На правах рукописи

Леонтьевская Елена Алексеевна

СТРУКТУРА ЭПИФИТНО-САПРОТРОФНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЗЕРНОВЫХ И ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР

Специальность 03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2014

Работа выполнена на кафедре биологии почв факультета почвоведения Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель:	**Добровольская Татьяна Глебовна,** кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, кафедра биологии почв
Официальные оппоненты:	**Васильева Лина Васильевна,** доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, лаборатория реликтовых микробных сообществ.
	Ермакова Инна Тихоновна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, лаборатория микробной энзимологии
Ведущее учреждение:	Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева

Защита диссертации состоится «___»_____2014 г. в __часов__минут в аудитории М-2 на заседании Диссертационного совета Д 501.002.13 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва. Ленинские горы, д. 1, строение 12, МГУ имени М.В.Ломоносова, факультет почвоведения.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «____»_____2014 г.

Приглашаем Вас принять участие в обсуждении диссертации на заседании Диссертационного совета. Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные печатью, просим направлять по вышеуказанному адресу.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
профессор Зенова Галина Михаиловна Зенова

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

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

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

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

необходимо комплексное изучение таксономического состава микроорганизмов в агроценозах в филлосфере, ризосфере и почве под сельскохозяйственными культурами. Однако исследований в этой области проводится крайне мало. При этом изучаются лишь отдельные элементы агроценозов, обычно связанные с анализом разнообразия ризосферных бактерий либо зерновых культур (Гордеева, 2012; Johansen, Binnerup, 2002; Joshi, Bhatt, 2011), либо овощей (Шильникова и др., 2006; Berg et al., 2005; Enya et al., 2007).

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

Задачи исследования:

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

Научная новизна работы

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

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

Практическая значимость

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

Апробация работы

Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: V Всероссийский съезд общества почвоведов, (Ростов-на-Дону, 2008), V Международная научно-практическая

конференция «Экология речных бассейнов» (Владимир, 2009), VI Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2011), IX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012» (Москва, 2012), Международная научная конференция «Дни Науки», (Болгария, 2012), VI Всероссийский съезд общества почвоведов им. В.В. Докучаева (Петрозаводск, 2012), Международная конференция «Биодиагностика в биологической оценке почв и сопредельных сред» (Москва, 2013).

Публикации

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

Объем и структура работы

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

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю кандидату биологических наук, ведущему сотруднику Т.Г. Добровольской за постоянную помощь и повседневное внимание к работе. Благодарю Н.А. Манучарову за помощь в построении филогенетических древ, Л.В. Лысак за ценные советы в области биохимии микроорганизмов. Спасибо всем

сотрудникам кафедры биологии почв за внимательное отношение и ценные советы.

Содержание работы

Объекты и методы исследования

Объекты исследования

Объектами исследования были агроэкосистемы Каширского и Солнечногорского районов Московской области.

Участки Каширского района распаханы под овощные и кормовые культуры (капуста, морковь, картофель, свекла, лук). В результате длительного использования почв в земледелии аллювиальные луговые почвы эволюционировали в агропочвы. Подробная характеристика почв приведена в тексте диссертации.

Образцы почвы и растений – морковь посевная (*Daucus sativus*), капуста огородная (*Brássica olerácea*), свекла обыкновенная (*Béta vulgáris*), лук репчатый (*Allium cepa* L.), картофель (*Solánum tuberósum*), ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare*), пшеница мягкая (*Triticum aestivum L.*) были отобраны в июне и сентябре.

Методы исследования

Численность и таксономический состав бактериального комплекса исследовали методом посева на глюкозо-пептонно-дрожжевую среду в пятикратной повторности. Высевы проводились из разведений 10^3-10^8. Статистическая обработка выполнена в соответствии со стандартными методами. Стандартное отклонение рассчитывалось в соответствии с рекомендациями Дмитриева (Дмитриев, 2012). Родовую принадлежность выделенных бактерий устанавливали на основании морфологических, культуральных и хемотаксономических признаков, используя «Определитель бактерий Берджи» (Определитель..., 1997), а также «Методы оценки

бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий» (Лысак и др., 2003). Для идентификации бактерий использовался также метод выделения ДНК с последующим проведением ПЦР и секвенированием. Для видовой идентификации использовался метод времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS). Идентификацию микроорганизмов проводили на основе сопоставления данных о составе и соотношении пептидов, полученных гидролизом белков в колонии исследуемого микроорганизма, с аналогичными данными типовых штаммов из базы данных.

Антагонистическую активность исследуемых штаммов бактерий относительно фитопатогенов проводили на основании метода агаровых блоков (Егоров, 1957). Общую бактериолитическую активность определяли турбидиметрическим методом. Определение природы антибиотиков проводили с использованием метода ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии).

Результаты и обсуждение

В зависимости от стадии развития растения и климатических условий численность бактерий овощных культур изменялась в пределах 10^6-10^9 КОЕ/г. Динамика численности бактериальных сообществ в процессе онтогенеза растения представлена на примере картофеля (Табл. 1). Наивысшие показатели численности наблюдались в период бутонизации, минимальные – на стадии всходов.

Таблица 1. Динамика численности бактерий на картофеле в процессе вегетации (КОЕ/г).

Органы растения	**Всходы**	**Стадия бутонизации**	**Стадия цветения**	**Уборка картофеля**
Листья	$4{,}2x10^4$	$2{,}7x10^9$	$5{,}8x10^7$	$4{,}2x10^9$
Стебли	$4{,}2x10^4$	$1{,}2x10^8$	$1{,}5x10^6$	$3{,}8x10^8$
Цветы	-	-	$5{,}3x10^8$	-
Корни	-	$5{,}0x10^9$	$5{,}2x10^8$	$4{,}6x10^8$
Клубни	-	$3{,}0x10^8$	-	-

Через месяц после высева культур в агроценозах наблюдали одинаковую таксономическую структуру бактериальных комплексов в филлосфере, ризосфере исследуемых растений и в почве. Так на листьях и корнях лука, а также в почве в качестве доминанта выделились бактерии рода *Aquaspirillum* – типичные гидробионты, свидетельствующие о высокой влажности почв в момент отбора образцов. На корнях лука и в почве около 20 % (субдоминант) составили типично почвенные бактерии рода *Arthrobacter*, в качестве минорных компонентов были выявлены миксобактерии и бациллы. Доля миксобактерий была несколько выше на листьях лука (Рис. 1).

