициной РФ не используется. В народной медицине надземную часть пикульника в виде настоев и отваров используют внутрь для возбуждения аппетита и регуляции пищеварения в качестве противовоспалительного и обезболивающего средства, используется при болезнях почек, при бронхитах, астме (Трухачев, 2006).

Подмаренник настоящий (*Galium verum*) - многолетнее травянистое растение семейства Мареновых. Растение обладает противовоспалительным, антисептическим, обезболивающим, желчегонным, мочегонным, слабительным, кровоостанавливающим, способствует заживлению ран. Корневища подмаренника широко используют: в тибетской медицине - при пневмонии, заболеваниях почек, при внутренних кровоизлияниях; в монгольской – при желудочно-кишечных заболеваниях и болезнях сердечно-сосудистой системы, а также в составе сборов, особенно при инфекционных заболеваниях. В народной медицине - при гнойных ранах, ушибах, порезах, ожогах. В Забайкалье (настой) - при болезнях печени. В Казахстане (отвар) - при респираторных инфекциях (Путырский, 2010).

Расторопша пятнистая (*Silybum marianum*) - однолетнее травянистое растение семейства Сложноцветных. Препараты расторопши применяют для лечения острых и хронических гепатитов, цирроза, токсико-метаболических поражений печени. Противопоказаний и побочного действия не установлено. Из плодов расторопши пятнистой изготавливают отечественный препарат силибор. Силибор используется

при лечении хронических гепатитов, жировой дистрофии печени, лекарственных и токсических поражений печени. Аналогичные препараты из расторопши пятнистой выпускают в Болгарии (карсил) и Германии (легалон) (Задорожный, 1992).

Сныть обыкновенная (*Aegopodium podagraria*) - многолетнее травянистое растение семейства Зонтичных. В народной медицине настой из надземной части растения применяют при ревматизме, подагре, желудочно-кишечных заболеваниях, болезнях почек и мочевого пузыря. Сок (внутрь) - при болезнях почек и мочевого пузыря, дыхательных путей, головокружениях; растение используется в гомеопатии. В Польше растение применяется - при ревматизме, болезнях пищеварительного тракта, дыхательных путей, подагре, артрите (Путырский, 2010). В состав травы входят невероятно полезные флавоноиды, кверцитин и кемферол. Эти вещества обладают высокой противоопухолевой активностью и противовирусной активностью, помогают избавиться от аллергии, укрепляют и повышают эластичность стенок кровеносных сосудов. Фалькаринол и фалькариндинол оказывают противогрибковое действие, а фалькаринол снижает риск возникновения онкологии. Американские ученые после экспериментов с апигенином обнаружили у этого вещества способность уменьшать размеры раковых опухолей, приостанавливать прогресс болезни и постепенно полностью уничтожать ее. Исследование этих веществ может привести к появлению препарата против рака с совершенно новым принципом действия.

Сурепка обыкновенная (*Barbarea vulgaris*) - Двухлетнее травянистое растение семейства Капустных. Сурепка обыкновенная обладает мочегонным, ранозаживляющим, тонизирующим свойствами. В народной медицине сурепку используют для лечения эпилепсии, инсульта, паралича, отеков, а также для повышения потенции. Ещё сурепка полезна при астеническом синдроме, хронической усталости, как профилактическое средство гипо- и авитаминозов. Из травы сурепки

обыкновенной готовят и принимают настой. Из молодых розеточных листьев этого растения ранней весной или поздней осенью готовят салаты. Также употребляют пророщенные семена сурепки. Пророщенные семена добавляют в первые блюда, посыпают ими мясные блюда. В тибетской народной медицине ранее маслом из семян сурепки лечили проказу. В настоящее время масло из семян сурепки используют в консервной промышленности и хлебобулочном производстве. Из цветков сурепки изготавливают жёлтый краситель для тканей из натурального волокна (Трухачев, 2006).

5.2. Бактериальные сообщества сорных растений.

Бактериальное население эпифитного комплекса сорных растений изучено очень мало. Исследователями из Пакистана (Mukhtar et al, 2010) были определены эпифитные и эндофитные бактерии на 4-х видах сорных растений: вьюнок полевой, молочай солнцегляд, пиретрум, марь белая. В отличие от работ других исследователей среди эпифитов не обнаружены псевдомонады и артробактер, но при этом были выделены бактерии родов *Burkholderia*, *Acidovorax*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Peptococcus* и *Kurthia*. Американскими микробиологами (Bodenhausen et al, 2013) были изучены эпифитные бактериальные сообщества уникального сорного растения – Резуховидка Таля (*Arabidopsis thaliana*). Это растение-космонавт, растение – минер, оно имеет большое значение и как объект изучения генома растений. Что касается таксономического состава бактериальных комплексов этого растения, то он практически близок к таковому, изученному для других сорных и лекарственных растений. Авторы установили, что бактериальные эпифиты на листьях и корнях Резуховидки представлены следующими родами: *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, *Massilia*, *Rhizobium*, *Variovorax*. Микробиологами из Колумбии (Kremer et al, 1990) были выделены культуры ризобактерий из 7 видов сорняков. Флюоресцирующие псевдомонады составляли от 11 до

42% от всех выделенных культур. Другие бактерии, которые наиболее часто выделялись с поверхности корней сорняков, были представлены следующими таксонами: *Erwinia herbicola*, *Alcaligenes spp.*, *Flavobacterium spp.* Канадскими микробиологами (Sturz et al., 2001) были изучены сорные растения в качестве источника выделения ростстимулирующих ризобактерий в агроценозах. В качестве объектов исследования были взяты 6 видов сорных растений. Многие из них являются одновременно лекарственными растениями (торица, осот, итальянский райграсс, пырей ползучий). Наиболее часто выделялись представители родов *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*. Культуры этих бактерий значительно стимулировали рост картофеля, увеличивая вес побегов и корней. Все выше перечисленные авторы высказывают точку зрения, согласно которой следует обратить особое внимание на сорные растения, изучая их бактериальное разнообразие с целью поиска ростстимулирующих бактерий, антагонистов фитопатогенов и их положительного влияния на качество почвы.

Большинство работ по лекарственным растениям, к которым относится большая часть и сорных растений, посвящено анализу физиологии и метаболитов этих растений и их использованию в медицине. Бактериальное население эпифитного комплекса лекарственных растений изучено очень плохо. Приведём лишь несколько работ, в которых исследовались бактериальные эпифиты и эндофиты на листьях и корнях лекарственных растений. В статье Бороздиной, Заикиной (2010) объектом исследования являлись микроорганизмы, выделенные с поверхности листьев и цветков семейства Сложноцветных (*Compositae*): Василёк синий (*Centaurea cyanus*L.), Ромашка душистая (*Matricaria matricarioides*L.), Подсолнечник однолетний (*Helianthus annuus*L.), Календула лекарственная (*Calendula officinalis*). В результате было показано, что доминантами на этих растениях являются представители родов *Pseudomonas* и *Bacillus*. При этом псевдомонады доминировали на

ранних стадиях развития растений, а бациллы – на поздних (осенью). В перечне родов упоминаются так же представители родов *Erwinia* и *Lactobacillus*, а на цветках – *Arthrobacter* и *Rhodococcus*. Анализ семян лекарственных растений, представленных укропом, льном и календулой, показал доминирование на их поверхности представителей наиболее широко распространённых на растениях и в почве родов *Pseudomonas* и *Bacillus*. На видовом уровне это были *Ps. fluorescens*, *Ps. herbicola*, *Ps. putida*, *Bac. subtilis*, *Bac. cereus* (Бороздина, Мануйлов, 2011).

В работе польских исследователей (Rekosz-Burlaga et al., 2014) изучались бактерии эпифитного и эндофитного комплекса на растениях зверобоя (*Hipericum perforatum*). Их численность колебалась в пределах 10^6 – 10^7 КОЕ/г для копитрофных бактерий и 10^5 .- 10^6 КОЕ/г для олиготрофных (*Azotobacter*). В качестве эндофитных бактерий были выделены представители видов *Alcaligenes faecalis* и *Bacillus licheniformis*. В качестве эпифитов приводится список многих родов и видов, наиболее часто обнаруживаемых в процессе отбора образцов на разных стадиях онтогенеза зверобоя. Это: *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Pantoea agglomerans*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus cereus*, *Rhodococcus sp.*, *R. erythropolis* and *Cellulosimicrobium cellulans*. Авторы исследовали так же антибиотическую активность выделенных культур бактерий по отношению к фитопатогенным грибам. Было установлено, что бактерии видов *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas putida* и *Pantoea agglomerans* способны подавлять рост исследованных фитопатогенных грибов.

В обзоре микробиологов из Индии (Sarathambal et al., 2014), посвященном анализу положительной роли эпифитных бактерий сорных и лекарственных растений, приводится перечень разнообразных функций бактериальных сообществ, формирующихся в ризосфере различных видов растений. Приводим основные выводы из этого обзора.

Главные функции эпифитных бактерий: выделение ростстимулирующих веществ, облегчение поглощения некоторых веществ из почвы и уменьшение или предотвращение растений от заболевания. Стимулирование роста растений происходит за счёт симбиотических и ассоциативных PGPR бактерий, которые синтезируют такие растительные гормоны, как ауксины, цитокинины, гиббереллины, этилен и индолил-3-уксусную кислоту. PGPR могут также способствовать растворению минеральных фосфатов и других питательных веществ, повысить устойчивость к стрессам, стабилизацию почвенных агрегатов, способствовать улучшению структуры почвы и содержанию органических веществ.

Свободно живущие diaзотрофы в почвах и на растениях обеспечивают природный источник фиксированного азота во многих наземных экосистемах. В Бразилии ряд тропических сорных трав, включая *Brachiaria humidicola*, *B. decumbens*, *Paspalum notatum* и колосья проса проявили относительно высокие показатели фиксации азота. Восемьдесят процентов микроорганизмов, изолированных из ризосферы различных культур, способны продуцировать ауксины как вторичные метаболиты. Бактерии, принадлежащие к родам *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Rhizobium*, *Alcaligenes*, *Acetobacter*, *Bradyrhizobium* оказались способными производить ауксины, которые стимулируют рост растений. Все изоляты из ризосферы трав Бермудских островов проявили способность к выделению таких фитогормонов как индолил-3-уксусная и гибберелловая кислоты. Ризобактерии могут подавлять рост различных фитопатогенов. Среди PGPR бактерий наибольший спектр антагонистов обнаружен среди флюоресцентных псевдомонад., в том числе выделенных из сорных трав. Штаммы *Bacillus subtilis*, изолированные из ризосферы амброзий, обладали способностью подавлять рост таких патогенов, как *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides* и *Alternaria solani*.

Одним из механизмов, посредством которых ризобактерии стимулируют рост растений, является растворение ими минералов. Фосфор является вторым по значимости после азота необходимым элементом для роста сельскохозяйственных культур. Некоторые микроорганизмы (бактерии, грибы, актиномицеты) способны растворять такие недоступные формы неорганических фосфорных соединений как трикальцийфосфат, фосфаты железа, алюминия за счёт выделения различных органических кислот - янтарной, лимонной, яблочной, фумаровой, глиоксалевой и глюконовой кислот. Кроме фосфора такие элементы как Zn, Fe и Mn, оказались недостаточными в большинстве почв. Включение бактерий, растворяющих цинк, как bioinoculant в продукции растениеводства, особенно выгодно для такой страны, как Индия, имеющей высокий уровень дефицита цинка (более 70 процентов). Такие бактерии как *Bacillus mucilagenosus* и *Bacillus edaphicus* являются примером микроорганизмов, которые используются как биоинокулянты. Среди бактерий, растворяющих калий, которые играют важную роль в поддержании структуры почв и стабилизации почвенных агрегатов, названы такие как *Bacillus sp.*, *Serratia sp.*, *Enterobacter sp.*. Выделенные из различных сорных трав бактерии оказались способными к растворению фосфора, цинка и минерализации калия.

Авторы делают выводы, согласно которым проведённые ими исследования открывают возможности использования сорняков для стимуляции роста растений и для смягчения последствий стресса и создания устойчивого растениеводства с меньшим количеством химикатов. Предварительный анализ показал, что ризосфера сорняков колонизирована специфическими микробными сообществами, Было бы очень интересно исследовать молекулярное взаимодействие между растениями и микробами в ризосфере сорных растений для дальнейшего использования новых микробов в целях улучшения роста

сельскохозяйственных культур, особенно в условиях повышенной нагрузки на агроценозы.

ГЛАВА 6. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

6.1 Объекты исследования

Исследования проводились в Солнечногорском районе Московской области, на территории Учебно-опытного почвенно-экологического центра МГУ им. М.В. Ломоносова «Чашниково». Станция расположена вдоль Ленинградского шоссе в 43 км от Москвы в верховьях реки Клязьмы.

Объектами исследования явились культурные и сорные растения, а также дерново-подзолистая почва под растениями.

Из культурных растений для исследования были взяты: картофель - сорт «Брянский деликатес», морковь посевная (*Daucus carota* subsp. *sativus*), свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*), овес посевной (*Avena sativa* L.), вика посевная (*Vicia sativa* L.), горох посевной (*Pisum sativum*), которые произрастали на дерново-подзолистой хорошо окультуренной среднесуглинистой почве.

Из сорных растений исследовали: пастушья сумка обыкновенная (*Capsella bursa-pastoris*), лебеда раскидистая (*Atriplex patula*), пикульник обыкновенный (*Galeopsis tetrahit*), осот полевой (*Sonchus arvensis*), подмаренник настоящий (*Galium verum*), сурепка обыкновенная (*Barbarea vulgaris*), сныть обыкновенная (*Aegopodium podagraria*), расторопша пятнистая (*Silybum marianum*).

В качестве объекта исследования служила дерново-подзолистая почва под культурными и сорными растениями.

Все сорные растения относятся к апофитам (растения местной флоры, которые перешли из естественной среды обитания на территории, изменённые хозяйственной деятельностью человека: пашни, пастбища).

Образцы культурных и сорных растений были отобраны на разных стадиях развития растений – всходы, – период цветения/образование метелок – стадия созревания корнеплодов, бобов (культурные растения), стадия созревания семян (сорные растения). Одни и те же виды сорняков были взяты с края поля, с середины поля и в смешанном лесу.

Анализировались листья, цветки, корни, семена и корнеплоды растений.

Почва опытного поля под культурными растениями дерново-подзолистая, хорошо окультуренная среднесуглинистая, на покровных суглинках, подстилаемых красно-бурой суглинистой мореной (рис.1), которая имеет следующую характеристику: гумус 6,05%; рНКС1 6,8; P₂O₅, 360,9 мг/кг; K₂O 556.0 мг/кг; NH₄ 13,4мг/г; NO₃ 92,6 мг/кг; Са 22.5мг-экв/100г; Mg 3.5 мг-экв/100г. Согласно агрохимическим показателям почву опыта можно отнести к группе хорошо окультуренных почв, обладающих высоким уровнем плодородия (Хуснетдинова Т.И., 2016).

В смешанном лесу, где отбирались исследуемые растения, преобладали лиственные породы, почва – дерново-подзолистая, суглинистая, на покровных суглинках, подстилаемых флювиогляциальными песками. Исследуемая почва имеет следующие характеристики: рН_{сол} - 3,95; содержание гумуса - 2,02 %; содержание K₂O-0,37 мг/100 г почвы; P₂O₅ – 4,6 мг/100 г почвы.



- Ар** 0-23 Средний суглинок, темно-серый с коричневым оттенком, свежий, структура мелко-глыбистая, мелко-средне комковатая, мягкий, плотное структурное сложение, Fe-Mn конкреции, редкие червоточины, щебень, переход ясный, граница волнистая, мелкопористый
- Ар'** 23-42 Средний суглинок, свежий, серовато-бурый, мелко-средне-комковатая структура, твердоватый, плотное структурное сложение, Fe-Mn конкреции, редкие червоточины, редкие корни, переход резкий, граница рваная, мелкопористый
- Ев** 42-53 Средний суглинок, свежий, окраска светло-серая с охристыми пятнами, мелкокомковатая структура, твердоватый, плотное сложение, Fe-Mn конкреции, переход заметный, граница затечная, мелкопористый, встречаются червоточины, средняя разложившиеся растительные остатков, SiO₂ присыпка,
- Вt** 53-70 Средний суглинок, свежий, окраска неоднородная светло-серая с охристыми пятнами, средне-мелкокомковатая структура, твердоватый, единичные корни, глинистые кутаны, переход постепенный, граница затечная, микропористый
- Вс** 70-89 Свежий, средний Fe-Mn конкреции, суглинок, окраска неоднородная, рыже-бурая с серыми пятнами, плитчато-ореховато-призмовидная структура, твердый, плотное сложение, мелкопористый, переход постепенный, граница различная
- С** 89-125 Средний суглинок, свежий, окраска неоднородная, красновато-коричневая с серыми пятнами, потеками, языками, структура неясно выраженная, плитчатая, твердый, плотное структурное сложение, Fe-Mn конкреции, мелкопористый

Рисунок 1. Дерново-подзолистая хорошо окультуренная среднесуглинистая почва.

6.2. Методы исследований

Образцы листьев, корней и цветков сорных растений измельчали с помощью ножниц. Взвешивали по 1 г этих субстратов, а также почвенных образцов и вносили их в колбы, содержащие 100 мл стерильной воды. Для десорбции микроорганизмов из образцов использовали Вортекс, затем отделяли раствор центрифугированием (5000 об/мин, 5 мин), численность и таксономический состав десорбированных бактериальных комплексов исследовали методом посева. Посев проводили в пятикратной повторности из разведений 10^5 – 10^8 на агаризованную глюкозо-пептонно-дрожжевую среду (г/л): пептон – 0.5, глюкоза – 0.5, дрожжевой экстракт – 0.5, гидролизат казеина – 0.5, агар – 10, мел – 5, вода – 1л. В среду вносили 50мг нистатина для ингибирования развития грибов. Посевы культивировали в течение 7-10 суток при комнатной температуре. После подсчета общего числа колоний проводили их микроскопирование в световом микроскопе с фазово-контрастным устройством (ЛОМО, Микмед-2, Россия). Основных представителей бактерий, выросших на плотной среде, выделяли в чистые культуры. Морфологические признаки изучали у молодых 24 час. и 3-5-сут культур. Численность бактерий выражали в колониобразующих единицах на г субстрата (КОЕ/г). Родовую принадлежность выделенных культур бактерий устанавливали на основании морфологических, культуральных и хемотаксономических признаков, используя «Определитель бактерий Берджи» (1997), а также методическое пособие (Лысак с соавт., 2003). Кроме того, для идентификации микроорганизмов до рода были использованы диагностические системы, позволяющие 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.

Определение таксономического состава представителей грамотрицательных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий проводили с помощью молекулярной диагностики 16SpPHK, выделяя ДНК из клеток чистых культур с последующей амплификацией и секвенированием.

Выделение ДНК. Для экстрагирования тотальной ДНК из образцов филлосферы, ризосферы и из клеток чистых культур микроорганизмов применяли стандартные методики, модифицированные на кафедре биологии почв МГУ (PowerSoil DNA IsolationKit (MO BIO, США) (Манучарова с соавт., 2008).

Выбор олигонуклеотидных праймеров и амплификация ДНК

Для проведения полимеразной цепной реакции и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16SpPHK была использована система универсальных праймеров (Манучарова с соавт., Edwards et al, 2008; 1989).

Филогенетический анализ

Для предварительного анализа полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S rRNA использовали программное обеспечение баз данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Анализ и выравнивание последовательностей проводили с помощью программы BioEdit (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Построение дендрограмм осуществляли с помощью алгоритма neighbor-joining (NJ) в программе MEGA 4. Статистическую достоверность филогенетических реконструкций оценивали методом «Bootstrap» путем построения 1000 альтернативных деревьев (Thompson et al, 1994). Вновь полученные последовательности генов были депонированы в базу данных нуклеотидных последовательностей (GenBank) с присвоением им индивидуальных номеров доступа.

Для изучения влияния препаратов Гумистим и БИОУДа-1 на урожай картофеля была использована следующая схема опыта:

1. Фон – N₁₀₀P₁₂₀K₁₂₀ (Контроль)
2. Фон (N₁₀₀P₁₂₀K₁₂₀) + Гумистим разведение с водой в соотношении 1:10
3. Фон (N₁₀₀P₁₂₀K₁₂₀) + БИОУД-1 разведение с водой в соотношении 1:10

Из препарата Гумистим и БИОУД-1 для внекорневой подкормки картофеля готовили рабочий раствор: на 1 га 5 л препарата + 50 л воды

Для изучения влияния БИОУД-1 на урожай вики и овса жидкое органическое удобрение вносилось на растения путем распыскивания (в разведении с водой в соотношении 1:10) в период цветения вики и образования метелок овса.

Для определения антибиотической активности применялся метод агаровых блоков. Поверхность питательного агара, пригодного для развития испытуемого организма и образования им антибиотического вещества, засеивается сплошным «газоном» фитопатогенной бактерии. После того, как этот организм хорошо вырастет, 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*, *Pseudomonas syringae*, *Clavibacter michiganensis*, *Erwinia carotovora*. После 18-20 часов инкубации в термостате при температуре, благоприятной для развития тест-организмов, вокруг агаровых блоков образуются зоны ингибирования или задержки роста тест-организмов. По диаметру зон судят об антибиотической активности изучаемого организма (Егоров, 1957).

Rathayibacter tritici вызывает желтый слизистый бактериоз пшеницы, *Pseudomonas syringae* вызывает бурое слизеточение, обморожения, повреждения плодов и пятнистость листьев. *Clavibacter michiganensis* вызывает заболевание, которое проявляется в виде увядания и некрозов на стеблях, листьях и плодах во время цветения растений. Увядание начинается с нижних ярусов листьев. Края таких листьев желтеют и

скручиваются. Бактериоз проявляется в виде коричневых язвочек (из них может выступать желтая слизь), на молодых чашелистиках, стеблях, черешках и особенно на плодоножках. *Erwinia carotovora* вызывает болезни картофеля и других растений, называемые чёрная ножка. Бактерии поражают как надземные части растения, так и подземные, в том числе и клубни, вызывая потемнение и гниение тканей, скручивание и пожелтение листьев.

ГЛАВА 7. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

7.1. Динамика численности и таксономической структуры эпифитных и почвенных бактериальных сообществ в процессе развития сельскохозяйственных растений.

Всего было проанализировано 120 образцов сельскохозяйственных растений, включающих семена, листья, цветки, корни, корнеплоды, отобранные на разных стадиях развития растений.

На поверхности всходов картофеля численность бактерий составила всего лишь десятки тысяч КОЕ/г. На стадии бутонизации количество бактерий на наземных и подземных органах возросло на 4-6 порядков и составило $1.2 \cdot 10^8$ – на стеблях и $2.7-5 \cdot 10^{11}$ КОЕ/г на листьях и корнях картофеля (табл.1). Такая высокая численность связана со вспышкой развития эпифитных бактерий в период с очень высокой летней температурой и наличием влаги в виде обильной росы по утрам - т.е. созданием оптимальных условий для размножения бактерий. На стадии цветения картофеля наблюдали уменьшение численности бактерий на листьях и стеблях на 2-4 порядка, при этом количество бактерий на цветках и корнях было высоким и составило $5 \cdot 10^8$ КОЕ/г. На стадии созревания клубней картофеля численность прокариотных микроорганизмов на корнях сохранилась на том же уровне, в то время как

на надземных органах она увеличилась на 2 порядка по сравнению со стадией цветения (табл. 1).

Таблица 1. Динамика численности бактерий в филлосфере и ризосфере картофеля (КОЕ/г)

Вегетационные органы	Всходы	Стадия бутонизации	Стадия цветения	Стадия созревания корнеплодов
Листья	$(4,2 \pm 0,9) * 10^4$	$(2,74 \pm 1,16) * 10^{11}$	$(5,8 \pm 0,7) * 10^7$	$(4,18 \pm 1,3) * 10^9$
Цветки	-	-	$(5,3 \pm 1,7) * 10^8$	-
Корни	-	$(5,04 \pm 2,7) * 10^{11}$	$(5,2 \pm 0,7) * 10^8$	$(4,62 \pm 0,5) * 10^8$
Клубни	-	$(3 \pm 1,3) * 10^8$	-	-

Таким образом, максимальной численности эпифитное бактериальное сообщество на надземных и подземных органах картофеля достигало в период бутонизации, уменьшаясь на стадии цветения и опять увеличиваясь на стадии созревания клубней.

Для бактериальных комплексов свёклы и моркови наблюдали другие закономерности – на листьях и корнях этих растений численность бактерий изменялась незначительно – она колебалась в пределах 10^7 - 10^8 КОЕ/г, на корнеплодах она составила 10^6 КОЕ/г (табл.2). Отсутствие таких резких колебаний в плотности бактериальных популяций на этих овощных культурах, в отличие от картофеля, связано с отсутствием дождей и засухой в те годы, когда отбирались образцы

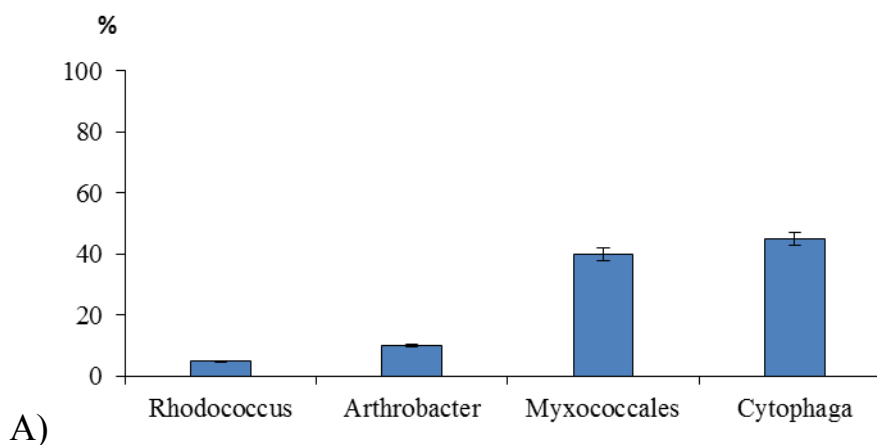
На клубнях картофеля было обнаружено 2 доминанта – представители порядка Мухососcales и рода *Cytophaga*. В качестве минорных компонентов выделялись актинобактерии – представители родов *Arthrobacter* и *Rhodococcus*. При прорастании на всходы картофеля переходили миксобактерии и цитофаги, которые были выявлены в качестве двух доминантов. Актинобактерий не было обнаружено (рис2).

Таблица 2. Динамика численности бактерий в филлосфере и ризосфере моркови и свеклы (КОЕ/г)

Растение	Вегетационные органы	Всходы	Цветение	Созревание корнеплодов
Морковь	Листья	$8,6 \cdot 10^8$	$1,12 \cdot 10^8$	$4,6 \cdot 10^8$
	Корни	$8,6 \cdot 10^8$	-	-
	Корнеплоды	-	$4,8 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$
Свекла	Листья	$1 \cdot 10^7$	$8,6 \cdot 10^7$	$1,46 \cdot 10^7$
	Корни	$1,4 \cdot 10^9$	$1,62 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^6$
	Корнеплоды	-	$1,62 \cdot 10^6$	$6,2 \cdot 10^6$

Динамика таксономической структуры бактериальных сообществ в процессе вегетации картофеля.

В период бутонизации и цветения картофеля на листьях доминантами становятся актинобактерии – *Rhodococcus* и *Arthrobacter*. По-видимому, эти бактерии попали в филлосферу из почвы. На стадии созревания клубней на листьях в качестве монодоминанта были выделены представители энтеробактерий – бактерии рода *Pantoea* (бывшая *Erwinia*). Эрвинии были выявлены и на цветках картофеля в качестве доминанта (рис.3,4).



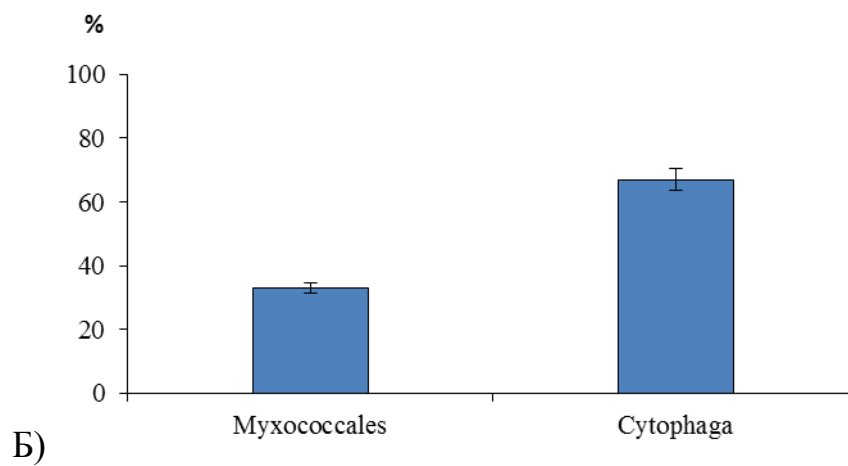
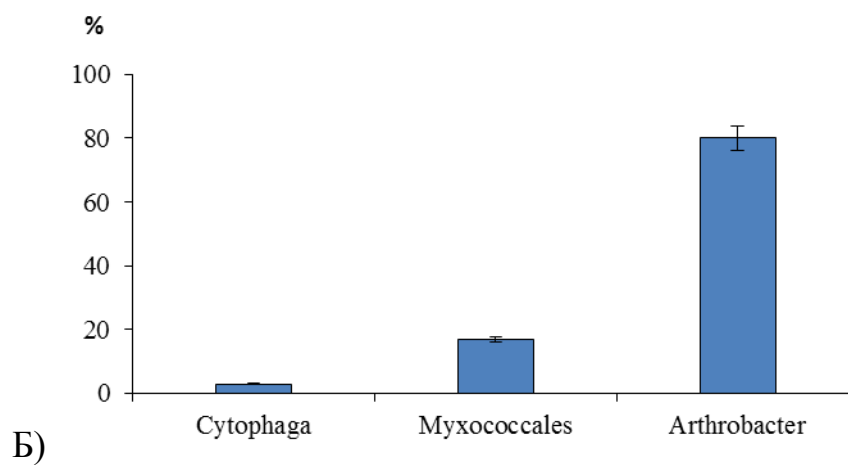
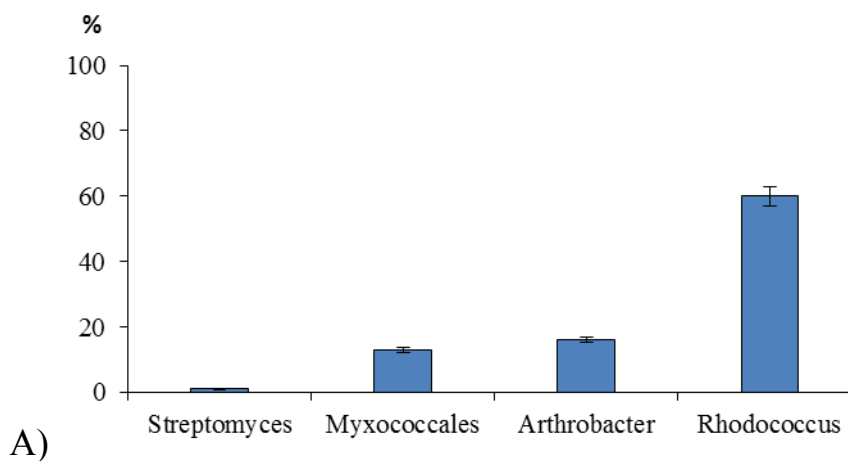


Рисунок 2. Таксономическая структура бактериальных сообществ на всходах и клубнях картофеля

А- Клубни; Б – Всходы



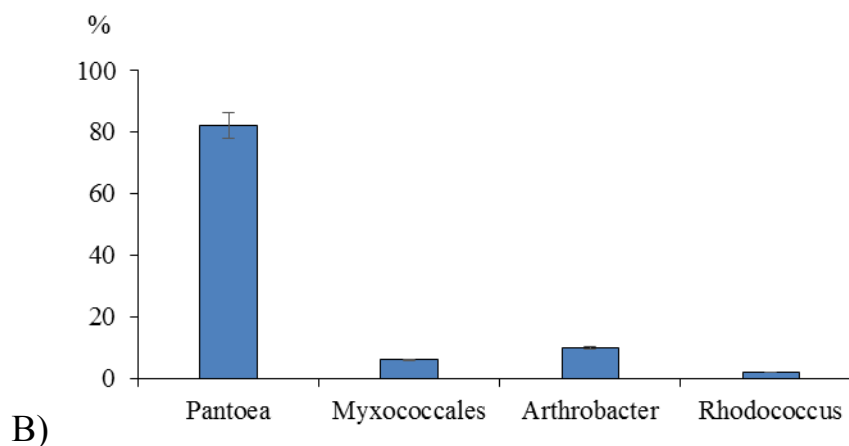


Рисунок 3. Таксономическая структура бактериальных сообществ на листьях картофеля

А – Стадия бутонизации ; Б - Стадия цветения ; В – Стадия созревания клубней

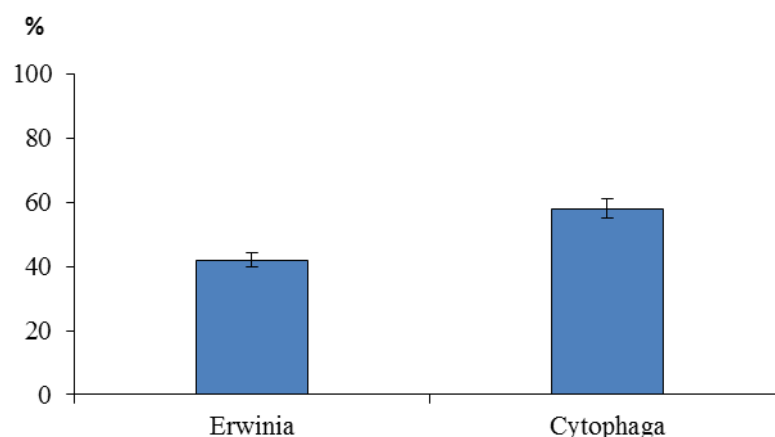
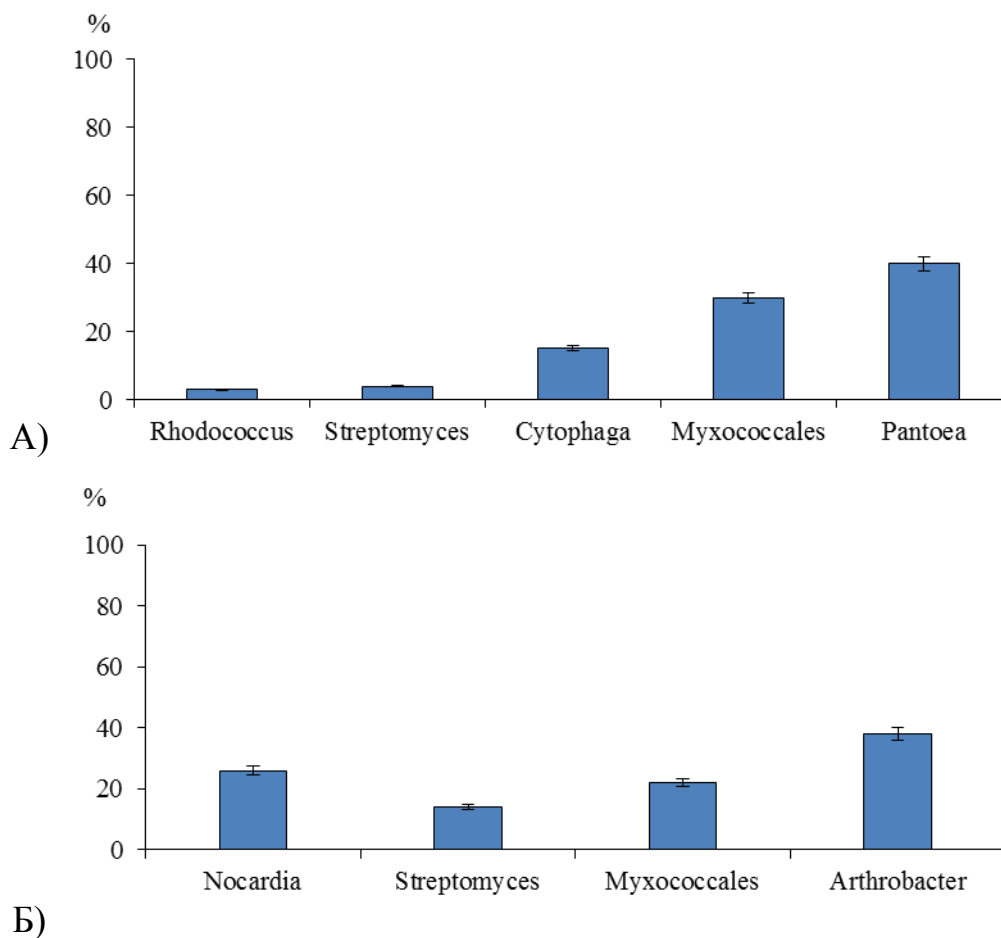


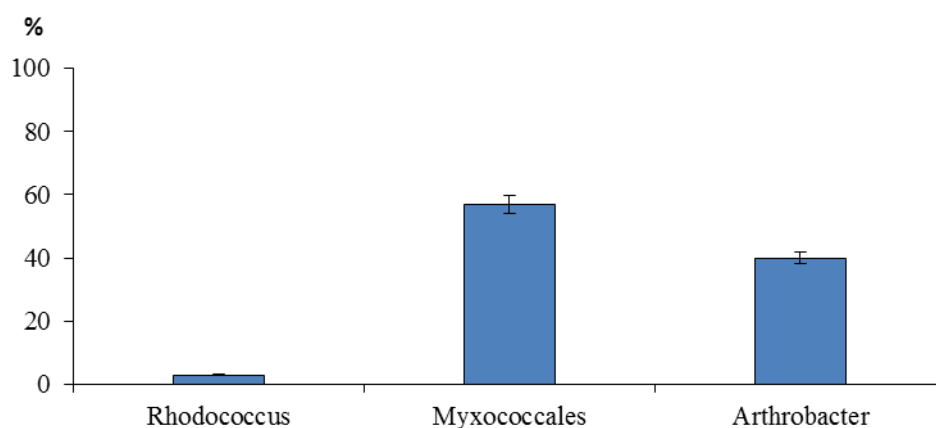
Рисунок 4. Таксономическая структура бактериальных сообществ на цветках картофеля

Бактерии этого рода являются характерными обитателями многих сельскохозяйственных растений (Asis, Adachi, 2004., El-Hendawy et al., 2002). Ранее нами при изучении состава бактерий на картофеле летом 2010 года в этом же агроценозе (Добровольская и др. 2012) было показано, что именно представители рода *Erwinia* выявлялись в качестве доминантов на цветках и листьях картофеля в самый жаркий период лета.

Актинобактерии сохранились на листьях перед уборкой картофеля в качестве минорных компонентов.

В ризосфере картофеля бактериальное разнообразие было выше, чем в филлосфере. Так, на стадии бутонизации было выявлено 5 таксонов бактерий. Доминировали миксобактерии и бактерии рода *Pantoea*, в качестве минорных компонентов были выявлены актинобактерии, цитофаги и родококки. В период цветения картофеля число таксонов сократилось до 4, произошла смена доминантов – преобладающими стали актинобактерии – артробактер (доминант), нокардиоподобные бактерии и стрептомицеты (субдоминанты). На стадия созревания клубней картофеля опять наблюдали изменения в таксономической структуре эпифитных бактерий корнеплодов – резкое увеличение доли миксобактерий (до 60%), в качестве второго доминанта (40%) оставался артробактер, минорный компонент - родококки (рис.5).





