

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

ЩЕРБАКОВ
Андрей Васильевич

**ЭНДОФИТНЫЕ СООБЩЕСТВА СФАГНОВЫХ МХОВ КАК ИСТОЧНИК
БАКТЕРИЙ – ЭФФЕКТИВНЫХ АССОЦИАНТОВ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР**

03.02.03 - Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург - 2014

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийском научно-исследовательском институте сельскохозяйственной микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии)

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Чеботарь Владимир Кузьмич (ГНУ ВНИИСХМ
Россельхозакадемии)

Официальные оппоненты:

д.б.н., проф., зав. кафедрой микробиологии
Сопрунова О.Б. (Астраханский ГТУ, г. Астрахань)

к.б.н., с.н.с лаборатории гидробиологии
Капустина Л.Л. (Институт озераведения РАН, г. Санкт-Петербург)

Ведущая организация: Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (ГНУ ВИЗР)

Защита состоится «__» _____ 2014 г. в __ часов на заседании диссертационного совета ДМ212.232.07 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, Биолого-почвенный факультет, аудитория

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. М. Горького Санкт-Петербургского государственного университета.

Автореферат разослан «__» _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Е.И.Шарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. К настоящему времени в литературе накоплен достаточно обширный материал о бактериях, ассоциированных с высшими растениями и способных стимулировать их рост и развитие за счет синтеза необходимых для растения фитогормонов и витаминов, фиксации молекулярного азота, а также подавлять развитие бактериальных и грибных заболеваний. Клеппером с соавт. (Kloepper et al., 1980) для обозначения такой группы бактерий был предложен термин PGPR (от англ. plant growth-promoting rhizobacteria), который включает почвенные микроорганизмы, активно колонизирующие ризосферу и ризоплану растений и стимулирующие их рост. Однако, в последнее время появилось большое число работ, касающихся эндофитных бактерий (Stepniewska, Kuźniar, 2013; Nair, Padmavathy, 2014; Brader et al., 2014). В данной работе мы придерживались именно классического определения термина «эндофитные бактерии», который включает в себя микроорганизмы, населяющие внутренние ткани здоровых растений, не вызывающие морфологические изменения и не несущие какого либо вреда для хозяина (Holliday, 1989; Schulz, 2006). Эндофитные бактерии были обнаружены внутри тканей и семян важнейших сельскохозяйственных культур, таких как рис (Baldani et al., 2000; Okunishi et al., 2005), кукуруза (McInroy et al., 1995; Rijavec et al., 2007), хлопок (Misaghi, Donndelinger, 1990), картофель (Sturz et al., 1998; Krechel et al., 2002), сахарный тростник (Rennie et al., 1982), пшеница (Чеботарь с соавт., 2010; Щербakov с соавт., 2013) и др. Есть предположение, что поддержание эндофитных сообществ микроорганизмов является универсальным свойством всех растений (Hallmann et al., 1997).

Однако, сведения о бактериях, стимулирующих рост и развитие растений, и ассоциированных со сфагновыми мхами, отсутствовали в литературе до настоящего времени. Специфическое строение внутренних тканей сфагновых мхов, представляющее из себя сочетание живых хлорофиллоносных и мертвых гиалиновых клеток, позволяет применить термин «эндофит» для представителей микробных сообществ, локализованных внутри этих растений.

Ранее, в работах австрийских исследователей группы проф. Берг (Opelt, Berg, 2004; Opelt et al., 2007; Bragina et al., 2012) было показано, что зеленые части растений сфагнома являются особыми местообитаниями для бактерий, которые, предположительно, играют важную роль как в жизни сфагнов, так и в функционировании болотных экосистем в целом. Проведенный молекулярный анализ микробных сообществ, ассоциированных со сфагновыми мхами, показал, что до 97% всех клонированных последовательностей генов 16S рРНК могли принадлежать некультивируемым формам микроорганизмов. Таксономическое положение и соотношение наиболее многочисленных групп микроорганизмов варьировали в зависимости от вида мха. Исследования были сфокусированы на азотфиксирующих бактериях, которые играли ключевую роль в условиях дефицита элементов минерального питания для растений-хозяев.

Какова же роль эндофитных бактерий, ассоциированных со сфагновыми мхами, в функционировании растений и формировании болотных экосистем? Одной из научных гипотез данной работы стало предположение о том, что уникальная антимикробная активность сфагнов и их экстрактов (Буркина с соавт., 2000; Белоусов с соавт., 2008) связана именно с деятельностью эндофитных бактерий, населяющих их ткани. Кроме того, эндофитные бактерии, населяющие ткани сфагновых мхов, и относящиеся к группе стимуляторов роста растений, возможно, продуцируют метаболиты, оказывающие регуляторное влияние на

рост и развитие сфагновых мхов. Аналогичный тип симбиоза был продемонстрирован для метан-окисляющих микроорганизмов, колонизирующих внешний кортекс стеблей *Sphagnum cuspidatum* Hoffm. (Raghoebarsing et al., 2005) и снабжающих растение углеродом, полученным при ассимиляции метана, а также для азотфиксирующих цианобактерий (Solheim and Zielke, 2003), поставляющих для растений азот.

В настоящее время ассоциации растений с полезными микроорганизмами привлекают внимание ученых с точки зрения не только изучения фундаментальных основ взаимодействия различных организмов, но и возможного использования данных взаимодействий в практике экологически ориентированного адаптивного растениеводства. Современное высокоэффективное сельское хозяйство невозможно без применения удобрений и средств защиты растений, а использование микробиологических препаратов и удобрений является одной из современных тенденций сельскохозяйственного производства.

Использование биологического потенциала микроорганизмов, населяющих корни и внутренние ткани бобовых и небобовых растений, позволяет создавать такие высокоэффективные микробные препараты и удобрения (Schippers, 1995; Тихонович с соавт., 2005; Чеботарь с соавт., 2007). В последнее время, в мировой практике разработан ряд микробиологических препаратов, основу которых составляют полезные штаммы эндофитных и ризобактерий из родов *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter* (Graner et al., 2003; Compant et al., 2005; Chebotar et al., 2009). Было показано, что инокуляция небобовых растений ризобактериями способна значительно увеличить продуктивность растений и качество с/х продукции (Okon, Labandera-Gonzalez, 1994). В некоторых случаях применение микробиологических препаратов позволяло защитить растения от болезней, заменяя таким образом, химические пестициды (Weller, 1988; Chebotar et al., 2009). Разработка микробных препаратов и удобрений на основе эндофитных бактерий к настоящему времени является одним из основных направлений развития с/х микробиологии.

Цель и задачи исследований. Цель настоящей работы – изучение пространственной локализации и выделение эндофитных бактерий растений сфагновых мхов различного видового состава и разных мест обитания, изучение таксономического состава бактериальных популяций, их фенотипических свойств, а также отбор перспективных штаммов с комплексом хозяйственно-ценных свойств для дальнейшего создания на их основе высокоэффективных микробиологических препаратов для растениеводства.

В соответствии с намеченной целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучение пространственной локализации эндофитных бактерий внутри растений мхов двух видов - *Sphagnum fallax* (H. Klinggr.) H. Klinggr. и *S. magellanicum* Brid из различных географических регионов (Австрийские Альпы, Ленинградская область, Западная Сибирь).

2. Выделение эндофитных бактерий из растений мхов, изучение таксономического состава эндофитных бактериальных популяций, их культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств.

3. Отбор перспективных штаммов, обладающих хозяйственно-ценными свойствами: фунгицидной, бактерицидной, ростстимулирующей, ферментативной активностью.

4. Выявление способности перспективных штаммов бактерий активно колонизировать сельскохозяйственные культуры и оказывать положительное влияние на их рост и развитие путем стимуляции роста, фиторпротекторных и других механизмов.

5. Нарботка лабораторных образцов микробиологических препаратов на основе перспективных штаммов и их апробация в вегетационных и полевых экспериментах.

Научная новизна. Впервые (в России) проведены исследования микроорганизмов, ассоциированных со сфагновыми мхами, из различных, удаленных географически регионов. Впервые в России, создана коллекция эндофитных бактерий-ассоциантов сфагновых мхов, изучены их культурально-морфологические, физиолого-биохимические и хозяйственно-ценные свойства. Впервые в мире, показано, что более 50% выделяемых эндофитных бактерий, населяющих ткани сфагновых мхов, имеют выраженные антагонистические свойства против широкого спектра фитопатогенных микроорганизмов, что, предположительно, и обеспечивает уникальные свойства сфагновых мхов противостоять развитию бактериальных и грибных заболеваний. Впервые в России проведена молекулярно-генетическая идентификация штаммов широкого географического происхождения. Показано, что доминирующими среди всех изучаемых бактериальных популяций являлись представители родов *Pseudomonas*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Collimonas*, *Stenotrophomonas*. Установлено, что одни и те же виды сфагнов, отобранные в различных географических регионах, являются местобитаниями для представителей одних и тех же таксономических групп. Впервые в мире показано, что эндофитные бактерии, выделенные из тканей сфагновых мхов, способны активно взаимодействовать с культивируемыми в сельском хозяйстве растениями и оказывать положительное влияние на их рост и развитие. Впервые в мире, созданы эффективные лабораторные образцы микробиологических препаратов на основе эндофитных бактерий, выделенных из сфагновых мхов.

