

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ**

На правах рукописи

ЩЕРБАКОВ

Андрей Васильевич

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

03.02.03 – Микробиология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Чеботарь Владимир Кузьмич

Санкт-Петербург – 2013

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. Микробные сообщества сфагновых болот. Экологическая роль в функционировании болотных экосистем. Полезные растительно-микробные системы в сельскохозяйственной биотехнологии. Основные перспективные направления развития (Обзор литературы)	14
1.1. Микробные сообщества сфагновых болот. Экологическая роль в функционировании болотных экосистем.....	14
1.1.1. Микроорганизмы болотных экосистем, связанные с круговоротом метана.....	15
1.1.1.1. Метаногены.....	15
1.1.1.2. Метанотрофы.....	21
1.1.2. Микробные ассоциации торфяных отложений, микроорганизмы, связанные с деструкцией торфа.....	25
1.1.2.1. Alphaproteobacteria.....	28
1.1.2.2. Acidobacteria.....	29
1.1.2.3. Actinobacteria.....	30
1.1.2.4. Bacteroides.....	30
1.1.3. Микроорганизмы - ассоцианты сфагновых мхов.....	31
1.1.3.1. Метанотрофные и метаногенные ассоцианты сфагновых мхов.....	33
1.1.3.2. Азотфиксирующие ассоцианты сфагновых мхов.....	35
1.1.3.3. Гетеротрофные бактерии, ассоцианты сфагновых мхов.....	38
1.1.3.4. Дрожжи и грибы арбускулярной микоризы - ассоцианты мхов.....	40
1.2. Полезные растительно-микробные системы в сельскохозяйственной биотехнологии. Основные востребованные и перспективные направления развития.....	42
1.2.1. Микроорганизмы, как продуценты биопрепаратов стимулирующего действия.....	43
1.2.1.1. Продукция бактериями регуляторов роста растений.....	45
1.2.1.2. Ризосферные и эндофитные бактерии в основе микробиологических удобрений.....	47
1.2.1.3. Опыт применения и эффективность микробиологических удобрений.....	48
1.2.2. Микроорганизмы, как продуценты биопрепаратов защитного действия.....	49
1.2.2.1. Продукция бактериями сидерафоров, антибиотиков и бактериоцинов.....	50

1.2.2.2. Индуцированная устойчивость.....	52
1.2.3. Фосфатмобилизующие бактерии в основе микробиологических препаратов для растениеводства.....	55
1.2.4. Целлюлозолитические микроорганизмы, как продуценты биопрепаратов для деградации отходов сельскохозяйственного производства.....	60
1.2.4.1. Микробные целлюлазы.....	62
1.2.4.2. Механизмы микробного гидролиза целлюлозы.....	63
1.2.4.3. Распространение целлюлозолитических микроорганизмов в природе и их роль в деградации целлюлозы.....	65
1.2.4.4. Опыт применения биопрепаратов на основе целлюлозолитических микроорганизмов.....	66
1.3. Заключение к обзору литературы.....	68
ГЛАВА 2. Материалы и методы.....	71
2.1. Сбор образцов сфагновых мхов и определение их видовой принадлежности.....	71
2.2. Флуоресцентная <i>in situ</i> гибридизация (FISH) и конфокальная сканирующая лазерная микроскопия (CSLM).....	71
2.3. Выделение бактериальных изолятов эндофитных бактерий	74
2.4. Молекулярно-генетическая идентификация выделенных изолятов.....	75
2.4.1. Выделение бактериальной ДНК.....	75
2.4.2. Амплификация фрагментов гена 16-S рРНК.....	76
2.4.3. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов гена 16-S рРНК.....	77
2.4.4. Секвенирование фрагментов гена 16-S рРНК и определение видовой принадлежности изучаемых изолятов бактерий.....	77
2.5. Изучение культурально-морфологических, хозяйственно-ценных и физиолого-биохимических свойств выделенных изолятов эндофитных бактерий.....	79
2.5.1. Изучение культурально-морфологических свойств.....	79
2.5.2. Изучение фунгицидной активности.....	79
2.5.3. Изучение бактерицидной активности.....	80
2.5.4. Изучение способности изолятов к продукции ИУК и ее производных на среде с L-триптофаном.....	80
2.5.5. Изучение ростстимулирующей активности на проростках редиса	82
2.5.6. Изучение способности изолятов растворять неорганические соединения фосфора.....	82

2.5.7. Изучение ферментативной (протеазной, амилазной, липазной, целлюлазной) активности.....	83
2.5.8. Изучение физиолого-биохимических свойств.....	85
2.6. Изучение <i>in planta</i> колонизационного потенциала, биоконтрольной, ростстимулирующей и целлюлолитической активности перспективных штаммов.....	86
2.6.1. Определение колонизационной активности с помощью метода гнотобиотических систем.....	86
2.6.2. Визуализация интродуцируемых штаммов бактерий с помощью метода флуоресцентной <i>in situ</i> гибридизации (FISH).....	87
2.6.3. Детекция интродуцируемых штаммов бактерий методом полимеразной цепной реакции (PCR).....	87
2.6.4. Изучение биоконтрольной активности штаммов <i>in planta</i>	88
2.6.5. Изучение ростстимулирующей активности штаммов <i>in planta</i>	89
2.6.6. Изучение скорости разложения соломы целлюлозолитической микробной ассоциацией (ЦМА).....	89
2.7. Создание и апробация лабораторных образцов микробиологических препаратов.....	90
2.7.1. Условия культивирования перспективных штаммов.....	90
2.7.2. Создание оптимальной композиции лабораторного образца микробиологического препарата.....	90
2.7.3. Апробация лабораторных образцов микробиологических препаратов в полевых экспериментах	91
ГЛАВА 3. Результаты исследований и обсуждение.....	92
3.1. Характеристика и география отбора образцов сфагновых мхов.....	92
3.2. Эндофитные бактерии – характерные обитатели гаметофитов сфагнума.....	98
3.3. Культивируемые бактериальные эндофиты сфагнума: характеристика состава популяций и перспективные штаммы – обладатели комплекса хозяйственно-ценных свойств.....	103
3.3.1. Культурально-морфологические свойства выделенных изолятов бактерий.....	104
3.3.2. Таксономический состав бактериальных популяций.....	106
3.3.3. Антифунгальные и антибактериальные свойства выделенных изолятов.....	109
3.3.4. Продукция ауксинов и стимуляция проростков кресс-салата.....	111
3.3.5. Растворение малорастворимых неорганических соединений фосфора и ферментативная активность.....	117
3.3.6. Таксономическое положение, культурально-морфологическая и физиолого-биохимическая характеристика наиболее перспективных штаммов.....	118

3.3.7. Заключение к разделу 3.3.....	121
3.4. Эндوفитные бактерии-ассоцианты сфагновых мхов, как активные колонизаторы ризосферы сельскохозяйственных культур и продуценты высокоэффективных биопрепаратов для сельского хозяйства.....	124
3.4.1. Колонизационная активность в экспериментах <i>in planta</i>	124
3.4.2. Ростстимулирующий и биоконтрольный эффекты в экспериментах <i>in planta</i>	129
3.4.3. Целлюлозолитическая микробная ассоциация (ЦМА) и его эффективность.....	133
3.4.4. Заключение к разделу 3.4.....	136
3.5. Создание и апробация лабораторного образца микробиологического препарата на основе эндوفитных бактерий сфагновых мхов.....	137
3.5.1. Технологические режимы культивирования перспективных штаммов-продуцентов....	137
3.5.2. Создание стабильной формы лабораторного образца микробиологического препарата на основе штамма <i>Pseudomonas asplenii</i> RF13H.....	140
3.5.3. Апробация лабораторных образцов микробиологических препаратов.....	143
3.5.4. Заключение к разделу 3.5.....	143
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	144
ВЫВОДЫ	146
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	148
ПРИЛОЖЕНИЕ	174

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ИУК – индолил-3-уксусная кислота

ДГГЭ - денатурирующий градиентный гель-электрофорез

КМЦ - карбоксиметилцеллюлоза

ПА – питательный агар

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ТГГЭ - температурный градиентный гель-электрофорез

ЦМА – целлюлозолитическая микробная ассоциация

CSLM – от англ. «confocal scanning laser microscopy» - конфокальная сканирующая лазерная микроскопия

EDTA – от англ. «ethylenediaminetetraacetic acid» - этилендиаминтетрауксусная кислота

FISH – от англ. «fluorescence in situ hybridization» - флуоресцентная *in situ* гибридизация

HPLC – от англ. «high-performance liquid chromatography» - высокэффективная жидкостная хроматография высокого давления

ISR – от англ. «induced systemic sesistance» - индуцированная системная устойчивость

in planta – лат. «на растении»

in situ – лат. «на месте»

in vitro – лат. «на стекле»

PBS – от англ. «phosphate buffer salina» - натрий-фосфатный буфер

PGPR - от англ. «plant growth promotion rhizobacteria» - ризобактерии, стимулирующие развитие растений

PGPB - от англ. «plant growth promotion bacteria» - бактерии, стимулирующие развитие растений

PNS – от англ. «plant nutrion solution» - питательный раствор для растений

PR - «pathogenesis-related proteins» - белки, связанные с патогенезом

T-RFLP – от англ. «terminal restriction fragment length polymorphism» - терминальный полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

SAR – от англ. «systemic acquired resistance» - системная приобретенная устойчивость

SDS – от англ. «sodium dodecil sulphate» - додецилсульфат натрия

SSCP – от англ. «single-strand conformation polymorphism» - конформационный полиморфизм одноцепочечной ДНК

SSF – от англ. «solid substrate fermentation» - твердосубстратное ферментирование

ВВЕДЕНИЕ

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. Кроме того, имеется достаточно много сведений об эндофитных бактериях. 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; Щербаков с соавт., 2013) и др; считается, что поддержание эндофитных сообществ микроорганизмов является универсальным свойством всех растений.

Однако, сведения о симбиотрофах, относящихся к группе бактерий, 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 сфагнума 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 также были сфокусированы на азотфиксирующих бактериях, которые играли ключевую роль в условиях дефицита элементов минерального питания для растений-хозяев.

Sphagnum – своеобразный и интересный род мохообразных, почти космополитный, распространен от тропиков (в горах) к югу и северу, через умеренные зоны до субантарктической и арктической областей включительно (Савич-Любицкая, Смирнова, 1968), который включает около 400 видов и часто является доминантным компонентом болот (Daniels, Eddy, 1985). Сами сфагновые мхи издревле использовались в медицинских целях в цивилизациях Индии и Майя, во время Первой и Второй мировых войн. Имеется немало сведений народной медицины и практических исследований об использовании сфагновых мхов в качестве эффективного наружного средства для лечения раневых патологий, в особенности для заживления гнойных ран (Савич-Любицкая, 1943; Городкова, 1949; Военно-полевая хирургия..., 2004). Считается, что сами же сфагновые мхи не подвержены бактериальным и грибным заболеваниям, в научной литературе практически отсутствуют сведения о фитопатогенах сфагнов. Однако, условия для развития бактериальных и грибных заболеваний сфагнов более чем предостаточны: повышенная влажность сфагновых болот, повышенная кислотность, низкие температуры. Общепринято, что основным бактерицидным агентом сфагнов является вещество полифенольной природы – сфагнол; долгое время считалось, что именно он отвечает за антибактериальную природу сфагнов, однако эта гипотеза так и не была доказана (Муравьева, 1981) из-за сложности определения химической структуры веществ в его составе.

Какова же роль эндофитных бактерий, ассоциированных со сфагновыми мхами, в формировании этих уникальных свойств растений? Одной из гипотез данной работы стало предположение о том, что уникальная антимикробная активность самих сфагнов связана с деятельностью эндофитных бактерий, населяющих их ткани. Кроме того, гетеротрофные бактерии, населяющие ткани сфагновых мхов, возможно продуцируют метаболиты, оказывающие стимулирующее влияние на рост и развитие сфагнов. 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). Гаметофиты сфагнов обладают уникальной морфологией. У всех видов *Sphagnum* листья состоят из одного слоя чередующихся клеток: узких хлорофилоносных клеток (хлороцитов), осуществляющих фотосинтез, и широких, полых гиалиновых клеток с крупными порами (гиалоцитов), которые выполняют структурную и водозапасающую функцию. Применение методов флуоресцентной *in situ* гибридизации и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, а также последующая трехмерная реконструкция и компьютерный анализ изображений показали, что эндофитные бактерии заселяют гиалиновые клетки листьев мха путем прикрепления к внутренней стороне клеточной стенки растений (Bragina et al., 2012). Возможно, что

гиалиновые клетки сфагнов выполняют роль внутритканевых и внутриклеточных ниш для микроорганизмов и местом продукции и накопления ими антимикробных и ростстимулирующих метаболитов.

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). Колонизация корней растений интродуцируемыми штаммами микроорганизмов является наиболее важным моментом для функционирования высокоэффективных растительно-бактериальных ассоциаций. Успех при нанесении полезных микроорганизмов на семена или проростки растений зависит от колонизационного потенциала интродуцируемых штаммов (Weller, 1988; Shippers et al., 1987). В последнее время в мировой практике разработан ряд биопрепаратов, 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 продукции (Okon, Labandera-Gonzalez, 1994). В некоторых случаях применение биопрепаратов позволяло защитить растения от болезней, заменяя таким образом, химические пестициды (Weller, 1988; Chebotar et al., 2009). Таким образом, разработка микробных препаратов и удобрений на основе эндофитных бактерий является актуальным направлением с/х микробиологии.

В данной диссертационной работе источником для выделения эффективных микроорганизмов послужили растения сфагновых мхов. Приводятся данные о биологическом разнообразии эндофитных бактерий сфагновых мхов широкого географического происхождения, отобранных на территории Австрийских Альп (Австрия), Ленинградской области, Западной Сибири. Описан ряд штаммов, характеризующихся наличием комплекса хозяйственно-ценных свойств, таких как антагонизм по отношению к фитопатогенным грибам и бактериям, стимуляция роста сельскохозяйственных культур, способность к мобилизации труднодоступных для растений соединений фосфора, способность к деградации целлюлозосодержащих отходов с/х производства. Показана способность микроорганизмов,

выделенных из растений сфагновых мхов, активно колонизировать сельскохозяйственные культуры и оказывать благоприятное влияние на их рост и развитие. Разработаны и апробированы лабораторные образцы микробиологических препаратов.

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.

Конкретными **задачами** работы являлись:

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 экспериментов

Научная новизна работы. Впервые проведены исследования микроорганизмов, ассоциированных со сфагновыми мхами, различных, удаленных географических регионов. Впервые создана коллекция эндофитных бактерий-ассоциантов сфагновых мхов, изучены их культурально-морфологические, физиолого-биохимические и хозяйственно-ценные свойства. Впервые показано, что более 50% выделяемых симбиотрофных бактерий, населяющих ткани сфагновых мхов, имеют выраженные антагонистические свойства против ряда фитопатогенов, что, предположительно, обеспечивает уникальные свойства сфагновых мхов противостоять развитию бактериальных и грибных заболеваний. Молекулярно-генетическая идентификация на основании анализа фрагментов гена 16S рРНК, наряду с физиолого-биохимической характеристикой, показала, что доминирующими группами бактерий среди изучаемых сфагнум-ассоциированных микроорганизмов являлись представители родов *Pseudomonas*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Collimonas*, *Stenotrophomonas* и ряд других.

Установлено, что одни и те же виды сфагнов, отобранные в различных географических регионах, являются местообитаниями для представителей одних и тех же таксономических групп. Впервые в мире показано, что эндофитные бактерии, выделенные из тканей сфагновых мхов, способны активно взаимодействовать с растениями сельскохозяйственного значения и оказывать положительное влияние на их рост и развитие. Впервые созданы лабораторные образцы биопрепаратов на основе эндофитных бактерий, выделенных из сфагновых мхов.

Практическая значимость. 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 Пущинской международной школе-конференции молодых ученых (19-23 апреля 2010 года, г. Пущино, 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. Ладыженской «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 Пущинской международной школе-конференции молодых ученых, (16-21 апреля 2012, г. Пущино, Россия); 7-ой конференции «Перспективы использования новых форм удобрений, средств защиты и регуляторов роста растений в агротехнологиях сельскохозяйственных культур» (2012, г. Анапа, Россия); международной биологической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Р.Н. Шилякова (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 лаборатории технологии микробных препаратов ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии под руководством к.б.н., зав. лабораторией Чеботаря В.К.

Личный вклад соискателя. Представленные экспериментальные и теоретические результаты получены лично автором. Соискатель принимал непосредственное участие в постановке всех задач исследования, подготовке и проведении 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. (ГНУ ВНИИСХМ). Часть работ выполнена с использованием оборудования ЦКП "Геномные технологии и клеточная биология" ГНУ ВНИИСХМ.

Публикации. По материалам диссертации опубликована 31 работа, в том числе 9 - в ведущих рецензируемых научных журналах ВАК, из них 3 статьи в ведущих иностранных журналах, 1 глава в книге, получен 1 патент.

Структура и объем работы. 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. Микробные сообщества сфагновых болот. Экологическая роль в функционировании болотных экосистем. Полезные растительно-микробные системы в сельскохозяйственной биотехнологии. Основные перспективные направления развития (Обзор литературы).

1.1. Микробные сообщества сфагновых болот. Экологическая роль в функционировании болотных экосистем.

Сфагновые болота и заболоченные оторфованные земли России составляют 369,1 млн. га, или 21 % территории страны, т. е. каждый пятый гектар территории нашей страны. Сфагновые болота - это уникальные природные образования, выполняющие важную роль в биосфере, имеют богатейший природный потенциал. Они консервируют огромные запасы пресной воды, депонируют углерод, в существенной мере определяют водный и гидрологический режимы территории, служат гигантскими естественными фильтрами, поглощающими токсичные элементы из атмосферы.

До настоящего времени многие исследователи рассматривали развитие болотных экосистем как процесс эволюции их растительности, находящийся под влиянием климатических факторов, но обусловленный главным образом свойством растительных группировок изменять условия местообитания.

Однако, современные исследования в области микробиологии болот говорят о высокой структурно - функциональной взаимосвязи между растениями и микроорганизмами, позволяют характеризовать болото как сложную растительно-микробную систему, в которой каждый компонент играет свою специфическую роль. Болотные экосистемы – это к тому же уникальная кладезь микроорганизмов, большей частью представленных новыми и, часто, уникальными и специфическими формами бактерий, грибов, дрожжей, которые могут найти свое применение в такой активно развивающейся отрасли как биотехнология.

Сельскохозяйственная микробиология обращает пристальное внимание на передовые достижения в изучении растительно-микробных систем с целью их дальнейшего практического применения. Особый интерес вызывали новые штаммы бактерий, обладающих комплексом хозяйственно-ценных свойств, которые и определяют их возможность дальнейшего практического применения и востребованность в сельском хозяйстве.

К настоящему времени в микробиологической науке, так или иначе касающейся болотных экосистем, прослеживаются следующие основные направления исследований:

- исследования бактериальных ассоциаций, связанных с круговоротом метана
- исследования, касающиеся микробиологической деструкции природных полимеров, происходящей в торфах, микробные ассоциации и отдельные виды микроорганизмов торфа

- микроорганизмы, ассоциированные с растениями болотных экосистем.

В данном обзоре литературы мы охарактеризуем основные успехи микробиологии, касающиеся каждого направления исследований, и особо остановимся на третьей части, наиболее тесно связанной с представленной работой.

1.1.1. Микроорганизмы болотных экосистем, связанные с круговоротом метана.

Цикл метана является одним из геохимически важных звеньев глобального круговорота углерода. Основные процессы трансформации углерода в этом цикле (за исключением термokatалитического образования, сжигания и фотохимического окисления) осуществляются исключительно специфическими группами микроорганизмов.

1.1.1.1. Метаногены.

Метаногены болотных экосистем представлены анаэробными прокариотами, относящимися к домену *Archaea*, третьему домену живых организмов, наряду с *Eucarya* и *Bacteria* (Woese et al., 1990). Метаболическая уникальность архей заключается в их способности получать энергию из низкомолекулярных источников углерода и водорода и продуцировать метан.

Согласно последней классификации в домене *Archaea* выделяют две основные филы: *Euryarchaeota* и *Crenarcheota*, метаногены же присутствуют в эуархеальной филе, наряду неметаногенными галофильными, термоацидофильными и гипертермофильными *Archaea* (Boone, Castenholz, 2001). Количество новых описываемых родов постоянно увеличивается, при этом пути метаногенеза были обнаружены и в неметаногенных организмах, однако к термину «метаногены» относятся организмы, у которых присутствует весь цикл синтеза метана с конечным выходом продукта в виде CH_4 (Vornolt et al., 1995; Klenk et. al, 1997; Chistoserdova et. al., 1998). Метаногенез сперва был предложен как специфическая черта эуархей, однако вскоре это предложение было отклонено в связи с присутствием в филе неметаногенов (Gribaldo, Brochier-Armanet, 2006).

Метаногены способны развиваться только в присутствии одного или двух источников углерода и молекулярного водорода, они не способны получать энергию из сложных органических соединений, а осуществляемый ими метаногенез зависит от поставок субстратов ассоциированными микробными сообществами или за счет геохимических ресурсов (Juottonen., 2008). К настоящему времени детерминированы три основных пути метаногенеза, в зависимости от используемого субстрата (Deppenmier, 2002):

- Метаногены, использующие водород в качестве донора электронов, а CO_2 в качестве акцептора. Такие метаногены так же могут использовать и формиат наряду с CO_2 и H_2 .

- Метаногены, восстанавливающие ацетат в метильную и карбонильную группу. Дальнейшее окисление карбонильной группы в CO_2 обеспечивает редукционный потенциал для восстановления метильной группы до CH_4 .

- Метилотрофные метаногены, усваивающие метилированные субстраты такие как метанол, метиламины, метилсульфиды, которые одновременно выступают и как доноры и как акцепторы электронов.

Некоторые метаногены также способны использовать спирты, такие как этанол и пропанол в качестве источника водорода для восстановления CO_2 или роста на CO (Zellner and Winter, 1987). Таксономически метаногены формируют пять порядков: *Methanosarcinales* (9 родов), *Methanomicrobiales* (8), *Methanobacteriales* (5), *Methanococcales* (4), *Methanopyrales* (1) (Boone and Castenholz, 2001). Большинство описанных видов способны продуцировать CH_4 из H_2 и CO_2 , а порядки *Methanomicrobiales*, *Methanococcales* и *Methanopyrales* содержат только микроорганизмы первой группы. Члены *Methanobacteriales* также относятся к первой группе, исключение составляет лишь род *Methanosphaera*. Другие метилотрофные метаногены и все ацетотрофы, относящиеся к *Methanosarcinales*, включая только известные облигатные ацетотрофы, формируют семейство *Methanosaetaceae*. Порядок *Methanosarcinales* включает метаболически разносторонние метаногены; несколько членов семейства *Methanosarcinaceae* содержит представителей всех трех вышеуказанных групп (Garcia et. al., 2000).

Несмотря на общий энергетический метаболизм, метаногены физиологически и морфологически дивергентны. Например, большинство культивируемых метаногенов оптимально растут в мезофильном интервале температур (Garcia et. al., 2000), но температурные рамки метаногенеза включает и психрофильные условия роста (1°C) для *Methanogenium frigidum* (Franzman et. al., 1997) и *Methanosarcina lacustris* (Simankova et. al., 2001), и гипертермофильные условия (110°C) для *Methanopyrus kandleri* (Kurg et. al., 1991). Несколько термофильных родов описаны для порядков *Methanobacteriales* и *Methanococcales*. Форма клеток также сильно варьирует даже внутри одного порядка, и ранжирована от кокков, палочек и спирилл до сарцин и плоских неправильных форм бактерий (Garcia et. Al., 2000). Как и у всех архей, клеточная стенка метаногенов состоит из пептидогликана, включающего псевдомуреин, протеиновые субъединицы, или уникальный полимер – метанохондроитин (Kandler and Konig, 1998).

Разнообразие мест обитания метаногенов отражает их физиологическую вариабельность, но обязательным фактором является наличие анаэробных условий. Местообитания метаногенов включают (Garcia et. al., 2000):

- Анаэробные местообитания с разлагающейся органикой, которые включают в себя постоянные или временно затопленные водно-болотные угодья, болота, рисовые поля, соленые озера, пресноводные или морские отложения. Такие местообитания населены обычно

метаногенами порядков *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales* и *Methanococcales*.

- Пищеварительный тракт различных организмов, включая жвачных животных, людей и членистоногих, таких как термиты. Анаэробные простейших также имеют эндосимбиотических метаногенов. Поскольку организм хозяина поглощает промежуточные соединения, такие как ацетат, метаногены пищеварительного тракта преимущественно гидрогенотрофны и часто представлены порядком *Methanobacteriales*.

- Геотермальные условия, такие как горячие источники, нефтяные скважины и геотермальные жерла морского дна, где используемые субстраты (H_2 , CO_2) поступают за счет геологической активности. Термофильные и гипертермофильные штаммы, выделенные из таких местообитаний, относились к порядкам *Methanobacteriales*, *Methanococcales* и *Methanopyrales*.

Болотные экосистемы, характеризующиеся накоплением частично деградированных органических веществ торфа (Laine, Vasander 1996) и низкой скоростью его разложения в анаэробных условиях, приводящей к значительным накоплениям углерода (Clymo, 1984), являются уникальными местообитаниями для метаногенов.

Повышенный уровень воды в болотах экосистемах приводит к вертикальной стратификации с неглубоким аэробным верхним слоем и анаэробным (до нескольких метров) слоем торфа (рис. 1). Выше уровня воды аэробные грибы и бактерии разлагают органические вещества до CO_2 , в то время как ниже уровня воды, концентрация кислорода быстро падает с глубиной (Lloyd et al., 1998) создавая бескислородные условия разложения, осуществляемые ассоциациями анаэробных микроорганизмов. Действуя во взаимосвязанных последовательностях, анаэробы переводят органическое вещество в продукты брожения, в том числе органические кислоты, ацетат, и, наконец, в CH_4 и CO_2 .

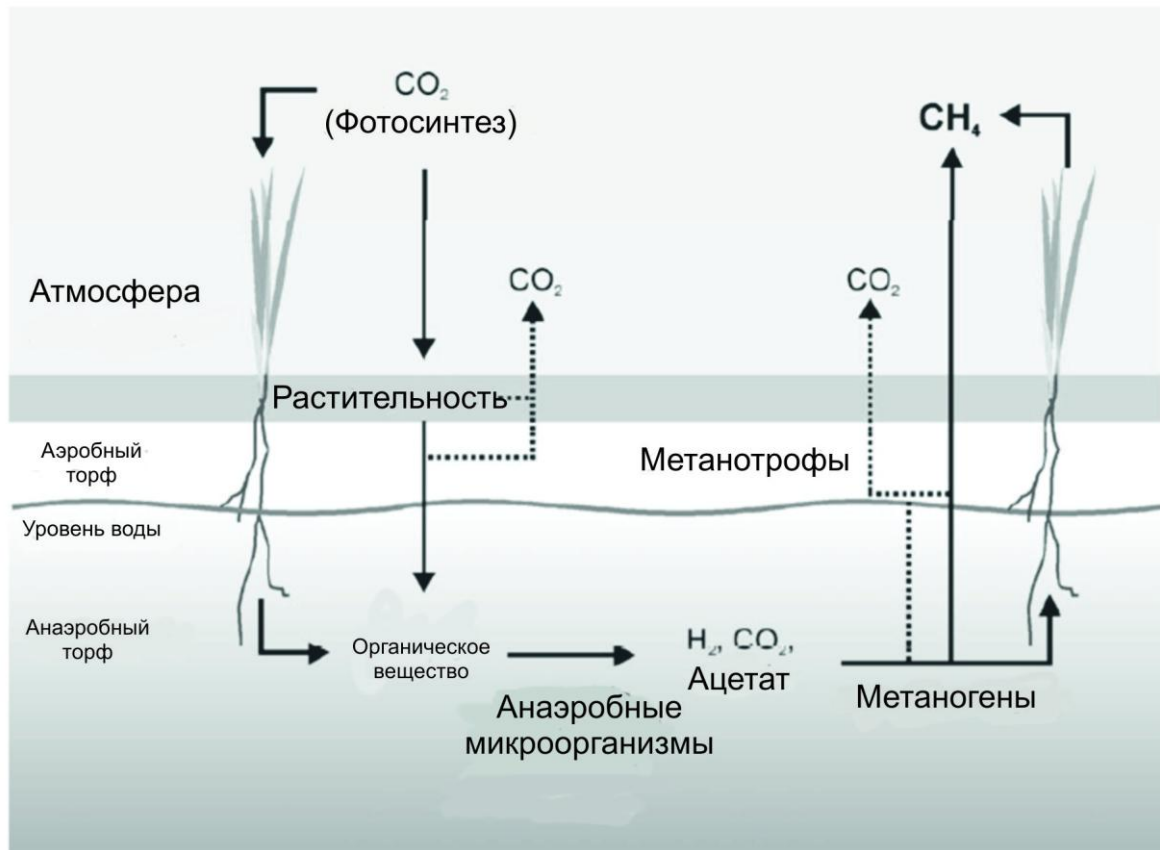


Рис. 1. Схематическое изображение циклов углерода и метана в болотах (Juottonen, 2008).

Экология, физиология и систематика микроорганизмов, связанных с процессом метаногенеза, пока остаются мало охарактеризованными, особое значение здесь приобретает изучение микробиологической активности, лежащей в основе метаногенеза, зависимость этих процессов от абиотических и биотических факторов. Метаногенные микробные в болотных экосистемах чрезвычайно сложны, а традиционные методы их изучения, основанные на культивировании микроорганизмов и выделении чистых культур оказались не достаточны для описания огромного разнообразия микроорганизмов; такие методы часто оставляли без внимания более 99% микроорганизмов, часто составляющих численно и функционально важную часть микробного сообщества (Torsvik et al., 1990; Amann et al., 1995). Применение методов молекулярной биологии, которые не зависят от культивирования микроорганизмов, значительно улучшили результаты исследований и позволили раскрыть весь потенциал микробных сообществ (DeLong, Pace, 2001); с начала их использования более 20 лет назад число детерминированных бактериальных фил возросло с 12 до более чем 50 (Hugenholtz et al., 1998; Rappe, Giovannoni, 2003), что позволило, к примеру, выделить широкое разнообразие мезофильных архей с неизвестными до селе функциями (Scheleper et al, 2005).

Стандартные методы молекулярного анализа обычно начинаются с выделения бактериальной ДНК из природных образцов, затем проводят ПЦР-амплификацию маркерных генов, дифференциацию ампликонов методом молекулярного фингерпринтинга или клонирования и,

наконец, определяют состав микробной популяции путем секвенирования ДНК и филогенетического анализа (Head et al., 1998; Bragina et al., 2012). Одной из проблем в этой области исследований является связывание данных секвенирования с последовательностью функций микроорганизмов в болотных экосистемах (Gray, Head, 2001), а также в точном и всеобъемлющем описании всего разнообразия микробных сообществ и их компонентов. Высокое разнообразие и численность прокариот создают условия для вычленения только наиболее доминантных компонентов таких сообществ, а распознавание того или иного компонента используя метод ПЦР во многом зависит от специфичности праймеров (Baker et al., 2003; Forney et al., 2004). Кроме того, основным недостатком метода ПЦР является отсутствие относительности в амплификации, т. е. концентрация ампликона того или иного таксона может не соответствовать реальному положению дел (Suzuki, Giovannoni, 1996).

Метаногенные микробные сообщества могут быть охарактеризованы на основе анализа фрагментов гена 16S рибосомальной РНК или гена метил-коэнзим М (mcrM), как молекулярного маркера в широком природном разнообразии микроорганизмов. Природными условиями для изучения стали многочисленные болота, почвы рисовых полей, вода, и морские донные отложения, гидротермальные источники, пищеварительный тракт животных, внутренние органы термитов, свалки и анаэробные реакторы (Chaban et al, 2006). Основными методами, применяемыми для изучения состава метаногенных сообществ являются: анализ библиотек клонов, денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ), температурный градиентный гель-электрофорез (ТГГЭ), анализ полиморфизма однонитиевой ДНК (SSCP – от англ. single strand conformation polymorphism), основанные на разделении фрагментов ДНК имеющих различные последовательности; а также метод T-RFLP (от англ. terminal restriction fragment length polymorphism), основанный на различиях в длине рестрикционных фрагментов у разных таксонов (Moyer et al, 1994). В дополнение к этому применяют флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH- от англ. fluorescens *in situ* hybridization) и мембранную гибридизацию (Raskin et al., 1994; Purdy et al., 2003), активность метаногенных сообществ осуществляют путем анализа РНК, выделенной из природной среды (Lueders, Friedrich, 2002; Koizumi et al., 2004; Shigematsu et al., 2004).

Изучение генов 16S рРНК может выявить филогенетическую принадлежность организма, но не его функции в экосистеме. Множество функциональных групп, включая метаногенов, не монофилетичны по филогении 16S, что затрудняет их обнаружение и идентификацию, поэтому для анализа применяют 16S рРНК метаноген-специфичные праймеры (Marchesi et al., 2001; Wright, Pimm, 2003). Однако *in silico* анализ (Banning et al., 2005) показал, что данные праймеры также амплифицировали и не-метаногенные Euarchoeota и Crenarchoeota. Для решения этой проблемы авторами были предложены три пары праймеров, которые перекрывали широкое разнообразие нуклеотидных последовательностей 16S рРНК

метаногенов. Также была разработана серия праймеров для большинства *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* (Watanabe et al., 2004), кроме того, ряд группоспецифичных гибридизационных проб (Raskin et al., 1994) и праймеров для количественного ПЦР (Hori et al., 2006).

Анализ маркерных генов, кодирующих функции, специфичные только для функциональной группы метаногенов, позволяет решить проблему филогенетического расхождения. К примеру, метил-коэнзим-М-редуктаза (MCR, 2.8.4.1) – важнейший фермент, задействованный в продукции CH_4 , катализирует финальную стадию метаногенеза (Deppenmeier, 2002). Данный фермент присутствует у всех хорошо-известных метаногенов, отсутствует у не-метаногенных *Archaea* и *Bacteria* (Chistoserdova et al., 1998; Thauer 1998; Baptiste et al., 2005) и состоит из трех субъединиц α , β , γ (Reeve et al., 1997). Ген, кодирующий α -субъединицу, *mcrA*, содержит консервативную нуклеотидную последовательность и связан с каталитическими сайтами MCR (Hallam et al., 2003). Филогения *mcrA* повторяет филогению 16S рРНК, а идентификация метаногенов основывается на анализе нуклеотидных последовательностей *mcrA* (Luton et al. 2002).

Основные результаты исследований, выполненные к настоящему времени с использованием методов накопительных культур, а также вышеуказанных методов молекулярной биологии, приведены в таблице 1 (Juottonen, 2008). Представители порядков *Methanosarcinales* (семейства *Methanosarcinaceae* и *Methanosaetaceae*), *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales* являются типичными обитателями торфяных отложений сфагновых болот.

Первые исследования метаногенов с использованием молекулярного анализа выявили две новые группы микроорганизмов: R10, отнесенная к *Methanomicrobiales*, и R17, отнесенная к *Methanosarcinales* (Hales et al., 1996), которые часто встречались в болотных экосистемах. Позже группа R10 также была описана для болот (Galand et al., 2002) на основе анализа *mcrA* генов, на ряду с другой новой группой E2 (Cadillo-Quiroz et al., 2006), которые были отнесены к «болотному» кластеру, в то время как группа R17 составила «кластер рисовых полей» (Grosskopf et al., 1998).

Состав метаногенных сообществ, как правило, меняется с увеличением глубины залегания торфяных отложений (Galand et al., 2002; Cadillo-Quiroz et al., 2006) и кроме того, меняется в зависимости от типа растительности, например между болотами с доминирующими *Sphagnum* или *Eriophorum* (Galand et al. 2003), с доминирующими *Sphagnum* и *Carex* (Rooney-Varga et al., 2007) или же с увеличением высоты над уровнем моря (Merila et al., 2006). В болотах Аляски отмечена зависимость между составом метаногенных сообществ и изменениями рН и температуры в течение вегетационного периода (Rooney-Varga et al., 2007). Методами накопительных культур были изучены состав метаногенных сообществ (Sizova et al. 2003), изменения метаногенных сообществ в зависимости от рН (Kotsyurbenko et al., 2007) или

температуры (Hoj et al., 2008). Имеются данные о воздействии на состав сообществ антропогенных факторов, таких, как например осушение болот (Laine, 1996).

До недавнего времени считалось, что все представители групп метаногенов – нейтрофилы (Коцюрбенко, 2005), с оптимальным рН в области 6,5–7,5, не обладающие способностью к росту при значениях рН ниже 4,5. Позднее ряд бактериальных изолятов, выделенных из торфа, и отнесенных к *Methanobacteriales*, проявили свою активность при низких значениях рН (Williams, Crawford, 1985; Kotsyurbenko et al., 2007). Кроме того, новые штаммы бактерий, выделенные из североамериканских болот, были идентифицированы как представители *Methanomicrobiales* (Brauer et al. 2006, Cadillo-Quiroz et al. 2008). В данных исследованиях, представители новой группы метаногенов, до этого отнесенных к некультивируемым формам бактерий, были успешно изолированы в чистые культуры. “*Candidatus Methanoregula boonei*” является первым культивируемым представителем кластера R10/E2, а “*Candidatus Methanosphaerula palustris*” кластера E1 внутри *Methanomicrobiales*.

1.1.1.2. Метанотрофы

Метанотрофные бактерии или метанотрофы – это одна из подгрупп физиологической группы метилотрофных бактерий, которая является уникальной по своей способности использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии. Группа метилотрофных бактерий способна к утилизации широкого разнообразия одноуглеродных соединений, включая метан, метанол, метламины, метилсульфатные соединения (Абрамочкина и др., 1987; Anderson et. al., 1988; Antony, 1991; Lidstorm, 1991; Dijkhuizen et. al., 1992).

Метан – наиболее стабильное соединение углерода в анаэробных условиях болотных экосистем, он является очень важным промежуточным продуктом реакций, в конечном итоге приводящих к минерализации органического вещества (Dagley, 1978). Эмиссия метана в болотных экосистемах контролируется сообществом микроорганизмов и зависит от процессов метанообразования и метаноокисления (Заварзин, 1999). Болотные экосистемы являются своего рода природными фильтрами для метана: образующийся при участии метаногенов в анаэробной зоне, метан проходит в верхние слои торфяных болот, где окисляется метанотрофами (Слободкин и др., 1992; Заварзин, 1995; Паников, 1995).

Окисление метана к настоящему времени хорошо изучено, показана возможность его осуществления как для аэробных, так и для анаэробных местообитаний, хотя микробиология и биохимия анаэробного окисления метана изучены пока слабо. Бактерии, утилизирующие метан, вместе с некоторыми хемолитотрофными бактериями, формируют основу для пищевой цепи, не зависящей от фотосинтеза или энергии геотермальных источников (Hovland, 1988; Fisher, 1990; Cavanaugh, 1993).

Важной характеристикой метанотрофов является наличие монооксигеназ – ферментов, катализирующих окисление метана в метанол. Рис. 2 отражает метаболизм субстратов метанотрофов: общие черты их метаболизма, в том числе центральную роль формальдегида в качестве промежуточного продукта катаболических и анаболических путей (Hanson и Hanson, 1996).

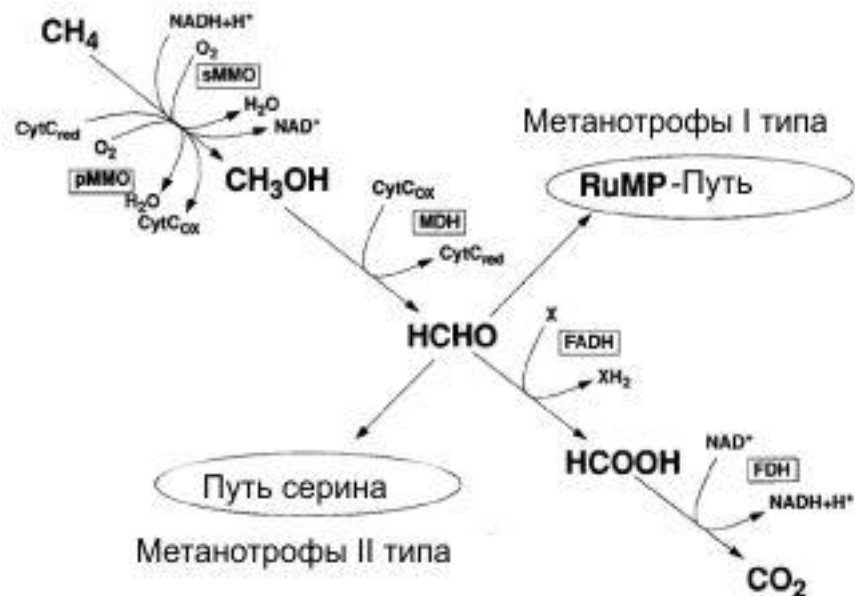


Рис. 2. Пути окисления метана и ассимиляции формальдегида: CytC- цитохром С, FADH – формальдегиддегидрогеназа, FDH – формиатдегидрогеназа (Hanson и Hanson, 1996).

Шонгеном в 1906 (Sohnngen, 1906) было высказано предположение, что метан в природе производится в огромных количествах, но низкая концентрация в атмосфере объясняется его окислением микроорганизмами. Им же впервые была выделена метанооксилюющая бактерия, названная *Bacillus methanicus*. Позднее было выделено более 100 новых изолятов метан-утилизирующих бактерий (Whittenbury, 1970) и создана база для текущей классификации этих бактерий. В данных исследованиях было предложено разделение метан-ассимилирующих бактерий на пять групп (родов), основанное на морфологических различиях, форм покоящихся стадий, строение интраплазматических мембран и некоторых физиологических характеристик (Whittenbury et. al., 1981; Whittenbury et. al., 1984). Данные рода *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylocystis*, *Methylosinus* присутствуют и в современной классификации, за исключением добавления одного нового рода *Methylomicrobium* (Bowman, 1993).

Все метанотрофы были разделены на 2 типа (Табл. 1.): тип 1, включающий рода *Methylomonas* и *Methylobacter*; и тип 2, включающий рода *Methylosinus* и *Methylocystis*. Кроме того, была выделена группа метанотрофов – тип X, включающая метанотрофов, схожих с *Methylococcus capsulatus*, которые, как и метанотрофы типа 1, утилизируют рибулозу монофосфат в качестве

пути ассимиляции формальдегида. Но при этом, тип X метанотрофов отличается от типа 1, так как имеют низкий уровень фермента рибулозидифосфаткарбоксилазы, одного из ферментов цикла Кальвина-Бенсона (Whittenbury et. al., 1981; Whittenbury et. al., 1984). Кроме того, они растут при более высоких температурах и отличаются повышенным содержанием G+C, чем большинство представителей типа 1 метанотрофов (Green, 1992).

Боуманом с коллегами (Bowman, 1993; 1995) были сравнены 124 фенотипические характеристики более чем 136 метанотрофных бактерий, включая несколько новых изолятов. Для уточнения взаимосвязи родов и видов использовались принципы нумерической систематики, ДНК-ДНК-гибридизация, анализ состава жирных кислот, входящих в фосфолипиды мембран, физиолого-биохимические характеристики. Они пришли к выводу, что тип 1 метанотрофов включает три гомологичных кластера и предложили, что семейство *Methylococcaceae* должно состоять из родов *Methylococcus*, *Methylomicrobium*, *Methylobacter* и *Methylomonas*. Позже к этой группе метанотрофов были добавлены 2 новых рода *Methylocaldum* (Bodrossy, 1998) и *Methylosphaera* (Bowman, 1997). Тип 2 метанотрофов включает тесно связанные группы, относящиеся к родам *Methylocystis* и *Methylosinus* (Whittenbury, 1970).

Филогенетические связи среди представителей метанотрофных бактерий также были установлены и с использованием анализа генов 16S рРНК (Bratina, 1992; Bowman, 1993; Uz, 2003). Результаты этих исследований показали, что метанотрофные бактерии, утилизирующие серин путем ассимиляции формальдегида формируют кластер внутри α -кластера *Proteobacteria*. Семейство *Methylococcaceae* формирует отдельное подразделение внутри γ -кластера *Proteobacteria*, в то время как не-метанутилизирующие метилотрофные бактерии отнесены к β -кластеру протеобактерий. Боуманом с соавт. (Bowman, 1995) был предложен новый род *Methylomicrobium*, который как предлагается, включает в себя несколько цистообразующих непигментированных видов с различным фосфолипидным профилем. Эти бактерии были предварительно классифицированы как члены родов *Methylobacter* и *Methylomonas*. Анализ последовательности гена 16 s рРНК метанотрофного эндосимбионта из жаберных тканей мидии, обитающей в Мексиканском заливе (Distel, 1994), показал, что эта некультивируемая бактерия относится к семейству *Methylococcaceae* и может представлять собой новый вид.

Анализ генов 16S рРНК, метилотрофов, не утилизирующих метан, позволило определить ключевые последовательности, характеризующие семейство *Methylococcaceae* и обнаружить тип 2 метанотрофов в α -кластере *Proteobacteria* (Brusseau, 1994). Такие олигонуклеотидные последовательности в качестве целевых нуклеотидных проб могут быть использованы для детекции некультивируемых форм метанотрофов в природных образцах (Bowman, 1993; Brusseau, 1994).

Методами газовой хроматографии и хроматомасспектрометрии установлены липидные профили культур метанотрофов (Galchenko, Andreev, 1984; Bowman, 1991), что также имеет место при таксономической характеристике. Тип 1 и тип X метанотрофов несут в себе 16-и углеродные жирные кислоты, в то время как 18-и углеродные жирные кислоты характерны для типа 2. Было описано применение метода анализа мембранных липидов как фенотипических маркеров в сравнении с филогенетическими взаимосвязями на основе анализа 16S рРНК. Члены рода *Methylomonas* содержали главным образом 14:0 (19-25%) и 16:1 ω 8с (26-41%) жирные кислоты, в то время как штаммы *Methylococcus* несли в себе 16:0 (33-56%) и 16:1 ω 7с (4-12%). Представители типа 2 метанотрофов несли в себе высокие концентрации 18:1 ω 8с (53-74%) и 18:1 ω 7с (15-38%) жирных кислот.

Почти все метан-утилизирующие бактерии – облигатные метанотрофы (Antony, 1982). Имеются сведения о факультативных метанотрофах, способных использовать разнообразные источники углерода (Hanson, 1992; King, 1992), например для *Methylobacterium organophilum* показана способность к росту не только в присутствии метана, но и разнообразных источников углерода и энергии (Patt, 1974). Кроме того было показано, что рестрикционные фрагменты, полученные при обработке бактериальной ДНК из клеток, выращенных в атмосфере метана и клеток, выращенных на питательном бульоне, не отличаются между собой, также как и размеры фрагментов *mxaF*-гена, кодирующего большую субъединицу метанолдегидрогеназы (Hanson, 1996). *M. organophilum* XX был отнесен к кластеру пигментированных факультативных метилотрофов из *α -Proteobacteria* (Безрукова, 1983).