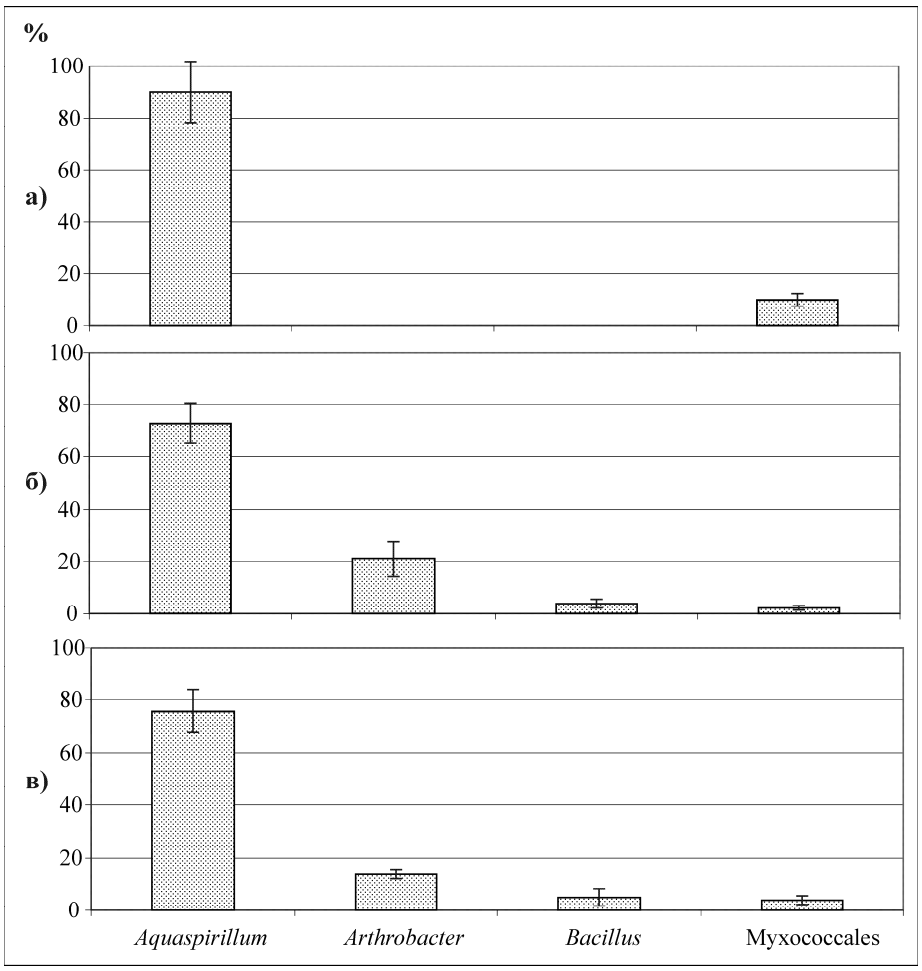

Рисунок 1. Таксономическая структура бактериальных сообществ лука.

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

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

Наиболее чёткие различия в структуре бактериальных сообществ картофеля проявляются во всех ярусах, когда происходят последовательные изменения в онтогенезе растений – цветение, образование клубней (Рис. 2). На цветках картофеля доминировали подвижные протеобактерии родов *Aquaspirillum* и *Pseudomonas*. В качестве минорных компонентов были выделены представители родов *Erwinia* и *Arthrobacter*. На листьях картофеля в период цветения появляются и доминируют факультативно-анаэробные бактерии рода *Erwinia*. Они представлены типичным для овощных культур видом Erwinia *herbicola* (*Pantoea agglomerans*). Группу минорных компонентов составили актинобактерии родов *Arthrobacter, Curtobacterium, Micrococcus* (Рис. 2 б). На корнях и клубнях картофеля в качестве монодоминантов были выявлены типичные для ризосферы целлюлозоразрушающие бактерии – цитофаги. В ризосфере картофеля были обнаружены также артробактер и азотобактер (по 10 %). Нахождение спирилл на корнях (25 %) свидетельствует о проникновении этих водных форм бактерий с влагой в подземные органы растения. На клубнях картофеля всё сообщество было представлено исключительно целлюлолитическими бактериями – цитофагами и миксобактериями (Рис. 2 в, г).