Практическая значимость работы. Создана коллекция штаммов эндофитных микроорганизмов, характеризующихся наличием важных, хозяйственно-ценных свойств, таких как антагонизм по отношению к фитопатогенным грибам и бактериям, ростстимуляция, способность к мобилизации малодоступных для растения соединений фосфора, ферментативная активность и др. Наиболее перспективные штаммы депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов сельскохозяйственного назначения. Апробирована технология получения и применения лабораторных образцов микробных препаратов на основе эндофитных бактерий сфагновых мхов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Внутри тканей сфагновых мхов локализуются эндофитные бактериальные сообщества.
2. В компонентном составе гетеротрофных бактериальных сообществ сфагновых мхов различного географического происхождения преобладают представители родов *Pseudomonas*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Collimonas*, *Stenotrophomonas*.
3. Культивируемые гетеротрофные бактерии сфагновых мхов обладают комплексом свойств, которые играют важную роль не только в жизни растения-хозяина, но и могут быть использованы в практических целях.
4. Штаммы бактерий, выделенные из тканей сфагновых мхов, способны активно взаимодействовать с высшими растениями сельскохозяйственного значения и оказывать положительное влияние на их рост и развитие.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы и результаты исследований докладывались на: Всероссийской научной конференции «Ориентированные фундаментальные исследования и их реализация в агропромышленном комплексе России» (14-15 апреля 2010 г., г. Москва, Россия); 14-ой Пушкинской международной школе-конференции молодых ученых (19-23 апреля 2010 года, г. Пушкино, Россия); международной конференции «Biological control of fungal and bacterial plant pathogens» (7-10 июня 2010, г. Грац, Австрия); международной научно-практической школе молодых ученых и минисимпозиуме «Adaptation to Climate Change in the Baltic Sea Region: Contributions from Plant and Microbial Biotechnology» (12-17 июля 2010, г. Миккели, Финляндия); международной бриологической конференции, посвященной 110-летию со дня рождения З.Н. Смирновой и К.И. Ладъженской «Бриология: традиции и современность» (2010, г. С.Петербург, Россия); 4-ой международной конференции «Environmental, Industrial and Applied Microbiology» (14-16 сентября 2011, г. Торремолинос, Испания); международной конференции «Current aspects of european endophyte research» (28-30 марта 2012, г. Реймс, Франция); 16-ой Пушкинской международной школе-конференции молодых ученых, (16-21 апреля 2012, г. Пушкино, Россия); 7-ой конференции «Перспективы использования новых форм удобрений, средств защиты и регуляторов роста растений в агротехнологиях сельскохозяйственных культур» (2012, г. Анапа, Россия); международной бриологической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Р.Н. Шиликова (24-26 июня 2012 г., г. Апатиты, Россия); международной конференции «Endophytes: from discovery to application» (14-16 ноября 2012 г, г. Сан-Мишель, Италия).

Работа выполнена в рамках Российско-Австрийского проекта при финансовой поддержке гранта РФФИ № 09-04-91007_АНФ

Личный вклад соискателя. Представленные экспериментальные и теоретические результаты получены лично автором. Соискатель принимал непосредственное участие в постановке всех задач исследования, подготовке и проведении экспедиций и экспериментов, вегетационных опытов и полевых исследований, обработке и обсуждении полученных результатов, подготовке публикаций. Идентификация образцов сфагновых мхов выполнялась совместно со специалистами в области ботаники Бергом К. (Ботанический институт, Карл-Франсес университет, Грац, Австрия), Кузьминой Е.Ю. (Ботанический институт им. Комарова РАН, С.Петербург, Россия), Лапшиной Е.Д. (Югорский государственный университет, Ханты-Мансийск, Россия). Методики FISH и CSLM были освоены под руководством и при непосредственном участии Брагиной А.В. и Кардинале М. (Институт природоведческой биотехнологии, Технологический университет, Грац, Австрия), а также сотрудников лаборатории молекулярной и клеточной биологии ГНУ ВНИИСХМ. Определение концентрации ауксинов в культуральной жидкости выполнено при участии к.б.н. Шапошникова А.Н. (ГНУ ВНИИСХМ). Часть работ выполнена с использованием оборудования ЦКП "Геномные технологии и клеточная биология" ГНУ ВНИИСХМ.

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 30 работ, в том числе: 9 - в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, из них 3 статьи в ведущих иностранных журналах, 1 глава в книге, получен 1 патент.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, изложения результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, состоящего

из 400 источников (из них – 376 иностранных) и приложений. Материалы диссертации изложены на 179 страницах машинописного текста, иллюстрированы 44 таблицами и 31 рисунком.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Представлены сведения об экологической роли, распространённости, видовом составе микроорганизмов болотных экосистем. Обобщены результаты исследований микроорганизмов, ассоциированных с растениями рода *Sphagnum*.

Рассмотрены материалы о полезных растительно-микробных системах в сельскохозяйственной биотехнологии.

Изложены результаты и перспективы практического использования эндофитных бактерий.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Сбор образцов сфагновых мхов. В представленной диссертационной работе эндофитные бактерии выделяли из гаметофитов сфагновых мхов двух видов: *Sphagnum fallax* (H. Klinggr.) H. Klinggr. и *S. magellanicum* Brid. Образцы сфагновых мхов отбирали в ходе экспедиций на территории трех географически удаленных регионов (табл.1): Австрийских Альп, Ленинградской области, Западной Сибири (Ханты-Мансийский автономный округ).

Таблица 1. География отбора образцов сфагновых мхов в 2009-2012 гг.

Регион отбора	Точка отбора	Географические координаты	Дата отбора
Австрийские Альпы	“Rootmoos” (Австрия, федеративная земля Штирия)	N 47°41' E 15°09'	02.09.2009
	“Waasenmoos” (Австрия, федеративная земля Зальцбург)	N 47°18' E 12°24'	03.09.2009
	“Pürgschachen” Моог (Австрия, федеративная земля Штирия)	N 47°34' E 14°20'	04.09.2009
Ленинградская область	Урочище «Полесье» (Россия, Ленинградская область, Выборгский р-н)	N 60°44' E 29°04'	19.07.2010
	Озеро Волярви (Россия, Ленинградская область, Всеволожский р-н)	N 60°18' E 30°48'	03.10.2009
	Урочище «Кордон Кирпичный» (Россия, Ленинградская область, Гатчинский р-н)	N 59°16' E 29°54'	06.10.2011
Западная Сибирь	Болото «Чистое» у п. Шапша (Россия, Ханты-Мансийский АО)	N 61°03' E 69°27'	30.08.2012
	Болото «Мухрино» (Россия, Ханты-Мансийский АО)	N 60°53' E 68°41'	31.08.2012
	Болото «Кукушкино» у 45 км трассы Ханты-Мансийск – Нефтеюганск (Россия, Ханты-Мансийский АО)	N 60°57' E 69°41'	01.09.2012

Идентификация видов сфагновых мхов проводилась в полевых условиях по анатомо-морфологическим признакам в соответствии с определителем сфагновых мхов (Ignatov et al., 2006). В указанных болотных экосистемах образцы мха каждого

вида отбирали в четырех точках, удаленных друг от друга на расстоянии 50-100 м. При отборе пучок из 50-100 растений извлекали вручную с помощью стерильных перчаток из растительного массива, помещали в стерильный пластиковый пакет, который в тот же день в охлажденном виде доставляли в лабораторию для дальнейших исследований. Для каждой точки отмечали географические координаты, описывали характер окружающей растительности, температуру и pH воды.

2.2. Пространственная локализация бактерий, ассоциированных со сфагновыми мхами, при помощи флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и конфокальной сканирующей лазерной микроскопии (CSLM). Растительный материал (гаметофиты растений) отмывали от частиц посторонних включений и растительных остатков стерильным буфером PBS, разрезали в асептических условиях на секции размером 1,5-2,0 см и фиксировали в течение 18 ч при температуре +4°C. Флуоресцентную *in situ* гибридизацию проводили по описанной ранее методике (Cardinale et al., 2011; Щербаков с соавт., 2013) с использованием следующих универсальных и групп-специфических олигонуклеотидных проб: эквимоллярную смесь олигонуклеотидных проб EUB338, EUBП338, EUBШ338 (Amann et al., 1990; Daims et al., 1999) - универсальную пробу для всех эубактерий, маркированную флуорохромом Cy3; BET42a и GAM42a – специфические пробы для представителей классов *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria* (Manz et al., 1992), маркированные флуорохромами Cy-5 и 6FAM, соответственно. Конфокальную сканирующую лазерную микроскопию выполняли с использованием микроскопа Leica TCS SPE (Leica Microsystems, Германия). Для детекции олигонуклеотидных проб, меченных флуорохромами 6FAM, Cy3 и Cy5, использовали лазеры с длиной волны 488, 532 и 635 нм. Флуоресценцию регистрировали в диапазоне 508-566 нм, 665-607 нм и 657-709 нм соответственно. Трехмерную реконструкцию изображений выполняли с использованием программы Imaris 7.0 (Bitplane, Швейцария).