Все хорошо изученные метанотрофные бактерии – облигатные аэробы (Hanson, 1996), при этом, некоторые представители типа 2 и типа X метанотрофов способны фиксировать азот атмосферы (Hanson, 1991; Bowman, 1993). «Форсированная» фиксация атмосферного азота (например в условиях недостатка минерального азота в воде болот) обычно проходит при максимально низких концентрациях растворенного кислорода (Hanson, 1991).

Как правило, при использовании методов, основанных на культивировании и выделении метанотрофов в чистые культуры, обнаруживается лишь незначительная часть жизнеспособной популяции, присутствующей в природных образцах. Количество жизнеспособных клеток при этом колеблется между 10^3 - 10^6 КОЕ на грамм исследуемого субстрата (Neueg, 1977). Физиологические типы метанотрофов могут отражать условия культивирования, таким образом детектируются только микроорганизмы, для которых наиболее благоприятны условия эксперимента (Amaral, 1995). Таким образом, использование культивируемых методов не полностью отражает истинный состав природных популяций. Оценка же физиологического состояния метан-окисляющего сообщества проводят по изменению потребления метана методами газовой хроматографии (Hanson, 1996).

Одним из эффективных методов для детекции метанотрофов и других бактерий в природных образцах является использование флуоресцентных антител, специфичным к мертвым клеткам в чистых культурах (Абрамочкина, 1987). Гальченко с соавт. (1988) использовал иммунофлуоресцентный метод с антителами, специфичными к 14 штаммам метанотрофов, выделенных из природных источников, для идентификации и количественного анализа метанотрофного сообщества донных отложений Черного моря. При этом численность метанотрофных бактерий была выше на 3 порядка, нежели при определении численности путем прямого культивирования.

Также как и для метаногенов, некультивируемые формы метанотрофных бактерий могут быть обнаружены методами молекулярного-генетического анализа. При этом олигонуклеотидные пробы для амплификации могут быть специфичны к участкам гена 16S рРНК (Wise, 1999), либо к последовательностям, кодирующим ключевые ферменты ответственные за процессы окисления метана.

1.1.2. Микробные ассоциации торфяных отложений, микроорганизмы, связанные с деструкцией торфа.

Несмотря на важность торфяных болот в процессах глобального цикла углерода и воды, состав микробных сообществ торфяных отложений изучен еще достаточно слабо. Основные работы здесь посвящены изучению микробного разнообразия торфяных отложений болот на основе анализа фрагментов гена 16S рРНК (Juottonen et al., 2005; Dedysh et al., 2006; Morales et al., 2006; Hartman et al., 2008; Ausecetal., 2009; Pankratov et al., 2011).

На рис. 3 представлен обзор разнообразия состава микробных сообществ торфяных болот на основе молекулярно-генетического анализа последовательностей генов 16S рРНК различных географических регионов (Dedysh, 2011), и, в дополнение к этому, для сравнения приведены данные о составе микроорганизмов тропических болот Тайланда (Kanokratana et al., 2011).

Показано, что тропические и северные болота в целом имеют сходный состав основных паттернов микроорганизмов, которые, чаще всего включают в себя такие доминантные филы, как *Acidobacteria* и *Proteobacteria*. Филя *Acidobacteria* в торфяных отложениях представлена подотделами 1, 3, 4, 8, из которых только подотдел 1 хорошо изучен с помощью методов культивирования бактериальных изолятов, а подотделы 3 и 4 включают лишь несколько описанных представителей. Протеобактерии, обнаруженные в торфяных отложениях чаще всего классифицируются как представители *Alpha*- и *Delta*- классов, при этом *Alphaproteobacteria* представлены в основном метанотрофами и метилотрофами из семейств *Methylocystaceae* and *Beijerinckiaceae* (Dedysh et al., 2006; Dedysh, 2009). Из гетеротрофных бактерий имеются сведения о представителях семейств *Bradyrhizobiaceae*, *Acetobacteraceae*,

Hyphomicrobiaceae и *Caulobacteraceae*, фототрофы представлены родами *Rhodoblastus*, *Rhodomicrobium*, и *Rhodopseudomonas*. Кроме того, для болот отличающихся повышенными уровнями сульфатов, показано присутствие в торфяных отложениях таких представителей *Deltaproteobacteria* как рода *Syntrophobacter*, *Syntrophus*, *Smithella*, *Geobacter* и *Anaeromyxobacter* (Morales et al., 2006).

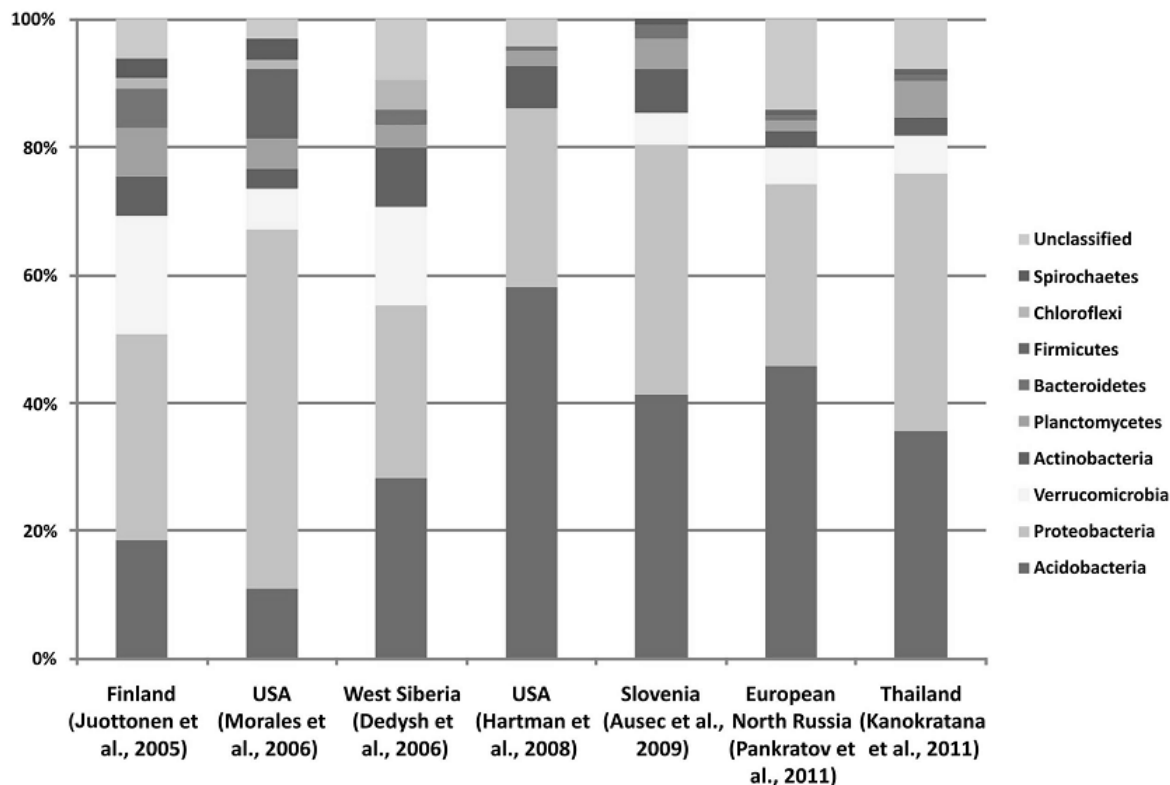


Рис. 3. Таксономическая характеристика микробных сообществ северных торфяных болот различных географических регионов. Для сравнения приведен состав сообществ микроорганизмов тропических болот Тайланда (по Dedysh, 2011).

Анализ расшифрованных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК библиотек клонов кислых сфагновых болот выявил менее крупные, но при этом довольно многочисленные филы, такие как *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*. Показано, что большинство представителей *Verrucomicrobia* относятся к таксономически не охарактеризованным группам микроорганизмов, для которых культивирование на питательных средах не возможно. Представители *Actinobacteria* болотных экосистем к настоящему времени также остаются слабоизученными, в отличие от других представителей этой филы, населяющие почвы. Значительная часть расшифрованных нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК из образцов кислых торфяных отложений сфагновых болот принадлежали только двум характерным представителям этой филы: *Acidimicrobium ferrooxidans* и *Ferrimicrobium acidiphilum*. Еще один выявленный характерный представитель был классифицирован как *Conexibacter woesei*, также уже устоявшийся член *Actinobacteria* (Dedysh, 2011).

Фила *Planctomycetes* - это одна из наиболее многочисленных бактериальных групп, выявляемых в библиотеках клонов с использованием таких широко распространенных бактериальных праймеров, как 9-27f. В кислых сфагновых болотах представители фило отличаются широким разнообразием и представлены практически всеми известными к настоящему времени основными линиями данной фило. Многие расшифрованные и отнесенные к филе *Planctomycetes* нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК отличаются невысоким коэффициентом сходства ($\leq 90\%$) к уже таксономически охарактеризованному микроорганизму, к тому же, многие из них были отнесены к линиям недавно описанных ацидофильных родов *Schlesneria*, *Singulisphaera* и *Zavarzinella* (Dedysh, 2011). Установлены и минорные группы микроорганизмов, отнесенные к *Beta*- и *Gammaproteobacteria*: *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Firmicutes*, представленные в основном уже хорошо охарактеризованными группами микроорганизмов.

Таким образом, с использованием методов, не предусматривающих выделение и культивирование микроорганизмов, большая часть бактерий торфов кислых болот представлена не культивированными (некультивируемыми) представителями микробного сообщества с неизвестным метаболическим потенциалом.

Обычно численность микробной популяции в типичном кислом сфагновом болоте колеблется между 10^8 - 10^9 КОЕ на грамм сухого торфа (Williams и Crawford, 1983; Dedysh et al., 2001, 2006; Kotsyurbenko et al., 2004), до 70% которых выявляется с помощью методов флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с использованием универсальной бактерио-специфичной пробы EUB338, а около 10% выявлено с использованием архее-специфичных проб ARCH915 и ARC344. Не выявленные с помощью специфической гибридизации бактерии, были обнаружены путем DAPI-окрашивания и имели очень мелкие размеры в длину ($< 0,5$ мкм); их природа и метаболический статус остается не ясен (Dedysh, 2006).

Только незначительная часть микробной популяции торфов может быть выявлена с использованием посева на стандартные агаризированные питательные среды (такие, как например питательный агар, среда R2A и др.), при этом количество колониеобразующих единиц варьирует в пределах 10^5 – 10^6 на г сырого торфа (Golovchenko et al., 2005; Dedysh et al., 2006), что составляет всего лишь 0,01-0,1% от общей бактериальной биомассы, выявленной при DAPI-окрашивании (Dedysh, 2011). Большая часть таких бактериальных изолятов, выделяемых на стандартных агаризованных средах, отнесены к *Betaproteobacteria* (Belova et al., 2006; Dedysh et al., 2006), в особенности к роду *Burkholderia*. Другая часть бактерий, также активно развивающаяся на поверхности твердых питательных сред, относилась к *Alphaproteobacteria* (такие рода как *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sphingomonas*, *Brevundimonas*, *Caulobacter*, *Hyphomicrobium*), *Actinobacteria* (*Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Micromonospora*), *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonas*, *Serratia*,

Rahnella), *Firmicutes* (*Paenibacillus*, *Bacillus*) и *Bacteroidetes* (*Pedobacter*, *Dyadobacter*, *Chryseobacterium*). Анализ генов 16S рРНК показал, что данные бактериальные изоляты имели высокую долю сходства (98 - 100%) с уже таксономически описанными микроорганизмами.

Наиболее широко используемые питательные среды обычно имеют нейтральный показатель рН и концентрацию солей в пределах 1-3 г/л, что не соответствует истинным параметрам болотной воды (имеющей обычно показатель рН 3,5 - 5,5 и содержание солей 5 - 50 мг/л) и ограничивает рост значительного числа представителей микробной популяции при выделении на таких средах. Для более достоверного повторения состава болотной воды обычно используют сильно разбавленные питательные среды с кислым показателем рН (4,0-5,0). Высокий потенциал данной стратегии использования сильно разбавленных кислых сред показан при выделении новых представителей метаноокисляющих бактерий (Dedysh, 1998; Dedysh, 2009; Kip, et. al, 2011), а также метаногенных архей (Sizova et al., 2003; Brauer et al., 2006; Kotsyurbenko et al., 2007; Cadillo-Quiroz et al., 2009). Примером может служить успешное выделение представителей *Acidobacteria* на средах с очень низким содержанием ионов и органических субстратов: таких как ММ, ММ1, 10-кратно разбавленной R2A (Dedysh et al., 2006; Pankratov et al., 2008), которые к тому же не содержали в себе фосфатов, как было показано (Pankratov, 2010), обычно ингибирующих рост ацидобактерий.

Большинство представителей микробной биоты, населяющей северные сфагновые болота являются психрофильными микроорганизмами с весьма низкой скоростью роста. Колонии метанорофов, ацидобактерий и планктомицет обычно проявляются на поверхности твердых питательных сред на 4-8 неделях инкубирования (Dedysh et al., 2000; Pankratov et al., 2008; Kulichevskaya et al., 2009), а в случае ацидотолерантного факультативно-анаэробного *Telmatospirillum sibiricense* продолжительность культивирования составила 5 месяцев (Sizova et al., 2007).

Далее дадим обзор основных бактериальных доменов, представители которых обитают в торфяных отложениях сфагновых болот и освещены в научной литературе. Такие бактериальные изоляты выделены в чистые культуры и депонированы в коллекциях тех или иных учреждений.

1.1.2.1. Alphaproteobacteria

Представителей *Alphaproteobacteria*, обитателей кислых торфяных болот, условно можно разделить на три крупные физиологические группы: метанотрофы, хемоорганотрофы и фототрофы. Обзор метанотрофных бактерий, культивируемые формы которых входят в семейства *Beijerinckiaceae* (рода *Methylocella*, *Methylocapsa*, и *Methyloferula*) и

Methylocystaceae (род *Methylocystis*), приведен выше, далее же коротко остановимся на представителях хемоорганотрофов и фототрофов.

Основным доминирующим компонентом хемоорганотрофной группировки микроорганизмов является семейство *Rhodospirillaceae*. Классическим примером данной группы может служить *Telmatospirillum sibiricense*, факультативно-анаэробная ацидотолерантная бактерия, выделенная из сибирских тундровых болот (Sizova et al., 2007). Эта подвижная спирилла, растущая хемоорганотрофно в присутствии ряда органических кислот и глюкозы в анаэробных либо микроаэрофильных условиях. Кроме того, отмечено, что при низком парциальном давлении кислорода и в темноте эта бактерия способна к литотрофному росту с использованием H_2 и CO_2 . Таким образом, подвижность, олиготрофность, способность к использованию различных субстратов и фиксации атмосферного азота делают данную бактерию весьма адаптированной к обитанию в кислых сфагновых болотах. Два ацидофильных, аэробных хеморганотрофа были описаны Беловой (Belova et al., 2009): *Acidisoma sibiricum* и *Acidisoma tundrae* – психротолерантные бактерии с оптимом роста при pH 3,0-7,0, утилизирующие большинство сахаров, многоатомных спиртов, некоторые органические кислоты и полисахариды.

Фоторофы, наиболее часто встречающиеся в торфяных болотах, - это пурпурные несерные бактерии, активно развивающиеся в прозрачной подкисленной воде. Данные бактерии растут фототрофно в анаэробных условиях, но также способны к хемотрофии в микроаэрофильных и аэробных условиях. Примерами таксономически охарактеризованных несерных бактерий болот могут быть *Rhodoblastus acidophilus* (Imhoff, 2001), первоначально описанный как «*Rhodopseudomonas acidophila*» (Pfennig, 1969) и *Rhodoblastus sphagnicola* (Kulichevskaya et al., 2006). Последняя была выделена из анаэробных разлагающихся торфяных отложений, инкубированных на свету. Некоторые другие фототрофы, как например *Rhodopseudomonas palustris* и *Rhodomicrobium vannielii*, также были выделены из кислых болот и имели сходство 99-100% по гену 16S р-РНК с типовыми, уже известными штаммами.

1.1.2.2. Acidobacteria

Ацидобактерии – одна из наиболее доминирующих группировок бактерий кислых торфяных болот (Dedysh, 2006), причем культивируемые формы этой филы относятся к подпорядкам 1 и 3. Это рода *Granulicella* (Pankratov, Dedysh, 2010), *Telmatobacter* и *Bryocella* (Dedysh et al., 2011) в подпорядке 1 и род *Bryobacter* в подпорядке 3 (Kulichevskaya et al., 2010). Приведенные представители *Acidobacteria* характеризуются как мезофильные или психротолерантные, ацидофильные хемоорганотрофы, которые растут обычно при pH от 3,0 до 7,5. *Granulicella spp.*, *Bryocella elongate* и *B. aggregates* являются строгими аэробами, а *T. bradus* это факультативные анаэробы, развивающиеся в условиях низкой концентрации O_2 в

окружающей среде. Основным источником углерода для них являются простые сахара либо многоатомные спирты или органические кислоты, используемые некоторыми представителями. Большинство представителей *Acidobacteria* могут усваивать глюкуроновую и галактуроновую кислоты, накапливающиеся в среде при разложении сфагнов. Способность к деструкции различных природных полимеров растительного происхождения различается у разных представителей этой филы, и только *T. bradus* способны гидролизовать целлюлозу. *B. elongata* проявляла способность развиваться как со-культура ацидофильных метанотрофов, обильно продуцирующих экзополисахариды, и в качестве источника питания использовала их капсульный материал. Ни один из культивируемых представителей *Acidobacteria* не способен фиксировать молекулярный азот, однако эта фила играет важную роль в деградации природных полимеров растительного происхождения в кислых олиготрофных болотах (Dedysh, 2011).

1.1.2.3. Actinobacteria

К настоящему времени показано, что в состав микробных сообществ торфяных отложений входят несколько видов *Actinobacteria*, в основном из рода *Mycobacterium* (Kazda и Müller, 1979; Kazda, 1980), а также член семейства *Micromonosporaceae*, *Verrucosipora gifhornensis* (Rheims et al., 1998). Все они хорошо утилизируют простые сахара и некоторые многоатомные спирты и ароматические соединения, но при этом, ни у одного из них не обнаружена способность к деградации целлюлозы.

1.1.2.4. Bacteroides

В отличие от водных и почвенных биотопов, представители *Bacteroides* обычно менее распространены в кислых торфяных болотах северных широт, и, как правило, не обладают способностью к деструкции природных полимеров, таких как целлюлоза или хитин. Примером могут служить два представителя этой филы - *Mucilaginibacter spp.* (Pankratov et al., 2007) и *Chitinophaga arvensicola* (Pankratov et al., 2006). Штаммы *Chitinophaga arvensicola* были способны гидролизовать ламинарин, микробные полисахариды, казеин эксулин и желатин. Некоторые штаммы были способны деградировать агар, ксилан и крахмал, но ни один из них не был способен к деградации целлюлозы, хитина и пектина, а также восстанавливать нитрат. Штаммы обладали способностью к психрофильному росту в кислых интервалах pH(4,0-5,0) и низких концентрациях кислорода в среде; бактерии предположительно являются компонентами ассоциаций, осуществляющих первичную деструкцию полисахаридов болотных растений (Панкратов, 2007, автореф. дисс.).

Представители *Mucilaginibacter* принадлежали к семейству *Sphingabacteriaceae*, но имели лишь 91-93% сходства генов 16S рНК с представителями *Pedobacter* и *Sphingobacterium*, по совокупности физиологических, хемотаксаномических и генотипических анализов изоляты были отнесены к новому роду. Данные штаммы характеризовались способностью к обильной продукции экзополисахаридов и образовывали крупные слизистые колонии желто-кремового или розового цвета. Представители *Mucilaginibacter* – это неподвижные граммотрицательные палочки длиной 1,5- 40 мкм, концы клеток закругленные или слегка заостренные, которые на плотных средах могут быть собраны в цепочки. Рост аэробный, но могут расти и анаэробно за счет сбраживания глюкозы (Панкратов, 2007, автореф. дисс.).

1.2.3. Микроорганизмы - ассоцианты сфагновых мхов

Бореальные торфяные болота, как правило, подразделяются на две категории согласно характеру доминирующих растительных сообществ и гидрологии (Payette, 2001; Rydin et al., 2006).

Омбротрофные болотные экосистемы обычно бедны питательными элементами, и единственным источником их поступления являются осадки. Такие торфяники обычно имеют низкий показатель рН воды, в пределах 3,7-4,1, а также крайне низкое содержание минеральных элементов питания. В растительном покрове преобладают сфагновые виды мхов, такие как *Sphagnum fuscum*, *Sphagnum rubellum*, *Sphagnum capillifolium*, *Sphagnum cuspidatum* и *Sphagnum magellanicum*, а также некоторые виды вересковых, например *Kalmia sp.*, *Ledum sp.*, *Chamaedaphnaea calyculata* (характерны для Северной Америки) и *Calluna vulgaris*, *Erica tetralix* (чаще встречаются в Европе). Травянистые виды растений, такие как *Eriophorum vaginatum*, и плотоядные *Drosera rotundifolia*, *Sarracenia purpurea* типичны для таких болот наряду с деревьями *Picea mariana* (Канада), *Pinus silvestris* (Европа), *Larix laricina*. Торфяники с минеротрофным типом питания были исторически разделены на олиготрофные и мезотрофные, и характеризовались соответствующими значениями рН 3.8-6.5 и 5.8-8.4 (Sjörs, 1950). Тем не менее, олиготрофные болота не отличаются большим разнообразием видов растений, чем омбротрофные торфяники, однако и там и там доминирующими видами растений остаются сфагновые мхи. Мезотрофные болота обычно колонизированы истинными мхами (*Amblystegiasceae*), осокоцветными (*Carex*, *Trichophorum*, *Scirpus* spp.), а также кустарниками (*Salix sp.*, *Betula sp.* и др.). Богатые питательными элементами, лесные торфяники, могут рассматриваться в качестве третьей категории в этом подразделении: они и имеют нижний ярус из сфагнов и истинных мхов, подлесок, состоящий из кустарниковых и осоковых, и ярус древесных пород (например, ели), что отличает их от других и может влиять на состав ассоциированных с этими растениями микробных сообществ. Микробиологическая

активность и функциональный состав микробных сообществ, как было показано, сильно различаются для торфяников с разнообразным растительным покровом, с преобладанием сфагново-кустарникового покрова, и для лесных и осоковых орфяников (Börge et al., 1994; Fisk et al., 2003).

Основной и часто доминантный растительный компонент болот - сфагновые мхи - своеобразный и уникальный подкласс мохообразных, почти космополитный, распространен от тропиков (в горах) к югу и северу, через умеренные зоны до субантарктической и арктической областей включительно. Подкласс Сфагновые мхи представлен одним порядком *Sphagnales*, одним семейством *Sphagnaceae* с одним родом сфагнум (*Sphagnum*), объединяющим свыше 300 видов, которые морфологически довольно трудно различаются. В России произрастает 42 вида. Сфагновые мхи наиболее широко распространены в умеренной зоне Северного полушария, где на обширных пространствах они формируют верховые сфагновые болота. Поселяясь на влажных местах, многие виды сфагнума способствуют быстрому заболачиванию этих территорий благодаря способности активно и быстро поглощать влагу и прочно ее удерживать. Это объясняется высокой специализацией их морфологического и анатомического строения.

Эндوفитная колонизация гиалиновых клеток *Sphagnum* sp. микроорганизмами была отмечена Стewardом (Stewart, 1966), позднее, более детально с использованием электронной микроскопии, была описана также в других работах (Granhall и Hofsten, 1976). Вегетативные клетки и гетероцисты цианобактерий описываются авторами внутри гиалочитов *S. girarium*, при этом клетки собраны в агрегации и погружены в слизистый матрикс, продуцируемый самими цианобактериями. Кроме того, в дополнение к цианобактериям, внутри гиалочитов сфагнов были обнаружены гетеротрофные бактерии, *Methanosarcina*-подобные бактерии и мицелий грибов. Основываясь на наблюдении, что сфагновые мхи, имеющие цианобактериальных ассоциантов, обладают большей скоростью роста, чем мхи, не имеющие таковых, была предложена модель (Granhall и Hofsten, 1976) переноса химических соединений между растением-хозяином и различными микробными ассоциантами, эндифитно населяющими гиалочиты. Согласно этой модели, имеют место быть не только взаимодействия между цианобактериями и растением-хозяином, но и между цианобактериями и другими гетеротрофными бактериями внутри закрытого клеточного пространства. Такие гетеротрофные бактерии могут использовать азотные и углеводные компоненты, продуцируемые цианобактериями, в то же время, бактериальное дыхание и поглощение азота стимулируют процессы азотфиксации, увеличение уровня CO₂ и снижение концентрации кислорода. В это же время, продукты азотфиксации, такие как водород и аммоний, могут использоваться метаногенными бактериями.

1.1.3.1. Метанотрофные и метаногенные ассоцианты сфагновых мхов

Вопрос о возможности населения внутренних тканей растений сфагновых мхов метанотрофными микроорганизмами впервые детально затронут в недавних работах (Raghoebarsing et al., 2005, 2006; Kip et al., 2011a). Данные исследования касались изучения симбиотической взаимосвязи сфагновых мхов и метанотрофных бактерий, обеспечивающих поставки углерода для построения самих растений. Основываясь на исследованиях группы Дедыш (Dedysh, 1998, 2000, 2002), было высказано предположение, метанотрофные бактерии не просто находятся в болотной воде или оседают в торфяных отложениях, но и что сфагновые мхи и их внутренние части являются местообитаниями для таких бактерий. Исследования кортекса стеблей *Sphagnum cuspidatum* с помощью методов флюоресцентной *in situ* гибридизации и эпифлуоресцентной микроскопии показало, что внутренняя часть гиалиновых клеток заселена метанотрофными бактериями. В данном случае, авторы использовали для гибридизации групп-специфичную олигонуклеотидную пробу Alf968, предназначенную для выявления всего кластера альфапротеобактерий. Характерной особенностью расположения микробных клеток является то, что бактерии не просто плавают в жидкой среде, заполняющей гиалопиты, а закреплены на их внутренней поверхности, образуя микроколонию.

Секвенирование фрагментов гена 16S рНК из поверхностно отмытых частей растений *S. cuspidatum* показало, что доминирующими представителями метанотрофов, населяющих внутренние ткани растений сфагнума являются *Methylocella palustris* и *Methylocapsa acidiphila*. Авторами высказывается предположение об участии данных бактерий в симбиозе с растениями сфагнов, обеспечивающем ассимиляцию углерода из метана и его аккумуляцию в болотных экосистемах в виде растительной ткани. По разным оценкам, до 10–15 (Raghoebarsing et al., 2005) либо до 10–30% (Larmola et al., 2010) углерода, входящего в состав биомассы сфагновых мхов получено из метана за счет деятельности метаноокисляющих бактерий.

Кип с соавт. (Kip et al., 2011b), применяя методы анализа генов *pmoA* и пиросеквенирования, изучили метанотрофные бактерии, населяющие внутренние части сфагнов. Были исследованы образцы сфагнов из различных географических точек болотных экосистем Нидерландов и Бельгии, в частности такие виды как *Sphagnum cuspidatum* и *Sphagnum denticulatum*. Показано, что доминантными компонентами эндофитных микробных сообществ являются метаногенные альфапротеобактерии из родов *Methylocystis* и *Methylosinus*. Кроме того, с использованием метода меченых атомов, было установлено (Kip et al., 2010), что углерод из молекул метана вовлекается в метаболизм растения и накапливается в его липидных включениях, что таким образом доказывает симбиотические отношения между сфагнами и метанотрофами.

В данных работах для обозначения метанотрофов, ассоциантов сфагнов, применяется именно термин «эндофиты», несмотря на специфическое строение этих растений. Кроме того, приводятся сведения о выделении представителей *Burkholderiales* и *Pseudomonaceae* spp., не обладающих метаноокисляющей активностью и, поэтому, не находящихся в фокусе исследований, а домен *Gammaproteobacteria* представлен был в основном родами *Methylobacter* и *Methylomonas*.

Далее, в условиях полевых экспериментов в тундре (Восточная Сибирь) (Parmentier et al., 2011) было продемонстрировано, что эмиссия метана в атмосферу зависит от типа преобладающей болотной растительности, в частности, в болотах, где доминантным компонентом растительности были сфагновые мхи, эмиссия была в два раза ниже, чем в болотах с преобладанием осоковой и кустарниковой растительности. Авторы связывают это явление с ассимиляцией метана эндофитными бактериями, ассоциированными со сфагновыми мхами.

Недавно было предложено понятие «сфагнум-ассоциированная метанотрофия» (Larmola et al., 2010; Putkinen et al., 2012), включающее в себя целенаправленный симбиоз между сфагновыми мхами и метанотрофными бактериями, которые колонизируют внутренние части растений и ассимилируют метан.

Данные исследования были направлены на изучение явления реактивации метаноокисляющей способности симбиоза после засухи. Авторы задались вопросом, за счет чего возобновляется ассимиляция метана при подъеме уровня воды в болотной экосистеме: за счет выживших после засухи внутри растения метанотрофов или за счет метанотрофов, находившихся в грунтовой воде, и активно колонизирующих растение сфагнов при подъеме ее уровня. Объектом для экспериментов послужили образцы *S. rubellum*, отобранные в бореальном болотном массиве на юге Финляндии. В ходе данных исследований было установлено, что искусственная трансплантация растений сфагнов, не обладающих комплексом метаноокисляющих микроорганизмов, к другой части растений, обладающих таким комплексом, через три дня приводит к колонизации «не активных» растений метаноокисляющими бактериями. Мiсroаgгау-анализ показал, что состав метанотрофов в обеих группах растений одинаков, и основным и доминирующим компонентом являются представители *Methylocystis*-подобных групп микроорганизмов.

Во второй части исследования образцы *S. rubellum*, не обладающие комплексом метанотрофов, погружали в болотную воду, не фильтрованную, в которой присутствовали метанотрофы, и воду, стерилизованную фильтрацией. Показано, что метанотрофы, присутствующие в воде, активно заселяли растения сфагнумов, увеличивая количество копий рmоА-гена более чем в 60 раз.

Исследования физиолого-биохимических свойств выделяемых штаммов метанотрофных бактерий показало (Kir, 2010), что почти все штаммы бактерий обладали способностью к росту на безазотных средах, часть штаммов проявляла способность продуцировать этилен на средах в условиях содержания кислорода 5-10%.

1.1.3.2. Азотфиксирующие ассоцианты сфагновых мхов

Ассоциации между бриофитами и азотфиксирующими микроорганизмами были известны и описаны довольно давно (Alexander et al., 1974; Granhall, 1976; Basilier et al., 1978) и особую роль в таких ассоциациях играют цианобактерии (Gentili et al., 2005). Специальных морфологических структур для таких ассоциативных взаимодействий, наподобие присутствующих у лишайников, у мохообразных нет; колонизация цианобактериями растений мхов идет путем эпифитного заселения, либо внутриклеточного проникновения в мертвые гиалиновые клетки (Solheim and Zielke, 2003).

Согласно ранее проведенным исследованиям, наши знания о цианобактериях, ассоциированных с мохообразными, касаются в основном полярных и субполярных областей. В таких областях земного шара, цианобактерии в ассоциациях с мохообразными являются главным действующим лицом в процессах фиксации молекулярного азота и обеспечении продуктивности таких экосистем (Solheim and Zielke, 2003).

Таксономия цианобактерий, ассоциированных с мохообразными антарктических областей была изучена довольно детально (Broady, 1987; Ohtani и Kanda, 1987; Fumanti et al., 1997; Alfinito et al., 1998), но лишь небольшое число цианобактериальных такс было обнаружено в таких ассоциациях, доминантными же видами являлись *Phormidium frigidum* Fritsch и *Nostoc commune* Vaucher, часто также встречались *Microcystis parasitica* Kutzing (Alfinito et al., 1998). Джордан с соавт. (Jordan et al., 1978) выявили представителей *Nostoc*, как эпифитного обитателя листьев арктических мхов, наряду с *Oscillatoria* и *Anabena*. Основным механизмом передачи цианобактериальных ассоциантов, по-видимому, является пассивный перенос микробных клеток от растения к растению с током воды (Solheim and Zielke, 2003), однако хемотаксис и активная колонизация цианобактериями растений-хозяев также обсуждалось ранее (Rai et al., 2000).

На сегодняшний день сведений об эпи- и эндофитной колонизации цианобактериями растений мохообразных накоплено достаточно много: это данные и о неравномерности заселения мхов эпифитными бактериями (Broady, 1979), об азотфиксирующей активности ассоциаций цианобактерий и бриофитов (Smith, 1984), предложена также модель внутриклеточной активной колонизации сфагновых мхов цианобактериями (Granhal, 1976). Во многих случаях отмечается преобладание численности цианобактерий в средней, зеленой части растений мхов

над численностью в их верхней апикальной части. Броди с соавт. (Broady, 1979), исследовали вертикальное микрораспределение фототрофов (включая трех представителей цианобактерий) в растениях мхов на протяжении более трех лет. Была предложена модель роста и жизненных циклов *Nostoc muscorum* в побеге растений мха. В начале лета, талломы с гетероцистами обнаруживались в первичных апикальных структурах растения, затем, когда растение начинало расти, трихомы цианобактерий фрагментировались и подвижные гормогонии высвобождались и поднимались вверх вместе с растущим побегом мха. Таким образом, гормогонии достигали сайта стареющей терминальной почки, где и образовывали гетероцисты. Молодые побеги растений не имели при этом внутри себя цианобактериальных ассоциантов, а в стареющих частях растений, и растительная ткань и цианобактериальные ассоцианты отмирали, привнося органические вещества в окружающую среду. Таким образом, авторы предполагают, что *Nostoc muscorum* образует такие специфические подвижные структуры для поддержания популяции в регионах с высоким уровнем солнечной активности. Сфагновые мхи являются местообитанием для цианобактерий, к примеру, для *Nostoc sp.*, которые колонизируют растения эпифитно и эндофитно (Granhall и Selander, 1973; Granhall и Hofsten, 1976). Наполненные водой гиалиновые клетки сфагнов, являются микронишами для этих цианобактерий, а внутриклеточная колонизация осуществляется через поры в гиалиновых клетках. Granhall и Hofsten (1976) выявили *Nostoc sp.* внутри тканей *Sphagnum lindebergii* и *S. riparium*, однако *S. balticum*, *S. fuscum*, *S. annulatum* цианобактерии не колонизировали. Фактором, определяющим либо внутриклеточный либо эпифитный процесс колонизации, авторы считают показатель pH в экосистеме. При низких значениях pH 4,2-4,9, характерных к примеру для местообитаний *S. lindebergii* и *S. riparium*, цианобактерии, «избегая» кислой среды, колонизируют сфагны внутриклеточно, в случае еще более кислых условий (pH ниже 3,8, характерный для местообитаний *S. balticum*, *S. fuscum*, *S. annulatum*), жизнедеятельность цианобактерий подавляется вовсе. При более высоких значениях pH, цианобактерии колонизируют сфагновые мхи эпифитно, либо вовсе ведут свободноживущий образ жизни (Granhall и Selander, 1973).

Джордан с соавт. (Jordan et al., 1978), исследуя мхи наземных местообитаний арктической Канады, обнаруживал в основном представителей *Nostoc sp.*, эпифитно колонизирующие различные мхи. Хотя крупные глобулярные колонии *Nostoc* присутствовали на верхушках листьев мхов, авторы не разграничивали колонизацию растений на эпифитный и эндофитный типы. С использованием методов сканирующей электронной микроскопии (Scheirer и Dolan, 1983) было выявлено широкое разнообразие различных групп микроорганизмов на поверхности *Polytrichum commune* Hedw. Азотфиксирующие цианобактерии изучались также на поверхности *Funaria hygrometrica* в эвкалиптовых лесах Южной Тасмании с помощью методов эпифлуоресцентной микроскопии (Scheirer и Brasell, 1984). Гетероцисты

цианобактерий были обнаружены на нижней половине гаметофоров мхов и среди ризоидов в базальной части стебля. В противоположность, Броди (Broady, 1979) и Смит (Smith, 1984) обнаруживали цианобактериальных ассоциантов на верхних зеленых частях растений мхов. Также было показано (Solheim et al., 1996), что некоторые виды мхов, такие как *Sanionia uncinata* и *Calliergon richardsonii*, специально адаптированы для ассоциации с азотфиксирующими цианобактериями.

Солхейм с соавт. (Solheim и Zielke, 2003) исследовали распространение цианобактерий и их ацетиленредуктазную активность в ассоциациях с мохообразными и получили результаты сходные с результатами Броди, Смита и др. авторов. Используя методы эпиллюминесцентной и лазерной конфокальной микроскопии, авторы исследовали ассоциации между различными видами мхов Арктики (о. Шпицберген) и субарктики (Абиско, Швеция) и цианобактериями. Было установлено, что цианобактерии в основном локализируются вдоль листьев, а иногда и внутриклеточно, например у *S. uncinata*. Наилучшие изображения локализуемых цианобактерий были получены с использованием конфокальной лазерной микроскопии, однако основной трудностью в изучении локализации цианобактериальных ассоциантов являлось сложность подготовки и правильной фиксации полых стеблей растений. Были получены изображения высокого разрешения, на которых видно, что цианобактерии занимают пространство внутри матрикса между листьями и стеблями растения, а матрикс в этом случае играет роль в обеспечении стабильности ассоциации и делает передачу различных веществ между микро- и макроорганизмом более эффективной.

Использование радиоактивно меченного молекулярного азота (Alexander et al., 1974) позволило показать быстрый процесс ассимиляции азота цианобактериями и его перенос в растение мха. Кроме того, было показано присутствие огромного числа различных гетеротрофных бактерий, находящихся во взаимосвязи с цианобактериями и растением-хозяином.

Хотя объемы фиксированного молекулярного азота в полярных регионах значительно ниже, чем в умеренных и тропических, они все же составляют значительный источник его поступления в наземные полярные экосистемы (Alexander, 1974; Chapin and Bledsoe, 1992). Поступление соединений азота в такие экосистемы с осадками крайне низко, равно как и его фиксация почвенными бактериями в связи с низкими температурами и ограниченными источниками питания в почве (Jordan et al., 1978; Smith, 1985). Хотя свободноживущие азотфиксирующие цианобактерии имеют высокий потенциал, их вклад в процессы ассимиляции азота крайне низок, поскольку данные микроорганизмы лимитированы в распространении, ограничены низкой выживаемостью из-за высыхания верхнего слоя почвы. Симбиотические системы между азотфиксирующими бактериями и бобовыми растениями редко встречаются в субполярных регионах, в арктических же областях они не

распространены вовсе (Henry и Svoboda, 1986). Однако, по разным оценкам, количество фиксируемого молекулярного азота в арктических регионах составляет 19-255 мг N м⁻² в год (Chapin and Bledsoe, 1992) или 10-192 мг N м⁻² в год (Vincent, 2000). Доддс (Dodds et al., 1995) полагает, что вклад цианобактерий, ассоциированных с мохообразными, в обеспечение ассимиляции атмосферного азота составляет 2-58% для арктических и 42-84% для антарктических регионов. Было также показано (Bazely и Jefferies, 1989), что азот, выносящийся из таких экосистем, восполняется за счет активизации азотфиксации цианобактериями.

Для умеренных и тропических регионов вклад цианобактерий, ассоциированных с мохообразными, может быть высоким в некоторых специфических местообитаниях. К примеру, было показано (Basilier, 1979), что сфагновые мхи ассоциированы с азотфиксирующими цианобактериями только в пределах открытых болотных экосистем, в умеренных хвойных лесах сфагновые мхи не несут в себе азотфиксирующих цианобактериальных ассоциантов, а их нитрогеназная активность крайне низка и обеспечивается за счет деятельности гетеротрофных бактерий. Активность ассимиляции азота сфагнум-ассоциированными цианобактериями в открытых болотах умеренных широт составляет 37,9 кг N га⁻¹ в год (Granhall и Lindberg, 1978), при этом она сильно зависит от таких параметров как влажность и освещенность (Vlassak et al., 1973). Влияние различных абиотических факторов на активность фиксации атмосферного азота цианобактериальными ассоциантами мхов было показано во многих исследованиях (Dickson, 2000; Solheim et al., 2002 и др). Основными факторами, отмеченными в этих работах, являются температура, влажность, освещенность и наличие компонентов питания.

1.1.3.3. Гетеротрофные бактерии, ассоцианты сфагновых мхов

Впервые внутриклеточная колонизация гиалиновых клеток сфагнов гетеротрофными бактериями упоминается в работах шведских ученых (Granhall и Hofsten, 1976), в которых при помощи методов электронной микроскопии показано присутствие не только цианобактерий, но и гетеротрофных бактерий.

Наиболее полные данные о гетеротрофных бактериях-ассоциантах сфагновых мхов, полученные в том числе и с помощью молекулярно-генетических методов исследования, были освещены в работах группы Берг (Opelt и Berg, 2004; Vandamme et al., 2007; Opelt et al., 2007; Bragina et al., 2012).

Группой исследователей под руководством проф. Берг изначально исследовались не только ассоцианты сфагновых мхов, но и других представителей *Bryophyta*, например *Tortula ruralis*, *Aulacomnium palustre*, типичных компонентов растительных сообществ южного побережья

Балтийского моря (Opelt и Berg, 2004). С использованием методов электронной микроскопии показано присутствие отдельных клеток гетеротрофных бактерий на поверхности растений. Методами молекулярно-генетического анализа были выявлены доминирующие группы бактерий, ассоциированные со *Sphagnum rubellum*, среди которых доминировали рода *Pseudomonas*, *Serratia*, *Burkholderia*; субдоминантные кластеры были представлены *Acetobacter*, *Acidocella* и др. Путем посева на плотные питательные среды было выявлено широкое разнообразие бактериальных групп, ассоциантов *Sphagnum*. Общая же численность гетеротрофных бактерий, изолированных из тканей сфагнов, составляла 10^5 - 10^6 КОЕ/г растительной ткани.

Среди бактерий, выделенных в чистые культуры, доминировали представители *Pseudomonas* (*P. putida*, *P. sp.*), *Serratia* (*S. proteamaculans*, *S. liquefaciens*), *Burkholderia* (*B. phenazinium*, *B. fungorum*), кроме того указывается присутствие таких родов как *Collimonas*, *Xantomonas*, *Bacillus*. Из 83 штаммов, исследованных на наличие антагонистической активности, 99% имели фунгицидные свойства против *Verticillium dahliae*.

Позднее, с использованием метода SSCP, было показано (Opelt., et al., 2007a), что состав микробного сообщества варьирует в зависимости от вида мха (исследовались образцы гаметофитов двух видов мхов – *Sphagnum magellanicum* и *S. fallax*), при этом образцы мхов одного вида, отобранные в Германии и Норвегии, имели сходный состав микробиоты.

Методом посева на плотные питательные среды из поверхностно стерилизованных образцов *S. fallax* и *S. magellanicum* было выделено порядка 1222 изолятов гетеротрофных бактерий (Opelt., et al., 2007b). Молекулярно-генетическая идентификация выявила представителей следующих доминирующих родов бактерий: *Burkholderia*, *Serratia*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Dyella*, а также единичных представителей *Moraxella*, *Microbacterium*, *Streptomyces*, при этом, более 26% выделенных штаммов обладало фунгицидной активностью против *V. dahliae* и *R. solani*. Процентное соотношение штаммов, обладающих фунгицидной активностью против фитопатогенов, был выше для *S. fallax*. Среди выделенных штаммов сфагнум-ассоциированных микроорганизмов особое положение занимали различные виды *Burkholderia*, несущие в себе *nifH* гены, и, по-видимому, обладающие азотфиксирующей активностью.

Были проведены многофакторные таксономические исследования (Vandamme et al., 2007), включая ДНК-ДНК гибридизацию и физиолого-биохимическую характеристику 14 штаммов, представителей р. *Burkholderia*, выделенных из гаметофитов сфагновых мхов. На основании полученных данных были описаны два новых вида – *Burkholderia bryophila* и *B. megapolitana*, которые, по мнению авторов, являются специфическим компонентом микробных сообществ, ассоциированных со сфагновыми мхами. Изученные штаммы также характеризовались

наличием антагонистической активности против *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani* и *Candida albicans*.

Несмотря на присутствие высокой доли штаммов, обладающих антагонистической активностью против грибных фитопатогенов, авторами приводятся сведения о колонизации сфагновых мхов бактериями, относящимся к родам, среди представителей которых большинство являются оппортунистическими или условными патогенами человека и теплокровных животных (Opelt et al., 2007c). Например, среди штаммов бактерий, выделенных из тканей *S. fallax* и *S. magellanicum*, выявлены представители родов *Staphylococcus*, *Hafnia*, *Yersinia* и *Pantoea*. Однако сведения о реальной патогенности выделенных штаммов для человека и животных авторами в данных исследованиях не приводятся.

Проведение детального молекулярно генетического исследования тотальной ДНК, выделенной из тех же видов мхов (*S. fallax* и *S. magellanicum*) и анализ библиотек клонов позволило установить (Bragina et al., 2012), что доминирующими компонентами среди микробного населения *S. magellanicum* являются некультивируемые виды *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*. Состав микробного сообщества другого вида мха *S. fallax* сильно отличается, здесь доминируют представители *Verrucomicrobia* и *Planctomyces*. Авторы проводят анализ зависимости состава специфических микробных сообществ сфагновых мхов от абиотических факторов среды обитания этих видов, таких, как обеспеченность питательными веществами и рН водной среды и высказывают предположение, что состав микробного сообщества может модифицироваться при изменении внешних условий.

1.1.3.4. Дрожжи и грибы арбускулярной микоризы - ассоцианты мхов.

Сфагновые мхи являются специфическими местообитаниями для эпифитных дрожжей (Kachalkin et al., 2007), состав эпифитного дрожжевого сообщества сфагновых мхов отличается от такового для других сосудистых растений, обитающих в том же экотопе. По данным исследователей, средняя численность эпифитных дрожжей составляла $1,5 \times 10^3$ КОЕ/г растительной ткани для видов *Sphagnum girgensohnii* Russ., *S. magellanicum* Brid., *S. balticum* (Russ.) C.Jens., и *S. angustifolium* (Russ.) (Kachalkin et al., 2007), при этом прослеживалась сезонная динамика численности дрожжей ассоциированных со сфагнами: минимальные значения численности приходятся на поздне-осенний и зимний периоды, а максимальные - на весну (Качалкин, 2010, автореф. дисс).

Видовой состав эпифитных дрожжей болотных растений включал в себя более 70 видов (Качалкин, 2010, автореф. дисс), при этом доминирующие виды на сфагновых мхах и сосудистых растениях одинаковы. В среднем около 50% приходится всегда на два вида: *Rhodotorula mucilaginosa* и *Cryptococcus magnus*. Однако состав минорных видов

принципиально различен. Основные отличия в дрожжевом сообществе между сфагновыми мхами и сосудистыми растениями проявляется в значительном присутствии в моховой дернине разнообразных психрофильных видов дрожжей.

Впервые симбиозы между микоризными грибами и бриофитами были описаны в начале прошлого века (Rauner, 1927), позднее упоминаются в нескольких работах (Kelley, 1950; Gerdemann, 1968; Harley 1969). В дополнение, имеются сведения о формировании арбускулярных микоризных симбиозов с лишайниками (Turnau et al. 1999; Schübler 2000; Russell, Bulman, 2005).

Внутри представителей рода *Sphagnum* гифы и везикулы несептированных эндофитных грибов, сходных с арбускулярной микоризой (АМ) высших растений впервые были обнаружены в работах Бутлера (Butler, 1939).