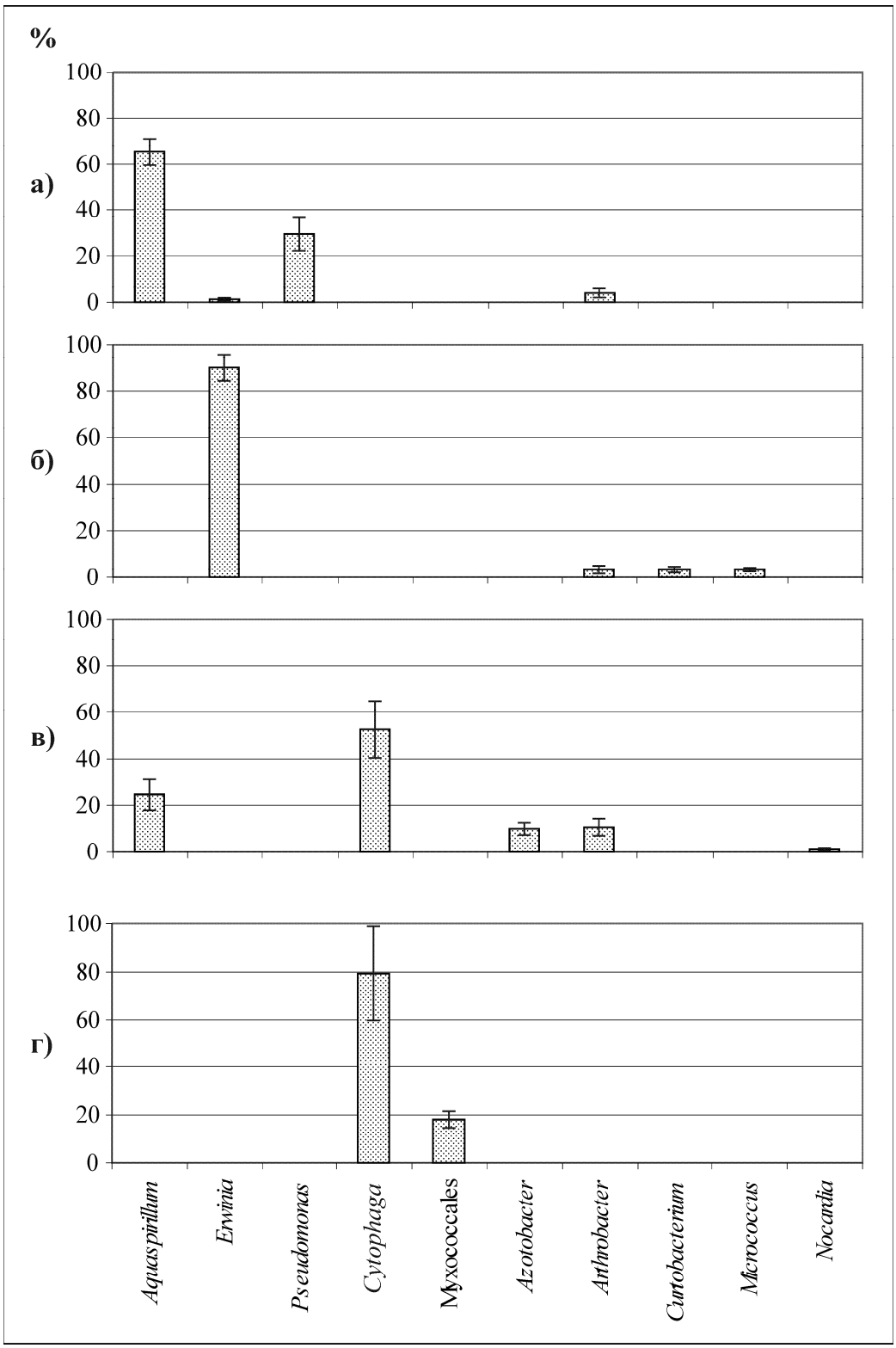

Рисунок 2. Таксономическая структура бактериальных сообществ картофеля в процессе онтогенеза.

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

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

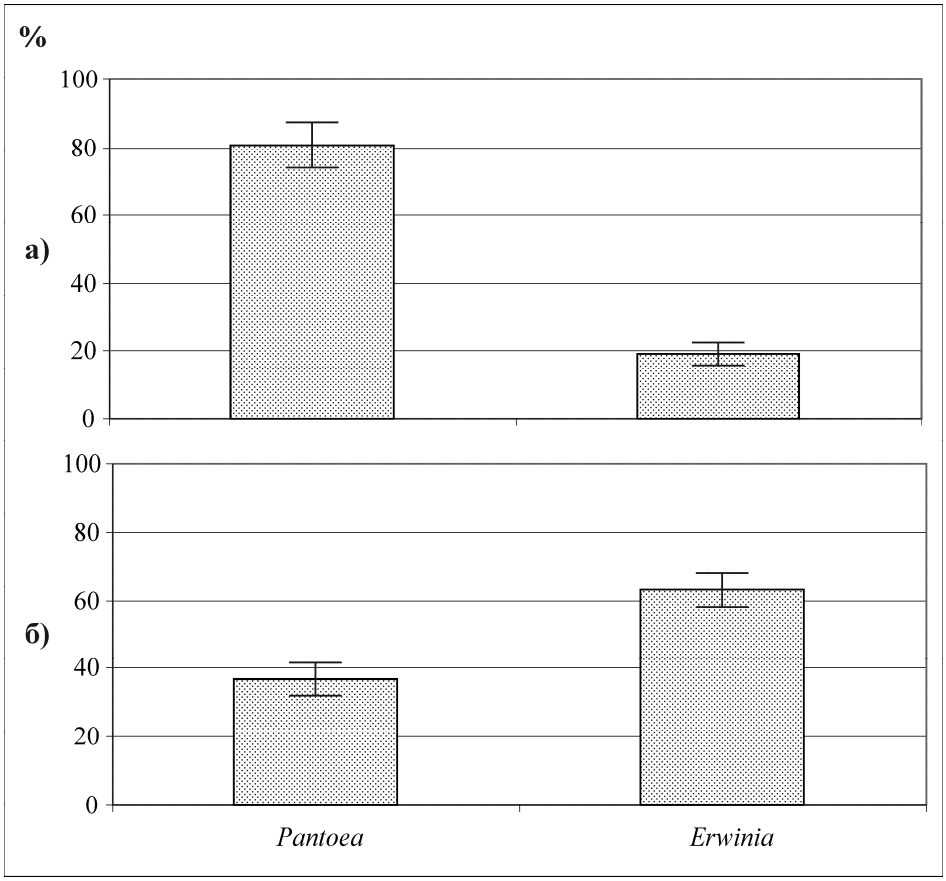

Рисунок 3. Таксономическая структура бактериальных сообществ моркови.

а) здоровой, б) гнилой.

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

бактерии рода *Pantoea* (бывшая *Erwinia herbicola*). На корнеплодах гнилой моркови доминировали представители рода *Erwinia*, вызывающие мягкую гниль овощей (Рис. 3).

При запашке моркови представители энетеробактерий были обнаружены и в почве. Кроме того, 60 % от всех бактериальных таксонов составили псевдомонады, среди которых также много фитопатогенных форм. Однако через год после запахивания и получения нового урожая эрвинии и псевдомонады выделялись только как минорные компоненты. Появились целлюлозоразрушающие бактерии, представленные миксобактериями, цитофагами, которые, по-видимому, принимают участие в деструкции запаханных овощей (Рис. 4).