2.3. Выделение эндофитных бактерий и создание коллекции штаммов с хозяйственно-ценными свойствами. Для выделения изолятов эндофитных бактерий использовали следующую методику. Свежие гаметофиты сфагнума в количестве 5-10 штук общей массой 5 г промывали в стерильном физиологическом растворе для удаления частиц посторонних включений и растительных остатков. Затем образцы выдерживали 5 мин в 10% растворе перекиси водорода. Образцы трехкратно отмывали от перекиси в стерильном физиологическом растворе и помещали в стерильные керамические ступки. Для контроля качества поверхностной стерилизации физраствор из последней серии высевали на поверхность питательного агара (ПА). К растительному материалу добавляли 10 мл стерильного физраствора и растирали пестиком до получения однородной кашеобразной массы. Полученную массу методом последовательных серийных разведений высевали на поверхность твердой агаризованной среды R2A с pH=5,7 (табл. 2.6). Посевы инкубировали в течение 5 суток при 20°C, после инкубации подсчитывали общее число выросших колоний, бактерии из морфологически различных колоний методом истощающего посева отсеивали на новые чашки Петри, проверяли чистоту культур, описывали культурально-морфологические свойства. Для хранения культуры пересевали в пробирки со скошенной агаризованной средой R2A, а также замораживали при -80°C в 20% растворе глицерина.

Для молекулярно-генетической идентификации доминантных изолятов бактерий из полученных чистых культур, ДНК выделяли с помощью стандартного метода (лизис лизоцимом и SDS, и последующей фенол-хлороформовой экстракцией). Ам-

плификацию фрагментов гена 16S рРНК проводили с использованием праймеров BD1/FD1 (Коростик с соавт., 2006), амплифицированные фрагменты после очистки из геля секвенировали согласно протоколу фирмы Beckman Coulter (США) для 8-и канального секвенатора SEQ8000 с коммерческим набором «SEQ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) with Quick Start Kit». Видовую принадлежность изолятов определяли с помощью программы BLAST GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

В качестве тест-культур при изучении фунгицидных свойств выделенных изолятов использовали штаммы фитопатогенных и токсигенных грибов: *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium sporotrichioides* (штаммы из коллекции ВИЗР, предоставлены к.б.н. Т. Ю. Гагкаевой), *Alternaria alternata*, *Pythium ultimum* (из коллекции ГНУ ВНИИСХМ). Культуры бактерий-антагонистов наращивали на жидкой среде R2A стационарно при 20°C в течение 3-х суток, фунгицидную активность определяли с помощью метода «колодцев» (Magnusson и Schnurer, 2001) на картофельно-декстрозном агаре (Difco, США).

Бактерицидную активность проверяли на 4-х штаммах фитопатогенных бактерий: *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* 822, *Pseudomonas syringae* 213, *Pseudomonas syringae* 8511, *Clavibacter michiganensis* pv. *sepedonicum* 6028 (штаммы из коллекции ВИЗР, предоставлены к.б.н. А. М. Лазаревым) с помощью метода «агаровых блоков» (Зенова с соавт., 2002) на 2% картофельном агаре.

Для изучения способности штаммов к продукции ауксинов исследуемые изоляты бактерий культивировали 5 суток стационарно при температуре 28°C на жидкой среде R2A с добавлением 2 mM L-триптофана. Качественную реакцию на ИУК и ее производные проводили при помощи реактива Сальковского (Salkowski, 1885; Gordon, Weber, 1951). Количественный анализ ауксинов в экстрактах культуральной жидкости проводили с помощью системы ультрапроизводительной жидкостной хроматографии (УПДЖХ, UPLC) Waters ACQUITY UPLC H-class с флуоресцентным детектором.

Ростстимулирующую активность определяли на проростках кукурузы и редиса по разнице в длине корешков инокулированных и контрольных растений. Способность выделенных изолятов эндофитных бактерий к растворению соединений фосфора проверяли на модифицированной среде Муромцева, в которую вносили 2 г/л ортофосфата Са и фосфоритной муки. Протеазную, амилазную и липазную активности выявляли стандартными методами для оценки ферментативной активности бактерий (Теппер 2004; Нетрусов, 2005). Целлюлазную активность выявляли согласно оригинальной методике (Kasana et al., 2008).

2.4. Изучение колонизационной, ростстимулирующей, биоконтрольной, фосфатмобилизующей активности выделенных штаммов *in planta*. Для выявления способности исследуемых штаммов эндофитных бактерий мхов к активной колонизации высших растений использовали метод инокуляции семян и последующее выращивание растений в стерильных условиях гнотобиотических систем (Simons et al., 1996). Контрольным штаммом для сравнения колонизационных свойств бактерий выбран штамм *Pseudomonas chlororaphis* RR228 из коллекции лаборатории технологии микробных препаратов ГНУВНИИСХМ, уже используемый при производстве лабораторных образцов микробиологических препаратов. Растительными объектами для изучения служили следующие сельскохозяйственные культуры: пшеница *Triticum aestivum* (сорт «Веда», селекции Краснодарского НИИ сельского хозяйства), томаты *Solanum lycopersicum* (сорт «Пер-

сей», агрофирма «Дом семян», Санкт-Петербург) и редис *Raphanus sativus* L. var. *radicula* (сорт «Дуро», агрофирма «Дом семян», Санкт-Петербург).

Для изучения пространственной локализации бактерий на корнях растений томатов применяли метод флуоресцентной *in situ* гибридизации и люминесцентной микроскопии. Для этого, отмывые от песка корешки томатов подготавливали по методике, описанной выше. Гибридизацию проводили с использованием универсальной бактериальной пробы EUB338 (Amann et. al., 1990). Препараты анализировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа (Carl Zeiss, Германия).

В экспериментах по биоконтролю *in planta* использовали модельные растительно-микробные системы. Растительными объектами служили растения пшеницы и томатов. В модельных системах искусственно создавался фитопатогенный фон (нагрузка – 10 мл с титром 10^5 КОЕ/мл): для пшеницы – вносилась культура *Fusarium culmorum*; для томатов – *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

В условиях микровегетационного опыта растения томатов выращивали в сосудах объемом 3 л, в качестве субстрата использовали смесь нестерильного торфогрунта (марка «Терравита», производитель ЗАО «Фарт», Россия) и дерново-подзолистой почвы с опытного поля ГНУ ВНИИСХМ в соотношении 1:1. Растительными объектами для изучения служили следующие сельскохозяйственные культуры: томаты *Solanum lycopersicum* (сорт «Персей», агрофирма «Дом семян», Санкт-Петербург), редис *Raphanus sativus* L. var. *radicula* (сорт «Дуро», агрофирма «Дом семян», Санкт-Петербург). В эксперименте по изучению фосфатмобилизующих свойств, в почвогрунт вносили малорастворимые источники фосфора: ортофосфат Са и фосфоритную муку в количестве 5 г/кг субстрата и тщательно перемешивали.

Изучение влияния целлюлозолитической ассоциации, выделенной из сфагновых мхов, на процессы разложения растительных остатков и баланс гумуса в почве проводили в лабораторном эксперименте Лаборатории микробной экотехнологии ГНУ ВНИИСХМ и микрополевым опыте, заложенном осенью 2011 г. после уборки ячменя на опытном поле ГНУ ВНИИОУ (Отчет об испытаниях, приложение дисс. работы).

2.5. Апробация лабораторных образцов микробиологических препаратов.

Лабораторные образцы микробиологических препаратов апробировали на базе Карабалыкской сельскохозяйственной опытной станции (Республика Казахстан) в 2012 году на масличных культурах: масличный лен, подсолнечник масличный.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Эндобитные бактерии – характерные обитатели гаметофитов растений сфагнума. Современные методы молекулярной биологии и конфокальной сканирующей лазерной микроскопии, позволили изучить локализацию эндобитных бактерий внутри тканей вегетирующих растений сфагнума. Использование методов FISH и CSLM воссоздает также трехмерную модель (рис. 1, 2) структуры внутренних тканей, населенных бактериальными эндобитами.