В)

Рисунок 5. Таксономическая структура бактериальных сообществ на корнях и корнеплодах картофеля

А - Стадия бутонизации; Б - Стадия цветения; В – Стадия созревания корнеплодов

Таким образом, в процессе вегетации картофеля наблюдали изменение таксономической структуры бактериальных сообществ как в филлосфере, так и ризосфере картофеля. Происходило постепенное замещение тех целлюлозоразрушающих миксобактерий и цитофаг, которые исходно были на клубнях, а затем перешли в филлосферу, на почвенные актинобактерии, а затем эрвинии – на цветках и листьях. В ризосфере наблюдали другую картину – обилие актинобактерий в период цветения и доминирование миксобактерий на клубнях в период созревания клубней. Следует так же отметить, что нокардиоподобные актиномицеты и стрептомицеты, которые были обнаружены только на клубнях картофеля, отсутствовали в филлосфере картофеля.

Динамика таксономической структуры бактериальных сообществ на разных органах моркови и свёклы

На листьях моркови на стадии всходов доминировали коринеподобные бактерии, представленные родококками и артробактером. При этом родококки составляли более 50%, артробактер – около 25%. На стадии цветения бактерии

рода *Arthrobacter* становятся монодоминантами, появляются цитофаги в качестве минорных компонентов. На стадии созревания в качестве монодоминанта на листьях выявлены бациллы (рис.6).

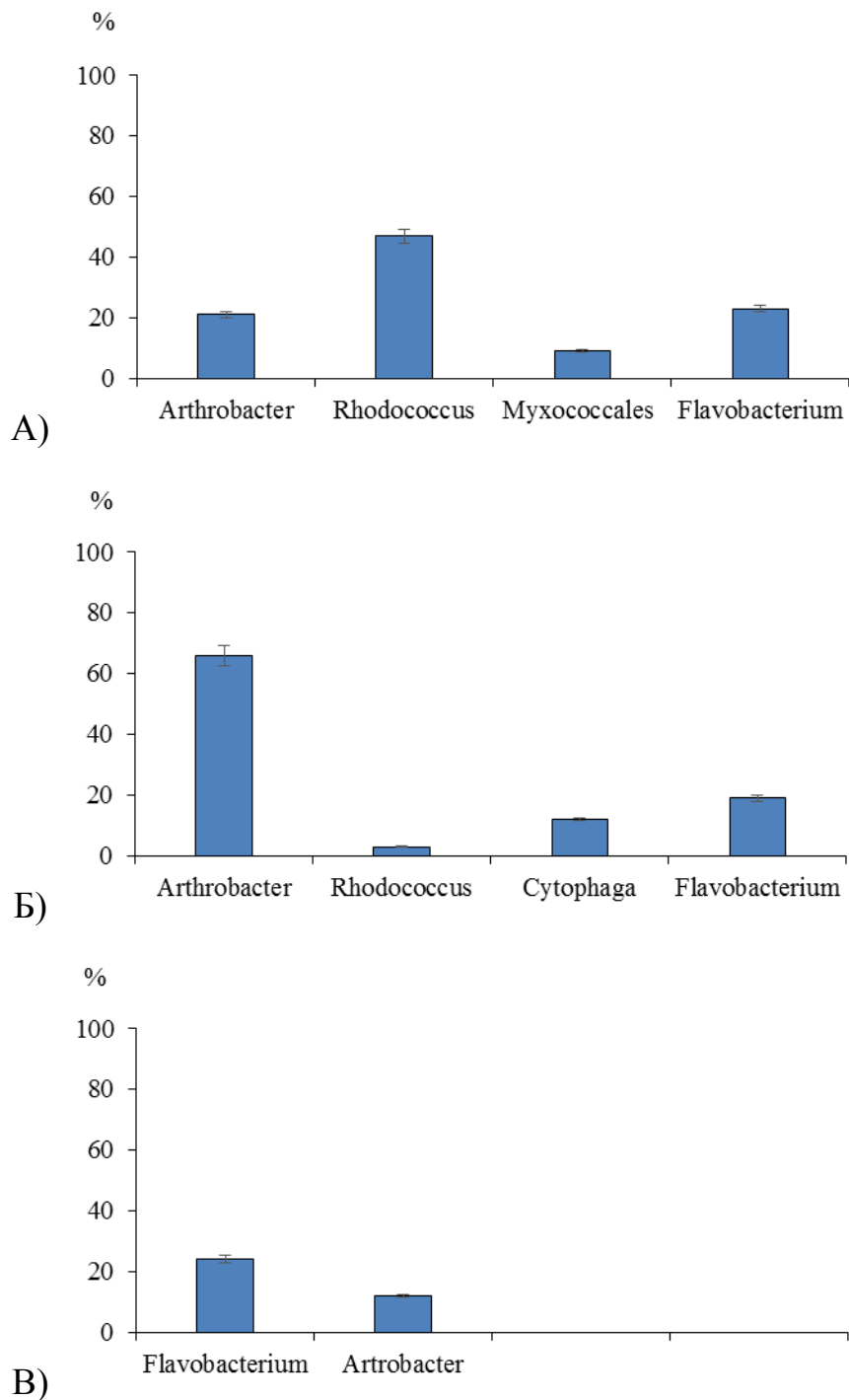
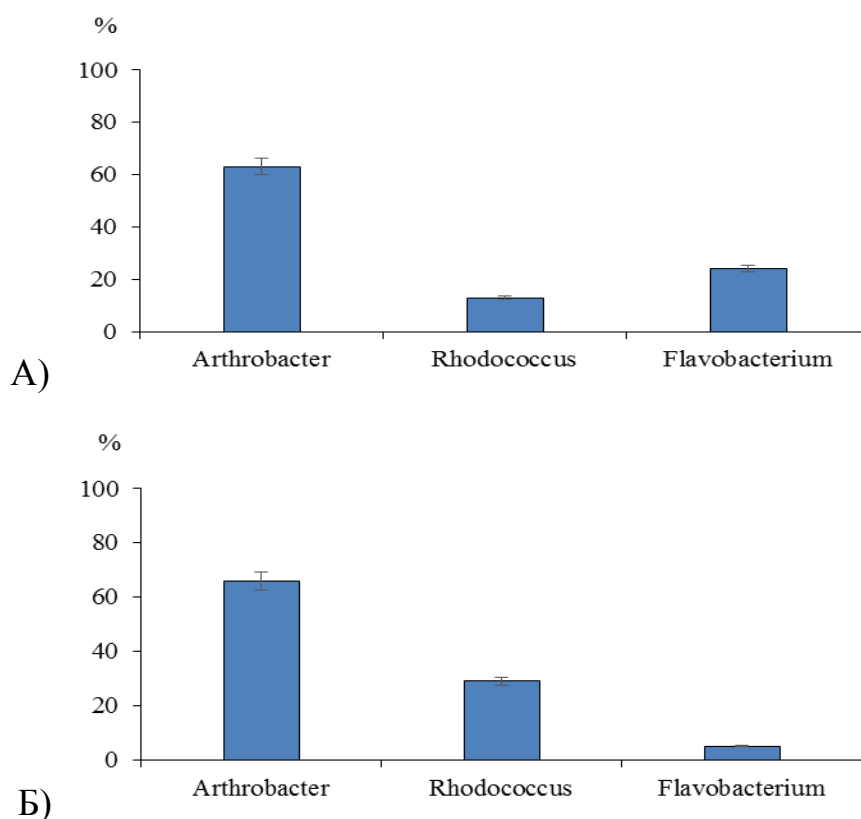


Рисунок 6. Таксономическая структура бактериальных сообществ на листьях моркови

А - Всходы; Б - Стадия цветения ; В – Стадия созревания корнеплодов

На корнях моркови на стадии всходов, как и на листьях, доминировали коринеподобные бактерии, представленные, в основном, артробактером, который становится монодоминантом на стадии цветения. Однако на стадии созревания на корнеплодах моркови, в отличие от листьев, доминируют не бациллы, а миксобактерии (рис. 7). На листьях свёклы на стадии всходов доминировали, как и на моркови, коринеподобные бактерии – артробактер и родококки. В качестве второго доминанта были обнаружены представители рода *Pantoea* (рис. 8). Представители этого рода, относящегося к филуму Bacteroidetes, становятся монодоминантами в период цветения. В период уборки урожая в качестве второго доминанта выявлены целлюлозоразрушающие коринеподобные бактерии рода *Cellulomonas* (рис. 9)



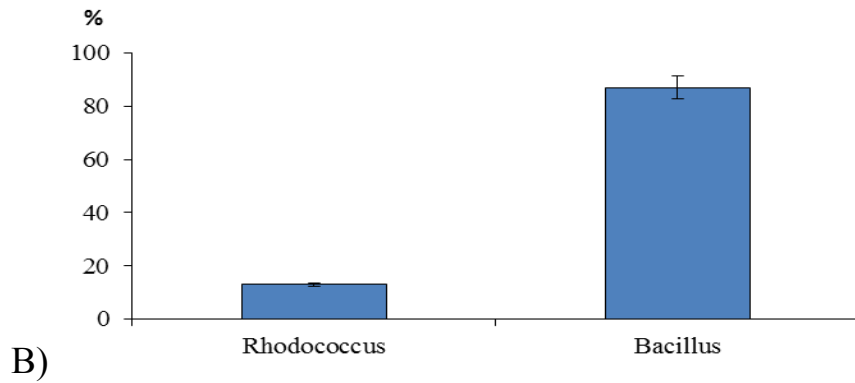


Рисунок 7. Таксономическая структура бактериальных сообществ на корнях и корнеплодах моркови

А - Всходы; Б - Стадия цветения ; В – Стадия созревания корнеплодов

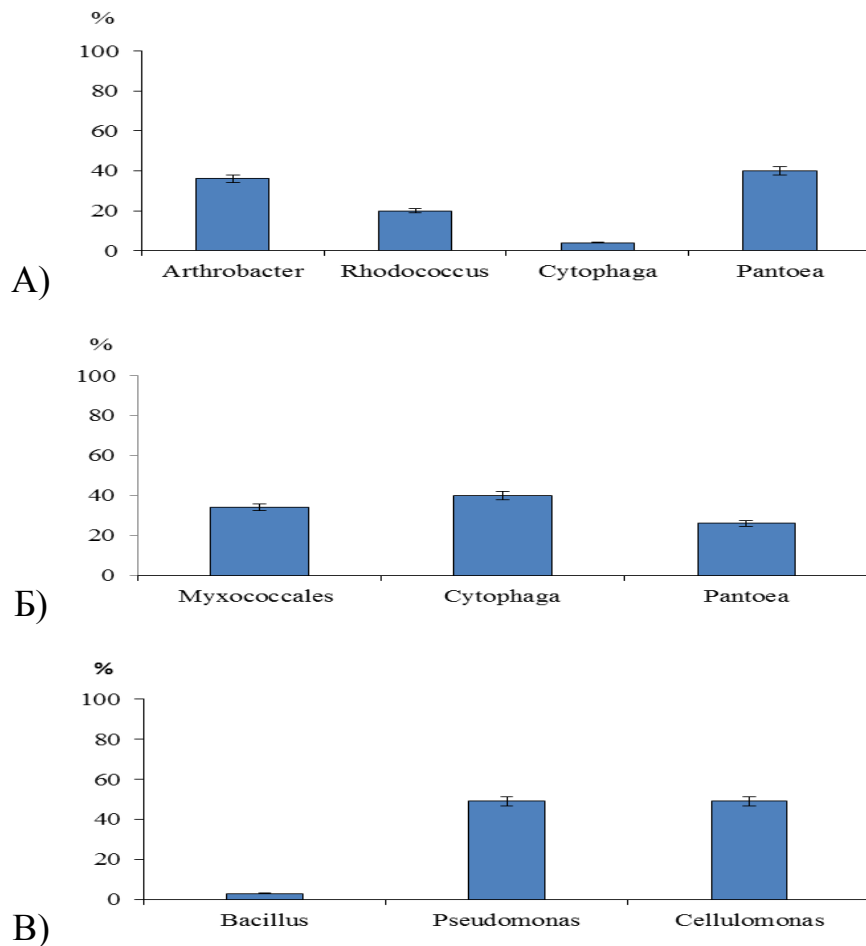


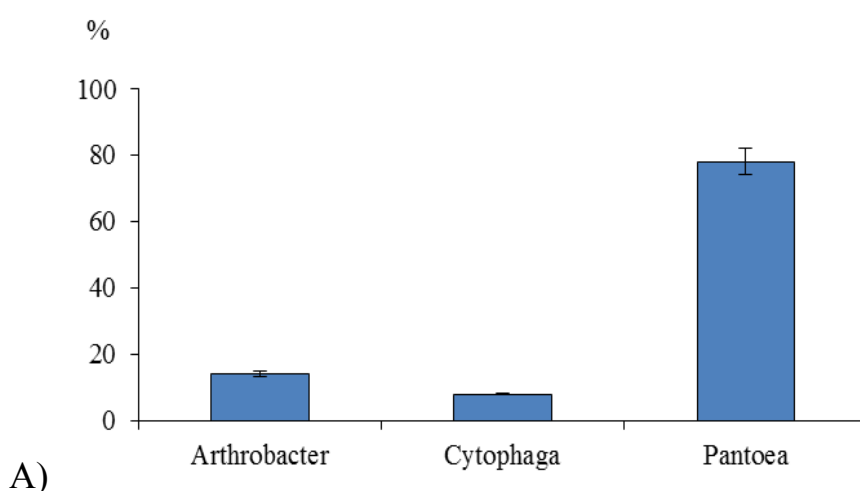
Рисунок 8. Таксономическая структура бактериальных сообществ на листьях свеклы

А - Всходы; Б - Стадия цветения ; В – Стадия созревания корнеплодов

На корнях свёклы на стадии всходов доминировали бактерии рода *Pantoea*, артробактер выделялся в качестве минорного компонента (рис. 9). В период цветения, как и на листьях, преобладали представители рода *Pantoea*, в качестве второго доминанта выявлены бактерии рода *Pseudomonas*. Во время уборки урожая на корнеплодах свёклы доминантами становятся целлюлозоразрушающие бактерии, представленные миксобактериями и цитофагами (рис. 9).

Таким образом, в процессе вегетации моркови и свёклы и образовании корнеплодов на листьях и плодах этих овощных культур в доминанты выходят бактерии гидролитического комплекса, представленные миксобактериями, цитофагами и бациллами. При созревании клубней картофеля, мы также наблюдали увеличение доли миксобактерий, которые становились доминантами в период уборки урожая.

В почве под исследуемыми культурами не происходило существенных изменений в таксономической структуре бактериальных сообществ (рис.10). На всех стадиях развития овощных культур в почве доминировали типично почвенные бактерии родов *Arthrobacter* и *Bacillus*. Перед уборкой урожая в качестве второго доминанта выявлены актинобактерии рода *Rhodococcus*, способные разлагать различные ароматические соединения.



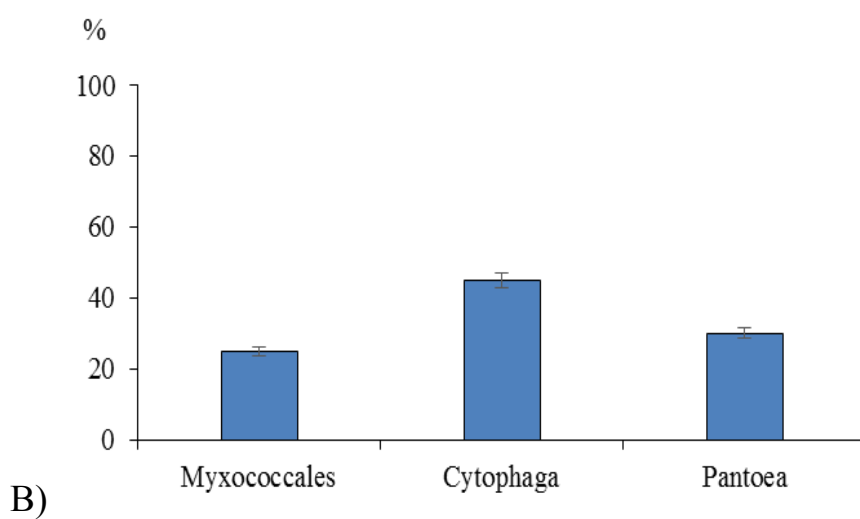
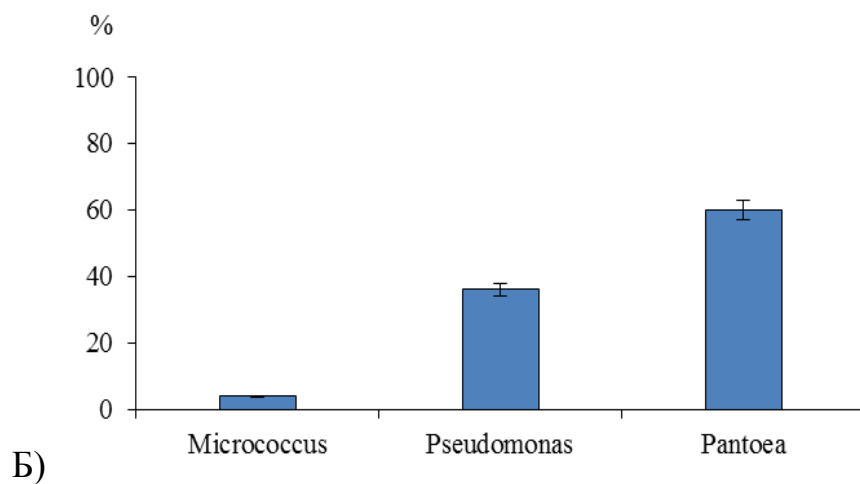
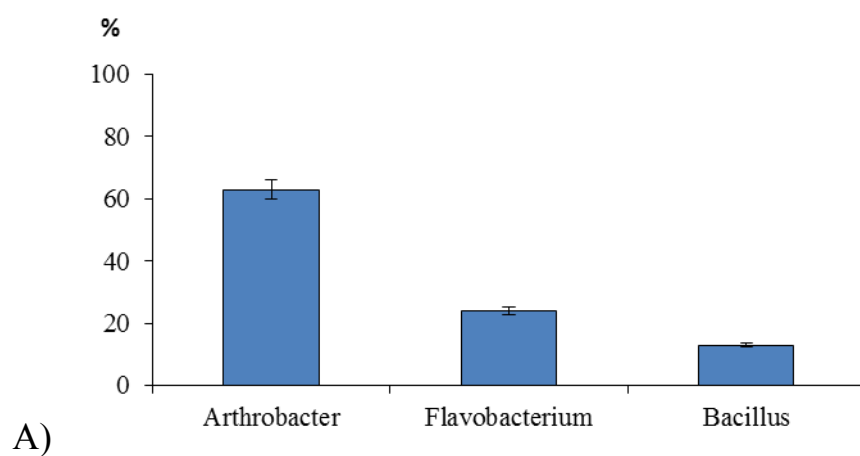


Рисунок 9. Таксономическая структура бактериальных сообществ на корнях и корнеплодах свеклы

А - Всходы; Б - Стадия цветения ; В – Стадия созревания корнеплодов



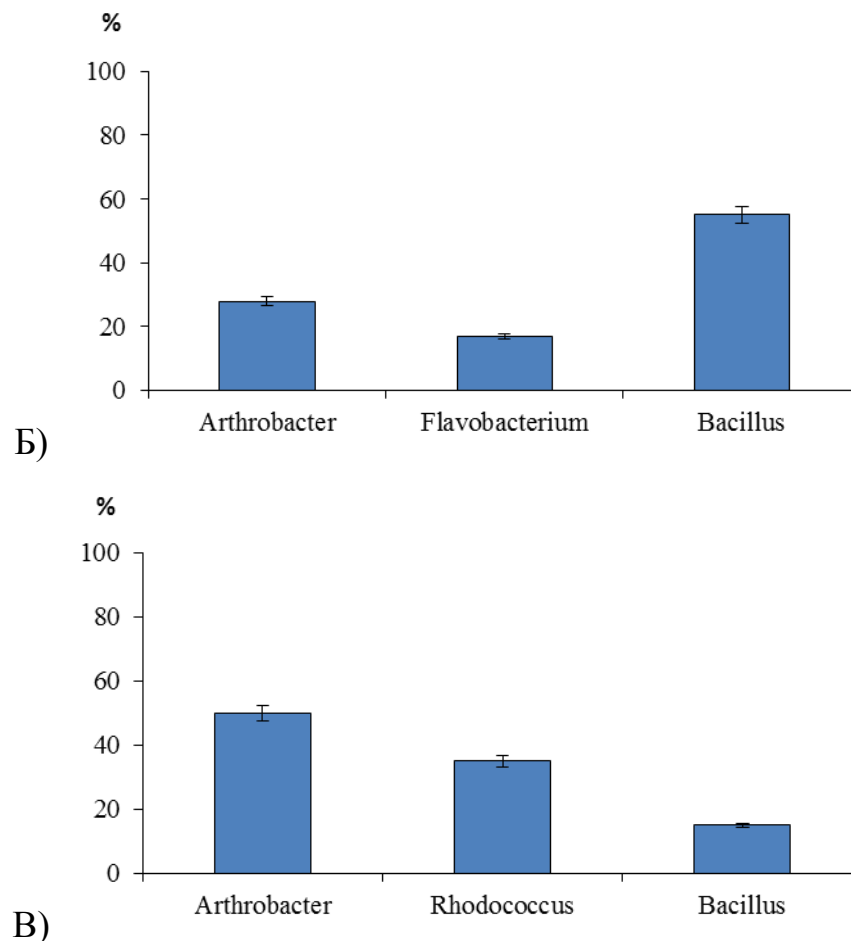


Рисунок 10. Таксономическая структура бактериальных сообществ почвы под овощными культурами

А - Всходы; Б - Стадия цветения ; В – Стадия созревания корнеплодов

Анализ данных по частоте доминирования бактерий разных таксонов на исследуемых овощных культурах подтвердил обилие артробактера, энтеробактерий, миксобактерий и цитофаг на листьях и корнях этих растений (рис. 11).

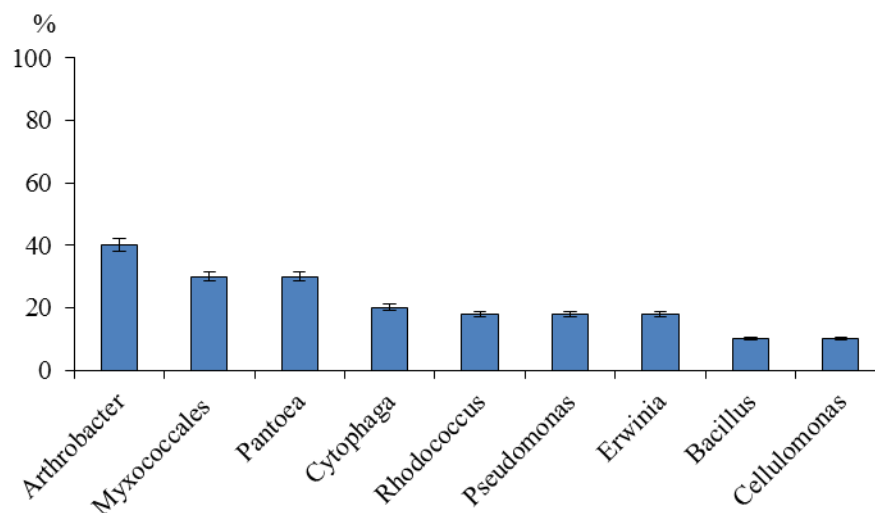


Рисунок 11. Частота доминирования бактерий разных таксонов на листьях и корнях овощных растений

В процессе вегетации овощных культур наблюдали постепенную замену энтеробактерий и актинобактерий в периоды всходов и цветения бактериями гидролитического блока – целлюлозоразрушающими бактериями перед уборкой урожая. Следовательно, при старении растительных тканей развиваются те бактерии, которые способны проводить их деструкцию.

Динамика численности бактерий эпифитно-сапротрофного комплекса в процессе развития вики, овса и гороха.

Численность бактерий на листьях овса и вики увеличивалась в процессе развития растений на 1-2 порядка (рис.12). Для овса наблюдали повышение количества бактерий от 10^5 до 10^6 КОЕ/г при переходе от стадии всходов до образования метёлок с дальнейшим увеличением ещё на порядок (более 10^7 КОЕ/г) в фазе зрелых колосьев. Для листьев вики была отмечена более высокая (на порядок), по сравнению с овсом, численность бактерий на всходах, она практически не менялась на стадии цветения, но увеличилась в 10 раз к стадии созревания бобов (рис.12). Таким образом,

максимальной концентрации на листьях исследуемых растений бактерии достигали в фазе образования плодов – колосьев овса и бобов вики.

На цветках вики численность бактерий эпифитно-сапротрофного комплекса составляла 10^6 КОЕ/г, а на бобах численность была выше на 2 порядка и составила 10^8 КОЕ/г. На метелках и колосьях овса численность бактерий была одинаковая и составила 10^6 КОЕ/г.

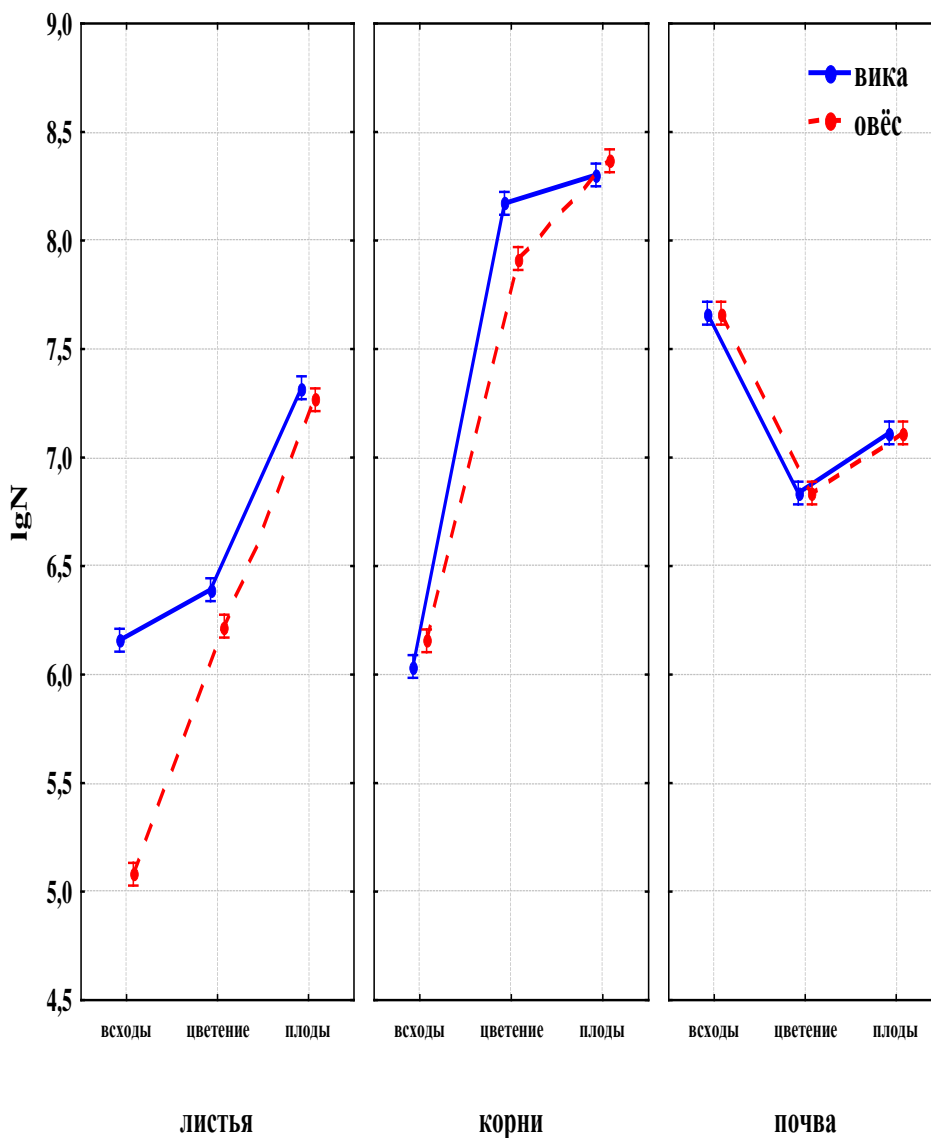
На корнях наблюдали ещё более резкий, чем на листьях, подъём численности бактерий в процессе развития растений - от всходов до созревания бобов - от нескольких миллионов до сотен миллионов КОЕ/г (рис.12). При этом абсолютные значения количества бактерий исследуемого эпифитно-сапротрофного комплекса были на порядок выше на корнях, чем на листьях, как овса, так и вики. Для почвы была выявлена противоположная закономерность – уменьшение (на порядок) плотности бактерий по мере развития растений.

На листьях и корнях гороха мы наблюдали такую же закономерность в динамике численности эпифитных бактерий как у вики и овса – увеличение численности в процессе развития растения на 1-2 порядка. Из всех трёх исследованных растений максимальная плотность бактериальных популяций была обнаружена на цветках и корнях гороха (табл.3).

Таблица 3. Динамика численности бактерий в филлосфере и ризосфере гороха (КОЕ/г)

	Вегетационные органы	Всходы	Цветение	Созревание бобов
Горох	Листья	$8,6 \cdot 10^6$	$6,6 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^8$
	Цветки	-	$1,26 \cdot 10^8$	-
	Стручки	-	$5,4 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^7$
	Корни	$1,96 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^9$

На основании проведённого 3-факторного анализа (вид растения, субстрат, стадия развития растения) было установлено, что на численность бактерий в одинаковой степени достоверное влияние оказывают 2 фактора - субстрат (листья, корни, почва) и стадия развития растений. При этом согласно значениям критерия Фишера (табл. 4), вид растения оказался тем фактором, который не является значимым.



N – КОЕ/г

Рисунок 12. Динамика численности исследуемого бактериального комплекса в процессе развития овса и вики

Таблица 4. Оценка силы влияния факторов на численность бактерий в исследуемых образцах (по результатам трехфакторного дисперсионного анализа)

Варьирование по градациям факторов*	Число степеней свободы	Дисперсия	Критерий Фишера	Уровень значимости
1	1	0,31	156,04	<0,001
2	2	5,69	2827,08	<0,001
3	2	5,66	2812,06	<0,001
12	2	0,27	133,76	<0,001
13	2	0,12	59,15	<0,001
23	4	4,27	2124,77	<0,001
123	4	0,21	103,55	<0,001
Остаточное	36	0,002		

* Факторы: 1 – вариант опыта (вика, овёс, горох); 2 – субстрат (листья, корни, почва) и 3 – срок отбора образцов (всходы, цветение, созревание бобов); 12 – совместное влияние первого и второго факторов

Динамика таксономической структуры бактериальных сообществ филлосферы овса и вики в процессе развития этих растений.

На семенах овса перед их посевом в качестве монодоминанта были выделены коринеподобные бактерии рода *Arthrobacter*, которые перешли на стадии всходов в филлосферу и ризосферу овса, оставаясь монодоминантами в исследуемом бактериальном комплексе (рис. 13). В качестве субдоминанта в ризосферу с семян перешли и бактерии рода *Cytophaga*, в филлосферу – микрококки.

Далее рассмотрим изменение во времени состава бактериальных сообществ в филлосфере исследуемых растений. Доминировавшие на листьях всходов овса бактерии рода *Arthrobacter*, сменились на стадии образования метёлок целлюлозоразрушающими бактериями, представленными родом *Cytophaga* и миксобактериями (Мухососсалясы)

(рис.14). Родоккокки, выявляемые в качестве минорных компонентов, были обнаружены на обеих исследованных стадиях онтогенеза.

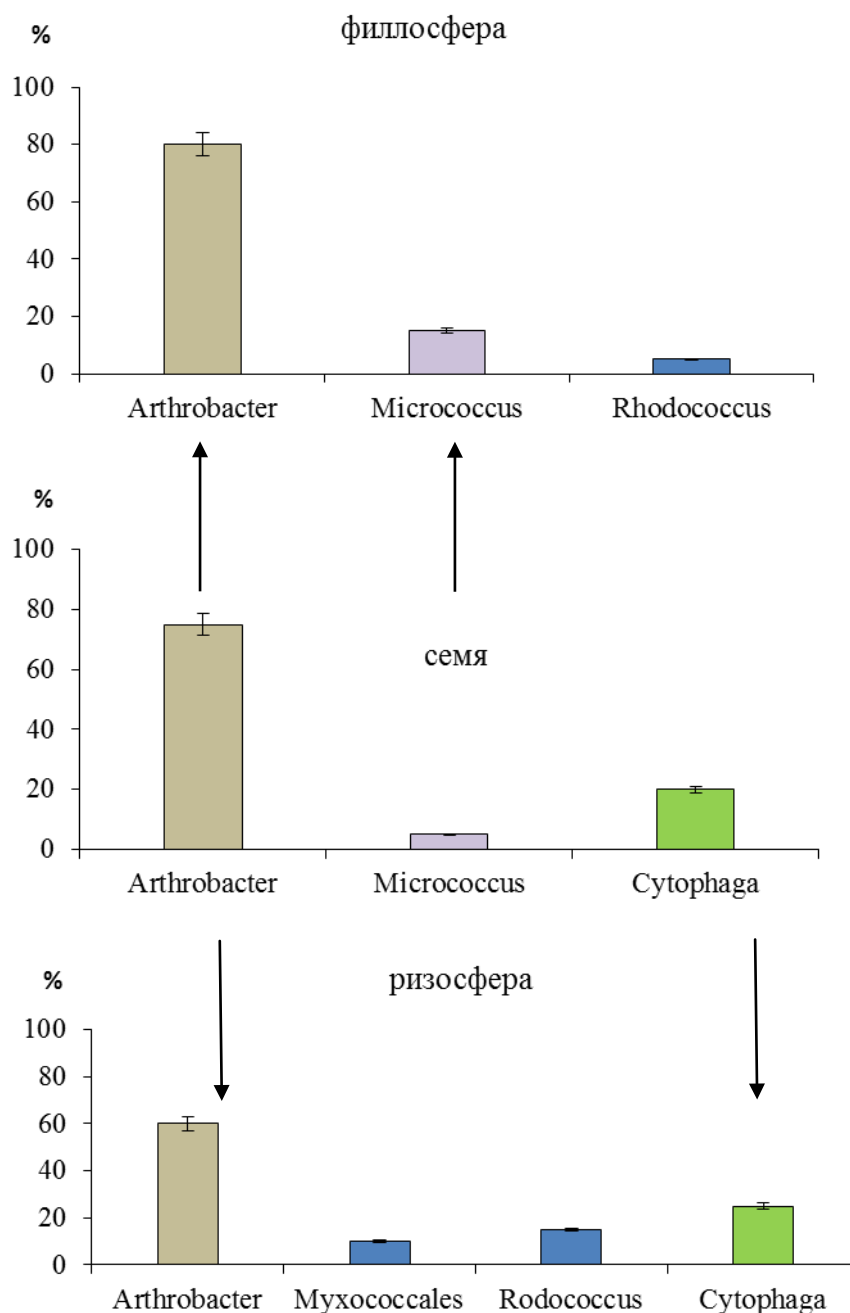


Рисунок 13. Таксономическая структура бактериальных сообществ филлосферы и ризосферы овса на стадии всходов

В фазе образования зрелых колосьев на листьях овса резко изменилось разнообразие и структура бактериальных сообществ. Появились подвижные протеобактерии, представленные родами *Erwinia*,

Pseudomonas, *Azospirillum*. При этом доля факультативно-анаэробных бактерий рода *Erwinia* составила более 40%, т.е. они вышли в доминанты. В качестве минорных компонентов появились целлюлозоразрушающие актинобактерии рода *Cellulomonas* (рис. 14). О доминировании бактерий рода *Erwinia* в филлосфере как зерновых, так и овощных культур сообщалось в работах многих авторов (Кононков и др., 1980, Шильникова и др., 2006). Кроме описанных выше доминирующих групп бактерий, на листьях овса в период отбора образцов во влажный период были выделены различные подвижные протеобактерии, которые трудно идентифицировать на основании фенотипических признаков. В результате отобрали 5 культур из этой группы бактерий, которые были определены до рода и вида на основании молекулярно-биологических методов. Для всех штаммов уровень сходства с теми видами, к которым они были отнесены, составил 99–100%. Результаты родовой и видовой идентификации исследуемых культур протеобактерий на основании молекулярно-биологических методов представлены в табл. 5. Следует отметить, что бактерии рода *Pantoea* (ранее *Erwinia*) – факультативно-анаэробные бактерии, двух других родов – аэробные. Представители всех этих родов упоминаются при описании бактериальных комплексов агроценозов (Шильникова и др., 2006., Емцев, Мишустин, 2005). Следует отметить, что выявленные бактерии вида *Pantoea vagans* используются в качестве биологического контроля над фитопатогенными бактериями *Erwinia amylovora*, так как они образуют антибиотик, ингибирующий размножение этого вида бактерий (Smits Т.Н. 2010.) Что касается бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, которая была исходно описана как фитопатоген, то впоследствии оказалось, что многие штаммы этого вида не вызывали болезни растений, а оказывали положительное действие на их рост. Так, культуры *Agrobacterium tumefaciens*, выделенные из ризопланы разнолистной капусты и водяного шпината, проявили себя в качестве активных ассоциативных азотфиксаторов и оказали положительный

эффект на рост и развитие исследованных растений (ФУНГ ТХИ МИ, 2015).

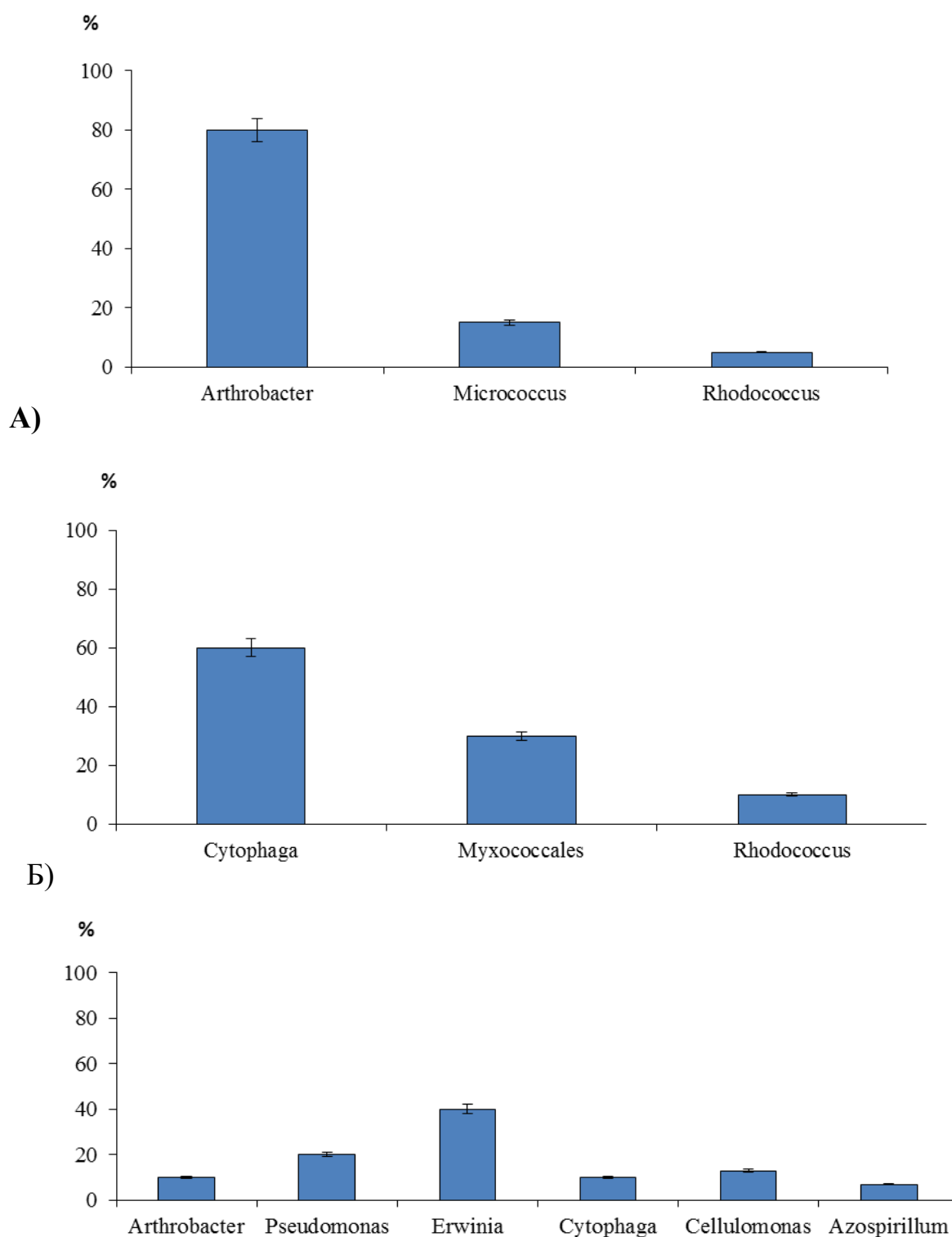


Рисунок 14. Таксономическая структура бактериальных сообществ листьев овса в разные фазы его развития

А-Всходы; Б-Стадия образования метелок; В-стадия зрелых бобов

Таблица 5. Таксономический состав культур протеобактерий на листьях овса, определенных молекулярно-биологическими методами

Вид
<i>Pantoea vagans</i>
<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Pseudomonas argentinensis</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens*</i>

*В настоящее время вид *Agrobacterium tumefaciens* ликвидирован и ему дано название *Rhizobium radiobacter* (Young et al., 2001).