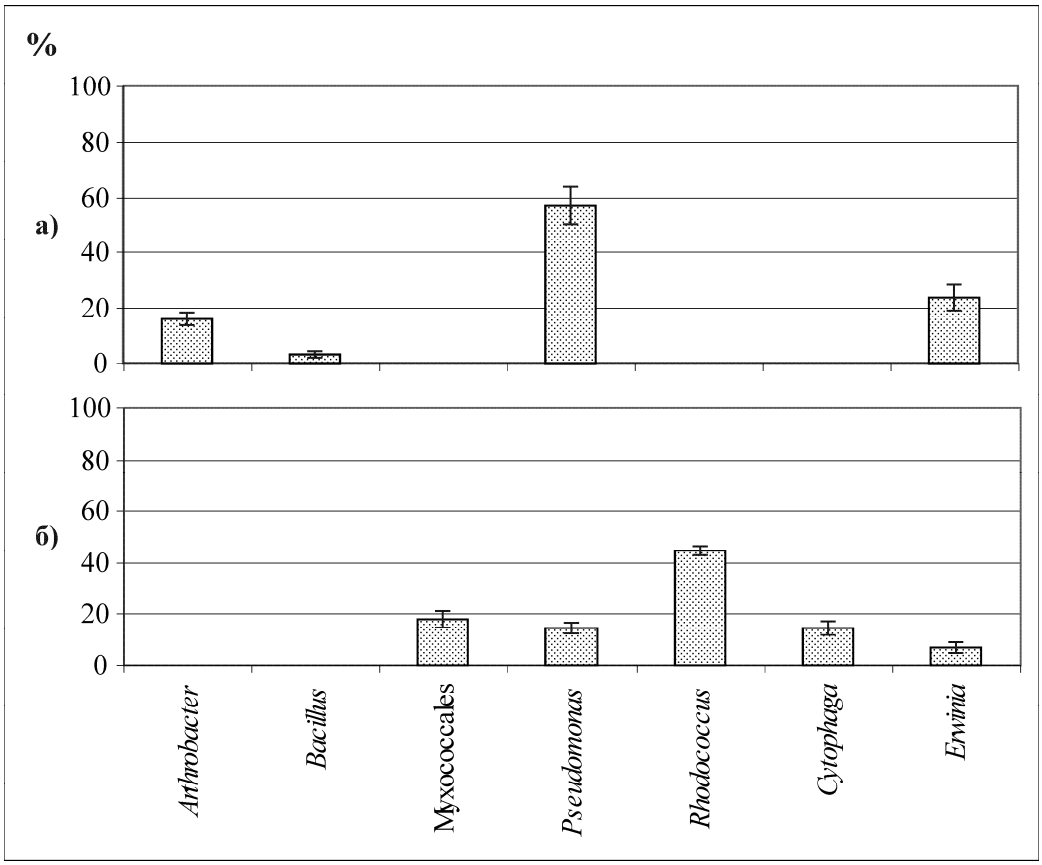

Рисунок 4. Изменение структуры бактериальных сообществ в почве под морковью.

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

Аналогичная ситуация наблюдалась и при запашке в почву капусты.

Численность бактериальных сообществ пшеницы в процессе вегетации колебалась от 10^6 до 10^9 и была максимальной на листьях в период образования колосьев, на корнях – на всходах растений. В почве плотность бактериальных популяций была самой низкой и практически не изменялась (табл. 2).

Таблица 2. Динамика численности бактерий на пшенице в процессе вегетации (КОЕ/г).

Органы растения, почва	**Всходы**	**Образование колосьев**
Листья	$1,6\times10^7$	$1,4\times10^9$
Зерна	-	$0,8\times10^7$
Корни	$2,5\times10^8$	$1,4\times10^7$
Почва	$1,6\times10^6$	$1,1\times10^6$

Таксономическая структура бактериальных сообществ на молодых растениях пшеницы была монодоминантной, как и на овощных культурах (Рис. 5). В филлосфере, ризосфере и почве доминировали бактерии рода *Pseudomonas.* На листьях пшеницы, кроме псевдомонад были обнаружены родококки. На корнях пшеницы в качестве второго доминанта были выявлены миксобактерии, субдоминанта – бациллы, т.е. бактерии гидролитического блока. В почве под пшеничным полем в структуре бактериальных сообществ преобладали бактерии рода *Pseudomonas*, в качестве минорных компонентов были обнаружены представители тех таксонов бактерий, которые были выделены из филлосферы и ризосферы пшеницы.

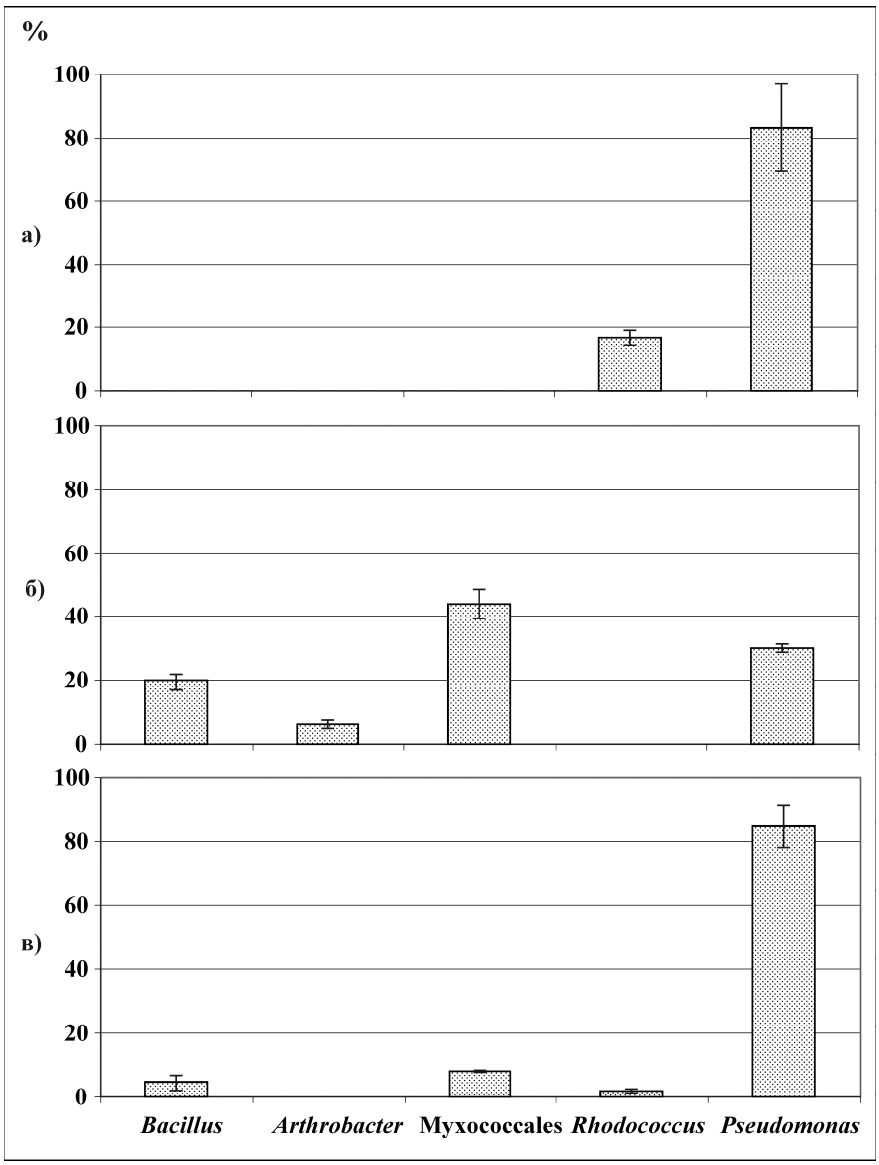

Рисунок 5. Структура бактериальных сообществ пшеницы.