Доунинг (Downing, 1959) описал встречаемость грибов АМ *Endogone fasciculata* (= *G. fasciculatum*) в мохообразных болотах Альберта (Канада), которые локализовались в грунте, а также вокруг корней растений и в (или вокруг) листьях растений мха. Рабатин (Rabatin, 1980) сообщает о формировании АМ гриба *G. tenuis* с растениями мха *Pogonatum*, однако проникновение гифов внутрь тканей растений при этом не отмечено. Споры, гифы и везикулы *G. epigaeum* были обнаружены у мха *Funaria hygrometrica* только в случае произрастания рядом с растением-«компаньоном» - аспарагусом (Parke, Linderman, 1980).

Подробное изучение структуры микоризного симбиоза у различных видов мохообразных было проведено в последнее время (Zhing, Guo, 2007). Из 24 видов мхов 16-и различных семейств споры, везикулы, внутриклеточные и внеклеточные гифы были обнаружены у 21 (88%) вида мха, но в отличие от более ранних описаний (Dowding 1959; Rabatin 1980; Parke, Linderman, 1980) грибы арбускулярной микоризы формировали эти структуры внутри стеблей и листьев мхов, но не внутри ризоидов. Такое необычная локализация грибов АМ не удивительна в свете того, что зеленые листья мхов сформированы неспециализированной паренхиматозной тканью, сходной по структуре с недифференцированной кортикальной тканью корней высших растений. Среди грибов, выделенных из растений мхов, 11 было отнесено к роду *Glomus*, 2 - к роду *Acaulospora*, один - к *Gigaspora* и один - к роду *Paraglomus*. *G. sinuosum* was был обнаружен в растениях мхов 9-и видов (69%), *G. ambisporum* - в трех видах, а также *G. fasciculatum*, *G. microaggregatum*, и *Glomus sp.* - в двух видах.

1.2. Полезные растительно-микробные системы в сельскохозяйственной биотехнологии. Основные востребованные и перспективные направления развития.

Современное высокоэффективное сельскохозяйственное производство невозможно без применения удобрений и средств защиты растений. Так, широкое использование минеральных удобрений, в первую очередь азотных, позволило за последние 50 лет более чем в 5 раз поднять урожайность основных сельскохозяйственных культур в развитых странах. Однако процесс получения и применения минеральных удобрений является наиболее энергоемким - на него расходуется до от 30 до 50% всей энергии, потребляемой в сельскохозяйственном производстве. Применение минеральных удобрений оказывает негативное влияние на здоровье человека, биоразнообразие, выброс парниковых газов, плодородие почв и только в Европе требует компенсационных затрат от 70 до 320 млрд. евро ежегодно (Sutton et al., 2011).

Корни растений служат для поглощения элементов минерального питания и воды для роста растений (Bewley, Black, 1993). Кроме того, они выделяют широкий спектр органических соединений, поступающих в ризосферу растений, где осуществляется активная микробная деятельность. Таким образом, ризосфера является тем местом, куда необходимо интродуцировать полезные микроорганизмы в качестве инокулянтов: биоудобрений, фитостимуляторов и биопестицидов (Чеботарь, Завалин, Кипрушкина, 2007). Это может привести к значительному увеличению урожая и качества продукции, снижая при этом хемогенную нагрузку на окружающую среду.

Таким образом, существует научно-обоснованная необходимость обеспечить современное земледелие высокоэффективными микробными препаратами для обработки не менее 20 млн. га посевных площадей, что определяется структурой посевных площадей и результатами многолетних испытаний эффективности биопрепаратов в РФ (Тихонович с соавт., 2005). 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. Большинство научных исследований направлено на изучение ризосферных микроорганизмов (Lindow, Brandl, 2003; Kuiper et al., 2004; Berg et al., 2005).

Использование биологического потенциала микроорганизмов, населяющих корни и внутренние ткани бобовых и небобовых растений, позволяет создавать высокоэффективные биопрепараты для сельского хозяйства (Schippers, 1995). Колонизация корней растений интродуцируемыми высокоэффективными микроорганизмами является наиболее важным моментом для функционирования высокоэффективных растительно-бактериальных

ассоциаций. Успех при нанесении полезных микроорганизмов на семена или проростки растений зависит от колонизационного потенциала интродуцируемых штаммов (Weller, 1988; Shippers et al., 1987). В последнее время в мировой практике разработан ряд биопрепаратов, 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 продукции (Okon, Labandera-Gonzalez, 1994). В некоторых случаях применение биопрепаратов позволяло защитить растения от болезней, заменяя таким образом, химические пестициды (Weller, 1988; Chebotar et al., 2009).

К настоящему времени выделяют следующие востребованные ветви развития сельскохозяйственной микробиологии, связанные с исследованием, разработкой и применением высокоэффективных микробиологических препаратов для растениеводства:

- Разработка, производство, применение микробиологических препаратов стимулирующего действия, обеспеченное продукцией полезными микроорганизмами различных биологически-активных метаболитов.
- Разработка, применение микробиологических препаратов защитного действия – так называемых биопестицидов.
- Разработка, применение микробиологических препаратов на основе полезных бактерий (фосфатмобилизующих, силикатных), способствующих более полному усвоению вносимых минеральных удобрений и малодоступных для растений органических и неорганических компонентов почвы.
- Разработка, производство, применение микробиологических препаратов, обеспечивающих переработку и уничтожение отходов сельскохозяйственного производства.
- Разработка, производство, применение микробиологических препаратов, способствующих восстановлению почвенных агроценозов, улучшающих плодородие и восстанавливающих баланс гумуса почвы, биопрепараты для биологической очистки почв, загрязненных нефтепродуктами, радионуклеидами, тяжелыми металлами и агрохимикатами.

Далее, речь пойдет о тех востребованных направлениях развития сельскохозяйственной биотехнологии, которые упоминаются в исследованиях представленной диссертационной работы.

1.2.1. Микроорганизмы - продуценты биопрепаратов стимулирующего действия.

Хотя о существовании бактерий не было известно вплоть до их открытия Левенгуком в 1683, их косвенное использование для стимулирования роста растений было известно с древних

времен. Теофраст (372-287 до н.э.) предлагал смешивать различные типы почв с целью увеличения их плодородия и повышения урожайности возделываемых растений (Tisdale и Nelson, 1975). Вергилий описывал выращивание бобовых на обрабатываемых землях и продемонстрировал их положительное влияние в повышении урожайности почв (Chew, 2002). Гельригель и Вилфарф (Hellriegel, Wilfarth, 1888) исследовали ризосферную колонизацию у бобовых и трав и показали способность почвенных бактерий преобразовывать атмосферный азот в формы, доступные для растений. На основании своих экспериментов с редисом Клоппер и Шорт (Kloepper, Schroth, 1978) предложили термин «ризобактерии», который включает почвенные микробные сообщества, конкурентно колонизирующие корни растений, стимулирующие их рост и снижающие заболеваемость растений.

Позднее был предложен термин PGPR (Kloepper, Schroth, 1983) (от англ. «plant growth promoting rhizobacteria»), который может быть определен как обязательная часть микробной биоты ризосферы, сосуществующая в ассоциации с растением-хозяином и способствующая его росту и развитию. Кук (Cook, 2002) полагает, что PGPR – это важный критерий в управлении сельскохозяйственным потенциалом растений, а концепция PGPR теперь ограничивается только теми бактериальными штаммами, которые могут обладать хотя бы двумя из трех характеристик для отбора: агрессивная колонизация, стимуляция роста растений и биоконтроль (Weller et al. 2002; Vessey 2003). В соответствии со степенью ассоциации с клетками корней растений, PGPR могут быть классифицированы как внеклеточные ризобактерии, стимулирующие рост растений – ePGPR (от англ. «extracellular plant growth promoting rhizobacteria») и внутриклеточные ризобактерии, стимулирующие рост растений (от англ. «intracellular plant growth promoting rhizobacteria») (Martinez-Viveros et al. 2010). Внеклеточные PGPR существуют в ризосфере и ризоплане растений, а также в межклеточных пространствах коры корня, в то время, как внутриклеточные PGPR проникают внутрь специализированных структур корня. Внутриклеточные ризобактерии, стимулирующие рост и развитие растений подразумевают под собой схожее понятие – «эндофиты». В данной работе мы придерживались именно классического определения термина “эндофитные бактерии”, который включает в себя микроорганизмы, населяющие внутренние ткани здоровых растений и не несущих какого либо вреда для хозяина. Большинство PGPR, населяющие ризосферу и ризоплану растения, а также эндофитно колонизирующие ткани корневой системы растения, были классифицированы как представители родов *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Serratia*. Отдельной группой стоят представители семейства Rhizobiaceae (Wang, Martinez-Romero, 2000), включающего рода *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* *Rhizobium* и формирующие клубеньки на корнях бобовых растений.

В современной научной литературе накоплено достаточно много сведений об использовании бактерий группы PGPR для стимуляции роста растений и увеличении продуктивности сельскохозяйственных культур. Наибольшую эффективность среди группы PGPR обычно демонстрируют флуоресцентные псевдомонады и ряд бацилл, отличающиеся особенной активностью в колонизации корней и высокой способностью к продукции метаболитов-стимуляторов роста, что обеспечивает достоверное увеличение урожайности сельскохозяйственных культур (Khalid et al., 2004). Кроме того, высокая эффективность данных представителей PGPR для стимуляции роста корневой системы, поглощения питательных веществ и обеспечения устойчивости к неблагоприятным факторам также хорошо изучены (Malhotra, Srivastava, 2009). Немало препаратов на основе полезных бактерий из группы PGPR в настоящее время доступны как коммерческие продукты для повышения эффективности сельскохозяйственного производства. Наше понимание о PGPR в настоящее время сильно продвинулось на клеточном, геномном и протеомном уровне, а огромное количество штаммов PGPR различного таксономического положения с многофункциональными свойствами были описаны для их потенциального применения и приложения в современном сельском хозяйстве. Однако не менее важным является изучение механизмов и потенциальных возможностей этой группы ризосферных микроорганизмов для обеспечения и стабильности сельскохозяйственного производства. Возникает обоснованная необходимость в повышении уровня наших знаний о PGPR с целью селекции наиболее агрессивных штаммов-колонизаторов ризосферы и конкретных программ успешного адаптивного земледелия. Такие полезные растительно-микробные системы могут быть продуктивны за счет прямых и косвенных механизмов. Большинство видов PGPR оказывают свое стимулирующее влияние за счет прямых механизмов, выражающихся в фиксации молекулярного азота, продукции фитогормонов, витаминов, летучих стимуляторов роста, таких как этилен и 2,3-бутандиол (Ryu et al. 2003; Vessey 2003), сидерафоров (Schippers et al., 1988). В данном разделе остановлюсь на настоящем понимании известных, предполагаемых и спекулятивных механизмах взаимодействия PGPR и сельскохозяйственных культур.

1.2.1.1. Продукция бактериями регуляторов роста растений

Бактерии, относящиеся к группе PGPR, способны изменять «архитектуру» корня и стимулировать рост растений за счет продукции различных фитогормонов, таких, как ауксины, гибберелины и цитокинины (Клоергер et al., 2007). Большинство таких бактерий, а также некоторые патогенные и симбиотические микроорганизмы, выделяют ауксины и гибберелины в ризосфере растения, и тем самым играют важную роль в увеличении площади поверхности корня и количестве корневых волосков (Han et al., 2005). Недавние исследования аукин-

синтезирующих бактерий (Sraeren et al., 2007), как продуцентов фитогормонов, продемонстрировали, что ризобактерии могут синтезировать ИУК из триптофана различными путями, хотя в основном механизм синтеза ауксинов базируется на триптофан-независимых путях. Фитопатогенные бактерии часто используют индол-ацетамидный путь синтеза ИУК, которая индуцирует начало опухолеобразования у растений.

Суэйн с соавт. (Swain et al., 2007) сообщили о положительном влиянии ИУК, продуцируемой штаммами *Bacillus subtilis*, на ямс (*Dioscorea rotundata* L.): они обрабатывали бактериальной суспензией поверхность растения, что приводило к увеличению корневой системы, скорости роста стебля и количеству молодых побегов в сравнении с неинокулированными растениями. Потенциал *Azotobacter spp.* в сельском хозяйстве, как мощного продуцента ауксинов (7.3–32.8 мг/мл), был изложен Ахмадом (Ahmad et al., 2005). Аналогично, значительная стимуляция роста карликовых мутантов кукурузы и риса были обеспечены гибберелино-подобными веществами, продуцируемыми *Azospirillum spp.* (Voiero et al., 2007). Некоторые данные об активных микроорганизмах-продуцентах регуляторов роста сельскохозяйственных растений объединены в табл. 1.1.

Таблица 1.1. Продукция фитогормонов бактериями группы PGPR

Продуцируемый фитогормон	Вид	Растение-хозяин	Ссылка
ИУК	<i>Aeromonas veronii</i>	Рис	Mehnaz et al., 2001
	<i>Agrobacterium sp.</i>	Салат	Barazani et al., 1999
	<i>Alcaligenes piechaudii</i>	Салат	Barazani et al., 1999
	<i>Azospirillum brasilense</i>	Пшеница	Kaushik et al., 2000
	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Редис	Antoun et al., 1998
	<i>Commamonas acidovarans</i>	Салат	Barazani et al., 1999
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Рис	Mehnaz et al., 2001
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Редис	Antoun et al., 1998
Цитокинины	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Пшеница	Timmusk et al., 1999
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Соя	Garcia et l., 2001
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Рапс	Noel et al., 1996
Гиббереллины	<i>Bacillus sp.</i>	Ольха	Gutierrez-Manero et al., 2001
АЦК-дезаминаза	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	Горох	Сафронова с соавт., 2006
	<i>Variovorax paradoxus</i>	Кукуруза	Белимов с соавт., 2011

ИУК-опосредованная продукция этилена способствовала увеличению корневой биомассы, числа корневых волосков, а, следовательно, и площади поверхности корня у растений томатов (Ribaud et al., 2006). Использование цитокининов, продуцируемых ризобактериями, приводило к инициации деления клеток, увеличению ширины клеток, а также площади поверхности корня сельскохозяйственных культур за счет формирования большого количества боковых и придаточных корней (Werner et al. 2003). Недавно было установлено, что механизмы действия подобных фитостимуляторов, ведущих к общему развитию сельскохозяйственных культур, по-разному регулируются катаболической репрессией в основе физиологического механизма формирования биопленок (Zaied et al. 2009).

1.2.1.2. Ризосферные и эндофитные бактерии в основе микробиологических удобрений

Под микробиологическими удобрениями понимают субстанции на основе живых клеток бактерий группы PGPR, которые наносятся на семена либо поверхность сельскохозяйственного растения, при этом живые клетки бактерий активно (агрессивно) колонизируют ризосферу и внутренние части растения и стимулируют его рост и развитие, обеспечивая увеличение продуктивности сельскохозяйственной культуры. Термин «микробиологические удобрения» не может быть использован взаимозаменяемо с «зелеными» удобрениями, органическими удобрениями типа навоза и т. п., а также смесями органоминеральных удобрений. Интересно, что большинство PGPR обычно действуют как в качестве биоудобрения, так и в качестве биопестицида. К примеру, штамм *Burkholderia serapia* проявлял биоконтрольные свойства по отношению к *Fusarium spp.*, но в то же время был способен стимулировать рост и развитие с/х культур на почвах, бедных железом за счет продукции сидерофоров (Bevivino et al., 1998). Штамм *Bacillus subtilis*, продуцент микробиологического удобрения «Экстрасол», продуцирует ИУК, обеспечивая увеличение урожайности сельскохозяйственных культур, но в то же время обладает фунгицидной активностью против спектра фитопатогенных грибов (Чеботарь с соавт., 2007). Сообщается о ряде штаммов *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* и *Sinorhizobium*, как представителей PGPR, и потенциале микробиологических удобрений на их основе (Vessey, 2003).

Отношения между PGP-бактериями и растением-хозяином можно разделить на два уровня сложности: ризосферные и эндофитные взаимодействия. В ризосфере PGPR колонизируют поверхность корня, а также межклеточные пространства ризодермы растения (McCully, 2001). Такие взаимодействия тесно связаны с изменениями различных физико-химических свойств почвы, таких как показатель pH, влажность, парциальное давление кислорода, выделение экссудатов растением, что в свою очередь существенно влияет на колонизирующую

активность исследуемых штаммов (Griffiths et al., 1999). В случае эндофитных взаимоотношений, PGP-бактерии существуют в апопластных областях внутри растения. Существуют прямые свидетельства присутствия эндофитных бактерий в апопластных межклеточных пространствах тканей паренхимы (Dong et al., 1997) и ксилемы (James et al., 2001).

Таким образом, действие микробиологических удобрений обеспечивается прямой стимуляцией роста растения за счет продукции фитогормонов и сидерофоров, повышения доступности питательных веществ в ризосфере, биологической фиксации азота, увеличении общей площади поверхности корня, а также комбинацией всех перечисленных механизмов. Тем не менее, эффективность взаимодействия между PGPR и растением во многом зависит от того, где и как бактерии колонизируют растение.

1.2.1.3. Опыт применения и эффективность микробиологических удобрений

Применение микробиологических удобрений на основе штаммов бактерий из группы PGPR имеет высокий потенциал в решении вопросов мирового спроса на продукты питания и защиты окружающей среды за счет повышения урожайности с/х культур в различных агроэкосистемах (Minorsky, 2008). Инокуляция с/х растений различными штаммами бактерий этой группы способствует улучшению ростовых характеристик растения, таких как площадь листовой поверхности, содержание хлорофилла, общая биомасса растения. К примеру, эффект от инокуляции различных с/х культур штаммами *Azospirillum sp.* заключался в выраженном увеличении веса корневой системы и надземной части, лучшему цветению растений (Dobbelaere et al., 2001). Применение микробиологических удобрений по зеленым частям растений абрикоса и шелковицы приводило к увеличению общей площади листа и содержания хлорофилла (Esitken et al., 2003). Общая длина корня, а также площадь поверхности и объем плодов томатов и огурцов существенно увеличивались при инокуляции штаммами *Pseudomonas fluorescens* 92rk и P190r (Saravanakumar, Samiyappan, 2007). PGPR вызывали изменения внешних слоев коры корня путем усиления клеточного деления проростков кукурузы и пшеницы (Baset Mia et al., 2010). Обработка семян зерновых культур и декоративных растений смесью культур клеток PGPR и ризобий перед посадкой приводило к усиленному росту растений и повышению устойчивости к грибным заболеваниям (Zehnder et al. 2001). Отмечено (Khalid et al., 2004), что ответная реакция проростков пшеницы, инокулированных PGPR, во многом зависит от ряда факторов, таких как генотип растения, природа самих бактерий, действие внешних факторов. Плодовые культуры также отзывчивы на действие PGPR, к примеру, для яблонь, инокулированных штаммами *Bacillus* M3 и *Microbacterium* FS01, отмечается значительный прирост урожайности (Karlidag et al., 2007).

Основными механизмами, обеспечивающими урожайность яблонь, являлись продукция регуляторов роста растений и мобилизация доступных питательных веществ из почвы. Совместное применение грибов арбускулярной микоризы и бактерий группы PGPR в почвах с разными концентрациями азота приводило к увеличению общей биомассы, содержанию фосфора и азота в растении (Ahanthem, Jha, 2007). Применение микробных инокулянтов таким образом позволило снизить дозы внесения минеральных удобрений на 50%. Стимулирующие эффекты PGPR отмечены и по отношению к древесным культурам, к примеру ряд штаммов *Bacillus* ускоряли рост черенков лиственных культур на 42% по сравнению с неинокулированными растениями (Erturk et al., 2010). Полученные результаты с бактериями PGPR свидетельствуют о возможности замены синтетических ауксинов микробиологическими удобрениями в технологии выращивания саженцев древесных пород.

1.2.2. Микроорганизмы, как продуценты биопрепаратов защитного действия

Бактерии, снижающие частоту и тяжесть инфекционных заболеваний растений, часто определяют термином «биоконтрольные агенты», тогда как бактерии, обладающие антагонистической активностью против фитопатогенов, определены как бактерии-антагонисты (Beattie, 2006). Выделяют следующие механизмы, обеспечивающие биоконтроль бактерий группы PGPR по отношению к фитопатогенам:

- синтез гидролитических ферментов, таких как хитиназы, глюканы, протеазы и липазы, которые могут лизировать клетки грибных фитопатогенов (Neeraja et al., 2010; Maksimov et al., 2011);
- конкуренция за питательные вещества и колонизационные ниши на поверхности корня (Stephens et al., 1993; Камилова et al., 2005);
- регуляция уровня этилена за счет продукции фермента АЦК-дезаминазы в условиях стресса;
- продукция сидерофоров и антибиотиков;
- индуцированный иммунитет растений.

1.2.2.1. Продукция сидерофоров, антибиотиков и бактериоцинов

Способность ризобактерий к продукции сидерофоров и антибиотиков была в фокусе многих исследований, посвященных PGPR (Maksimov et al., 2011). Поглощение ионов трехвалентного железа через сидерофоры в значительной мере используются патогенными и непатогенными микроорганизмами почвы, тела человека и животных, морских отложений. Важность сидерофоров заключается в их взаимодействии с железом, важным элементом различных биологических процессов (Crosa, Walsh, 2002). С другой стороны, бактерии могут

производить широкий спектр соединений с антимикробной активностью, среди которых антибиотики, молочная кислота, литические агенты (например лизоцим), многочисленные экзотоксины и бактериоцины (Riley, Wertz, 2002). Сидерофоры, антибиотики и бактериоцины – три наиболее эффективные группы веществ, продуцируемых PGPR, которые могут быть использованы для минимизации и полного предотвращения патогенной пролиферации.

Для удовлетворения потребностей в железе у микроорганизмов развились весьма специфические пути с участием низкомолекулярных хелатов железа, называемых сидерофорами. Сидерофоры продуцируются для растворения железа из окружающей среды, образуя сложные железо-серные белки, которые могут двигаться за счет диффузии, возвращаясь на поверхность бактериальной клетки (Andrewset al., 2003). Активация транспортной системы начинается с распознавания сидерофоров специфическими рецепторами на мембранах клеток грамотрицательных и грамположительных бактерий (Boukhalfa, Crumbliss, 2002). В почве активность продукции сидерофоров играет центральную роль в определении способности различных микроорганизмов колонизировать растения. Продукция сидерофоров дает конкурентные преимущества для PGPR, усиливая их колонизационную активность, что позволяет исключить другие микроорганизмы из экологических ниш на поверхности корня (Haas, Défago, 2005). В условиях жесткой конкуренции, возможность приобретения железа через сидерофоры может определить исход конкуренции за различные источники углерода, которые являются доступными в результате экссудации (Crowley, 2006). Среди наиболее изученных сидерофоров отмечаются бактериальные сидерофоры псевдомонад, которые известны их высоким сродством к ионам трехвалентного железа. Высокоактивный сидерофор, пиовердин, способен ингибировать рост бактерий и грибов на железообедненных средах *in vitro* (Kloepper et al., 1980). Сидерофор псевдобактин, продуцируемый штаммом *Pseudomonas putida* B10, также подавлял развитие *Fusarium oxisporum* в почвах с дефицитом железа; однако такое подавление нивелировалось, если почва вновь пополнялась ионами железа (Kloepper et al., 1980). В недавних исследованиях было продемонстрировано подавление почвенных патогенных грибов путем выпуска железо-хелатирующим сидерофоров флуоресцентными псевдомонадами, свойство, недоступное для других организмов (Dwivedi, Johri, 2003).

Продукция одного или более антибиотиков – это механизм, наиболее часто обеспечивающий антагонистические свойства бактерий группы PGPR в отношении фитопатогенных микроорганизмов (Glick et al., 2007). Антагонистическая активность бактерий (биоконтроль) обеспечивается секрецией молекул, которые убивают или задерживают рост целевых фитопатогенов (Lugtenberg, Kamilova, 2009). Антибиотики охватывают гетерогенную группу органических низкомолекулярных соединений, подавляющих рост и метаболические пути других микроорганизмов. Выделяют (Haas, Défago, 2005) шесть классов антибиотических

веществ (для каждого механизмы их активности изучены частично), связанных с биоконтролем фитопатогенов на корнях растений: феназины, хлороглицины, пиоллютеорины, пиролнитрин, циклические липопептиды и цианистая кислота (HCN, летучие цианиды). Недавние исследования показали, что липопептидные биосурфактанты, продуцируемые различными видами *Pseudomonas* и *Bacillus*, положительно влияют на конкурентоспособность при взаимодействии между бактериями, грибами, простейшими, нематодами и растениями (de Bruijn et al., 2007; Raaijmakers et al., 2010). Многочисленные типы антибиотиков были выделены из штаммов бактерий и грибов, и это разнообразие включает различные механизмы их действия: подавление синтеза клеточной стенки возбудителя, влияние на мембранные структуры клеток и ингибирование образования малой субъединицы рибосомы (Maksimov et al., 2011).

Пиролнитрин, антибиотик, продуцируемый штаммом *P. fluorescens* BL915, подавлял развитие *Rhizoctonia solani*, причину заболеваний растений хлопчатника (Hill et al., 1994). 2,4-диацетилхлороглицинол (DAPG), выделяемый псевдомонадами, эффективный и активно изучаемый антибиотик, вызывал повреждения мембран у *Phyium spp.*, а также оказывал ингибирующее действие на зооспоры этого оомицета (de Souza et al., 2003). Феназин, также продуцируемый псевдомонадами, обладал окислительно-восстановительной активностью и мог подавлять грибные фитопатогены, такие как *Fusarium oxysporum* и *Gaeumannomyces graminis* (Chin-A-Woeng et al., 2003). Штамм *P. chlororaphis* PCL1391, выделенный из корней растений томатов, синтезировал феназин-1-карбоксамид, способный высвободить ионы железа из нерастворимых окислов при нейтральном pH, способствуя мобилизации ионов железа в почве (Haas, Défago, 2005).

Антибиотики, такие как полимиксин, циркулин и колистин, выделяемые большинством *Bacillus ssp.*, активны в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также многих патогенных грибов (Maksimov et al., 2011). К примеру, штамм *B. cereus* UW85 подавлял развитие фитопатогенных оомицет за счет продукции антибиотиков звиттермицина и каносамина, обеспечивая биоконтроль патогенов люцерны (Silo-Suhet et al., 1994). Что касается вопросов создания биопрепаратов на основе бактерий-продуцентов антибиотиков, то тут наиболее перспективны различные штаммы *Bacillus* и *Paenibacillus*, которые сохраняют высокую стабильность популяции в течение инокуляции и хранения биопрепаратов (Kokalis-Burelle et al., 2005).

Другими веществами, продуцируемыми микроорганизмами в качестве защитных факторов являются бактериоцины. Согласно обзору Райли и Вертца (Riley, Wertz, 2002) бактериоцины отличаются от традиционных антибиотиков тем, что имеют относительно узкий спектр организмов-мишеней, и токсичны для бактерий, тесно связанных со штаммом-продуцентом. Почти все бактерии могут продуцировать хотя бы один бактериоцин, а многие бактериоцины,

изолированные из грамотрицательных бактерий, являлись рекомбинацией уже существующих бактериоцинов (Riley, 1993). Как и колицин, название которого происходит от названия кишечной палочки, другие бактериоцины были изучены и названы аналогичным образом: пиоцин из *P. pyogenes*, клоацин из *Enterobacter cloacae*, марцесцин из *Serratia marcescens*, мегацин из *B. megaterium* (Cascales et al., 2007). Интересно, что бактериоцины из *B. spp.* все чаще становятся объектом для исследований в связи с их широким спектром ингибирования (в сравнении с бактериоцинами молочнокислых бактерий), который включает грамотрицательные бактерии, дрожжи и грибы, а также некоторые грамположительные виды бактерий (Abrioulet et al., 2011).

1.2.2.2. Индуцированная устойчивость

Известно, что непатогенные ризобактерии способны стимулировать у растения-хозяина механизмы сопротивления болезням; данное явление получило название «индуцированная системная устойчивость» (ISR – от англ. «Induced Systemic Resistance») (Van Loon et al., 1998). Индуцированной устойчивостью называют состояние усиления защитных сил организма растения при воздействии PGPR, наряду со стимуляцией роста (Van Loon et al., 1998). Впервые это явление было описано Ван Перетом (Van Peer et al., 1991) у растений гвоздики, которые были системно защищены бактериями *P. fluorescens* от *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, а также Вейетом (Wei et al., 1991) у растений огурцов, при этом, ризосферные штаммы защищали листья от антракноза, вызванного *Colletotrichum orbiculare*. Так, и индуцирующие бактерии и штамм-патоген находились на одном растении, но в разных его частях, пространственно ограниченных друг от друга, но защитный эффект тем не менее был достигнут.

Индуцированная системная устойчивость, опосредованная ризобактериями, схожа с патоген-индуцированной системной приобретенной устойчивостью (SAR – от англ. «Systemic Acquired Resistance») в том, что оба типа индуцированной устойчивости проявляются в неинфицированных частях растений, которые становятся более резистентны к патогенам, в том числе грибным, бактериальным, вирусным, а также нематодам и насекомым (Zehnder et al., 1997; Van Loon et al., 1998; Bent, 2006; Pozo, Azcon-Aguilar, 2007). Некоторые штаммы индуцируют устойчивость одного растения сразу против нескольких патогенов (Somers et al., 2004). В частности, ряд штаммов *Pseudomonas* и *Bacillus* являются наиболее изученными ризобактериями, которые вызывают ISR (Kloepper et al., 2004; Van Wees et al., 2008). Термин ISR был предложен как способность растения сопротивляться патогену, обеспеченное деятельностью PGPR, и не зависящее от сигнального пути, вовлеченного в этот процесс, в то время как термин SAR используется для описания салицил-зависимой резистенции, вызванной

локальной инфекцией. ISR и SAR действуют через различные сигнальные пути: так, SAR индуцируется салициловой кислотой, в то время как ISR осуществляется за счет сигнальных путей с участием жасминовой кислоты и этилена (Van Loon et al., 1998). Накопление этих сигнальных молекул координирует резистентность, а внесение их экзогенно достаточно для того, что бы вызвать защитную реакцию (Ryals et al., 1996). Уровень защитных реакций, опосредованных ISR, значительно слабее, чем вызванных SAR (Van Loon, 2000), и в значительной степени зависит от генотипа растения (Bloemberg, Lugtenberg, 2001). Тем не менее, ISR и SAR вместе обеспечивают лучшую защиту, чем каждый из них в отдельности, что указывает на их способность действовать аддитивно, усиливая устойчивость к патогенам (Van Wees et al., 2000).

Обычно накопление салициловой кислоты происходит локально в низких концентрациях, системно, и в соответствии с развитием SAR. Отмечено, что внедрение экзогенной салициловой кислоты индуцировало SAR у многих видов растений (Van Loon et al., 1998). Развитие некроза тканей рассматривается как общая функция, необходимая для активации SAR (Vleeschauwer, Höfte, 2009), однако, в некоторых случаях SAR может развиваться и без некроза тканей, как это было продемонстрировано для *Arabidopsis thaliana* (Mishina, Zeier, 2007). В случае SAR, первичная инфекция предрасполагает растение к способности растений противостоять последующим инвазиям: салициловая кислота активирует определенные участки оборонительных генов, ответственных за выработку особых белков – PR (от англ. «pathogenesis-related proteins»). Как правило, ISR не сопровождается активацией генов PR, в то время как усиление защитных характеристик SAR всегда связано с аккумуляцией PR (Van Loon, 2007). Например, обработка корней табака штаммом *P. fluorescens* CHA0 приводило к накоплению индуцируемых салициловой кислотой PR-белков в листьях (Maurhofer et al., 1994). Эти белки служат характерным признаком SAR у некоторых видов растений, и, как полагают, вносят свой вклад в состояние резистентности (Vleeschauwer and Höfte, 2009). Часть таких белков являются 1,3-глюконазами и хитиназами, способными гидролизовать клеточные стенки грибов, в то время как оставшаяся часть таких белков еще плохо изучена. Ген PR-1 и его экспрессия, индуцируемая салициловой кислотой, обычно выступают в роли молекулярных маркеров для SAR (Van Loon and Bakker, 2006). Растения арабидопсиса, инокулированные патогеном *P. syringae* pv. *tomato*, либо обработанные салициловой кислотой, проявляли SAR и аккумулялировали PR-1 мПНК, тогда как инокуляция штаммами-индукторами ISR *P. fluorescens* WCS417 и *P. putida* WCS358 не влияла на экспрессию PR- генов или накопление PR-белков.

Такого рода прайминг врожденной иммунной системы растения открывает широкие возможности для его резистентности с минимальным воздействием на семена и непосредственный рост растения (Van Hulst et al. 2006). Прайминг предлагает более

экономически выгодную стратегию устойчивости, это позволяет растению более эффективно реагировать на инвазию извне, индуцируя клеточные механизмы устойчивости (Beckers and Conrath 2007; Conrath et al. 2006). Использование таких систем было описано достаточно подробно (Choudhary et al., 2007; Choudhary and Johri, 2009) на примере *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Bacillus pumilus* и *Serratia marcescens*. Значительно меньше сведений имеется о представителях рода *Bacillus*, как индукторов ISR, часть данных приводится в работах Клоппера с соавт. (Kloepper et al., 2004). Кроме того, в список других, ISR-индуцирующих ризобактерий, можно включить *Paenibacillus alvei* (Tjamos et al. 2005), *Acinetobacter lwoffii* (Trotel-Aziz et al. 2008), *Chryseobacterium balustinum*, *Azospirillum brasilense* (Ramos Solano et al. 2008), *Curtobacterium sp.*, *Arthrobacter oxidans* (Barriuso et al. 2008), *Stenotrophomonas* (Domenech et al. 2007), а также эндофитные *Actinobacteria* (Conn et al., 2008). Обзор ризобактерий, индуцирующих ISR, приведен в таблице 1.2. Эффективность этих штаммов была оценена в вегетационных и полевых экспериментах на различных культурах, таких как томаты, болгарский перец, дыни, арбузы, сахарная свекла, табак, огурцы, тропические культуры.

Таблица 1.2. Индуцируемая системная устойчивость, вызываемая *Bacillus* у растений к патогенам.

Растение	Заболевание	Патоген	<i>Bacillus</i> spp.
Сахарная свекла	Церкоспороз	<i>Cercospora beticola</i>	<i>B. pumilus</i> 203-6, 203-7
Редис	Бактериальная пятнистость листьев	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>armoraciae</i>	<i>Bacillus</i> spp.
Огурец	Корневая гниль	<i>Pythium</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.
Арахис	Пятнистость	<i>Cercosporidium personatum</i>	<i>Bacillus</i> spp.
Табак	Голубая плесень	<i>Peronospora tabacina</i>	<i>B. pasteurii</i> , <i>B. pumilus</i>
Огурец	Бактериальное увядание	<i>Erwinia tracheiphila</i>	<i>B. pumilus</i>
Томаты	Пятнистость	Вирус мозаики огурца	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. amiloliquefaciens</i>
Томаты	Фитофтороз	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>B. pumilus</i>

В отличие от SAR, основную роль в активации ISR играют летучие вещества микробного происхождения. Было проведено сравнение летучих веществ растительного происхождения и двух классов сигнальных молекул, С6 (летучие вещества зеленых листьев) и С4 (бактериальных летучих веществ), которые усиливали способность мобилизовать защитные клеточные механизмы в случае атаки патогенна (Choudhary et al., 2008). Рю с соавт. (Ryu et al., 2004) исследовал роль летучих микробных метаболитов в активации ISR ризосферными бактериями у проростков арабидопсиса на разных, пространственно отделенных сторонах

чашек Петри. ISR было активировано действием на растения летучих соединений, продуцируемых *Bacillus sp.*, при этом через 4 дня экспозиции наблюдалось значительное снижение симптомов мягкой гнили, вызываемой *Erwinia carotovora*. Состав летучих метаболитов ризобактерий штаммов *B. subtilis* GB03 и *B. amyloliquefaciens* IN937a, являющихся PGPR существенно отличался от состава метаболитов, выделяемых другим штаммом DH5a, который не относился к группе PGPR. Так, штаммы GB03 и IN937a продуцировали два наиболее распространенных соединения: 2,3-бутандиол и 3-гидрокси-2-бутанон (ацетоин), в то время как продукция этих соединений у DH5a не наблюдалась (Ryu et al., 2004). Других летучих метаболитов, выделяемых ризобактериями, но не активирующими ISR, следует отметить додекан, 2-ундеканол, 2-тридеканол, 2-тридеканол, тетраметилпирозин. Идеи о роли летучих метаболитов в активации ISR нашли поддержку в других работах. Установлено (Han et al., 2006), что активация ISR штаммом *Pseudomonas chlororaphis* O6 у растений табака неразрывно связана с продукцией 2R,3R- бутандиола, которая активируется сенсорной киназой GacS. Остается неясным, где расположен сайт восприятия растением сигнальных молекул - выше или ниже поверхности почвы, а также как растение воспринимает эти сигналы. Не ясно также, может ли эндогенный сигнал вызывать ISR, опосредованную летучими метаболитами (Pare et al., 2005). Предполагается (Neil, Ton, 2008), что летучие метаболиты изменяют трансмембранные потенциалы, и тем самым влияют на активность генов. Учитывая роль микробных метаболитов в регуляции клеточных процессов, включая рост и развитие растения, устойчивость к патогенам и адаптацию к абиотическим стрессовым факторам, возможно, существуют и другие сигнальные пути, обуславливающие ISR.

1.2.3. Фосфатмобилизующие бактерии в основе микробиологических препаратов для растениеводства

В связи с истощением общих мировых запасов фосфора возникает практически значимая и обоснованная необходимость изучения биотехнологических способов мобилизации малодоступных форм фосфора; особую роль в этом должны, по-видимому, сыграть фосфатмобилизующие микроорганизмы.

К настоящему времени показано, что эффективность использования фосфатных удобрений остается крайне низкой, особенно в кислых и известковых почвах. Микробиологический подход к процессам мобилизации трудноусвояемых растениями форм фосфора был предложен в качестве менее затратного и высокоэффективного метода по сравнению с обычными физико-химическими способами (Goldstein, Rogers, 1999; Khan et al., 2007). Большинство таких методов (Rodriguez, Fraga 1999; Whitelaw, 2000; Vassilev et al., 2001; Vassilev, Vassileva, 2003) основывается на применении фосфатмобилизующих

микроорганизмов наряду с внесением в почву низкосортных отходов горнодобывающей промышленности, в частности фосфоритов.

Фосфатмобилизующая активность определяется биохимической способностью почвенных микроорганизмов продуцировать метаболиты (например, органические кислоты), которые за счет своих гидроксильных и карбоксильных групп, а также хелатных катионов, связывают фосфат, переводя его в растворимые формы (Sagoe et al., 1998). В течение последних 15 лет была продемонстрирована способность фосфатмобилизующих бактерий оказывать существенное влияние на биохимические процессы и условия почвы.

Панди с соавт. (Pandey et al., 2001) был предложен термин, характеризующий процессы твердосубстратной деградации малорастворимых соединений фосфора (SSF, от англ. «solid substrate fermentation»), происходящие в условиях полного или практически полного отсутствия воды. Такая технология подразумевает обработку микроорганизмами отходов горнодобывающей промышленности, обеспечивая полный контакт микроорганизмов и минералов, и достигая, таким образом, наивысшей концентрации субстрата для ферментации. Основными микроорганизмами-продуцентами таких биопрепаратов являются бактерии и грибы. В качестве дополнительного субстрата (подложки), содержащей крахмал, целлюлозу, лигноцеллюлозу, пектин и другие полисахариды используются побочные продукты, либо отходы сельскохозяйственного производства, подвергшиеся предварительной обработке или вносимые непосредственно (Pandey et al., 2000). Подготовка и формуляция всех компонентов микробных инокулянтов непосредственно перед внесением в почву является наиболее эффективной, таким образом достигается более высокая производительность ферментации, стабильность продукта, стерильность компонентов при хранении, низкие трудовые и технические затраты (Spadaro, Gullino, 2005).

Использование подобной технологии на основе грибов и отходов сахарной и оливковой промышленности было предложено Васильевым (Vassilev et al., 1994), а также описано в последующих работах группы авторов. Эксперименты с использованием фосфатмобилизующих штаммов *Aspergillus niger* и различных агропромышленных отходов в условиях технологии SSF выявили, по крайней мере, три одновременно происходящих процесса: минерализацию лигноцеллюлозных субстратов, биосинтез органических кислот, и, как следствие, мобилизацию труднодоступных соединений фосфора в строгой корреляции с первыми двумя процессами (Vassilev et al., 1995). Отходы, получаемые от переработки сахарной свеклы, были выбраны наиболее оптимальными (Vassilev et al., 1998), поскольку обеспечивали приемлемый рост мицелия грибов и продукцию органических кислот, а также высокий уровень минерализации (56-69%, в зависимости от концентрации субстрата). Подобная система была способна мобилизовать до 76% фосфора, переводя его в растворимое состояние, при концентрации отходов свеклольного производства до 1,5%. Присутствие

нерастворимых фосфатов также влияло на рост и скорость продукции лимонной кислоты *A. niger* (Vassilev et al., 1995).

Пристальное внимание в современной научной литературе обращено изучению фосфатмобилизирующих бактерий, как наиболее эффективных и технологичных в производстве и применении продуцентов инокулянтов для сельского хозяйства. Имеются многочисленные сведения о такой функциональной группе микроорганизмов, включающей разнообразные грамотрицательные и грамположительные бактерии (Табл. 1.3).

Опираясь на обзор исследований последних лет можно сделать вывод, что наиболее значимым бактериальным компонентом микробных сообществ, обладающим фосфатмобилизирующими свойствами, являются представители грамотрицательных бактерий. Так, наиболее перспективными с точки зрения создания микробиологических препаратов, автором видятся представители рода *Pseudomonas*. Данный род включает в себя микроорганизмы, характеризующиеся способностью к активной колонизации ризосферы высших растений, быстрой скоростью роста как в ризосфере, так и в условиях промышленного культивирования, не требовательностью к составу питательных сред, а помимо фосфатмобилизирующей активности, способностью продуцировать различные биологически активные метаболиты. Представители других родов, несмотря на их возможно высокую фосфатмобилизирующую активность, видятся менее перспективными, поскольку либо относятся к родам бактерий – условным патогенам человека, животных, растений, либо слабо изученным или не отвечающим высоким технологическим требованиям. Большинство исследователей придерживается следующей схемы при изучении фосфатмобилизирующих микроорганизмов. Объектом исследований чаще всего являются образцы почвы, либо ризосфера (реже эндосфера) различных сельскохозяйственных культур. В качестве селективных сред обычно используют классические среды (среда Пиковской, среда Муромцева) с добавлением неорганических источников фосфора (фосфаты кальция, алюминия, железа). Далее, по величине зон растворения источников фосфора подбирают несколько наиболее активных изолятов. На основании генотипической и физиолого-биохимической характеристики определяют таксономическое положение перспективного изолята. Ряд авторов оценивает способность мобилизации малорастворимых фосфатов количественно, при культивировании микроорганизмов на жидких средах и последующим измерением содержания фосфора в культуральной жидкости (Liu et al., 2012; Busato et al., 2012; Rawat, Tewari, 2011). Для определения состава продуцируемых фосфатмобилизирующими микроорганизмами метаболитов обычно используют методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (HSCPL).

Таблица 1.3. Фосфатмобилизующие бактерии и грибы, перспективные штаммы-продуценты биопрепаратов.

Род (вид)	Целевые минералы	Механизм действия	Ссылка
<i>Burkholderia cepacia</i>	Фосфаты Ca, Al, Fe, фосфоритная мука	Продукция щавелевой, уксусной, молочной, лимонной кислот	Liu et al., 2012
<i>Burkholderia silvatlantica</i> , <i>Burkholderia spp.</i> и <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Фосфаты вермикомпоста	Кислые фосфатазы	Busato et al., 2012
<i>Pantoea</i> , <i>Serratia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>	Ортофосфат Ca	Щелочные фосфатазы, сидерофоры, ИУК	Viruel et al., 2011
<i>Trichoderma sp.</i>	Ортофосфат Fe, Ca	Щелочные фосфатазы	Rawat и Tewari, 2011
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Ортофосфат Ca	Глюконовая и др. орг. кислоты	Scervino et. al, 2011
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ортофосфат Ca	Орг. кислоты	Hesham, Mohamed, 2011
<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Burkholderia sp.</i>	Ортофосфат Ca	Орг. кислоты	Qian et al., 2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Фосфориты	Глюконовая кислота	Patel et al., 2011
<i>Pseudomonas sp.</i>	Фосфориты, двойной суперфосфат	-	Sunita et al, 2010
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	Неорганические фосфаты, гидроксипатиты	Глюконовая и 2-кетоглутаровая кислоты	Park et al., 2010
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Неорганические фосфаты	Глюконовая, пировиноградная, уксусная кислоты	Buch et al., 2009
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ортофосфат Ca	-	Ahemad и Khan, 2009
<i>Serratia sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>	Фосфориты	-	Hameeda et. al., 2006
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Bacillus sp.</i>	Неорганические фосфаты	-	Souchie et. al., 2006
<i>Arthrobacter ureafaciens</i> , <i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Delftia sp.</i>	Ортофосфат Ca	Лимонная, глюконовая, молочная, пировиноградная, пропионовая кислоты	Chen et al., 2006
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Ортофосфат Ca	-	Kumar et al., 2000

Основным механизмом, обеспечивающим мобилизацию труднодоступных соединений фосфора, является выработка микроорганизмами различных органических кислот. Набор таких кислот чрезвычайно разнообразен, микроорганизмы продуцируют глюконовую, пировиноградную, уксусную, щавелевую, уксусную, яблочную, молочную, лимонную кислоты

Кроме того, продукция органических кислот часто сопряжена с выработкой фосфатаз, чаще всего щелочных, а также других биологически активных метаболитов, таких как ИУК, сидерофоры, антифунгальные метаболиты.

Эффективность растворения минеральных соединений фосфора может быть достаточно высокой, данные количества доступного фосфора могут полностью удовлетворить потребности растительного организма. К примеру, штамм *Burkholderia cepacia* способствовал мобилизации фосфатов кальция, алюминия, железа, фосфоритной муки, повышая содержание растворенного фосфора до 125,7; 227,3; 60,0; 321,1 мг/л соответственно (Liu et al., 2012). Штамм *Trichoderma sp.* способствовал накоплению до 398.4 мкг фосфора/мл среды (при утилизации фосфорита железа), и до 449.0 мкг фосфора/мл среды (при утилизации ортофосфата кальция) (Rawat, Tewari, 2011). Содержание доступного для растений фосфора в вермикомпосте при инокуляции фосфатмобилизующими штаммами *Burkholderia silvatlantica*, *Burkholderia spp.*, *Herbaspirillum seropedicae* через 60 дней инкубации увеличивалось на 106% (Busato et al., 2012). При использовании штамма *Burkholderia vietnamiensis* мобилизация фосфора из ортофосфата кальция составляла 1,039 мг/л, гидрофосфата кальция - 2,132 мг/л, гидроксиапатитов - 1,754 мг/л (Park et al., 2010).

Продукция фосфатаз у разных штаммов микроорганизмов при росте на жидких средах с добавлением неорганических источников фосфора обычно колеблется в интервалах 200-500 мкг белка на мл (Viruel et al., 2011). Отмечается также увеличение активности фосфатаз на 43% в нестерильных почвенных субстратах (Busato et al., 2012).