Доминирование в филлосфере исследованных нами растений актинобактерий, устойчивых к высушиванию, во все другие сроки объясняется жаркой и сухой погодой в этот летний период.

В колосьях овса, находящихся как на стадии формирования метёлок, так и восковой спелости, доминировали целлюлозоразрушающие бактерии. Они были представлены миксобактериями и цитофагами, их соотношение изменялось в процессе онтогенеза овса в сторону увеличения доли и выхода в монодоминанты бактерий рода *Cytophaga* (рис 15).

Кроме доминировавших в бактериальных комплексах метёлок миксобактерий были выделены бактерии рода *Cellulomonas*, а в созревших колосьях – *Bacillus*.

На семенах вики были обнаружены представители трёх таксонов: *Cytophaga* (доминант), *Arthrobacter* (субдоминант) и Мухососсаles (минорный компонент). Следует отметить, что цитофаги и артробактер перешли с семян в филлосферу, а артробактер и миксобактерии – в ризосферу вики. Однако соотношение доминантов резко изменилось: доминирующие в бактериальных сообществах семян бактерии рода *Cytophaga* заменились в филлосфере всходов вики артробактером, а в ризосфере - миксобактериями (рис. 16).

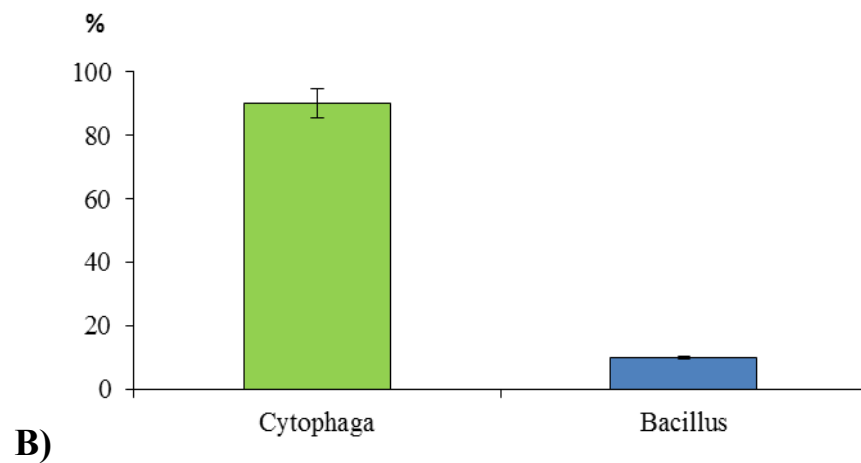
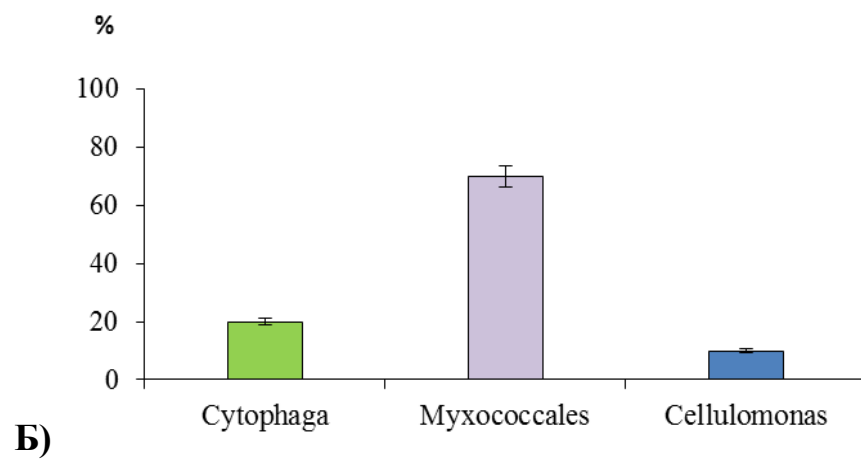
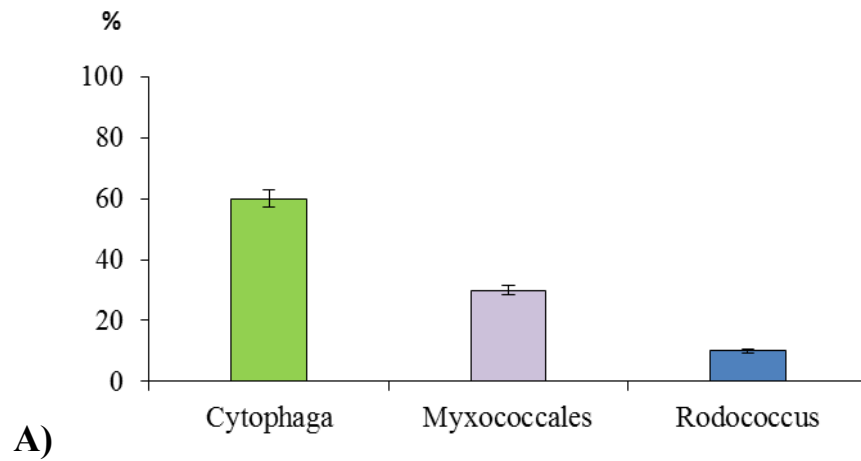


Рисунок 15. Таксономическая структура бактериальных сообществ овса (в ряду листья-метелки-колосья восковой спелости)
 А-листья; Б-метелки; В-колосья

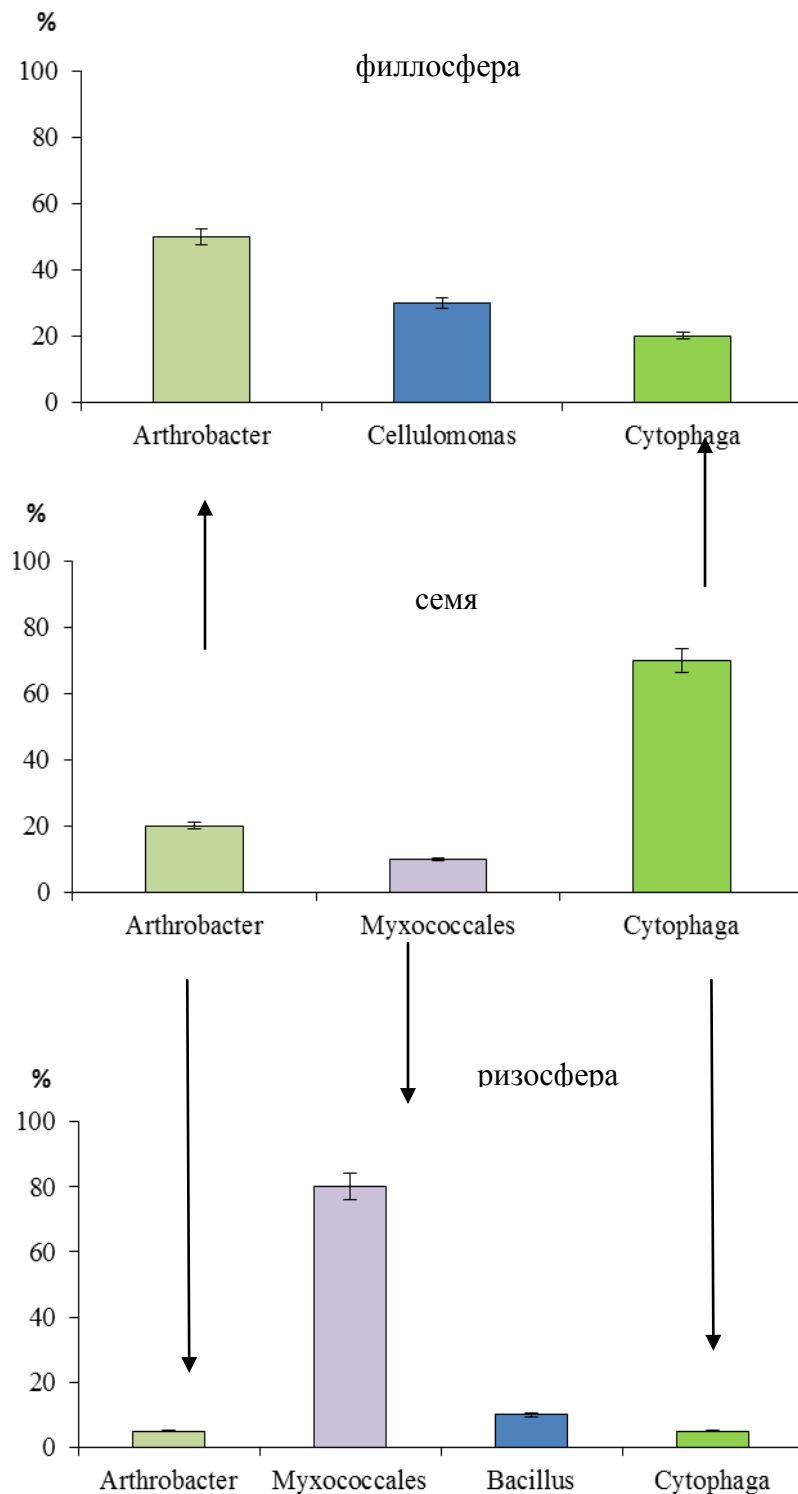


Рисунок 16. Таксономическая структура бактериальных сообществ филлосферы и ризосферы вики на стадии всходов

В бактериальных комплексах листьев вики со временем также менялась таксономическая структура. Если на листьях всходов доминировали актинобактерии, представленные артробактером и

целлюломонадами, то в период цветения вики доминантами становились целлюлозоразрушающие бактерии, представленные цитофагами и миксобактериями. Появились так же актинобактерии родов *Rhodococcus* и *Micrococcus* (рис. 17). После созревания бобов в бактериальных комплексах листьев вики увеличились разнообразие и доля актинобактерий по сравнению со стадией цветения, хотя в доминантах по-прежнему остались целлюлолитики - бактерии рода *Cytophaga* (рис. 17).

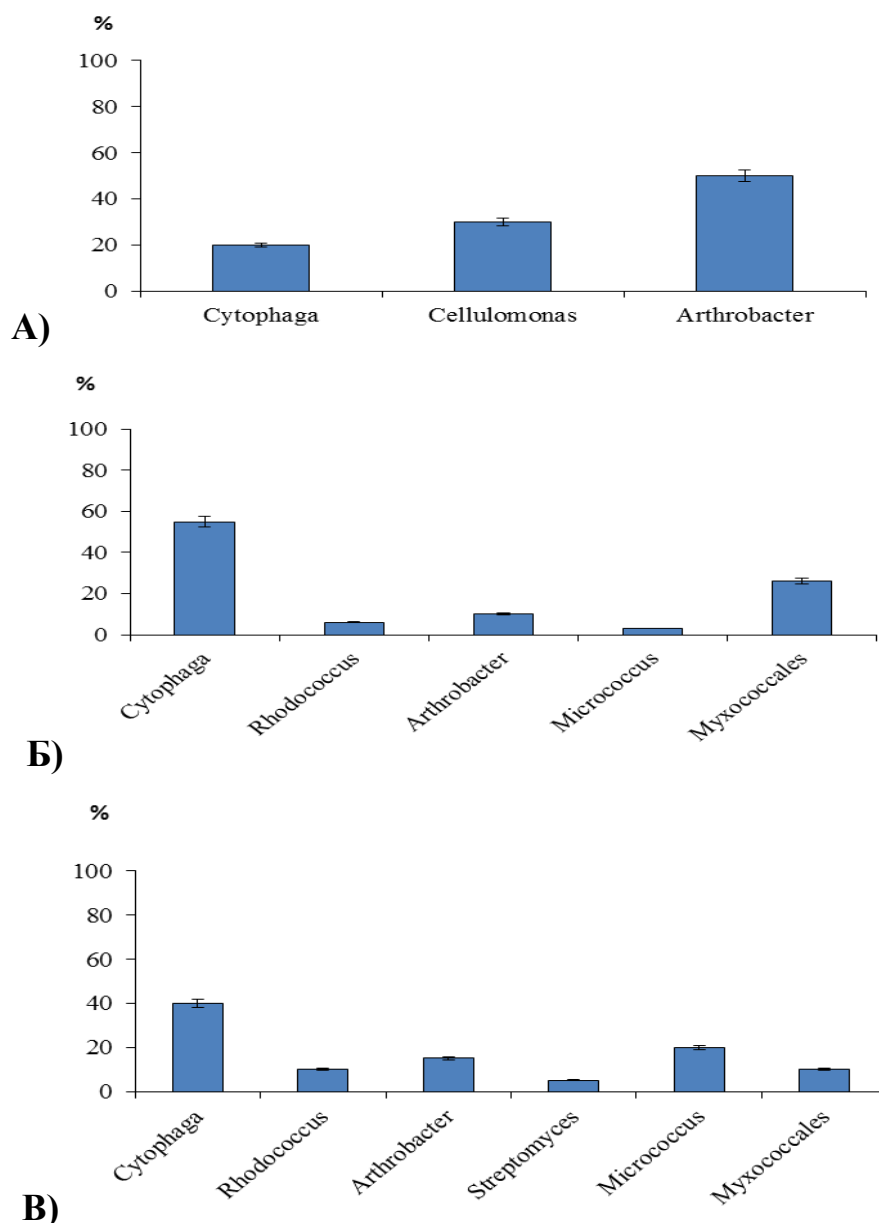


Рисунок 17. Таксономическая структура бактериальных сообществ листьев вики на разных стадиях развития растения

А-всходы; Б-период цветения; В-стадия зрелых бобов

Представители этой же группы были обнаружены и в цветках вики, однако, в качестве второго доминанта, составляющего более 50% от всего сообщества, были выявлены родококки (*Rhodococcus*). Для бактериальных комплексов бобов характерно разнообразие целлюлозоразрушающих бактерий, которые вместе составили более 95%. Они представлены как грамотрицательными бактериями (*Cytophaga*, Мухососсаles), так и грамположительными (*Cellulomonas*) (рис. 18).

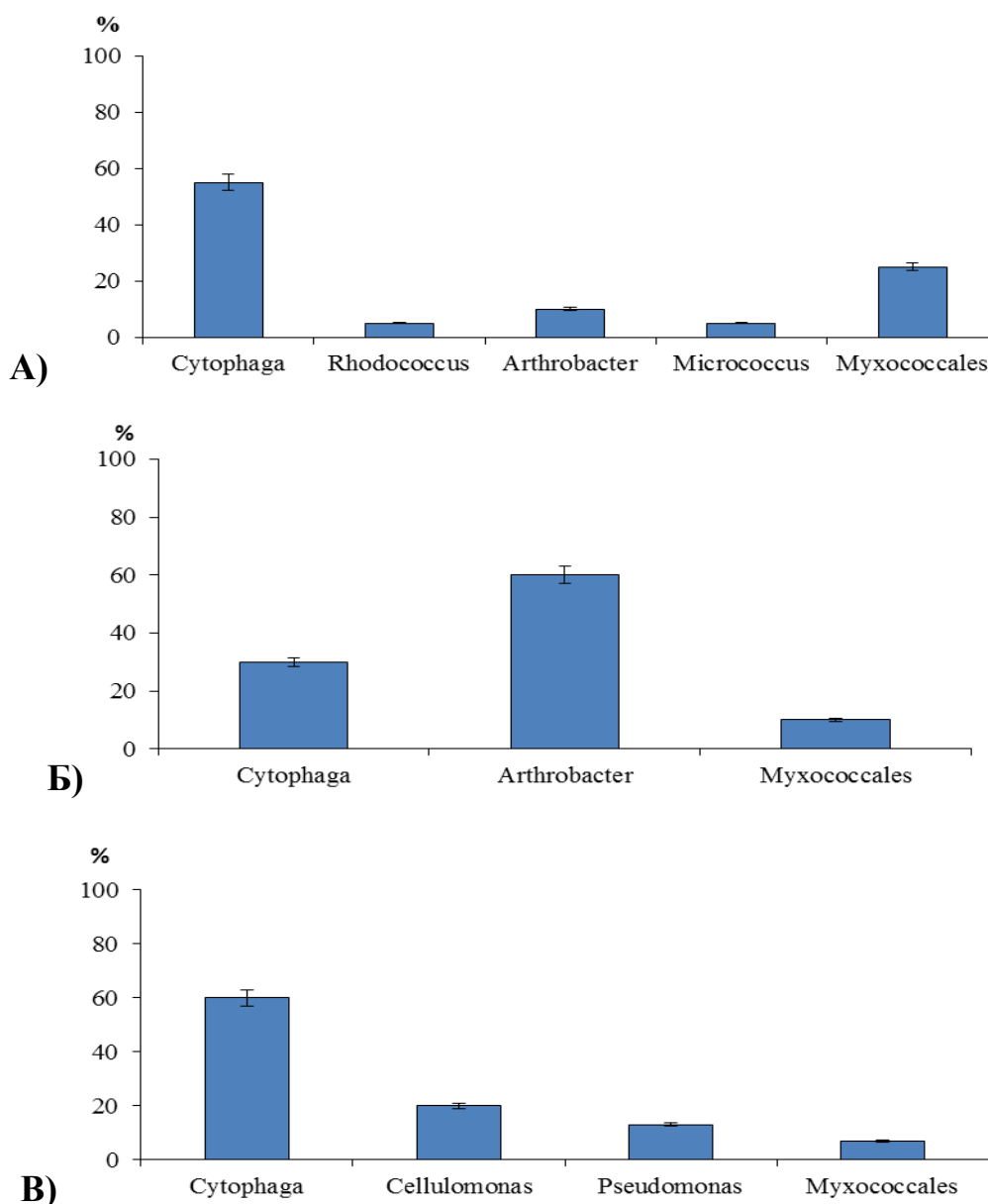


Рисунок 18. Таксономическая структура бактериальных сообществ филлосферы вики (в ряду листья-цветки-бобы)

А-листья; Б-цветки; В-бобы

Таким образом, прослеживаются чёткие изменения в экологотрофической структуре бактериальных сообществ филлосферы овса и вики в процессе их развития. Они состоят в постепенной смене доминантов, представленных актинобактериями на листьях и цветках, целлюлозоразрушающими бактериями рода *Cytophaga* и порядка Мухососсаles на плодах (колосья и бобы).

Различия в таксономической структуре бактериальных комплексов филлосферы овса и вики выявились лишь при сравнении листьев этих растений перед уборкой урожая. На этой стадии на листьях овса были обнаружены подвижные протеобактерии родов *Erwinia* (доминант), *Pseudomonas*, *Azospirillum* (минорные компоненты). На листьях вики – цитофаги (более 40%), миксобактерии (около 20%), в качестве минорных компонентов – актинобактерии (*Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*).

Динамика таксономической структуры бактериальных сообществ ризосферы овса и вики в процессе развития этих растений.

В ризосфере овса в качестве доминанта на всех исследованных стадиях развития был выявлен типично почвенный организм – *Arthrobacter*. Другие члены сообщества - цитофаги и родококки, так же постоянно выделялись во все исследованные сроки, несколько изменялось лишь их соотношение (рис. 19). Таким образом, в отличие от филлосферы, структура бактериального сообщества ризосферы овса, практически не менялась в процессе развития растения.

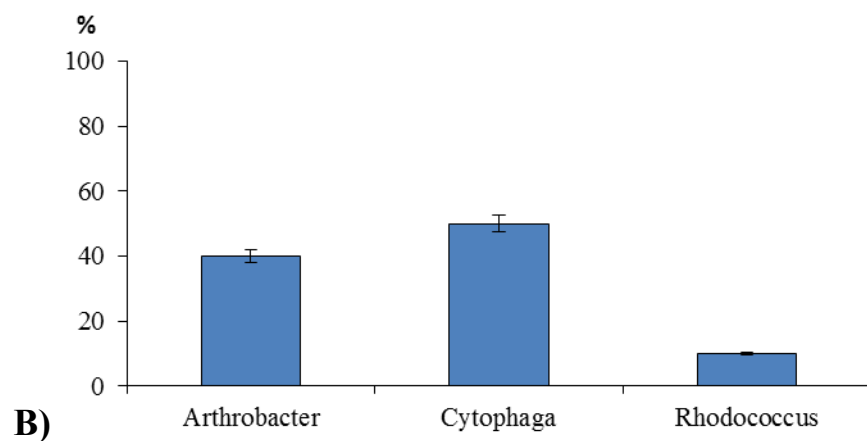
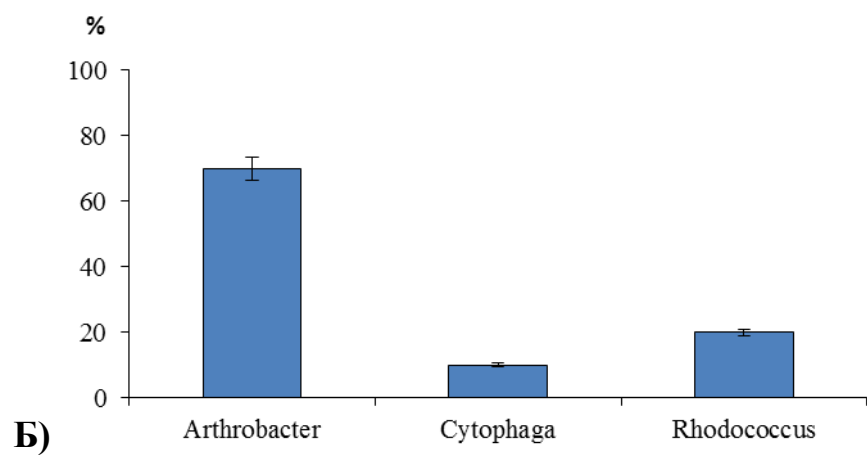
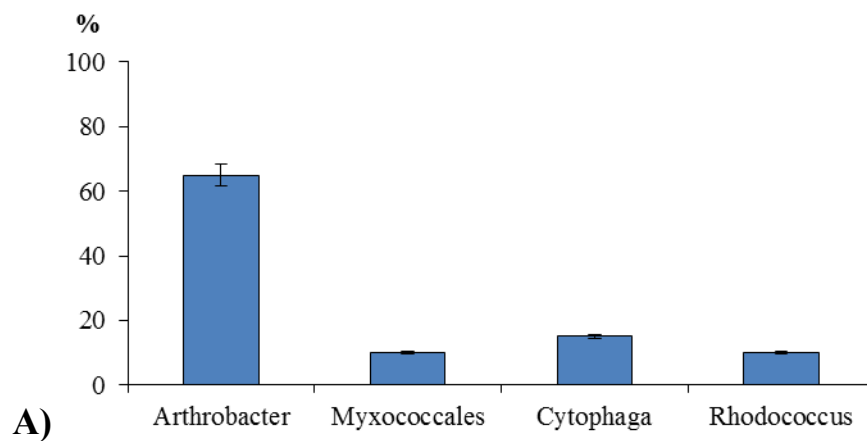
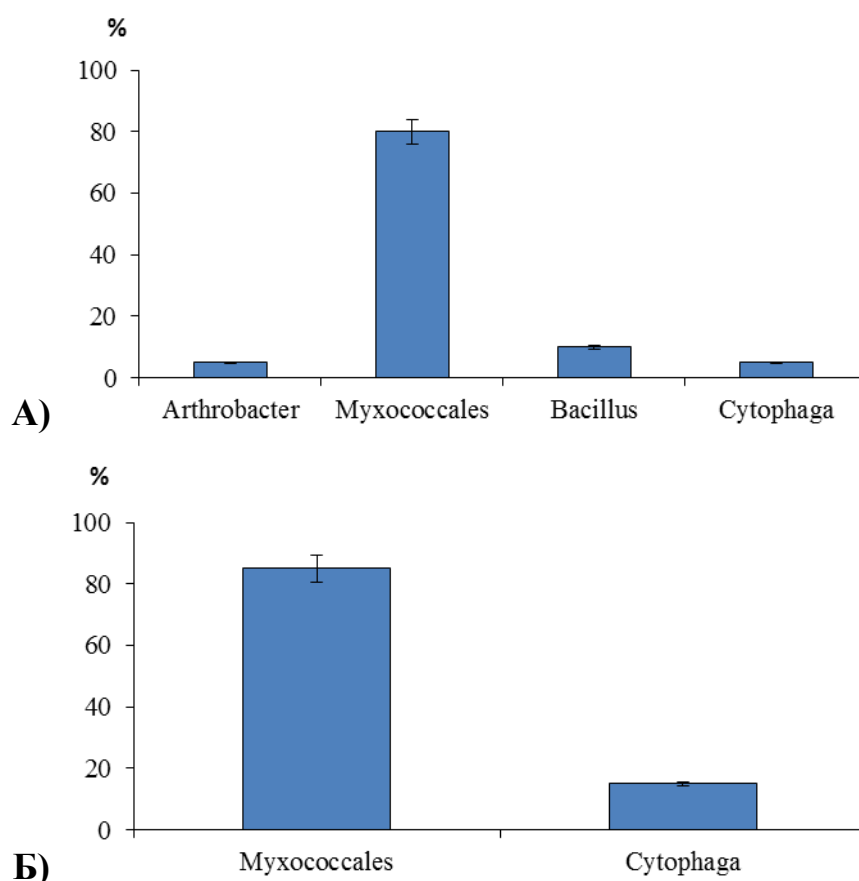


Рисунок 19. Таксономическая структура бактериальных сообществ ризосферы овса в разные фазы развития растения
 А-всходы; Б-стадия образования метелок; В-стадия колосьев восковой спелости

В бактериальных сообществах ризосферы вики на стадии всходов и цветения был выявлен один и тот же монодоминант (более 80%) – целлюлозоразрушающие бактерии порядка Мухососсаles (рис. 20). И лишь на стадии зрелых бобов в ризосфере вики увеличилось разнообразие за счёт появления актинобактерий и произошла смена доминантов – миксобактерии сменились цитофагами. При этом следует отметить, что обе группы бактерий относятся к целлюлозоразрушающим микроорганизмам.

Таким образом, в отличие от филлосферы, в составе бактериальных сообществ ризосферы как овса, так и вики, происходят небольшие изменения в процессе развития этих растений. На всех стадиях доминируют либо артробактер (овес), либо цитофаги и миксобактерии (вика).



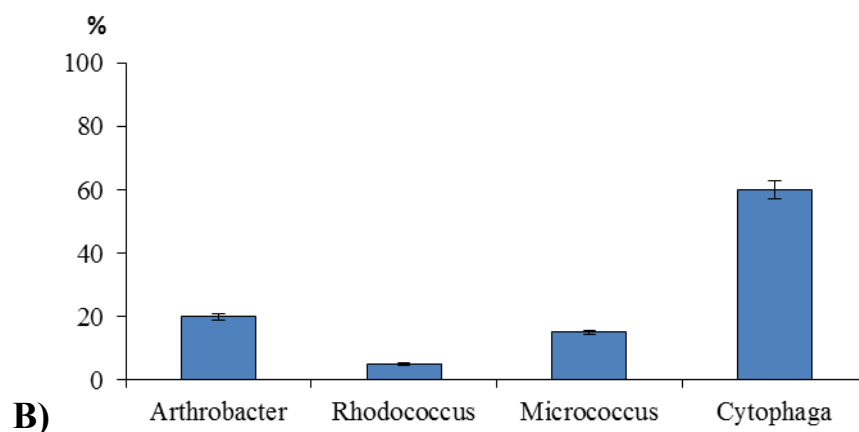
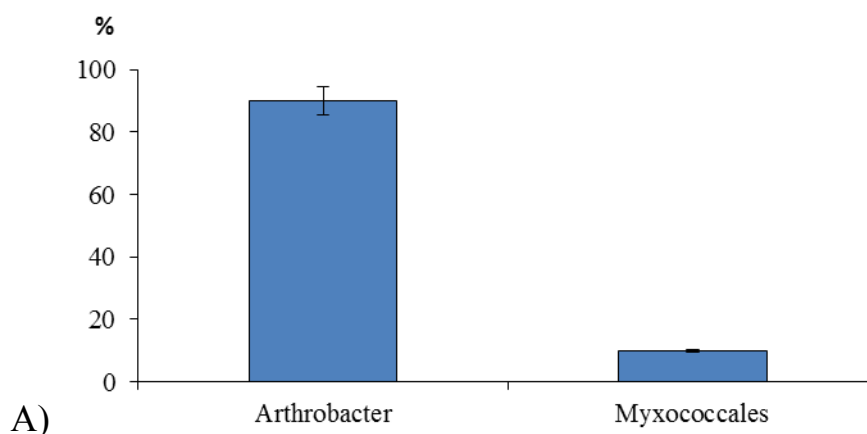


Рисунок 20. Таксономическая структура бактериальных сообществ ризосферы вики на разных стадиях развития растений
А- всходы; Б- период цветения; В- стадия зрелых бобов

Динамика таксономической структуры бактериальных сообществ почвы под викой и овсом в процессе развития этих растений.

Что касается почвенного бактериального сообщества, то оно практически не изменялось в процессе развития исследуемых растений и лишь перед уборкой урожая увеличилось разнообразие за счёт актинобактерий. На всех этапах в качестве монодоминанта выявлялись типично почвенные бактерии рода *Arthrobacter* (рис. 21).



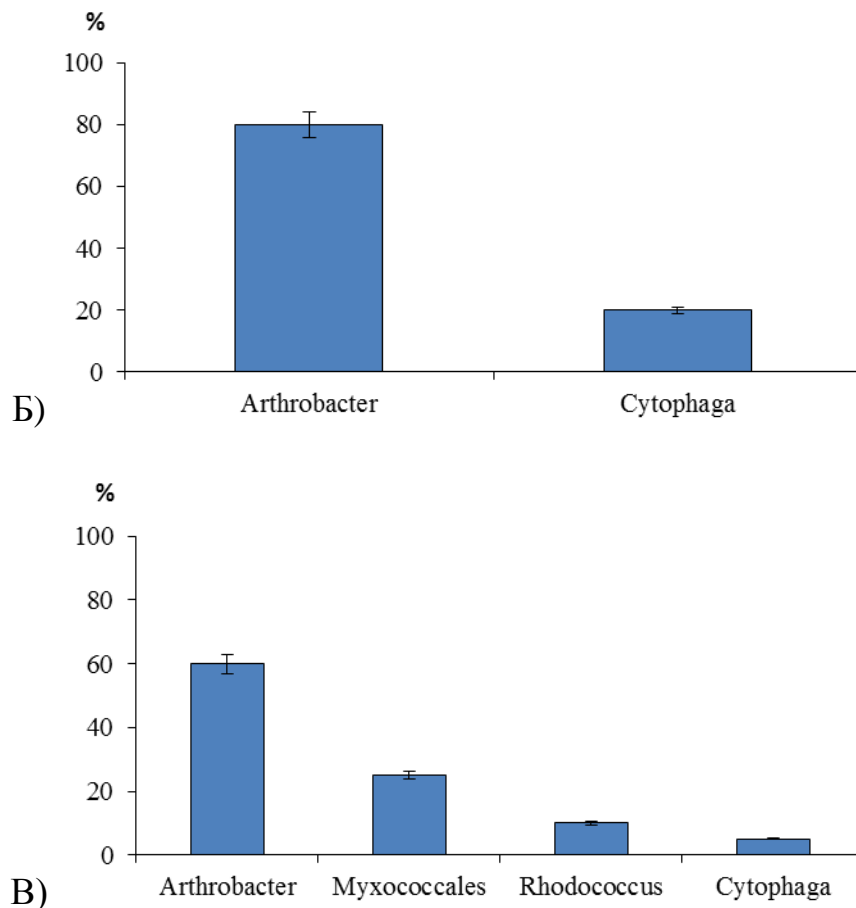


Рисунок 21. Таксономическая структура бактериальных сообществ почвы под викой и овсом на разных стадиях развития растений

А - Всходы; Б - период цветения вики и стадия образования метелок овса;

В - стадия зрелых бобов вики и колосьев восковой спелости овса

Динамика таксономической структуры бактериальных сообществ филлосферы и ризосферы гороха в процессе развития растения.

Доминировавшие на листьях всходов бактерии рода *Arthrobacter*, сменились на стадии цветения целлюлозоразрушающими бактериями, представленными родом *Cytophaga*. Появились так же актинобактерии родов *Rhodococcus* и *Cellulomonas* (рис.22). На стадии созревания плодов выявлено 2 доминанта, представленных бактериями гидролитического блока: бактерии родов *Cellulomonas* и *Cytophaga*.

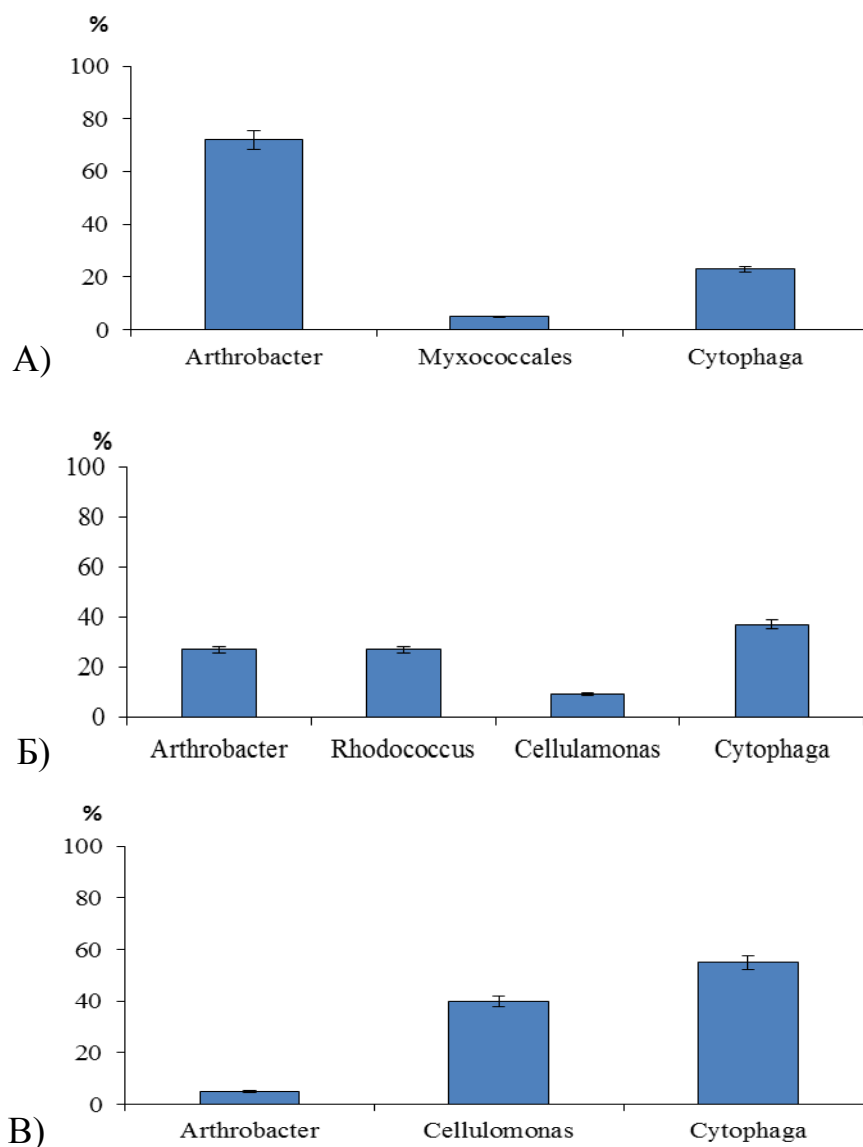


Рисунок 22. Динамика таксономической структуры бактериальных сообществ листьев гороха в процессе вегетации растения
 А – Всходы; Б – Стадия цветеник; В – Стадия созревания

На цветках и стручках гороха доминировали, как и на листьях в период созревания, целлюлозоразрушающие бактерии. Они были представлены цитофагами, родококки были выделены в качестве минорного компонента (рис.23).

При рассмотрении таксономической структуры бактериальных сообществ в ризосфере гороха на всходах миксобактерии и цитофаги были выделены в качестве доминантов, артробактер – в качестве минорных компонентов (рис.24). В период цветения гороха в качестве второго

доминанта появляются актинобактерии, представленные артробактером. На стадии созревания на корнях доминировали как целлюлозоразрушающие (цитофаги), так и типичные копиотрофы – псевдомонады. Бациллы были выделены как минорные компоненты (рис.24). Из клубеньков на корнях как вики, так и гороха, нам удалось выделить на безазотистой среде Эшби характерные для бобовых растений эндофиты-симбионты. Это бактерии рода *Rhizobium*. Их численность составляла $5 \cdot 10^3$ КОЕ/г.