а) листья, б) корни, в) почва.

На листьях пшеницы в июне в качестве монодоминанта выделялись типичные эпифиты – псевдомонады. В роли субдоминанта были обнаружены родококки. (Рис. 6а). В сентябре при старении листьев появлялись целлюлозоразрушающие бактерии – представители порядка Myxococcales, псевдомонады оставались в качестве второго доминанта. Были выявлены также характерные для филлосферы различных растений метилобактерии (Рис. 6б). Аналогичная таксономическая структура бактериальных комплексов была выявлена и в колосьях – на зёрнах пшеницы (Рис. 6в).

Отличие заключалось лишь в увеличении доли миксобактерий в колосьях по сравнению с листьями.

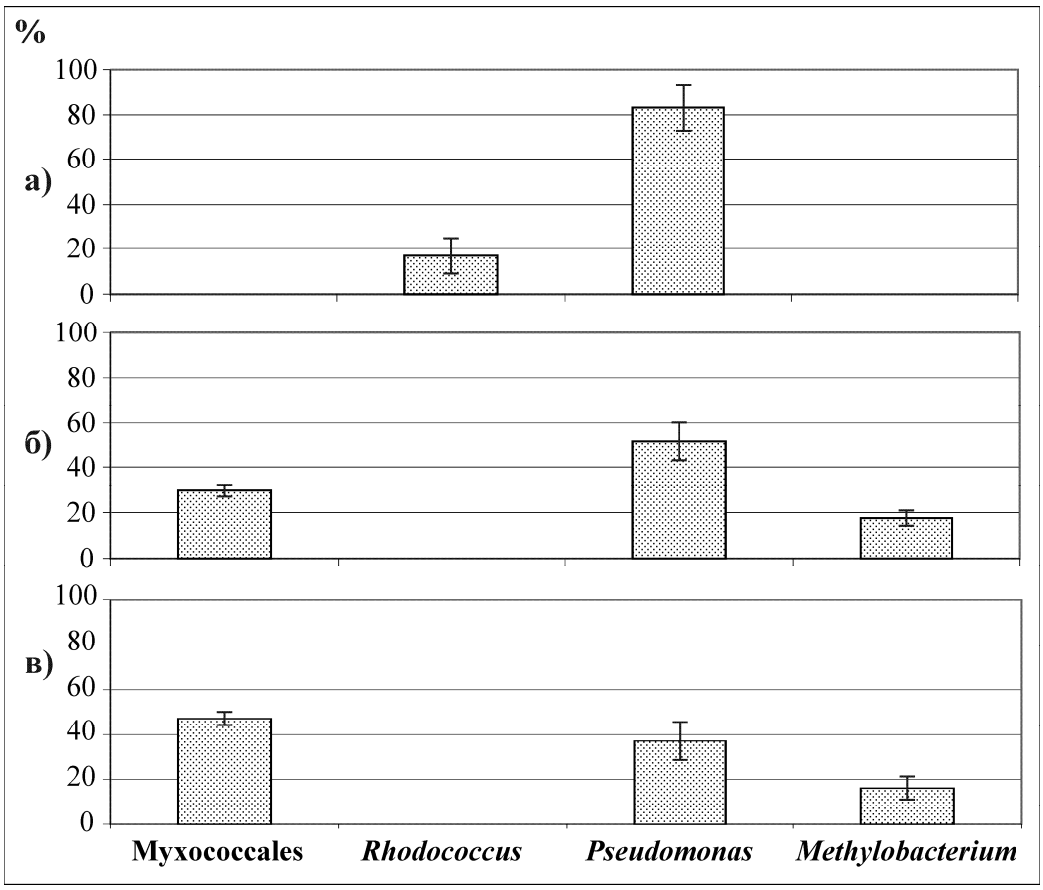

Рисунок 6. Таксономическая структура бактериальных сообществ пшеницы в процессе онтогенеза.

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

Анализ перечня всех таксонов бактерий, которые были обнаружены нами при изучении таксономического состава бактериальных комплексов овощных и зерновых культур позволил нам подсчитать частоту встречаемости и частоту доминирования разных родов бактерий в изученных эконишах. Из 14 выявленных нами таксонов бактерий первое место по частоте встречаемости (50 %) заняли артробактер и миксобактерии, второе место – псевдомонады, аквaспириллы и бациллы (30-40 %). Следующую группу бактерий в порядке убывания составляют: эрвинии, родококки и

цитофаги (20 %), азоспириллы и метилобактерии (около 10 %), стрептомицеты, куртобактерии, нокардии (<10 %) (Рис. 7).