Благодаря уникальной морфологической структуре вегетативных частей растений сфагнума, которые представляют из себя сочетание живых хлорофиллоносных клеток и мертвых гиалочитов, внутри тканей этих растений формируются специфические микронизы для существования эндобитных бактериальных сообществ. В свете представленных исследований, изменяются и наши представления о функциональных свойствах самих тканей гаметофитов сфагновых мхов. Ранее утверждалось, что бла-

годаря губчатой структуре и наличию крупных пор, функция гиалочитов заключается в запасании воды и последующей ее отдаче растению по мере необходимости. Проведенные исследования последнего десятилетия, в том числе и наши, позволяют с уверенностью сказать, что гиалиновые клетки несут не только водозапасающую функцию, но выполняют роль своего рода микрониз для различных микробных сообществ, обеспечивая функционирование особого, специфического типа симбиотических растительно-бактериальных взаимоотношений.

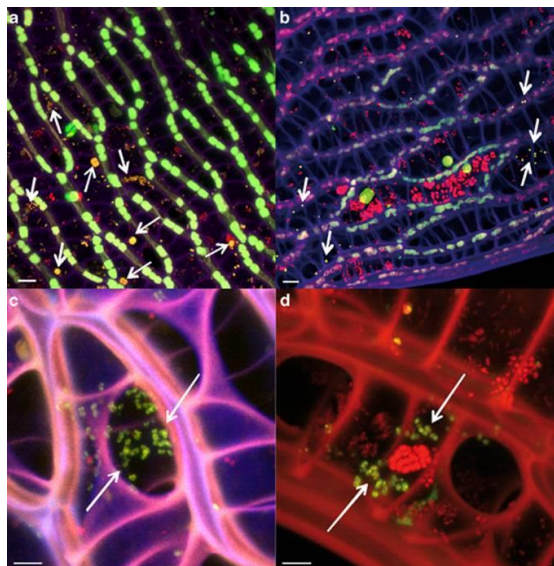


Рисунок 1. Локализация *Alphaproteobacteria* и *Planctomycetes* в гиалочитах сфагнума. Показано внутреннее пространство гиалочитов *S. fallax* (a, b) и *S. magellanicum* (c, d). Гибридизация проводилась с использованием *Alphaproteobacteria*- и *Planctomycetes*-специфических проб. Желтый: *Alphaproteobacteria* (a, c) или *Planctomycetes* (b, d); красный: другие эубактерии. Масштабная линейка: 10 (a, b) и 5 (c, d) мкм. (Bragina A., Berg C., Cardinale M., Shcherbakov A. et al., 2012)

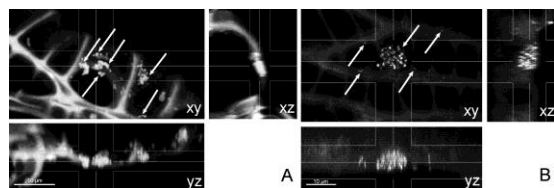


Рисунок 2. Локализация микробиоты в гаметофитах сфагнов. Флуоресцентная *in situ* гибридизация веточных листьев с групп-специфичными (белые стрелки) бактериальными пробами выявила колонизацию внутреннего пространства гиалиновых клеток сфагнов бактериями классов *Betaproteobacteria* (А) и *Gammaproteobacteria* (В). Изображения, полученные при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа, представлены в 3 проекциях. Масштабная линейка - 10 мкм.

Использование универсальных и группспецифичных олигонуклеотидных проб позволило визуализировать представителей *Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria*, *Planctomycetes*, населяющих ткани сфагнов (Рис. 1, 2). Бактериальные микробиоты обнаруживались и на внешней поверхности листьев и стеблей растения сфагнума,

однако наибольшая плотность микробных популяций была локализована именно внутри гиалиновых клеток растений.

Важным моментом, выявленным в ходе исследований, является формирование бактериальными эндофитами микроколоний внутри гиалочитов сфагнома, эндофиты не просто находятся внутри гиалочитов, либо «заплывают» в них с током воды, а именно существуют в тесной взаимосвязи с растением-хозяином, формируя микроколонии активно делящихся клеток.

3.2. Таксономический состав эндофитных бактериальных популяций сфагновых мхов. Молекулярно-генетическая идентификация на основании анализа фрагментов гена 16S рРНК позволила определить таксономический состав выделенных бактериальных популяций.

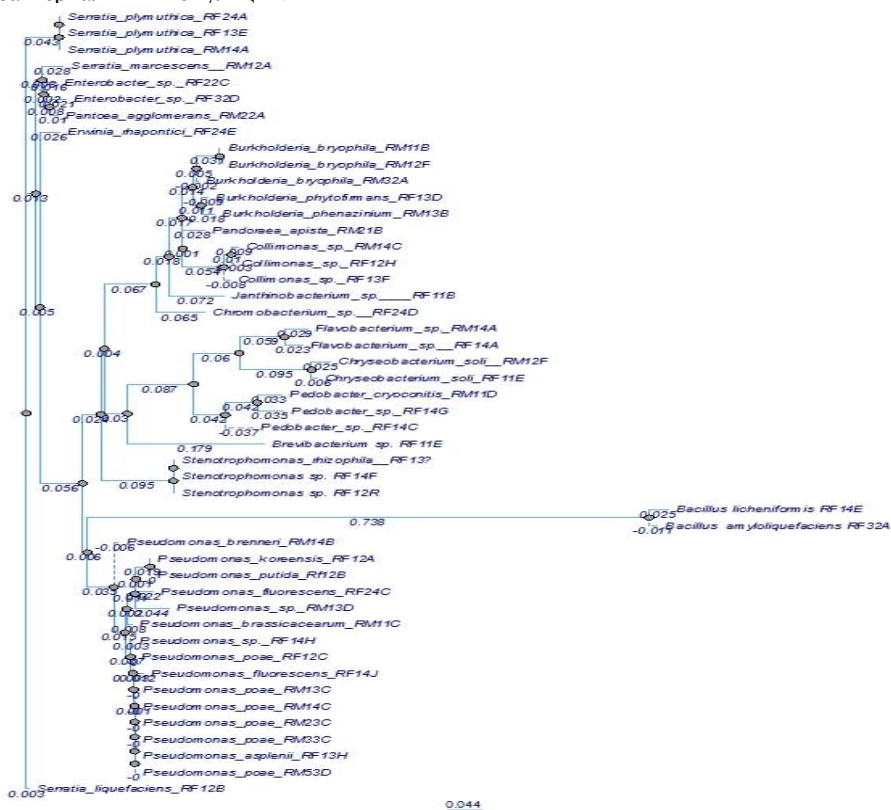


Рисунок 3. Пример видового состава бактериального сообщества эндофитных бактерий *S. fallax* и *S. magellanicum*, отобранных в Ленинградской области (оз. Волоярви, Всеволожский р-н, 2010 г.).

Основу бактериальных популяций, культивируемых, и способных расти на поверхности агаризованных сред, составляют грамотрицательные бактерии (на рис. 3-5 приведен пример состава бактериальных сообществ сфагновых мхов различного гео-

графического происхождения). В видовом составе бактериальных сообществ, ассоциированных со сфагновыми мхами, можно выделить следующие основные таксономические ветви. Класс *Gammaproteobacteria* порядок *Enterobacteriales* включал представителей родов *Serratia*, *Enterobacter* и ряд других. Другой, не менее заметной таксономической ветвью были представители порядка *Burkholderiales*, разделенной на две основные доминанты: семейство *Oxalobacteraceae*, представленное *Collimonas spp.*, и семейство *Burkholderiaceae*, представленное *Burkholderia spp.* Филя *Bacteroidetes* представлена родами *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Chryseobacterium*. К наиболее крупной таксономической ветви следует отнести представителей *Pseudomonadaceae*, численность которых достигает 50% всех выделенных изолятов бактерий. Среди характерных видов *Pseudomonas* следует отметить *P. poae*.

Сравнение таксономического состава природных популяций гетеротрофных бактерий, ассоциированных со сфагновыми мхами, показало наличие общих закономерностей численности различных группировок бактерий (рис. 4, 5). Так одной из общих тенденций являются вариации в численности родов *Pseudomonas* и *Collimonas* для разных видов сфагнового мха. Представители рода *Pseudomonas* составляли наиболее многочисленную группировку эндофитных бактерий *S. magellanicum*, в то время как для *S. fallax* популяция псевдомонад была не столь многочисленна, а более выраженной становится численность представители родов *Collimonas* и *Flavobacterium*.

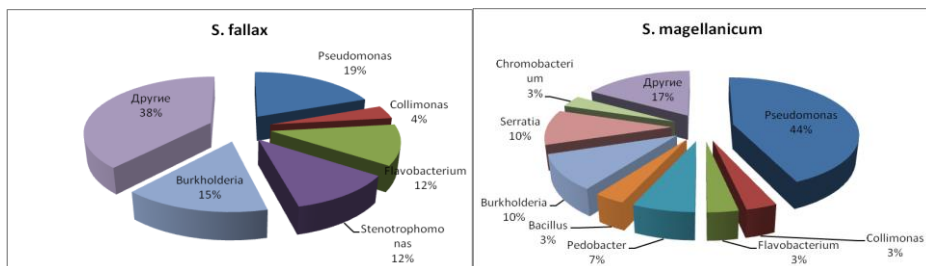


Рисунок 4. Компонентный состав бактериального сообщества эндофитных бактерий *S. fallax* и *S. magellanicum*, отобранных в Ленинградской области (оз. Волоярви, Всеволожский р-н, 2010 г.).