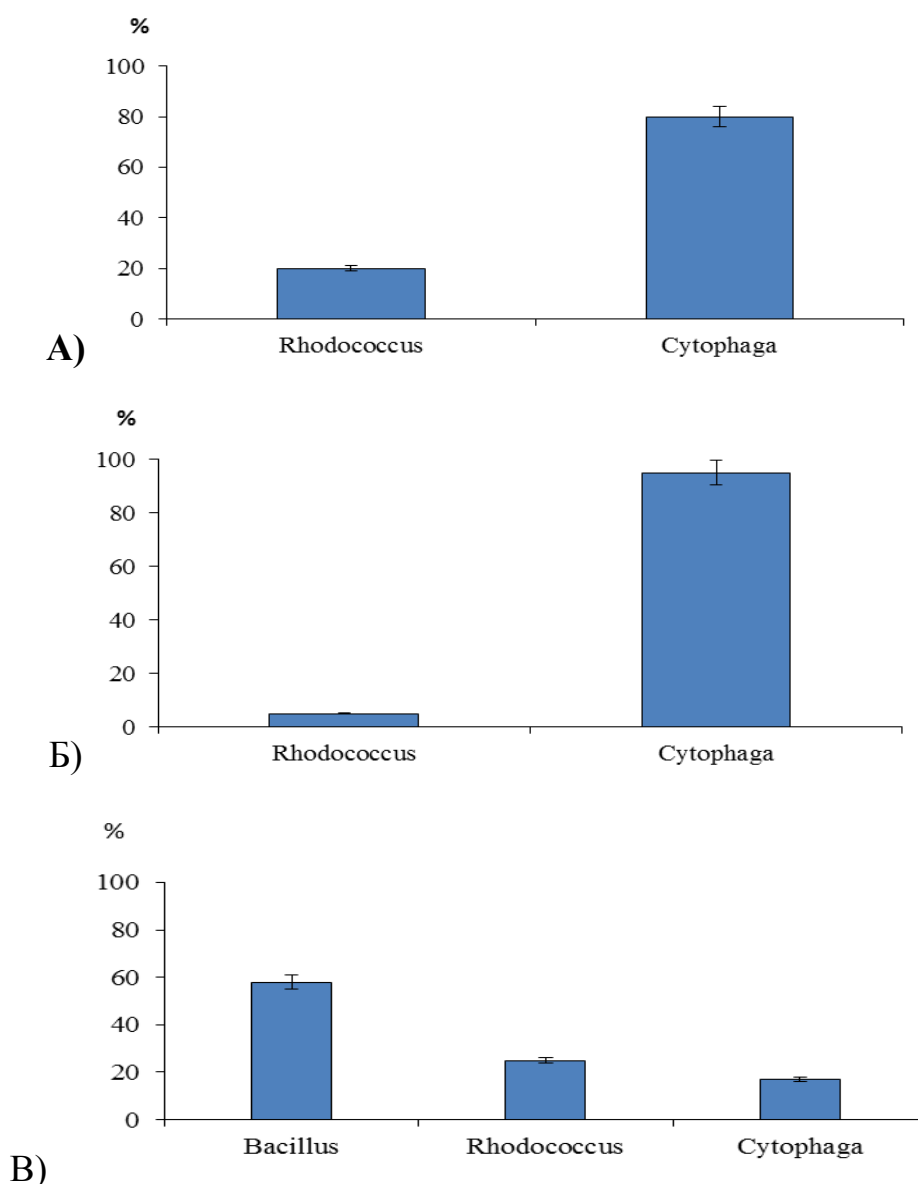


Рисунок 23. Таксономическая структура бактериальных сообществ гороха (в ряду цветки - бобы - семена)
 А – Цветки; Б – Бобы; В – Семен

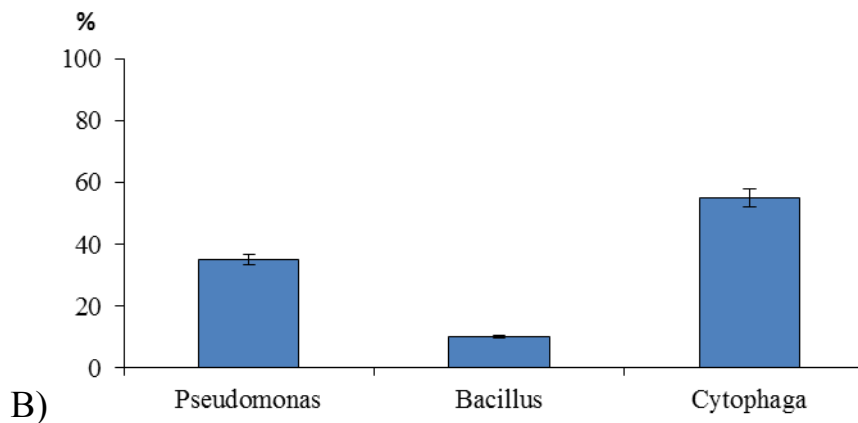
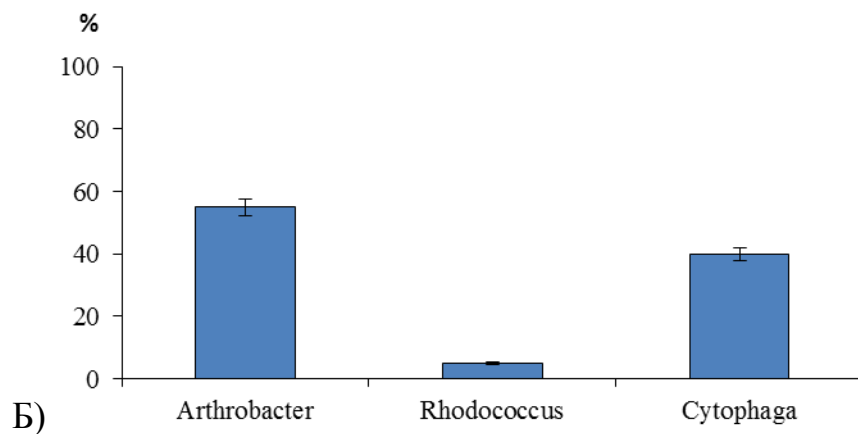
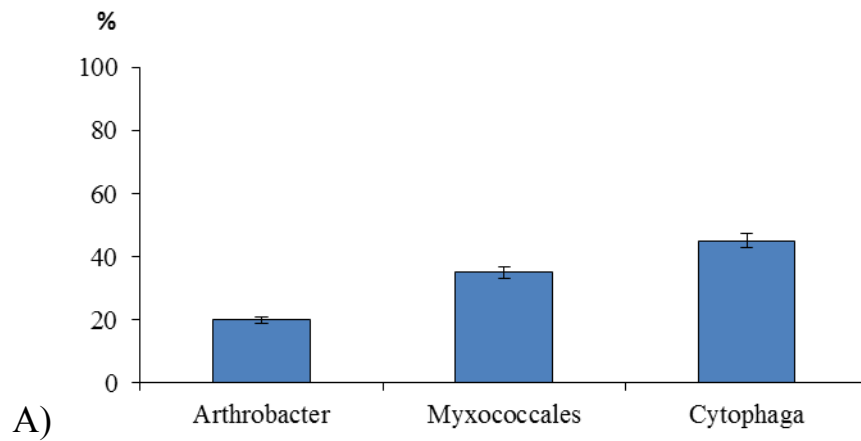


Рисунок 24. Динамика таксономической структуры бактериальных сообществ корней гороха в процессе вегетации растения

А – Всходы; Б – Стадия цветения; В – Стадия созревания

Все полученные результаты с описанием смены бактериальных доминантов в разных ярусах в процессе онтогенеза растений получили подтверждение в их достоверности на основании факторного анализа,

проведенного на основании объединения и сравнения динамики двух крупных групп бактерий: актинобактерии и миксобактерии-цитофаги (табл. 6). Для группы актинобактерий критерий Фишера был максимальным для фактора субстрат (583), далее в порядке убывания следовали: стадия развития растения (248) и вид растения (193). Для группы миксобактерии-цитофаги значения критерия Фишера убывали в ряду: субстрат (372), вид растения (304), стадия развития (180). Таким образом, наиболее значимым фактором, определяющим таксономическую структуру бактериальных сообществ в исследуемом агроценозе, является субстрат, то есть орган растения – листья, цветки, плоды, корни.

Таблица 6. Оценка силы влияния факторов на относительное обилие таксономических групп бактерий в исследуемых образцах (по результатам трехфакторного дисперсионного анализа)

Варьирование по градациям факторов*	Число степеней свободы	Дисперсия	Критерий Фишера	Уровень значимости
Скользящие бактерии				
1	1	6468	305	<0.001
2	2	7903	372	<0.001
3	2	3831	181	<0.001
12	2	3157	149	<0.001
13	2	82	4	<0.03
23	4	2901	137	<0.001
123	4	1393	66	<0.001
		21		
Остаточное	36			
Актинобактерии				
1	1	3440	193	<0.001
2	2	10393	584	<0.001
3	2	4415	248	<0.001
12	2	5420	305	<0.001
13	2	1193	67	<0.001
23	4	2960	166	<0.001
123	4	670	38	<0.001
		18		
Остаточное	36			

На основании проведённых нами экспериментов по изучению динамики структуры бактериальных сообществ на опытном поле, засеянном викой, овсом и горохом, мы продемонстрировали последовательность формирования бактериальных комплексов в разных ярусах агроценоза. Наибольшие изменения в таксономической структуре бактериальных комплексов в процессе вегетации растений происходили в филлосфере – наблюдали постепенную смену актинобактерий на молодых листьях целлюлозоразрушающими миксобактериями и цитофагами при старении листьев и образовании плодов (метёлок овса и бобов вики и гороха). При прорастании семян на листьях и стеблях всходов различных видов растений, судя по литературным данным, доминируют подвижные протеобактерии, являющиеся эккрисотрофами и представленные псевдомонадами, спириллами, эрвиниями. В наших экспериментах на молодых листьях и стеблях овса, вики и гороха доминировали не грамотрицательные протеобактерии, а грамположительные актинобактерии – представители родов *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*. Эти бактерии, как и протеобактерии, могут так же питаться экссудатами растений и довольствоваться низкими концентрациями питательных веществ (относятся к олиготрофам). Их доминирование на молодых растениях связано с периодами летней жары и засухи в периоды отбора образцов, что связано с устойчивостью актинобактерий к засухе, в отличие от грамотрицательных подвижных протеобактерий – типичных гидробионтов. Нам удалось выделить представителей этих групп бактерий лишь перед уборкой урожая на листьях овса после выпавших дождей. Этот факт лишней раз подтверждает влияние влажности на таксономический состав бактериальных комплексов, развивающихся в филлосфере растений.

Наиболее значимым в смене таксонов бактерий в филлосфере и ризосфере в процессе онтогенеза растений представляется замена эккрисотрофных бактерий на гидролитические, относящиеся к группе

целлюлозоразрушающих бактерий. Это связано со снижением метаболической активности листьев и корней, что проявляется в снижении количества выделяемых метаболитов и старении органов растений. Постепенно накапливается тот спектр бактерий, который впоследствии участвует в разложении отмирающих растительных тканей. Подобные выводы были сделаны ранее другими исследователями, изучавшими бактериальные комплексы ризосферы разных растений (Красильников, 1958., Емцев, Мишустин, 2005).

Проведённый нами трёхфакторный анализ позволил установить, что наиболее значимым фактором, определяющим специфику таксономического состава бактериальных сообществ в агроценозе, является часть или орган растения (листья, цветки, корни, плоды), определяемый ярусом (надземный, либо подземный). В смене таксонов определяющее влияние оказывает стадия развития растений. Что касается сравнения типов бактериальных сообществ овса, вики и гороха, то следует отметить, что зерновые культуры отличаются от бобовых лишь наличием у последних активных азотфиксаторов-ризобий в клубеньках, являющихся симбионтами бобовых растений. Относительно других групп бактерий – актинобактерий и скользящих (цитофаги и миксобактерии), то их соотношение и состав на вике, овсе и горохе мало отличалось.

7.2. Влияние гуминовых удобрений на структуру бактериальных сообществ культурных растений.

При рассмотрении влияния гуминовых удобрений на структуру бактериальных сообществ овса и вики выявлено, что опрыскивание гуминовым удобрением вики и овса привело к повышению урожайности зелёной массы вики и овса от 442 до 513ц/га. Внесение удобрения БИОУД-1 повлияло и на таксономическую структуру эпифитных бактерий, как овса, так и вики. Доминировавшие в бактериальных сообществах листьев вики миксобактерии и цитофаги, сменились под

влиянием удобрений на родококки. Появились в качестве субдоминантов и другие представители актинобактерий – *Arthrobacter* и *Cellulomonas* (рис. 25).

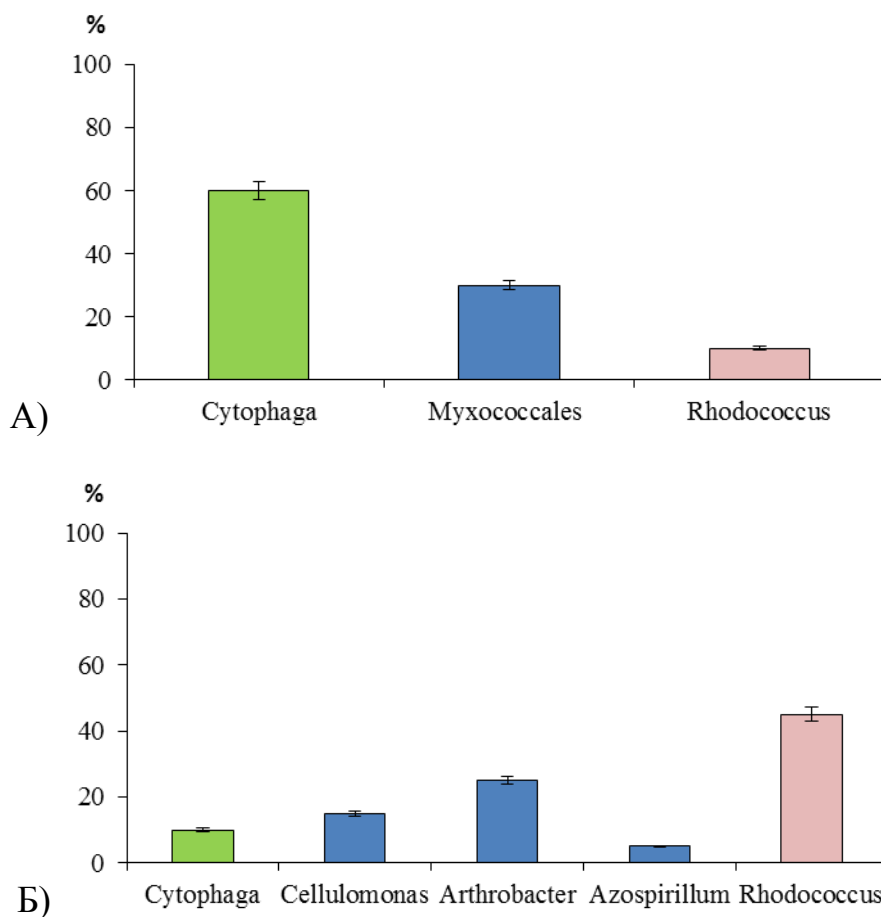


Рисунок 25. Влияние удобрения на таксономический состав бактериальных сообществ листьев вики в период цветения
А - Контроль; Б – БИОУД-1

Ещё большие изменения произошли в эпифитных комплексах цветков вики – бактерии рода *Rhodococcus* были обнаружены в качестве монодоминантов (90%) в результате подкормки гуминами, в то время как в контрольных вариантах на цветках преобладали целлюлозоразрушающие бактерии порядка Мухососкалес (рис. 26)

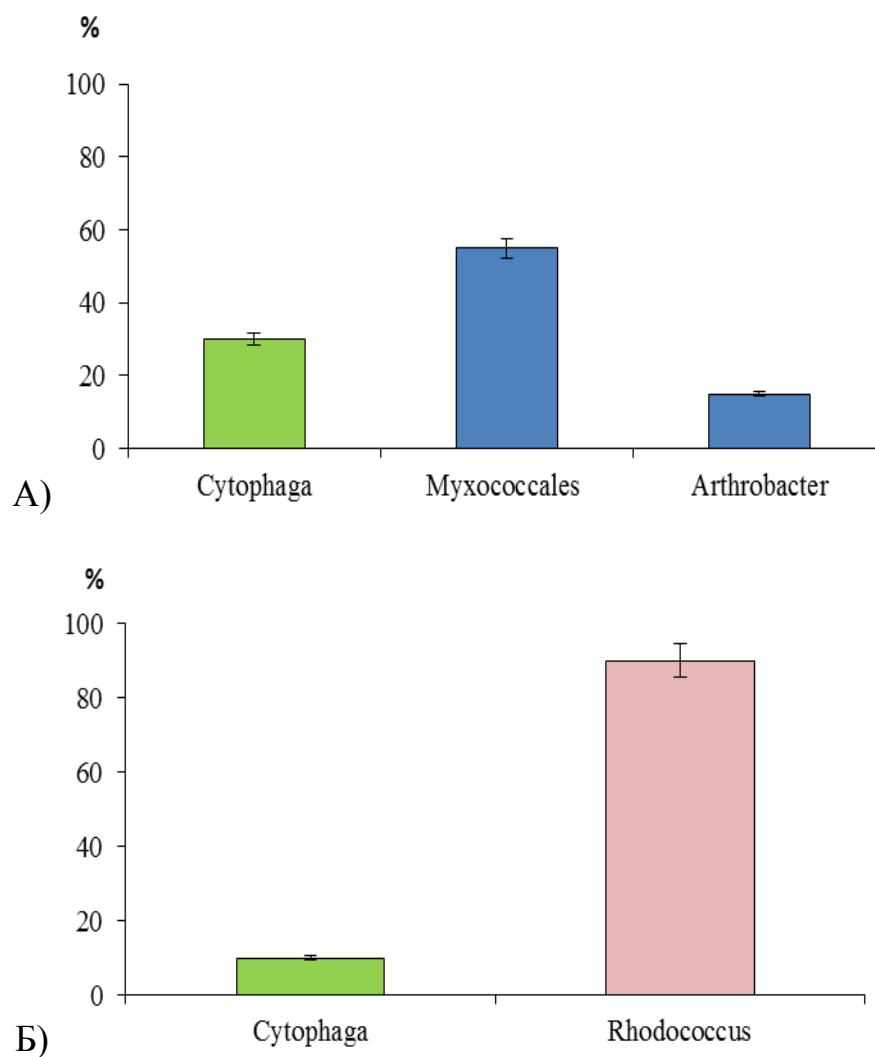


Рисунок 26. Влияние удобрения на таксономический состав бактериальных сообществ цветков вики

А-Контроль; Б- БИОУД-1

Родококки были выявлены в качестве доминантов и на бобах вики после внекорневой подкормки. В качестве второго доминанта сохранились преобладавшие в контроле цитофаги (рис.27).

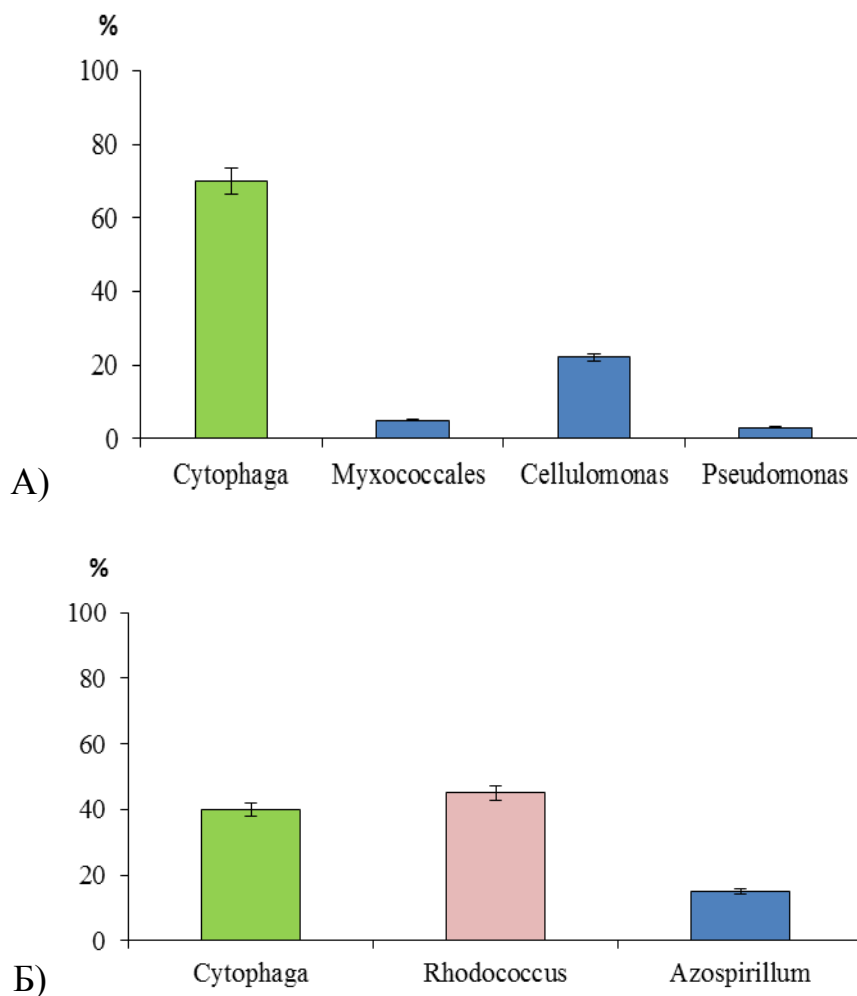


Рисунок 27. Влияние удобрения на таксономический состав бактериальных сообществ бобов вики

А-Контроль; Б – БИОУД-1

Аналогичную картину наблюдали на метёлках овса - замену доминирующих в контроле миксобактерий на родококки, ставшие монодоминантами (90%) в бактериальных комплексах колосьев под влиянием опрыскивания их гуминовым удобрением (рис. 28).

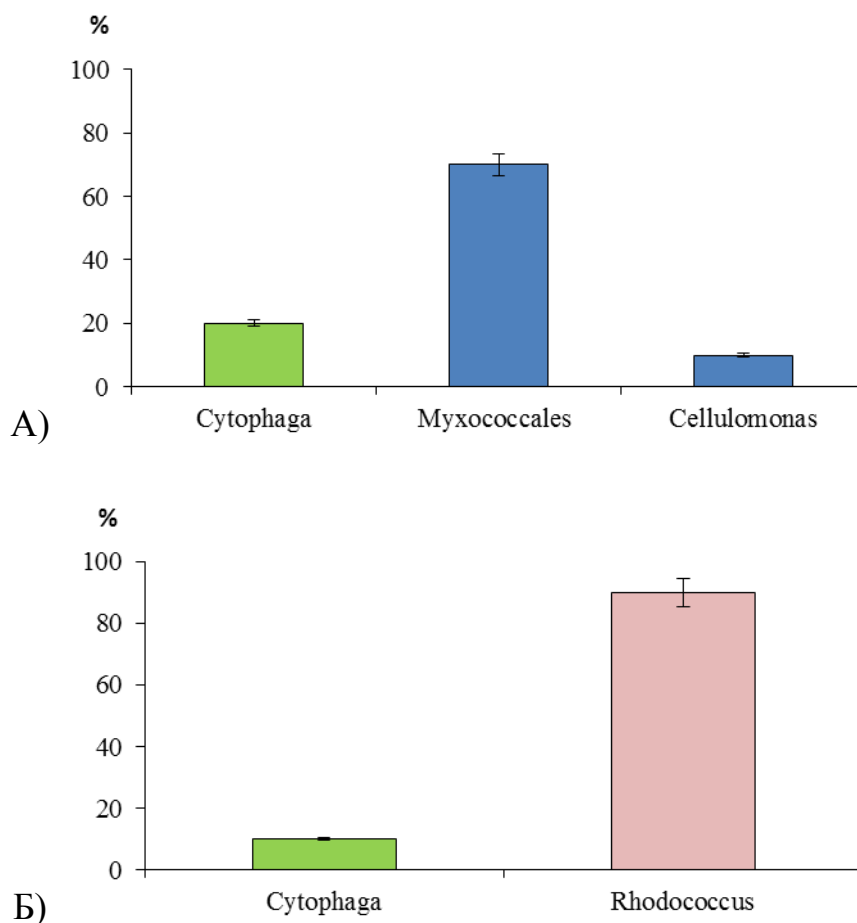


Рисунок 28. Влияние удобрения на таксономический состав бактериальных сообществ метелок овса
А-Контроль; Б – БИОУД-1

В бактериальных сообществах ризосферы овса и вики происходили другие (в отличие от филлосферы) изменения в таксономическом составе в результате подкормки этих растений гуминами. Они заключались в увеличении доли и разнообразия целлюлолитических бактерий (рис. 29,30). Особенно чётко это проявилось в ризосфере овса – доминировавшие в контроле типично почвенные бактерии рода *Arthrobacter* (70%), заменились целлюлозоразрушающими бактериями. Они были представлены миксобактериями (60%), бациллами и целлюломонадами (по 20%) (рис 30).

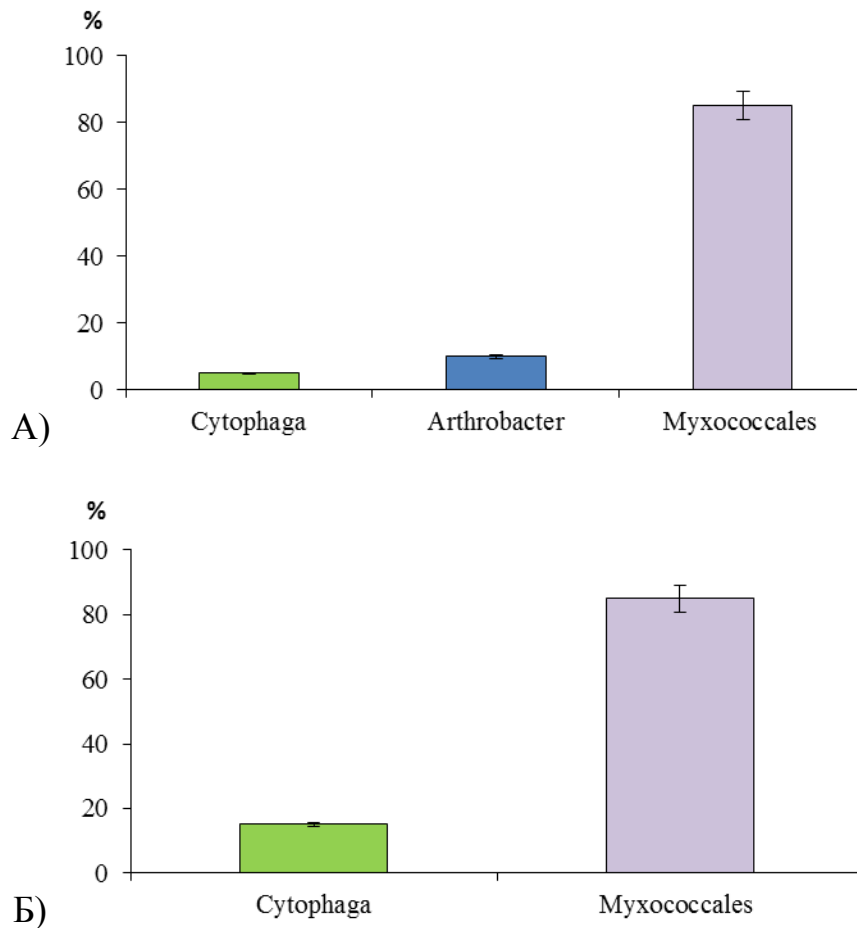


Рисунок 29. Влияние удобрения на таксономический состав бактериальных сообществ ризосферы вики
А-Контроль; Б – БИОУД-1

Таким образом, в филлосфере овса и вики в результате непосредственного попадания гуминового удобрения на надземные части растений наблюдали развитие тех актинобактерий (*Rhodococcus*), которые способны использовать те ароматические соединения, которые входят в состав гуминовых удобрений (Бабошин, 2007). В результате деструкции этих веществ могут освобождаться аминокислоты (гистидин и др.), которые способны к стимуляции роста растений (Лысак, Сидоренко, 1997). Этот факт свидетельствует о благоприятном воздействии гуминовых удобрений на растения, в том числе и благодаря функционированию эпифитных бактериальных сообществ.

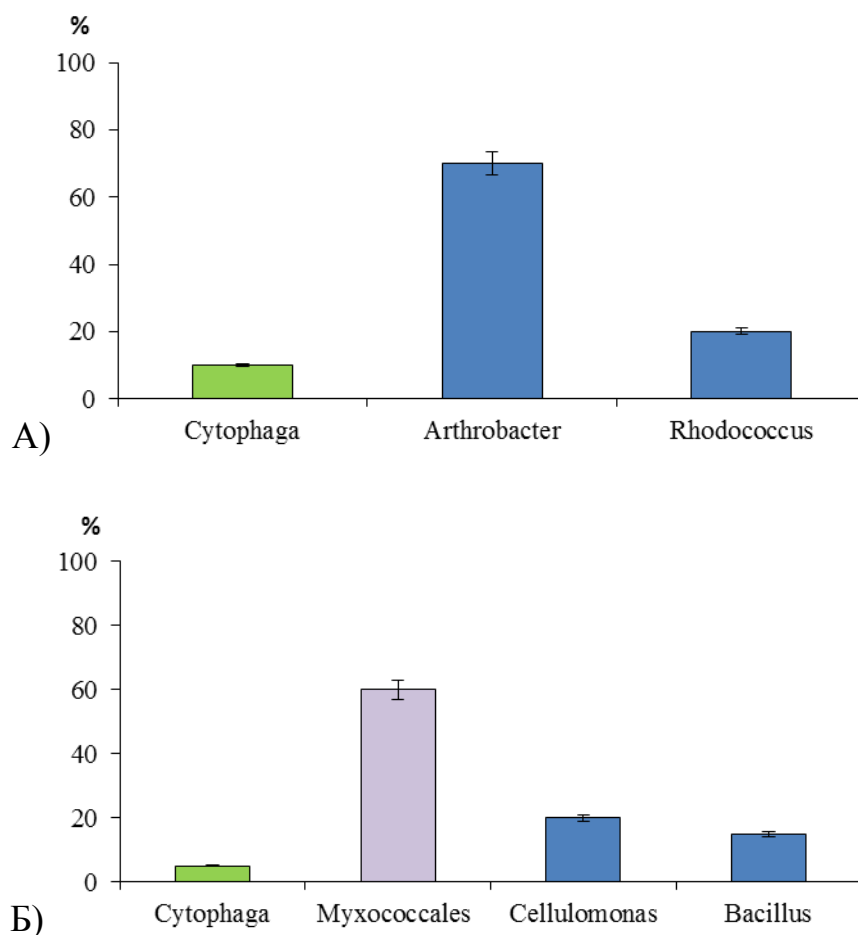


Рисунок 30. Влияние удобрения на таксономический состав бактериальных сообществ ризосферы овса
 А-Контроль; Б – БИОУД-1

Увеличение целлюлолитических бактерий в ризосфере овса и вики связано, вероятно, с проникновением гуминов и в корни, где они используются этими бактериями-гидролитами в качестве дополнительного источника питания. Кроме того, возможно перемещение скользящих бактерий (цитофаг и миксобактерий) из надземных в подземные части растений. Этот факт следует так же рассматривать как благоприятный, так как скопление целлюлолитиков в филлосфере (а не в ризосфере) могло бы привести к ускорению разложения вики и овса, используемой в качестве корма для скота.

Одной из задач наших исследований – изучить влияние внекорневой подкормки гуминовыми препаратами БИОУД-1 и Гумистим на численность и таксономическую структуру эпифитных бактерий картофеля.

Известно, что при подкормке гуминовыми удобрениями увеличивается урожайность картофеля: по сравнению с контролем она увеличилась на 37% и составила около 50 т/га. При применении жидкого органического удобрения БИОУД-1 урожайность возросла на 14% и составила около 40 т /га (Балабко и др., 2010).

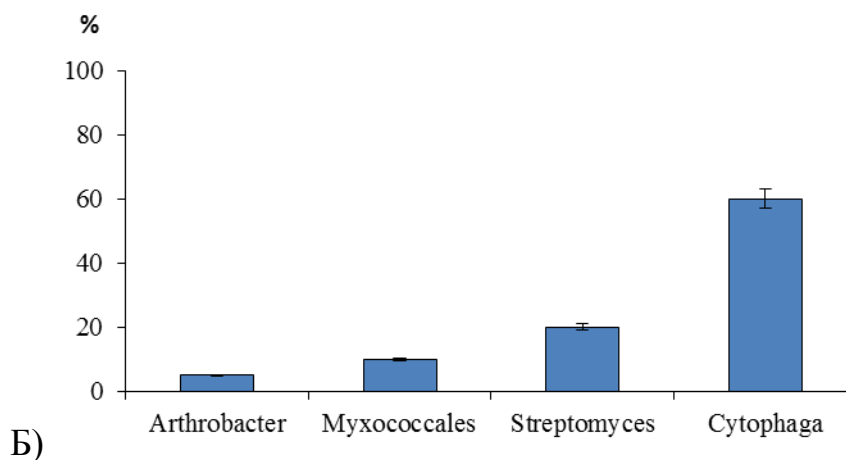
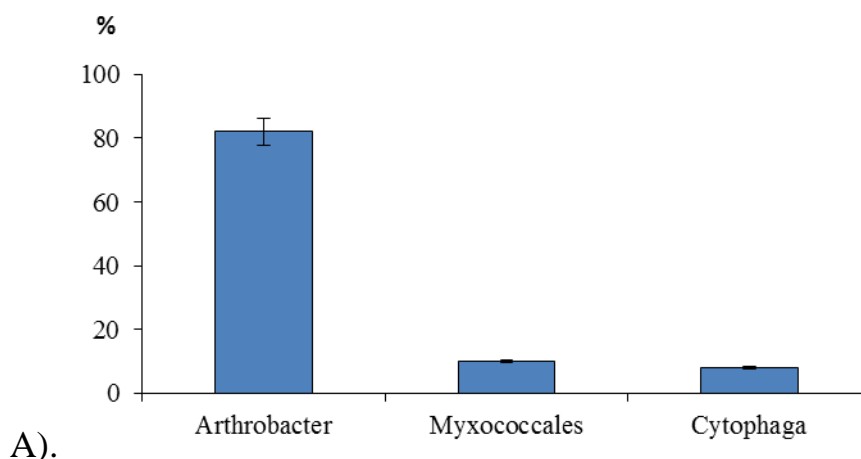
Оценку воздействия гуминовых удобрений на численность бактерий в агроценозе проводили в период цветения картофеля. При опрыскивании гумистимом количество бактерий на листьях и стеблях картофеля практически не изменилось, в то время как на цветках и корнях оно уменьшилось на 2 порядка. Воздействие удобрения БИОУД-1 проявилось в уменьшении концентрации бактерий на всех органах картофеля – количество бактерий сократилось на 1-2 порядка. Возможно, что падение количества бактерий под воздействием гуминовых препаратов связано с тем, что при их распылении перекрываются отверстия, через которые бактерии питаются экссудатами растений. На численность бактерий в почве внекорневая подкормка удобрениями не повлияла – количество бактерий в контроле и опытных вариантах составляло $7-12 \cdot 10^6$ КОЕ/г (табл.7).

В результате опрыскивания филлосферы картофеля удобрениями произошли чёткие изменения в таксономической структуре бактериальных сообществ филлосферы. Доминировавший в этот период на листьях картофеля артробактер, сменился после внесения препарата БИОУД-1 на таких представителей целлюлозоразрушающих бактерий как *Cytophaga*, артробактер остался в качестве минорного компонента, а при внесении гумистима – обнаружили два доминанта – *Cellulomonas* и *Cytophaga*, в

качестве минорных компонентов были выделены родококки и эрвинии (рис.31)

Таблица 7. Влияние удобрений на численность бактерий на разных органах картофеля и в почве (в период цветения картофеля) (КОЕ/г).

Вегетативные органы, почва	Контроль	Гумистим (опрыскивание)	БИОУД-1 (опрыскивание)
Листья	$(5,8 \pm 0,7) * 10^7$	$(16,8 \pm 0,5) * 10^7$	$(8,8 \pm 0,3) * 10^5$
Стебли	$(1,48 \pm 0,5) * 10^6$	$(5,2 \pm 0,1) * 10^6$	$(4,8 \pm 0,1) * 10^5$
Цветы	$(5,3 \pm 1,7) * 10^8$	$(6,6 \pm 0,8) * 10^6$	$(1,6 \pm 0,2) * 10^7$
Корни	$(5,2 \pm 0,7) * 10^8$	$(1,6 \pm 0,06) * 10^6$	$(1,8 \pm 0,4) * 10^6$
Почва	$(8,4 \pm 0,5) * 10^6$	$(12 \pm 1,3) * 10^6$	$(7 \pm 2,1) * 10^6$



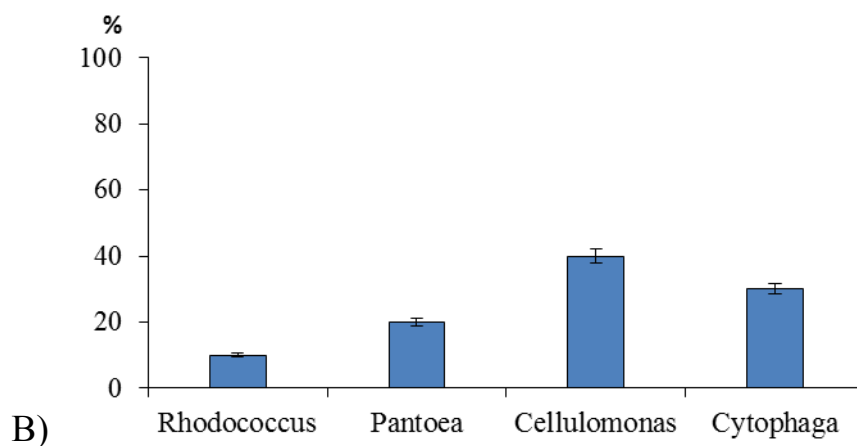
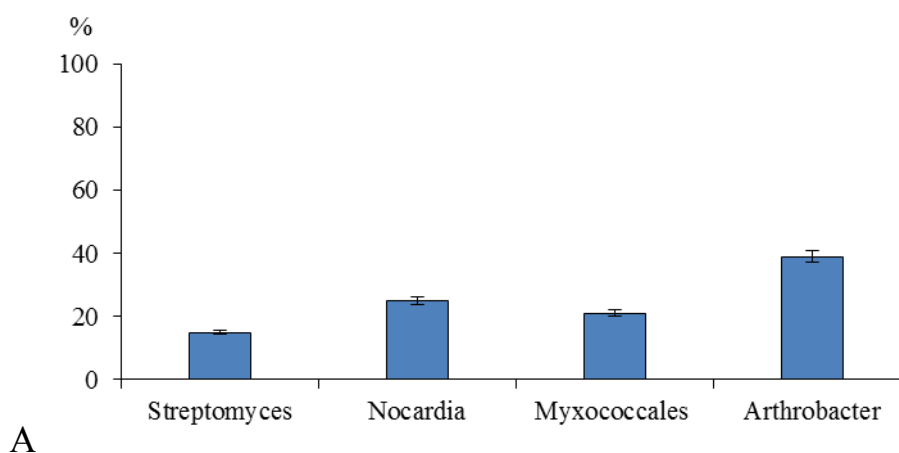


Рисунок 31. Влияние удобрений на таксономический состав бактериальных сообществ листьев картофеля в период цветения
 А – Контроль; Б - БИОУД-1; В - Гумистим

В ризосфере картофеля перестройка структуры сообщества проходила так же с увеличением доли целлюлозоразрушающих бактерий, представленных порядком Мухососсаles, которые становились монодоминантами при воздействии как гумистима, так и БИОУДа-1 (рис. 32).



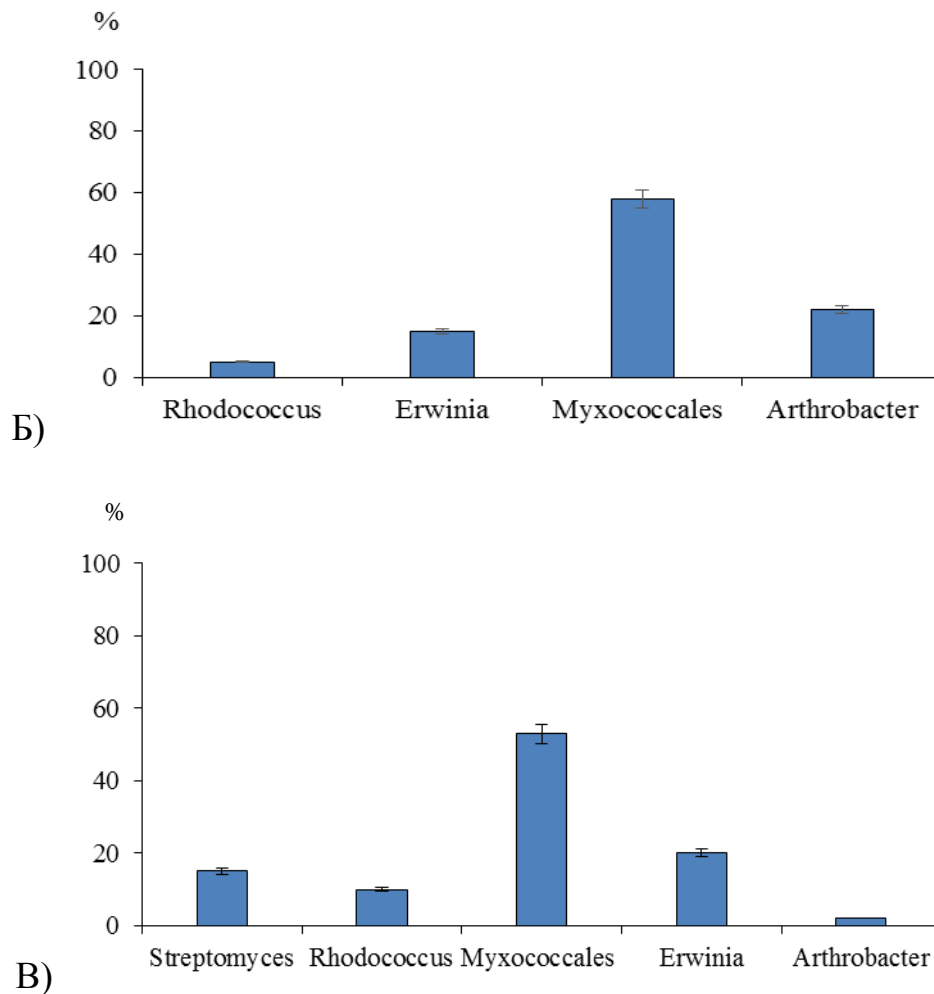


Рисунок 32. Влияние удобрений на таксономический состав бактериальных сообществ корнеплодов картофеля в период цветения
 А – Контроль; Б - Гумистим; В – БИОУД-1

На цветках картофеля наблюдали противоположную картину: при опрыскивании гуминовыми удобрениями – исчезновение цитофаг и выход в доминанты тех протеобактерий, которые характерны для цветков – *Pantoea* и *Pseudomonas* (рис.33).