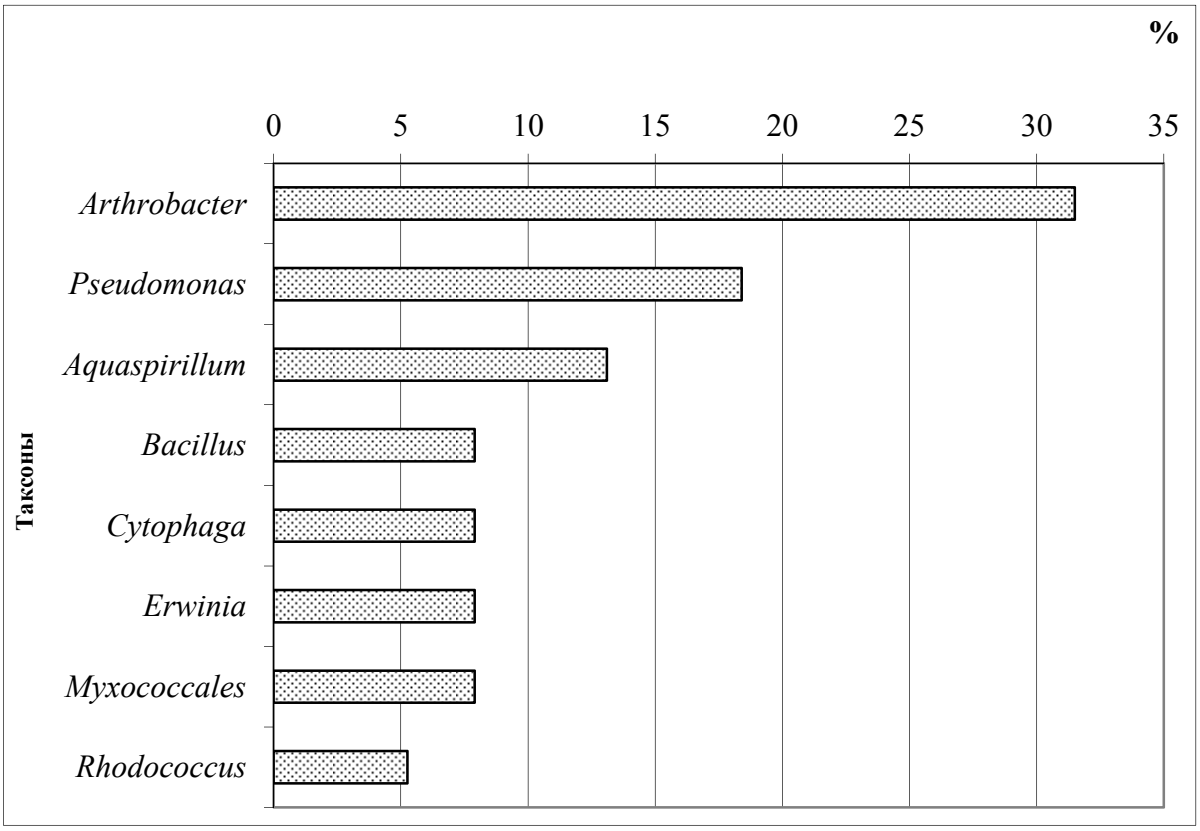

Рисунок 7. Частота встречаемости бактериальных таксонов исследуемых агроценозов.

По частоте доминирования максимальную долю составили представители тех же родов, что перечислены на 1-2 местах в списке таксонов по встречаемости. Это бактерии родов *Arthrobacter* (>30 %), *Pseudomonas* (около 20 %), Aquaspirillum (15 %). Далее в порядке убывания следуют таксоны *Bacillus, Erwinia, Myxococcales* (5-10 %), затем – *Cytophaga и Rhodococcus* (<5 %) (Рис. 8). Следует отметить, что факультативно-анаэробные бактерии рода *Ewinia* были обнаружены нами только на овощных культурах, где в качестве доминантов они выявлялись большей частью на корнеплодах. Представители всех других перечисленных выше родов бактерий встречались как на овощных, так и на зерновых культурах.

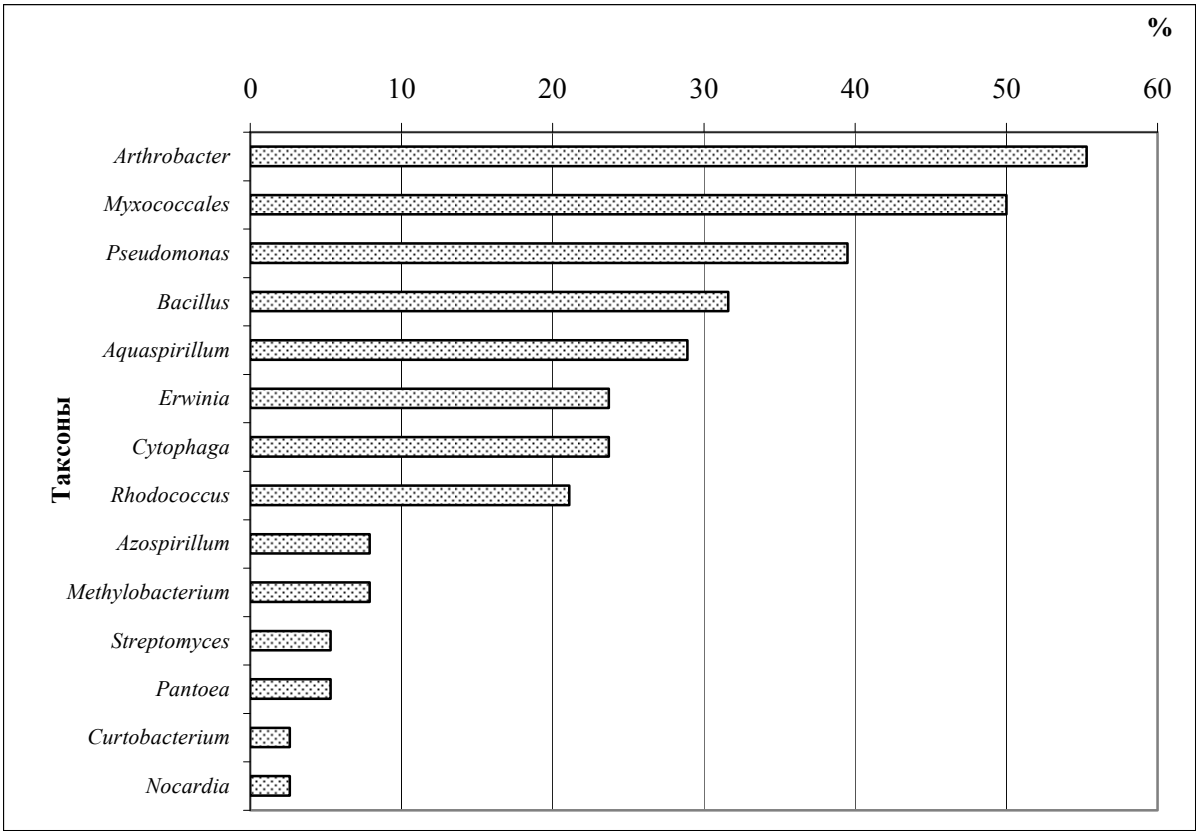

Рисунок 8. Частота доминирования бактериальных таксонов исследуемых агроценозов.