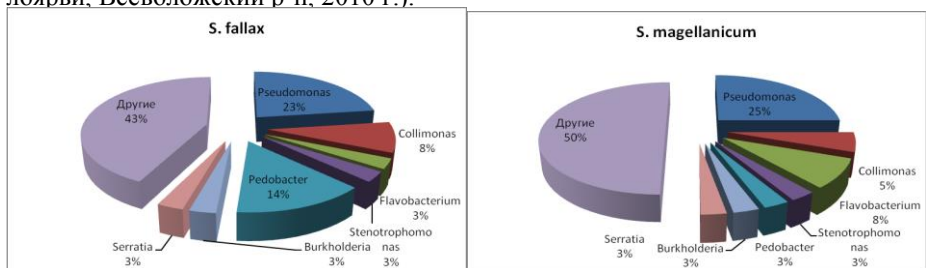


Рисунок 5. Компонентный состав бактериального сообщества эндофитных бактерий *S. fallax* и *S. magellanicum*, отобранных у бол. Чистое (Ханты-Мансийский АО, Зап. Сибирь).

3.3. Культивируемые формы бактериальных эндофитов растений сфагноума – обладатели комплекса хозяйственно-ценных свойств. Всего в ходе работы из тканей сфагновых мхов *S. fallax* и *S. magellanicum*, отобранных на территории Австрийских Альп, Ленинградской области, Западной Сибири, было выделено более 400 изолятов культивируемых форм эндофитных бактерий. Были охарактеризованы их культуральные и морфологические свойства. Большинство выделенных бактерий - грамотрицательные (более 98%), округлые, овальные клетки или короткие палочки, очень мелкие (<1.5 мкм), которые формировали на среде R2A быстрорастущие, либо медленно растущие, плоские и стелющиеся, прозрачные или полупрозрачные колонии, окрашенные иногда довольно ярко, красного, фиолетового, розового, желтого, оранжевого цветов, либо бесцветные, бежевые или мутно-белые. Общая численность микроорганизмов, выделяемых на питательных средах варьировала в диапазоне 10^5 - 10^6 КОЕ/г растительной ткани.

Изучение фунгицидной активности более чем у 400 изолятов эндофитных бактерий, выделенных из тканей сфагновых мхов, позволило установить, что доля штаммов, способных подавлять развитие фитопатогенных грибов, была очень высокой и составляла около 60% от общего числа бактерий (табл.2). Кроме того, установлено, что более 30% всех выделенных штаммов подавляли развитие ряда важнейших бактериальных фитопатогенов, что было в 24-32 раза больше, чем в почвах.

Ряд штаммов, характеризующихся наличием ярко выраженных фунгицидных и бактерицидных свойств, был отобран для дальнейших исследований. Следует отметить, что из 16 исследуемых штаммов 10 (62,5%) проявили положительную качественную реакцию на продукцию ИУК. Сведения о содержании ауксинов в культуральной жидкости исследуемых штаммов представлены в таблице 2. Анализируя представленные результаты можно отметить способность к продукции всеми отобранными штаммами трех основных ауксинов: индоллил-3-молочной кислоты (ИМК), индоллил-3-карбоновой кислоты (ИКК) и индоллил-3-уксусной кислоты (ИУК). Наиболее интенсивно ИУК продуцировалась штаммами *P. aspleni* RF13H (4,1 мкг/мл), *Crysoobacterium sp.* RM12F (5,8 мкг/мл), *Serratia plymuthica* AM24A (5,4 мкг/мл), *P. sp.* RF14D (8,1 мкг/мл), но особенно активным продуцентом ауксинов был штамм *Burkholderia bryophila* AM31A, у которого суммарный уровень продукции составлял 41 мкг/мл, а степень конверсии L-триптофана для данного штамма достигал 69,3%.

Оптимальные температуры роста для данных бактерий находились в пределах 18-28°C, при температуре +37°C рост изучаемых бактерий полностью подавлялся. Отмечено, что некоторые из изучаемых штаммов характеризовались способностью к психрофильному росту при +4°C, что вероятно объясняется приспособленностью к температурным режимам болотных экосистем в регионах, отличающихся пониженными температурами. Оптимумы pH в питательной среде колебались от 5,5 до 7,0, при pH=8,0 рост всех изучаемых штаммов бактерий существенно уменьшался. Шесть перспективных штаммов эндофитных бактерий характеризовались способностью растворять малорастворимые соединения фосфора, такие как ортофосфат кальция и фосфоритная мука. Данные штаммы (в основном представителю р. *Pseudomonas*) в дальнейшем могут быть использованы для улучшения фосфорного питания растений.

Ростстимулирующий эффект исследуемых эндофитных бактерий оценивался на проростках сельскохозяйственных растений. Показано, что при уменьшении титра культуры исследуемых штаммов эндофитных бактерий способны стимулировать развитие растений *in vitro* (табл. 3). Особенно выраженный стимулирующий эффект ока-

зали штаммы RF13H, RF11D, RF14J, AM24A, который проявился в достоверном увеличении длины корешков редиса по сравнению с контрольным вариантом, обработанным стерильной водой (табл.3). Изучение ферментативной активности изучаемых изолятов эндофитных бактерий показало наличие у них активных гидролитических ферментов. В результате отобраны штаммы, наиболее активно выделявшие протеиназы, амилазы, липазы и целлюлазы (табл.2).

Таблица 2. Таксономическая принадлежность, хозяйственно-ценные и физиологические свойства наиболее перспективных штаммов эндофитных бактерий-ассоциантов сфагновых мхов.

Штамм	Функциональная активность (в целом)	Бактерицидная активность (в целом)	Ферментативная активность	Растворение малорастворимых соединений фосфора ($Ca_3(PO_4)_2$)/ фосфоритная мука	Рост на безазотных средах	Уровень продукции ауксинов (на среде с L-триптофаном), мкг/мл	Оптимальная температура, °С	Рост при +37	Рост при +4
<i>Pseudomonas breunneri</i> RM14B	+++	++	P(+), L(+)	+/+	-	0,11	28	-	+
<i>Pseudomonas poae</i> RF11D	++	+++	P(++)	+/+	-	0,04	28	-	-
<i>Pseudomonas asplenii</i> RF13H	+++	++	A(+++), L(+++)	-/-	-	4,11	28	-	+
<i>Serratia plymuthica</i> AF24A	++	++	P(++), A(+), L(++)	-/-	-	5,43	28	-	+
<i>Pseudomonas poae</i> RM13C	+++	+	P(+), A(+)	+/+	-	-	18	-	-
<i>Pseudomonas. sp.</i> RM13D	+++	+	P(++)	+/+	-	0,13	28	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RF14J	++	+	P(++), L(+)	+/+	-	6,23	28	-	+
<i>Flavobacterium sp.</i> RM14A	-	+++	P(++), A(+++), L(++)	-/-	-	-	18	-	+
<i>Flavobacterium sp.</i> RF14A	-	+++	P(+), A(++), L(++), C(++)	-/-	-	-	28	-	-
<i>Burkholderia bryophila</i> AM32A	-	-	A(+)	-/-	+	35,1	28	-	-
<i>Burkholderia phenazinium</i> RM13B	++	-	A(+)	-/-	-	-	28	-	-
<i>Collimonas sp.</i> RM14C	+	++	P(+), L(+)	-/-	+	1,23	18	-	-
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> RF13C	-	-	P(++), A(++)	-/-	-	-	28	-	±
<i>Pseudomonas sp.</i> RF14D	++	-	P(+), A(+)	-/-	-	8,10	28	-	-
<i>Pseudomonas poae</i> RF14H	++	+	-	+/+	-	-	28	-	+
<i>Chryseobacterium soli</i> RM12F	+	-	P(++), A(+++), L(+)	-/-	-	5,82	28	-	-

Примечание. Величина зоны подавления фитопатогена: «-» - отсутствует, «+» - до 5 мм, «++» - 5-15 мм, «+++» - более 15мм; ферментативная активность: «Р» - протеаза, «А» - амилаза, «L» - липаза, «С» - целлюлаза.

Таблица 3. Стимулирующий эффект, оказываемый изучаемыми штаммами бактерий, на сельскохозяйственные растения *in vitro*.