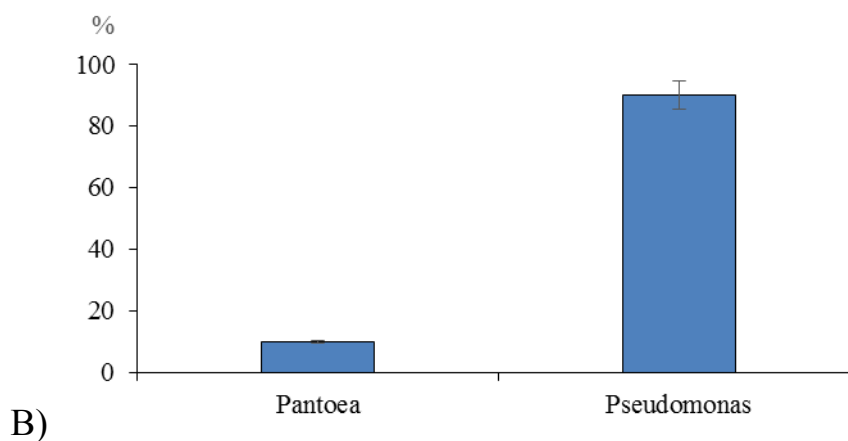
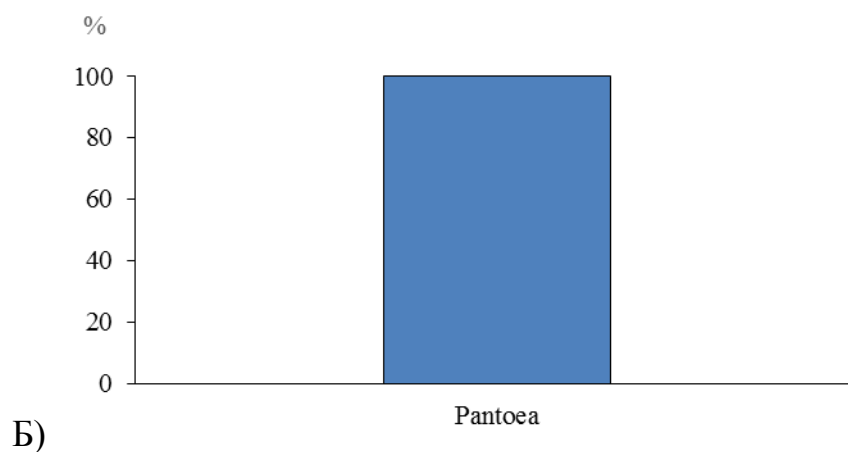
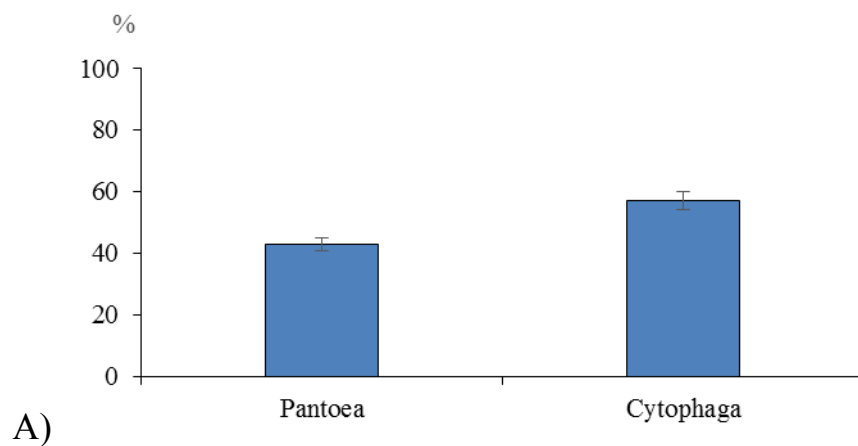


Рисунок 33. Влияние удобрений на таксономический состав бактериальных сообществ цветков картофеля
 А – Контроль; Б - Гумистим; В –БИОУД-1

В почве так же происходило уменьшение целлюлозоразрушающих бактерий и выход в доминанты типично почвенных бактерий – артробактера и актиномицетов (рис. 34).

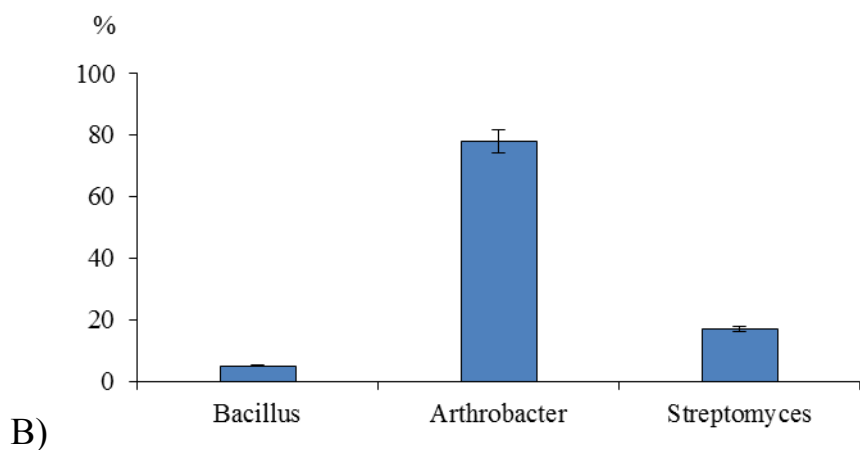
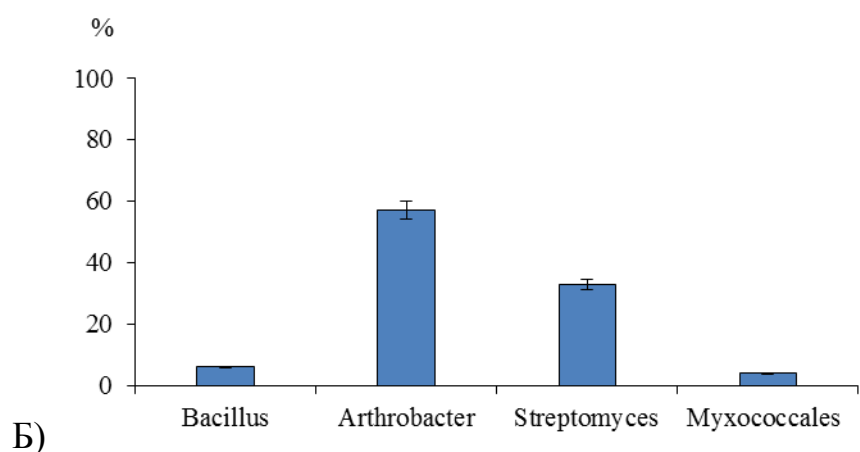
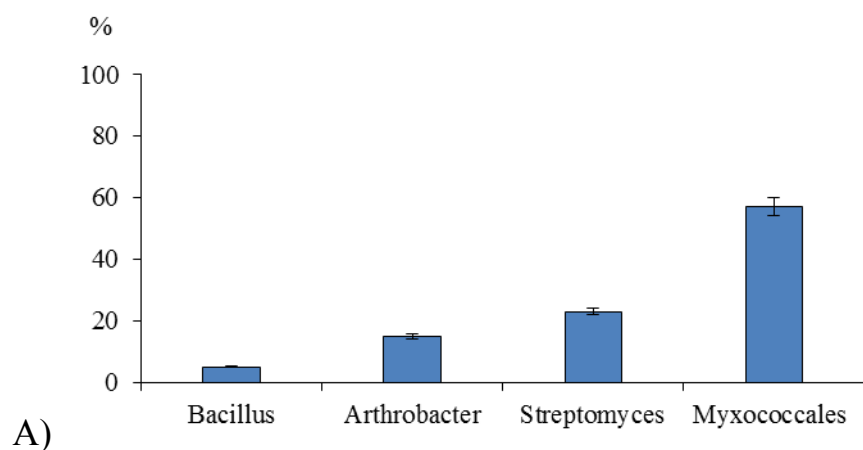


Рисунок 34. Влияние удобрений на таксономический состав бактериальных сообществ почвы под картофелем в период цветения
 А – Контроль; Б - БИОУД-1; В - Гумистим

Таким образом, большинство целлюлозолитиков после внесения удобрений концентрировалось в филлосфере и ризосфере картофеля, что

связано, вероятно, с использованием этими бактериями тех субстратов, которые поступают с этими удобрениями. Известно, что в состав гумистима входят все компоненты биогумуса в растворенном состоянии. Кроме того, при посеве препарата Гумистим на ту же среду, на которую высевались бактерии (ГПД), нами были выделены представители рода *Cellulomonas* – те целлюлозоразрушающие бактерии, которые становились доминирующими при опрыскивании картофеля гумистимом. Следовательно, с гумистимом на растения переносились и целлюломонады. Следует также напомнить, что при опрыскивании гумистиновыми удобрениями вики и овса наблюдали резкое увеличение доли родококков, которые в большинстве случаев становились доминантами на листьях и метёлках овса, цветках и бобах вики.

Таким образом, увеличение урожайности как вики и овса, так и картофеля, зафиксированное при внекорневой подкормке этих растений гуминовыми удобрениями, напрямую связано с перестройкой таксономической структуры эпифитного комплекса этих бактерий, заключающейся в резком увеличении доли бактерий-гидролитиков и родококков, способных к деструкции используемых удобрений.

7.3. Численность и таксономическая структура эпифитных бактериальных сообществ сорных растений.

Всего было проанализировано 118 образцов сорных растений, включающих листья, корни, цветки, семена, отобранные на разных стадиях развития растений. Численность бактерий эпифитного комплекса на листьях и корнях исследованных растений колебалась в пределах $10^6 - 10^9$ КОЕ/г. (табл. 8) При этом наблюдалась тенденция к увеличению численности бактерий на 2-3 порядка на стадиях цветения и созревания семян, особенно на листьях. На цветках плотность бактериальных популяций была почти такой же, как на листьях, $10^6 - 10^8$ КОЕ/г. В почве количество бактерий постоянно было ниже и составляло $10^5 - 10^7$ КОЕ/г.

Таблица 8. Численность эпифитных бактерий на сорных растениях в процессе развития растений, КОЕ/г.

Название растения, почва	Вегетативные органы	Всходы	Цветение	Созревание семян
Пастушья сумка	Листья	$7,4 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^9$
	Корни	$1,64 \cdot 10^7$	$8,2 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^8$
	Цветки	-	$4 \cdot 10^6$	-
	Семена	-	-	$8,6 \cdot 10^8$
Лебеда	Листья	$2,1 \cdot 10^6$	$7,4 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^9$
	Корни	$9,2 \cdot 10^8$	$6,4 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$
	Цветки	-	$5,1 \cdot 10^6$	-
	Семена	-	-	$7,6 \cdot 10^8$
Пикульник	Листья	$8,2 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^9$
	Корни	$1,2 \cdot 10^9$	$5,8 \cdot 10^8$	$9,6 \cdot 10^6$
	Цветки	-	$3 \cdot 10^5$	-
	Семена	-	-	$6,2 \cdot 10^7$
Осот	Листья	$4 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^8$
	Корни	$9,2 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^8$	$3,3 \cdot 10^8$
	Цветки	-	$6 \cdot 10^5$	-
	Семена	-	-	$2 \cdot 10^5$
Сурепка	Листья	$6 \cdot 10^6$	$7,6 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$
	Корни	$4 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^6$
	Цветки	-	$5,2 \cdot 10^8$	-
	Семена	-	-	$2 \cdot 10^7$
Почва		$5,8 \cdot 10^5$	$4,6 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^6$

Одни и те же виды сорняков были взяты с различных экологических ниш: с края и середины опытного поля, а так же из смешанного леса, расположенного по краю поля. Рассмотрим как изменялась численность

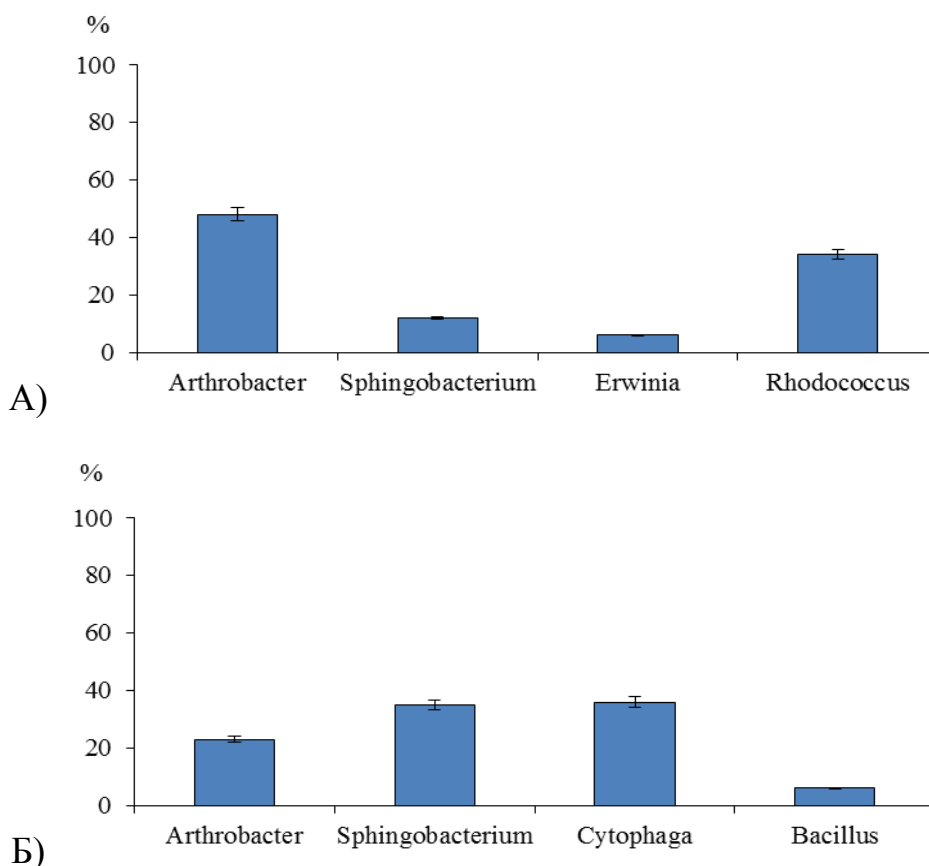
бактериальных сообществ сорных растений, отобранных из разных экологических ниш в период их цветения (табл. 9). В смешанном лесу плотность бактериальных была выше на 1-2 порядка по сравнению с краем и серединой поля. Так, например, на пастушьей сумке численность бактерий на листьях, взятых с края и середины поля, составила 10^7 КОЕ/г, а на листьях, взятых из смешанного леса, расположенного по краю поля, была на 2 порядка выше и составила 10^9 КОЕ/г. В почве количество бактерий так же было выше на 2 порядка в смешанном лесу и составило 10^9 КОЕ/г.

Таблица 9. Численность эпифитных бактерий на сорных растениях, взятых с различных экологических ниш (край поля, середина поля, смешанный лес), в период цветения растений, КОЕ/г.

Название растения, почва	Вегетативные органы	Край поля	Середина поля	Смешанный лес
Пастушья сумка	Листья	$8 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^9$
	Корни	$9 \cdot 10^6$	$7,2 \cdot 10^7$	$8,2 \cdot 10^8$
	Цветки	$4 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$
Лебеда	Листья	$3,2 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	$7,4 \cdot 10^7$
	Корни	$2,6 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$	$6,4 \cdot 10^8$
	Цветки	$4,6 \cdot 10^6$	$3,7 \cdot 10^7$	$5,1 \cdot 10^6$
Пикульник	Листья	$1 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$
	Корни	$6,6 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^7$	$5,8 \cdot 10^8$
	Цветки	$1 \cdot 10^6$	$4,7 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$
Сурепка	Листья	$8,8 \cdot 10^7$	$9,2 \cdot 10^7$	$7,6 \cdot 10^8$
	Корни	$2,7 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^8$
	Цветки	$8,6 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^8$
Почва		$1 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$	$4,6 \cdot 10^9$

Таксономическая структура бактериальных сообществ сорных растений.

В процессе развития растений изменялась таксономическая структура бактериальных сообществ филлосферы сорных растений. На листьях пастушьей сумки (*Capsella bursa-pastoris*) на стадии всходов доминировали типично почвенные бактерии рода *Arthrobacter*, которые возможно попали из почвы, в качестве второго доминанта выделили представителей рода *Rhodococcus*, Бактерии родов *Sphingobacterium* и *Erwinia* были выделены в качестве минорных компонентов (рис.35). Следует отметить, что идентификация бактерий этих родов была проведена нами на основании молекулярно-биологических методов (рис.36,37). На стадии цветения произошла замена артробактера и родококков на бактерии гидролитического комплекса - *Sphingobacterium* и *Cytophaga*. На стадии созревания семян, на листьях пастушьей сумки обнаружены в качестве единственного монодоминанта сфингобактерии, а субдоминанта – миксобактерии (рис.35).



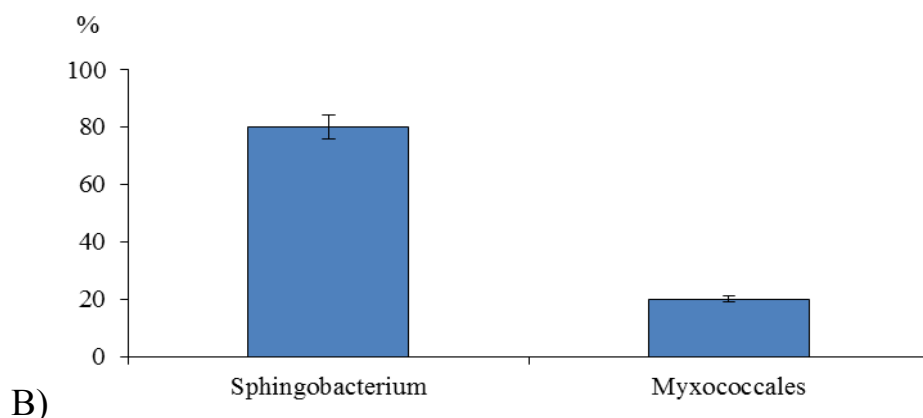


Рисунок 35. Таксономическая структура бактериальных сообществ листьев пастушьей сумки в процессе развития растения
А-Всходы; Б - Цветение; В – Созревание семян

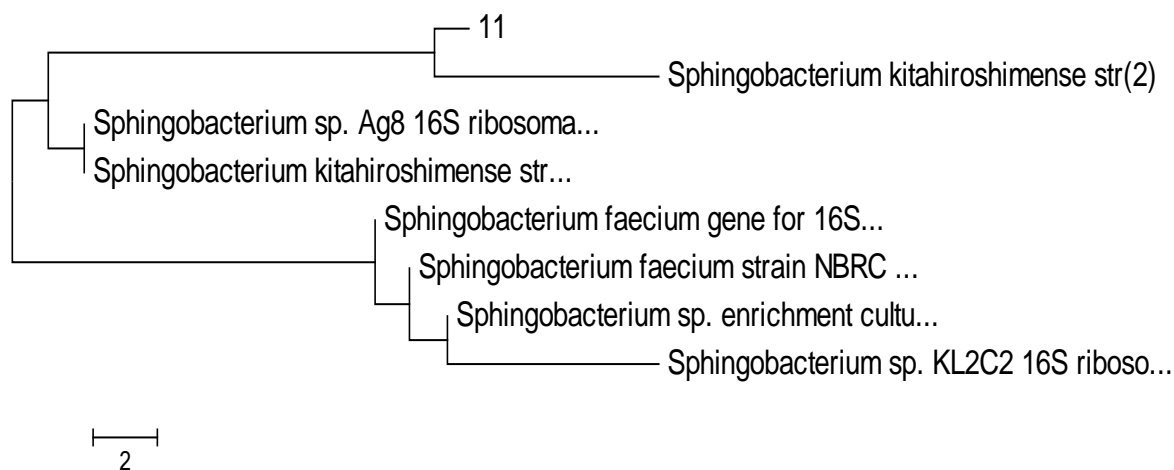


Рисунок 36. Филогенетическое положение исследуемых культур протеобактерий

На основании филогенетического положения штамма №11 следует, что этот штамм относится к роду *Sphingobacterium*, виду *kitahiroshimense*. Что касается принадлежности культур к роду *Erwinia*, то его видовую принадлежность не удалось установить – эти бактерии определены как *Erwinia sp* (рис.37).

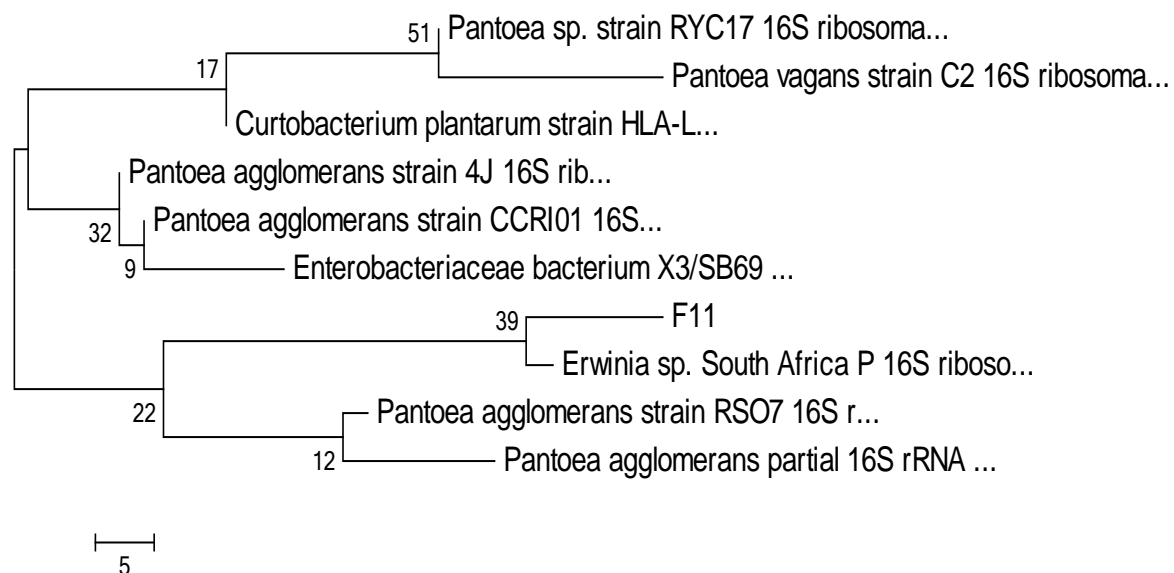


Рисунок 37. Филогенетическое положение исследуемых культур протеобактерий.

На всходах лебеды раскидистой (*Atriplex patula*), так же как и на всходах пастушьей сумки (*Capsella bursa-pastoris*), в качестве доминанта обнаружен *Arthrobacter*. На стадии цветения выявлены 2 доминанта – протеобактерии рода *Pseudomonas* (50%) и миксобактерии (более 30%) (рис.38). На стадии созревания семян миксобактерии остаются в качестве доминантов, субдоминанты представлены так же целлюлозоразрушающими бактериями родов *Cytophaga* и *Sphingobacterium*, минорные компоненты – так же гидролитики – *Cellulomonas* и *Streptomyces*. Таким образом, на стадии созревания семян на листьях как лебеды, так и пастушьей сумки, констатируем полный набор бактерий гидролитического комплекса. Наиболее интересным фактом, вытекающим из анализа таксономической структуры бактериальных сообществ пастушьей сумки и лебеды, является постоянное присутствие, а на большинстве стадий развития этих растений и доминирование бактерий рода *Sphingobacterium*.

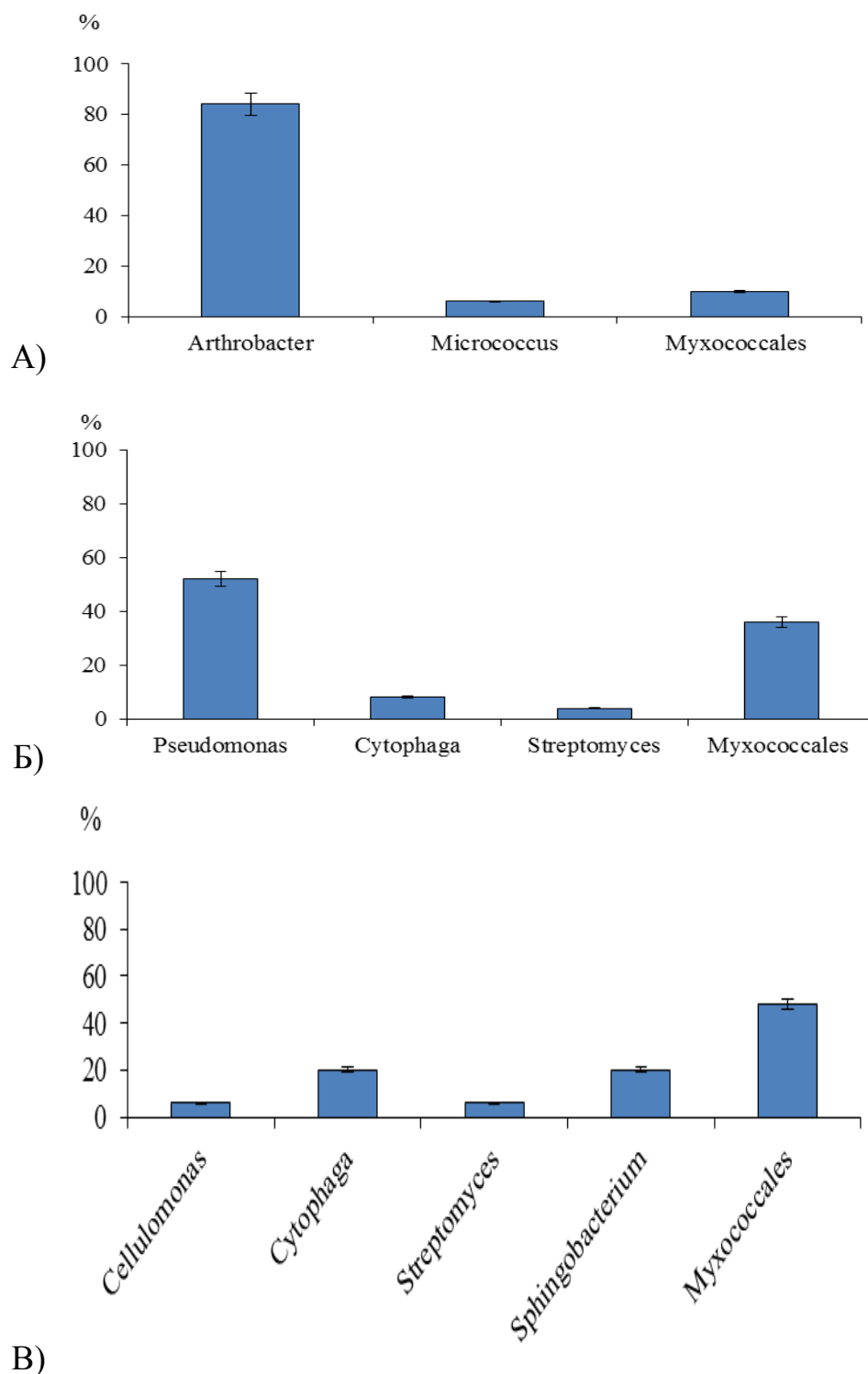


Рисунок 38. Таксономическая структура бактериальных сообществ листьев лебеды раскидистой в процессе развития растения
 А-Всходы; Б - Цветение; В – Созревания семян

На листьях осота полевого (*Sonchus arvensis*) на всходах в качестве доминанта выделили цитофаги и артробактер, на стадии цветения они

перешли в минорные компоненты, а в доминанты вышли бактерии рода *Sphingobacterium* (рис.39).

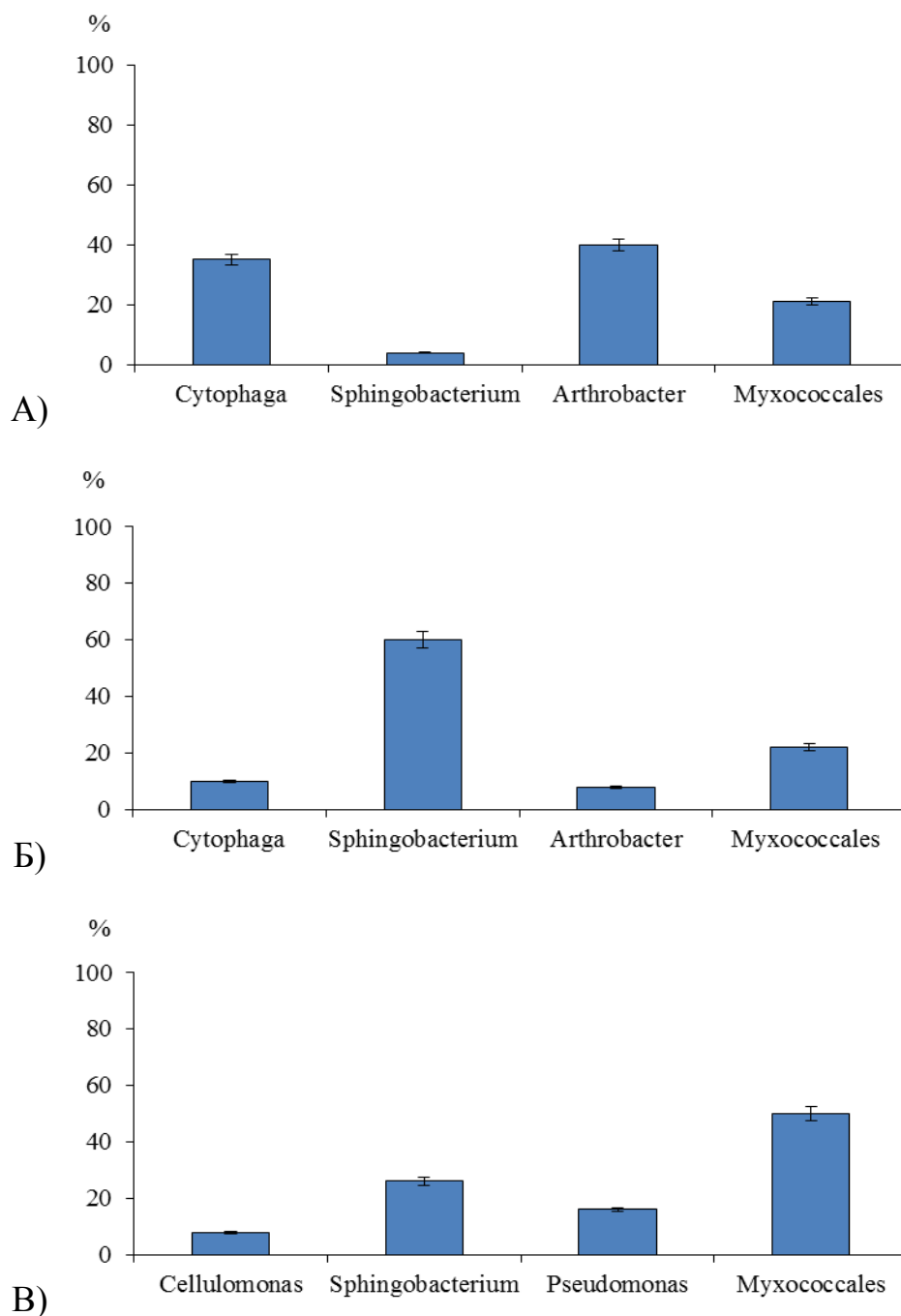


Рисунок 39. Таксономическая структура бактериальных сообществ листьев осота полевого в процессе развития растения
А-Всходы; Б - Цветение; В – Образование семян

На всходах пикульника обыкновенного (*Galeopsis tetrahit*) и подмаренника настоящего (*Galium verum*) доминировали артробактер, на

стадии цветения в доминанты у пикульника выходят цитофаги (рис.40), а у подмаренника – сфингобактерии (рис.41). На стадии созревания семян доминантами становятся цитофаги и целлюломонады. (рис.40,41).

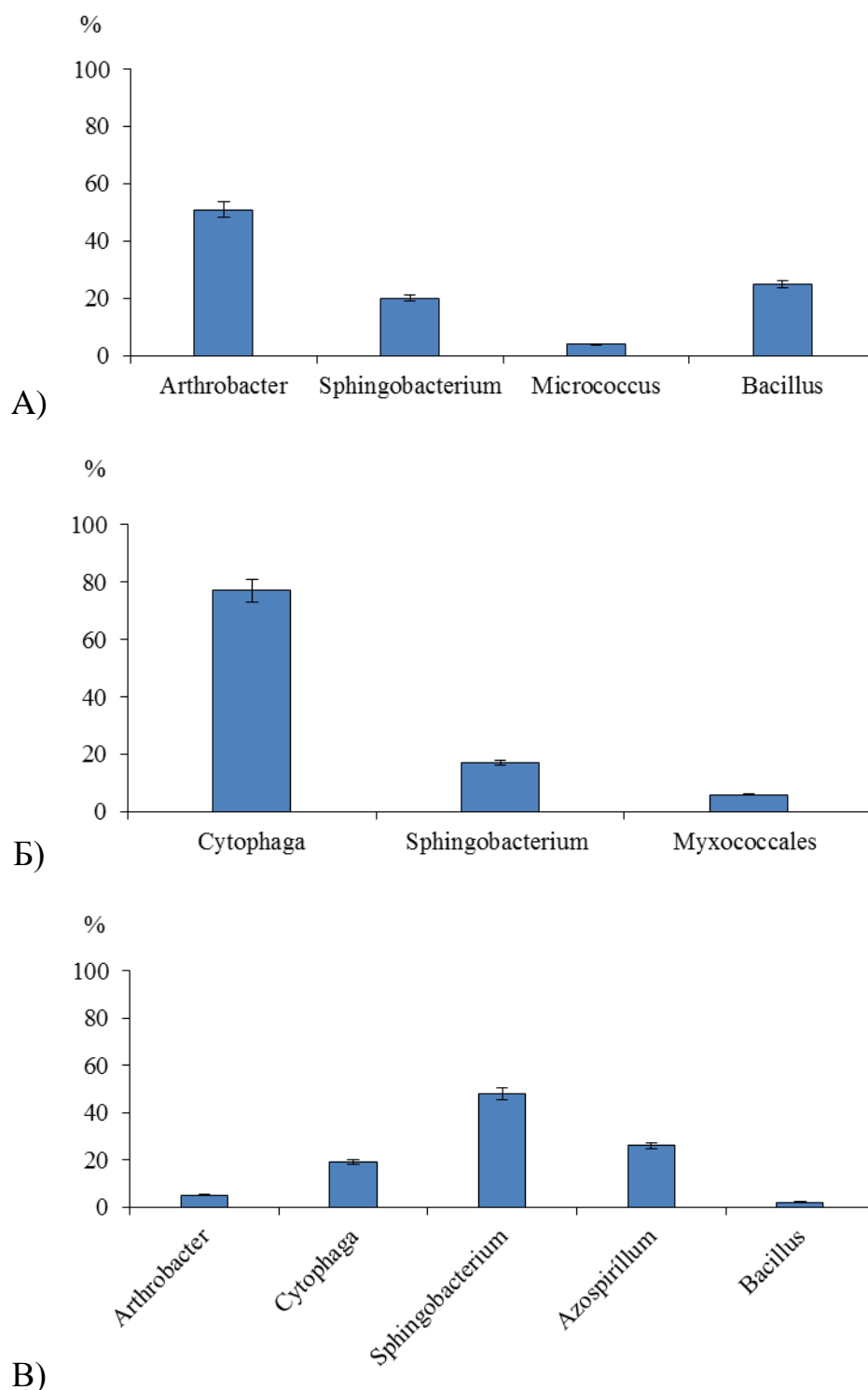


Рисунок 40. Таксономическая структура бактериальных сообществ листьев пикульника обыкновенного в процессе развития растения А-Всходы; Б - Цветение; В – Созревание семян

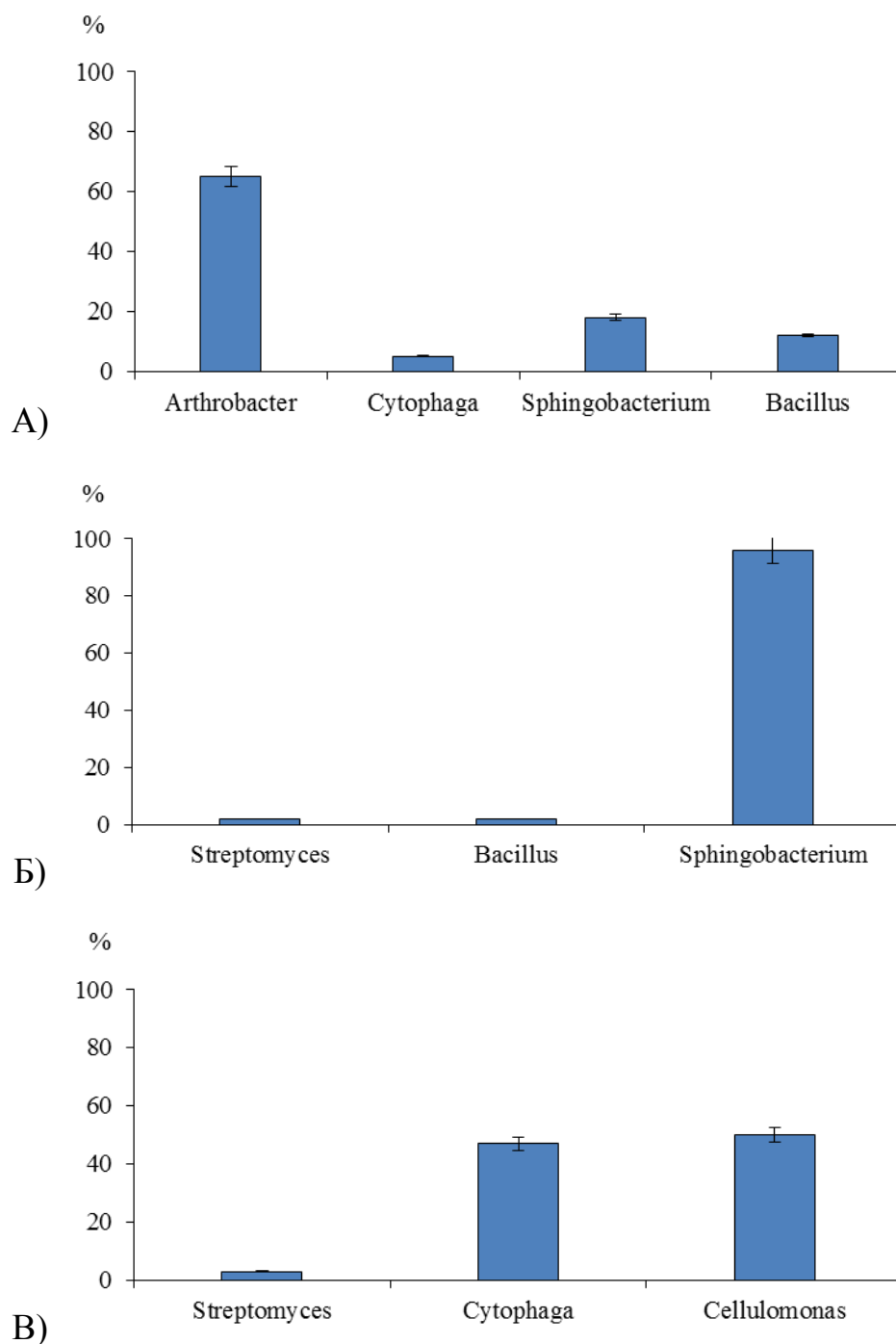


Рисунок 41. Таксономическая структура бактериальных сообществ листьев подмаренника настоящего в процессе развития растения
 А-Всходы; Б - Цветение; В – Созревание семян

При анализе динамики таксономической структуры бактериальных сообществ в филлосфере расторопши (рис.42) на стадии всходов на листьях доминировали коринеподобные бактерии рода *Arthrobacter* и сфингобактерии. Минорные компоненты были представлены родококками

и бациллами. На стадии цветения сфингобактерии становятся монодоминантами, повышается доля родококков, они становятся субдоминантами (20-30%). Минорные члены сообщества – артробактер и миксобактерии. В период созревания семян опять наблюдаем смену доминантов, ими становятся актинобактерии рода *Rhodococcus*, в качестве второго доминанта сохраняются сфингобактерии, увеличивается доля целлюлозоразрушающих миксобактерий. В качестве минорных выделились протеобактерии рода *Stenotrophomonas*.