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

В настоящее время грамотрицательные подвижные палочки по фенотипическим признакам весьма условно можно отнести к роду *Pseudomonas,* так как описано значительное количество новых родов, близких к псевдомонадам и отличающихся от них по составу липидов, либо молекулярно-биологическим признакам. Использование метода секвенирования 16S РНК позволило уточнить принадлежность протеобактерий, которые трудно определяются фенотипическими методами, к роду *Pseudomonas*. Что касается рода *Aquaspirillum*, то бактерии,

отнесенные нами к этому роду на основании фенотипических признаков, были идентифицированы как представители рода *Pseudomonas.*

Поскольку родовой состав доминирующих в исследуемых агроценозах бактерий оказался довольно банальным, т.е. о наличии бактерий этих родов сообщали и другие авторы (Sun et al., 2004; Иутинская и др., 1993), мы решили провести идентификацию доминантов на видовом уровне. В таблице 3 дан список видов бактерий, определённых на основании использования метода MALDI-TOF MS. В результате бактерии рода *Arthrobacter* представлены двумя видами, *Bacillus* – тремя видами. Максимальное количество видов (четыре) было выявлено среди бактерий рода *Pseudomonas*. Два штамма, отнесённые нами к роду *Pseudomonas* по фенотипическим признакам, на основании метода MALDI-TOF MS были определены как *Sphingobacterium faecium* и *Stenotrophomonas rhizophila*.

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

Таблица 3. Антагонистическая активность бактерий разных видов по отношению к фитопатогенам.

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

Из анализа данных, представленных в таблице 3, следует, что бактерии-антагонисты обнаружены среди разных таксонов как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Зоны ингибирования роста составляли от 1 до 7 мм. Максимальные зоны ингибирования были обнаружены вокруг блоков культур разных видов

Pseudomonas. Только один вид этого рода – *Pseudomonas frederiksbergensis* – подавлял рост всех трёх видов фитопатогенных бактерий.

Для штаммов, проявивших наибольшую активность (6 штаммов), было решено подтвердить их родовую и видовую принадлежность на основании последовательности 16S рРНК. На филогенетическом древе, где показана принадлежность исследуемого нами штамма к роду *Pseudomonas* указаны три вида, которые наиболее близки к этому штамму. Среди них вид *Pseudomonas frederiksbergensis* – это тот вид, который был определён методом MALDI-TOF MS и который оказался наиболее активным антагонистом среди других видов *Pseudomonas* (Рис. 9). На рисунках 10 и 11 видно, что другие исследуемые нами штаммы бактерий ближе всего расположены на филогенетическом древе к видам *Variovorax paradoxus* и *Curtobacterium flaccumfaciens*. Именно под такими видовыми названиями приводятся в таблице 3 штаммы бактерий-антагонистов. В этой таблице все названные виды определены на основании метода MALDI-TOF MS. Таким образом, анализ филогенетических древ, представленных на рисунках 9, 10 и 11, позволяет сделать вывод об идентичности родов и видов, определённых с помощью методов MALDI-TOF MS и ПЦР.

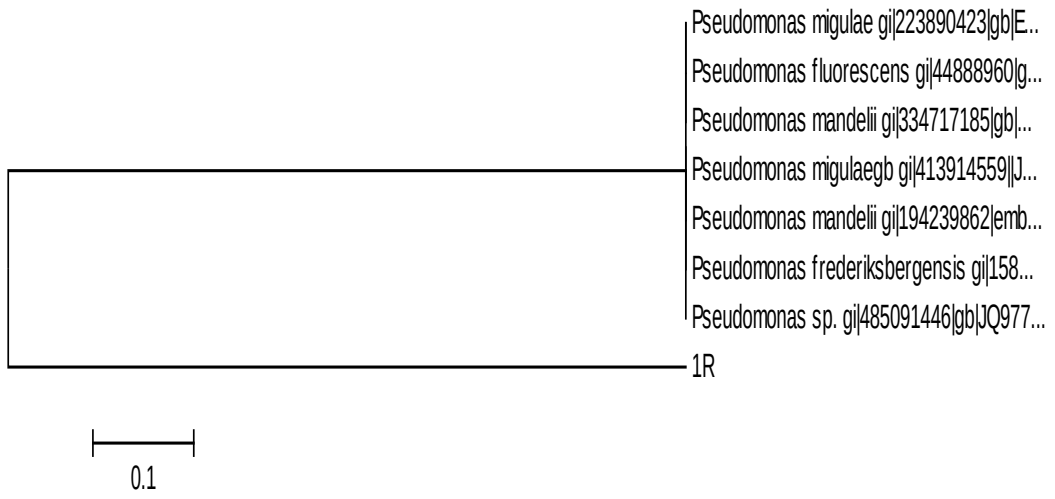

Рисунок 9. Филогенетическое положение доминирующего штамма бактерии в прокариотном комплексе дерново-подзолистой почвы.

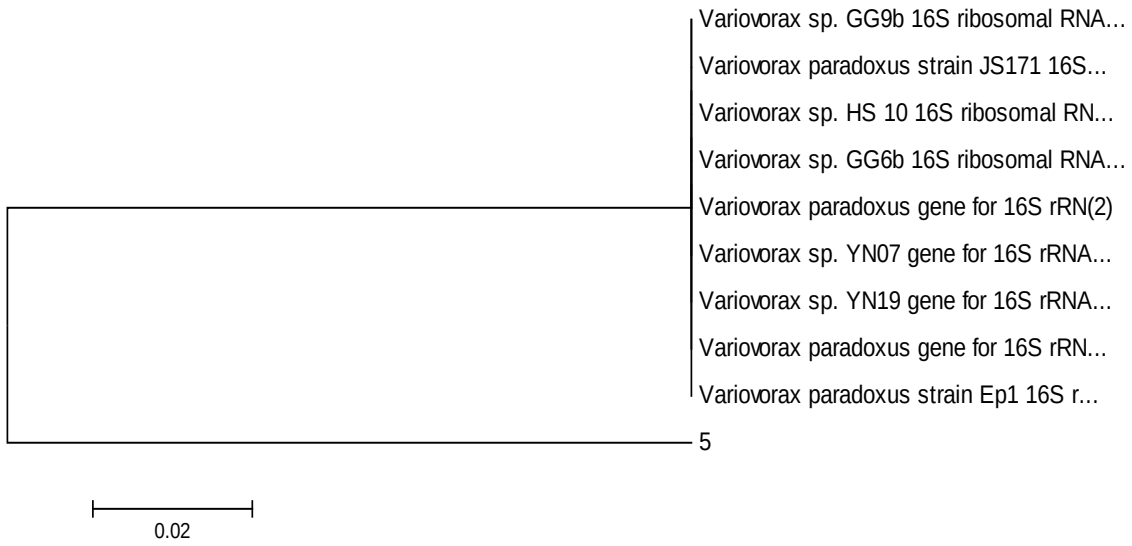

Рисунок 10. Филогенетическое положение доминирующего штамма бактерии в прокариотном комплексе ризосферы пшеницы.