Показан также положительный эффект от использования фосфатмобилизующих микроорганизмов в вегетационных, полевых экспериментах и сельскохозяйственной практике (Gaur, Ostwal, 1972; Vanik, Dey, 1982; Datta et al, 1982; Kloepper et al., 1988). Однако продукция рядом штаммов других полезных для растения метаболитов, таких как фитогормоны, сидерофоры и др., создает определенную путаницу в выяснении непосредственной роли мобилизации фосфора в процессах развития растения. В настоящее время есть доказательства, подтверждающие участие данного механизма в стимулировании сельскохозяйственных культур. Например, ряд штаммов бактерий усиливал процессы поставки фосфора в растение вследствие способности к растворению неорганических фосфатов (Lifshitz et al., 1987; Richardson et al., 1994). Учитывая, что наличие фосфора является лимитирующим фактором в питании растений, накопленные данные позволяют

сделать вывод о фундаментальном вкладе фосфатмобилизирующих микроорганизмов в фосфорном питании растений и их влиянии на показатели роста.

Так, Шабо с соавт. (Chabot et al., 1993) продемонстрировал положительный эффект от инокуляции сельскохозяйственных культур несколькими штаммами фосфатмобилизирующих бактерий. К примеру, штамм *Burkholderia cepacia* не обладая способностью к продукции ИУК, за счет мобилизации фосфора и высокой активности фосфатаз, способствовал стимуляции роста растений томатов, лука картофеля, бананов, кофе и др. культур в полевых экспериментах. К настоящему времени биопрепарат на основе данного штамма зарегистрирован в качестве коммерческого продукта на Кубе (Rodrigues, 1999). Кроме того, имеются сведения от использования штаммов с двойным эффектом: фосфатмобилизирующих и ростстимулирующих бактерий. Использование двух штаммов фосфатмобилизирующих *Rhizobium* способствовало увеличению количества клубеньков и более мощному развитию корневой системы, повышению содержания фосфора в растениях (Chabot et al., 1996). Эксперименты с меченым фосфором в составе фосфатов, продемонстрировали процессы фосфатмобилизации на примере штамма *Pseudomonas putida* (Lifshitz et al., 1987). А инокуляция семян риса штаммом *Azospirillum lipoferum* strain 34H увеличивала не только содержание фосфора в растении, но и общую биомассу. Стимулирующий эффект оказывали ряд фосфатмобилизирующих представителей рода *Bacillus*: *Bacillus firmus* (Datta et al., 1982), *Bacillus polymyxa* (Gaur et al., 1972) и *Bacillus cereus* (Fernandez et al., 1984).

Коммерческие продукты на основе фосфатмобилизирующих бактерий или смешанных культур в настоящее время активно разрабатываются и внедряются в сельскохозяйственное производство. Примером может служить препарат «Phylazonit-M» (регистрационный No 9961 Министерства сельского хозяйства Венгрии), продукт на основе двух культур - *Bacillus megaterium* и *Azotobacter chroococcum*, способствующий снабжению растений фосфором и азотом, или препарат «KYUSEI EM» (EM Technologies, Inc.) на основе молочнокислых бактерий.

1.2.4. Целлюлозолитические микроорганизмы, как продуценты биопрепаратов для деградации отходов сельскохозяйственного производства

В настоящее время в России более половины пахотных земель засеваются озимыми и яровыми культурами. В то же время после их уборки на полях остаётся большое количество пожнивных остатков - соломы, которая является основным источником поступления свежего органического вещества в почву. При больших объемах пожнивных остатков очень сильно затрудняется работа почвообрабатывающей техники из-за забивания и залипания (при большой влажности) соломенно-земляной массой рабочих органов агрегатов, что ведет к

частым поломкам и преждевременному износу оборудования, увеличивается расход ГСМ. Особенно остро стоит эта проблема после уборки кукурузы на зерно, так как она оставляет за собой в поле большое количество пожнивной массы. Также важной проблемой является и то, что при наличии большого количества пожнивных остатков на поверхности поля происходит взрывное развитие болезнетворных микроорганизмов и вредителей.

Солома зерновых культур имеет высокое содержание целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина при широких пределах варьирования соотношения C:N (70-80:1), что существенно влияет на характер и скорость ее разложения. При этом, целлюлозолитические организмы для старта активной жизнедеятельности испытывают высокую потребность в азоте, так оптимальным для процессов деструкции соломы в почве считается соотношение C:N 20-30:1 (Кононова, 1972). В России, несмотря на повсеместную нехватку органических удобрений, устоялась практика сжигания пожнивных остатков. При этом, наряду с явным ущербом от уничтожения потенциального источника почвенной органики происходит дальнейшее упрощение уже деформированной избытком пестицидов и агрохимиктов структуры почвенной микрофлоры. Заделка в почву измельченной соломы (еще один распространенный способ утилизации пожнивных органических остатков зерновых) тоже небезопасна, поскольку на подобных субстратах хорошо развивается и благополучно переживает зиму микрофлора (гнилостная, сапрофитная, патогенная грибная и бактериальная), что активизирует процессы иммобилизации почвенного азота, в том числе из гумусовых веществ. Также достаточно часто встречается пролив пожнивных остатков водными растворами азотных удобрений, однако этот агроприем в первую очередь инициирует процесс минерализации почвенной органики до газообразных, жидких и балластных продуктов метаболизма. Сведения об усилении процессов гумификации при внесении в солому малых доз азота не находят экспериментального и практического подтверждения (Петров, Чеботарь, 2012).

В настоящее время активно разрабатываются и внедряются в практику альтернативные методы утилизации пожнивных остатков, предполагающие их более полное вовлечение в биологический круговорот с применением современных комплексных микробиологических препаратов. Разработаны методологические основы, технологии производства и применения спектра таких микробных препаратов, в частности, группа средств создается на основе комплексов грибов и бактерий (Русакова, Воробьев, 2010; Воробьев с соавт., 2011).

Ферментативный гидролиз целлюлозы с помощью целлюлозолитических микроорганизмов является одним из ключевых звеньев глобального круговорота углерода. Несмотря на обилие микроорганизмов в почве, только небольшой их процент может деградировать целлюлозу (Li et. al., 2009). Существует по крайней мере пять различных механизмов, используемых микроорганизмами для деградации целлюлозы, которые непосредственно связаны с продукцией целлюлаз. Использование целлюлозолитических микроорганизмов и целлюлаз

открывает чрезвычайно разнообразные возможности для технологии деградации растительных отходов. При этом существуют две основные проблемы, ограничивающие наше понимание в этой области, - это огромное разнообразие микроорганизмов, присутствующих на деградируемых субстратах и невозможность выделения их в чистые культуры (Wilson, 2011).

Поскольку бактериальные и грибные клетки не способны поглощать частицы субстрата, они вынуждены выделять целлюлазы во внешнюю среду, кроме того некоторые бактерии образуют целлюлосомы, которые прикреплены к внешней стороне клеточной стенки бактерий. Поскольку клеточные стенки растений довольно устойчивы к деградации, некоторые целлюлолитики продуцируют во внешнюю среду до 50% целлюлаз (от общей массы белка) при росте на целлюлозосодержащих субстратах.

1.2.4.1. Микробные целлюлазы

Несмотря на разницу в механизмах деградации целлюлозы, все они основаны на продукции целлюлаз микроорганизмами (Wilson, 2008). Целлюлазы – это ферменты самого разнообразного строения, общим свойством которых является гидролиз целлюлозных волокон по β -1,4-гликозидным связям. Выделяют 11 различных групп целлюлаз согласно характеру их аминокислотных последовательностей, согласно же структурного анализа укладки молекул белка выделяют 8 типов целлюлаз (Wilson, 2011).

Такое разнообразие микробных целлюлаз может быть следствием использования широкого ряда природных субстратов, а именно разнообразного строения клеточных стенок растений. Отдельные целлюлазы имеют очень низкую активность на нативной кристаллической целлюлозе, однако их каталитическая активность имеет свойство усиливаться со временем полураспада целлюлозы.

Целлюлазы отличаются от большинства ферментов тем, что деградируют нерастворимые субстраты. Это требует непосредственной диффузии фермента в субстрат, а также смещения сегмента целлюлозной молекулы к своему активному центру, в то время как растворимые субстраты диффундируют к ферменту и связываются с его активным центром сами по себе. Почти все ферменты, разлагающие нерастворимые субстраты, содержат субстрат-связывающий домен, который обычно соединен с каталитическим доменом и гибким пептидным линкером (Shoseyov et al., 2006). В случае с целлюлазами, где этот тип доменов был обнаружен первым, домен получил название целлюлозо-связывающий, хотя позднее был переименован в углеводо-связывающий модуль для обозначения других доменов связывания углеводов. Очевидно, что роль углеводо-связывающего модуля заключается в соединении фермента с целлюлозой, при этом каталитический центр тратит меньше времени на

связывание с субстратом и имеет запас времени на перемещение цепи целлюлозы до того как фермент диффундирует от субстрата. До сих пор точно не ясно, способствует ли углевод-связывающий модуль модификации молекул целлюлозы, либо иным образом содействует каталитическому гидролизу целлюлозы (Din et al., 1991).

Существуют различные формы целлюлозы, используемые для анализа активности целлюлаз. К примеру – карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), являющаяся растворимой модификацией целлюлозы и отличным субстратом для эндо целлюлаз, не требующим присутствия углевод-связывающего модуля. Аморфная целлюлоза, получаемая при кислотной обработке кристаллической целлюлозы – также хороший субстрат для большинства целлюлаз, не требующие присутствия углевод-связывающего модуля. Кристаллическая целлюлоза («Авицель», бактериальная целлюлоза, фильтровальная бумага), присутствующая в клеточных стенках растений, требует наличия углевод-связывающего домена для эффективного гидролиза (Bhat et al., 1997; Rabinovich et al., 2002).

Микробные целлюлазы имеют нелинейный характер кинетики на полимерных субстратах, по-видимому, из-за гетерогенности субстратов, однако они подчиняются кинетике Михаэлиса-Мэнтена в случае слабо-растворимых субстратов (Zhang et al., 1999). Большинство целлюлаз и эндоцеллюлаз с открытым активным центром могут связываться и расщеплять молекулы целлюлозы в любой доступной точке по всей длине цепи (Spezio et al., 1993). Эндоцеллюлазы случайно связываются вдоль молекулы целлюлозы, делая в ней определенное количество «расколов», а затем диссоциируют от субстрата, повышая тем самым вязкость целлюлозы. Все экзоцеллюлазы несут свой активный центр внутри так называемого «тоннеля» и могут связываться с молекулами субстрата только на концах цепи, таким образом, они гидролизуют молекулы поступательно, от одного конца цепи к другому. Таким образом, экзоцеллюлазы имеют низкую активность на КМЦ и не уменьшают ее вязкость. Существует два типа экзоцеллюлаз, первый «атакует» восстанавливающий конец молекулы целлюлозы, второй связывается с невосстанавливающим (Bagh et al., 1996). Наконец, открыт третий класс целлюлаз, прогрессивные эндоглюконазы, который был обнаружен только у бактерий. Прогрессивные эндоглюконазы имеют уникальную доменную структуру: С-конец несет 9 каталитических центров, жестко связанных с углевод-связывающим модулем (Bagh et al., 1996). Эти ферменты проводят начальную «атаку» на цепь целлюлозы, а затем последовательно гидролизуют молекулу с невосстанавливающего конца расщепленной цепи.

1.2.4.2. Механизмы микробного гидролиза целлюлозы

Многие аэробные микроорганизмы используют механизм свободных целлюлаз, по которому они секретируют набор определенных специфических целлюлаз, большинство из которых

содержат углевод-связывающий модуль, связанный с гибким линкером на одном из концов каталитического домена. Смесь целлюлаз обычно проявляет синергический эффект на кристаллической целлюлозе (Wilson, 2008). Синергический эффект таких целлюлаз обычно приводит к увеличению активности соответствующих смесей в 15 и более раз по сравнению с активностью каждой целлюлазы в отдельности (Irwin et al., 1993).

Аэробные микроорганизмы производят целлюлосомы – крупные мультиэнзимные комплексы (с многомиллионным молекулярным весом), деградирующие молекулы целлюлозы (Ding et al., 2008). Только несколько ферментов комплекса несут в себе углевод-связывающий домен, но белок, связывающийся с молекулой целлюлозы, и к которому они прикреплены, не содержит такового. В целом, целлюлазы, продуцируемые аэробными и анаэробными микроорганизмами, относятся к схожим семействам; исключение составляют только аэробные грибы, продуцирующее GH-7 целлюлазы, и целлюлосомы, не несущие в себе 6 семейств целлюлаз. Некоторые анаэробные целлюлолитические термофильные бактерии, такие как *Caldicellulosiruptor sp.*, секретируют многодоменные целлюлазы, содержащие углевод-связывающие домены. Эти микроорганизмы имеют очень эффективные системы деградации растительной клеточной стенки в отличие от большинства целлюлолитических микроорганизмов (Blumer-Schuetz et al., 2010).

Некоторые аэробные грибы, способные деградировать целлюлозу, но не лигнин, такие как *Trichoderma reesei*, являются источником получения коммерческих целлюлаз и используют механизм свободных целлюлаз, в то время как патогенные грибы (например бурая гниль) секретируют целлюлазы наряду с пероксидазами (Martinez et al., 2005). Пероксид и OH-радикал, образующиеся пероксидазами, облегчают деградацию целлюлозы. Таким образом, патогенные грибы используют набор целлюлаз, способных деградировать немодифицированную кристаллическую целлюлозу. К примеру, возбудитель бурой гнили *Postia placenta* секретирует только одну эндоглюконазу, в то время как большинство свободноживущих целлюлолитических бактерий производят шесть и более целлюлаз, а также целлюлосомы с еще большим набором целлюлаз (Doi, Tamari, 2001; Wilson, 2004; Martinez et al., 2006).

Известны целлюлолитические бактерии *Fibrobacter succinogenes*, анаэробные доминирующие бактерии рубца, и *Cytophaga hutchinsonii*, аэробные бактерии почвы, геномы которых содержат ряд последовательностей генов эндоцеллюлаз, большинству из которых не хватает углевод-связывающих доменов (Xie et al., 2007; Wilson, 2008). Более того, ни одна из этих целлюлаз не имела активности на кристаллической целлюлозе. Но оба этих организма связаны с целлюлозой на протяжении всего развития, при этом ни один из них не секретировал свободные целлюлазы или целлюлосомы. Таким образом, эти микроорганизмы, по-видимому, используют новый, не известный до селе механизм ферментативного гидролиза целлюлозы.

Этот механизм оказался очень эффективным: *F. succinogenes* развивался на целлюлозных субстратах гораздо быстрее, чем большинство целлюлолитических микроорганизмов (Fields et al., 2000). Микроорганизмы, родственные *F. succinogenes*, довольно широко распространены в природе, их геномы часто встречаются в метагеномных последовательностях, выделенных из термитов (Warnecke et al., 2007). Поскольку все больше и больше бактериальных геномов становятся расшифрованными, гены целлюлаз открываются у большого числа микроорганизмов. *Saccharophagus degradans* имел очень своеобразный набор целлюлаз, большинство из которых принадлежали семейству 5, некоторые семейству 9, и все они относились только к эндоцеллюлазам (Weiner et al., 2008). Три целлюлазы из семейства 5, по-видимому, являются новым типом прогрессивных эндоглюконаз, у которых процесс гидролиза не требует участия вспомогательных доменов, но как именно эти целлюлазы деградируют субстрат до сих пор остается не ясным (Watson et al., 2009). Недавно у нескольких новых белков была установлена способность к гидролизу целлюлозы. Большинство целлюлолитических грибов содержат многочисленные гены семейства GH-61, некоторые из них кодируют белки, имеющие слабую целлюлолитическую активность (Harris et al., 2010). Семейство белков GH-61 стимулировало гидролиз целлюлозы сырой биомассы *Trichoderma reesei* в присутствии ионов магния, но данный эффект не обнаруживался на чистой целлюлозе. *Thermobifida fusca* продуцировал большой объем протеинов двух семейств целлюлаз при росте на целлюлозе (Moser et al., 2008).

1.2.4.3. Распространение целлюлолитических микроорганизмов в природе и их роль в деградации целлюлозы

Наиболее изученным местообитанием целлюлолитических микроорганизмов к настоящему времени является рубец жвачных животных, который по сути является хемостатом, деградирующим растительные компоненты, предварительно измельченные и обработанные животным, и в дальнейшем преобразуемые сложным комплексом целлюлолитических микроорганизмов. Из 10 млрд. бактерий в 1 мл содержимого рубца только 10% являются целлюлолитическими, хотя целлюлоза – это основной источник углерода для данного комплекса микроорганизмов. Отмечено присутствие некоторых целлюлолитических грибов и простейших в составе микрофлоры рубца, однако бактерии являются основным деструктором целлюлозы. Интересно, что в большинстве метагеномных последовательности, извлеченных из содержимого пищеварительного тракта муравьев, были обнаружены гены, кодирующие целлюлазы, близкие целлюлазам рубца жвачных (Suen et al., 2010).

Другим наиболее изученным субстратом, несущим в себе целлюлолитические микроорганизмы, является компост. Начальный этап компостирования происходит при

нормальных температурах и осуществляется при участии бактерий и грибов, затем происходит разогрев субстрата и микробное сообщество сменяется представителями термофильных бактерий (Hansgate et al., 2005; Schloss et al., 2005; Szekely et al., 2009). Дегградация целлюлозы происходит в основном в процессе термофильной фазы; при этом сообщества микроорганизмов в составе компоста очень разнообразны и изменчивы, хотя созревший компост, как правило, имеет довольно просто устроенное сообщество целлюлолитиков (Szekely et al., 2009).

Серьезной проблемой при изучении экологии и физиологии целлюлолитических бактерий является их неспособность к культивированию на твердых средах в чистых культурах, а также очень высокая гетерогенность их популяций. Интересно, что состав анаэробных целлюлолитических популяций бактерий еще более разнообразен, чем состав аэробных целлюлолитиков. Предполагается, что активность разрушения клеточной стенки растений определяется синергическим эффектом от действия микробных целлюлаз различных микроорганизмов, и различные полимеры в составе клеточной стенки деградируются различными микроорганизмами. Имеются упоминания о некоторых специфичных процессах утилизации целлюлозы. Так, *F. succinogenes* может гидролизовать различные полисахариды, но хорошо растет только в присутствии целлюлозы (Kobayashi et al., 2008). *Clostridium thermocellum* не был способен к росту на ксилане, хотя хорошо деградировал ксилан (Dror et al., 2005), а *T. fusca* не культивировалась на ксилоглюкане, обладая при этом мощным комплексом ксилоглюконаз, активно расщепляющих ксилоглюкан до растворимых продуктов (McGrath, Wilson, 2006). Выработка этого фермента индуцировалась ростом на целлюлозе, что объясняется присутствием ксилоглюкана в составе вторичной клеточной стенки растения. В дополнение, хотя *T. fusca* способна расти и на ксилане и на глюкозе, при гидролизе растительной биомассы, содержащей оба субстрата, в первую очередь усваивается целлюлоза. Это возможно, объясняется тем, что синтез ксилан-деградирующих ксиланаз, ингибируется целлобиозой, которая является индуктором целлюлозо-деградирующих ферментов, включая ксиланазы и маннаназы (Chen, Wilson, 2007).

1.2.4.4. Опыт применения биопрепаратов на основе целлюлолитических микроорганизмов

Биодеградация и биоконверсия – это важнейшие направления биотехнологии, основанные на использовании целлюлолитических микроорганизмов. Ведь переработка (биодеградация) отходов и побочных продуктов сельского хозяйства и промышленности решает одновременно производственные и природоохранные задачи. Речь идет о достижении двух целей в едином

процессе: утилизации (биodeградации) и превращении ненужного (как правило, экологически вредного) сырья в полезные продукты (биоconversion).

Яркий пример биотехнологии, основанной на биodeградации в сочетании с биоconversion, – хорошо налаженная в Японии и других странах переработка отходов животноводческих комплексов с помощью термофильных целлюлозолитических бактерий. Избавляясь от отходов, одновременно получают биомассу с высоким содержанием белка и биогаз, сильно обогащенный метаном. В Индии в настоящее время действует около 600 тыс. биоустановок по производству биогаза, обеспечивающих основную потребность в нем сельского хозяйства.

В России зарегистрировано и введено в практику большое количество разработок на основе целлюлозолитических микроорганизмов.

Так, одним из эффективных продуцентов микробных целлюлаз считаются грибы *Trichoderma viride*. К примеру, штамм гриба *Trichoderma viride* используется для получения ферментного препарата целловиродина, применяемого в кормлении сельскохозяйственных животных с целью увеличения переваримости питательных веществ и улучшения их всасывания в тонком отделе кишечника сельскохозяйственных животных. Известны продуценты целлюлаз *Trichoderma viride* 44 (Авт. свид. 745933, 1978 г.), *Trichoderma viride* 13/10 (авт. св. 923188, 1984 г.), которые используются в производстве целлюлаз при культивировании на питательных средах, содержащих свекловичный жом и минеральные соли. В патенте РФ 2001949 описан штамм *Trichoderma reesi* ВСМ 18.2/КК - продуцент целлюлаз, пригодный для культивирования в присутствии высоких концентраций сахаров, в том числе на молочной сыворотке. В патенте 2213138 описывается штамм *Trichoderma viride* ВОСГ 63/300 - продуцент целлюлаз и гемицеллюлаз.

Кроме того, для ускоренной микробиологической переработки целлюлозосодержащих материалов используются и другие штаммы грибов: *Paecilomyces variotii* (патент 2094414 С 05 F 11/08, 1997), *Rleurotus ostreatus* (патент 2080078 А 23 К 1/00, 1997), *Agricus lisporus* (патент 2097979 А 23 К 1/00). Кроме грибных целлюлозолитических комплексов, существуют примеры бактериальных препаратов: *Clostridium thermocellum* и *Streptomyces sp.* (патент 2257366 С05 F11/08, 2004), *Bacillus*, *Pseudomonas putida* и *Klebsiella* (Патент 2057103, С05 F3/00, 1996).

Кроме того, в виде коммерческих продуктов активно применяются различные биопрепараты для животноводства и переработки органических отходов: «Бацелл» (на основе штаммов *Ruminococcus albus*, *Lactobacillus sp*, *Bacillus subtilis* 8130) «Трихофит» (*Trichoderma sp.*), однако их эффективность пока не находит обоснованного научного подтверждения.

1.2. Заключение к обзору литературы

Исследование микроорганизмов, ассоциированных со сфагновыми мхами, было начато с самого зарождения микробиологии в начале XX века: тогда впервые были упомянуты эндосимбиозы между микоризными грибами и растениями рода *Sphagnum*. Позднее были открыты бактерии, обитающие внутри тканей сфагновых мхов: развитие методов электронной микроскопии в 70-х годах прошлого века позволило выявить представителей сине-зеленых водорослей и гетеротрофные бактерии внутри гиалиновых клеток мхов, при этом понятие «эндофит» тогда еще не было введено, исследователи применяли термин «внутриклеточные» (от англ. «intercellular»).

Сфагновые мхи населяют довольно экстремальные биотопы, с довольно низким содержанием питательных веществ, но при этом к настоящему времени являются довольно процветающей группой растений. Что позволяет растениям рода *Sphagnum* выживать в столь неподходящих условиях и при этом наращивать высокую биомассу?

Лишь в последние 2 десятилетия была установлена важная роль микроорганизмов, ассоциированных со сфагновыми мхами, в функционировании не только растений сфагнов, но и болотных экосистем в целом. Так была высказана теория о существовании сложной взаимосвязи между метаногенами, метанотрофами и сфагновыми мхами. Согласно предложенной концепции, продуцируемый метаногенами метан ассимилируется метанотрофами в аэробных условиях внутри гиалиновых клеток мхов, а затем связанный таким образом углерод поставляется в само растение мха. Другим аналогичным типом симбиоза считается симбиоз между растениями сфагнов и цианобактериями. Так, населяющие внутриклеточные пространства цианобактерии ассимилируют молекулярный азот и снабжают им растения мхов. Кроме того, только в работах последних нескольких лет упоминаются азотфиксирующие представители *Eubacteria*, ассоциированные со сфагновыми мхами. Гетеротрофные представители эубактерий впервые и наиболее полно были затронуты в работах группы проф. Берг.

Таким образом, к настоящему времени сложилась научно-обоснованная теория симбиоза между сфагновыми мхами и ассоциированными с ними микроорганизмами. Объектом изучения, освещенным в представленной диссертационной работе, являются аэробные гетеротрофные бактерии, ассоциированные со сфагновыми мхами, и относящиеся к группе RGP- бактерий. На основе анализа источников научной литературы и исследований, положенных в основу диссертационной работы, автором предлагается следующая модель, описывающая структурно-функциональную взаимосвязь между растениями сфагновых мхов и эндофитными микроорганизмами, населяющими их ткани (рис 3).

Согласно предложенной схеме, аэробные и микроаэрофильные гетеротрофные бактерии группы PGP занимают одну из ключевых позиций в системе симбиотических взаимоотношений между эндофитными бактериями и растением-хозяином. Основными функциями данной группировки микроорганизмов, по-видимому, является выработка необходимых растению фитогормонов и витаминов, а также антагонизм по отношению к фитопатогенам.

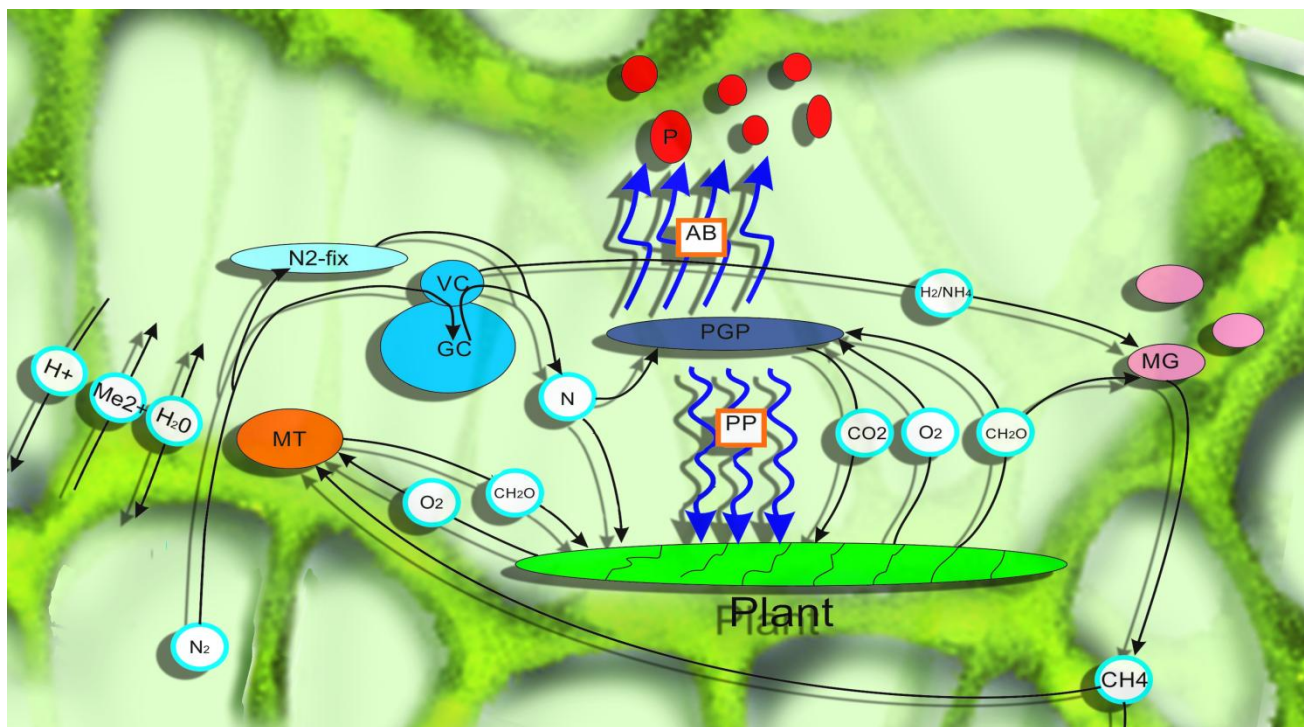


Рис. 3. Структурно-функциональная модель, описывающая систему биохимических взаимодействий между эндофитными бактериями и растением мха: PGP- бактерии группы «plant-growth promotion»; MG- метаногенные бактерии; MT- метанотрофные бактерии; VC- вегетативные клетки цианобактерий; GC- гетероцисты цианобактерий; N₂-fix – азотфиксирующие эубактерии; P - фитопатогенные бактерии и грибы; Plant – растение-хозяин; AB – антибиоз; PP- продукция фитогормонов и витаминов. Модель предложена автором (Shcherbakov et. al., 2014) и основывается на системе Грабхела и Хофстена (Grabhell and Hofsten, 1976).

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. Большинство научных исследований направлено на изучение ризосферных микроорганизмов (Lindow, Brandl, 2003; Kuiper et al., 2004; Berg et al., 2005).

Использование биологического потенциала микроорганизмов, населяющих корни и внутренние ткани бобовых и небобовых растений, позволит создать высокоэффективные биопрепараты для сельского хозяйства (Тихонович с соавт., 2005). Колонизация корней растений интродуцируемыми высокоэффективными микроорганизмами является наиболее важным моментом для функционирования высокоэффективных растительно-бактериальных ассоциаций. Успех при нанесении полезных микроорганизмов на семена или проростки растений зависит от колонизационного потенциала интродуцируемых штаммов (Weller, 1988; Shippers et al., 1987). В последнее время в мировой практике разработан ряд биопрепаратов, 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 продукции (Okon, Labandera-Gonzalez, 1994). В некоторых случаях применение биопрепаратов позволяло защитить растения от болезней, заменяя таким образом, химические пестициды (Weller, 1988; Chebotar et al., 2009).

К настоящему времени выделяют следующие востребованные ветви связанные с исследованием, разработкой и применением высокоэффективных микробиологических препаратов для растениеводства:

- Разработка, производство, применение микробиологических препаратов стимулирующего действия, обеспеченное продукцией полезными микроорганизмами различных биологически-активных метаболитов.
- Разработка, применение микробиологических препаратов защитного действия – так называемых биопестицидов.
- Разработка, применение микробиологических препаратов на основе полезных бактерий (фосфатмобилизующих, силикатных), способствующих более полному усвоению вносимых минеральных удобрений и малодоступных для растений органических и неорганических компонентов почвы.
- Разработка, производство, применение микробиологических препаратов, обеспечивающих переработку и уничтожение отходов сельскохозяйственного производства.
- Разработка, производство, применение микробиологических препаратов, способствующих восстановлению почвенных агроценозов, улучшающих плодородие и восстанавливающих баланс гумуса почвы, биопрепараты для биологической очистки почв, загрязненных нефтепродуктами, радионуклеидами, тяжелыми металлами и агрохимикатами.

ГЛАВА 2. Материалы и методы.

2.1. Сбор образцов сфагновых мхов. Определение видовой принадлежности.

В представленной 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: Австрийских Альп, Ленинградской области, Западной Сибири (Ханты-Мансийский автономный округ). В каждом регионе были выбраны 3 удаленные географические точки, находящиеся на расстоянии нескольких десятков километров друг от друга. Одна географическая точка представляла из себя не связанную с другими, болотную экосистему, часто имеющую свое географическое название. Перечень географических точек, в которых осуществлялся отбор образцов сфагновых мхов приведен в табл. 3.1.

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 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. Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) и конфокальная сканирующая лазерная микроскопия (CSLM).

Растительный материал (гаметофиты растений) отмывали от частиц посторонних включений и растительных остатков стерильным буфером PBS (табл. 2.1), резали в асептических условиях на секции размером 1,5-2,0 см и фиксировали в течении 18 ч при температуре +4°C с использованием раствора А (Табл. 2.2). После этого тщательно удаляли раствор А, растительный материал трехкратно отмывали в охлажденном до +4°C буфере PBS (1 раз – 1 мин, второй раз – 5 мин, 3 раз – 10 мин). Для проведения гибридизации растительный материал использовали сразу, либо помещали на хранение в растворе В (табл. 2.3) при -20°C.

Таблица 2.1. Состав буфера PBS (Sambrook, Russel, 2001).

Компонент	Концентрация
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
pH=7,4	

Таблица 2.2. Состав раствора А для фиксации растительного материала.

Компонент	Концентрация
4% раствор парформальдегида	75% (v/v)
Буфер PBS	25% (v/v)

Таблица 2.3. Состав раствора В для хранения растительного материала.

Компонент	Концентрация
Этиловый спирт 96%	75% (v/v)
Буфер PBS	25% (v/v)

Для гибридизации *in situ* использовали следующие универсальные и групп-специфичные олигонуклеотидные пробы (производства компании «ДНК-синтез», г. Москва): эквимольярную смесь олигонуклеотидных проб EUB338, EUBII338, EUBIII338 (Amann et. al., 1990; Daims et al., 1999) - универсальную пробу для всех эубактерий, маркированную флуорохромом Cy3; BET42a и GAM42a – специфичные пробы для представителей классов *Betaproteobacteria* и *Gammaaproteobacteria* (Manz et al., 1992), маркированные флуорохромами Cy-5 и 6FAM, соответственно. Концентрация формамида в гибридизационном буфере составляла 45% для универсальных бактериальных проб и 15% для групп-специфичных проб соответственно. При постановке отрицательного контроля использовали неспецифичную пробу NONEUB (Amann et. al., 1990).

Гибридизация *in situ* была выполнена согласно протоколу:

1. Отмытый от фиксирующего раствора А в буфере PBS растительный материал обрабатывали в течении 10 мин раствором лизоцима (концентрация 1 мг/мл) при комнатной температуре.
2. Промывали 3 мин в буфере PBS при температуре +4°C
3. Обезвоживали образцы этанольной серией с повышающейся концентрацией спирта 50% - 70% - 96% по 3 мин каждой серии.

4. В микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл помещали образцы растительного материала и добавляли по 1 мл гибридизационного буфера С (табл. 2.4).

Таблица 2.4. Состав гибридизационного буфера С.

Компонент	Концентрация (мкл/мл)	
	Для 15% формамида	Для 45% формамида
5M NaCl	180	180
1M TRIS-HCl (pH=7,6)	20	20
2% SDS	5	5
Формамид	150	450
H ₂ O бидист.	640	340
Олигонуклеотидная проба	5	5

5. Гибридизацию проводили в темноте при температуре 41°C в течении 90 мин.
6. Образцы отмывали однократно в подогретом до 42°C промывочном растворе D (таблица 2.5) и выдерживали во второй серии раствора D в течение 15 мин при 42°C.

Таблица 2.5. Состав промывочного раствора D.

Компонент	Концентрация (мкл/ 10 мл)	
	Для 15% формамида	Для 45% формамида
5M NaCl	636	60
1M TRIS-HCl (pH=7,6)	200	200
0,5M EDTA	0	100
H ₂ O бидист.	8900	9640

7. Образцы промывали в 1 мл бидист. воды, охлажденной до +4°C.
8. Части растений извлекали из микроцентрифужных пробирок, помещали на предметное стекло и под биноклем разделяли на отдельные веточки и листья.
9. Одиночные листья растений выкладывали на предметное стекло и быстро подсушивали под струей воздуха.
10. Для предотвращения процессов быстрого выгорания флуорохромов препараты обрабатывали реагентом ProLong Gold Antifade (Invitrogen, Германия).
11. Препараты выдерживали 20 ч при +4°C в темноте и микроскопировали.

Кофокальную 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

ним соответственно. Трехмерную реконструкцию изображений выполняли с использованием программы Imaris 7.0 (Bitplane, Швейцария).

2.3. Выделение бактериальных изолятов эндофитных бактерий

Для выделения изолятов эндофитных бактерий использовали следующую методику. Свежие гаметофиты сфагнома 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 перетирали 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).

Таблица 2.6. Состав среды R2A.

Компонент	Концентрация, г/л
Пептон	0,5
Дрожжевой экстракт	0,5
Гидролизат казеина	0,5
Крахмал	0,5
Глюкоза	0,5
MgSO ₄	0,024
K ₂ HPO ₄	0,3
Пируват Na	0,3
Агар	17
H ₂ O дист.	1000

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 пересеивали со скошенной агаризованной среды R2A, а также замораживали при -80°C в 20% растворе глицерина.

Ассоциацию целлюлозолитических бактерий выделяли из образцов сфагновых мхов *S. fallax* (Н. Klinggr.) Н. Klinggr., отобранных в районе оз. Волюярви (Ленинградская обл). Для

изоляции бактерий использовали метод накопительных культур на жидкой минеральной среде с добавлением фильтровальной бумаги и показателем рН=5,0. Для этого 3-5 растений мха, предварительно отмытых в стерильном физиологическом растворе, тщательно перетирали в асептических условиях с добавлением 10 мл физиологического раствора до получения кашеобразной массы. Затем, по 1 мл полученной растительной массы вносили в колбы с 50 мл среды и складчатым фильтром. Посевы инкубировали стационарно 14 дней при температуре 20°C, периодически встряхивая, отмечали изменения в структуре складчатого фильтра.

2.4. Молекулярно-генетическая идентификация выделенных изолятов

2.4.1. Выделение бактериальной ДНК

Бактериальную ДНК из чистых культур эндофитных бактерий выделяли согласно следующему протоколу:

1. Культуру бактерий наращивали на поверхности твердой среды R2A в течение 24 ч.
2. 1-2 бактериальные колонии вносили в микроцентрифужную пробирку и ресуспендировали в 500 мкл раствора А. Пробирки инкубировали 10 мин при 37°C.
3. В пробирки вносили по 100 мкл 10% раствора SDS и инкубировали 15 мин при 65°C, периодически встряхивая.
4. Пробирки полностью замораживали при – 20 °C, затем быстро размораживали.
5. Вносили 50 мкл 3 М ацетата Na.
6. Добавляли 500 мкл смеси фенол-хлораформ-изоамиловый спирт (в соотношении 25:24:1).
7. Интенсивно встряхивали на шейкере в течение 10 мин.
8. Центрифугировали 5 мин при 14000 об/мин.
9. Отбирали верхнюю водную фазу (супернатант) в чистые пробирки, затем повторно экстрагировали смесью хлороформ – изоамиловый спирт (в соотношении 24:1).
10. Центрифугировали 5 мин при 14000 об/мин.
11. Повторно отбирали водную фазу в чистые пробирки.
12. ДНК осаждали равным объемом изопропанола.
13. Центрифугировали 5 мин при 14000 об/мин.
14. Удаляли супернатант, осадок промывали 70% этанолом, подсушивали при комнатной температуре до полного испарения спирта.
15. ДНК растворяли в 50 мкл бидистиллированной воды.
16. Отбирали 2 мкл для проверки качества выделенной ДНК электрофоретически.

Электрофорез проводили в 1% агарозном геле на основе 0,5% буфера ТАЕ (табл. 2.7).

Таблица 2.7. Состав буфера TAE (50X), pH=7,6.

Компонент	Концентрация
TRIS-HCl	2 М
EDTA	0,05М
CH ₃ COOH	~1,56М
H ₂ O дист.	до 1 л

2.4.2. Амплификация фрагментов гена 16-S рРНК

Для амплификации фрагментов гена 16-S рРНК использовали праймеры fd1/rD1 (Коростик с соавт., 2006): прямой (8–27f) - 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; обратный (1541–1525r) - 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'. Амплификацию фрагментов проводили с использованием термоциклера Bio-Rad C1000 (Bio-Rad, США). Использовали Taq-полимеразу производства компании Хеликон (Россия) при следующих соотношениях реагентов (табл. 2.8.).

Таблица 2.8. Состав смеси для реакции ПЦР.

Объем реакционной смеси	20 мкл
Реакционный буфер (таблица 2.9)	1X
Дезоксирибонуклеотиды	25 mM каждый
Прямой праймер	5 pM
Обратный праймер	5 pM
Taq- полимераза	1 ед.
ДНК	До 5 нг
H ₂ O бидист.	До 20 мкл

Таблица 2.9. Состав реакционного буфера для PCR (1X).

Компонент	Концентрация
TRIS-HCl (pH=8,8)	67 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	17 mM
MgCl ₂	2,5 mM
Tween 20	0,01%
H ₂ O бидист.	

Для проведения ПЦР создавались следующие условия реакции:

1. Начальная денатурация ДНК - 95°C, 3 мин.
2. Амплификация в течение 30 циклов:
 - а). Денатурация ДНК - 95°C, 30 сек.

- б). Отжиг праймеров - 55°C, 30 сек.
 - в). Синтез ДНК - 72°C, 90 сек.
3. Окончание синтеза - 72°C, 5 мин.

Результаты ПЦР оценивали электрофоретически в 1% агарозном геле на основе 0,5% буфера ТАЕ (табл. 2.7).

2.4.3. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов гена 16-S рНК

Для проведения рестрикционного анализа использовали рестриктазы MSPI и HAEIII (производства компании Fermentas, США). Рестрикционная смесь имела следующий состав (табл. 2.10).

Таблица 2.10. Состав реакционной смеси для рестриктаз MSPI и HAEIII.

Компонент	Рестриктаза	
	MSPI	HAEIII
Реакционный буфер (10X)	2 мкл	2 мкл
Рестриктаза	2 мкл	1 мкл
ПЦР-продукт	10 мкл	10 мкл
H ₂ O деионизир.	6 мкл	7 мкл

Реакционную смесь инкубировали 16 ч при 37°C, результаты рестрикции оценивали электрофоретически в 3% агарозном геле на основе 0,5% буфера ТАЕ (табл. 2.7).

Полученные рестрикционные профили анализировали с помощью программного обеспечения TotalLab (Nonlinear Dynamics Ltd., США).

2.4.4. Секвенирование фрагментов гена 16-S рНК и определение видовой принадлежности изучаемых изолятов бактерий

Для секвенирования фрагментов ДНК были использованы олигонуклеотидные праймеры, применявшиеся на этапе амплификации. Очистку фрагментов и их выделение из агарозного геля проводили по следующему протоколу:

1. Участок геля, содержащий необходимый фрагмент ДНК, помещали в микроцентрифужную пробирку с 300 мкл раствора А (табл. 2.11). Выдерживали при 65 °С до полного растворения агарозы, периодически встряхивая.

2. Добавляли хорошо перемешанный раствор В (Раствор А с добавлением 40 мг/мл SiO₂) в количестве 50 мкл на пробу. Перемешивали 15 мин.
3. Центрифугировали 1 мин. при 2500 об/мин. Тщательно отбирали супернатант.
4. Добавляли 100 мкл раствора С (табл. 2.12). Перемешивали.
5. Центрифугировали 1 мин. при 2500 об/мин. Удаляли супернатант.
6. Добавляли 100 мкл 70% этанола. Перемешивали.
7. Центрифугировали 1 мин. при 2500 об/мин. Удаляли супернатант.
8. Отбирали остатки этанола, высушивали на воздухе (5 минут).
9. Добавляли 20 мкл 10 mM Tris-HCl (pH=8.0).
10. Центрифугировали 1 мин., чтобы осадить сорбент.

Таблица 2.11. Состав раствора А.

Компонент	Концентрация
Гуанидин-(изо)тиоцианат	3 М
EDTA	20 mM
TRIS-HCl (pH=7,0)	10 mM
Triton X-100	40 мг/мл
H ₂ O бидист.	

Таблица 2.12. Состав раствора С.

Компонент	Концентрация
Этанол	25% (v/v)
Изопропанол	25% (v/v)
NaCl	100 mM
TRIS-HCl (pH=8,0)	10 mM
H ₂ O бидист.	

Очищенные фрагменты ДНК использовали для секвенирования. Секвенирование проводили согласно протоколу фирмы Beckman Coulter (США) для 8-и канального секвенатора SEQ8000 с использованием коммерческого набора «SEQ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) with Quick Start Kit». Видовую принадлежность изолятов определяли с использованием программ

BLAST GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) и Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

2.5. Изучение культурально-морфологических, хозяйственно-ценных и физиолого-биохимических свойств выделенных изолятов эндофитных бактерий

2.5.1. Изучение культурально-морфологических свойств

Описывали следующие культуральные свойства выделенных изолятов бактерий при росте на агаризованной среде R2A: цвет и форму колоний, размер, консистенцию, профиль, край колоний.

Морфологические свойства бактерий описывали после микроскопирования фиксированных препаратов, окрашенных по Граму согласно протоколу:

1. На обезжиренное предметное стекло в каплю физраствора бактериологической петлей вносили 18-и часовую культуру бактерий и растирали до размеров монеты.
2. Подсушивали на воздухе.
3. Препарат фиксировали, проведя трехкратно над пламенем горелки.
4. Окрашивали раствором метилового фиолетового в течение 30 сек.
5. Сливали метиловый фиолетовый, промакивали препарат фильтровальной бумагой.
6. Протравливали препарат раствором Люголя 30 сек.
7. Сливали раствор Люголя, промакивали препарат фильтровальной бумагой.
8. Обесцвечивали 96% этанолом 15 сек.
9. Тщательно промывали стерильной водопроводной водой
10. Дополнительно окрашивали водным раствором фуксина основного 30 сек.
11. Тщательно промывали стерильной водопроводной водой, сушили фильтровальной бумагой.
12. Микроскопировали препарат с использованием иммерсионного масла на микроскопе «Микмед-6» («ЛОМО», Россия) с ситемой визуализации изображения.

При микроскопировании отмечали окраску бактерий по Граму, форму и размеры клеток, наличие и расположение спор, капсул, чехлов и др. признаки.

2.5.2. Изучение фунгицидной активности

Тест-культурами при изучении фунгицидных свойств выделенных изолятов послужили 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). Для этого поверхностным смывом с колонии гриба готовили суспензию спор с титром 10^5 КОЕ/мл. 20 мкл полученной суспензии вносили в расплавленный и охлажденный до 45°C картофельно-декстрозный агар объемом 200 мл. Питательную среду разливали по чашкам, после застывания среды стерильным пробочным сверлом в ней делали отверстия. В полученные «колодцы» вносили по 100 мкл культуры бактерий-антагонистов. Посевы инкубировали 5 суток при 25°C, после инкубации фунгицидную активность оценивали по диаметру зон ингибирования фитопатогена вокруг «колодца».

2.5.3. Изучение бактерицидной активности

Бактерицидную активность проверяли на 4-х штаммах фитопатогенных бактерий: *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* 822, *Pseudomonas fluorescens* 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 (20 г очищенного картофеля отваривали 30 мин, фильтровали через марлю, к фильтрату добавляли 15 г агара, объем доводили до 1 л, устанавливали pH=7,0, разливали по бутылкам, стерилизовали 20 мин при 1 атм.).

Культуры бактерий-антагонистов выращивали газоном трое сут. при температуре 28°C. Тест-культуры фитопатогенных бактерий засеивали газоном на поверхность картофельного агара, затем на поверхность выкладывались агаровые блоки, вырезанные из культур штаммов-антагонистов. Посевы инкубировали 48 ч при температуре 28°C, бактерицидную активность оценивали по диаметру зон ингибирования фитопатогена вокруг агарового блока.