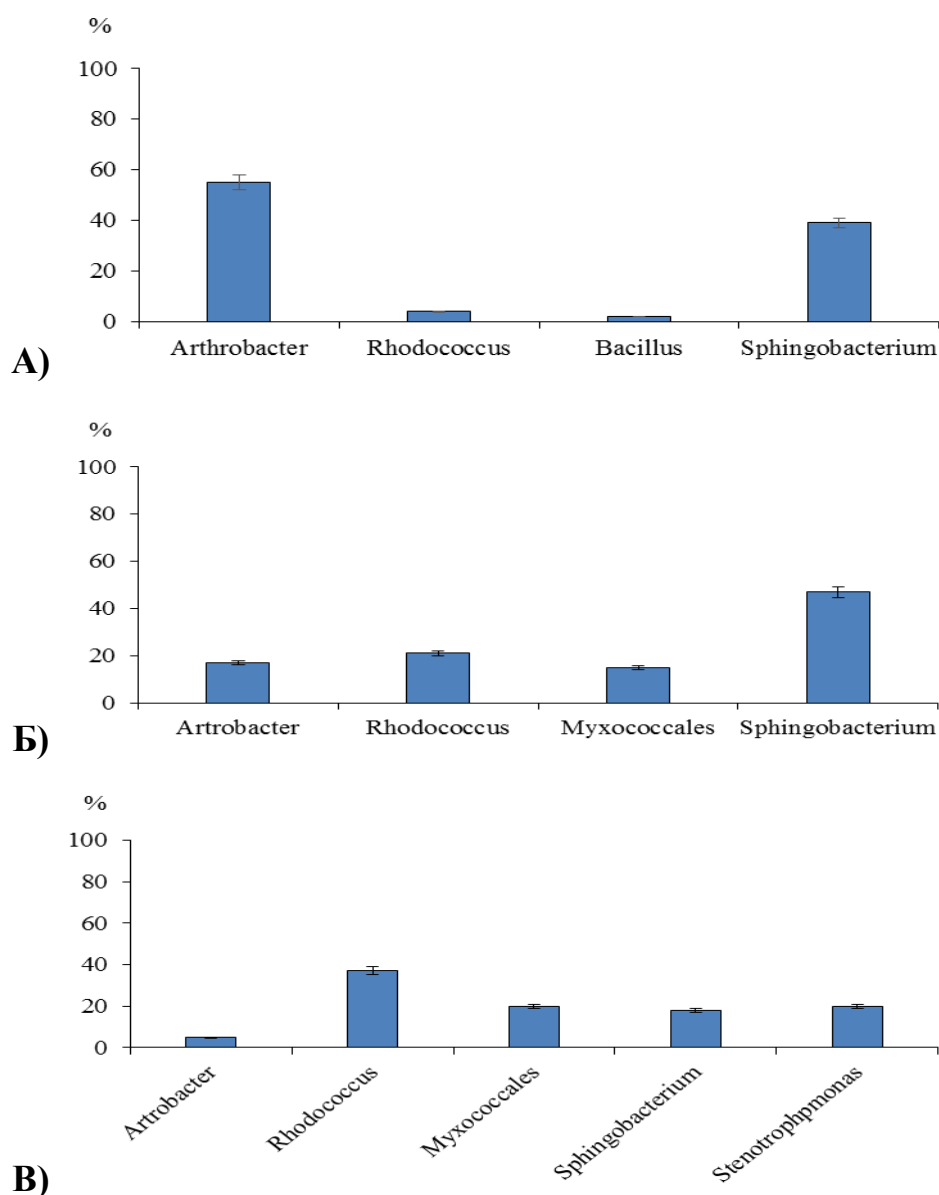


Рисунок 42. Таксономическая структура бактериальных сообществ листьев расторопши пятнистой в процессе развития растения
 А - Всходы; Б - Цветение; В – образование семян

Обобщая результаты, полученные при анализе динамики таксономической структуры бактериальных сообществ в филлосфере исследованных сорняков, то можно сделать выводы о резкой смене доминантов в процессе развития этих растений (табл.10). Следует, что на стадии всходов, на всех 6 видах сорных растений доминируют типично почвенные бактерии рода *Arthrobacter*, что вполне логично, учитывая его поступление из почвы на семена, а затем и листья. Относительная доля бактерий рода *Arthrobacter* в эпифитных бактериальных сообществах проростков колеблется от 40 до 80%. На стадиях цветения и образования семян происходит резкая смена доминантов – начинают преобладать бактерии гидролитического комплекса, представленные родами *Sphingobacterium*, *Cytophaga*, *Cellulomonas*, порядком Мухососcales (табл.10). Особое место среди исследованных сорных растений занимает расторопша. Для неё характерно доминирование на всех органах представителей протеобактерий, представленных как пигментными, так и апигментными формами. Кроме того, в качестве второго доминанта на листьях, отобранных в период цветения и созревания семян, доминируют родококки. Это связано, по-видимому, с более высоким содержанием фенольных веществ, в том числе флавоноидов, в растительных тканях расторопши, которые, как известно, используются родококками, обитающими на всех органах этого растения. Общее количество фенольных соединений в расторопше составляет 1.8-3.2%. Обилие разнообразных протеобактерий в филлосфере связано с удивительно разнообразным и сложным химическим составом расторопши, - белки, разнообразные макро- и микроэлементы, жиры, витамины. Недаром это растение, называемое расторопшей или чертополохом, является уникальным лекарственным растением, используемым при лечении очень многих заболеваний.

Таблица 10. Изменения доминирующих таксонов бактериальных сообществ на листьях сорных растений в процессе их развития

№	Название растения	Таксономический состав доминантов		
		Всходы	Цветение	Созревание семян
1	Пастушья сумка обыкновенная (<i>Capsella bursa-pastoris</i>)	Arthrobacter (50%) Rhodococcus (40%)	Sphingobacterium (40%) Cytophaga(40%)	Sphingobacterium (80%)
2	Лебеда раскидистая (<i>Atriplex patula</i>)	Arthrobacter (80%)	Мухососкалы (40%) Pseudomonas (50%)	Мухососкалы (40%)
3	Осот полевой (<i>Sonchus arvensis</i>)	Arthrobacter (40%) Cytophaga (30%)	Sphingobacterium (60%)	Sphingobacterium (30%) Мухососкалы (50%)
4	Пикульник обыкновенный (<i>Galeopsis tetrahit</i>)	Arthrobacter (50%)	Cytophaga(70%)	Sphingobacterium (50%)
5	Подмаренник настоящий (<i>Galium verum</i>)	Arthrobacter (60%),	Sphingobacterium (90%)	Cellulomonas (50%) Cytophaga(40%)
6	Расторопша пятнистая (<i>Silybum marianum</i>)	Arthrobacter (50%) Sphingobacterium (40%)	Sphingobacterium (40%)	Rhodococcus (35%)

При анализе изменения таксономической структуры бактериальных сообществ на цветках и семенах исследованных сорных растений выявлено, что на цветках пастушьей сумки бактерии рода *Sphingobacterium* остаются, как и на листьях, в роли монодоминанта, на семенах обнаружен второй доминант – родококки, минорные компоненты – миксобактерии и артробактер (рис.43)

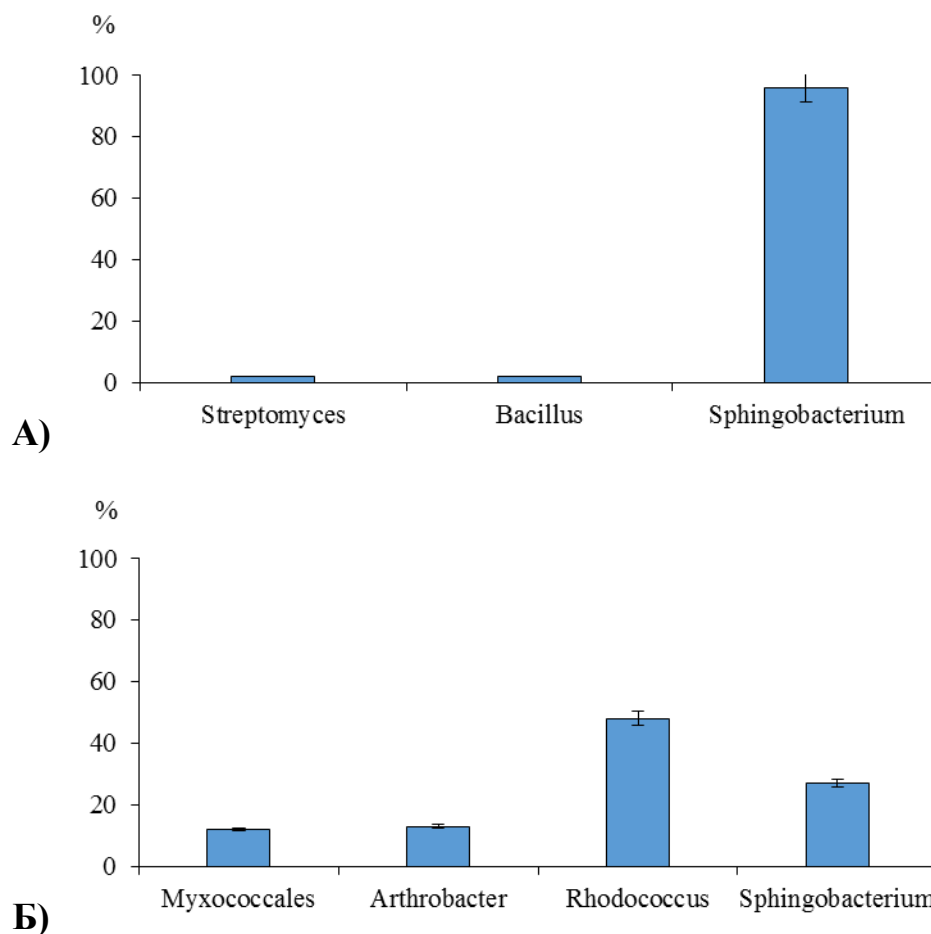


Рисунок 43. Таксономическая структура бактериальных сообществ пастушьей сумки в ряду цветки-семена

А – Цветки; Б – Семена

На цветках лебеды доминируют представители родов *Sphingobacterium* и *Micrococcus*, в качестве субдоминантов выделены цитофаги, минорных компонентов – родококки. На семенах лебеды сфингобактерии становятся монодоминантом, минорные компоненты – цитофаги и актинобактерии (*Arthrobacter* и *Streptomyces*) (рис.44).

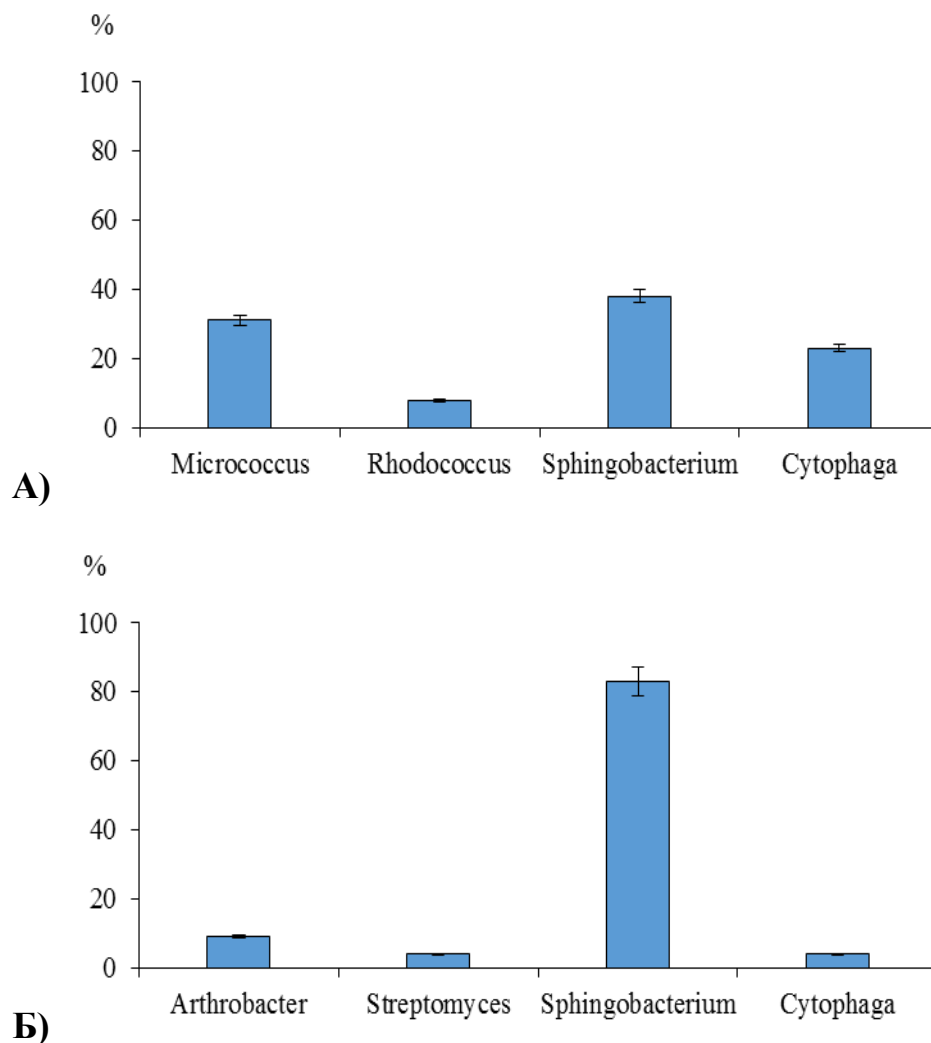


Рисунок 44. Таксономическая структура бактериальных сообществ лебеды раскидистой в ряду цветки-семена

А – Цветки; Б – Семена

На цветках сурепки доминировали представители факультативно-анаэробных бактерий рода *Pantoe* (ранее *Erwinia*), в качестве минорных компонентов обнаружены родококки и сфингобактерии. На семенах растения произошла смена доминантов - более 70% составили спорообразующие бактерии рода *Bacillus*, около 30% - сфингобактерии (*Sphingobacterium*).

(рис.45)

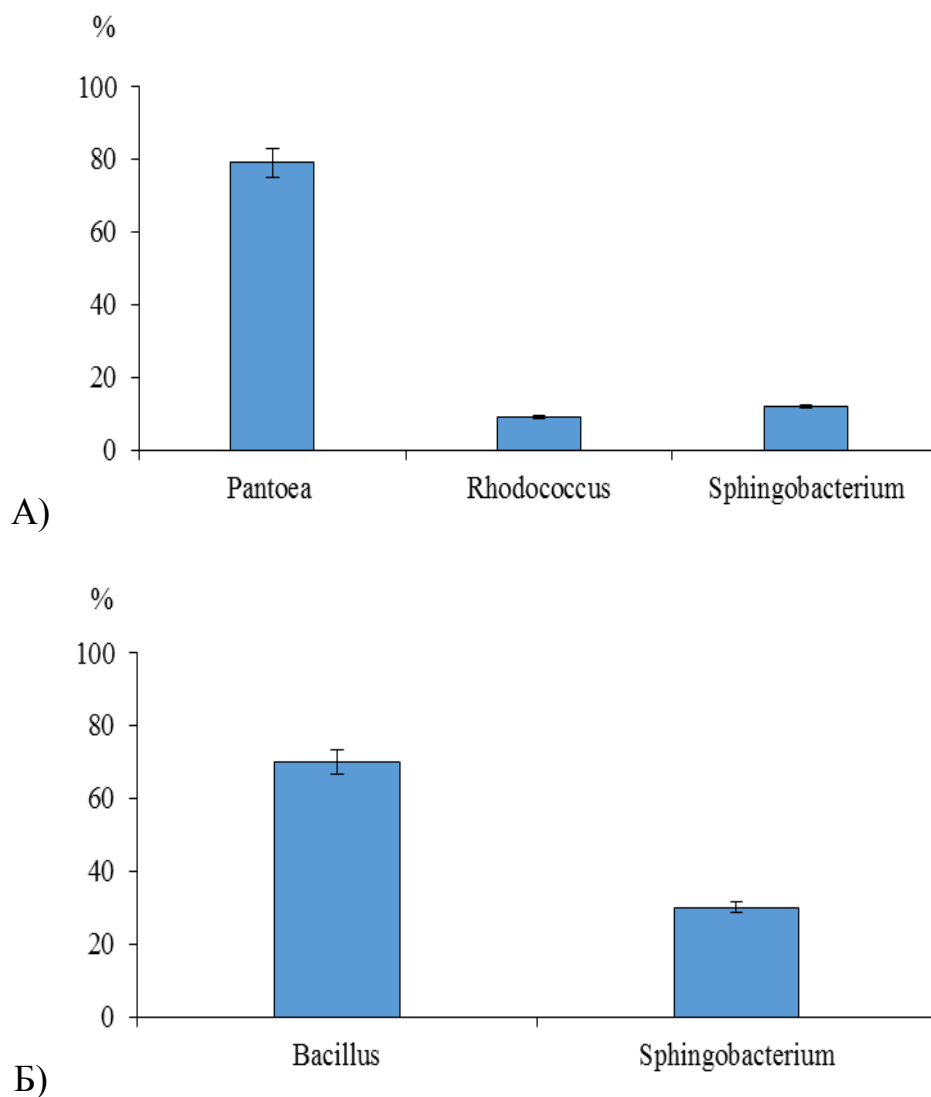


Рисунок 45. Таксономическая структура бактериальных сообществ сурепки обыкновенной в ряду цветки-семена
 А – Цветки; Б – Семена

На цветках расторопши преобладают те же бактерии, что были обнаружены на листьях в период цветения – сфингобактерии и миксобактерии. На семенах было зафиксировано 2 доминанта – те же сфингобактерии, что на цветках, но в качестве второго доминанта были обнаружены целлюлозоразрушающие бактерии рода *Cytophaga*. Миксобактерии так же выделялись, но в небольшом количестве (рис.46).

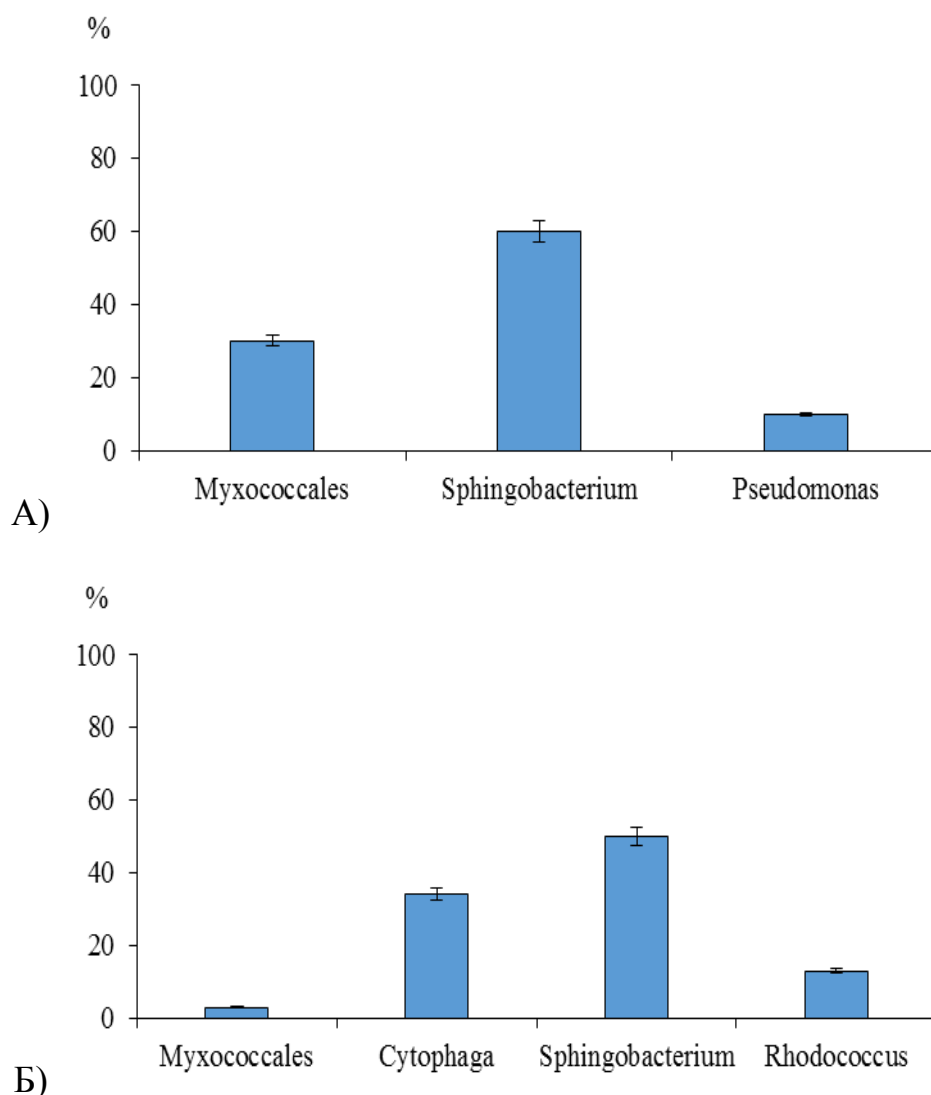


Рисунок 46. Таксономическая структура бактериальных сообществ расторопши пятнистой в ряду цветки-семена
 А – Цветки; Б – Семена

Таким образом, на цветках и семенах исследуемых сорных растений доминируют представители тех же таксонов, что на листьях, отобранных в период цветения и созревания семян. Это, прежде всего, бактерии рода *Sphingobacterium*. На семенах в качестве других доминантов выделялись так же бактерии-гидролитики – бациллы и цитофаги (табл. 11). Следует так же отметить преобладание протеобактерий (*Pantoea*) на цветках сурепки (80%) и актинобактерий (*Micrococcus*) – на цветках лебеды (30%). Представители этих родов не были обнаружены нами на листьях.

Таблица 11. Изменения доминирующих таксонов бактериальных сообществ сорных растений в процессе их развития в ряду цветки-семена.

№	Название растения	Таксономический состав доминантов	
		Цветки	Семена
1	Пастушья сумка обыкновенная (<i>Capsella bursa-pastoris</i>)	Sphingobacterium (90%)	Sphingobacterium(30%) Rhodococcus(50%)
2	Лебеда раскидистая (<i>Atriplex patula</i>)	Micrococcus(30%) Sphingobacterium (40%)	Sphingobacterium (90%)
3	Сурепка обыкновенная (<i>Barbarea vulgaris</i>)	Pantoe (80%)	Bacillus (70%) Sphingobacterium(30%)
4	Расторопша пятнистая (<i>Silybum marianum</i>)	Sphingobacterium (60%) Мухососцаles (30%)	Sphingobacterium(50%) Cytophaga(40%)

При изменении таксономической структуры бактериальных сообществ ризосферы сорных растений в процессе развития этих растений установлено, что на корнях пастушьей сумки (*Capsella bursa-pastoris*) на стадии всходов доминировали бактерии рода *Bacillus*. Бактерии родов *Sphingobacterium*, *Arthrobacter* и *Rhodococcus*, а также порядка Мухососцаles, были выделены в качестве минорных компонентов (рис.47). На стадии цветения произошла замена доминантов - бацилл на бактерии рода *Arthrobacter*. На стадии созревания семян на корнях пастушьей сумки появились в качестве второго доминанта миксобактерии. Стрептомицеты и сфингобактерии были выявлены как минорные компоненты (рис.47)

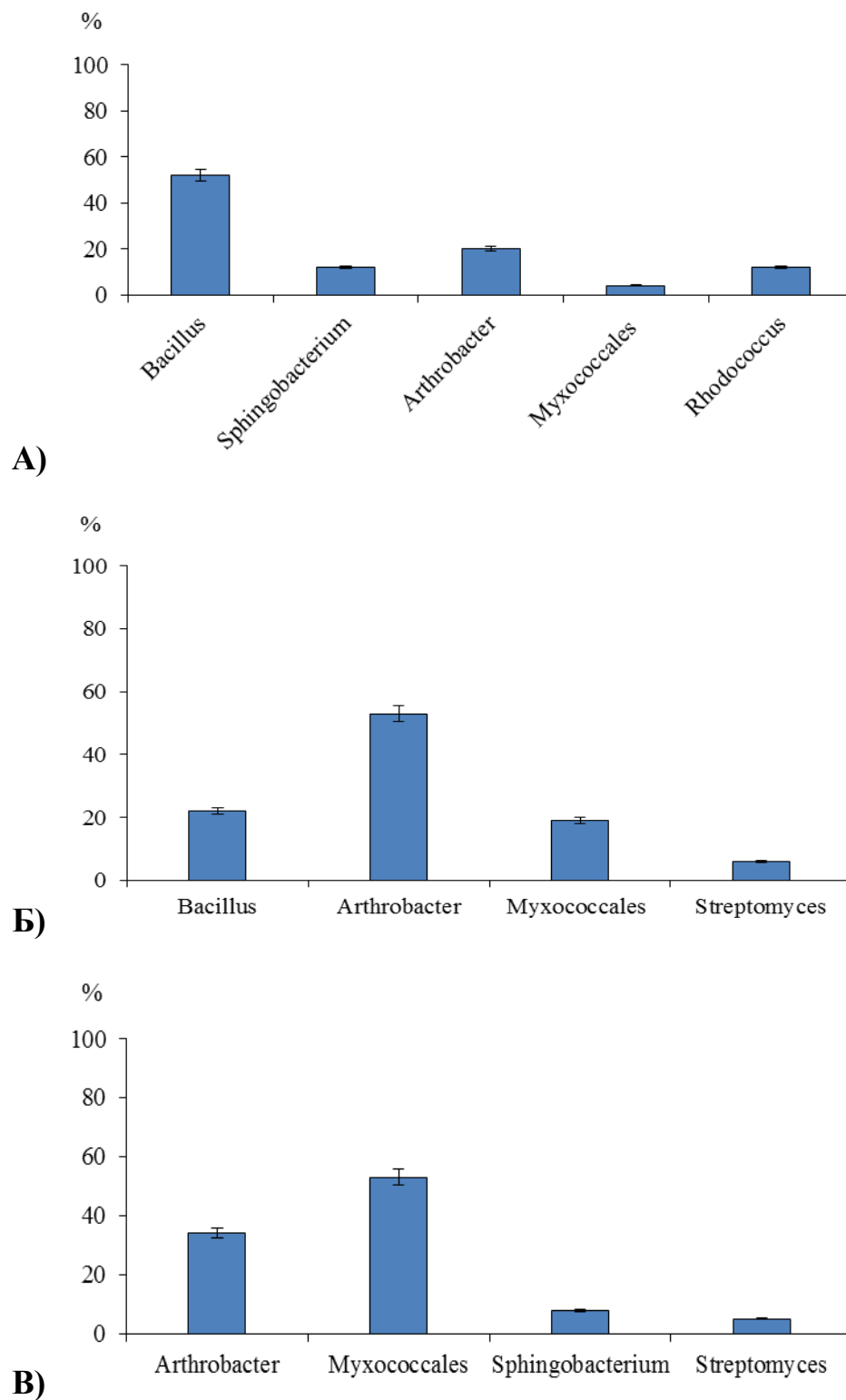
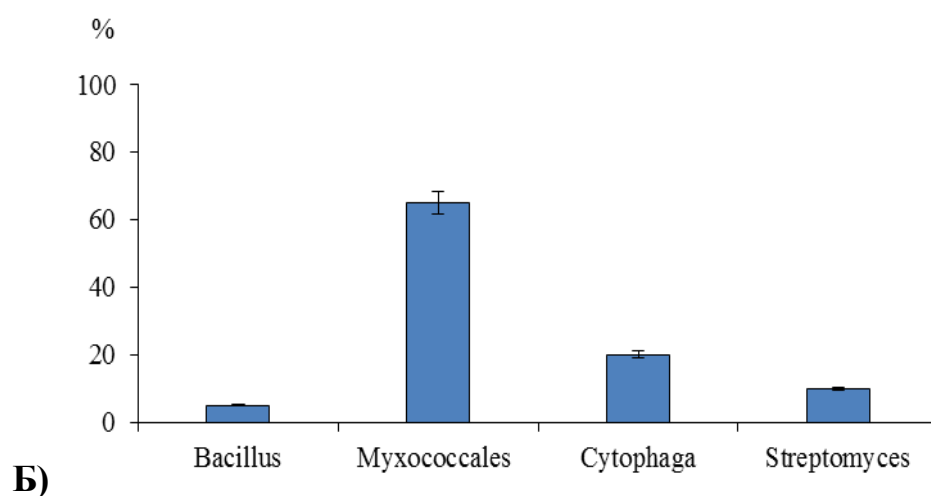
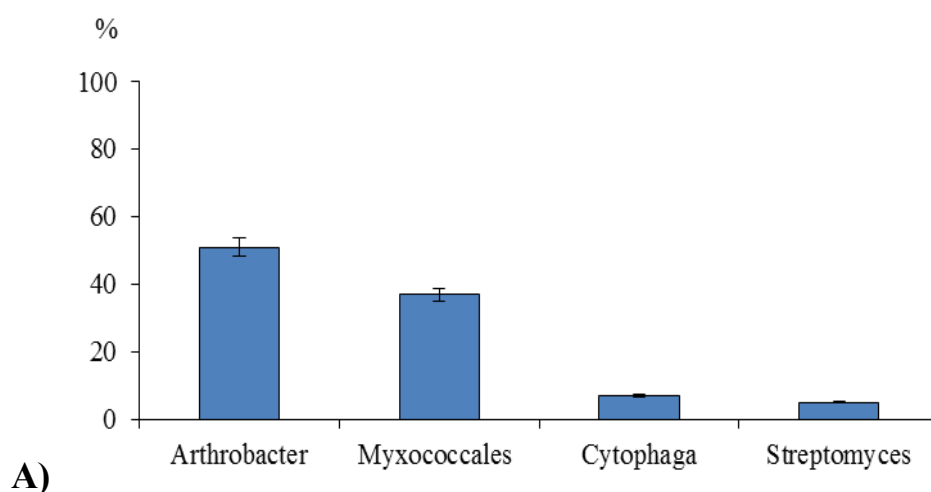


Рисунок 47. Таксономическая структура бактериальных сообществ корней пастушьей сумки обыкновенной в процессе развития растения
 А - Всходы; Б – Цветение; В – Созревание семян

На всходах лебеды раскидистой (*Atriplex patula*) на корнях в качестве доминантов обнаружены *Arthrobacter* и миксобактерии. На стадии цветения в доминанты выходят миксобактерии, все минорные компоненты так же представлены бактериями гидролитического комплекса - *Bacillus*, *Cytophaga* и *Streptomyces* (рис.48). На стадии созревания семян миксобактерии остаются на корнях в качестве доминантов, субдоминанты представлены так же целлюлозоразрушающими бактериями рода *Cytophaga*, минорные компоненты – так же гидролитики – актинобактерии рода *Streptomyces*.



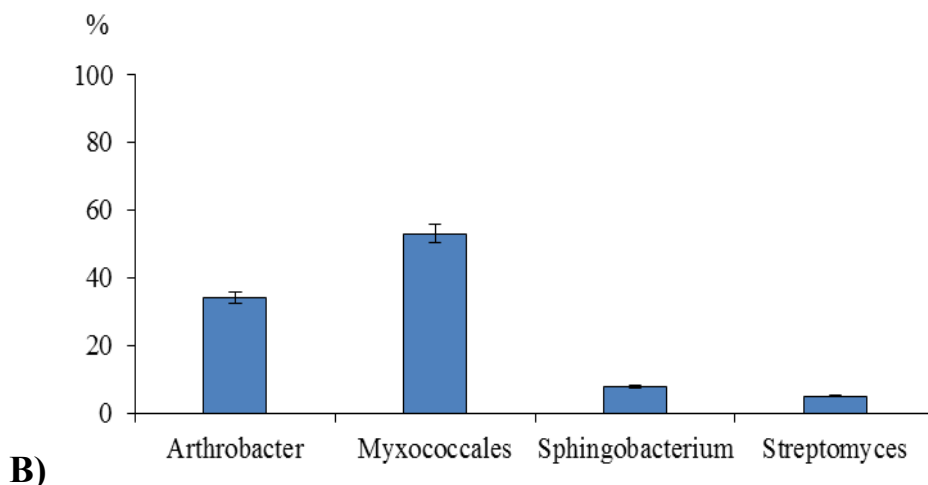
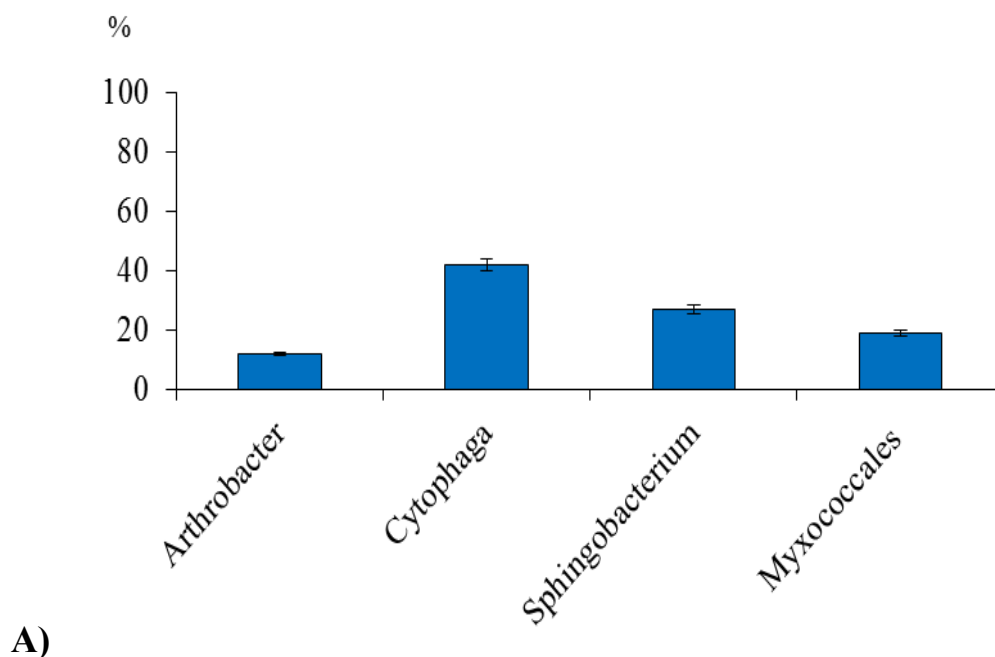
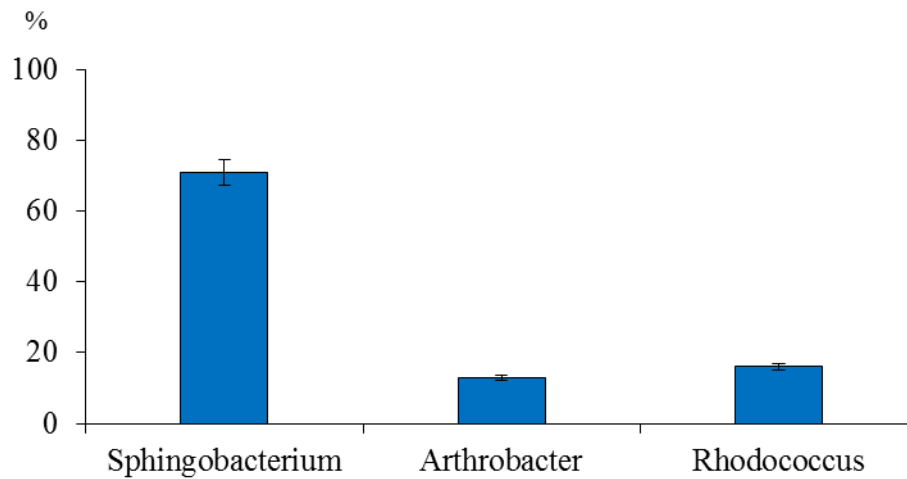


Рисунок 48. Таксономическая структура бактериальных сообществ корней лебеды раскидистой в процессе развития растения

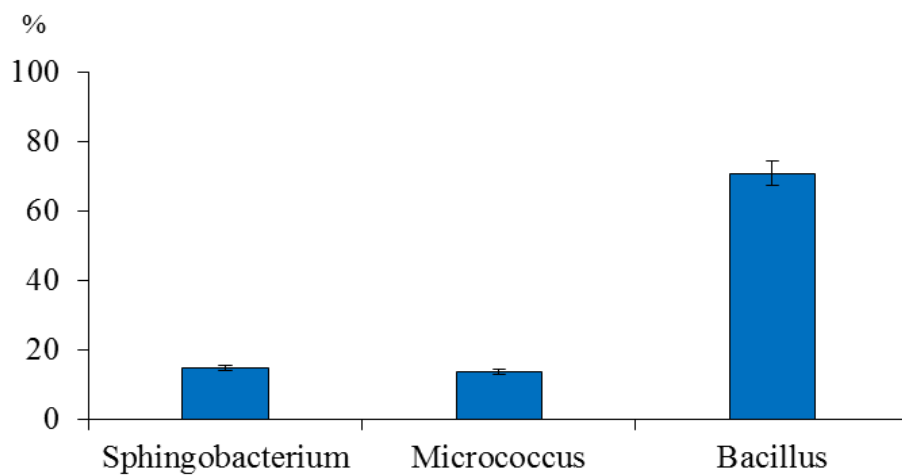
А - Всходы; Б – Цветение; В – Образование семян

На корнях осота полевого (*Sonchus arvensis*) на стадии всходов в качестве доминанта выделили цитофаги и сфингобактерии, на стадии цветения сфингобактерии перешли в доминанты, минорные компоненты – артробактер и родококки. На стадии образования семян доминантами становятся бациллы, бактерии родов *Sphingobacterium* и *Micrococcus* выявлены как минорные компоненты (рис.49).





Б)



В)

Рисунок 49. Таксономическая структура бактериальных сообществ корней осота полевого в процессе развития растения

А - Всходы; Б – Цветение; В – Созревание семян

На корнях подмаренника настоящего (*Galium verum*) и Пикульника обыкновенного (*Galeopsis tetrahit*) на стадии всходов доминировал артробактер, на стадии цветения в доминанты у подмаренника выходят сфингобактерии (рис.50), а у пикульника – сфингобактерии и миксобактерии (рис.51). На стадии формирования семян доминантами становятся у подмаренника *Arthrobacter* и *Sphingobacterium*, в качестве минорных компонентов выделили стрептомицеты и целлюлозоразрушающие актинобактерии рода *Cellulomonas*. У пикульника

в период созревания семян доминантом снова становится артробактер, и так же как у подмаренника, в качестве минорных компонентов обнаружены бактерии гидролитического комплекса – цитофаги и целлюломонады (рис.50,51).