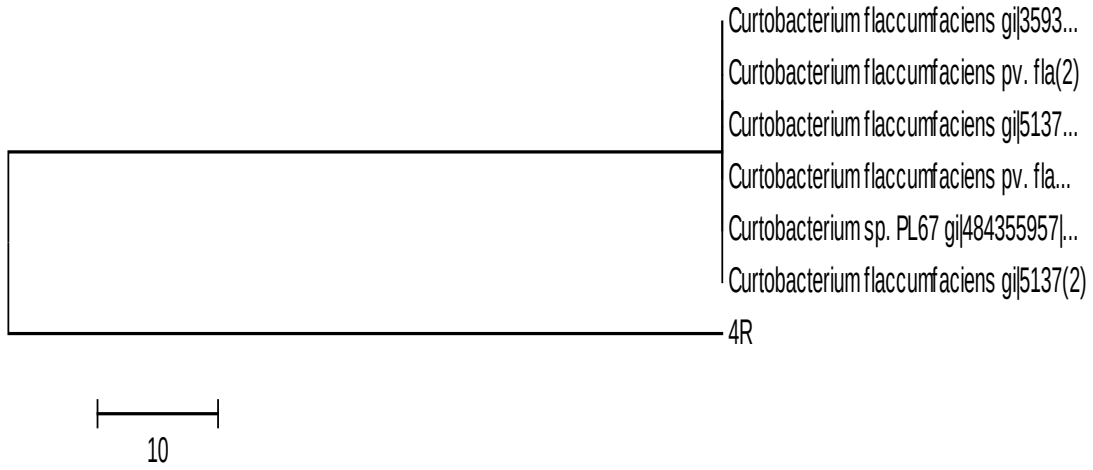

Рисунок 11.Филогенетическое положение доминирующего штамма бактерии в прокариотном комплексе филлосферы ячменя.

Было установлено, что антибиотическая активность культур обусловлена образованием ими антибиотиков феназиновой природы. Выделение антибиотиков этого типа оказалось свойственным как грамположительным, так и грамотрицательным бактериям, представленных разными таксонами (табл. 4). В большинстве случаев для приведённых в табл. № видов бактерий характерно образование как феназина, так и феназин-1-карбоновой кислоты. Представители видов *Pseudomonas*

frederiksbergensis и *Pseudomonas brassicacearum* выделяли только феназин-1-карбоновую кислоту.

Таблица 4. Наличие антибиотиков феназиновой природы у исследуемых штаммов бактерий.

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

Бактериолитическая активность исследуемых штаммов была определена по их возможности лизировать автоклавированые клетки *S. aureus* 209P. Из 16 проверяемых штаммов, пять проявили литическую активность.

Таблица 5. Общая литическая активность бактерий по отношению к штамму *Staphylococcus aureus.*

№ штамма	Вид бактерии	Литическая активность, ЛЕ/мл
2	*Arthrobacter chlorophenolicus*	19,2
3	*Bacillus atrophaeus*	8,7
9	*Pseudomonas brassicacearum*	5,29
15	*Stenotrophomonas rhizophila*	2,69
5	*Bacillus simplex*	0,6

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

Таким образом, благодаря образованию эпифитными и сапротрофными бактериями агроценозов антибиотиков против фитопатогенных бактерий и проявлению ими бактериолитической активности, бактериальные сообщества исследуемых агроценозов способны защищать растения от болезней и поддерживать экологическое равновесие агроэкосистем.

Выводы

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

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

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

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

5. Из исследованной коллекции бактерий 25 % штаммов проявили антагонистическую активность к бактериальным фитопатогенам. Идентифицированы антибиотики, продуцируемые штаммами-антагонистами. Это феназин и феназин-1-карбоновая кислота.

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

РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Добровольская Т.Г., Леонтьевская Е.А., Балабко П.Н. Влияние нарушения режимов землепользования на состав бактериальных сообществ пойменных почв под овощными культурами// Материалы V Всероссийского съезда общества почвоведов. 2008. С. 104

2. Добровольская Т.Г., Балабко П.Н., Леонтьевская Е.А., Снег А.А. Состав бактериальных сообществ аллювиальных почв и растений долины р. Оки в условиях интенсивного землепользования// Труды V международной научно-практической конференции «Экология речных бассейнов» 2009. С. 114-117.

3. Добровольская Т.Г., Балабко П.Н., Леонтьевская Е.А., Снег А.А., Особенности структуры бактериальных сообществ в пойменных агроценозах// **Почвоведение.** 2010. №4. С. 477-481.

4. Добровольская Т.Г., Леонтьевская Е.А. Особенности структуры бактериальных сообществ в пойменных агроценозх// Материалы VI московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 2011. С. 173-174.

5. Добровольская Т.Г., Балабко П.Н., Леонтьевская Е.А., Хуснетдинова К.А. Таксономический состав и антибиотические свойства бактерий в надземном и подземном ярусах агроценоза// **Проблемы агрохимии и экологии**. 2012. №4. С. 42-45

6. Леонтьевская Е.А., Хуснетдинова К.А. Влияние органических удобрений на численность и структуру бактериальных сообществ картофеля// Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012».

7. Добровольская Т.Г., Леонтьевская Е.А., Хуснетдинова К.А. Состав бактериальных сообществ в пойменном агроценозе: культурные и сорные

растения, почва// Материалы международной научной конференции «Дни Науки». 2012. Т. 28. С. 35-37.

8. Добровольская Т.Г., Леонтьевская Е.А., Хуснетдинова К.А. Бактериальные сообщества растений и почвы картофельного поля// Материалы докладов VI Съезда общества почвоведов им. В.В. Докучаева. 2012. Книга 2. С. 373-374.

9. Добровольская Т.Г., Леонтьевская Е.А., Хуснетдинова К.А. Численность и структура бактериальных сообществ картофеля под влиянием органических удобрений// Современные проблемы загрязнения окружающей среды и пути их решения. М.: 2012. С.16

10. Добровольская Т.Г., Леонтьевская Е.А., Хуснетдинова К.А., Балабко П.Н. Влияние гуминовых удобрений на численность и структуру бактериальных комплекса картофельного поля// **Вестник МГУ**. 2013. Серия 17, № 3. С. 47-50.

11. Добровольская Т.Г., Леонтьевская Е.А., Балабко П.Н., Снег А.А. Опыт микробиологической индикации бактериальных сообществ в пойменных агроценозах// Биодиагностика в биологической оценке почв и сопредельных сред. 2013. С. 125.