2.5.4. Изучение способности изолятов к продукции ИУК и ее производных на среде с L-триптофаном

Исследуемые изоляты бактерий культивировали 5 суток стационарно при температуре 28°C на жидкой среде R2A с добавлением 2 mM L-триптофана. Затем 1 мл культуры вносили в микроцентрифужные пробирки и центрифугировали 2 мин на 14000 об/мин. 0,5 мл супернатанта вносили в чистые пробирки, затем добавляли 0,5 мл реактива Сальковского (Salkowski, 1885; Gordon и Weber, 1951). Пробирки инкубировали 10 мин при комнатной температуре, по интенсивности изменения окраски жидкости от бледно-розового до

насыщено-малинового судили об уровне продукции ИУК и ее производных исследуемыми изолятами бактерий.

Для выделения ауксинов культуральные жидкости (объемом 1 мл) подкисляли 0,4 н соляной кислотой до $\text{pH}=3,0$ и экстрагировали дважды эквивалентными объемами этилацетата. Полученные экстракты выпаривали досуха при 35°C на вакуумном роторном испарителе и растворяли в 0.5 мл 18% ацетонитрила. Полученные образцы фильтровали через нейлоновые мембранные фильтры (Corning Costar Spin-X centrifuge tube filters) с диаметром пор 0.22 мкм (Sigma, США) и разводили в 10 раз 18% ацетонитрилом для последующего хроматографического анализа.

Анализ ауксинов в полученных экстрактах проводили с помощью системы ультрапроизводительной жидкостной хроматографии (УПЖХ, UPLC) Waters ACQUITY UPLC H-class с флуоресцентным детектором.

Ауксины разделяли на колонке с обращенной фазой Waters ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (Waters, США), используя изократическое разделение в элюенте ацетонитрил : вода : уксусная кислота (18:82:0.1 об/об/об) в течение 4 мин, с дальнейшей промывкой колонки элюентом ацетонитрил : вода : уксусная кислота (80:20:0.1 об/об/об) в течение 3 мин. Скорость подачи элюента составляла 0.3 мл/мин, температура колонки 30°C , длины волн флуоресцентного детектора: 280 нм возбуждающая (Ex) и 350 нм эмиссионная (Em).

Идентификацию ауксинов проводили сравнением времен удержания соответствующих веществ (Sigma-Aldrich, США) в пробах и в стандартной смеси. Количества ауксинов определяли сравнением площадей пиков в пробах и стандартной смеси с концентрацией кислот 0,5 мкг/мл (индолил-3-молочная), 10 мкг/мл (индолил-3-карбоновая) и 4 мкг/мл (индолил-3-уксусная). Степень использования L-триптофана (%) определяли как долю его молекул, идущих на биосинтез эквивалентного количества молекул ауксинов, идентифицированных в пробах.

Для определения содержания L-триптофана в питательных средах использовали стерильные среды без дополнительной пробоподготовки. Анализ L-триптофана проводили на колонке с обращенной фазой Waters ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (Waters, США) 5 минут в линейном градиенте элюента ацетонитрил : вода : уксусная кислота от 1% : 99% : 0,1% до 18% : 82% : 0,1%, с последующей 3-х минутной изократической элюцией и 3-х минутной промывки колонки при концентрации компонентов буфера 80% : 20% : 0.1% . Скорость подачи элюента составляла 0.3 мл/мин, температура колонки 30°C , длины волн флуоресцентного детектора: 280 нм возбуждающая (Ex) и 350 нм эмиссионная (Em). Идентификацию L-триптофана проводили сравнением его времени удержания в пробах и в растворе химически чистого вещества (Sigma, США). Количество L-триптофана определяли сравнением площадей пиков в пробах и стандартной смеси с концентрацией 0,01 мг/мл.

2.5.4. Изучение ростстимулирующей активности на проростках редиса

Предварительно был оптимизирован протокол поверхностной стерилизации семян, позволяющий полностью подавить всю эпифитную микрофлору семян, но сохранить в жизнеспособном состоянии зародыш семени:

1. Семена выдерживали 2 мин в 70% этаноле
2. Отмывали в стерильной водопроводной воде.
3. 2-хкратно отмывали в 30% растворе гипохлорита Na в течение 5 мин.
4. 5-икратно отмывали в стерильной водопроводной воде.

Для контроля качества поверхностной стерилизации 20 семян выкладывали на поверхность питательного агара и инкубировали 48 ч при температуре 28°C. По отсутствию бактериального роста вокруг семян, судили о степени их стерильности.

Исследуемые штаммы бактерий культивировали 3-е сут. при температуре 28°C стационарно на жидкой среде R2A (табл. 2.4). Стерильные семена редиса (сорт «Дуро», агрофирма «Дом семян», Санкт-Петербург) замачивали в полученных суспензиях клеток бактерий в течение 30 мин, затем в условиях опыта *in vitro* выкладывали в стерильные влажные камеры на поверхность фильтровальной бумаги. Для каждого варианта на 1 влажную камеру выкладывали по 25 семян в трех повторностях. Семена в контрольном варианте замачивали в стерильном физиологическом растворе. Проростки выращивали в течение пяти суток при 28°C. Контрольным штаммом для сравнения ростстимулирующих свойств бактерий выбран штамм *Pseudomonas chlororaphis* RR228 из коллекции лаборатории технологии микробных препаратов ГНУВНИИСХМ, уже используемый при производстве биопрепаратов.

2.5.5. Изучение способности изолятов растворять малорастворимые неорганические соединения фосфора

Способность выделенных изолятов эндофитных бактерий проверяли на модифицированной среде Муромцева (табл. 2.7), в которую вносили 2 г/л ортофосфата Ca и фосфоритной муки.

Таблица 2.7. Состав среды Муромцева для изучения фосфатмобилизующей активности бактерий.

Компонент	Концентрация, г/л
Глюкоза	10,0
Аспарагин	1,0
K ₂ SO ₄	0,2
MgSO ₄	0,2
Дрожжевой экстракт	0,02
Агар	15,0
pH=7,0	

Штаммы изучаемых бактерий засеивали уколом на поверхность твердой среды Муромцева, посевы инкубировали 5 сут при температуре 28°C. По диаметру зон просветления ортофосфата Са и фосфоритной муки судили о способности изучаемых штаммов мобилизовать неорганические соединения фосфора.

2.5.6. Изучение ферментативной активности

Для изучения протеазной активности использовали среду с казеином (табл. 2.8). Штаммы изучаемых бактерий засеивали уколом на поверхность среды, посевы инкубировали 2-е сут при температуре 28°C. Для проявления зон растворения казеина чашки после инкубации заливали 10 мл 10 % раствора трихлоруксусной кислоты.

Для изучения амилазной активности использовали среду с крахмалом (табл. 2.9). Штаммы изучаемых бактерий засеивали уколом на поверхность среды, посевы инкубировали 2-е сут при температуре 28°C. Для проявления зон растворения крахмала чашки после инкубации заливали 10 мл разбавленного раствора Люголя.

Для изучения липазной активности использовали минеральную среду (табл. 2.10). Среду разливали по чашкам Петри, после застывания на поверхность среды наносили 100 мкл стерильного подсолнечного масла и равномерно распределяли шпателем. Штаммы изучаемых бактерий засеивали уколом на поверхность среды, посевы инкубировали 2-е сут при температуре 28°C. По изменению окраски индикатора от синего до желтого, свидетельствующей о гидролизе жиров с образованием жирных кислот, судили о наличии липазной активности у штаммов бактерий.

Для изучения целлюлазной активности использовали модифицированную методику (Kasana et al., 2008). Минеральную среду с добавлением микрокристаллической целлюлозы (табл. 2.11) разливали по чашкам Петри, в центр чашки уколом засеивали исследуемый изолят бактерий.

Посевы инкубировали 5 сут. при 28°C, для выявления зон растворения микрокристаллической целлюлозы чашки заливали разбавленным раствором Люголя.

Таблица 2.8. Среда с казеином для определения протеазной активности бактерий.

Компонент	Концентрация, г/л
Казеин	10,0
Глюкоза	0,5
Крахмал	0,5
K ₂ HPO ₄	0,3
MgSO ₄	0,1
Агар	15
pH=6,0	

Таблица 2.9. Среда с крахмалом для определения амилазной активности бактерий

Компонент	Концентрация, г/л
Крахмал	2,0
Пептон	0,5
K ₂ HPO ₄	0,3
MgSO ₄	0,1
Агар	15
pH=6,0	

Таблица 2.10. Минеральная среда для определения липазной активности бактерий.

Компонент	Концентрация, г/л
(NH ₄) ₂ PO ₄	1,5
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄	0,3
CaCl ₂	0,3
NaCl	0,3
Агар	20,0
Бромтимоловый синий 0,05%	10,0
pH=7,0	

Таблица 2.11. Среда с микрокристаллической целлюлозой для изучения целлюлазной активности бактерий.

Компонент	Концентрация, г/л
Целлюлоза	2,0
NaNO ₃	2,0
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄	0,5
KCl	0,5
Дрожжевой экстракт	0,1
Агар	17
pH=6,0	

2.5.7. Изучение физиолого-биохимических свойств

Для определения оптимальных температур роста бактерий, культуры уколом засеивали на поверхность агаризованной среды R2A и инкубировали в различных диапазонах температур в течение 48 ч. Скорость роста оценивали по диаметру выросших бактериальных колоний.

Для определения оптимальных значений pH питательной среды, культуры уколом засеивали на поверхность агаризованной среды R2A с различными показателями pH (5,0 – 8,0) при температуре 28°C в течение 48 ч. Скорость роста оценивали по диаметру выросших бактериальных колоний.

Использование различных источников азота изучали на среде (табл. 2.12.) с добавлением следующих минеральных и органических субстратов: NaNO₃, NH₄Cl, пептон, дрожжевой экстракт, казеин, гидролизат казеина, бобовый отвар, кукурузный экстракт, желатин, а также безазотную среду.

Использование различных источников углерода оценивали на фоновой среде (табл. 2.13.) с добавлением следующих субстратов: D-глюкоза, L-арабиноза, глицерин, дульцитол, D-ксилоза, лактоза, D-маннитол, сахароза, D-сорбит, мальтоза, инозит. Готовили 10% растворы субстратов, стерилизовали при 0,5 атм., добавляли в фоновую среду. Конечная концентрация субстрата – 1%.

Таблица 2.12. Состав питательной среды для оценки использования источников азота.

Компонент	Концентрация, г/л
Глюкоза	20,0
K ₂ HPO ₄	1,0
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄	0,5
NaCl	0,5
Агар	15,0
Раствор микроэлементов по Федорову	1,0

Таблица 2.13. Состав фоновой питательной среды для оценки использования источников углерода.

Компонент	Концентрация, г/л
Пептон	5,0
K ₂ HPO ₄	1,0
Бромтимоловый синий 1,6%	2,0

2.6. Изучение *in planta* колонизационного потенциала, биоконтрольной, ростстимулирующей и целлюлолитической активности перспективных штаммов

2.6.1. Определение колонизационной активности с помощью метода гнотобиотических систем

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 биопрепаратов. Растительными объектами для изучения служили следующие сельскохозяйственные культуры: пшеница *Triticum aestivum* (сорт «Веда», селекции Краснодарского НИИ сельского хозяйства), томаты *Solanum lycopersicum* (сорт «Персей», агрофирма «Дом семян», Санкт-Петербург) и редис *Raphanus sativus* L. var. *radicula* (сорт «Дуро», агрофирма «Дом семян», Санкт-Петербург).

Семена пшеницы стерилизовали сначала 2 мин в 70% этаноле, затем промывали в стерильной воде, после чего двукратно выдерживали в 30% растворе гипохлорита Na в течение 30 мин.

Семена томатов сначала 1 мин отмывали в 70% этаноле, затем двукратно выдерживали в 30% растворе гипохлорита Na в течение 8 мин. После стерилизации семена тщательно отмывали в стерильной воде.

Далее семена инокулировали бактериальными суспензиями клеток с титром 10^7 КОЕ/мл и выращивали в условиях гнотобиотических систем согласно методикам, разработанным во ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (Румянцева с соавт., 2011). Для определения количества интродуцируемых бактерий в ризоплане, отмытые корни суспендировали в физиологическом растворе и учитывали численность микроорганизмов высевом на твердую среду R2A.

2.6.2. Визуализация интродуцируемых штаммов бактерий с помощью метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH)

Для изучения пространственной локализации бактерий на корнях растений томатов применяли метод флуоресцентной *in situ* гибридизации и люминесцентной микроскопии. Для этого, отмытые 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).

2.6.3. Детекция интродуцируемых штаммов бактерий методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК перспективных штаммов были выровнены со схожими последовательностями, полученными с помощью программы BLAST GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) других распространенных близкородственных видов. В данных последовательностях определили уникальные участки, к которым подобрали специфические праймеры при помощи программы Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Параметры ПЦР-реакции с использованием данных праймеров оптимизировали с использованием тотальной ДНК изучаемых штаммов (п. 2.3.2.). Растения томатов инокулировали бактериальными культурами перспективных штаммов, затем выращивали в нестерильных условиях закрытого грунта (см. ниже п. 2.5.5). По истечению периода вегетации извлекали растения из сосудов, несколько раз отмывали корни в стерильной водопроводной воде. Затем отмытые корни с частицами ризосферной почвы тщательно перетерали в физрастворе с использованием ступки и пестика. В качестве контроля использовали корни неинокулированных растений и образец почвы. Бактериальную ДНК из

полученных суспензий выделяли согласно протоколу (п. 2.3.2). Состав ПЦР-смеси, использовавшейся при анализе, приведен в табл. 2.8. ПЦР-реакцию с образцами ДНК проводили при следующих параметрах:

1. Начальная денатурация ДНК - 95°C, 3 мин.
2. Амплификация в течение 30 циклов:
 - а). Денатурация ДНК - 95°C, 30 сек.
 - б). Отжиг праймеров - 57°C, 15 сек.
 - в). Синтез ДНК - 72°C, 30 сек.
3. Окончание синтеза - 72°C, 5 мин.

Результаты ПЦР оценивали электрофоретически в 1% агарозном геле на основе 0,5% буфера ТАЕ (табл. 2.7).

2.6.4. Изучение биоконтрольной активности штаммов *in planta*

В эксперименте по биоконтролю *in planta* использовали модельные растительно-микробные системы. Бактериальные культуры перспективных штаммов-антагонистов наращивали 72 часа в стационарной культуре на жидкой среде R2A (Табл. 2.6).

Культуру фитопатогена *F. culmorum* выращивали 10 суток на картофельно-декстрозном агаре до получения конидий, затем готовили суспензию конидий в стерильном физиологическом растворе, численность конидий в суспензии определяли прямым подсчетом в камере Горяева. Из полученной суспензии готовили фоновую суспензию с титром конидий 10^4 КОЕ/мл. Семена пшеницы *Triticum aestivum* (сорт «Подарок Дону») поверхностно стерилизовали сначала 2 мин в 70% этаноле, затем 2 раза по 10 мин в 30% растворе гипохлорида Na и пятикратно отмывали в стерильной воде. Семена инокулировали 30 мин в суспензии клеток тестируемых штаммов-антагонистов с титром 10^7 КОЕ/мл и высаживали в вегетационные сосуды объемом 1 л с отмытым кварцевым песком на глубину 1 см. В сосуды с высаженными семенами вносили фитопатогенный фон в объеме 100 мл. Повторность опыта – шестикратная. Растения культивировали 7 дней в фитотроне, после чего извлекали из песка, отмывали; отмечали число растений, пораженных корневой гнилью, максимальную длину побегов и корней растения.

В эксперименте по биоконтролю черной пятнистости томатов, вызванной *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, культуру фитопатогена выращивали 2 сут на поверхности 2% голодного картофельного агара. Готовили суспензию бактерий в физиологическом растворе, численность бактерий в суспензии определяли высевом на плотные питательные среды. Численность *P. syringae* pv. *tomato* в фоновой суспензии приводилась к 10^7 КОЕ/мл. Семена томатов *Solanum lycopersicum* (сорт «Персей», агрофирма «Дом семян», Санкт-Петербург) поверхностно

стерилизовали 2 мин в 70% этаноле и пятикратно отмывали в стерильной воде. Семена инокулировали 30 мин в суспензии клеток тестируемых штаммов-антагонистов с титром 10^7 КОЕ/мл и высаживали в вегетационные сосуды объемом 1 л с отмытым кварцевым песком на глубину 1 см. В сосуды с высаженными семенами вносили фитопатогенный фон в объеме 100 мл. Повторность опыта – шестикратная. После 7 дней роста растения опрыскивали бактериальной суспензией штаммов-антагонистов с титром 10^6 КОЕ/мл. Томаты выращивали 14 дней в фитотроне, после чего извлекали из песка, отмывали; отмечали число растений, пораженных черной пятнистостью.

2.6.5. Изучение ростстимулирующей активности штаммов *in planta*

В условиях микровегетационного опыта растения томатов выращивали в сосудах объемом 3 л, в качестве субстрата использовался 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).

Растения выращивали в течение 30 дней в условиях летних вегетационных домиков ГНУ ВНИИСХМ, где температура и влажность определялась погодными условиями на широте г. Санкт-Петербурга. По истечению периода вегетации растения извлекали из сосудов, отмывали от остатков почвы и определяли разницу в сырой массе и длине корешков, проростков по сравнению с контрольным вариантом.

2.6.6. Изучение скорости разложения соломы целлюлозолитической микробной ассоциацией (ЦМА).

Для определения стабильности целлюлозолитической ассоциации, выделенной по п. 2.3.1, провели 10 последовательных пассажей культуры, для чего по 100 мкл первоначальной суспензии вносили в новые колбы с 200 мл среды Гетченсона и 5 граммами измельченной фильтровальной бумаги инкубировали 7 суток при 20°C и 220 об/мин, отмечали изменения в цвете и консистенции фильтровальной бумаги.

Полученную культуру, представляющую из себя смесь бактериальной массы и остатков полудеградированных волокон целлюлозы исследовали под микроскопом («Ломо», Россия) в живых и окрашенных препаратах (п. 2.4.1.). Целлюлазную активность сообщества определяли по методике Кассана (п. 2.4.7.) в сравнении с жидкой культурой *B. subtilis* Ч-13 из коллекции

лаборатории технологии микробных препаратов ГНУ ВНИИСХМ, обладающей целлюлазной активностью. Для разделения ассоциации и выделения доминантных форм в чистые культуры, суспензию методом последовательных серийных разведений высевали на поверхность агаризованной минеральной среды с 1% микрокристаллической целлюлозы и инкубировали 7 суток при 20°C. Отдельные колонии бактерий отсеивали на свежие чашки Петри и пробирки со скошенным агаром, описывали культурально-морфологические свойства выросших изолятов бактерий. Физиолого-биохимические свойства выделенных изолятов бактерий исследовали методом мультисубстратного анализа с помощью системы GEN III Microplate (BioLog, США). Исследования влияния целлюлозолитической ассоциации 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 2).

2.7. Создание и апробация лабораторных образцов микробиологических препаратов

2.7.1. Условия культивирования перспективных штаммов

Состав питательной среды оптимизировали при наращивании бактериальной культуры в качалочных колбах объемом 500 мл с рабочим объемом 150 мл. За основу были взяты питательные среды 5 различных составов, для изготовления которых, прежде всего используется дешевое сырье. Культуры наращивали в течение 3-х суток при температуре 28°C и перемешивании - 200 об/мин, затем методом последовательных серийных разведений и высевом на агаризованную среду R2A определяли титр культуры.

Оптимизацию параметров культивирования проводили с использованием универсального газо-вихревого биореактора «Торнадо» объемом 10 л и коэффициентом наполнения 0,5. В качестве основных параметров определяли показатели температуры, pH, концентрации растворенного кислорода. Плотность культуры оценивали колориметрически на спектрофотометре «КФК-2» при длине волны 540 нм и ширине кювет 5 мм.

2.7.2. Создание оптимальной композиции лабораторного образца микробиологического препарата

Для создания стабильного в хранении и консистенции прототипа биопрепарата использовали различные композиции добавок. Основу данной композиции составляли следующие основные ингредиенты: культура клеток, разбавленная стерильной водой в зависимости от плотности,

до титра $1,5 \times 10^9$; стабилизатор консистенции; краситель зеленого цвета; консервант. Различные вариации концентраций и сочетаний указанных добавок тестировали на совместимость с культурами изучаемых штаммов бактерий. Определяли оптимальный состав композиции прототипа биопрепарата, стабильный по консистенции и срокам хранения. Стабильность численности бактериальной культуры и ее свойств в композиции биопрепарата определяли через 7, 14, 30, 60, 90 сут. хранения.

2.7.3. Апробация лабораторных образцов микробиологических препаратов в полевых экспериментах

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

Культура – лен масличный, подсолнечник масличный. Почва- чернозем обыкновенный, среднегумусный, тяжелосуглинистый, гумус 3-4%, рН=7,1. Предшественник- яровая мягкая пшеница, культуры высевались в четырехпольном севообороте последней культурой, срок сева – 23 мая 2012, посев проведен сеялкой точного сева CRC-6-10, с порционным высевальным аппаратом, уборка проведена малогабаритным комбайном «Винтерштайгер». Вид опыта – полевой- мелкоделяночный, производственный, площадь делянок – 25 м² в трехкратной повторности.

Варианты опыта: 1. Лабораторный образец препарата на основе штамма *Pseudomonas brenneri* RM14B – обработка семян 2 л/т, обработка по вегетации 1 л/га; 2. Лабораторный образец препарата на основе штамма *Pseudomonas asplenii* RF13H – обработка семян 2 л/т, обработка по вегетации 1 л/га; 3. - Лабораторный образец препарата на основе штамма *Flavobacterium sp.* RM14A – обработка семян 2 л/т, обработка по вегетации 1 л/га; 4. Биопрепарат «Бинорам» - по рекомендации производителя; 5. Контроль – без обработки.

Учет урожая проводился методом взвешивания семян со всех трех повторностей, высчитыванием среднего показателя, пересчетом урожайности на 1 га.

ГЛАВА 3. Результаты исследований и обсуждение

3.1. Характеристика и география отбора образцов сфагновых мхов

В представленной диссертационной в качестве объектов исследований были выбраны два вида сфагнового мха, которые занимают различные экологические ниши в болотных экосистемах, но в то же время распространены довольно широко и часто встречаются вместе в одних и тех же биотопах - *Sphagnum fallax* (Н. Klinggr.) Н. Klinggr. и *S. magellanicum* Brid., (названия видов приводятся по Ignatov et al., 2006):

- *Sphagnum magellanicum* Brid. (Сфагнум магелланский, секция *Sphagnum*, Приложение 1, фотография 1). Дерновники красноватые, пурпурно-фиолетовые, иногда с сизо-зеленовато-желтым оттенком. Склеродермис стебля от красноватого до пурпурного, стеблевые листья 0,8-2,0 мм длиной и 0,5-0,8 мм шириной, языковидно-лопаточковидные, к верху расширенные, с порами в водоносных клетках. Веточные листья черепитчатые, широкояйцевидные. Хлорофилоносные клетки на срезе эллиптические, центрированные. Гигрофит, реже гидрофит. Распространен преимущественно на открытых облесенных верховых болотах с древесным ярусом из сосны, с более или менее развитым ярусом болотных кустарников. Обычно на кочках и грядах, в грядово-мочажинных озерковых комплексах, реже в межкочьях и мочажинах, а также в заболоченных хвойных и смешанных лесах, по берегам рек и озер. В Европе один из главных торфообразователей, характерный и распространенный член комплексных сфагновых ассоциаций. Непосредственного участия в затягивании водной поверхности не принимает, но широко распространен в ассоциациях ряда сухопутного заболачивания.

- *Sphagnum fallax* (Н. Klinggr.) Н. Klinggr. (Сфагнум обманчивый, секция *Cuspidata*, Приложение 1, фотография 2). Дерновники обычно высокие и рыхлые, жестковатые, от серо- и желто- зеленых до буроватых. Гиалодермис стебля 2-4 слойный, не ясно или местами более ясно ограниченный. Склеродермис зеленоватый или желтоватый. Стеблевые листья мелкие 0,1-1,0 мм длиной, коротко равнобедренные или равносторонне треугольные, заостренные, обычно без волокон или пор, с сильно расширенной к низу каймой. Веточные листья сухие, волнистые, не блестящие вогнутые, ланцетовидные, постепенно сужены в более менее длинную верхушку, на наружной поверхности с немногими кольчатыми порами в боковых углах и с верхушечными порами, более крупными у основания листа. Хлорофилоносные клетки на срезе треугольные. Гидрофит. Встречается в заболоченных хвойных и смешанных лесах, в мочажинах и межкочьях, по обводненным окраинам комплексных переходных верховых болот, по берегам озер, на сплавилах, в сырых лесах и тундрах; повсюду довольно часто.

География отобранных образцов двух видов мха достаточно широка, что позволяет оценить результаты исследований в масштабе Евразийского континента (Рис. 3.1, табл. 3.1.). Так, первой географическим регионом были выбраны Австрийские Альпы, крайняя западная территория отбора. Образцы, отбирали в предгорьях Альп, в трех географических точках, удаленных друг от друга на расстоянии 200 км. Центральным географическим регионом была выбрана территория Ленинградской области, изобилующая болотными экосистемами и заболоченными территориями. Именно с этими образцами были проведены наиболее полные исследования, в том числе касающиеся экологического разнообразия штаммов бактерий, ассоциированных со сфагнами. Крайним восточным регионом была выбрана Западная Сибирь, территория Ханты-Мансийского АО. Здесь территория также изобилует болотами, ареал распространения *S. fallax* и *S. magellanicum* затрагивает и эти территории.

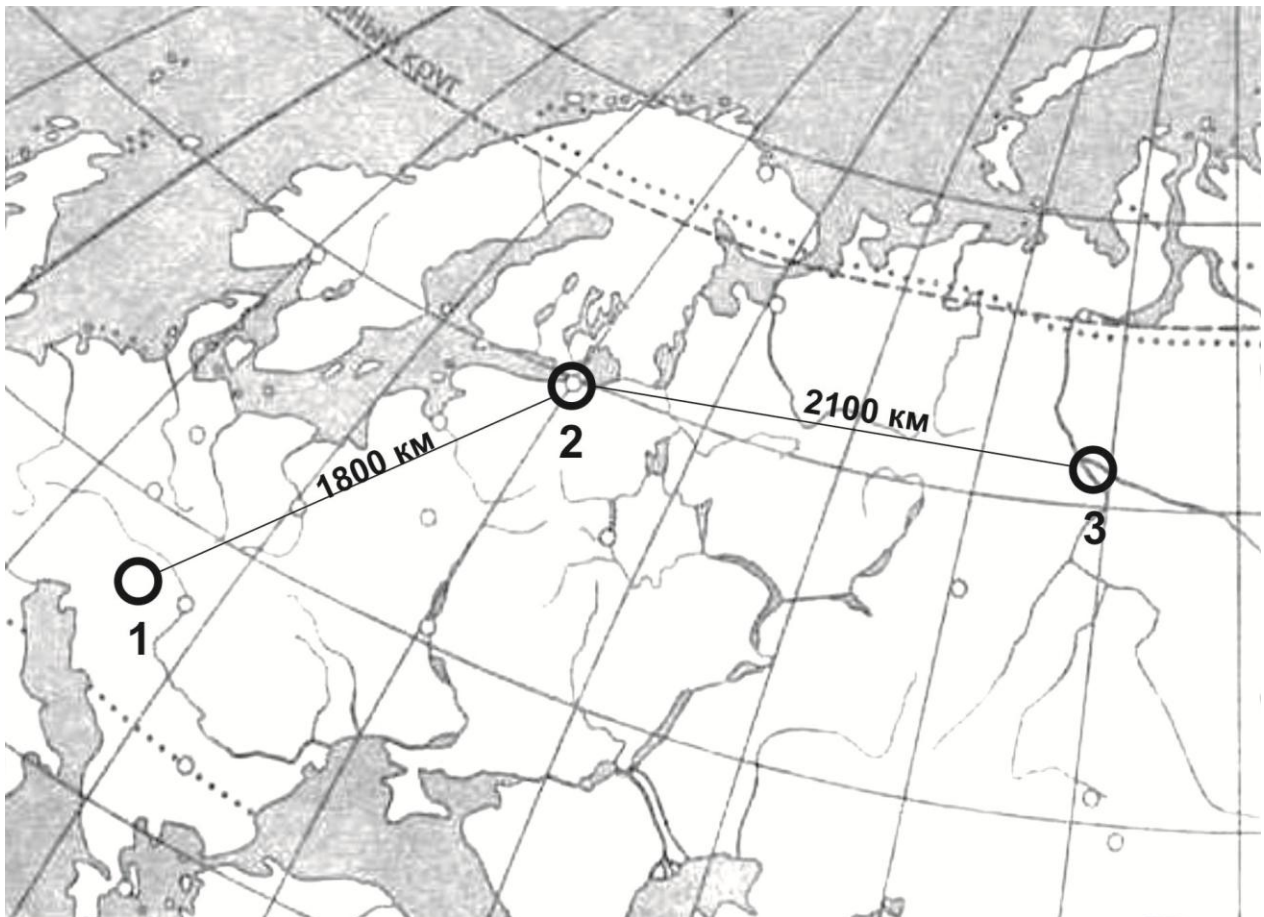


Рис. 3.1. География отбора образцов сфагновых мхов в 2009-2012 годах: 1- географический регион «Австрийские Альпы»; 2 – географический регион «Ленинградская область»; 3 – географический регион «Западная Сибирь».

Выбранные болотные экосистемы имеют следующие экологические характеристики:

“Rootmoos” (Австрия, федеративная земля Штирия). Небольшое округлое олиготрофное болото, расположенное на 690 м выше уровня моря, в 13 км юго-западнее Гувега, Земля Штирия. Болото верхового типа, площадь около 5 га. Окружено еловым лесом с внутренним поясом: береза пушистая (*Betula pubescens*) - крушина ольховидная (*Frangula alnus*). *Sphagnum fallax* здесь произрастает вместе с *Carex canescens*, *Carex rostrata*, *Dryopteris carthusiana* и *Frangula alnus*. Внутреннее пространство болота занимают концентрические круги горной сосны (*Pinus mugo*), ассоциированной с *Andromeda polifolia*, *Calluna vulgaris*, *Carex pauciflora*, *Drosera rotundifolia*, *Empetrum hermaphroditum*, *Eriophorum vaginatum*, *Melampyrum pratense*, *Pleurozium schreberi*, *Polytrichum strictum*, *Sphagnum magellanicum*, *Sphagnum fuscum*, *oxycoccus Vaccinium*, *Vaccinium uliginosum* и *Vaccinium vitis-idaea*.

“Waasenmoos” (Австрия, федеративная земля Зальцбург). Расположено у шоссе Пасс-Турн-Стит, близ Миттерсилл, Земля Зальцбург. Болото площадью 15,7 га, на 1200 м выше уровня моря. На протяжении нескольких веков использовалось для добычи торфа и изрезано многочисленными дренажными каналами. В 2002 году дренажные каналы были закрыты и был начат процесс рекультивации болота. К настоящему времени на болоте встречается типичная растительность антропогенно-деградированных болот: береза пушистая (*Betula pubescens*), молиния голубая (*Molinia caerulea*), сфагновые мхи, осоки (*Carex spec.*), горная сосна (*Pinus mugo*), карликовая береза (*Betula nana*). Встречается 22 вида сфагновых мхов. Для болота типичны также *Andromeda polifolia*, *Aulacomnium palustre*, *Calluna vulgaris*, *Drosera rotundifolia*, *Eriophorum vaginatum*, *Pinus mugo* agg., *Potentilla erecta*, *Sphagnum angustifolium*, *Sphagnum capillifolium*, *Sphagnum magellanicum*, *Sphagnum papillosum*, *Sphagnum rubellum*, *Vaccinium oxycoccus*, *Vaccinium uliginosum*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Agrostis stolonifera*, *Carex echinata*, *Carex nigra*, *Carex rostrata*, *Equisetum fluviatile*, *Equisetum sylvaticum*, *Frangula alnus*, *Juncus filiformis*, *Melampyrum pratense*, *Menyanthes trifoliata*, *Molinia caerulea*, *Polytrichum commune*, *Potentilla erecta*, *Sphagnum fallax*, *Sphagnum girgensohnii*, *Sphagnum palustre*, *Vaccinium myrtillus* и *Viola palustris*.

“Pürgschachen” Moor (Австрия, федеративная земля Штирия). Болото расположено возле Ардинга, дер. Еннс, Земля Штирия, размер – около 60 га. До 60-х годов прошлого века оставалось нетронутым, затем периферия болота была осушена и использовалась в хозяйственных целях. С 1991 года находится под защитой Рамсарской конвенции и считается одним из наиболее хорошо сохранившихся альпийских болот. Типичное верховое болото, вокруг открытой центральной площадки без деревьев пояс из карликовой горной сосны (*Pinus mugo*), к внешнему краю переходящий в березу пушистую (*Betula pubescens*). Центральная часть болота имеет типичную грядовую структуру со *Sphagnum cuspidatum*, *Carex limosa* и *Rhynchospora alba* в мочажинах и *Sphagnum magellanicum*, *Pleurozium schreberi*, *Cladonia*

arbuscula, *Andromeda polifolia*, *Aulacomnium palustre*, *Calluna vulgaris*, *Drosera rotundifolia*, *Eriophorum vaginatum*, *Sphagnum capillifolium*, *Vaccinium oxycoccos* на кочках. *Sphagnum fallax* встречается по окрайке болота в ассоциации с *Carex rostrata*, *Frangula alnus*, *Molinia caerulea*.

Болото «Полесье». Расположено на территории Выборгского района Ленинградской области, в 95 км северо-западнее Санкт-Петербурга. Заболоченное редколесье по окрайке елового леса. Мочажина травяно-осоковая с поверхностным обводнением, окружена буграми с элементами кустарничково-сфагнового верхового болота. Древесный ярус образован сосной обыкновенной (*Pinus sylvestris*), окрайка леса сформирована елью европейской (*Picea abies*). По центру болота - плоские кочки, образованные дерниной *Sphagnum magellanicum*, *S. fuscum* с примесью тростника обыкновенного (*Phragmites australis*), хвоща болотного (*Equisetum palustre*), клюквы болотной (*Oxycoccus palustris*).

Озеро «Волюярви». Расположено на территории Всевожского района Ленинградской области, в 35 км северо-восточнее Санкт-Петербурга. Верховое осоково-сфагновое с элементами переходного болота, сформированное по берегу озера. Растительный покров сформирован сфагновыми мхами *S. magellanicum*, *S. fallax*, *S. angustifolium*, осоками (*Carex* spec.).

Урочище «Кардон Кирпичный». Подтопленное (влияние изменения гидрологического режима из-за близкого расположения дороги) кустарничково-осоково-сфагновое с сосной верховое болото, очевидно, формирующиеся низинное болото. Древесный ярус из ели европейской (*Picea abies*) и березы пушистой (*Betula pubescens*).

Болото «Чистое». Расположено на левобережной террасе р. Оби в 25 км к северо-востоку от Ханты-Мансийска у пос. Шапша. По центру болота - плоские кочки, образованные чистой дерниной *Sphagnum magellanicum* в кустарничково-пушицево-сфагновом сообществе. Плоские кочки и ковры с доминированием *Sphagnum magellanicum* высотой 15-20 см, покрытые ковром клюквы болотной (*Oxycoccus palustris*) и кустарничков (*Chamaedaphne calyculata*, *Andromeda polifolia*), чередуются с плоскими участками *Sphagnum angustifolium*, по которым равномерно рассеяны кочки пушицы влагилицной.

Болото «Мухрино». Расположено на левобережной террасе Иртыша в 30 км к юго-западу г. Ханты-Мансийска в районе международного полевого стационара кафедры ЮНЕСКО Югорского государственного университета «Мухрино». сосново-кустарничково-сфагновом сообществе на кочках сфагна бурного (*Sphagnum fuscum*), образующего почти сплошной моховой покров. *S. magellanicum* встречался в виде примеси, изредка образуя чистые пятна до 0,4-0,5 м в диаметре. Микрорельеф участка хорошо выражен, волнисто-кочковатый, усложненный отдельными более высокими кочками и мелкими мочажинами 0,5-1,5 м в диаметре. Относительный перепад высот 30-40 (до 50) см. Древесный ярус разреженный, образованный сосной обыкновенной *Pinus sylvestris* высотой от 2,5-3 до 5-6 м.

Кустарничковый ярус густой (проективное покрытие 50-60%) образованный багульником и кассандрой (*Ledum palustre*, *Chamaedaphne calyculata*, *Andromeda polifolia*). По сфагновым кочкам обильно разрастается клюква (*Oxycoccus palustris*, *O. microcarpa*). В межкочьях встречается пушица влагалищная (*Eriophorum vaginatum*), в моховом покрове доминирует сфагн узколистный (*Sphagnum angustifolium*).

Болото «Кукушкино». Представляет собой обширную болотную систему, занимающую основные площади объединенных террас Оби и Иртыша к востоку от Ханты-Мансийска. Образцы сфагновых мхов отбирали на 45 километре трассы Ханты-Мансийск – Сургут. Болото представляет собой олиготрофный кочковато-топяного комплекс, где сфагн магелланский образует сравнительно высокие (до 30-40 см) кочки-клумбы рассеянные среди топяных осоково (*C. limosa*)-шейхцериево (*Scheuchzeria palustris*)-сфагновых (*Sphagnum balticum*, *S. jensenii*, *S. majus*) сообществ. Разреженный древесный ярус образует береза пушистая (*Betula pubescens*) высотой 3-5 (до 8) м и диаметром стволов до 5-8 (10 см). В травяном ярусе доминирует осока волосистоплодная (*Carex lasiocarpa*), которой в незначительном обилии сопутствуют *Calamagrostis purpurea*, *Calla palustris*, *Naumburgia thyrsoiflora*, *Carex rostrata*, *C. canescens*. По высоким кочкам встречается кассандра болотная (*Chamaedaphne calyculata*). Моховой покров пятнистого сложения. Помимо *Sphagnum fallax*, который, как правило, преобладает в моховом покрове, встречаются также *Sphagnum angustifolium*, *S. flexuosum*, *S. riparium*, реже *S. russowii*, *S. fimbriatum*.

Таблица 3.1. География отбора образцов сфагновых мхов в 2009-2012 гг.

Регион отбора	Точка отбора	Географические координаты	Дата отбора	Средние значения pH и температуры воды в точках отбора проб	Вид сфагнового мха	Штаммы, выделенные из данных образцов (приведены первые три символа аббревиатур)
Австрийские Альпы	“Rootmoos” (Австрия, федеративная земля Штирия)	N 47°41' E 15°09'	02.09.2009	pH 4.3–4.5; 8°C	<i>S. magellanicum</i> <i>S. fallax</i>	AM1 AF1
	“Waasenmoos” (Австрия, федеративная земля Зальцбург)	N 47°18' E 12°24'	03.09.2009	pH 3.3–3.7; 10°C	<i>S. magellanicum</i> <i>S. fallax</i>	AM2 AF2
	“Pürgschachen Moor” (Австрия, федеративная земля Штирия)	N 47°34' E 14°20'	04.09.2009	pH 3.9–4.2; 8°C	<i>S. magellanicum</i> <i>S. fallax</i>	AM3 AF3
Ленинградская область	Урочище «Полесье» (Россия, Ленинградская область, Выборгский р-н)	N 60°44' E 29°04'	19.07.2010	pH 4.2–4.6; 15°C	<i>S. magellanicum</i> <i>S. fallax</i>	RVM1 RVF1
	Озеро Волеярви	N 60°18' E 30°48'	03.10.2009	pH 4.7–5.0; 5°C	<i>S. magellanicum</i> <i>S. fallax</i>	RM1 RF1
	Урочище «Кардон Кирпичный»	N 59°16' E 29°54'	06.10.2011	pH 4.4–5.1; 7°C	<i>S. magellanicum</i> <i>S. fallax</i>	RSM1 RSF1
Западная Сибирь	Болото «Чистое» у п. Шапша (Россия, Ханты-Мансийский АО)	N 61°03' E 69°27'	30.08.2012	pH 3.2–4.0; 18°C	<i>S. magellanicum</i> <i>S. fallax</i>	HM1 HF1
	Болото «Мухрино» (Россия, Ханты-Мансийский АО)	N 60°53' E 68°41'	31.08.2012	pH 4.1–5.0; 21°C	<i>S. magellanicum</i> <i>S. fallax</i>	HM2 HF2
	Болото «Кукушкино» у 45 км трассы Ханты-Мансийск - Нефтеюганск	N 60°57' E 69°41'	01.09.2012	pH 4.4–5.0; 17°C	<i>S. magellanicum</i> <i>S. fallax</i>	HM3 HF3

3.2. Эндofитные бактерии – характерные обитатели гаметофитов сфагнума

Современные методы молекулярной биологии и конфокальной сканирующей лазерной микроскопии, используемые в представленной работе, позволили локализовать эндofитные бактерии внутри тканей вегетирующих растений сфагнума. Использование методов FISH и CSLM воссоздает также трехмерную модель структуры внутренних тканей, населенных бактериальными эндofитами.

Благодаря уникальной морфологической структуре вегетативных частей растений сфагнума, которые представляют из себя сочетание живых хлорофилоносных клеток и мертвых гиалоцитов, внутри тканей этих растений формируются уникальные микроскопические ниши для существования бактериальных сообществ. Данные сообщества микроорганизмов находятся в тесных симбиотических взаимоотношениях с растением-хозяином, которые возникли, по-видимому, в самом начале эволюции наземных растений. Поскольку сами сфагновые мхи, а вернее сказать, их эволюционные предки, являлись первыми растениями, осуществившими переход от водных растительных организмов к наземным, то современные сфагны являются уникальной моделью для изучения таких типов симбиоза. В свете представленных исследований, изменяются и наши представления о функциональных свойствах самих тканей гаметофитов сфагнов. Ранее утверждалось, что благодаря губчатой структуре и наличию крупных пор, функция гиалоцитов 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 микрониш для различных микробных сообществ, обеспечивая функционирование особого, уникального типа симбиотических взаимоотношений.

Комбинация методов FISH и CSLM, а также компьютерная трехмерная реконструкция, позволяют детерминировать представителей различных таксономических группировок внутри тканей сфагнума. Так, использование универсальных и группспецифичных олигонуклеотидных проб позволило визуализировать представителей *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma**proteobacteria*, населяющих ткани сфагнов (Рис. 3.2). Бактериальные микроколонии обнаруживались и на внешней поверхности листьев и стеблей растения сфагнума, однако наибольшая плотность микробных популяций была локализована именно внутри гиалиновых клеток растений. При этом, трехмерная компьютерная реконструкция показала, что микроколонии бактерий и отдельные клетки плотно прикреплены к внутренней поверхности гиалоцитов, по-видимому, тесно взаимодействуя с растением-хозяином.

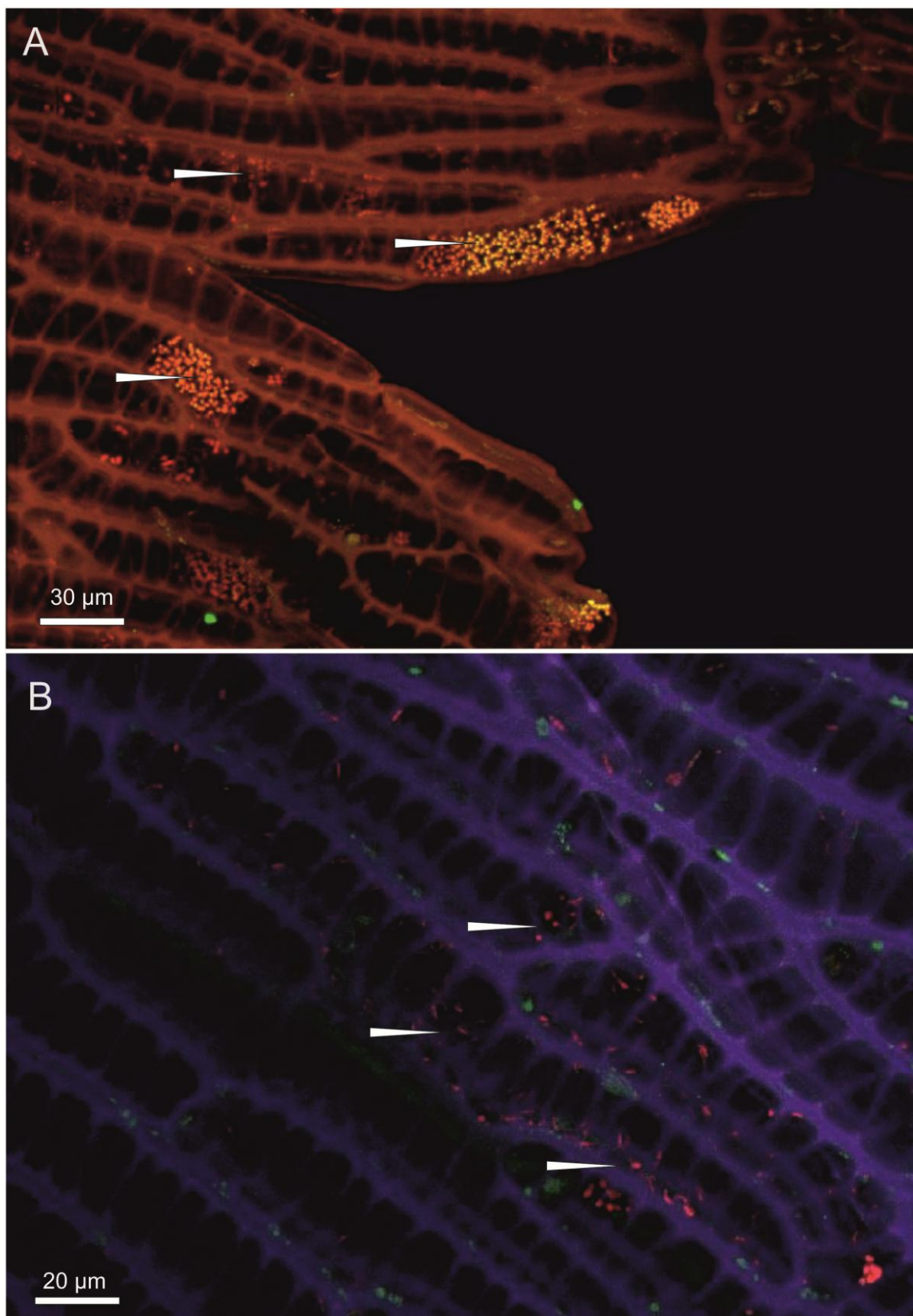


Рис. 3.2. Локализация *Eubacteria* в гиалиновых клетках *S. fallax*. Гибридизация проводилась с использованием эквимольной смеси универсальных олигонуклеотидных проб EUB338, EUBП338, EUBШ338. Стрелками показаны микроколонии бактерий и отдельные клетки. Конфокальная сканирующая лазерная микроскопия.

Более детальное изучение состава микробных сообществ были проведены в совместных исследованиях с австрийскими коллегами (Bragina et. el., 2012). Так, были отмечены общие черты колонизации бактериальными эндофитами растений сфагноума. Использование групп-специфичных проб показало, что представители *Alphaproteobacteria* являются доминантным компонентом микробных сообществ как *S. fallax*, так и *S. magellanicum*. При этом, в обоих видах мха *Alphaproteobacteria* были представлены различными морфологическими формами: кокковидными, палочковидными, тетрадами, сарцино-подобными конгломератами. Второй доминантный компонент микробных сообществ сфагновых мхов – *Planctomyces*, колонии которых чаще встречаются внутри тканей *S. fallax*, нежели *S. magellanicum*. Представители *Planctomyces* ранее обнаруживали в составе сообществ торфа сфагновых болот (Deadysh et al., 2006) в качестве субдоминантного компонента, однако в наших совместных с австрийскими коллегами исследованиях было показана их способность колонизировать внутренние части растений сфагноума (Рис. 3.3).