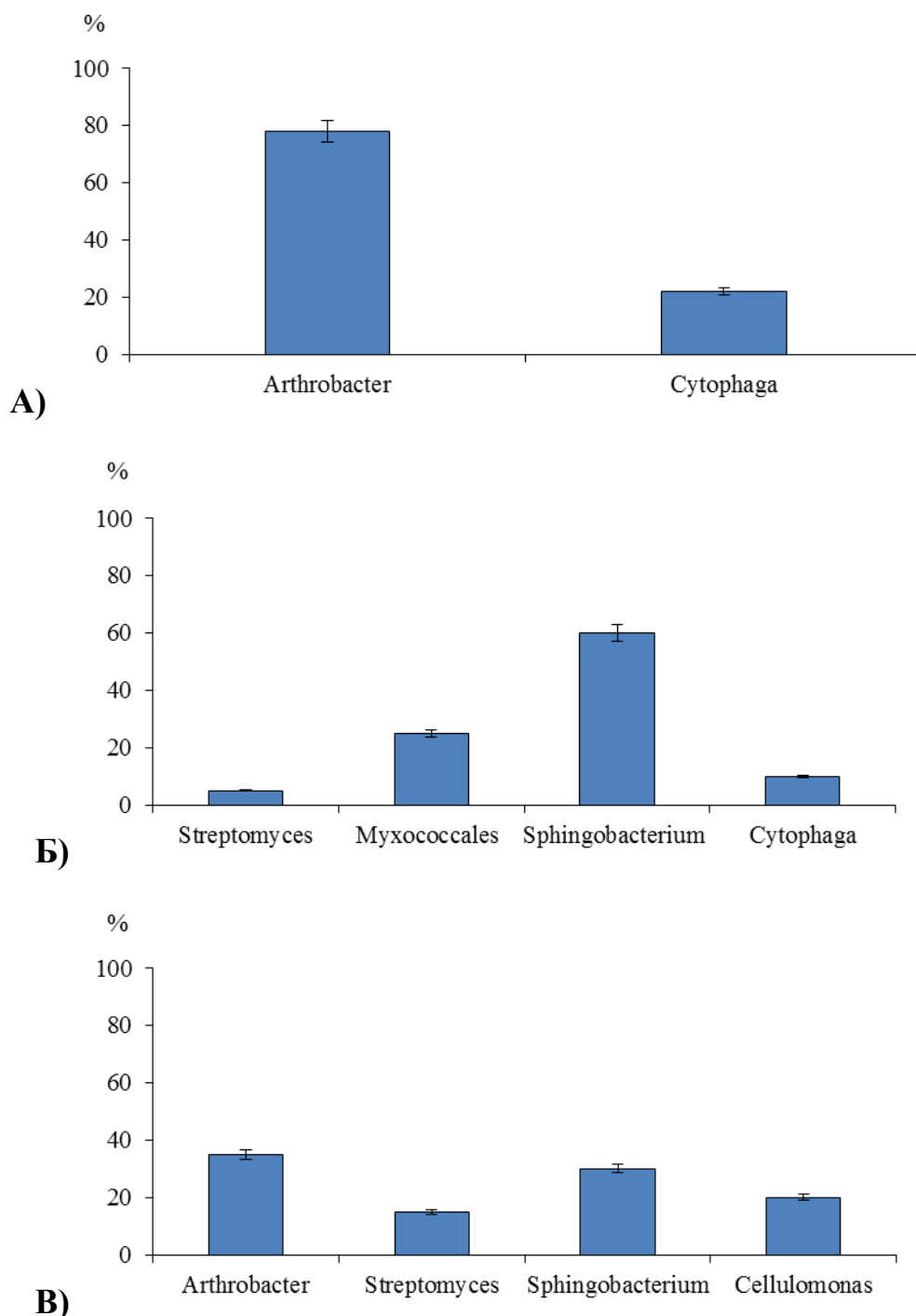


Рисунок 50. Таксономическая структура бактериальных сообществ корней подмаренника настоящего в процессе развития растения
А - Всходы; Б – Цветение; В - Созревание семян

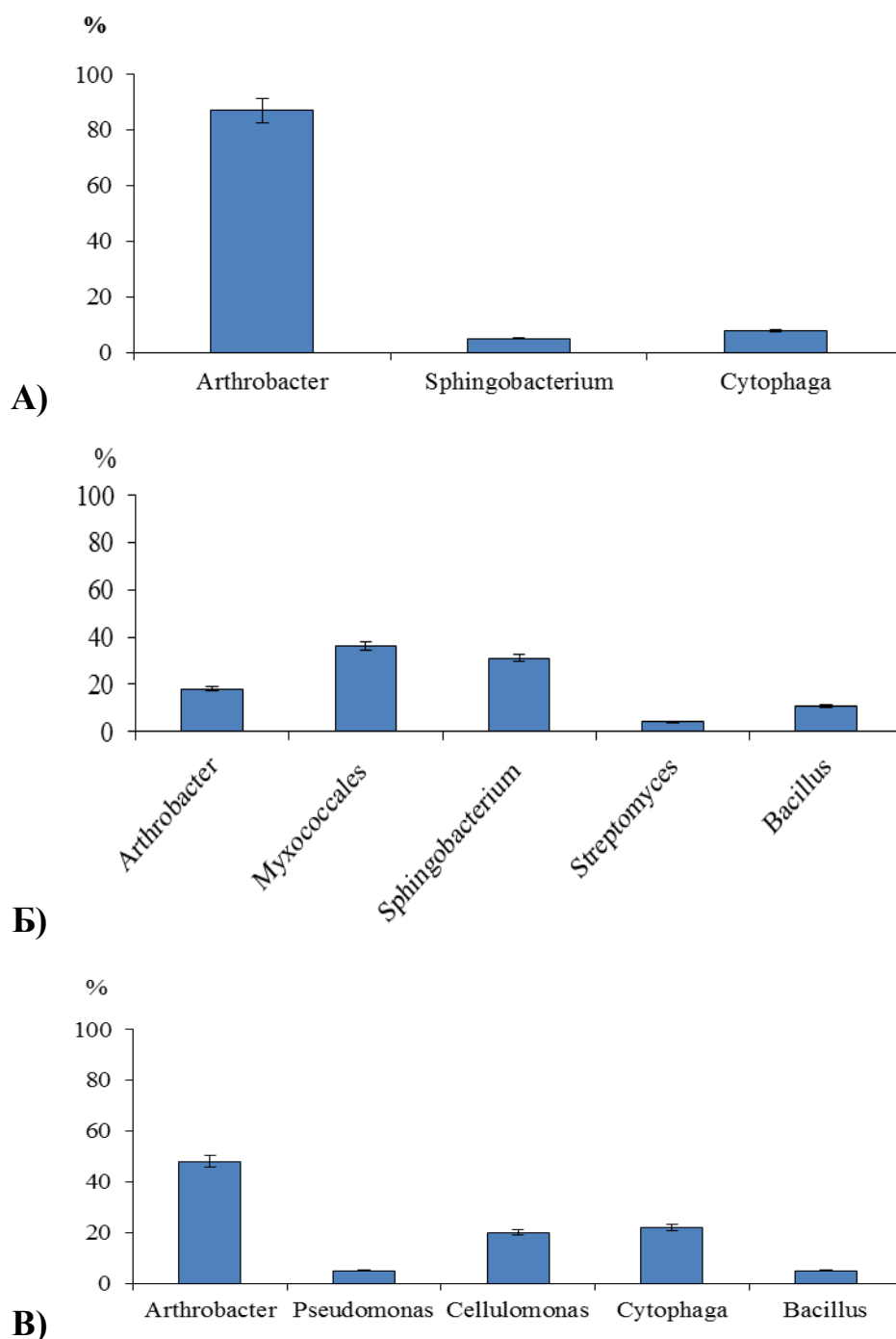


Рисунок 51. Таксономическая структура бактериальных сообществ корней пикульника обыкновенного в процессе развития растения
 А - Всходы; Б – Цветение; В – Созревание семян

На корнях расторопши на стадии всходов доминировали миксобактерии, все остальные представители разных таксонов (*Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Sphingobacterium*) были минорными компонентами (рис. 52). В период цветения, как и на листьях,

доминантами становятся сфингобактерии (более 60%), в качестве второго доминанта обнаружен артробактер, минорного – микрококки (*Micrococcus*). На стадии образования семян на корнях значительно увеличилось число таксонов (6), но только 2 из них были доминирующие – сфингобактерии и родококки. Минорные компоненты были представлены как актинобактериями (роды *Arthrobacter*, *Curtobacterium*), так и целлюлозоразрушающими цитофагами.

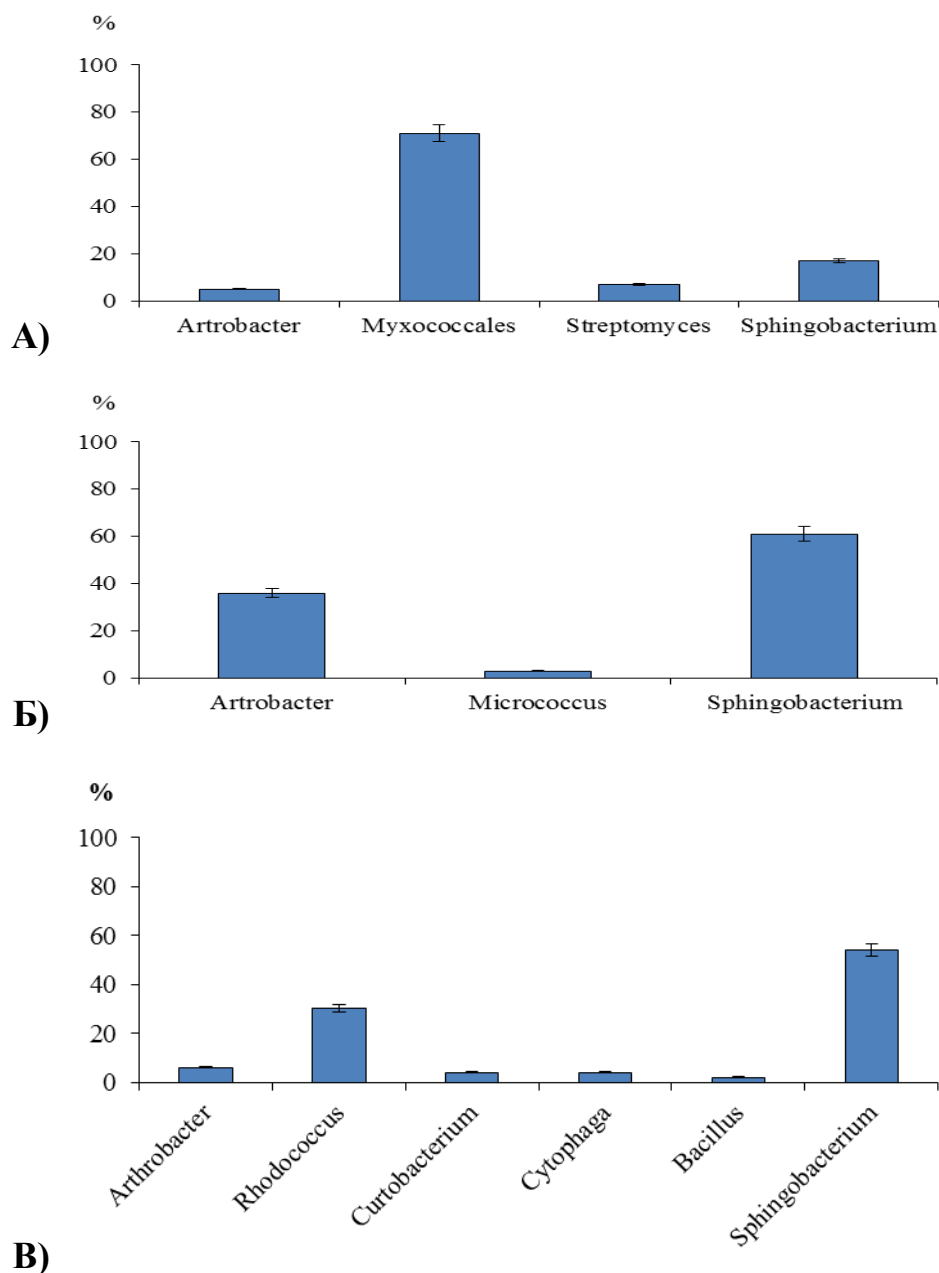


Рисунок 52. Таксономическая структура бактериальных сообществ корней расторопши пятнистой в процессе развития растения
А- Всходы; Б – Цветение; В – Образование семян

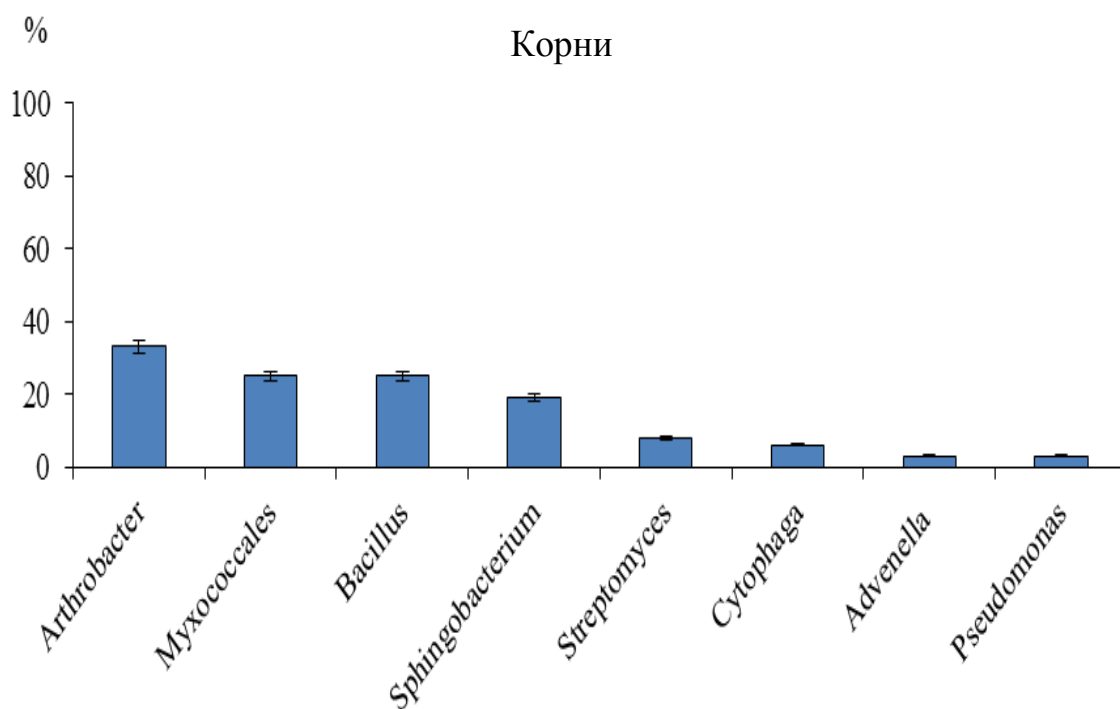
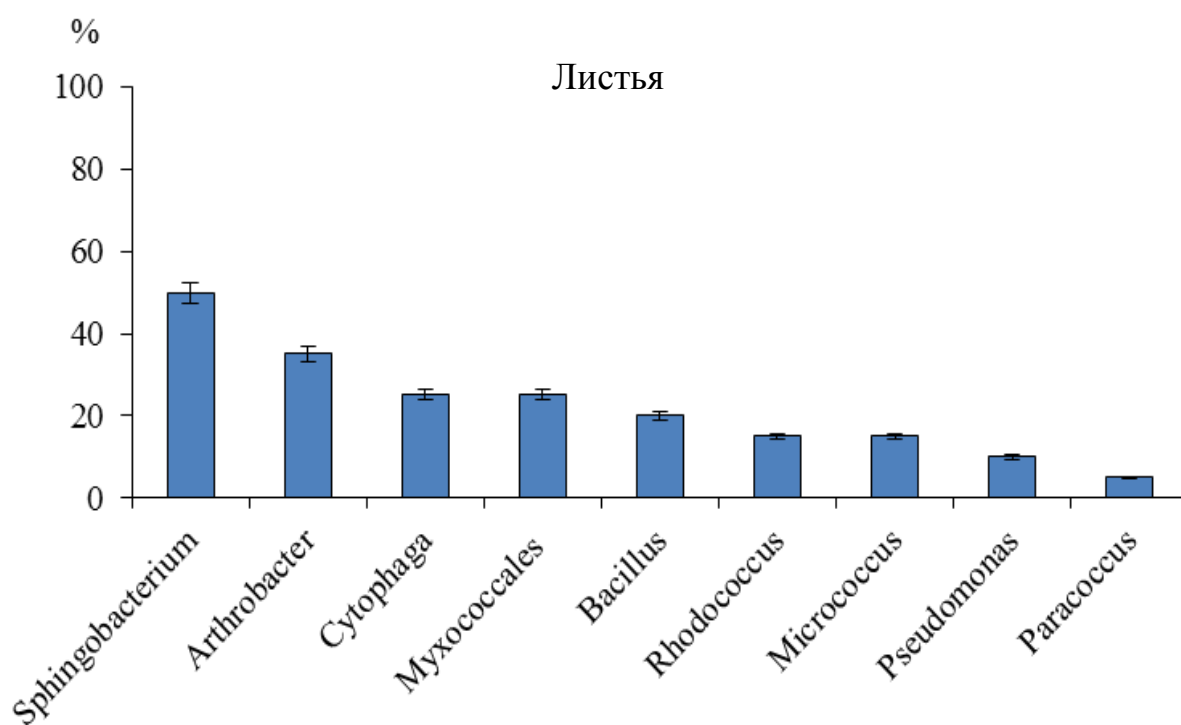
Если подвести итоги изменению таксономической структуры бактериальных сообществ на корнях всех исследованных сорняков в процессе их развития, то можно сделать следующие выводы – в ризосфере сорных растений, в отличие от филлосферы, не происходит существенной перестройки в составе бактериальных комплексов (табл. 12). Список доминантов представлен как типично почвенным представителем олиготрофных бактерий артробактером, так и целлюлозоразрушающими миксобактериями и цитофагами. Изменяется лишь их соотношение. Особое внимание следует обратить на доминирование бактерий рода *Sphingobacterium* на корнях большинства сорных растений, которые выделялись нами в качестве доминантов и на листьях этих же растений. Для бактериальных сообществ Расторопши характерно, в отличие от других сорных растений, доминирование родококков – как на корнях, так и на листьях.

Необходимо сравнить таксономическую структуру эпифитных бактериальных сообществ в филлосфере и ризосфере исследованных сорных растений. Лучше всего это сделать, основываясь на построенных нами графиках по частоте доминирования разных таксонов бактерий на листьях и корнях сорняков (рис.53). Из графиков видно, что на листьях всех исследуемых сорных растений наиболее часто выделялись в качестве доминирующих представители 3-х родов – *Sphingobacterium*, *Arthrobacter*, *Cytophaga*. На корнях этих же растений в число постоянных доминантов входили бактерии родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Sphingobacterium* и порядка Мухососсаles. Таким образом, на корнях, в отличие, от листьев постоянно преобладали миксобактерии и бациллы. Что касается бактерий рода *Sphingobacterium*, то чаще они доминировали на листьях (более 40%), чем на корнях (менее 20%).

Таблица 12. Смена доминирующих таксонов бактериальных сообществ на корнях сорных растений в процессе их развития

№	Название растения	Таксономический состав доминантов		
		Всходы	Цветение	Созревание семян
1	Пастушья сумка обыкновенная (<i>Capsella bursa-pastoris</i>)	Bacillus (50%) Arthrobacter (30%)	Arthrobacter (60%)	Мухососцаles (60%) Arthrobacter (30%)
2	Лебеда раскидистая (<i>Atriplex patula</i>)	Arthrobacter (50%) Мухососцаles (40%)	Мухососцаles (70%)	Мухососцаles (60%) Arthrobacter (35%)
3	Осот полевой (<i>Sonchus arvensis</i>)	Cytophaga (40%) Sphingobacterium (30%)	Sphingobacterium (70%)	Bacillus (70%)
4	Пикульник обыкновенный (<i>Galeopsis tetrahit</i>)	Arthrobacter (90%)	Мухососцаles (35%) Sphingobacterium (30%)	Arthrobacter (55%) Paracoccus (30%)
5	Подмаренник на стоящий (<i>Galium verum</i>)	Arthrobacter (80%)	Sphingobacterium (60%)	Arthrobacter (35%) Sphingobacterium (30%)
6	Расторопша пятнистая (<i>Silybum marianum</i>)	Мухососцаles (80%)	Sphingobacterium (55%) Arthrobacter (35%)	Sphingobacterium (60%) Rhodococcus (30%)

А. %



Б.

Рисунок 53. Частота доминирования бактерий разных таксонов на листьях (А) и корнях (Б) сорных растений, % от общей численности бактерий (100%)

Обратим внимание на представителей тех компонентов бактериальных сообществ, которые часто выделялись из филлосферы и ризосферы исследованных сорняков (табл.13). Это бактерии родов *Advenella* (рис.54), *Tetrathioabacter*(рис.55) и *Stenotrophomonas* (рис.56). Первые 2 рода входят в семейство Alcaligenaceae, порядок Burkholderiales. Бактерии рода *Tetrathioabacter*, впоследствии переведённые в род *Advenella*, были описаны как факультативно-хемолитотрофные бактерии, способные к окислению тетраионов и тиосульфата. Из сорных растений выделены так же представители Gammaproteobacteria - род *Stenotrophomonas*, близкий к *Pseudomonas maltophila*

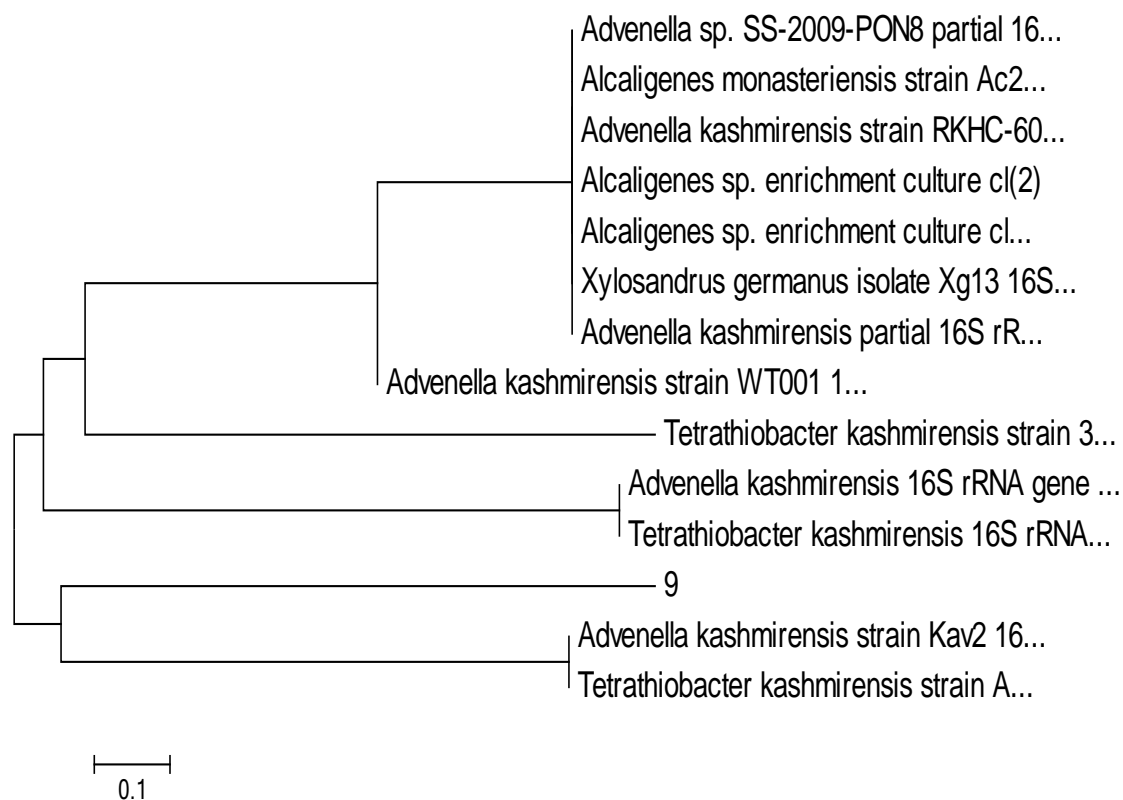


Рисунок 54. Филогенетическое положение исследуемых культур протеобактерий

На основании филогенетического положения штамма №9 следует, что этот штамм относится к роду *Advenella* виду *kashmirensis*

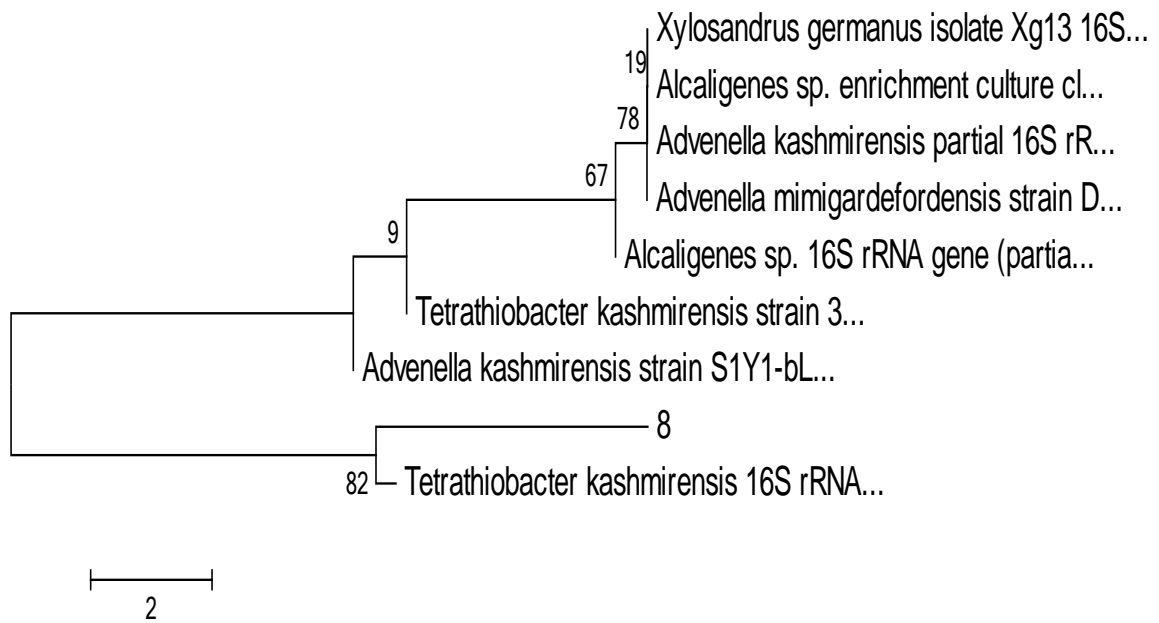


Рисунок 55. Филогенетическое положение исследуемых культур протеобактерий

На основании филогенетического положения штамма №8 следует, что этот штамм относится к роду *Tetrathioabacter* виду *kashmirensis*

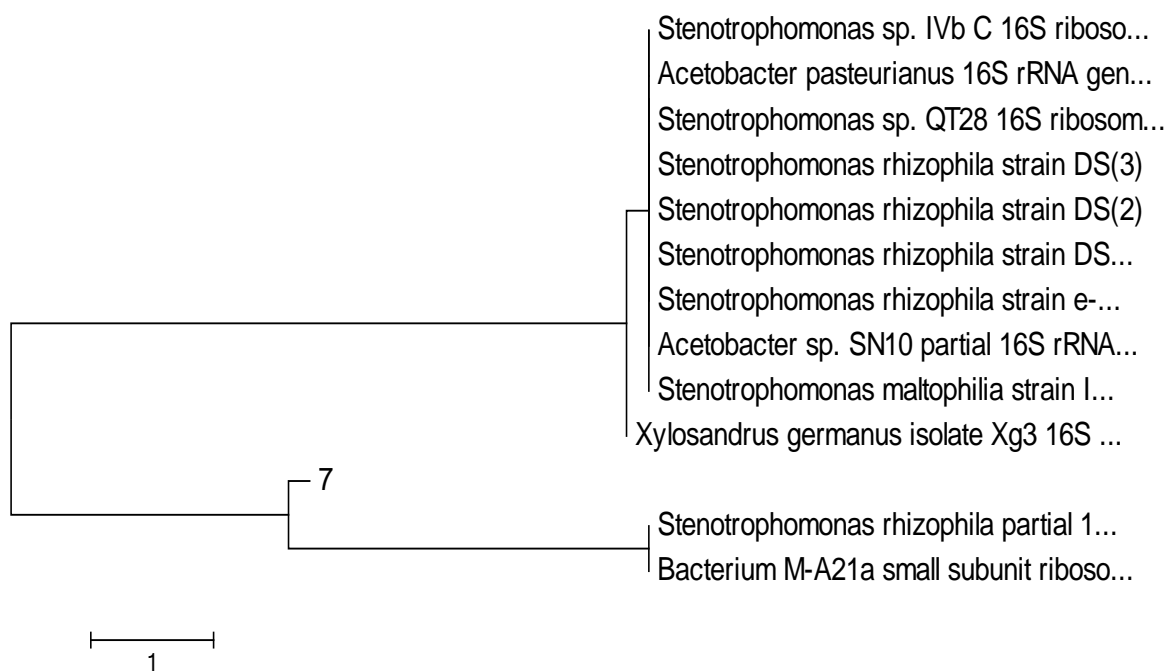


Рисунок 56. Филогенетическое положение исследуемых культур протеобактерий

На основании филогенетического положения штамма №7 следует, что этот штамм относится к роду *Stenotrophomonas* виду *rhizophila*

Таблица 13. Таксономический состав протеобактерий на сорных растениях, определённых на основании молекулярно-биологического метода

Вид растения	Орган растения	Время отбора образцов	Подкласс бактерий	Названия родов бактерий
лебеда	листья	осень	Betaproteobacteria	<i>Tetrathio bacter kashmirensis</i> *
Пастушья сумка	листья	осень	Betaproteobacteria	<i>Advenella kashmirensis</i>
Пастушья сумка	корни	Лето цветение	Betaproteobacteria	<i>Advenella kashmirensis</i>
Пикульник	листья	Весна всходы	Gammaproteobacteria	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
Сурепка	цветки	Лето цветение	Gammaproteobacteria	<i>Pantoea sp.</i>

*В настоящее время бактерии рода и вида *Tetrathio bacter kashmirensis* переведены в *Advenella kashmirensis* (Thompson et al, 1994).

Следующей задачей наших исследований - изучить влияние экологических микрониш, в которых произрастали и отбирались для анализа сорные растения, на численность и таксономическую структуру эпифитных бактериальных комплексов. Растения отбирали с окраины леса, края поля и середины пахотного поля. Были проанализированы многочисленные данные, отражающие изменения таксономического состава бактериальных сообществ в пространстве и во времени. Полученные данные были обработаны с помощью 4-х факторного дисперсионного анализа. Итоги анализа, приведённые в табл.14, позволили заключить, что главным фактором, определяющим таксономический состав эпифитных бактериальных сообществ, является стадия развития сорного растения и далее в порядке убывания значимости, следуют орган растения и затем экониша. Влияние вида растения оказалось не достоверным – иными словами на исследованных

нами растениях, относящихся к разным семействам и видам, состав бактерий был примерно одинаков.

Таблица 14. Влияние факторов на относительное обилие разных групп бактерий в исследуемых образцах

Варьирование по градациям факторов*	Число степеней свободы	Дисперсия	Критерий Фишера	Уровень значимости
Протеобактерии				
1	2	1035,34	157,934	<0,001
2	1	456,33	69,610	
3	Не достоверно			
4	2	132,56	20,222	
Остаточное	72	6,56		
Целлюлозоразрушающие (цитофаги + миксобактерии)				
1	2	3560,9	83,458	<0,001
2	1	3125,6	73,255	
3	1	485,6	11,380	
4	2	3043,4	71,331	
Остаточное	72	42,7		
Грамположительные бактерии (актинобактерии +бациллы)				
1	2	1537,9	45,869	<0,001
2	1	1134,3	33,830	
3	1	616,3	18,383	
4	2	1805,4	53,848	
Остаточное	72	33,5		

*1 – стадия развития растения (всходы, период цветения, созревания семян); 2 – орган растения (листья, корни); 3 – микронива произрастания растения (поле, край поля, лес); 4 – тип растения

7.4 Сравнение структуры бактериальных сообществ культурных и сорных растений.

Теперь перейдём к сравнительному анализу таксономической структуры эпифитных сообществ культурных и сорных растений (рис.57 и 58).

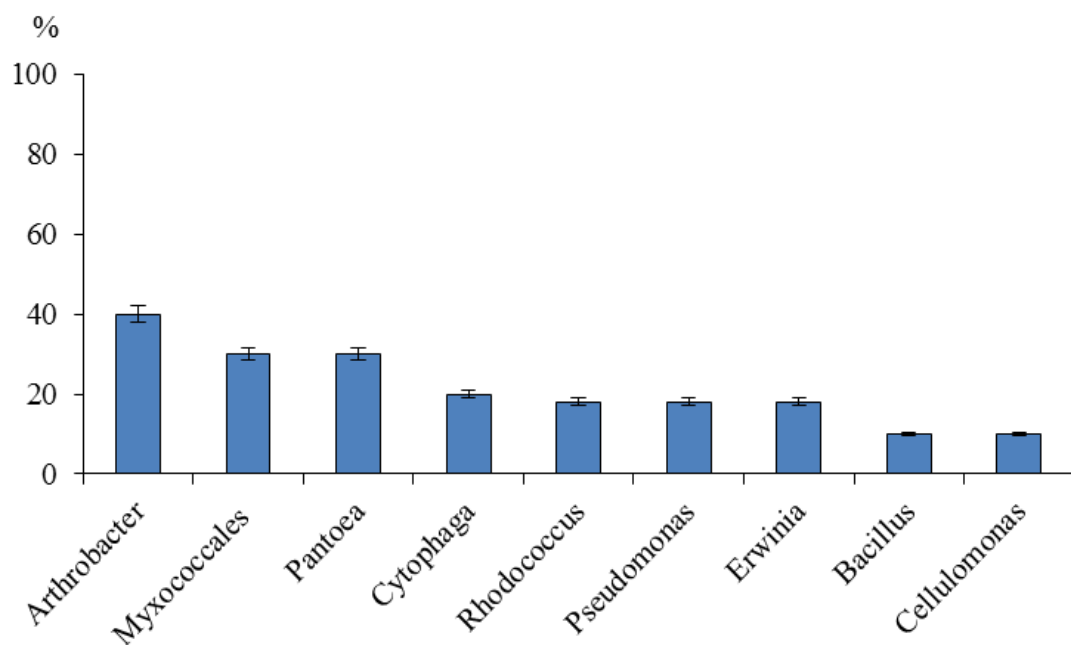


Рисунок 57. Частота доминирования бактерий разных таксонов на листьях и корнях культурных растений

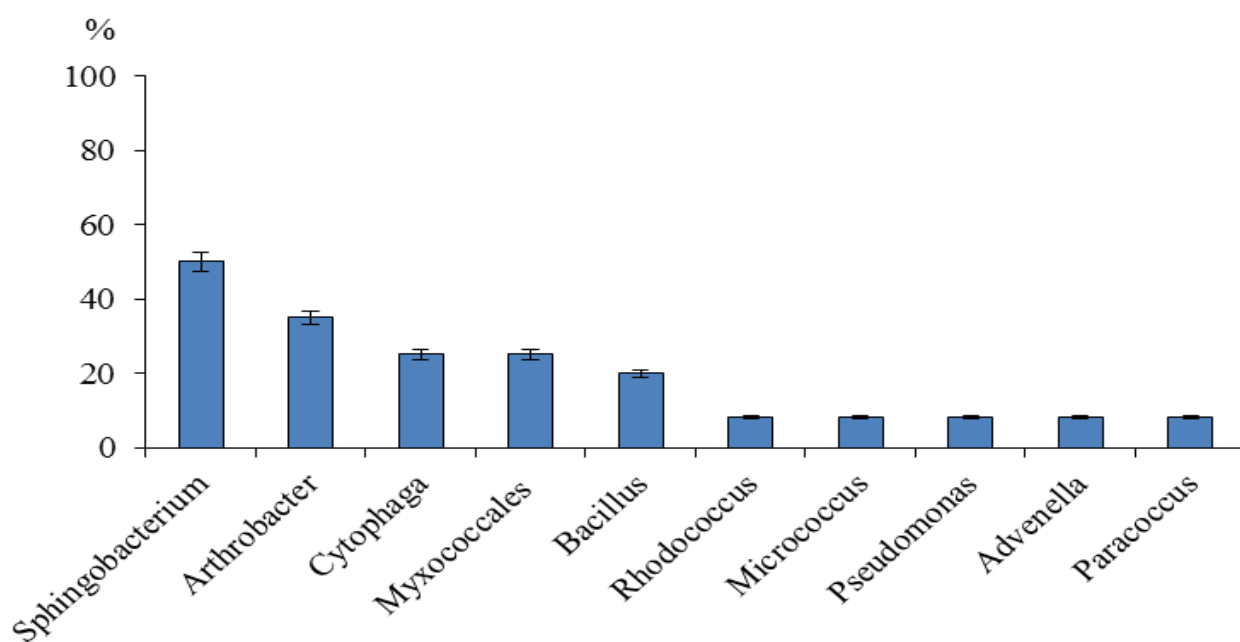


Рисунок 58. Частота доминирования бактерий разных таксонов на листьях и корнях сорных растений

Следует сразу отметить, что большинство доминантов на всех видах исследованных растений являются общими. Они представлены артробактером, миксобактериями, цитофагами, бациллами. Но есть и чёткие различия. Если у сельскохозяйственных культур первое место по

частоте доминирования составляют актинобактерии рода *Arthrobacter* (40%), то у сорных растений - бактерии рода *Sphingobacterium* (50%). Кроме того, энтеробактерии (роды *Pantoea* и *Erwinia*) доминировали только на овощных культурах. У сорных растений энтеробактерии рода *Pantoea* были выделены только из цветков сурепки. С другой стороны, из разных органов сорных растений были выделены в качестве доминантов представители таких родов бактерий как *Micrococcus* и *Paracoccus*, которые не были обнаружены на культурных растениях. Только из сорных растений были выделены хемолитотрофные бактерии рода *Advenella* и представители близкого к псевдомонадам рода *Stenotrophomonas*.

Методом главных компонент удалось подтвердить чёткие различия в таксономической структуре культурных и сорных растений (рис. 59).