Исследуемый штамм	Стимуляция проростков редиса <i>in vitro</i>	
	Средняя длина корешка, мм	Общая сырая масса проростка, мг
Контроль (без обработки)	13,1	50,5
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 228(контрольный штамм из коллекции ВНИИСХМ)	17,2	51,3
<i>Pseudomonas brenneri</i> RM14B	18,8	55,0
<i>P. poae</i> RF11D	28,5*	59,3
<i>P. asplenii</i> RF13H	31,1*	64,7*
<i>P. fluorescens</i> RF14J	24,8	59,6
<i>Serratia plymuthica</i> AM24A	30,0*	69,4*
<i>Flavobacterium sp.</i> RM14A	13,8	50,1
<i>P. sp.</i> RF14D	23,6	59,6
<i>Collimonas sp.</i> RF14C	22,5	68,4*
НСР ₀₅	12,3	10,5

Примечание. *Различия достоверны на уровне НСР₀₅

3.4. Эндوفитные бактерии сфагновых мхов, как активные колонизаторы ризосферы сельскохозяйственных культур, стимуляторы роста и фитопротекторы.

3.4.1. Приживаемость бактериальных штаммов. Вопрос о способности штаммов эндوفитных бактерий, выделенных из тканей сфагновых мхов, успешно колонизировать ризосферу высших растений, имеющих сельскохозяйственное значение, являлся основной особенностью данных исследований. От решения этой проблемы зависело, насколько эффективны будут штаммы, обладающие повышенным рост-стимулирующим и антагонистическим потенциалом против фитопатогенов, в условиях растительно-микробной системы.

В результате проведенных исследований было показано, что 5 перспективных штаммов эндوفитных бактерий имели высокий колонизационный потенциал (табл. 4). Тестируемые штаммы хорошо приживались и в ризосфере и на корнях пшеницы, а так же на поверхности корней томатов, не уступая, а в ряде вариантов превосходя соответствующие показатели стандартного штамма *P. chlororaphis* RR228. Максимальные значения приживаемости на корнях, как пшеницы, так и томатов были зарегистрированы для штаммов *Serratia plymuthica* AM24A и *Stenotrophomonas rhizophila* RF13C, что превосходило приживаемость стандартного штамма. Численность других штаммов эндوفитных бактерий была высока и сопоставима с показателями колонизационной активности стандартного штамма. Средняя численность всех интродуцированных штаммов эндوفитных бактерий на корнях томатов в несколько раз превосходила этот показатель на корнях пшеницы.

По данным эпилюминесцентной микроскопии, штаммы бактерий *Serratia plymuthica* AM24A, *Flavobacterium saccharophilum* RM14A, *Pseudomonas brenneri* RM14B, *Pseudomonas poae* RF11D, *Collimonas sp.* RM14C активно колонизировали по-

верхность корня томатов (рис. 6), располагаясь в виде микроколоний или биопленок, направленных вдоль оси корня. Было отмечено, что характерной особенностью формирования микроколоний является их локализация в стыках клеток ризодермы.

Таблица 4. Приживаемость типовых штаммов эндофитных бактерий сфагновых мхов на корнях пшеницы и томатов.

Штамм	Количество бактерий, 10 ⁵ КОЕ / растение пшеницы		Количество бактерий, 10 ⁵ КОЕ / растение томатов
	Ризосфера	Корень	
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> RR228 (контрольный штамм из коллекции ВНИИСХМ)	67,0	8,2	19,5
<i>Serratia plymuthica</i> AM24A	72,0	10,2	58,9*
<i>Pseudomonas poae</i> RF11D	56,0	4,6	30,2
<i>Flavobacterium</i> sp. RM14A	50,2	8,0	10,6
<i>P. fluorescens</i> RF13H	102,0*	8,6	4,3
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> RF13C	109,3*	15,5*	123,3*
НСП ₀₅	32,7	5,6	20,3

Примечание. *Различия достоверны на уровне НСП₀₅

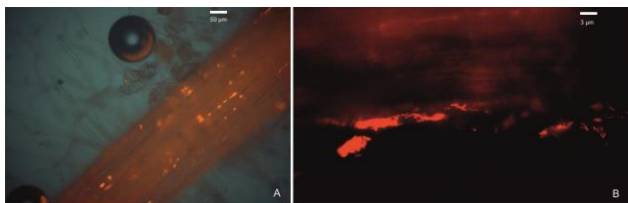


Рисунок 6. Локализация изучаемых штаммов эндофитных бактерий на поверхности корней томатов при помощи флуоресцентной *in situ* гибридизации и эпифлуоресцентной микроскопии. А.

– Общий вид корня томатов, микроколонии бактерий *Pseudomonas poae* RF11D располагаются вдоль корня. Масштабная линейка - 50 мкм. В. - Микроколонии и отдельные клетки *Pseudomonas poae* RF11D на поверхности корня томатов. Масштабная линейка - 3 мкм.

При этом, колонии бактерий были вытянуты вдоль продольной оси корня, залегают довольно глубоко в местах соприкосновения растительных клеток. Единичные клетки бактерий обнаружены на поверхности корневых волосков, при этом их количество было значительно меньше, чем непосредственно на поверхности ризодермы.

3.4.2. Ростстимулирующая активность бактериальных штаммов. Ростстимулирующий эффект двух штаммов бактерий *Serratia plymuthica* AM24A и *Pseudomonas asplenii* RF13H был показан в условиях микровегетационного эксперимента на растениях редиса *Raphanus sativus* L. var. *radicula*. Обработка семян редиса бактериальной суспензией с титром 10⁷ КОЕ/мл оказала положительное влияние на рост и развитие растений, обеспечив прибавку как средней массы корнеплодов, так и зеленой массы. Так, штамм *P. asplenii* RF13H обеспечил прибавку средней сырой массы корнеплодов на 25%, штамм *S. plymuthica* AM24A – на 40% (табл. 5). Результаты

микровегетационного эксперимента на растениях томатов *Solanum lycopersicum* показали стимулирующий эффект исследуемых штаммов эндофитных бактерий, заключающийся в увеличении надземной массы растений (табл. 6). Так, наибольшую эффективность в данном эксперименте продемонстрировали штаммы *Pseudomonas brenneri* RM14B, *P. asplenii* RF13H, *P. fluorescens* RF14J, обеспечившие существенное увеличение надземной массы, превосходящее этот показатель для стандартного штамма *P. chlororaphis* RR228.

Таблица 5. Стимулирующий эффект исследуемых штаммов эндофитных бактерий на растении редиса с. Дуро в условиях микровегетационного опыта.

Вариант	Средняя масса корнеплодов, г	Средняя масса зеленой части, г
Контроль	7,8	24,6
<i>Serratia plymuthica</i> AM24A	10,9 (+40%)*	34,9 (+41%)*
<i>Pseudomonas asplenii</i> RF13H	9,8 (+25%)	29,0 (+17,9%)
НСР ₀₅	2,5	6,3

Примечание. *Различия достоверны на уровне НСР₀₅

Таблица 6. Стимулирующий эффект исследуемых штаммов эндофитных бактерий на растениях томатов с. Персей в условиях микровегетационного опыта.

Штамм	Стимуляция в условиях микровегетационного эксперимента	
	Средний сырой вес растения томатов, г	Средний сухой вес растения томатов, г
Контроль (без обработки)	194,1	20,6
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> RR228 (контрольный штамм из коллекции ВНИИСХМ)	310,7*	24,6
<i>Pseudomonas brenneri</i> RM14B	374,2*	31,1*
<i>Pseudomonas poae</i> RF11D	275,9	23,3
<i>Pseudomonas asplenii</i> RF13H	316,6*	27,8*
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RF14J	321,2*	29,2*
<i>Serratia plymuthica</i> AM24A	229,7	20,7
<i>Flavobacterium sp.</i> RM14A	252,1	21,2
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> RF13C	305,9*	26,2*
<i>Collimonas sp.</i> RF14C	243,3	23,5
НСР ₀₅	96,0	4,7

Примечание. *Различия достоверны на уровне НСР₀₅

3.4.3. Биоконтрольная активность бактериальных штаммов. В микровегетационном эксперименте по биоконтролю корневой гнили пшеницы, вызванной *Fusarium culmorum*, было показано, что инокуляция семян пшеницы бактериями *P. asplenii* RF13H достоверно снижает заболеваемость растений с 90 до 40% (табл. 7).

В условиях микровегетационного опыта тестировалось антагонистическое действие штаммов различного таксономического положения (*Flavobacterium sp.* RM14A, *S. plymuthica* AM24A, *P. asplenii* RF13H), продемонстрировавших наибольшую бактерицидную активность *in vitro* против фитопатогена *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, возбудителя черной пятнистости томатов. Инокуляция семян и последующее опрыскивание 7-и дневных растений бактериальной суспензией штаммов-антагонистов привело к заметному снижению численности растений с симптомами черной пятнистости (табл. 8.). Инокуляция томатов штаммами *S. plymuthica* AM24A и *P. asplenii* RF13H также снижало численность пораженных растений до 11,2 и 15,9 % соответственно.