Акцент исследований в данной диссертационной работе был сделан на бактериях, представителях родов, хорошо зарекомендовавших себя в сельскохозяйственной микробиологии. С этой целью для флуоресцентной гибридизации *in situ* нами использовались олигонуклеотидные пробы, специфичные для представителей *Gamma*- и *Beta*- протеобактерий. В эти бактериальные классы отнесены представители многих родов, в том числе и тех, что могут быть перспективны с точки зрения полезных растительно-микробных взаимодействий. Так, к примеру, класс *Betaproteobacteria* включает в себя представителей порядка *Burkholderiales*, семейства *Burkholderiaceae*, микроорганизмов, ранее обнаруженных в ассоциациях со сфагновыми мхами (Vandaame et al., 2007). Еще один перспективный род бактерий – *Collimonas*, отнесенный к семейству *Oxalobacteraceae*, также выявлен в наших исследованиях, его упоминание будет представлено ниже. Представители таких родов, как *Pandoraea*, *Delftia*, *Acidovorax*, *Janthinobacterium*, которые относятся к порядку *Burkholderiales*, были выделены нами из бактериальных ассоциаций сфагновых мхов. Класс *Gamma*proteobacteria несет в себе представителей бактериального царства, способных эффективно взаимодействовать с растениями и оказывать положительное влияние на их рост и развитие. К примеру, сюда отнесен крупнейший род бактерий, относящихся к группе PGPR – *Pseudomonas*, включающий виды, наиболее эффективно колонизирующие высшие растения и используемые в качестве продуцентов биопрепаратов. Порядок *Enterobacteriales* включает в большинстве своем патогенные и условно-патогенные виды, однако некоторые его представители могут выступать в качестве ростстимулирующих и биоконтрольных агентов (к примеру рода *Serratia*, *Klebsiella*, *Rahnella*).

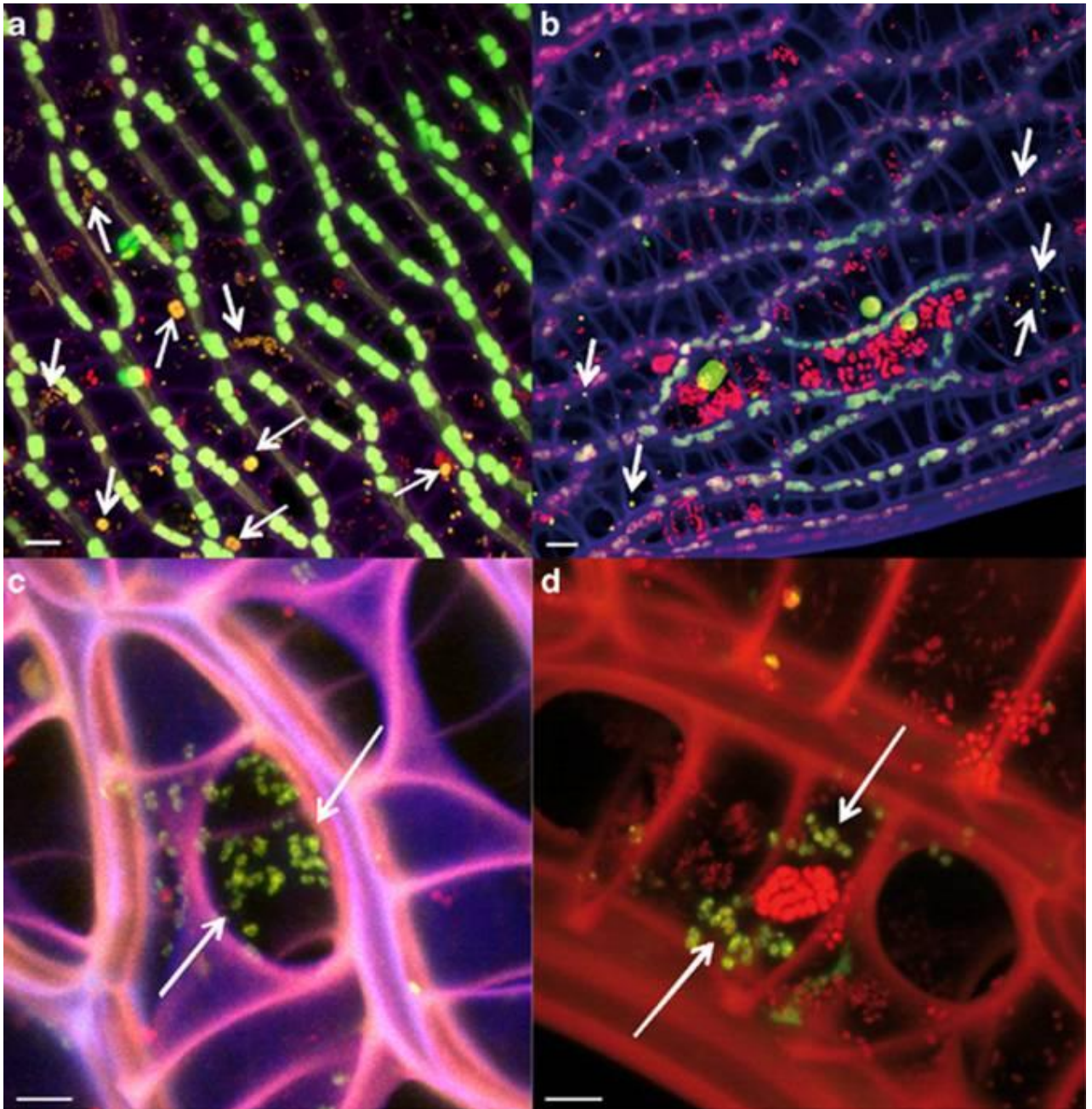


Рис. 3.3. Локализация *Alphaproteobacteria* и *Planctomycetes* в гиалоцитах сфагнума. Показано внутреннее пространство гиалоцитов *S. fallax* (a, b) и *S. magellanicum* (c, d). Гибридизация проводилась с использованием *Alphaproteobacteria*- и *Planctomycetes*- специфичных проб. Желтый: *Alphaproteobacteria* (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)

Таким образом, в наших исследованиях использование групп-специфичных олигонуклеотидных проб Bet42a и Gam42a позволило локализовать представителей и этих двух классов протеобактерий внутри тканей сфагновых мхов среди прочих представителей эубактериального царства (рис. 3.4). Согласно ранее полученным данным, β - и γ -протеобактерии представляют суб-доминантный компонент микробных сообществ, ассоциированных со сфагновыми мхами (Bragina et al., 2012). Путем анализа библиотек клонов гена 16S рРНК было установлено, что данные таксономические группы составляют до 7% и 12% общего числа выявленных бактерий соответственно. Важным моментом, выявленным в ходе исследований, является формирование бактериальными эндофитами микроколоний внутри гиалоцитов сфагнума (Рис 3.4.). Данный факт свидетельствует о том, что бактериальные эндофиты не просто находятся внутри гиалоцитов, либо «заплывают» в них с током воды, а именно существуют в тесной взаимосвязи с растением-хозяином, формируя микроколонии активно делящихся клеток. Доминирующими морфологическими формами среди представителей указанных классов были мелкие прямые или слегка изогнутые палочки, короткие палочки, а также овальные или кокковидные бактериальные клетки.

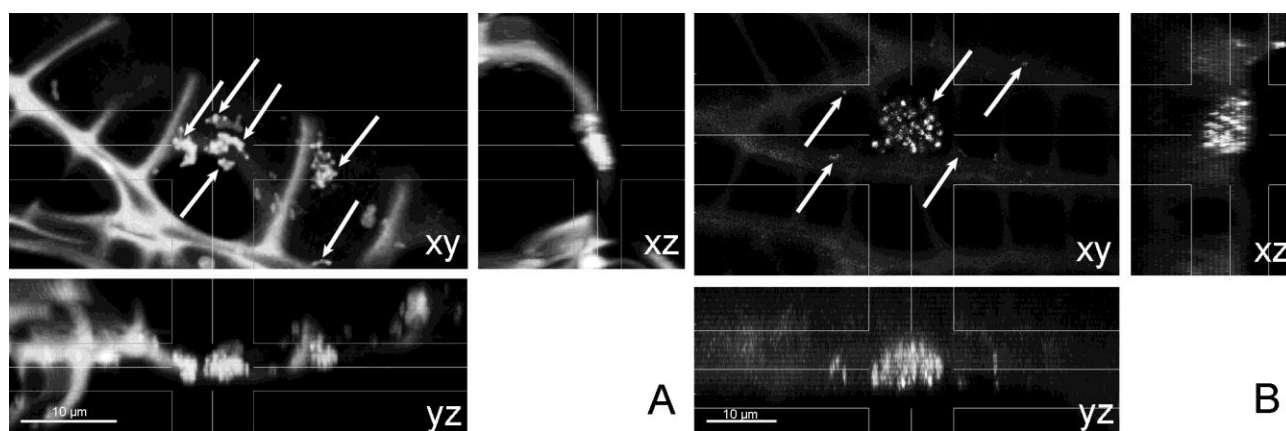


Рис 3.4. Локализация микроколоний бактерий в гаметофитах сфагнов. Флуоресцентная *in situ* гибридизация веточных листьев с групп-специфичными (белые стрелки) бактериальными пробами выявила колонизацию внутреннего пространства гиалиновых клеток сфагнов бактериями классов *Betaproteobacteria* (A) и *Gammaproteobacteria* (B). Изображения, полученные при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа, представлены в 3 проекциях. Масштабная линейка - 10 мкм.

Таким образом, проведенные исследования с использованием конфокальной микроскопии, позволили изучить локализацию бактериальных эндофитных сообществ, состоящими из

представителей различных таксономических единиц эубактериального царства, внутри тканей сфагновых мхов.

3.3. Культивируемые бактериальные эндофиты сфагнума: характеристика состава популяций и перспективные штаммы – обладатели комплекса хозяйственно-ценных свойств

Поскольку растения сфагнумов обладают весьма тонкой и сложной морфологической структурой, выделение культивируемых форм бактериальных эндофитов из их тканей составляет определенные сложности. Прежде всего, необходимо было оптимизировать протокол поверхностной стерилизации этих растений. При выборе стерилизующего агента мы остановились на использовании именно перекиси водорода по ряду причин: высокая эффективность дезинфекции поверхности растений, полнота и быстрота удаления агента при последующем отмывании, отсутствие каких либо продуктов распада, способных оказывать влияние на развитие бактерий. Использование этанола в протоколе стерилизации, по-видимому, не было бы обосновано, поскольку привело к обезвоживанию гиалоцитов, попаданию стерилизующего агента внутрь тканей и последующей гибели эндофитных бактериальных ассоциантов. Другие стерилизующие агенты, такие как гипохлорит Na и различные коммерческие продукты на его основе, а также хлорсодержащие продукты их распада, плохо удаляются при отмывании растений, а их остатки могли бы вызывать гибель выделяемых бактерий при последующих манипуляциях. Продолжительность экспозиции (выдержки в стерилизующем агенте) была также оптимизирована, 5-и минутная экспозиция достаточна для достижения необходимых условий поверхностной стерилизации растений. Таким образом, был получен протокол поверхностной стерилизации растений сфагнума, позволяющий полностью подавить всю их поверхностную микрофлору, но при этом сохранить в жизнеспособном состоянии клетки бактериальных эндофитов, населяющих внутренние ткани растений.

При подборе питательной среды выбор пал на среду R2A, как рекомендованную в предыдущих исследованиях. Данная среда считается не богатой и характеризуется минимальным содержанием всех необходимых компонентов для развития гетеротрофных эндофитных бактерий. Действительно, в классических исследованиях среда R2A используется для выделения бактерий из чистой воды и водных экосистем, и поэтому может быть успешно применена для выделения эндофитов, так как содержание гиалиновых клеток сфагнума очень близко составу воды природных биотопов. Показатель pH среды был снижен до 5,5, усредненному значению кислотности воды изучаемых болотных экосистем. При

выделении культуры целлюлозолитических бактерий также использовали подкисленную модифицированную среду Гетченсона, с показателем pH, близким этому показателю болотной воды (см. п. 2.3.1.). Характерными параметрами культивирования являлись инкубация поверхностных посевов при сниженной температуре (20°C) и более продолжительном периоде времени (5 суток) для достижения возможно более полного прорастания всех колониеобразующих единиц.

3.3.1. Культурально-морфологические свойства выделенных изолятов бактерий

Всего в ходе работы из тканей сфагновых мхом *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 - грамтрицательные (более 98%) округлые, овальные клетки или короткие палочки, очень мелкие (<1.5 мкм), которые формировали на среде R2A быстрорастущее либо медленнорастущие, плоские и стелящиеся, 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 питательные среды варьировала в диапазоне 10^5 - 10^6 КОЕ/г растительной ткани. На безазотной среде рост азотфиксирующих и олигонитрофильных бактерий был довольно обилен, однако число морфотипов невелико и составило не более 5. Они формировали на среде прозрачные, неокрашенные, слизистые колонии среднего размера, стелящиеся по поверхности агара, либо округлые и выпуклые.

Характерной особенностью следует отметить практически полное отсутствие среди выделенных изолятов грамположительных спорообразующих бактерий р. *Bacillus*: было выделено 2 штамма представителей этого рода. Причины такого явления могут быть скрыты в высокой переувлажненности болотных экосистем и условиями обитания сфагнов, либо эволюционно более позднем появлении спорных форм бактерий, когда основы функционирования симбиоза между сфагнами и грамтрицательными микроорганизмами уже сложились. Поскольку спорообразование сформировалось у бактерий как приспособление к неблагоприятным условиям среды, прежде всего недостатку влаги и связанному с ним пересыханию клеток, то логично предположить в условиях, когда растение еще только переходит к наземному образу жизни и большая часть его находится в воде, растительно-микробный симбиоз будет возникать с микроорганизмами, не подвергающимися пересыханию и находящимися в водной среде. Такими эффективными

микроорганизмами, сформировавшими симбиотические отношения со сфагнами, стали представители грамотрицательных бактерий.

Методом накопительной культуры на жидкой минеральной среде с добавлением целлюлозы была выделена целлюлозолитическая ассоциация, которая через 14 дней инкубации практически полностью разрушала субстрат по своей структуре и физическим свойствам; в результате сама накопительная культура представляла смесь культуральной жидкости желтого цвета и остатков целлюлозных волокон и была включена в последующую работу. Микроскопическое исследование культуральной жидкости с остатками целлюлозного волокна показало, что целлюлозные волокна активно колонизируются комплексом микроорганизмов, представленных разными морфологическими типами, основу которого составляют грамотрицательные неспорообразующие палочки различной морфологии и кокки (рис 3.5.). Методом последовательных серийных разведений и последующего высева на агаризованную среду Гетченсона с 1% микрокристаллической целлюлозы ассоциация была разделена на 5 доминантных бактериальных изолятов, каждый из которых был способен расти в чистой культуре отдельно от остальных. По результатам молекулярно-генетической идентификации установлено, что в состав сообщества входят микроорганизмы, сильно отличающиеся по своему таксономическому положению: *Bacillus cereus*, *Variovorax sp.*, *Delftia sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Rhodococcus erythropolis*.

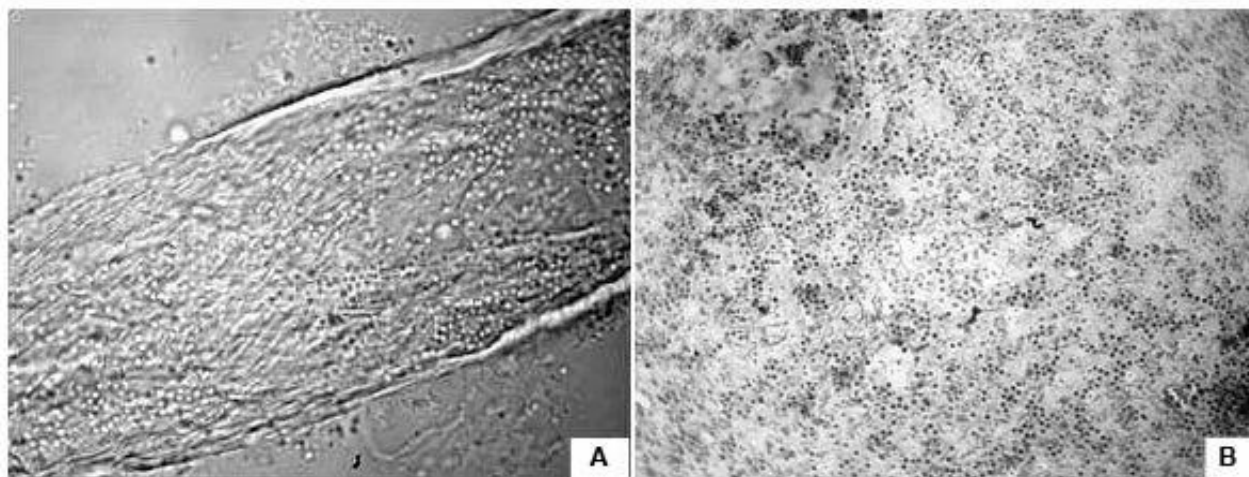


Рис. 3.5. Аэробное целлюлозолитическое сообщество микроорганизмов, выделенное из тканей сфагнового мха *S. fallax*: А. – Колонизация бактериями волокон целлюлозы; В. - Жидкая культура целлюлозолитического сообщества на 14 сутки роста (на снимке – активно развивающиеся целлюлозолитические микроорганизмы и остатки деградированного целлюлозного волокна). 1000X.

3.3.2. Таксономический состав эндофитных бактериальных популяций *Sphagnum fallax* и *S. magellanicum*

Молекулярно-генетическая идентификация на основании анализа фрагментов гена 16S рРНК с использованием программ BLAST и RDP выявила широкое разнообразие выделенных микроорганизмов.

Основу бактериальных популяций, культивируемых и способных расти на поверхности агаризованных сред, составляют грамотрицательные бактерии (рис. 3.6.-3.9.). Полученные данные показывают значительное разнообразие таксонов, выделяемых из сфагновых мхов. Опираясь на представленные результаты, 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. Ряд штаммов, отнесенных к условно-патогенным формам животных и растений, данного таксона был исключен из последующей работы; доминирующим видом, выделяемым как из *S. fallax*, так и из *S. magellanicum*, являлся *Serratia plymuthica*.

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.* Среди минорных видов отмечено присутствие *Janthinobacterium sp.*, *Pandorea sp.* и др.

Фила *Bacteroidetes* представлена родами *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Chryseobacterium*. Характерной особенностью здесь следует считать наличие представителей *Flavobacterium sp.* в бактериальных популяциях сфагновых мхов различного географического происхождения, которые формировали на средах характерные ярко-желтые колонии. Возможно, что данный вид флавобактерий является специфичным для сфагновых мхов.

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 общие закономерности численности различных группировок бактерий. Так одной из общих тенденций отмечены вариации в численности *Pseudomonas* и *Collimonas* для разных видов сфагнового мха. Представители *Pseudomonas* составляли наиболее многочисленную группировку эндофитных бактерий *S. magellanicum*, в то время как для *S. fallax* популяция псевдомнад была не столь многочисленна, более выраженной становится численность *Collimonas* и *Flavobacterium*.

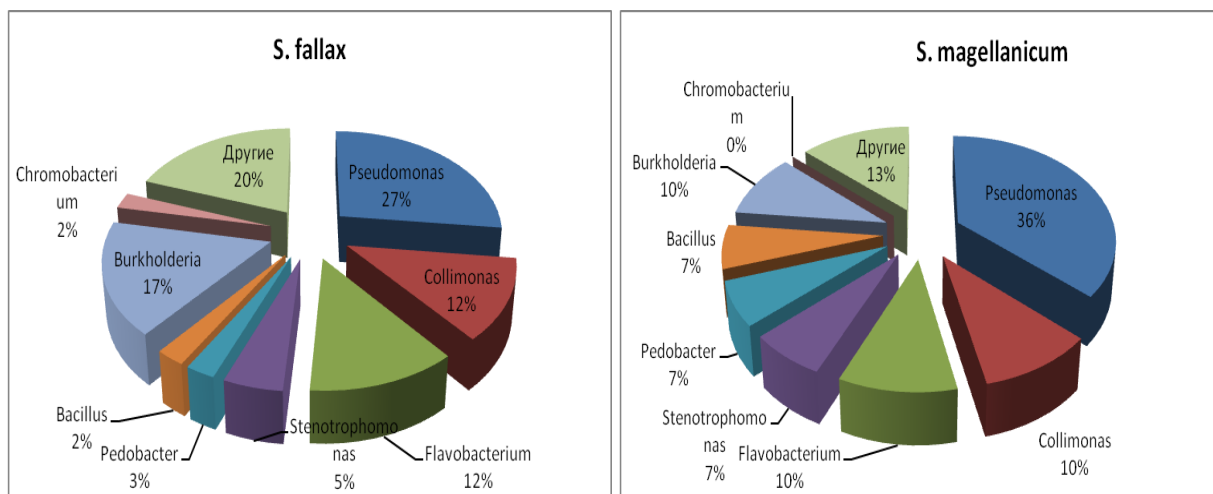


Рис 3.6. Компонентный состав бактериального сообщества эндофитных бактерий *S. fallax* и *S. magellanicum*, отобранных в Австрийских Альпах (Pürgschachen Moor, Штирия, 2009 г.).

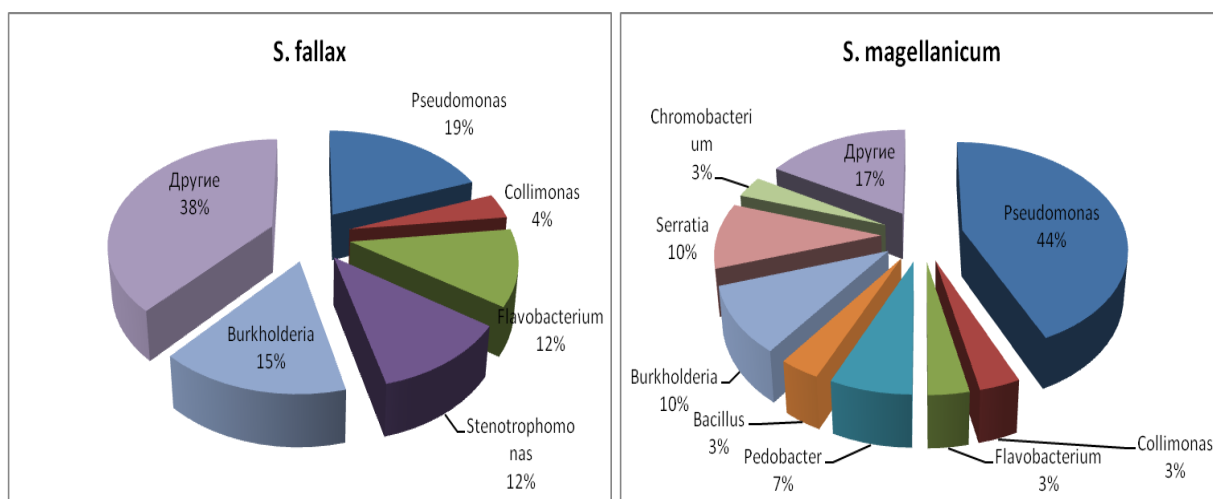


Рис 3.7. Компонентный состав бактериального сообщества эндофитных бактерий *S. fallax* и *S. magellanicum*, отобранных в Ленинградской области (оз. Воляярви, Всеволожский р-н, 2010 г.).

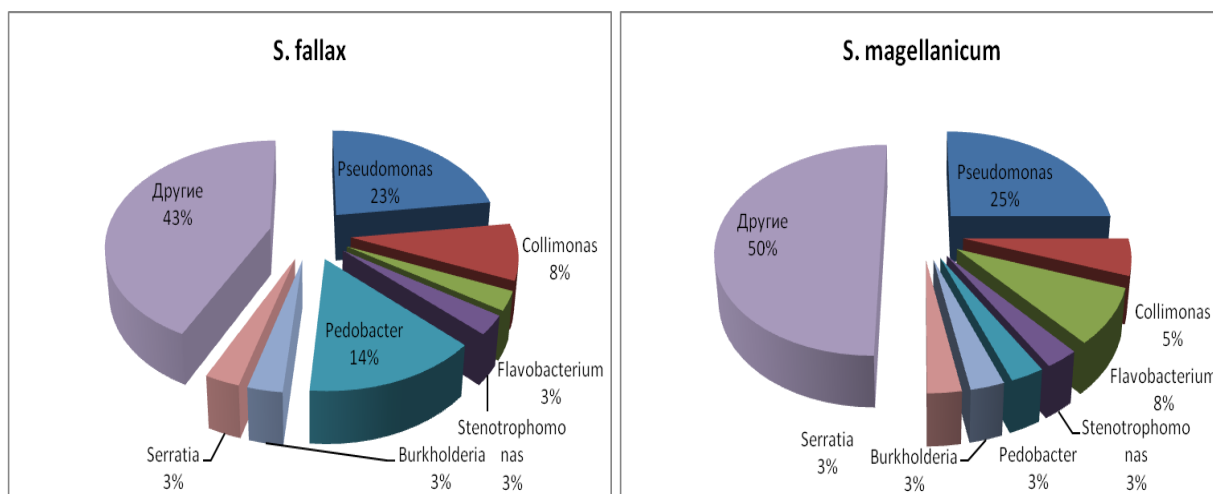


Рис 3.8. Компонентный состав бактериального сообщества эндофитных бактерий *S. fallax* и *S. magellanicum*, отобранных у бол. Чистое (Ханты-Мансийский АО, Зап. Сибирь)

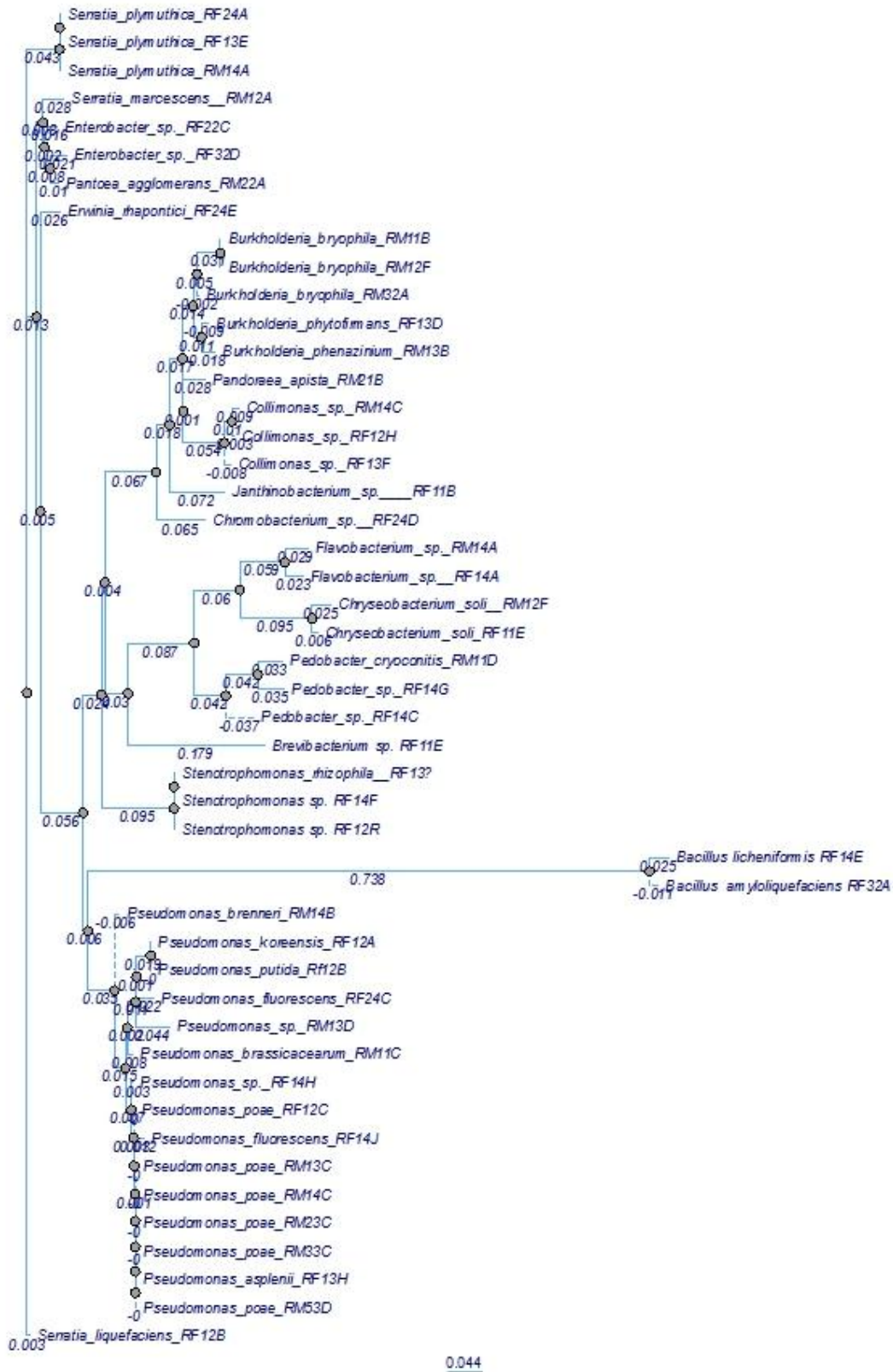


Рис 3.9. Видовой состав бактериального сообщества эндофитных бактерий *S. fallax* и *S. magellanicum*, отобранных в Ленинградской области (оз. Волеярви, Всеволожский р-н, 2010 г.).

3.3.3. Антифунгальные и антибактериальные свойства выделенных изолятов

Изучение фунгицидной активности более чем у 400 изолятов бактерий, выделенных из тканей сфагновых мхов, позволило установить, что доля штаммов, способных подавлять развитие фитопатогенных грибов, довольно высока и составляет около 60% от общего числа бактерий. Кроме того, установлено, что более 30% всех выделенных штаммов в той или иной степени подавляли развитие ряда важнейших бактериальных фитопатогенов. Ряд штаммов характеризовался комплексной активностью как против грибных, так и против бактериальных патогенов, некоторые же изоляты имели четко выраженный либо бактерицидный либо фунгицидный эффекты (табл. 3.2).

В результате работы был отобран ряд штаммов, характеризующихся наиболее выраженными фунгицидными и бактерицидными свойствами. Так, более подробное изучение фунгицидной активности этих штаммов позволило установить, что они способны активно подавлять все тест-объекты фитопатогенных грибов различного таксономического положения (различные виды *Fusarium*, *Alternaria*, *Pythium*) при различных нагрузках фитопатогенного фона (табл. 3.3). Края зон при этом были четко ограничены, хорошо выражены, а размеры зон характеризовались длительностью хранения. Данные штаммы обладали лучшим антибиотическим эффектом.

Кроме того, в ходе исследований было отмечено, что бактерицидная активность изучаемых бактерий проявляется по-разному. Часть штаммов, например AM24A и RF13H продуцировали в толщу агарового блока метаболиты, которые полностью подавляли развитие фитопатогена вокруг агарового блока, образуя «чистые» зоны ингибирования. Другие бактерии-антагонисты, отличающиеся быстрым ростом, как например штаммы RM14A, RF14A, активно разрастались вокруг агарового блока, лизируя культуру фитопатогена. В областях непосредственного смешения бактериальных культур происходил активный лизис и гибель клеток фитопатогенных бактерий (рис 3.6).

Таблица 3.2. Пример антагонистической активности бактерий-ассоциантов, выделенных из сфагновых мхов бол. Воляярви (3.10.2009). В таблице приведена процентная доля штаммов, с различной степенью антагонистической активности против фитопатогенов.

Активность подавления фитопатогена	Фунгицидная активность				Бактерицидная активность			
	<i>F. culmorum</i>	<i>F. sporotrichioides</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>A. alternata</i>	<i>E. carotovora</i>	<i>P. syringae</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>C. michiganensis</i>
Активное подавление (рост фитопатогена полностью ингибируется в зоне радиусом более 10 мм)	45%	47%	42%	40%	18%	10%	16%	20%
Умеренное подавление или угнетение роста («чистые» зоны ингибирования или угнетение роста в зоне радиусом до 10 мм)	15%	15%	8%	10%	16%	14%	12%	22%
Антагонистическая активность отсутствует (развитие фитопатогена вокруг лунки аналогично контролю, культурально-морфологические свойства не изменены)	40%	38%	50%	50%	66%	76%	72%	58%

Таблица 3.3. Штаммы эндофитных бактерий сфагновых мхов с наибольшей фунгицидной и бактерицидной активностью.

Штамм бактерии-антагониста	Фунгицидная активность, радиус зоны подавления фитопатогена в мм				Бактерицидная активность, радиус зоны подавления фитопатогена в мм			
	<i>F. graminearum</i>	<i>F. sporotrichioides</i> 35108	<i>F. culmorum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>E. carotovora</i> var. <i>atrocephala</i> 822	<i>P. syringae</i> 8511	<i>P. syringae</i> 213	<i>Cl. michiganensis</i> pv. <i>sepedonicum</i> 6028
<i>P. aspleni</i> RF13H	>25	16-17	>20	>20	3-4	4-5	5-6	5-6
<i>P. poae</i> RF11D	15-17	>20	>20	>20	10-12	7-8	7-8	12-13
<i>P. brenneri</i> RM14B	15-16	10-12	15-20	15-20	7-8	6-7	6-7	7-8
<i>P. fluorescens</i> RF14J	10-15	10-15	15-17	15-17	0	0	0	14-15
<i>P. sp.</i> RM13D	18-20	>20	>20	>20	0	0	0	9-10
<i>Collimonas sp.</i> RF12C	5-6	12-15	10-15	10-15	0	1-2	13-14	10-12
<i>S. plymuthica</i> AM24A	15-20	14-15	>20	15-20	8-9	15-17	10-12	11-12
<i>F. sp.</i> RM14A	0	2-3	5-7	5-10	5-6	8-10	9-10	4-5
<i>F. sp.</i> RF14A	0	0	0	5	7-8	10-12	9-11	5-6

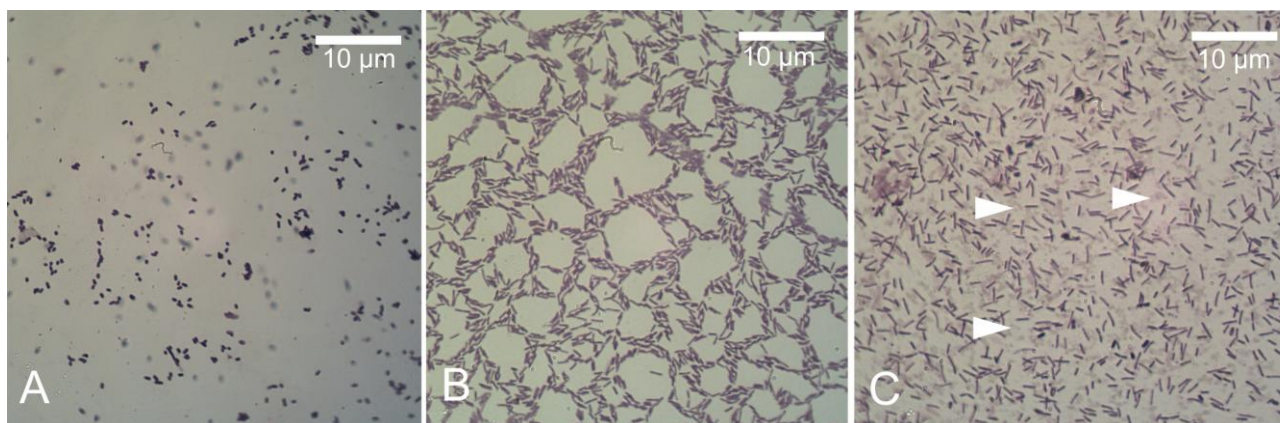


Рис. 3.6. Лизис клеток *P. syringae pv. tomato* бактериями-антагонистами *Flavobacterium sp.* RM14A: А. – чистая культура *P. syringae pv. tomato*; В. – чистая культура штамма RM14A; С. – смешанная культура, стрелками показаны не прокрашенные, лизирующиеся и разрушенные клетки фитопатогенных бактерий. Световая микроскопия с простой окраской. 1000X. Масштабная линейка 10 мкм.

Таким образом, опираясь на результаты представленной работы, можно отметить высокий антагонистический потенциал бактерий, ассоциированных со сфагновыми мхами, в отношении бактериальных и грибных фитопатогенов. Показана эффективность антагонизма исследуемых штаммов бактерий различного таксономического положения в отношении важнейших бактериальных и грибных фитопатогенов в экспериментах *in vitro*. Необходимо отметить, что проделанные исследования являются первой частью работы в объяснении роли эндофитных бактерий, ассоциированных со сфагновыми мхами, в формировании уникальной антимикробной природы самих растений сфагнов.

3.3.4. Продукция ауксинов и стимуляция проростков кресс-салата

Ряд штаммов, характеризующихся наличием ярко выраженных фунгицидных и бактерицидных свойств, был отобран для дальнейших исследований. Так, следующим критерием скрининга штаммов с хозяйственно-ценными свойствами, стала способность к продукции фитогормонов и стимуляции роста сельскохозяйственных культур. Применение относительно простого метода, позволяющего оценить способность сразу большого количества штаммов к продукции ИУК, и основанного на реакции при взаимодействии с реактивом Сальковского, выявило ряд активных изолятов (табл. 3.4). Визуальная оценка результатов этой качественной реакции показала, что некоторые штаммы довольно активно продуцируют ИУК (ее производные) на среде с L-триптофаном, при этом интенсивность окраски превышала данный показатель контрольного штамма *Pseudomonas chlororaphis* 228.

Кроме того следует отметить, что из 18 исследуемых штаммов 12 (66%) проявили положительную качественную реакцию на продукцию ИУК. Данные штаммы были отобраны для анализа продукции ауксинов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).

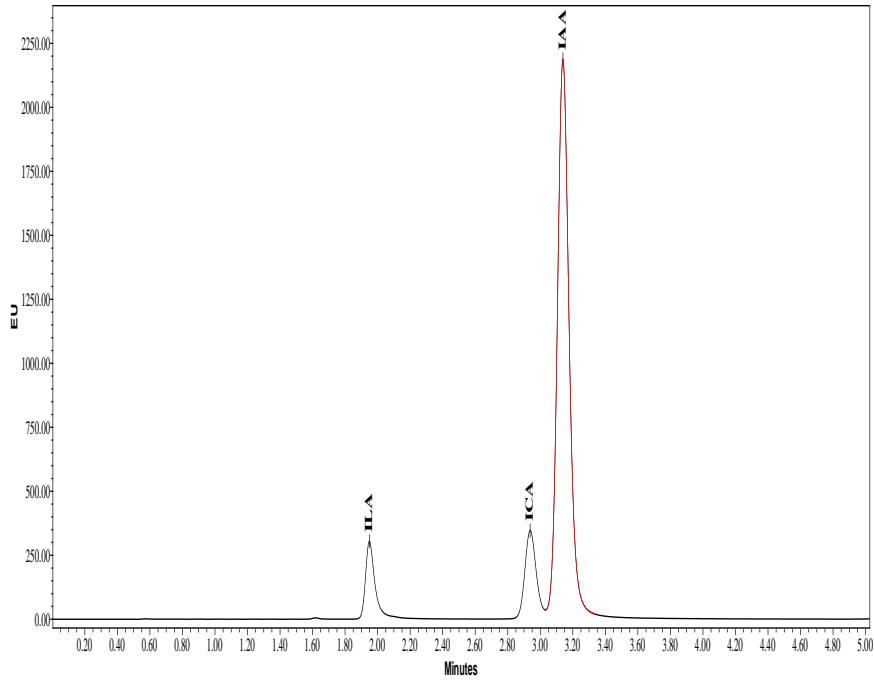
Данные о содержании ауксинов в культуральной жидкости исследуемых штаммов представлены в таблицах 3.4, 3.5, рис. 3.7, 3.8. Анализируя представленные результаты можно отметить способность к продукции всеми отобранными штаммами трех основных ауксинов: индоли-3-молочной кислоты (ИМК), индолил-3-карбоновой кислоты (ИКК) и индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). Наиболее интенсивно ИУК продуцируется штаммами *P. aspleni* RF13H (4,1 мкг/мл), *Cryseobacterium 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 является штамм *Burkholderia bryophila* AM31A, у которого суммарный уровень продукции достиг 41 мкг/мл, а степень конверсии L-триптофана для данного штамма достигал 69,3%.

Сопоставляя полученные данные с данными о продукции ИУК другими штаммами (Кравченко с соавт., 2002), относящимися к группе PGPR, можно отметить более высокий уровень продукции основного фитогормона рядом исследованных в данной работе штаммов бактерий. Так, штаммы *P. chlororaphis* SPB1217 и *P. fluorescens* SPB2137 в аналогичных условиях эксперимента накапливали 0,96-1,88 мкг/мл ИУК, в то время как штаммы, описанные в данной работе, имеют в разы превосходящий уровень продукции этого основного фитогормона.

Таблица 3.4. Содержание ауксинов в культуральной жидкости исследуемых штаммов бактерий (нг/мл).

Ауксин	Исследуемый штамм							
	<i>P. asplenii</i> RF13H	<i>B. bryophila</i> AM31A	<i>Cryseobacterium</i> sp. RM12F	<i>S. plymuthica</i> AM24A	<i>P. sp.</i> RF14D	<i>P. sp.</i> RM13D	<i>P. poae</i> RF11D	<i>P. fluorescens</i> RF14J
Индолил-3-молочная кислота (ИМК)	268,9 ± 11.6	1728,7 ± 127.9	57,9 ± 3.0	3,0 ± 0.2	28,4 ± 1.6	86,9 ± 5.13	145,1 ± 8.6	370,4 ± 20.7
Индолил-3-карбоновая кислота (ИКК)	2084,4 ± 89.6	4302,1 ± 318.4	11328,4 ± 577.8	3285,8 ± 177.4	1222,6 ± 69.7	4653,3 ± 274.6	7879,0 ± 464.9	1722,5 ± 96.5
Индолил-3-уксусная кислота (ИУК)	4105,9 ± 176.6	35100,9 ± 2597.5	5821,4 ± 296.9	5430,3 ± 293.2	8167,3 ± 465.5	125,7 ± 7.4	40,3 ± 2.4	62,3 ± 3.5
Сумма	6459,2 ± 277.7	41131,7 ± 3043.8	17207,7 ± 877.6	8719,1 ± 470.8	9418,3 ± 536.8	4865,9 ± 287.1	8064,5 ± 475.8	2155,3 ± 120.7

А



Б

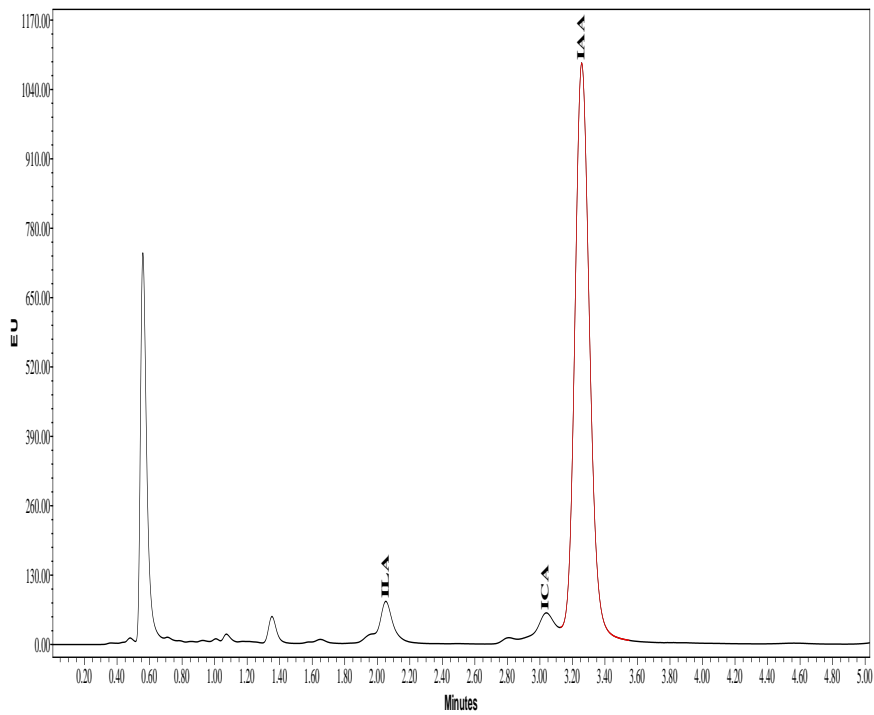
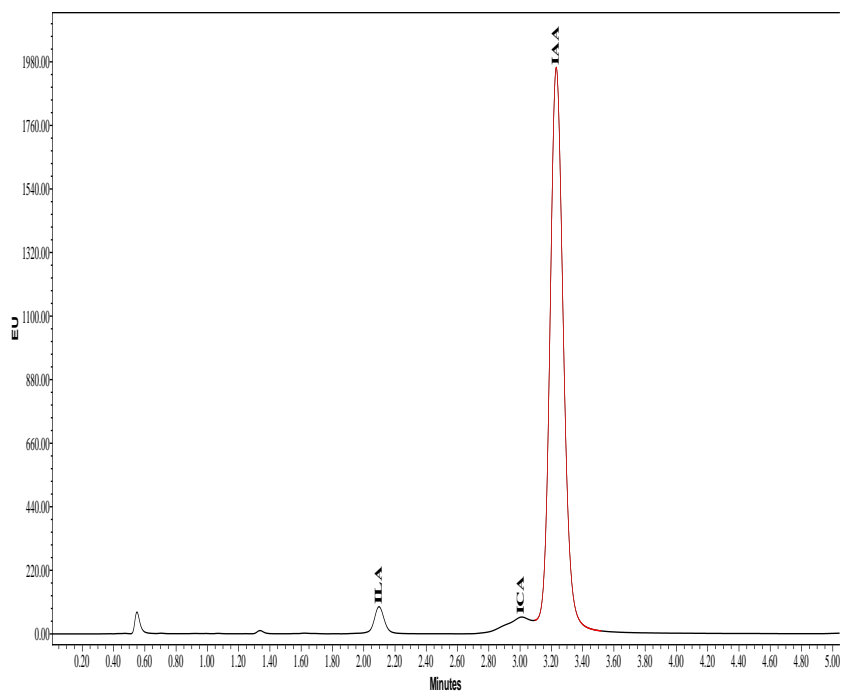


Рис 3.7. HPLC-анализ ауксинов в культуральной жидкости штамма *Pseudomonas aspleni* RF13Н при выращивании на среде R2A с L-триптофаном при 28°C на качалке в течении 4 сут. А. – стандартная смесь ауксинов (в 5 мкл смеси: ИМК – 2,5 нг; ИКК – 50 нг; ИУК – 20 нг); Б. – культуральная жидкость. IIA – Индолил-3-молочная кислота (ИМК), ICA – Индолил-3-карбоновая кислота (ИКК), IAA – Индолил-3-уксусная кислота (ИУК). EU – интенсивность флуоресценции (единицы эмиссии – Emission Units). Объем анализируемого образца 5 мкл.