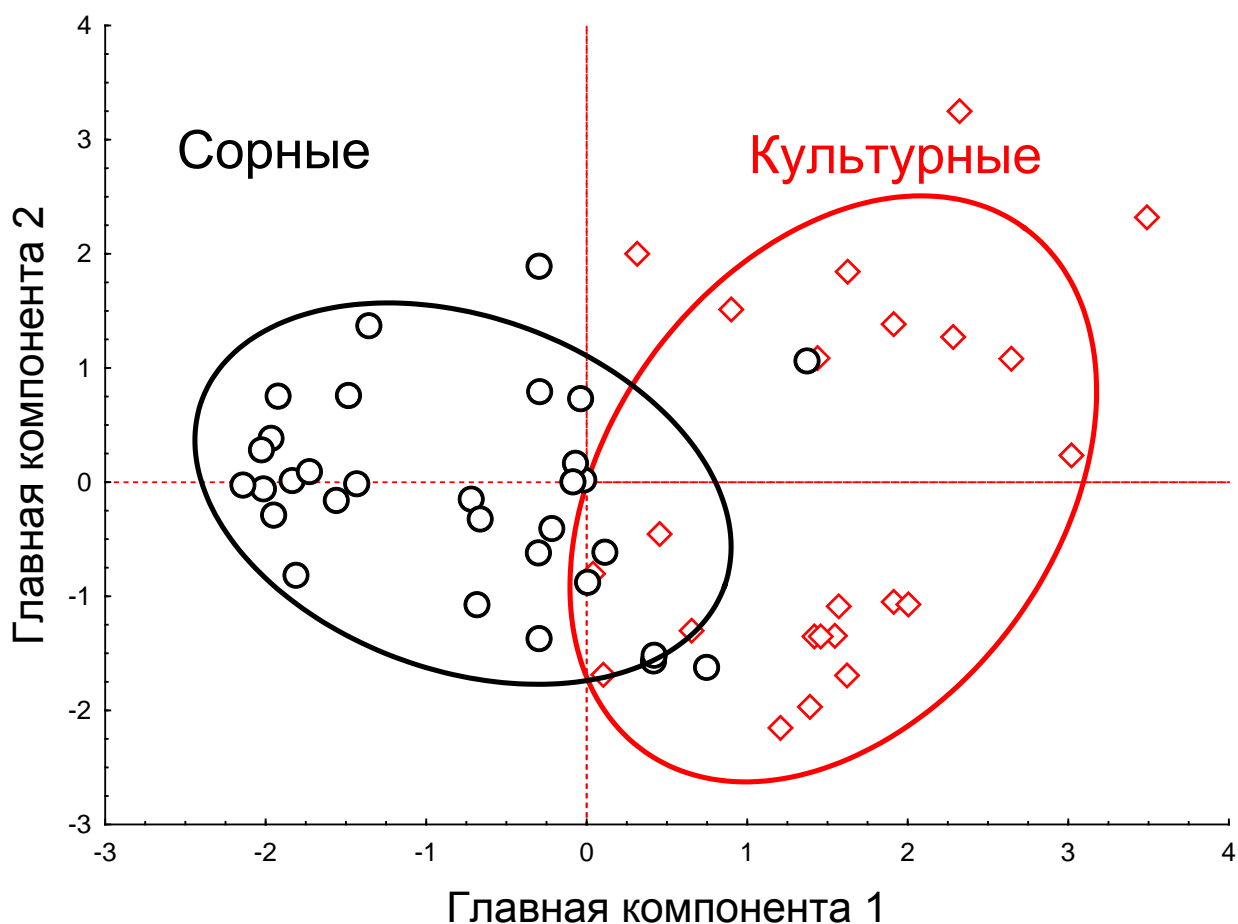


Рисунок 59. Разделение главными компонентами бактериальных комплексов культурных и сорных растений по таксономическому составу.

Соит особо отметить общее число бактериальных таксонов, идентифицированных нами на основании как фенотипических, так и молекулярно-биологических методов. Представители всех этих бактерий были выделены из разных органов культурных и сорных растений (табл.15). Из них 13 таксонов представлены грамотрицательными бактериями и 8 – грамположительными.

Таблица 15. Таксономический состав бактерий на культурных и сорных растениях, определённых на основании как фенотипических, так и молекулярно-биологического методов.

№	Названия таксонов бактерий				
	Г-		Г+		
1	<i>Advenella</i>	9	<i>Paracoccus</i>	1	<i>Arthrobacter</i>
2	<i>Agrobacterium</i>	10	<i>Pseudomonas</i>	2	<i>Bacillus</i>
3	<i>Azospirillum</i>	11	<i>Rhizobium</i>	3	<i>Cellulomonas</i>
4	<i>Cytophaga</i>	12	<i>Stenotrophomonas</i>	4	<i>Curtobacterium</i>
5	<i>Erwinia</i>	13	<i>Sphingobacterium</i>	5	Micrococcus
6	<i>Flavobacterium</i>			6	<i>Nocardia</i>
7	Мухососцаles			7	<i>Rhodococcus</i>
8	<i>Pantoea</i>			8	<i>Streptomyces</i>

Следует обратить внимание на функции бактерий-доминантов, обнаруженных на разных органах исследованных растений. Бактерии родов *Sphingobacterium* и *Cytophaga* являются представителями одного и того же филума Bacteroidetes, но относятся к разным классам. Если представители рода *Cytophaga* являются типичными целлюлолитиками, то бактерии рода *Sphingobacterium* способны к деструкции крахмала и только некоторые виды могут использовать целлобиозу. Следует отметить, что род *Sphingobacterium*, который был описан в 1983 году (Yabuuchi et al, 1983), отличается от рода *Flavobacterium* наличием особого состава липидов, названных сфингофосфолипидами. Миксобактерии,

доминирующие на корнях, являются типичными представителями целлюлозоразрушающих бактерий, относящимися к порядку Мухососcales.

Таким образом, в деструкции корневых остатков участвуют, в основном, миксобактерии, а разложении надземных растительных тканей – цитофаги (род *Cytophaga*).

Большинство эпифитных G-бактерий, выделенных из растений, (роды *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*) являются типичными эккрисотрофами, питающимися продуктами экзоосмоса растений. Представители рода *Arthrobacter* – типично почвенные актинобактерии. В надземный ярус растений бактерии этого рода попадают с почвенными частицами не только по корням, но и с ветром, пылью, осадками. Об их приживаемости в филлосфере ранее не сообщалось. Однако недавно появилась работа (Sheublin, Leveau, 2012), в которой доказано активное размножение на листьях яблони бактерий 4-х видов *Arthrobacter*, которые способны использовать фенолы, хлорфенолы, фенантрены, попадающие в филлосферу в качестве антропогенных загрязнителей, в том числе и при использовании пестицидов. В связи с этим авторы ставят вопрос о значимости артробактерий для очистки не только почв, но и растений от загрязнений окружающей среды. Как было продемонстрировано нами ранее, артробактер постоянно обнаруживался в качестве доминанта как на корнях, так и листьях сорных растений. О бактериях рода *Rhodococcus*, особенно доминирующих на различных органах Расторопши, мы уже писали ранее как о бактериях, способных использовать различные фенольные соединения.

В процессе развития как культурных, так и сорных растений наблюдали постепенную замену аэробных и факультативно-анаэробных протеобактерий и актинобактерий в периоды всходов и цветения бактериями гидролитического блока – целлюлозоразрушающими бактериями в период созревания семян. Следовательно, при старении

растительных тканей развиваются те бактерии, которые способны проводить их деструкцию.

7.5 Антибиотические свойства бактериальных культур, выделенных из культурных и сорных растений.

Мы создали коллекцию бактерий, выделенных из филлосферы и ризосферы культурных и сорных растений, и почвы. Проверили их на антагонизм по отношению к четырем видам фитопатогенных бактерий: *Clavibacter michiganensis*, *Rathayibacter tritici*, *Pseudomonas syringae* и *Erwinia carotovora*.

Сначала рассмотрим антибиотические свойства эпифитных бактерий, выделенных из культурных растений.

Среди штаммов бактерий, выделенных из культурных растений, проверенных на антагонизм по отношению к 3 видам фитопатогенных бактерий (*Clavibacter michiganensis*, *Rathayibacter tritici*, *Pseudomonas syringae*), были выявлены антагонисты среди миксобактерий, бацилл и артробактеров (табл. 16). Так, все взятые в опыт 8 штаммов миксобактерий (порядок Мухососсаles) подавляли рост фитопатогенной бактерии *Pseudomonas syringae*. Представители рода *Bacillus* (4 штамма) ингибировали развитие двух видов фитопатогенов – *Clavibacter michiganensis* и *Rathayibacter tritici*. Культуры рода *Arthrobacter* (10 штаммов) проявили антагонизм по отношению к фитопатогенным бактериям - *Clavibacter michiganensis* и *Rathayibacter tritici*. Следует отметить, что антагонистические свойства проявили представители тех бактерий, которые были обнаружены в доминантах на определенных стадиях развития исследуемых растений - миксобактерии и артробактер.

Из G⁻ бактерий – это представители таких родов как *Aquaspirillum*, *Erwinia*, *Cytophaga*. Спириллы и эрвинии были обнаружены, как было показано ранее, в качестве доминантов на цветках и листьях, цитофаги – на корнях картофеля. Из грамположительных бактерий антагонизм проявили

бактерии родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Nocardia* – характерные обитатели ризосферы и почв.

Таким образом, среди проверенных на антагонизм культур бактерий (70 штаммов) 44% проявили антагонистические свойства по отношению ко всем 3 видам фитопатогенных бактерий, используемых в этом опыте. Зоны ингибирования роста составляли 1–7 мм. Среди этих бактерий-антагонистов преобладают представители тех форм бактерий, которые доминируют в филлосфере, ризосфере и почве. Таким образом, существует естественная защита культурных растений от фитопатогенов в виде бактериальных популяций, которые формируются в разных ярусах агроценоза

Таблица 16. Антибиотические свойства бактерий разных таксонов, выделенных из культурных растений

Штамм	<i>Clavibacter michiganensis</i>	<i>Rathayibacter tritici</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>Arthrobacter</i>	3	0	2
<i>Bacillus</i>	10	10	0
<i>Cellulomonas</i>	0	0	1
<i>Curtobacterium</i>	0	0	0
<i>Cytophaga</i>	3	3	0
<i>Erwinia</i>	0	1	0
<i>Micrococcus</i>	0	0	0
Мухококкалы	0	0	8
<i>Nocardia</i>	0	0	1
<i>Pseudomonas</i>	0	0	0
<i>Rhodococcus</i>	0	0	0

Далее перейдем к антибиотическим свойствам бактериальных культур, выделенных из сорных растений.

Культуры бактерий, выделенные из сорных растений, проверяли на антагонизм по отношению к 3 видам фитопатогенных бактерий (*Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia carotovora*). Нами было установлено, что из взятых в опыт бактериальных штаммов (70) представители таксонов *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, Мухососкалей подавляли развитие фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora* (табл.17). Антибиотической активностью по отношению к двум другим выше названным видам фитопатогенных бактерий обладали представители как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. В спектр этих бактерий входили представители актинобактерий (роды *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*), бацилл (*Bacillus*), миксобактерий (порядок Мухососкалей), сфингобактерий (род *Sphingobacterium*). Зоны ингибирования составили 3-5 мм. В целом, антибиотическую активность по отношению ко всем взятым в опыт фитопатогенным бактериям проявили 72% штаммов бактерий эпифитно-сапротрофного комплекса.

Следует сравнить состав бактерий-антагонистов в настоящей работе с проведёнными ранее нами исследованиями (Добровольская и др., 2012, 2015) по изучению антибиотической деятельности эпифитных бактерий культурных растений (картофель, ячмень, овёс, вика) и сорных (одуванчик, пырей, осот). Доминирующее положение среди бактерий-антагонистов фитопатогенных бактерий всех исследованных растений занимали представители большинства выше перечисленных таксонов. Однако встречались и бактерии других родов: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Cytophaga*, *Nocardia*. При этом следует отметить, что они подавляли рост и той фитопатогенной бактерии, которая не использовалась в настоящем исследовании – *Rathayibacter tritici*.

Таблица 17. Антибиотические свойства бактериальных культур, выделенных из сорных растений

ШТАММ	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>	<i>Erwinia carotovora</i>
<i>Azospirillum</i>	0	0	1
<i>Paracoccus</i>	0	0	0
<i>Pseudomonas</i>	0	0	0
<i>Cellulomonas</i>	2	0	0
<i>Arthrobacter</i>	0	4	4
<i>Bacillus</i>	0	3	1
Мyxоcоссаles	2	1	1
<i>Micrococcus</i>	1	0	0
<i>Sphingobacterium</i>	0	3	0
<i>Cytophaga</i>	0	0	0
<i>Flavobacterium</i>	0	0	2
<i>Rhodococcus</i>	0	1	2

Таким образом, антибиотическую активность проявили многие представители как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, выделенных из культурных и сорных растений. Если это сопоставить с общим числом идентифицированных нами таксонов бактерий (20), то можно сказать, что практически 50% представителей всех определённых нами родов бактерий обладают антагонистической активностью.

ВЫВОДЫ

1. Определена численность бактерий эпифитного комплекса на разных органах культурных и сорных растений. Установлено, что плотность бактериальных популяций колеблется в диапазоне 10^6 - 10^{11} КОЕ/г и зависит от фазы развития растений и влажности.
2. Выявлены изменения в таксономической структуре исследуемых бактериальных сообществ на разных органах растений в процессе их развития - наблюдается четкая смена эккрисотрофных бактерий на бактерии гидролитического комплекса при старении растений.
3. Проведение дисперсионного анализа позволило установить, что на таксономическую структуру бактериальных сообществ как культурных, так и сорных растений, наибольшее влияние оказывают фаза развития и орган растения.
4. Установлены четкие различия между таксономическим составом бактериальных сообществ культурных и сорных растений. Они заключаются как в наличии разных доминантов, так и обнаружении на сорняках большего разнообразия протеобактерий, в том числе и специфических видов хемолитотрофных бактерий.
5. В почве под исследуемыми растениями во все сроки отбора образцов не наблюдали изменений в таксономической структуре бактериальных комплексов – доминировали артробактер и бациллы.
6. Использование гуминовых удобрений привело к повышению урожая сельскохозяйственных культур и увеличению концентрации тех бактерий, которые способны использовать те субстраты, которые входят в состав удобрений.
7. Из 140 штаммов бактерий, выделенных из культурных, сорных растений и почвы, более 50% проявили антагонистическую активность по отношению к фитопатогенным бактериям, что свидетельствует о защитной роли бактерий эпифитно-сапротрофного комплекса в агроценозе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алимов Т. К., Таволжанский Н.П. Краткая энциклопедия для владельцев садовых, усадебных участков и фермеров - Белгород: Крестьянское дело, 2000. - 540 с.
2. Балабко П.Н., Хуснетдинова Т.И. Применение гуматов и дефеката для выращивания картофеля различных сортов / Генетические и агротехнические ресурсы повышения качества продовольственного и технического картофеля: сб. тезисов второго научно–практического совещания, (Москва, Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, 23-24 марта 2012 г.). Биологический факультет МГУ, М.: - 2012. - С.7-9.
3. Бобошин М.А. Превращение полициклических ароматических углеводов бактериями: дис. ... канд.б.наук.: 03.00.07 - Пущино, 2007. - 99 с.
4. Бобырь, Л.Ф. Влияние физиологически активных гумусовых веществ на фотосинтетические процессы у растений: автореф. дис. ... канд. биол. наук.- Кишинев ,1984. - 24 с.
5. Большой энциклопедический словарь гл. ред. Прохоров А.М., М.: Советская энциклопедия. 1993. - 1632 с.
6. Бороздина И.Б., Заикина И.А. Сезонная динамика микробиологических показателей *Pseudomonas* и *Bacillus*, выделенных с поверхности филлопланы и цветков у представителей семейства Compositae // Вестник Алтайского государственного аграрного университета - 2010. - № 10 (72). - С. 43-46.
7. Бороздина И.Б., Мануйлов И.М. Микрофлора семян лекарственных растений // Вестник Алтайского государственного аграрного университета - 2011. - № 9. (83). - С. 43-47.
8. Боронин А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Соросовский образовательный журнал. - 1998. - №10. - С. 25-31.

9. Вахрамеева, М.Г., Загульский М.Н., Быченко Т.М. Ятрышник шлемоносный /Биологическая флора Московской области. М.: Изд-во МГУ, - 1995. - Вып.10. - С. 64-74.
- 10.Веселов С.Ю., Иванова Т.Н., Симонян М.В., Мелентьев А.И. Исследование цитокининов, продуцируемых ризосферными микроорганизмами // Прикладная биохимия и микробиология. -1998. - Т.34. - №2. - С. 175-179.
- 11.Витязев В.Г, Самсонова В.П., Макаров И.Б., Кондрашкина М.И. Практикум по общему земледелию. К., - 2005. - 100 с.
- 12.Витязев В.Г., Макаров И.Б. Общее земледелие: учебник - М.: 1991. - 288 с.
- 13.Гвоздяк П.И., Яковлева Л.М., Пасичник Л.А., Т.Н. Щербина Огородник Л.Е. Бактерии рода *Pseudomonas* на сорняках // Мікробіол. журн. - 2005. - Т. 67. - № 2. - С. 63–69.
- 14.Гвоздяк Р.І., Лукач М.І. Епіфітна фаза *Erwinia amylovora* та *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* на бур'янах плодових садів // Мікробіол. журн. - 2001. - Т. 63. - № 3. - С. 43–50.
- 15.Головков А.М., Черкашина Н.Ф., К вопросу об эффективности органического удобрения БИОУД – 1 // Агрoхимия. - 2001. - № 19. - С. 43-47.
- 16.Горбатко Л.С., Кудрин А.И. Использование почвенно-климатической энергии ресурсов в условиях интенсификации систем земледелия / Сборник научных трудов. Ставрополь. - 1980. - С. 116-125.
- 17.Гордеева Т.Х., Масленникова С.Н., Гажеева Т.П. Формирование микробно-растительных сообществ ризосферы в онтогенезе зерновых культур // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ). Краснодар: КубГАУ, - 2012. - №07(081). - С. 378 – 387.

- 18.Горовая А.И. Роль физиологически активных веществ гумусовой природы и повышения устойчивости растений к действию пестицидов // Биол. науки. Научн. докл. высш.школы - 1988. - №7.- С.5-16.
- 19.Горовая А.И., Орлов Д.С. , Щербенко О.В. Гуминовые вещества: строение, функции, механизм действия, протектор, свойства, экологическая роль. Киев. 1995, - 192с.
- 20.ГОСТ 16265-89. Земледелие. Термины и определения - М.: Издательство стандартов, 1990. - 188с.
- 21.Гродзинский А.М., Гродзинский Д. М. Краткий справочник по физиологии растений - 2-е изд., испр. и доп. - Киев : Наук. думка, 1973. - 591 с.
- 22.Тихонов В.В., Якушев А.В., Завгородняя Ю.А., Бызов Б.А., Демин В.В. Действие гуминовых кислот на рост бактерий // Почвоведение. - 2010. - № 3.- С. 333-341.
- 23.Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв - М.: ИКЦ «Академкнига», 2002. - 282 с.
- 24.Добровольская Т.Г., Леонтьевская Е.А., Хуснетдинова К.А., Балабко П.Н. Таксономический состав и антибиотические свойства бактерий в надземном и подземном ярусах агроценоза // «Проблемы агрохимии и экологии» научно-теоретический журнал. - 2012. - №4. - С.42-45.
- 25.Добровольская Т.Г., Леонтьевская Е.А. , Хуснетдинова К.А., Балабко П.Н. Роль эпифитных и почвенных бактериальных сообществ в защите растений от болезней в агроценозах / Материалы докладов Международной научной конференции «Роль почв в биосфере и жизни человека» (Москва, 05-07 октября 2015 г) . М. МГУ им. М.В. Ломоносова.- 2015 г. - С.169-170
- 26.Добровольская Т.Г., Павлова О.С., Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г. Бактериальные комплексы лесных биогеоценозов Окского

- заповедника: пространственная структура и таксономическое разнообразие // Микробиология. - 1995. - Т. 64. - № 6. - С. 829-833.
- 27.Емцев В.Т. Ассоциативный симбиоз почвенных diaзотрофных бактерий и овощных культур // Почвоведение. - 1994. - №4. - С. 74-84.
- 28.Емцев В.Т. , Мишустин Е.М. Микробиология: учебник для вузов. 5-ое изд., перераб. и доп. – М.: Дрофа. 2005. - 445 с.
- 29.Задорожный А.М., Кошкин А.Г., Соколов С.Я., Шретер А.И. Справочник по лекарственным растениям - 2-е изд. – М.: Экология. 1992. - 415 с.
- 30.Захаренко, А. В. Теоретические основы управления сорным компонентом агрофитоценоза в системах земледелия - М.: МСХА. 2000. - 247с.
- 31.Иванов, Н.С. Биологическая активность ризосферы различных сельскохозяйственных культур, выращенных в условиях поля и фитокамеры / Пути повышения плодородия почв Нечерноземной зоны РСФСР. Мат. зон. Семинара. Л., 1982. - С. 21
- 32.Иванова Е.Г. Ассоциация аэробных метилотрофных бактерий с растениями: дис. ... канд. биол. наук: - Пущино, 2006. - 164 с.
- 33.Интегрированная защита растений / Под ред. Ю.Н. Фадеева К.В. Новожилова - 2-е изд., перераб. и доп. М.: Колос. 2010. - 176 с.
- 34.Камышев Н.С. Пашенные сочетания как фитоценозы // Труды Воронежского гос. ун-та. — Воронеж: Изд-во Воронежского ун-та - 1939. - Т. 11. - Вып. 2. - С.33-62.
- 35.Комаровский, В. Сорняк: друг или враг? [Электронный ресурс] // «Директор». Апрель - 2007 – Режим доступа: <http://cluboz.net/blog/sornyak-drug-ili-vrag/>
- 36.Комиссаров И.Д., Климова А.А., Логинов Л.Ф. Влияние гуминовых препаратов на фотосинтез и дыхание растений // Гуминовые

- препараты. Научные труды Тюменского сельскохозяйственного института. Тюмень. - 1971. - Т.14. - С. 37-41.
37. Кононков П.Ф., Дудина З.Н., Добровольская Т.Г. Изменение микрофлоры и всхожести семян овощных культур при хранении // Сельскохозяйственная биология. - 1980. – Т.15. - С. 510-513.
38. Красильников, Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения - М.: АН СССР. 1958. - 464 с.
39. Кузнецов А.Е., Градова Н. Б., Лушников С. В., Энгельхарт М., Вайссер Т., Чеботаева М. В. Прикладная экобиотехнология М. : БИНОМ. Лаборатория знаний. 2012. - 485 с.
40. Куликова Н.А., Лебедева Г.Ф. Гербициды и экологические аспекты их применения: учебное пособие. М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ». 2010. - 152 с.
41. Куликова Н.А. Защитное действие гуминовых веществ по отношению к растениям в водных и почвенных средах в условиях абиотических стрессов: дисс... докт. биол. наук: - М.: МГУ, 2008. - 302 с.
42. Лошаков, В.Г. Севооборот и плодородие почвы; под ред. В.Г. Сычева. – М.: ВНИИА, 2012. - 512 с.
43. Лысак Л.В., Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий - М.: МАКС Пресс, 2003. - 120 с.
44. Лысак Л.В., Сидоренко Н.Н. О видовом разнообразии родококков в городских почвах // Микробиология. - 1997. - Т. 66. - №4. - С. 574-576.
45. Малашенко Ю.Р., Романовская В.А., Соколов И.Г. Роль розовоокрашенных факультативно метилотрофных бактерий (РМБ) в локальных экосистемах биосферы /Автотрофные микроорганизмы. (Конф. памяти акад. РАН Е.Н.Кондратьевой. Москва. МГУ. 23-25 апреля 1996 г.) М., - 1996. - С. 23.

46. Мальцев А.И. Сорная растительность СССР - 2-е изд. - М.; Л. : Сельхозгиз, 1933. - 295 с.
47. Манучарова Н.А. Молекулярно-биологические аспекты исследований в экологии и микробиологии: учебное пособие - М.: МГУ. 2010. - 48 с.
48. Марков М.В. Агрофитоценоз и процесс его становления: (К вопросу о фитоагроценогенезе) // Тр. МОИП. Отд. Биол. -1970. -Т.38. - С. 108-116.
49. Марков, М.В. Агрофитоценология. Наука о полевых растительных сообществах - учеб. пособие. Казань: Казан. ун-т, 1972. - 269 с.
50. Марухленко А.В., Свист В.Н., Борисова Н.П., Молякко А.А. Гуминовые препараты и полиазофос в биологическом картофелеводстве / Материалы научно - практической конференции и координационного совещания «Научное обеспечение и инновационное развитие картофелеводства». Рос.акад.с-х наук, Всерос. НИИ картоф. хоз-ва; под ред. Е.А. Симакова - М.: - 2008, - Т.2, - С. 175 -181
51. Мергель А.А., Тимченко А.В., Кудеяров В.Н. Роль корневых выделений растений в трансформации азота и углерода в почве // Почвоведение. - 1996. - №10. - С. 1234-1239
52. Мерзаева О.В., Широких И.Г. Образование ауксинов эндوفитными актинобактериями озимой ржи //Прикладная биохимия и микробиология. 2010. том 46. №1. - С. 51-57.
53. Миркин Б.М., Наумова Л.Г. Популярный экологический словарь /под ред. А.М. Гилярова. изд. 2е. М.: 2003. - 384 с.
54. Миркин Б. М., Туганаев В. В. Парадигма современной геоботаники и теория агрофитоценологии /Материалы III Всесоюзного совещания по проблемам агрофитоценологии и агробиогеоценологии отв. ред. В. В. Туганаев. Ижевск, - 1983. - С. 38-42.

- 55.Моргун В.В., Коць С.Я., Кириченко Е.В. Ростстимулирующие ризобактерии и их практическое применение // Физиология и биохимия культурных растений. - 2009. - Т. 41. - № 3. - С. 187-207.
- 56.Наумова Г.В., Кособокова Р.В., Косоногова Л.В., Райцина Г.И., Жмакова Н.А., Овчинникова Т.Ф. Гуминовые препараты и технологические приемы их получения /В сб.: Гуминовые вещества в биосфере. М.: Наука, - 1993. - С. 178-188
- 57.Недорезков, В.Д. Биологическая защита пшеницы от фитопатогенов - Уфа: БГАУ. 1998. - 65 с.
- 58.Недорезков, В.Д. Биологическое обоснование применения эндофитных бактерий в защите пшеницы от болезней на Южном Урале: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: - ВИЗР С-Пб. 2003. - 41 с.
- 59.Никитин, В.В. Сорные растения флоры СССР - Л.: Наука, 1983. - 454 с.
- 60.Павленко Г.В., Лойцянская М.С. Об экологии уксуснокислых бактерий //Вестник Ленинградского ун-та. - 1978. - № 21. - С. 121-128.
- 61.Патыка, В.Ф. Агроэкологическая роль азотфиксирующих микроорганизмов - Киев. 2004. - 320с.
- 62.Определитель бактерий Берджи. М.: Мир, 1997. Т. 1. С. 436, Т. 2. – 362 с.
- 63.Прижуков Ф.Б., Черепанов Г.Г. Альтернативное земледелие: опыт и проблемы /ВАСХНИЛ. ВНИИ информации и технико-экономических исследований агропромышленного комплекса. М., 1991. – С. 26-31.
- 64.Путырский И.Н., Прохоров В.Н. Всё о лекарственных растениях - Мн.: Книжный Дом, 2010. - 521с.
- 65.Тихонов В. В., Якушев А. В., Завгородняя Ю. А., Бызов Б. А., Демин В. В. Действие гуминовых кислот на рост бактерий // Почвоведение. - 2010. - № 3. - С. 333 – 341.

- 66.Ториков В.Е., Мешков И.И., Котиков М.В., Мажуго Т.М. Изменение урожайности зерновых культур и картофеля в зависимости от применения гумистима // Вестник Брянской сельскохозяйственной академии. - 2009. - № 4. - С. 21-25.
- 67.Трухочев В.И., Дорожко Г.Р., Дударь Ю.А. Сорные, лекарственные и ядовитые растения; под ред. В.В. Пенчукова и А.И. Войскового. – М.: МААО. Ставрополь: АГРУС, 2006. - 264 с.
- 68.Туганаев В. В. К классификации агрофитоценозов /Совещание по классификации растительности : тез. докл. (Ленинград, окт. 1971 г.) , Л., 1971. - С. 93-94.
- 69.Туганаев В. В. Агрофитоценозы современного земледелия и их история; АН СССР, Моск. о-во испытателей природы. М. : Наука, 1984. - 86 с.
70. Туганаев В. В. Эволюция состава и структуры агрофитоценозов / Растительный покров антропогенных местообитаний : межвуз. сб. науч. тр. Удмурт. гос. ун-т ; Ижевск, 1988. - С. 5-11.
- 71.Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация в биогеоценозах / Почвенные организмы как компонент биогеоценоза. М.: Наука. - 1984. - С. 185-199.
- 72.Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация - М. Изд-во МГУ. 1986. - 133 с.
- 73.Уразаев Н. А., Вакулин А.А., Никитин А.В. и др. Сельскохозяйственная экология : учеб. пособие для студентов вузов по агрономическим и зооветеринарным специальностям; под ред. Н. А. Уразаева. - 2. изд., перераб. и доп. М. : Колос, 2000. - 303 с.
74. Фокин А.Д., Бобырь Л.Ф., Епишина Л.Е., Кравцова Л., Христева Л.А. О проникновении гумусовых веществ в клетки растений / Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. - 1975. - Т.5. - С. 57-59.

75. ФУНГ ТХИ МИ Ассоциативные бактерии AGROBACTERIUM TUMEFACIENS ризопланы овощных культур Вьетнама: дис. ... канд. биол. М.: 2015. - 115 с.
76. Христева Л.А. Роль гуминовой кислоты в питании растений и гуминовые удобрения. / Труды почвенного ин-та им. В.В. Докучаева, Академия Наук СССР. - 1951. - Т. 38. - С. 108-184.
77. Христева Л.А. О природе действия физиологически активных форм гуминовых кислот и других стимуляторов роста растений / Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. - 1968. - Т. 3. - С. 13-27.
78. Христева Л. А. К природе действия физиологически активных веществ на растения в экстремальных условиях / Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. – Днепропетровск, - 1977. - Т. 4. - С. 5-15.
79. Хуснетдинова Т.И., Балабко П.Н., Шелепова О.В., Карпова Д.В., Батурина Л.К., Черкашина Н.Ф. Влияние препаратов "Эпин - экстра" и "Идеал" на продуктивность расторопши пятнистой (*silybum marianum* L.) в условиях интродукции в Московской области // Агрохимический вестник. М.: - 2016. - № 5. - С. 20-25
80. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцев Т.А., Нетрусов А.И. Гормоны и гормоноподобные соединения микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология. - 2006. - Т.42. № 3. - С. 261-268.
81. Черников В.А. Агрэкология - М.: Колос, 2000. – 535 с.
82. Чернов Н. М., Галушин В. М., Константинов В. М. Основы экологии; под ред. Н. М. Черновой. — 6-е изд., стереотип. — М.: Дрофа, 2002. - 304 с.
83. Шайхисламова, Э. Ф. Анализ динамики сегетальной растительности Зауралья Республики Башкортостан за 20 лет: 1982-2002 гг. : дисс. ... канд. биол. наук - Уфа. 2005. - 136 с.

84. Шильникова В.К., Ванькова А. А., Годова Г. В. Микробиология : учеб. пособие для СПО - М. : Дрофа, 2006. - 268 с.
85. Шмалько И.А., Багринцева В. Н. Полевые эксперименты по эффективному применению удобрения Гумистим на кукурузе // Зерновое хозяйство России. - 2015. - № 2. - С. 50-53.
86. Arshad R, Farooq S, Azam F (2006). Rhizospheric bacterial diversity: Is it partly responsible for water deficiency tolerance in wheat // Pak. J. Bot. 38: 1751-1758
87. Asis C, Adachi K. Isolation of endophytic diazotroph pantoea agglomerans and nondiazotroph enterobacter asburiae from sweet potato stem in japan. // Lett. Appl. Microbiol. 2004. V. 38(1). P. 19-23
88. Beattie, V., McInnes, W., & Fearnley, S. A methodology for analysing and evaluating narratives in annual reports: a comprehensive descriptive profile and metrics for disclosure quality attributes. Accounting Forum, 2004. 28 (3), 205–236.
89. Berg G., Krechel A., Ditz M., Sikora R., Ulrich A., Hallman J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. // Fems microbiol. Ecol. 2005. V. 51(2). P. 215-229.
90. Bodenhausen N., Horton M.W., Bergelson J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of Arabidopsis thaliana // PLOS ONE. 2013. V.8. № 2. P. 1-9.
91. Buckley DH, Schmidt TM.. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. // Environmental Microbiol. 2003.V.5: p.441-452
92. Buckley D.H., Schmidt T.M. The impact of historical land management of microbial community structure in soil. // Abstr. 99th gen. Meet. Amer. Soc. Microbiol. 1999. V. 3. P. 489.

93. Cattelan A.J., Hartel P.G., Fuhrmann J.J. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth // *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63 (1999), pp. 1670–1680
94. Corpe W.A., Rheem S. Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1984. V. 62. № 4. P. 243-250.
95. Dey R., Pal K. Influence of soil and plant types on diversity of rhizobacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci., India, sect. B biol. sci.* 2012. V. 82. 3. P. 341-352.
96. Edwards U., Rogall T., Bloeker H., Ende M.D., Boettge E.C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes, characterization of gene coding for 16S ribosomal RNA // *Nucl. Acids Res.* 1989. V.17. P. 7843-7853
97. El-Hendawy H.H., Osman M.E., Ramadan H.H. Pectic enzymes produced in vitro and in vivo by *Erwinia* spp. isolated from carrot and pepper in Egypt. // *J. Phytopathol.* 2002. V. 150(8-9). P. 431-438, 524-536.
98. Enya J., Shinohara H., Yohida S., Tsukiboshi T., Negishi H., Suyama K., Tsushima S. Culturable leaf-associated bacteria on tomato plants and their potential as biological control agents. // *Microbial ecology.* 2007. V. 53. P. 524- 536.
99. Hirano S.S., Upper C.D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus and epiphyte // *Microbiol. Molecul. Biol. Rew.* 2000. V. 64. № 3. P. 624-653.
100. Holland M.A. Methylobacterium and plants // *Rec. Res. Dev. Plant Physiol.* 1997. V. 1. № 1. P. 207-213.
101. Hsieh T.F., Huang H.C., Erickson R.S. Biological control of bacterial wilt of bean using a bacterial endophyte, *Pantoea agglomerans* // *J. Phytopathol.* 2005. V. 153(10). P. 608-614
102. Jacques M.A., Morris C.E. A review of issues related to the quantification of bacteria from the phyllosphere // *FEMS Microb. Ecol.* 1991. V. 18. P. 1-14.

103. Jaeger C.H., Lindow S.E., Miller W., Clark E., Firestone M. Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. P. 2685-2690.
104. Johansen J.E., Binnerup S.J. 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.) // *Microb. Ecol.* 2002. V. 43. P. 298-306.
105. Joshi P., Bhatt A. Diversity and function of plant growth promoting rhizobacteria associated with wheat rhizosphere in north himalayan region // *Intern. J. Environ. Sci.* 2011. V. 1. № 6. P. 1135-1143.
106. Kremer R.J., Fanima M., Begonia T., Stanley L., Lanham E.T. Characterization of Rhizobacteria Associated with Weed Seedlingst // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. Vol. 56. No. 6. p. 1649-1655.
107. Kulikova N.A., E.V. Stepanova E.V., Koroleva O.V. Mitigation activity of humic substances: direct influence on biota / in: Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice. NATO Science Series: IV: Earth and Environmental Sciences – V.52 – Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2006 – pp.285-310
108. Larkin R.P. Characterization of soil microbial communities under different potato cropping system by microbial population dynamics, substrate utilization, and fatty acid profiles. // *Soil biology and biochemistry.* 2003. V. 35. P. 1451-1466.
109. Marshall E.J.P., Moonen A.C. Field margins in northern Europe: their functions and interactions with agriculture // *Agriculture, Ecosystems, Environment.* 2004. V. 89. №1-2. P. 5-21
110. McMachon M.A., Wilson I.G. The occurrence of enteric pathogens and aeromonas in organic vegetables. // *International journal of food microbiology.* 2000. V. 70. P. 155-162.

111. McSpadden Gardener b. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems // *Phytopathol.* 2004. V. 94. № 11. P. 1252-1258.
112. Membreno J., Zapata M., Beaver J., Smith R. Microflora en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) // *Argon. Mesoamer.* 2001. V. 12(2). P. 135-139.
113. Mukhtar I., Khokhar I., Mushtaq S., Ali A. Diversity of epiphytic and endophytic microorganisms in some dominant weeds // *Pak. J. Weed Sci. Res.* 2010. 16 (3): 287-297.
114. Nacamulli C., Dalmastri C., Tabacchioni S., Chiarini L. Perturbation of maize rhizosphere microflora following seed bacterization with *Burkholderia cepacia* mci 7. // *Fems microbiol. Ecol.* 1997. V. 23. P. 183-193.
115. Nunan N., Daniell T., Singh B., Papert A., McNicol J, Prosser J. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 6784-6792.
116. Rekosz-Burlaga H., Borys M., Goryluk-Salmonowicz A. Cultivable microorganisms inhabiting the aerial parts of *Hypericum perforatum* // *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus.* 2014. 13(5) p. 117-129.
117. Rosenblueth M1, Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts// *International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions.* Vol. 19, № 8. P. 827-837.
118. Sabaratnam S., Beattie G. Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* b728a and *Pantoea agglomerans* brt98 in epiphytic and endophytic colonisation of leaves. // *Appl. Env. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 1220-1228.
119. Salles G., Samyn E., Vandamme P., Van veen J.A., Van elsas J.D. Changes in agricultural management drive the diversity of *Burkholderia* species isolated from soil on peat medium. // *Soil. Biol. Biochem.* 2004 V. 38. P. 661-673.

- 120.Sarathambal C., K. Ilamurugu1 , L. Srimathi Priya1 and K. K. Barman A Review on weeds as source of novel plant growth promoting microbes for crop improvement// Journal of Applied and Natural Science. 2014. № 6 (2): 880 - 886
- 121.Sheublin T.R., Leveau J.H.J. Isolation of Arthrobacter species from the phyllosphere and demonstration of their epiphytic fitness // Microbiology Open. 2012.
- 122.Smit E., Leeftang P, Gommans S., Broek J., Mil S., Wernars K.. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. // Appl. Microbiol. 2001. V. 67. P. 2284-2291.
- 123.Sowden F.J., Chen Y, Schnitzer M. The nitrogen distribution in soils formed under widely differing climatic conditions //Geochemica and Cosmochimica Acta, 1997, v.41, p.1524-1526
- 124.Stukenbrock E.H., Bruce A.M. The origins of plant pathogens in agroecosystems // Annual review of phitopatology. 2008. V. 46. P. 75-100.
- 125.Sturz A.V., Christie B.R., Matheson B.G. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy //Can. J. Microbiol. 1998. V. 44. P. 162-167.
- 126.Sturz A.V., Matheson B.G., Arsenault W., Kimpinski J., Christie B.R. Weeds as a source of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural soils // Can. J. Microbiol. 2001. V. 47. P. 1013-1024
- 127.Sun H.Y., Deng S.P., Raun W.R. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem// Applied and Environmental Microbiology. 2004. 70.(10). P.5868-5874
- 128.Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrixchoice // Nucl. Acids Res. 1994. V.22 P. 4673-4680.

129. Van Outryve M.F., Gossele F., Swings J. The Bacterial microflora of witloof chicory (*Cichorium intybus* L.var.Foliosum Hegi) leaves // *Microb.Ecol.* 1989. V. 18. № 2. P. 175-186.
130. 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. // *International Journal of Experimental Botany.* 81. 81-87.
131. Venieraki A., Dimou M., Vezuri E. Characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from field-grown barley, oat and wheat // *J. Microbial.* 2011. V.49. № 4. P. 525-534.
132. Warcholinska U. Flora segetalna wzniesien Lodzkich // *Acta UL. Folia bot.* 1981. №1.-P. 133-179.
133. Yabuuchi E., Kanenko T., Yano I., Moss C.W., Miyoshi N. *Sphingobacterium* gen.nov., *Sphingobacterium spiritivorum* comb. nov., *Sphingobacterium mizutae* sp.nov., and *Flavobacterium indologenes* sp. nov. : glucose –nonfermenting gram-negative rods in CDC groups IIK-2 and IIb // *Intern.J. Syst.Bacteriol.* 1983. V. 33. 3. P. 580-598.
134. Young J. M., Kuykendall L. D., Martinez-Romero E., Kerr A. and Sawada H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. Vitis*// *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2001), 51, P. 89–103.