Таблица 7. Снижение заболеваемости пшеницы корневой гнилью, вызванной *F. culmorum*, при инокуляции бактериями *P. asplenii* RF13H.

Вариант	Средняя длина побега, мм	Средняя длина корня, мм	Всхожесть, %	Количество пораженных растений, %
Контроль	14,27	6,85	98±2,5	50±9,1**
<i>P. asplenii</i> RF13H	14,40	7,04	95±4,0	0
<i>Fusarium culmorum</i>	6,78*	5,91	90±5,5	90±5,5
<i>Fusarium culmorum</i> + <i>P. asplenii</i> RF13H	10,10*	6,60	96±3,6	40±8,9
НСП ₀₅	2,36	1,52		

Примечание. *Различия достоверны на уровне НСП₀₅, **внутрисеменная инфекция.

Таблица 8. Снижение заболеваемости томатов черной пятнистостью при инокуляции изучаемыми штаммами-антагонистами.

Вариант	Количество растений, пораженных черной пятнистостью, %
Контроль (патогенный фон <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>)	24,4±7,8
Обработка семян и опрыскивание бактериальной суспензией <i>P. asplenii</i> RF13H + патогенный фон <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	15,9±6,7
Обработка семян и опрыскивание бактериальной суспензией <i>S. plymuthica</i> AM24A + патогенный фон <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	11,2±5,8
Обработка семян и опрыскивание бактериальной суспензией <i>F. sp.</i> RM14A + патогенный фон <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	9,7±5,4

3.5. Нарботка и апробация лабораторного образца микробиологического препарата на основе эндофитных бактерий сфагновых мхов.

С использованием биореактора «Торнадо» с контролируемыми параметрами культивирования, были отработаны технологические параметры культивирования четырех перспективных штаммов эндофитных бактерий. В качестве оптимальной среды для получения бактериальной суспензии выбрана среда на основе отрубей, режим культивирования составлял 48 ч. Основные параметры культивирования: парциальное давление кислорода в среде - 23,5 кПа, температура 30°C, показатель pH питательной среды -7,0. Средняя численность клеток получаемой бактериальной суспензии составляла – 15x10⁹ КОЕ/мл.

Лабораторные образцы микробиологических препаратов на основе перспективных штаммов эндофитных бактерий были апробированы в независимых полевых испытаниях на базе Карабалыкской сельскохозяйственной опытной станции (Республика Казахстан) в 2012 году на масличных культурах: лен и подсолнечник. В результате проведенных испытаний было показано, что все изучаемые штаммы эндофитных бактерий достоверно увеличили урожай зерна по сравнению с неинокулированным контролем. Однако, максимальная прибавка урожая зерна была получена в варианте со штаммом *Pseudomonas asplenii* RF13H: лен масличный - 1,5 ц/га, подсолнечник масличный - 3,8 ц/га.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что эндофитные бактериальные сообщества локализуются внутри тканей сфагновых мхов *S. fallax* и *S. magellanicum* широкого географического происхождения (Австрийские Альпы, Ленинградская обл., Западная Сибирь), располагаясь одиночно или в виде микроколоний внутри гиалочитов растения-хозяина, часто в виде многокомпонентных ассоциаций, объединяющих представителей *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-протеобактерий, цианобактерий, дрожжей, грибов.
2. Установлено, что доминирующими таксономическими группировками, ассоциированными со сфагновыми мхами различного географического происхождения, являются представители *Pseudomonadaceae*, численность которых составляет до 50% всей гетеротрофной микрофлоры, а также присутствуют субдоминантные компоненты семейств *Flavobacteriaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Burkholderiaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Sphingobacteriaceae* и ряд других.
3. Показано, что сфагновые мхи являются депозитарием биотехнологически ценных бактерий. Из 400 выделенных изолятов -240 штаммов обладали фунгицидной и 120 штаммов бактерицидной активностью против широкого спектра фитопатогенных микроорганизмов, более 100 штаммов были способны продуцировать ИУК и ее производные, что обеспечивало биоконтрольные и ростстимулирующие эффекты в процессе функционирования симбиоза между сфагновыми мхами и эндофитными бактериями, населяющими их ткани.
4. В результате исследований отобрано 10 перспективных штаммов эндофитных бактерий, представителей родов *Pseudomonas*, *Collimonas*, *Flavobacterium*, *Serratia*, обладающих фунгицидной, бактерицидной, ростстимулирующей, фосфат-мобилизующей, ферментативной активностью для создания на их основе высокоэффективных микробиологических препаратов для растениеводства.
5. В модельных экспериментах показано, что отобранные перспективные штаммы эндофитных бактерий способны активно заселять ризосферу и ризоплану сельскохозяйственных культур. Установлено, что интродуцируемые штаммы активно колонизируют поверхность корней растений, располагаясь в виде микроколоний или биопленок, плотно залегая в стыки клеток эпидермиса, направленных вдоль продольной оси. Их численность сопоставима или превосходит численность стандартного штамма, используемого для производства микробиологического препарата, составляя 10^6 - 10^7 КОЕ на 1 мм длины корня.
6. Эффективность перспективных штаммов эндофитных бактерий *Flavobacterium sp.* RM14A, *Pseudomonas brenneri* RM14B, *Pseudomonas asplenii* RF13H составляла 20-50% в вегетационных опытах и 30-43% в полевых опытах.
7. Изучены технологические параметры культивирования четырех перспективных штаммов эндофитных бактерий. В качестве оптимальной среды для получения лабораторных образцов микробиологических препаратов использована среда на основе отрубей, парциальное давление кислорода в среде - 23,5 кПа, температура 30°C, показатель pH питательной среды -7.0, что обеспечивало титр получаемой бактериальной суспензии $1,50 \times 10^{10}$ КОЕ/мл.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Чеботарь В. К., Щербаков А. В., Чижевская Е. П., Петров В. Б. Влияние засоления и тяжелых металлов на ростстимулирующую и антагонистическую

- активность почвенных бактерий и перспективы использования микроорганизмов для биоремедиации почв (аналитический обзор) // Достижения науки и техники АПК. 2011. №7. С. 28-31.
2. Канарская З. А., Канарский А. В., Дулькин Д. А., Семенов Э. И., Чеботарь В. К., **Щербаков А. В.** Биоконверсия сточных вод производства бумаги с получением бактериальных полисахоридных энтеросорбентов микотоксинов // Вестник Казанского Технологического университета. 2012. Т.15. №14. С.186-189.
 3. **Щербаков А. В.**, Брагина А. В., Кузьмина Е. Ю., Берг К., Мунтян А. Н., Макарова Н. М., Мальфанова Н. В., Кардинале М., Берг Г., Чеботарь В. К., Тихонович И. А. Эндофитные бактерии сфагновых мхов как перспективные объекты сельскохозяйственной микробиологии // Микробиология. 2013. Т.82. №3. С.312-322.
 4. **Щербаков А.В.**, Заплаткин А.Н., Чеботарь В.К. Эндофитные бактерии, населяющие семена пшеницы, перспективные продуценты микробных препаратов для сельского хозяйства // Достижения науки и техники АПК. 2013. №7. С.35-38.
 5. Гончар Е.Н., **Щербаков А.В.**, Лопатько К.Г., Гончар Л.Н., Чеботарь В.К., Каленская С.М. Повышение эффективности микробно-растительного симбиоза путем создания композиционных биопрепаратов с использованием наночастиц биогенных металлов // Достижения науки и техники АПК. 2013. №12. С.30-35.
 6. **Щербаков А.В.**, Русакова И.В., Орлова О.В., Воробьев Н.И., Свиридова О.В., Щербакова Е.Н., Чеботарь В.К. Аэробное целлюлозолитическое сообщество ассоциантов сфагнового мха *Sphagnum fallax* как основа в процессах деградации пожнивных остатков // Сельскохозяйственная биология. 2014. №1. С.54-62.

Статьи в ведущих рецензируемых иностранных журналах

7. **Shcherbakov A. V.**, Krikovtseva A. V., Kuzmina E. Yu., Berg C., Malfanova N. V., Cardinale M., Berg G., Chebotar V. K., Tikhonovich I. A. Endophytic and epiphytic bacteria associated with *Sphagnum* mosses as perspective objects for agricultural biotechnology // IOBC/WPRS Bulletin. 2012. V. 78. P. 165-171.
8. Bragina A., Berg C., Cardinale M., **Shcherbakov A.**, Chebotar V., Berg. G. *Sphagnum* mosses harbour highly specific bacterial diversity during their whole lifecycle // The ISME Journal. 2012. V. 6. No. 4. P. 802-813.
9. Malfanova N., Kamilova F., Validov S., **Shcherbakov A.**, Chebotar V., Tikhonovich I., Lugtenberg B. Characterization of *Bacillus subtilis* HC8, a novel plant-beneficial endophytic strain from giant hogweed // Microbial Biotechnology. 2011. V.4. P.523–532.