А.



Б.

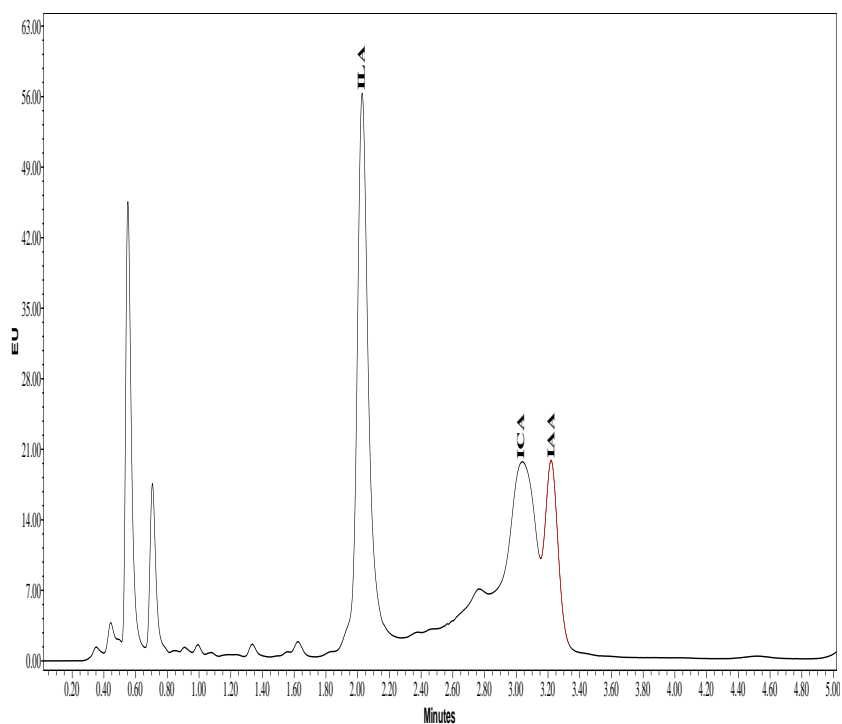


Рис 3.8. HPLC-анализ ауксинов в культуральной жидкости при выращивании на среде R2A с L-триптофаном при 28°C на качалке в течении 4 сут. А. – культуральная жидкость штамма *Burkholderia bryophila* AM31A (объем анализируемого образца 1 мкл); Б. – культуральная жидкость *P. fluorescens* RF14J (объем анализируемого образца 5 мкл). ILA – Индолил-3-молочная кислота (ИМК), ICA – Индолил-3-карбоновая кислота (ИКК), IAA – Индолил-3-уксусная кислота (ИУК). EU – интенсивность флуоресценции (единицы эмиссии – Emission Units).

Таблица 3.5. Степень конверсии L-триптофана в ауксины исследуемыми штаммами бактерий.

Ауксин	Исследуемый штамм															
	RF13H		AM31A		RM12F		AM24A		RF14D		RM13D		RF11D		RF14J	
	нМ/мл	Утилизация L-триптофана, %	нМ/мл	Утилизация L-триптофана, %	нМ/мл	Утилизация L-триптофана, %	нМ/мл	Утилизация L-триптофана, %	нМ/мл	Утилизация L-триптофана, %	нМ/мл	Утилизация L-триптофана, %	нМ/мл	Утилизация L-триптофана, %	нМ/мл	Утилизация L-триптофана, %
ИМК	1,31 ± 0,06	0,4	8,43 ± 0,62	2,5	0,28 ± 0,01	0,1	0,01 ± 0,001	0,003	0,14 ± 0,01	0,04	0,42 ± 0,03	0,1	0,71 ± 0,04	0,2	1,81 ± 0,10	0,5
ИКК	12,95 ± 0,56	3,8	26,72 ± 1,98	7,9	70,36 ± 3,59	20,7	20,41 ± 1,10	6,0	7,59 ± 0,43	2,2	28,90 ± 1,71	8,5	48,94 ± 2,89	14,4	10,70 ± 0,60	3,2
ИУК	23,44 ± 1,01	6,9	200,35 ± 14,83	58,9	33,23 ± 1,70	9,8	30,99 ± 1,67	9,1	46,62 ± 2,66	13,7	0,72 ± 0,04	0,2	0,23 ± 0,01	0,1	0,36 ± 0,02	0,1
Сумма	37,69 ± 1,62	11,1	235,50 ± 17,43	69,3	103,87 ± 5,30	30,6	51,42 ± 2,78	15,1	54,35 ± 3,10	15,9	30,04 ± 1,77	8,8	49,88 ± 2,94	14,7	12,86 ± 0,72	3,8

Примечание. ¹ суммарное содержание L-триптофана в среде R2A с L-триптофаном, определенное хроматографически – 340 нМ/мл (69,4 мкг/мл). В исходной среде R2A без внесения дополнительного L-триптофана его количество составляло 123,6 нМ/мл (25,2 мкг/мл).

Не менее важным является оценка ростстимулирующего эффекта при взаимодействии культуры бактерий с проростками сельскохозяйственных растений. Так, фито-тест, проведенный на проростках редиса, показал, что разбавленные культуры исследуемых штаммов бактерий способны стимулировать развитие растений *in vitro* (табл.3.6). Особенно выраженный стимулирующий эффект оказали штаммы RF13H, RF11D, RF14J, AM24A, который проявился в достоверном увеличении длины корешков редиса по сравнению с контрольным вариантом без обработки.

Таблица 3.6. 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. aspleni</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*
HCP ₀₅	12,3	10,5

Примечание. *Различия достоверны на уровне HCP₀₅

3.3.5. Растворение малорастворимых неорганических соединений фосфора и ферментативная активность

По результатам скрининга на способность растворять ортофосфат кальция и фосфоритную муку было отобрано 8 наиболее активных изолятов. Некоторые из них, кроме этого, обладали антифунгальной активностью и способностью к продукции ауксинов.

Характеристика ферментативной активности изучаемых изолятов бактерий свидетельствовала о наличии у них довольно активных гидролитических ферментов, выявлены штаммы, наиболее активно выделявшие протеиназы, амилазы, липазы и целлюлазы.

3.3.6. Таксономическое положение, культурально-морфологическая и физиолого-биохимическая характеристика отобранных перспективных штаммов

***Pseudomonas asplenii* RF13H.** Мелкие сильно укороченные, почти овальные грамотрицательные палочки длиной около 1,5 мкм. Каталазо- и оксидазоположительный. На среде R2A образуют кожистые колонии серого цвета, полупрозрачные, с неровным краем и конусообразным профилем, диаметр колоний 5-7 мм через 48 ч культивирования. Оптимальная температура роста 28°C, рост отсутствует при +37°C, штамм способен к росту при +4°C, оптимум pH 6,0. Строгий аэроб. В качестве источников углерода использует: глюкозу, маннозу, фруктозу, галактозу, ксилозу, инозитол, манитол, арабитол, глицерол. В качестве источников азота использует: пептон, триптон, дрожж. экстракт, гидролизат казеина, соли аммония; слабо использует: желатин, казеин; не использует: нитраты; на безазотных средах не растет. Обладает протеазной и липазной активностью. Продуцирует ауксины на среде с L-триптофаном. Обладает сильной фунгицидной активностью против грибов р. *Fusarium*, *Alternaria*, *Pythium*, хорошей бактерицидной активностью против *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*, *Clavibacter michiganensis*, *Xantomonas*.

***Pseudomonas poae* RF11D.** Мелкие, укороченные прямые грамотрицательные палочки. Каталазо- и оксидазоположительный. На среде R2A образуют быстрорастущие кремообразные колонии серого цвета, полупрозрачные, с неровным краем и плоским профилем, диаметр колоний 15-20 мм через 48 ч культивирования. Оптимальная температура роста 28°C, рост отсутствует при +37°C и +4°C, оптимум pH 6,0. Строгий аэроб. В качестве источников углерода использует: глюкозу, арабинозу, сахарозу, ксилозу, лактозу, мальтозу, дульцитол, инозитол, манитол, глицерол, сорбитол. В качестве источников азота использует: пептон, триптон, дрожжевой экстракт, казеин, гидролизат казеина, желатин; слабо использует: соли аммония, нитраты; на безазотных средах не растет. Обладает протеазной активностью. Продуцирует ауксины на среде с L-триптофаном. Способен к мобилизации малорастворимых соединений фосфора. Обладает сильной фунгицидной активностью против грибов р. *Fusarium*, *Alternaria*, *Pythium*, хорошей бактерицидной активностью против *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*, *Clavibacter michiganensis*, *Xantomonas*.

***Pseudomonas breneri* RM14B.** Мелкие, укороченные прямые грамотрицательные палочки 1,5-2 мкм. Каталазо- и оксидазоположительный. На среде R2A образуют кожистые, радиально-складчатые к краю колонии серого цвета, полупрозрачные, с неровным краем и конусообразным профилем, диаметр колоний 8-10 мм через 48 ч культивирования. Оптимальная температура роста 28°C, рост отсутствует при +37°C, способен к росту при +4°C, оптимум pH 6,0. Строгий аэроб. В качестве источников углерода использует: глюкозу,

арабинозу, сахарозу, ксилозу, лактозу, мальтозу, дульцитол, инозитол, манитол, глицерол, сорбитол. В качестве источников азота использует: пептон, триптон, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина, желатин; слабо использует: казеин, соли аммония, нитраты; на безазотных средах не растет. Обладает протеазной и липазной активностью. Продуцирует ауксины на среде с L-триптофаном. Способен к мобилизации малорастворимых соединений фосфора. Обладает сильной фунгицидной активностью против грибов р. *Fusarium*, *Alternaria*, *Pythium*, хорошей бактерицидной активностью против *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*, *Clavibacter michiganensis*, *Xantomonas*.

***Pseudomonas fluorescens* RF14J.** Мелкие овальные палочки с закругленными концами, грамотрицательные. Каталазо- и оксидазоположительный. На среде R2A образуют кожистые, радиально-складчатые к краю колонии серого цвета, полупрозрачные, с неровным краем и конусообразным профилем, диаметр колоний 8-10 мм через 48 ч культивирования. Оптимальная температура роста 28°C, рост отсутствует при +37°C, способен к росту при +4°C, оптимум рН 6,0. Строгий аэроб. В качестве источников углерода использует: глюкозу, арабинозу, сахарозу, ксилозу, мальтозу, манитол, глицерол, сорбитол. В качестве источников азота использует: пептон, триптон, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина, желатин; слабо использует: казеин, соли аммония, нитраты; на безазотных средах не растет. Обладает протеазной и липазной активностью. Продуцирует ауксины на среде с L-триптофаном. Способен к мобилизации малорастворимых соединений фосфора. Обладает сильной фунгицидной активностью против грибов р. *Fusarium*, *Alternaria*, *Pythium*.

***Pseudomonas. sp.* RM13D.** Мелкие укороченные или овальные грамотрицательные палочки длиной 1,5-2,0 мкм. Каталазо- и оксидазоположительные. На среде R2A образуют кожистые, радиально-складчатые к краю колонии серого цвета, полупрозрачные, с неровным краем и плоским профилем, диаметр колоний 10-15 мм через 48 ч культивирования. Оптимальная температура роста 28°C, рост отсутствует при +37°C и +4°C, оптимум рН 6,0. Строгий аэроб. В качестве источников углерода использует: глюкозу, арабинозу, сахарозу, ксилозу, мальтозу, дульцитол, инозитол, манитол, глицерол. В качестве источников азота использует: пептон, триптон, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина; слабо использует: казеин, желатин, нитраты. Обладает протеазной активностью. Продуцирует ауксины на среде с L-триптофаном. Способен к мобилизации малорастворимых соединений фосфора. Обладает сильной фунгицидной активностью против грибов р. *Fusarium*, *Alternaria*, *Pythium*.

***Flavobacterium sp.* RM14A.** Крупные удлиненные прямые грамотрицательные палочки, 3-4 x 0,5 мкм. Каталазо- и оксидазоположительные. Неподвижные. На среде R2A образуют плоские кожистые колонии ярко-желтого цвета, прозрачные, с ровным краем, застилающие

поверхность агара, диаметр колоний более 20 мм. Оптимальная температура роста 18°C, рост отсутствует при +37°C, способен к росту при +4°C, оптимум pH 7,0. Строгий аэроб. В качестве источников углерода использует: глюкозу, сахарозу, ксилозу, лактозу, глицерол. В качестве источников азота использует: пептон, триптон, дрожжевой экстракт, казеин, гидролизат казеина, желатин, нитрат; слабо использует: соли аммония; слабо растет на безазотных средах. Обладает протеазной, амилазной и липазной активностью. Обладает выраженной бактерицидной активностью против представителей родов *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Clavibacter*, *Xantomonas*.

***Serratia plymuthica* AM24A.** Овальные, почти круглые грамотрицательные бактерии длиной 1,5-2 мкм. На среде R2A образуют слизистые колонии темно-малинового цвета со светлым краем, не прозрачные, край ровный, выпуклый профиль, диаметр колоний 5-7 мм. Оптимальная температура роста 28°C, рост отсутствует при +37°C, штамм способен к росту при +4°C, оптимум pH 7,0. Факультативный анаэроб. В качестве источников углерода использует: глюкозу, арабинозу, сахарозу, ксилозу, лактозу, мальтозу, инозитол, сорбитол, глицерол; слабо: дульцитол. В качестве источников азота использует: пептон, триптон, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина, желатин, казеин, соли аммония; слабо использует нитраты; на безазотных средах растет слабо. Обладает протеазной, амилазной и липазной активностью. Продуцирует ауксины на среде с L-триптофаном. Обладает сильной фунгицидной активности против грибов р. *Fusarium*, *Alternaria*, *Pythium*, бактерицидной активностью против представителей родов *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Clavibacter*, *Xantomonas*.

***Collimonas* sp. RM14C.** Мелкие прямые, длиной около 1 мкм, грамотрицательные палочки. На среде R2A образуют крупные трудноотделяемые кожистые колонии диаметром 30-40 мм, стелящиеся по поверхности агара, выпуклые у центра, изрезанной шероховатой поверхностью, бесцветные и прозрачные. Оптимальная температура роста 28°C, рост отсутствует при +37°C, штамм способен к росту при +4°C, оптимум pH 7,0. Аэроб. В качестве источников углерода использует: глюкозу, арабинозу, ксилозу, лактозу, глицерол, сорбитол, дульцитол, инозитол. В качестве источников азота использует: пептон, триптон, дрожжевой экстракт, казеин, гидролизат казеина; слабо использует желатин, аммоний, нитраты; на безазотных средах растет слабо. Обладает незначительной протеазной и липазной активностью. Продуцирует ауксины на среде с L-триптофаном. Штамм *Collimonas* sp. RM14C обладает фунгицидной активностью против *Fusarium culmorum*, *F. sporotrichioides*, *Alternaria alternata*, бактерицидной активностью против *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas fluorescens*. Показана ростстимулирующая активность к томатам.

***Burkholderia bryophila* AM32A.** Мелкие прямые укороченные грамотрицательные палочки. На среде R2A образуют колонии среднего размера диаметром 8-10 мм, желтовато-лимонного

оттенка, непрозрачные, слегка выпуклые, с ровным краем и пастообразной консистенции. Оптимальная температура роста 28°C, рост отсутствует при +37°C и при +4°C, оптимум pH 4,5. В качестве источников углерода использует: глюкозу, арабинозу, мальтозу, лактозу, маннитол. В качестве источников азота использует: пептон, триптон, гидролизат казеина, дрожж. экстракт, казеин; слабо использует: желатин, соли аммония и нитраты; слабо растет на безазотных средах. Штамм обладает незначительной амилазной активностью. Продуцирует ауксины на среде с L-триптофаном.

3.3.7. Заключение к разделу 3.3

Скрининг изолятов с комплексом хозяйственно-ценных свойств (табл. 3.7) позволил отобрать ряд перспективных штаммов эндофитных бактерий сфагнов. Молекулярно-генетическая идентификация выявила широкое разнообразие выделенных микроорганизмов. Доминирующими группами бактерий среди изучаемых сфагнум-ассоциированных микроорганизмов являлись представители родов *Pseudomonas*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Collimonas*. Также следует уделить внимание факту присутствия представителей рода *Burkholderia* среди изучаемых изолятов. Виды *B. bryophila* и *B. phenazinium* в нашей работе были обнаружены в ассоциации со *S. fallax* и *S. magellanicum*, отобранных на территории как России, так и Австрии, что подтверждает мнение о высокоспецифичной взаимосвязи между представителями этого рода бактерий и сфагновыми мхами (Vandamme et al., 2007). Бактерии с высоким антагонистическим потенциалом были идентифицированы, как представители родов *Pseudomonas*, *Serratia* и *Flavobacterium* – родов бактерий, которые зарекомендовали себя как хорошие биоконтрольные и ростстимулирующие агенты, и широко применяются в сельскохозяйственной микробиологии для создания биопрепаратов широкого спектра действия (Шенин с соавт., 1996; Кравченко с соавт., 2002; Тихонович с соавт., 2005).

Характеристика ферментативной активности изучаемых изолятов бактерий свидетельствовала о наличии у них довольно активных гидролитических ферментов, выявлены штаммы, наиболее активно выделявшие протеиназы, амилазы, липазы и целлюлазы. 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 колебались от 5.5 до 7.0, при pH=8.0 рост всех изучаемых штаммов бактерий заметно

подавлялся. У одиннадцати исследованных штаммов *in vitro* отмечена способность к накоплению ауксинов на среде с L-триптофаном, что говорит о потенциальной возможности использования данных штаммов как ростстимулирующих. Восемь перспективных штаммов характеризовались способностью растворять малорастворимые соединения фосфора, такие как ортофосфат кальция и фосфоритна мука. Данные штаммы (в основном представители р. *Pseudomonas*) будут включены в разработку микробиологических препаратов для мобилизации малодоступных соединений фосфора.

Таблица 3.7. Таксономическая принадлежность, хозяйственно-ценные и физиологические свойства наиболее перспективных штаммов эндофитных бактерий-ассоциантов сфагновых мхов.

Штамм	Фунгицидная активность (в целом)	Бактерицидная активность (в целом)	Ферментативная активность	Растворение фосфатов (Са ₃ (РО ₄) ₂ / фосфоритная мука)	Рост на безазотных средах	Производство ауксинов (на среде с L-триптофаном)	Оптимум t	Рост при +37	Рост при +4	Оптимум рН
<i>Pseudomonas brenneri</i> RM14B	+++	++	P(+), L(+)	+/+	-	+	28	-	+	6.0
<i>Pseudomonas poae</i> RF11D	++	+++	P(++)	+/+	-	+++	28	-	-	6.0
<i>Pseudomonas asplenii</i> RF13H	+++	++	A(+++), L(++)	-/-	-	+++	28	-	+	6.0
<i>Serratia plymuthica</i> AF24A	++	++	P(++), A(+), L(++)	-/-	-	+	28	-	+	7.0
<i>Pseudomonas poae</i> RM13C	+++	+	P(+), A(+)	+/+	-	-	18	-	-	5.0
<i>Pseudomonas. sp.</i> RM13D	+++	+	P(++)	+/+	-	+++	28	-	-	6.0
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RF14J	++	+	P(++), L(+)	+/+	-	++	28	-	+	6.0
<i>Pseudomonas poae</i> RF12C	+++	++	A(++)	+/+	-	-	28	-	+	6.0
<i>Flavobacterium saccharophilum</i> RM14A	-	+++	P(++), A(+++), L(++)	-/-	-	-	18	-	+	7.0
<i>F. saccharophilum</i> RF14A	-	+++	P(+), A(++), L(++), C(++)	-/-	-	-	28	-	-	7.0
<i>F. sp.</i> NFX	-	-	P(+), A(+)	±/+	+	-	28	-	-	6.0
<i>Burkholderia bryophila</i> AM11B	++	-	A(+), L(++)	-/-	+	-	18	-	-	5.0
<i>Burkholderia bryophila</i> AM32A	-	-	A(+)	-/-	+	++	28	-	-	4.5
<i>Burkholderia phenazinum</i> RM13B	++	-	A(+)	-/-	-	-	28	-	-	6.0
<i>Collimonas sp.</i> RF12H	++	±	A(+++), L(++)	-/-	-	-	28	-	-	6.0
<i>Collimonas sp.</i> RF13F	++	-	P(+), L(+)	-/-	+	-	18	-	-	6.0
<i>Collimonas sp.</i> RM14C	+	++	P(+), L(+)	-/-	+	+	18	-	-	6.0
<i>Collimonas sp.</i> RF13G	++	-	-	-/-	-	-	28	-	-	6.0
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> RF13C	-	-	P(++), A(++)	-/-	-	-	28	-	±	6.0
<i>Pedobacter cryoconitis</i> RM11D	+	++	P(++), A(++), C(+++)	-/-	-	-	18	-	+	7.0
<i>Pedobacter sp.</i> RF14C	+	+	P(++), A(++), L(++)	-/-	-	-	28	-	+	7.0
<i>Pedobacter kribbensis</i> RF14G	+	-	P(+), A(+)	-/-	+	-	18	-	-	6.0
<i>Pseudomonas sp.</i> RF14D	++	-	P(+), A(+)	-/-	-	++	28	-	-	6.0
<i>Pseudomonas poae</i> RF14H	++	+	-	+/+	-	-	28	-	+	6.0
<i>Pedobacter sp.</i> RM12B	+	+	C(+++)	-/-	-	+	28	-	+	6.0
<i>Chryseobacterium soli</i> RM12F	+	-	P(++), A(+++), L(+)	-/-	-	++	28	-	-	6.0

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

3.4. Эндофитные бактерии-ассоцианты сфагновых мхов, как активные колонизаторы ризосферы сельскохозяйственных культур и продуценты высокоэффективных биопрепаратов для сельского хозяйства

3.4.1. Колонизационная активность *in planta*

Изначально возникший вопрос о способности штаммов 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 ростстимулирующим и антагонистическим потенциалом против фитопатогенов, в условиях системы «высшее растение - бактерия».

Использование метода гнотобиотических систем позволило дать положительный ответ на этот ключевой вопрос работы.

Колонизационный потенциал 5 штаммов тестируемых бактерий, выделенных из сфагновых мхов (табл. 3.8), имел достаточно высокие значения. 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 контрольного штамма *P. chlororaphis* RR228. Максимальные значения приживаемости на корнях, как пшеницы, так и томатов зарегистрированы для *Serratia plymuthica* AM24A и *Stenotrophomonas rhizophila* RF13C. Относительные значения численности данных бактерий на корнях по сравнению с ризосферой также были максимальными и составляли 14%. Численность остальных штаммов также была высока и сопоставима с показателями колонизационной активности контрольного штамма. Средняя же численность всех интродуцированных штаммов на корнях томатов в разы превосходила этот показатель на корнях пшеницы.

По данным эпифлуоресцентной микроскопии, штаммы бактерий *Serratia plymuthica* AM24A, *Flavobacterium saccharophilum* RM14A, *Pseudomonas brenneri* RM14B, *Pseudomonas poae* RF11D, *Collimonas sp.* RM14C активно заселяли поверхность корня томатов (рис. 3.9), располагаясь в виде микроколоний или биопленок, направленных вдоль оси корня. Было отмечено, что характерной особенностью формирования микроколоний является их локализация в стыках клеток ризодермы. При этом колонии бактерий были вытянуты вдоль продольной оси корня, залегая 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.

Таблица 3.8. Приживаемость типовых штаммов эндофитных бактерий сфагновых мхов на корнях пшеницы и томатов.

Штамм	Количество бактерий, 10^5 КОЕ /1 см корня		Количество бактерий, 10^5 КОЕ /1 см корня 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 sp.</i> 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*
НСР ₀₅	32,7	5,6	20,3

Примечание. *Различия достоверны на уровне НСР₀₅

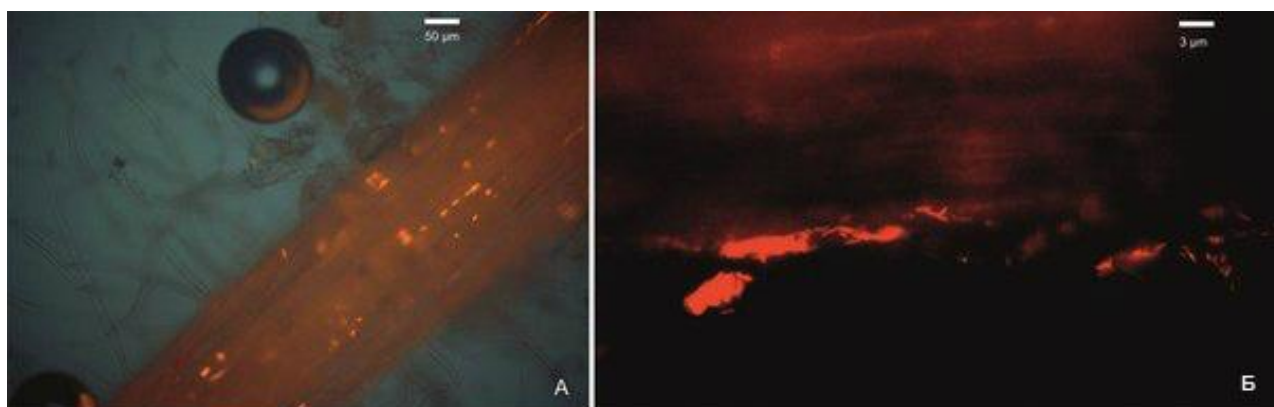


Рис 3.9. Локализация изучаемых штаммов бактерий на поверхности корней томатов при помощи флуоресцентной *in situ* гибридизации и эпифлуоресцентной микроскопии. А. – Общий вид корня томатов, микроколонии бактерий *Pseudomonas poae* RF11D располагаются вдоль корня. Масштабная линейка - 50 мкм. Б. - Микроколонии и отдельные клетки *Pseudomonas poae* RF11D на поверхности корня томатов. Масштабная линейка - 3 мкм

Интересные сведения получены о формировании микроколоний штаммом *P. asplenii* RF13H на корнях пшеницы с помощью конфокальной сканирующей лазерной микроскопии (рис. 3.10). Бактерии локализовались на корнях, формируя структуры двух типов. Часть бактерий формировала тяжи, находящиеся на поверхности корневых волосков и направленные вдоль их осей. Основная масса бактерий формировала крупные яйцевидные микроколонии из плотно сгруппированных псевдомонад, которые могли частично распадаться на отдельные

бактериальные клетки. Такие бактериальные конгломераты локализованы на поверхности корня и в основании корневых волосков. Необходимо отметить, что подобный тип микроколоний на корнях культурных растений не описан в литературе и, по-видимому, является уникальным.

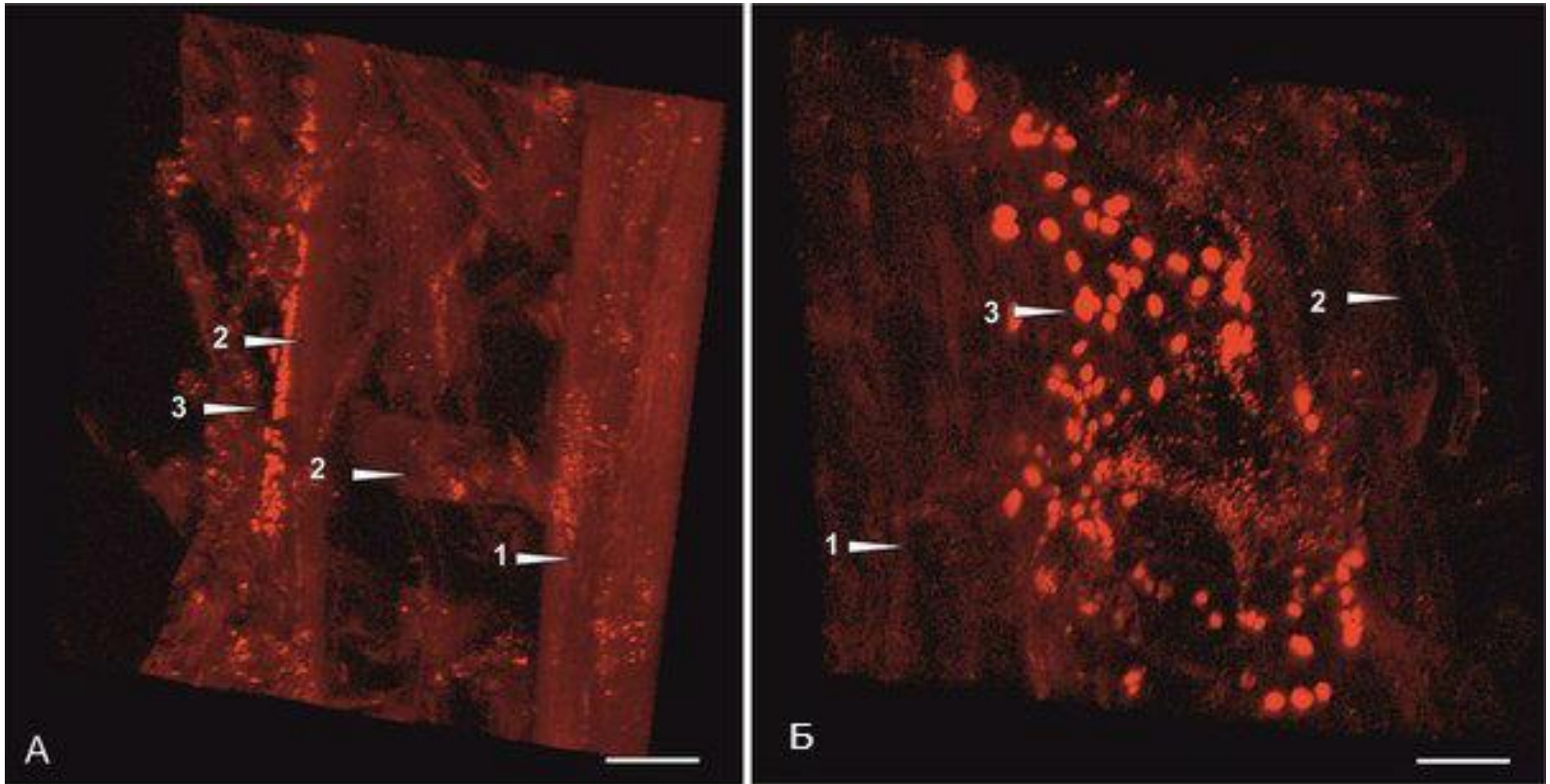


Рис 3.10. Формирование микроколоний на корнях пшеницы штаммом *Pseudomonas asplenii* RF13H: А. – Бактериальные клетки формируют тяжи на поверхности корневых волосков, вдоль их продольных осей (1.- поверхность корня; 2.- корневые волоски; 3.-бактериальные клетки на поверхности корневого волоска). Масштабная линейка – 5 мкм. Б. – Бактериальные клетки объединяются в плотные яйцевидные микроколонии, расположенные на поверхности корня и у основания корневых волосков (1.- поверхность корня; 2.- корневые волоски; 3.- микроколонии бактерий). Масштабная линейка – 20 мкм. Конфокальная сканирующая лазерная микроскопия.

Для оценки присутствия двух бактериальных штаммов (*Pseudomonas asplenii* RF13H, *Flavobacterium sp.* RM14A) на корнях томатов в условиях нестерильной почвы использовали метод ПЦР. Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК штаммов были выровнены со схожими последовательностями, полученными с помощью программы BLAST GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) других распространенных близкородственных видов. В данных последовательностях определили уникальные участки, к которым подобрали специфические праймеры при помощи программы Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). В итоге для каждого штамма была подобрана пара праймеров, специфичных для участка фрагмента гена 16S рРНК, и оптимизированы параметры ПЦР-реакции (табл. 3.9).

Таким образом, было установлено, что разработанные молекулярные маркеры позволяют детектировать изучаемые штаммы в ризосфере культурных растений в условиях вегетационных экспериментов с нестерильной почвой (рис. 3.11).

Таблица 3.10. Праймеры, подобранные для ПЦР-детекции изучаемых штаммов в условиях нестерильного вегетационного эксперимента в ризосфере культурных растений.

Штамм	Праймеры (прямой и обратный), 5'-3'	Размер ПЦР-фрагмента	Tm, °C
<i>Pseudomonas asplenii</i> RF13H	SpecPs-F GTCAACTAGCCGTTGGAAGC SpecPs-R TTAGAGTGCCCACCATTACG	333	58
<i>Flavobacterium sp.</i> RM14A	SpecFlavo-F CGTAGGCGGTTTAATAAGTCAGTG SpecFlavo-R CGTGGACTACCAGGGTATCTAATC	230	58

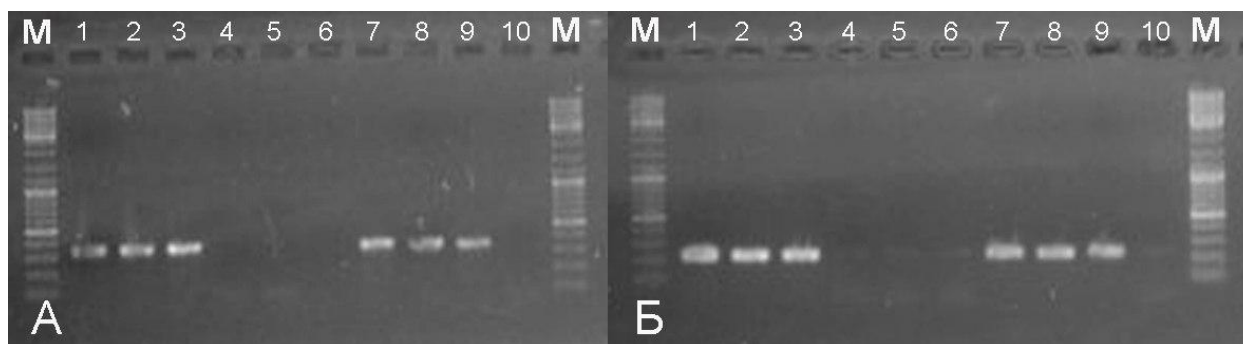


Рис 3.11. Результаты ПЦР-реакций с использованием специфических праймеров для штаммов *P. asplenii* RF13H (А) и *F. sp* RM14А (Б): М- маркер молекулярного веса (100-200-300-400... п.н.), 1-3 – положительный контроль - чистая культура бактерий, 4-6 – ризосферная почва неинокулированных растений, 7-9 – ризосферная почва инокулированных растений, 10 – отрицательный контроль- вода.

3.4.2. Ростстимулирующий и биоконтрольный эффекты *in planta*

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* в 2011 году. Обработка семян редиса бактериальной суспензией с титром 10^7 КОЕ/мл оказало 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.3.11, рис. 3.12).

В 2012 году ростстимулирующий эффект изучался у более широкого круга штаммов различного таксономического положения. По результатам микровегетационного эксперимента на растениях томатов *Solanum lycopersicum* выявлен стимулирующий эффект, заключавшийся в усилении развития общей зеленой массы растений (табл. 3.12). Так, наибольшую эффективность в данном эксперименте продемонстрировали штаммы *Pseudomonas brenneri* RM14B, *P. asplenii* RF13H, *P. fluorescens* RF14J, обеспечившие прибавку зеленой массы, превосходящую этот показатель для контрольного штамма *P. chlororaphis* RR228.

Таблица 3.11. Стимулирующий эффект, оказываемый изучаемыми штаммами бактерий, на растения редиса 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*	34,9*
<i>Pseudomonas asplenii</i> RF13H	9,8*	29,0
НСР ₀₅	2,0	6,3

Примечание. *Различия достоверны на уровне НСР₀₅

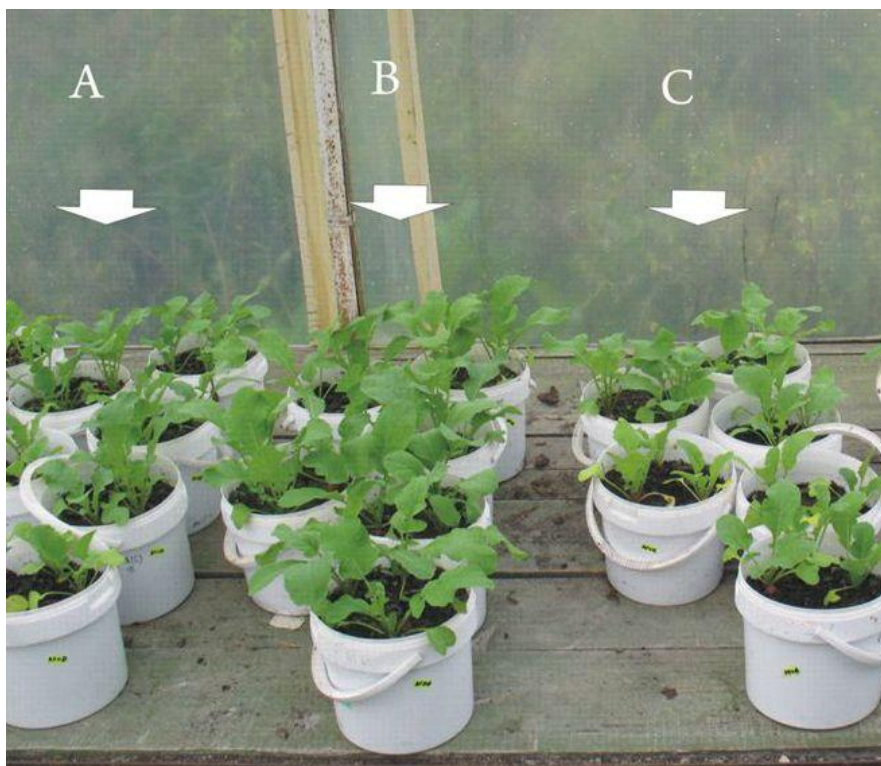


Рис. 3.12. Стимулирующий эффект, оказываемый изучаемыми штаммами бактерий, на растения редиса в условиях микровегетационного опыта (А.- *Pseudomonas asplenii* RF13H, В.- *Serratia plymuthica* AM24A, С.- контроль (вода)).

Таблица 3.12. Стимулирующий эффект, оказываемый изучаемыми штаммами бактерий, на растения томатов 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>P. brenneri</i> RM14B	374,2*	31,1*
<i>P. poae</i> RF11D	275,9	23,3
<i>P. asplenii</i> RF13H	316,6*	27,8*
<i>P. 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

В эксперименте по биоконтролю корневой гнили пшеницы, вызванной *Fusarium culmorum*, было продемонстрировано, что инокуляция семян пшеницы бактериями *P. asplenii* RF13H достоверно снижает заболеваемость растений с 90 до 40% (табл. 3.13, рис 3.13). Данное заболевание проявлялось в потемнении участков корней и побурении основания стеблей, а также разрушением или гибелью корневой системы. При этом было отмечено, что без внесения патогенного фона *F. culmorum* около 50% семян уже были поражены внутрисеменной инфекцией (предположительно вызванной *Alternaria* sp.), не удаленной при помощи поверхностной стерилизации семян. Данная инфекция проявлялась в почернении зерновки у контрольных растений. Инокуляция исследуемым штаммом *P. asplenii* полностью подавила развитие внутрисеменной инфекции в варианте без внесения дополнительного патогенного фона.

Особый практический интерес представляют исследования по биоконтролю патогена *P. syringae* pv. *tomato* на растениях томатов. К настоящему времени показано, что одним из наиболее эффективных средств предотвращения развития бактериозов растений является использование биопрепаратов на основе бактерий-антагонистов (Котляров, 2008). Фитопатогенные бактерии *P. syringae* pv. *tomato* к настоящему времени представляет серьезную угрозу и является причиной одного из наиболее опасных бактериозов. В представленных исследованиях в условиях микровегетационного эксперимента при внесении в почву бактериальной суспензии фитопатоген *P. syringae* pv. *tomato* вызывал поражение растений томатов, которое наиболее ярко проявлялись уже через две недели роста растения. Среди характерных признаков заболевания следует отметить: локальные участки некроза на листьях в виде черных пятен, а также поражение основания стебля, угнетение корневой системы, увядание и отставание в развитии у всего растения (рис 3.14).

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*. Инокуляция семян и последующее опрыскивание 7-и дневных растений бактериальной суспензией штаммов-антагонистов приводило к заметному снижению численности растений с симптомами черной пятнистости. Наибольшую эффективность продемонстрировал штамм *F. sp.* RM14A, инокуляция семян томатов и опрыскивание по вегетирующим растениям бактериальной суспензией которого приводило к снижению заболеваемости черной пятнистостью с 24,4 до 9,7% (табл. 3.14.). Инокуляция томатов штаммами *S. plymuthica* AM24A и *P. asplenii* RF13H также снижало численность пораженных растений до 11,2 и 15,9 % соответственно. Кроме того, необходимо уточнить, что использованная нами нагрузка фитопатогенного фона является довольно высокой и неестественной для природной среды и

выбрана для демонстрации выраженных симптомов заболевания. В природной среде при меньшей распространенности и фитопатогенной нагрузке эффективность инокуляции исследуемыми штаммами должна быть, по-видимому, выше.

Таблица 3.13. 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
HCP ₀₅	2,36	1,52		

Примечание. *Различия достоверны на уровне HCP₀₅, **внутрисеменная инфекция



Рис. 3.13. Подавление смешанной инфекции, вызванной *F. culmorum* и *Alternaria sp.*, бактериями *P. asplenii* RF13H: А. – симптомы инфекции: побурение и загнивание корневой системы, почернение зерновки; Б, В. – подавление инфекционного процесса при инокуляции штаммом *P. asplenii* RF13H (белыми стрелками показаны симптомы инфекции в контрольном варианте).

Таблица 3.14. 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



Рисунок 3.14. Симптомы черной пятнистости томатов, вызванной *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: появление черных пятен на листьях, побурение и гниль основания стебля, ингибирование коневой системы и развития всего растения в целом

3.4.4. Целлюлозолитическая микробная ассоциация (ЦМА) и его эффективность

Эффективность деструкции соломы с использованием ЦМА (п.3.3.1.) оценивалось в лабораторном и полевом (Приложение 1) экспериментах. В качестве положительного контроля в лабораторном эксперименте использовали биопрепарат «Экстрасол» и биопрепарат для деструкции пожнивных остатков «Баркон» (оба препарата разработаны в ГНУ ВНИИСХМ).

В опыте показано, что в зависимости от размера частиц соломы овса, наличия обработки и вида биопрепарата значительно изменяется режим подвижных соединений углерода и азота в почве (рис.3.15, 3.16). Часто влияние биопрепарата было определяющим по сравнению со степенью измельчения соломы. Так, содержание подвижного углерода в почве при разложении соломы, обработанной «Экстрасолом» и ЦМА, не зависело от измельчения соломы. В вариантах с необработанной соломой содержание подвижных С и N было выше при измельчении соломы.

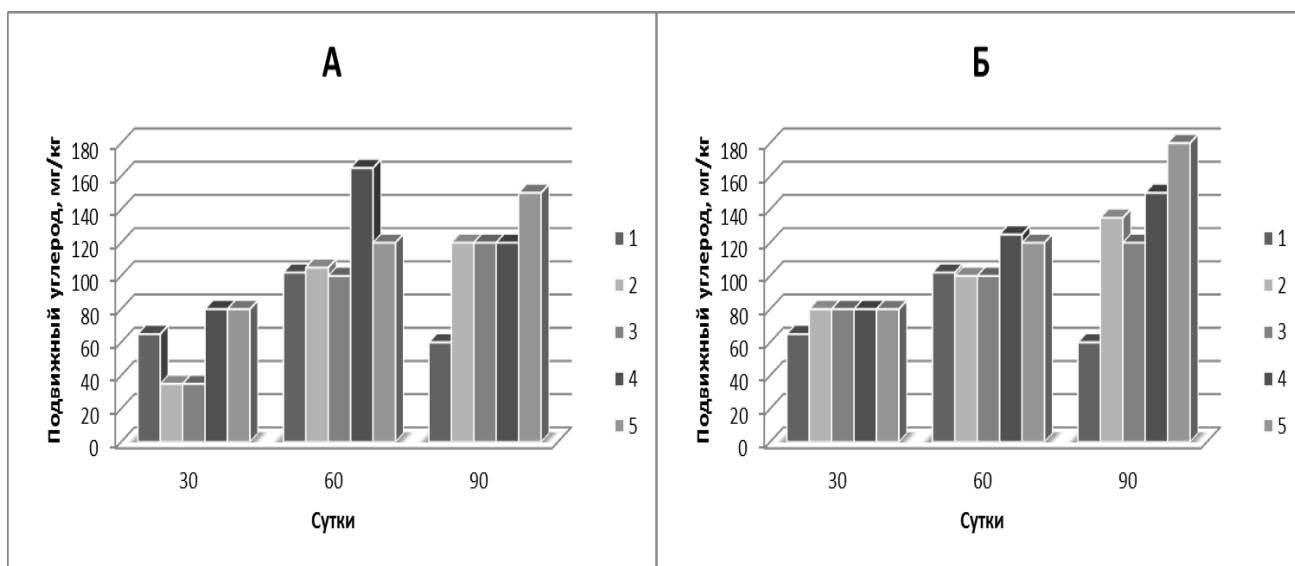


Рисунок 3.15. Динамика подвижных соединений углерода в опыте с внесением соломы в почву. А: 1) контроль; 2) солома; 3) солома + «Баркон»; 4) солома + «Экстрасол»; 5) солома + ЦМА; Б: 1) контроль; 2) солома измельченная; 3) солома измел.+ «Баркон»; 4) солома измел.+ «Экстрасол»; 5) солома измел.+ЦМА.

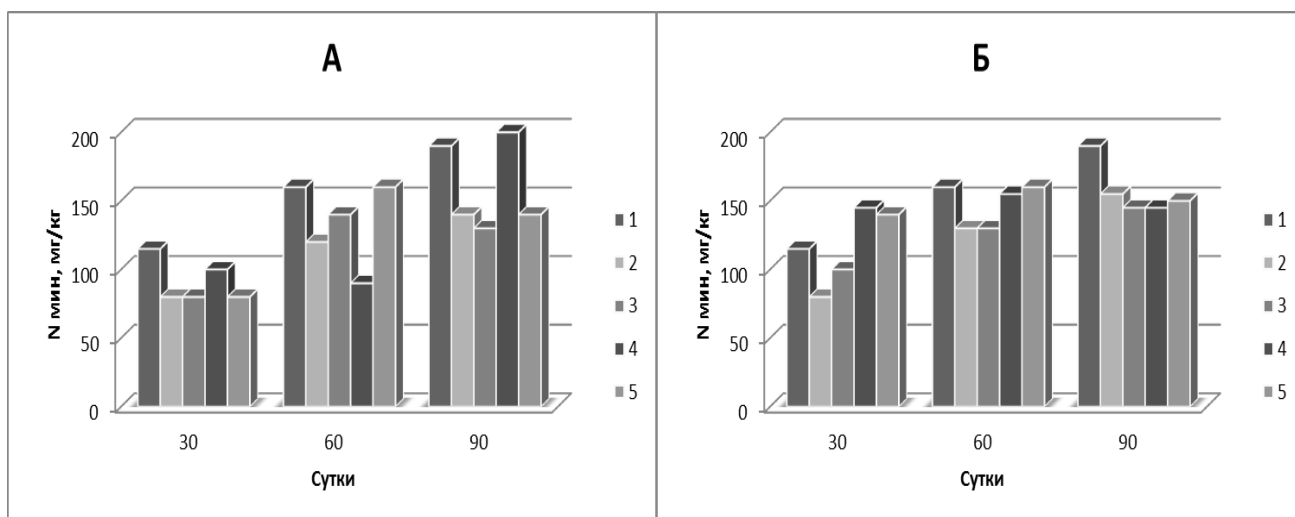


Рисунок 3.16. Динамика подвижных соединений азота в опыте с внесением соломы в почву. Варианты: А : 1) контроль; 2) солома; 3) солома + «Баркон»; 4) солома + «Экстрасол»; 5) солома + ЦМА; Б: 1) контроль; 2) солома измельченная; 3) солома измел.+ «Баркон»; 4) солома измел.+ «Экстрасол»; 5) солома измел.+ЦМА.