Глава в книге

Shcherbakov A.V., Kuzmina E.Yu., Lapshina E.D., Bragina A., Berg C., Berg G., Shcherbakova E.N., Chebotar V. K., Tikhonovich I. A.. Endophytic Bacteria Associated with Sphagnum Mosses: Ecological Diversity and Application for Agricultural Microbiology / In book: Moss: Classification, Development and Growth and Functional Role in Ecosystems // N.Y.: Nova Publishers, 2014. – 245 p. - ISBN 978-1-163117-396-7

Патент

№2495119 (зарег. 10 окт. 2013 г.) «Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 8A в качестве средства повышения продуктивности растений и их защиты от фитопатогенных микроорганизмов» / Чеботарь В.К., Михеева М.А., Чижевская Е.П., **Щербаков А.В.**, Петров В.Б., Быкова Н.В., Орлова Н.А., Темнова О.В.

Публикации в прочих изданиях

1. **Щербаков А. В.** Ферментативная активность аридных почв Астраханской области // Фундаментальные аспекты биологии в решении актуальных экологических проблем: материалы международной научно-практической конференции, - Астрахань, 2008.- 344с
2. **Щербаков А. В.** Ферментативная активность аридных почв Астраханской области // Материалы пятого съезда общества биотехнологов России им. Ю. А. Овчинникова: Москва, 2-4 декабря 2008 г. / Под. Ред. Р. Г. Василова. – М.: ИАЦ, 2008. – 408с.
3. Чеботарь В. К., **Щербаков А. В.**, Фадеева М. А., Мальфанова Н. В., Ерофеев С. В., Чижевская Е. П., Гагкаева Т. Ю., Гаврилова О. П., Филипас А. С., Бондаренко А. М., Тарасов А. Л. Выявление взаимодействия токсигенных грибов и эндофитных бактерий в зерне пшеницы для создания способов борьбы с токсигенными инфекциями и получения высококачественных продуктов питания. // Материалы Всероссийской научной конференции «Ориентированные фундаментальные исследования и их реализация в агропромышленном комплексе России», 14-15 апреля 2010 г. М.:2010. С.35-39.
4. **Щербаков А.В.**, Кузьмина Е. Ю., Мунтян А.Н., Чеботарь В.К. Микроорганизмы-ассоцианты сфагновых мхов как перспективные объекты сельскохозяйственной микробиологии. // 14-ая Пушкинская международная школа-конференция молодых ученых, (Пушино,19-23 апреля 2010 года). Сборник тезисов. Пушино, 2010. Т.1.С.306.
5. **Shcherbakov A.**, Kuzmina E., Chebotar V. Microorganisms associated with Sphagnum mosses as perspective objects for agricultural microbiology. // Materials of conference “Biological control of fungal and bacterial plant pathogens (June 7-10, 2010, Graz, Austria)”. Graz, Austria, 2010. P.79.
6. Fadeeva M., **Shcherbakov A.**, Chebotar V. Study of interaction between toxigenic fungi and endophytic bacteria in the wheat grain for development of the methods for control of toxigenic infections and production of high quality foodstuffs. // Materials of conference “Biological control of fungal and bacterial plant pathogens (June 7-10, 2010, Graz, Austria)”. Graz, Austria, 2010. P.80.
7. **Shcherbakov A.**, Kuzmina E., Chebotar V. Microorganisms associated with Sphagnum mosses as perspective objects for agricultural microbiology. // Materials of PhD course and minisymposium: “Adaptation to Climate Change in the Baltic Sea Region: Contributions from Plant and Microbial Biotechnology”(July 12-17, 2010, Mikkeli, Finland). Helsinki, Finland, 2010. P. 70.
8. **Щербаков А. В.**, Брагина А. В., Кузьмина Е. Ю., Berg С., Malfanova N. V., Cardinale M., Berg G., Чеботарь В. К., Тихонович И. А. Перспективы использования эпито- и эндофитных бактерий-ассоциантов сфагновых мхов в сельскохозяйственной биотехнологии. // Бриология: традиции и современность: сборник статей по материалам международной конференции, посвященной 110-летию со дня рождения З. Н. Смирновой и К. И. Ладъженской. 2010. СПб.: Атташе. С.152-156/

9. **Щербаков А. В.**, Кузьмина Е. Ю., Брагина А. В., Берг К., Берг Г., Чеботарь В. К., Тихонович И. А. Изучение таксономической структуры популяций эндофитных бактерий-ассоциантов сфагновых мхов ленинградской области. // 16-ая Пушкинская международная школа-конференция молодых ученых, (Пушино, 16-21 апреля 2012 года). Сборник тезисов. Пушино, 2010. Т.1. С. 52.
10. **Shcherbakov A. V.**, Makarova N. M., Muntyan A. N., Bragina A. V., Berg G., Chebotar V. K., Tikhonovich I. A. Isolation and study of endophytic bacteria from *Sphagnum fallax* and *S. magellanicum* mosses with high biocontrol activity and PGPR-properties. // 4 international Conference on Environmental, Industrial and Applied microbiology (Torremolinos (Spain), 14-16 September 2011). Book of abstract. 2011. P. 54.
11. **Shcherbakov A. V.**, Zaplatkin A. N., Malfanova N. V., Chizhevskaya E. P., Chebotar V. K. A new strains of endophytic and rhizobacteria for plant protection and growth stimulation under condition of high concentration of sodium chloride and heavy metals. // 4 international Conference on Environmental, Industrial and Applied microbiology (Torremolinos (Spain), 14-16 September 2011). Book of abstract. 2011. P. 5.
12. **Shcherbakov A. V.**, Kuzmina E. Yu., Malfanova N. V., Bragina A. V., Berg C., Berg G., Chebotar V. K., Tikhonovich I. A. Endophytes of *Sphagnum* mosses: resources for development high-effective biofertilizers. // International conference "Current aspects of european endophyte research (Reims (France), 28-30 march 2012)". Book of abstract. 2012. P. 62-63.
13. Chebotar V. K., **Shcherbakov A. V.**, Malfanova N. V., Gagkaeva T. Yu., Gavrilova O. P. Study of interaction between toxigenic fungi and endophytic bacteria in the wheat grain for development of the methods for control of toxigenic infections and production of high quality foodstuffs. // International conference "Current aspects of european endophyte research (Reims (France), 28-30 march 2012)". Book of abstract. 2012. P. 7.
14. **Щербаков А. В.**, Кузьмина Е. Ю., Мальфанова Н. В., Мунтян А. Н., Брагина А. В., Берг Г., Чеботарь В. К., Тихонович И. А. Эндофитные бактерии сфагновых мхов: ресурс для создания высокоэффективных биопрепаратов для сельского хозяйства. // Перспективы использования новых форм удобрений, средств защиты и регуляторов роста растений в агротехнологиях сельскохозяйственных культур: Материалы докладов участников 7-ой конференции «Анапа-2012»; Под. Ред. Акад. РАСХН В. Г. Сычева. – М.: ВНИИА. 2012. С. 138-140.
15. Заплаткин А. Н., **Щербаков А. В.**, Мальфанова Н. В., Чеботарь В. К., Чижевская Е. П. Применение новых штаммов эндофитных бактерий для минимизации стресса сельскохозяйственных растений в условиях засоления почв и загрязнения тяжелыми металлами. // Перспективы использования новых форм удобрений, средств защиты и регуляторов роста растений в агротехнологиях сельскохозяйственных культур: Материалы докладов участников 7-ой конференции «Анапа-2012»; Под. Ред. Акад. РАСХН В. Г. Сычева. – М.: ВНИИА. 2012. С. 61-62.
16. **Shcherbakov A. V.**, Kuzmina E. Yu., Bragina A. V., Muntian A. N., Berg C., Berg G., Chebotar V. K., Tikhonovich I. A. The endophytic bacteria associated with sphagnum mosses as perspective objects for agricultural microbiology. // International bryological conference dedicated to 100 year anniversary of R. N. Schiljakov. Apatity, Murmansk Province, 24-26th June 2012. Book of abstract. 2012. P. 69-71.
17. **Shcherbakov A.**, Kuzmina E., Malfanova N., Bragina A., Berg C., Berg G., Chebotar V. Biodiversity of endophytes from *Sphagnum* mosses collected from bogs in Russia and

- Austria. // International conference “Endophytes: from discovery to application”. (Fondazione Edmund Mach, Italy, 14-16 November 2012). Book of abstract. 2012. P. 52.
18. Chebotar V., Zaplatkin A., **Shcherbakov A.**, Barcheva A., Malfanova N. Microbiological preparation on the basis of of endophytes for bioremediation of polluted and salinated soils. // International conference “Endophytes: from discovery to application”. (Fondazione Edmund Mach, Italy, 14-16 November 2012). Book of abstract. 2012. P. 22.