Существенных различий по содержанию гумуса в конце опыта по вариантам не было, за исключением снижения его содержания при обработке соломы ЦМА: в контроле $C_{\text{гум.}}$ $3,65 \pm 0,12$, в вариантах с неизмельченной и измельченной соломой, обработанной ЦМА, $3,46 \pm 0,06$ и $3,59 \pm 0,06\%$ соответственно. Отсутствие корреляции между содержанием гумуса и остатком неразложившейся соломы в конце опыта ($r = -0,074$) свидетельствует о преобладании процессов минерализации в почве. Накопление новообразованных гумусовых веществ (пирофосфатная вытяжка) имело отрицательную связь с относительным содержанием активной микробной биомассы ($r = -0,848$) и с количеством гумусразлагающих микроорганизмов в почве ($r = -0,649$). Повышается активность микробоценоза в почве при внесении соломы в комплексе с активными микроорганизмами. По сравнению с контролем возрастает дыхание почвы в 2 - 3,8 раза, размеры активной микробной биомассы на 31 - 76%, потоки C и N - на 97 - 400 и 203 - 380% соответственно. Следовательно, причиной отсутствия накопления гумуса при внесении соломы стала высокая активность микроорганизмов, которая приводит к быстрой минерализации поступающих питательных элементов.

Выявлены существенные различия в эффективности биопрепаратов для разложения соломы в зависимости от степени измельчения соломы. Так, на измельченной соломе «Баркон» за 1 месяц разлагает 45% внесенной соломы против 10% для неизмельченной, аналогичные результаты показала ЦМА (рис.3.17). На плодородной почве при достаточном увлажнении и неограниченности во времени (например, нет посева озимых) имеет смысл биопрепараты применять для ускорения разложения соломы.

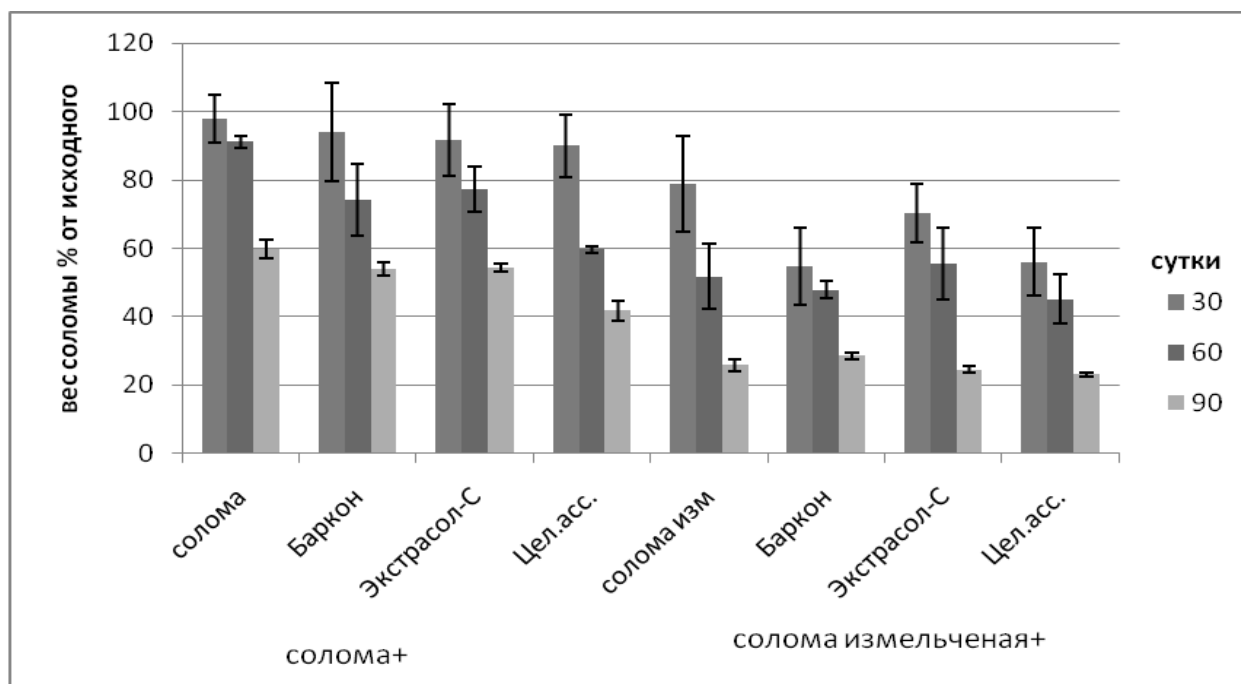


Рисунок 3.17. Влияние биопрепаратов на остаточное содержание соломы в почве. Указаны ошибки средних

Таким образом, установлено, что наиболее эффективно по итогам 3-х месяцев при любых размерах частиц соломы её разлагала ЦМА. На втором месте – биопрепарат «Баркон».

По результатам полевого эксперимента (Приложение 2), проведенного в независимых исследованиях на базе ВНИИОУ под руководством к.б.н. Русаковой И.В. установлено, что наибольшую эффективность в деструкции пожнивных остатков зерновых культур показала ЦМА, выделенная из сфагновых мхов.

3.4.5. Заключение к разделу 3.4

По результатам представленных в разделе исследований дан положительный ответ на ключевой вопрос диссертационной работы: способны ли эндофитные бактерии, выделенные из сфагновых мхов, колонизировать растения сельскохозяйственного значения и оказывать положительное влияние на их рост и развитие. Установлено, что выделенные перспективные штаммы способны активно заселять ризосферу и ризоплану сельскохозяйственных культур, при этом их численность сопоставима с численностью контрольного штамма-продуцента микробиологического препарата. Интродуцируемые штаммы были визуализированы на корнях сельскохозяйственных растений с использованием методик FISH и CSLM, исследован характер формирования микроколоний перспективными штаммами. Для двух перспективных штаммов подобраны пары праймеров и оптимизированы параметры реакции для их детекции в микровегетационных и полевых экспериментах при помощи метода ПЦР. Показан высокий антагонистический потенциал перспективных штаммов по отношению к возбудителям бактериальных и грибных заболеваний *in planta*. Отобраны штаммы, обладающие выраженным ростстимулирующим действием на сельскохозяйственные культуры, их эффективность продемонстрирована в микровегетационных экспериментах. Исследуемая целлюлозолитическая микробная ассоциация показала наибольшую эффективность при деструкции пожнивных остатков зерновых культур в лабораторных и полевых экспериментах. Результаты, полученные в работе, говорят о высоком потенциале использования эндофитных бактерий, выделенных из сфагновых мхов, в создании микробиологических препаратов для сельскохозяйственного производства.

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

3.5.1. Технологические режимы культивирования перспективных штаммов-продуцентов

Основной задачей данной части работы была отработка технологических режимов получения культур перспективных штаммов-продуцентов с максимально высоким титром культуры и сохранением хозяйственно-ценных свойств. Получение культуры производили с использованием универсального газово-вихревого биореактора «Торнадо» (производства компании «Саяны», Новосибирск), оснащенного датчиками температуры, pH, парциального давления O₂, с автоматической регулировкой заданных параметров и компьютерным управлением. Коэффициент заполнения биореактора - 0,5.

Определено влияние состава основных производственных сред на численность культур перспективных штаммов-продуцентов. В работе использовали 3 питательные среды: R2A, минеральная среда с мелассой, среда на основе пшеничных отрубей. В таблице 3.15 приведены данные о титрах 24-х и 48-и часовых культур перспективных штаммов-продуцентов, выращенных на данных средах. Было установлено, что оптимальной питательной средой, позволяющей получать максимально высокий титр культур наряду с низкой себестоимостью, доступностью компонентов, простотой изготовления является среда на основе отрубей.

Таблица 3.15. Влияние состава питательных сред на численность культур основных перспективных штаммов-продуцентов.

Штамм-продуцент	Численность культуры, млрд. КОЕ/мл					
	24 ч культивирования			48 ч культивирования		
	Среда R2A	Минеральная среда	Среда на основе отрубей	Среда R2A	Минеральная среда	Среда на основе отрубей
<i>Pseudomonas asplenii</i> RF13H	11,4±1,2	10,7±1,1	15,2±2,0	12,4±0,2	11,3±1,2	15,0±3,3
<i>Flavobacterium sp.</i> RM14A	1,3±0,3	0,98±0,2	1,4±0,1	1,5±0,3	1,0±0,3	1,5±0,3
<i>Serratia plymuthica</i> AM24A	10,5±1,0	5,6±0,6	11,2±3,0	11,2±0,1	4,5±0,5	12,3±0,2
<i>P. brenneri</i> RM14B	1,4±0,5	1,1±0,3	1,5±0,2	1,3±0,2	1,1±0,3	1,4±0,2

Изучено влияние концентрации кислорода на численность бактерий при культивировании в условиях биореактора «Торнадо». Показано что разные штаммы с разной скоростью

потребляют кислород из питательной среды. На рис. 3.18 показана зависимость парциального давления кислорода в питательной среде по истечению времени в 24-х часовой культуре. Так, штамм *Serratia plymuthica* AM14A, *Flavobacterium* sp. RM14A потребляет кислород с умеренной скоростью, в то время как *Pseudomonas brenneri* RM14B, *P. asplenii* RF13H практически мгновенно поглощают весь кислород из среды, что говорит о высоком уровне аэробного дыхания и соответственно в высоких потребностях данных штаммов в кислороде.

Определено влияние различных режимов перемешивания питательной среды на численность бактерий в 24-и часовой культуре при температуре 28°C. Установлено парциальное давление кислорода в среде при различной скорости вращения турбины биореактора. Так, показано, что при увеличении скорости вращения турбины в режимах 100-150-200-250 об/мин парциальное давление кислорода возрастает пропорционально: 20,0-22,0-23,5-24,8 кПа. В таблице 3.16 показаны данные о влиянии различной степени аэрации на численность бактерий в 24-и часовой культуре. Таким образом, установлено что оптимальным и универсальным режимом аэрации является режим, создаваем при скорости вращения 200 об/мин и парциальном давлении кислорода в среде 23,5 кПа.

Установлена зависимость численности бактерий исследуемых штаммов от pH питательной среды в условиях 24-х часовой культуры. Данные зависимости численности от pH представлены в табл. 3.17. Показано, что pH питательной среды кардинально не влияет на титр бактериальной культуры, все четыре штамма отличаются широким диапазоном оптимальных значений кислотности среды, однако оптимумы роста для всех штаммов лежат в пределах 6,5-7,5.

Таким образом, с использованием биореактора «Торнадо» с контролируемыми параметрами культивирования, были отработаны технологические режимы получения бактериальных культур 4-х перспективных штаммов-продуцентов. Для создания лабораторного образца микробиологического препарата был отобран штамм-продуцент *P. asplenii* RF13H, характеризующийся наличием комплекса полезных свойств. В качестве оптимальной среды для получения культуры выбрана среда на основе отрубей, режим культивирования составляет 48 ч. Основные параметры культивирования: парциальное давление кислорода в среде - 23,5 кПа, температура 30°C, показатель pH=7,0. Средняя численность получаемой бактериальной культуры $15 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

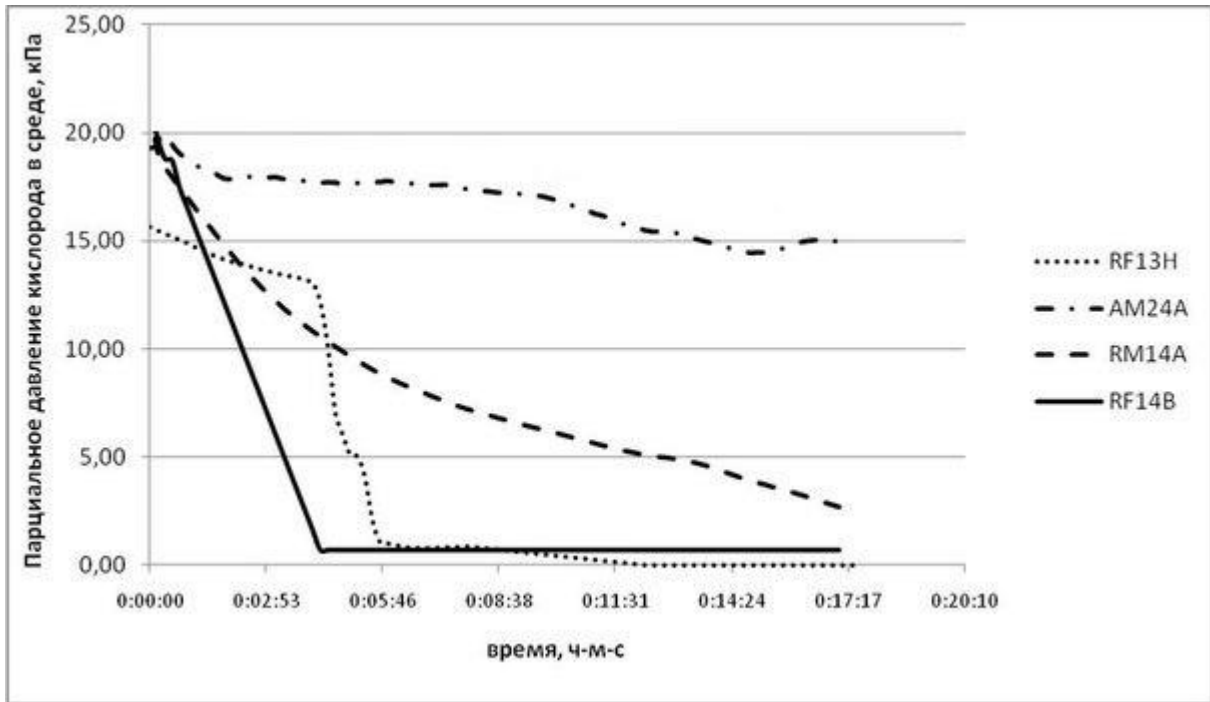


Рис. 3.19. Снижение парциального давления кислорода в среде 24-и часовых бактериальных культур без аэрации.

Таблица 3.16. Влияние различных режимов аэрации на численность исследуемых штаммов в 24-и часовой культуре. Численность в млрд. КОЕ/мл.

Штамм	Условия аэрации (об/мин \ парциальное давление, кПа)			
	100\20	150\22,0	200\23,5	250\24,8
<i>Pseudomonas asplenii</i> RF13H	7,2±3,5	8,0±2,0	15,6±3,2	15,0±3,5
<i>P. breunneri</i> RM14B	2,8±0,5	2,9±1,3	3,3±1,0	3,1±0,4
<i>Flavobacterium sp.</i> RM14A	1,0±0,3	1,3±1,1	2,1±0,9	2,0±0,9
<i>Serratia plymuthica</i> AM24A	9,6±2,2	10,4±1,5	11,6±2,1	10,6±1,6

Таблица 3.17. Влияние pH на численность исследуемых штаммов в 24-и часовой культуре. Численность в млрд. КОЕ/мл.

Штамм	pH				
	5,5	6	6,5	7	7,5
<i>Pseudomonas asplenii</i> RF13H	20±3,5	21±4,5	21,6±4,5	22±2,2	19,6±3,0
<i>P. breunneri</i> RM14B	2,8±0,2	2,9±1,3	2,9±0,2	3,2±0,4	3,3±2,1
<i>Flavobacterium sp.</i> RM14A	0,6±0,2	0,64±0,3	0,6±0,1	0,52±0,1	0,7±0,1
<i>Serratia plymuthica</i> AM24A	9,6±3,5	9,6±3,4	10,0±1,5	10,5±2,0	11,0±0,1

3.5.2. Создание стабильной формы лабораторного образца микробиологического препарата на основе штамма *Pseudomonas asplenii* RF13H

Основной проблемой при создании препаративных форм микробиологических удобрений и биопестицидов на основе грамотрицательных бактерий, в частности бактерий рода *Pseudomonas*, является нестабильность бактериальной культуры по показателю «численность клеток», а также малая продолжительность хранения. На данном этапе работы осуществлены исследования по повышению стабильности бактериальной культуры *P. asplenii* RF13H, увеличению её сроков хранения.

Кроме того, немаловажным моментом при применении жидких форм биопрепаратов является отсутствие визуальной оценки качества нанесения и распределения микробиологического препарата на семена. Для химических средств защиты эта проблема решена введением в состав композиций ярких красящих веществ (обычно красного цвета), облегчающих контроль за обработкой семенного материала. На данном этапе работы проведено совмещение бактериальной культуры штамма *P. asplenii* RF13H с красителями для цветовой маркировки лабораторного образца препарата.

Для повышения стабильности лабораторного образца, увеличения сроков его хранения и цветовой маркировки в состав композиции препарата вводились различные консервирующие добавки, а также стабилизаторы консистенции и красители. Для цветовой маркировки прототипа биопрепарата применили пищевой краситель «Зеленое яблоко». Краситель не оказал угнетающего влияния на численность и хозяйственно ценные свойства культуры продуцента биопрепарата. Основным стабилизирующим агентом прототипа биопрепарата выбрана ксантановая камедь. Данное вещество выступило в роли загустителя и стабилизатора консистенции, предотвращающего быстрое оседание бактериальных клеток и равномерное их распределение по всему объему культуры. Для предотвращения развития посторонней микрофлоры и консервации культуры прототип биопрепарата был добавлен консервант сорбат калия. Состав композиций прототипа биопрепарата на основе штамма *P. asplenii* RF13H приведен в таблице 3.19. При приготовлении прототипа биопрепарата концентрат бактериальной культуры с титром 15 млрд. КОЕ/мл разбавлялся стерильной водопроводной водой в соотношении 1:9, к полученной суспензии добавлялись стабилизирующие добавки и краситель. Полученные таким образом композиции закладывались на хранение.

В результате был установлен оптимальный состав композиции лабораторного образца микробиологического препарата на основе штамма-продуцента. Показано, что концентрации консерванта свыше 0,05% оказывают угнетающее влияние на численность бактерий штамма-продуцента, которое заметно уже после 14 сут. хранения. В качестве оптимальной

концентрации загустителя выбрана концентрация 0,25%, обеспечивающая стабильность консистенции, но при этом не чрезмерную густоту и вязкость. Таким образом, оптимальным выбран состав композиции №5 (табл. 3.19): за 30 суток хранения произошло снижение титра клеток с 1,5 до 1,2 млрд. КОЕ/мл, в то время как в контроле титр снизился до 0,1 млрд. КОЕ/мл. Через 60 суток хранения численность культуры составила 0,9 млрд. КОЕ/мл, что является достаточным для эффективного применения биопрепарата. Полученная композиция, благодаря присутствию красителя, обеспечивала цветовую маркировку обработанных семян и облегчала контроль за нанесением препарата.

Таблица 3.19. Состав композиций лабораторного образца микробиологического препарата для стабилизации численности и сроков хранения.

№ п.п.	Состав
Композиция 1	Загуститель 0,25%, консервант 0,1%
Композиция 2	Загуститель 0,1%, краситель 0,5%, консервант 0,01%
Композиция 3	Загуститель 0,25%, краситель 0,5%, консервант 0,01%
Композиция 4	Загуститель 0,5%, краситель 0,5%, консервант 0,01%
Композиция 5	Загуститель 0,25%, краситель 0,5%, консервант 0,05%
Композиция 6	Загуститель 0,25%, краситель 0,5%, консервант 0,1%
Композиция 7	Загуститель 0,25%, краситель 0,5%, консервант 0,5%

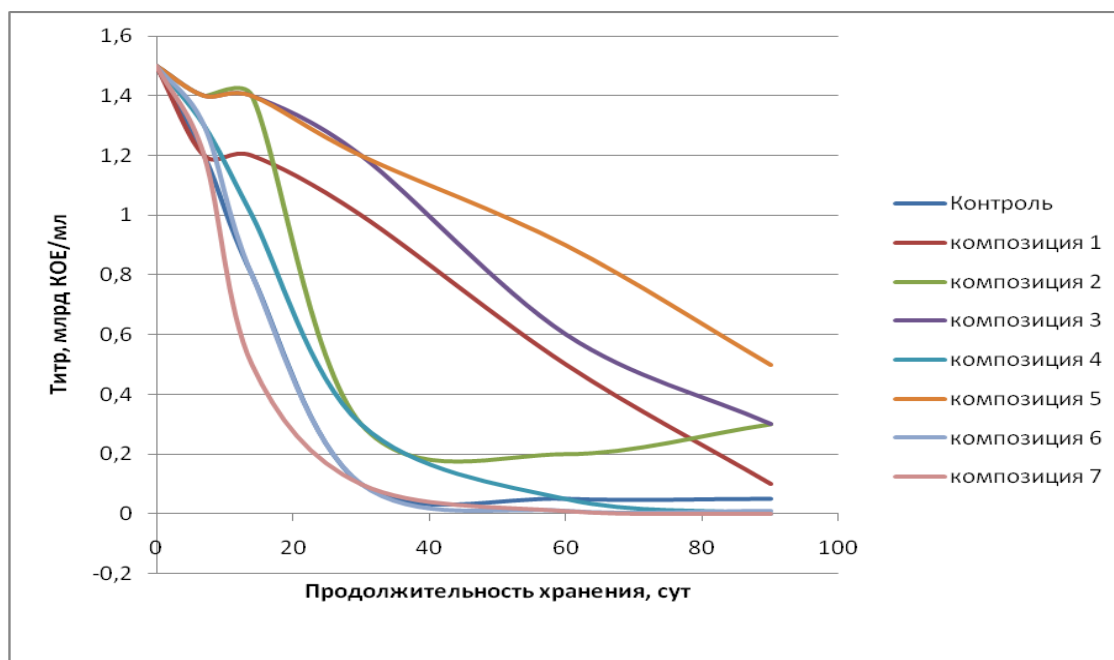


Рис. 3.20. Влияние состава лабораторного образца микробиологического препарата на численность бактерий *P. asplenii* RF13H в течении 90 сут. хранения.

3.5.3. Апробация лабораторных образцов микробиологических препаратов

Лабораторные образцы микробиологических препаратов на основе перспективных штаммов бактерий были апробированы в полевых испытаниях на базе Карабалыкской сельскохозяйственной опытной станции (Республика Казахстан) в 2012 году на масличных культурах: масличный лен, подсолнечник масличный.

Данные таблицы 3.20 свидетельствуют об увеличении урожайности льна масличного в вариантах с применением образцов микробиологических препаратов по сравнению с контрольным вариантом. В результате проведенных испытаний по показателю урожайности среди вариантов опыта при НСР₀₅ равной 0,6 ц/га все варианты достоверно превысили контроль. Максимальное превышение получено по вариантам *P. asplenii* RF13H (+1,5 ц/га), Бинорам (+1,4 ц/га), *Flavobacterium sp.* RM14A (+1,3 ц/га).

В результате проведенных испытаний по показателю урожайности подсолнечника масличного (табл. 3.21) среди вариантов опыта при НСР₀₅ равной 2,1 достоверно превысили контроль *P. asplenii* RF13H (+3,8 ц/га), Бинорам (+3,3 ц/га), *Flavobacterium sp.* RM14A (+2,4 ц/га).

Таблица 3.20. Урожайность льна масличного в опыте с применением лабораторных образцов микробиологических препаратов.

Вариант	Масса 1000 семян, гр	Урожайность, ц/га			Средняя	Отклонение от контроля
		1	2	3		
<i>P. brenneri</i> RM14B	6,4	4,5	5,6	5,8	5,3	1,2
<i>P. asplenii</i> RF13H	6,1	5,4	5,9	5,6	5,6	1,5
<i>Flavobacterium sp.</i> RM14A	5,7	5,2	5,4	5,7	5,4	1,3
Бинорам	6,4	5,4	5,8	5,3	5,5	1,4
Контроль	6,4	3,6	4,1	4,5	4,1	
НСР ₀₅						0,6

Таблица 3.21. Урожайность подсолнечника маслиного в опыте с применением лабораторных образцов микробиологических препаратов.

Вариант	Масса 1000 семян, гр	Урожайность, ц/га			Средняя	Отклонение от контроля
		1	2	3		
<i>P. brenneri</i> RM14B	26,1	9,0	14,5	7,6	10,3	1,4
<i>P. asplenii</i> RF13H	24,1	13,3	14,4	10,5	12,7	3,8
<i>Flavobacterium sp.</i> RM14A	29,9	11,8	12,3	10,0	11,3	2,4
Бинорам	28,8	12,7	12,7	10,6	12,2	3,3
Контроль	26,2	10,8	10,8	6,3	8,9	
НСП ₀₅						2,1

3.5.4. Заключение к разделу 3.5

По результатам представленных в данном разделе исследований разработаны и оптимизированы технологические параметры культивирования ряда перспективных штаммов-продуцентов, а также подобрана оптимальная среда для получения максимально высоких титров бактериальной суспензии. Для дальнейших исследований и создания лабораторного образца микробиологического препарата отобран штамм *P. asplenii* RF13H. Оптимизирован состав композиции лабораторного образца, обеспечивающий поддержание численной стабильности и увеличение сроков хранения жидкой культуры данного штамма. Впервые предложена композиция, содержащая краситель для цветовой маркировки препарата и обеспечения удобства обработки семенного материала. Эффективность лабораторных образцов на основе перспективных штаммов бактерий были апробированы в независимых полевых испытаниях на базе Карабалыкской сельскохозяйственной опытной станции (Республика Казахстан).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сфагновые мхи являются уникальными местообитаниями для микроорганизмов, которые играют важную роль в развитии и функционировании этих растений. Растения сфагнов одних видов, отобранные в различных географических точках Евразийского континента (Австрийские Альпы, Ленинградская область, Западная Сибирь) населены микроорганизмами одних и тех же систематических групп. Гиалиновые клетки сфагнов являются экологическими нишами для населяющих их ткани эндофитных микроорганизмов, формирующих микроколонии или располагающихся одиночно, но при этом, по-видимому, активно взаимодействующих с растением-хозяином. Культивируемые формы гетеротрофных бактерий, выделенные из сфагновых мхов одних видов различного географического происхождения, являются представителями одних и тех же таксонов, среди которых доминируют рода *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Collimonas*, *Serratia*, *Burkholderia* и некоторые другие.

Немаловажно и то, что большинство из выделенных представителей эубактерий обладают значимыми для растительно-микробных систем, и часто, хозяйственно-ценными свойствами, что, бесспорно, позволяет отнести их к группе PGP-бактерий. Так, было установлено, что более 50% всех выделенных бактерий обладают выраженной фунгицидной активностью против ряда фитопатогенных и токсигенных грибов, а около 30% в той или иной степени обладали антагонистической активностью против бактериальных фитопатогенов. Ряд исследованных бактерий-ассоциантов сфагнов различного таксономического положения обладало способностью продуцировать ауксины *in vitro* и стимулировать развитие проростков сельскохозяйственных культур. Среди выделенных штаммов бактерий обнаружены обладатели и других хозяйственно-ценных свойств, таких как способность к мобилизации труднодоступных для растений соединений фосфора, рост при пониженных температурах и значениях pH, ферментативные свойства, в частности целлюлазная активность. Все это создает предпосылки для использования данных штаммов микроорганизмов в практических целях, в частности для создания высокоэффективных микробиологических препаратов для растениеводства.

Изначально возникший вопрос о способности штаммов 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 высоким биотехнологическим потенциалом в условиях системы «высшее растение - бактерия». По результатам представленных исследований дан положительный ответ на

ключевой вопрос диссертационной работы. Установлено, что выделенные перспективные штаммы способны активно заселять ризосферу и ризоплану сельскохозяйственных культур, при этом их численность сопоставима с численностью контрольного штамма-продуцента микробиологического препарата. Интродуцируемые штаммы были визуализированы на корнях сельскохозяйственных растений с использованием методик FISH и CSLM, исследован характер формирования микроколоний перспективными штаммами. Для двух перспективных штаммов подобраны пары праймеров и оптимизированы параметры реакции для их детекции в микровегетационных и полевых экспериментах при помощи метода ПЦР. Показан высокий антагонистический потенциал перспективных штаммов по отношению к возбудителям бактериальных и грибных заболеваний *in planta*. Отобраны штаммы, обладающие выраженным ростстимулирующим действием на сельскохозяйственные культуры, их эффективность продемонстрирована в микровегетационных экспериментах.

Были разработаны и оптимизированы технологические параметры культивирования ряда перспективных штаммов-продуцентов, а также подобрана оптимальная среда для получения максимально высоких титров бактериальной суспензии. Для дальнейших исследований и создания лабораторного образца микробиологического препарата отобран штамм *P. asplenii* RF13H. Оптимизирован состав композиции лабораторного образца микробиологического препарата, обеспечивающий поддержание численной стабильности и увеличение сроков хранения жидкой культуры данного штамма. Лабораторные образцы на основе перспективных штаммов бактерий были апробированы в независимых полевых испытаниях на базе Карабалыкской сельскохозяйственной опытной станции (Республика Казахстан).

В заключении необходимо отметить, что семь штаммов были депонированы во Всероссийской коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Россельхозакадемии <http://arriam.spb.ru/> (номера штаммов в ВКСМ 01009-01015) и начаты работы по подготовке патентов к штаммам и препаратам на их основе

ВЫВОДЫ

1. 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 гиалоцитов растения-хозяина, часто в виде многокомпонентных ассоциаций, объединяющих представителей *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*- протеобактерий, цианобактерий, дрожжей, грибов.
2. Из тканей сфагновых мхов путем посева на твердые питательные среды выделено более 400 различных бактериальных изолятов, при этом 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. Значительная часть выделенных штаммов обладает комплексом свойств (до 60% штаммов проявляют выраженные фунгицидные, до 30% - бактерицидные свойства против фитопатогенов, ряд штаммов способен продуцировать ИУК и ее производные), которые, возможно, обеспечивают биоконтрольные и ростстимулирующие эффекты в процессе существования симбиоза между сфагновыми мхами и эндофитными микроорганизмами, населяющими их ткани.
4. В ходе работы было отобрано 10 перспективных штаммов, представителей родов *Pseudomonas*, *Collimonas*, *Flavobacterium*, *Serratia*, обладающих фунгицидной, бактерицидной, ростстимулирующей, фосфатрастворяющей, ферментативной активностью для дальнейшего создания на их основе высокоэффективных микробиологических препаратов для растениеводства.
5. Выделенные перспективные штаммы способны активно заселять ризосферу и ризоплану сельскохозяйственных культур. Установлено, что интродуцируемые штаммы заселяют поверхность корня, располагаясь в виде микроколоний или биопленок, плотно залегая в стыки клеток эпидермиса, направленных вдоль продольной оси, при этом их численность сопоставима с численностью контрольного штамма-продуцента микробиологического препарата, составляя 10^6 - 10^7 КОЕ на 1 мм длины корня.
6. Выделенные перспективные штаммы показывают эффективность в вегетационных (ростстимулирующая активность – 20-50%, биоконтрольная до 40%) и полевых

экспериментах (обеспечивая прибавку урожайности с применением штаммов *Flavobacterium sp.* RM14A – до 30%, *Pseudomonas brenneri* RM14B – до 30%, *P. asplenii* – до 43%).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамочкина Ф.Н., Безрукова Л.В., Кошелев А.В., Гальченко В.Ф., Иванов М.В. Микробиологическое окисление метана в пресноводных водоемах // Микробиология. – 1987. – №56. – С.464–471.
2. Безрукова Л.В., Николенко Ю.И., Нестеров А.И., Гальченко В.Ф., Иванов М.В. Сравнительный серологический анализ метанотрофных бактерий // Микробиология. – 1983. – №52. – С.800–805.
3. Петров В.Б., Чеботарь В.К. Управление деструкцией и гумификацией пожнивных остатков зерновых культур с использованием микробиологического препарата экстрасол // Сельскохозяйственная биология. – 2012. – № 3. – С.103–108.
4. Военно–полевая хирургия: учебник / под. ред. проф. Е.К. Гуманенко. – СПб., 2004. – 464 с.
5. Гальченко В.Ф., Абрамочкина Ф.Н., Безрукова Л.В., Соколова Е.Н., Иванов М.В. Видовой состав аэробной метанотрофной микрофлоры Черного моря // Микробиология. – 1988. – №57. – С.305–311.
6. Городкова А. А. О влиянии сфагна на аэробную флору гнойных ран: автореф. дис. ... канд. мед. наук. / А.А.Городкова. – Л., 1949. – 9 с.
7. Заварзин Г.А. О положении России в глобальной системе биосферы. Особенности биологического цикла метана на территории России. Биосферные перестройки и кризисы. В кн.: Воздействие глобальных изменений на биосферу / Под ред. Лаверова Н.П. – М.: АЛКОР, 1995. – 60 с.
8. Заварзин Г.А., Васильева Л.В. Цикл метана на территории России. В сб. Круговорот углерода на территории России. Глобальные изменения природной среды и климата / Под ред. Г.А. Заварзина. – М., 1999. – С.202–230.
9. Зенова Г.М., Степанов А.Л., Лихачев А.А., Манучарова Н.А. Практикум по биологии почв / М.: МГУ, 2002. – 120 с.
10. И.А. Тихонович, А.П. Кожемяков, В.К. Чеботарь, Ю.В. Круглов, Н.В. Кандыбин, Г.Ю. Лаптев. Биопрепараты в сельском хозяйстве. Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве / СПб.: ГНУ ВНИИСХМ, 2005. – 154 с.
11. И.В.Русакова, Н.И.Воробьев. Способ эффективного использования соломы в качестве удобрения с применением биопрепарата Баркон / Владимир: ГНУ ВНИИОУ Россельхозакадемии, 2010. – 38 с.
12. Качалкин А.В. Дрожжевые сообщества сфагновых мхов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. / А.В.Качалкин. – М., 2007. – 24 с.
13. Кравченко Л.В., Макарова Н.М., Азарова Т.С., Проваров Н.А., Тихонович И.А. Выделение и фенотипическая характеристика стимулирующих ризобактерий (PGPR) сочетающих высокую активность колонизации корней и ингибирования фитопатогенных грибов // Микробиология. – 2002. – Т.71. – №4. – С.521–525.
14. Котляров В.В. Бактериальные болезни культурных растений: учебное пособие / В. В. Котляров. – Краснодар: КубГАУ, 2008. – 324 с.
15. Воробьев Н.И., Свиридова О.В., Попов А.А., Русакова И.В., Петров В.Б. Граф– анализ генно– метаболических сетей микроорганизмов, трансформирующих растительные

- остатки в гумусовые вещества // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – №3. – С.88–93.
16. Паников Н.С., Сизова М.В., Зеленев В.В., Махов Г.А., Наумов А.В., Гаджиев И.М. Эмиссия CH_4 и CO_2 из болот юга Западной Сибири: пространственное и временное варьирование потоков // Экологическая химия. – 1995. – Т.4. – №1. – С.13–24.
 17. Панкратов Т.А. Бактериальные сообщества сфагновых болот и их участие в деструкции природных полимеров: автореф. дис. ... канд. биол. наук. / Т.А.Панкратов. – М., 2007. – 26 с.
 18. Румянцева М. Л., Симаров Б. В., Онищук О. П., Андронов Е. Е., Чижевская Е. П., Белова В. С., Курчак О. Н., Мунтян А. Н., Румянцева Т. Б., Затовская Т. В. Биологическое разнообразие клубеньковых бактерий в экостемах и агроценозах. Теоретические основы и методы / СПб.: ВНИИСХМ., 2011. – 104 с.
 19. Савич– Любичкая Л. И., Смирнова З. Н. Определитель сфагновых мхов СССР / Ленинград, 1968. – 112 с.
 20. Савич– Любичкая С. И. Применение сфагнового (торфяного) мха в медицине // Природа. – 1943. – №4. – С.41–50.
 21. 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.
 22. Чеботарь В.К., Завалин А.А., Кипрушкина Е.И. Эффективность применения биопрепарата экстрасол / М.: ВНИИА, 2007. – 216 С.
 23. Шенин Ю.Д., Кругликова Л.Ф., Васюк Л.Ф., Кожемяков А.П., Чеботарь В.К., Попова Т.А. Новый метаболит с фунгистатической и бактериостатической активностью, продуцируемый штаммом Л– 30 *Flavobacterium sp.* // Антибиотики и химиотерапия. – 1996. – Т.41. – №5. – С.6– 12.
 24. 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.
 25. Abriouel H., Franz C.M., Ben Omar N., Gálvez A. Diversity and applications of Bacillus bacteriocins // FEMS Microbiol. Rev. – 2011. – No.35. – P.201–232.
 26. Ahanthem S., Jha D.K. Response of rice crop inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria to different soil nitrogen concentrations // Mycorrhiza News. – 2007. – V.18. – No.4. – P.15–20.
 27. Ahemad M, Khan MS. Phosphate– solubilizing and plant– growth– promoting *Pseudomonas aeruginosa* PS1 improves greengram performance in quizalafop– p– ethyl and clodinafop amended soil // Arch Environ Contam Toxicol. – 2010. – V.58. – No.2. – P.361–72.
 28. Ahmad F., Ahmad I., Khan M.S. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan // Turk. J. Biol. – 2005. – No.29. – P.29–34.

29. Alexander V., Billington M., Schell D. The influence of abiotic factors on nitrogen fixation rates in the Barrow, Alaska, arctic tundra, Rep. Kevo // Subarct. Res. Sta. – 1974. – No.11. – P.3–11.
30. Alfnito S., Fumanti B., Cavacini P. Epiphytic algae on mosses from North Victoria Land (Antarctica) // Nova Hedwigia. – 1998. – No.66. – P.473–480.
31. Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A. Combination of 16S rRNA– targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations // Applied and Environmental Microbiology. – 1990. – V.56. P.1919–1925.
32. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // Microbiol. Rev. – 1995. – No.59. – P.143–169.
33. Amaral J.A., Knowles R. Growth of methanotrophs in oxygen and methane counter gradients // FEMS Microbiol. Lett. – 1995. – No.126. – P.215–220.
34. Anderson D., Lidstrom M.E. Themox FG region encodes four polypeptides in the methanol– oxidizing bacterium *Methylobacterium* sp. strain AM1 // J. Bacteriol. – 1988. – No.170. – P.2254–2262.
35. Andrews S.C., Robinson A.K., Rodríguez– Quiñones F. Bacterial iron homeostasis // FEMS Microbiol. Rev. – 2003. – No.27. – P.215–237.
36. Anthony C. The biochemistry of methylotrophs / London: Academic Press Ltd., 1982. – 350 p.
37. Anthony C. Assimilation of carbon in methylotrophs, In: Biology of methylotrophs. / Goldberg I., Rokem J.S. (ed.). – Butterworth– Heinemann, Stoneham, Mass., 1991. – P.79–109.
38. Ausec L., Kraigher B., Mandic– Mulec I. Differences in the activity and bacterial community structure of drained grassland and forest peat soil // Soil Biol. Biochem. – 2009. – No.41. – P.1874–1881.
39. Baker B.J., Tyson G.W., Webb R.I., Flanagan J., Hugenholtz P., Allen E.E., Banfield J.F. Lineages of acidophilic archaea revealed by community genomic analysis // Science. – 2006. No.314. P.1933–1935.
40. Baldani V., Baldani J. and Dobereiner J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. // Biol. Fertil. Soil. – 2000. – No.30. – P.485–491.
41. Banik S., Dey B.K. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate solubilizing microorganisms // Plant Soil. – 1982. – No.69. – P.353–364.
42. Banning N., Brock F., Fry J.C., Parkes R.J., Hornibrook E.R., Weightman A.J. Investigation of the methanogen population structure and activity in a brackish lake sediment // Environ. Microbiol. – 2005. – No.7. – P.947–960.
43. Baptiste E., Brochier C., Boucher Y. Higher– level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens // Archaea. – 2005. – No.1. P.353– 363.
44. Barr B.K., Hsieh Y– L., Ganem B., Wilson D.B. Identification of two functionally different classes of exocellulases // Biochemistry. – 1996. – No.35. – P.586–592.
45. Barriuso J., Ramos Solano B., Manñero Gutie´rrez F.J. Protection against pathogen and salt stress by four plant growth– promoting rhizobacteria isolated from *Pinus* spp. on *Arabidopsis thaliana* // Phytopathol. – 2008. – No.98. – P.666–672.

46. Baset Mia M.A., Shamsuddin Z.H., Wahab Z., Marziah M. Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue– cultured musa plantlets under nitrogen– free hydroponics condition // *Aust. J. Crop. Sci.* – 2010. – V.4. – No.2. – P.85–90.
47. Basilier K., Granhall U., Stenström T. Nitrogen fixation in wet minerotrophic moss communities of a subarctic mire // *Oikos.* – 1978. – No. 31. – P.236–246.
48. Basilier, K. Moss– associated nitrogen fixation in some mire and coniferous forest environments around Uppsala, Sweden // *Lindbergia.* – 1979. – No.5. – P.84– 88.
49. Bazely D.R., Jefferies R.L. Lesser snow geese and the nitrogen economy of a grazed salt march // *J. Ecol.* – 1989. – No.77. – P.24–34.
50. Beattie G.A. Plant– associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: *Plant– Associated Bacteria / Gnanama– Nickam S.S. (ed).* – Dordrecht: Springer, 2006. – P.1– 56.
51. Beckers G.J.M., Conrath U. Priming for stress resistance: from the lab to the field // *Current Opin. Plant. Biol.* – 2007. – No.10. – P.425–431.
52. Belova S.E., Pankratov T.A., Dedysh S.N. Bacteria of the genus *Burkholderia* as a typical component of the microbial community of *Sphagnum* peat bogs // *Microbiology.* – 2006. – No.75. – P.90–96.
53. Belova S.E., Pankratov T.A., Detkova E.N., Kaparullina E.N., Dedysh S.N. *Acidisoma tundrae* gen. nov. , s p. nov. and *Acidisoma sibiricum* sp. nov., two novel acidophilic and psychrotolerant members of the Alphaproteobacteria from acidic northern wetlands // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2009. – No.59. – P.2383–2290.
54. Bent E. Induced systemic resistance mediated by plant growth– promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). In: *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants / Tuzun S and Bent E (eds).* – New York: Springer Science, 2006. – P.225–259.
55. Berg G., Eberl L., Hartmann A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria // *Environ Microbiol.* – 2005. – Vol.7. – No.11. – P.1673–1685.
56. Bevivino A. Characterization of a free– living maize rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1998. – Vol.27. – No.3. – P.225–237.
57. Bhat M.K., Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications // *Biotechnol. Adv.* – 1997 – No.15. – P.583– 620.
58. Black M., Bewley J.D. *Seed technology and its biological basis /* Sheffield: Sheffield Academic Press, 2000. – 428p.
59. Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria // *Curr. Opin. Plant. Biol.* – 2001. – No.4. – P.343–350.
60. Blumer– Schuette S.E., Lewis D.L., Kelly R.M. Phylogenetic, microbiological, and glycoside hydrolase diversities within the extremely thermophilic, plant biomass– degrading genus *Caldicellulosiruptor* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – No.76. – P.8084–8092.
61. Bodrossy L., Holmes E., Holmes A., Kovaks K., Murrell J. Analysis of 16S rRNA and methane monooxygenase gene sequences reveals a novel group of thermotolerant and thermophilic methanotrophs, *Methylocaldum* gen. nov. // *Arch. Microbiol.* – 1997. – No.168. – P.493–503.

62. Boiero L., Perrig D., Masciarelli O., Penna C., Cassan F., Luna V. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – No.74. – P.874–880.
63. Boone D.R., Castenholz R.W. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / 2nd edn. New York: Springer-Verlag, 2001. – 721 p.
64. Borga, P., Nilsson, M., Tunlid, A., Bacterial communities in peat in relation to botanical composition as revealed by phospholipid fatty- acid analysis // *Soil Biology & Biochemistry.* – 1994. – No.26. – P.841–848.
65. Boukhalfa H., Crumbliss A.L. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport // *BioMetals.* – 2002. – No.15. – P.325–339.
66. Bowman J.P., McCammon S., Skerratt J. *Methylosphaera hansonii* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, group I methanotroph from Antarctic marine- salinity, meromictic lakes // *Microbiology.* – 1997. – Vol. 143. – Pt.4. – P.1451–1459.
67. Bowman J.P., Sly L.I., Stackebrandt E. The phylogenetic position of the family *Methylococcaceae* // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1995. – No.45. – P.182–185.
68. Bowman J.P., Sly L.I., Nichols P.D., Hayward A.C. Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1993. – No.43. – P.735–753.
69. 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. – Vol.6. – No.4. – P.802–813.
70. Bratina B.J., Brusseau G.A., Hanson R.S. Use of 16S rRNA analysis to investigate phylogeny of methylophilic bacteria // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1992. – No.42. – P.645–648.
71. Brauer S.L., Cadillo- Quiroz H., Yashiro E., Yavitt J.B., Zinder S.H. Isolation of a novel acidiphilic methanogen from an acidic peat bog // *Nature.* – 2006. – No.442. – P.192– 194.
72. Broady P.A. Wind dispersal of terrestrial algae at Signy Island, South Orkney Islands // *Br. Antarct. Surv. Bull.* – 1979. – No.48. – P.99–102.
73. Broady P.A. A floristic survey of algae at four locations in Northern Victoria Land, N. Z. // *Antarct. Rec.* – 1987. – No.7. – P.8–19.
74. Brusseau G.A., Bulygina E., Hanson R. S. Phylogenetic analysis and development of probes for differentiating methylophilic bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – No.60. – P.626–636.
75. Buch A., Archana G., Naresh Kumar G. Heterologous expression of phosphoenolpyruvate carboxylase enhances the phosphate solubilizing ability of fluorescent pseudomonads by altering the glucose catabolism to improve biomass yield // *Bioresour Technol.* – 2010. – Vol.101. – No.2. – P.679–687.
76. Busato J.G., Lima L.S., Aguiar N.O., Canellas L.P., Olivares F.L. Changes in labile phosphorus forms during maturation of vermicompost enriched with phosphorus- solubilizing and diazotrophic bacteria // *Bioresour Technol.* – 2012. – No.110. – P.390–395.
77. Butler E.J. The occurrences and systematic position of the vesicular- arbuscular type of mycorrhizal fungi // *Trans. Br. Mycol. Soc.* – 1939. – No.22. – P.274–301.
78. Cadillo- Quiroz H., Bräuer S.L., Yashiro E., Sun C., Yavitt J.B., Zinder S.H. Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State, USA // *Environ Microbiol.* – 2006. – No. 8. – P.1428–1440.

79. Cadillo–Quiroz H., Yashiro E., Yavitt J.B., Zinder S.H. Archaeal community in a minerotrophic fen and T– RFLP– directed isolation of a novel hydrogenotrophic methanogen // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – No.74. – P.2059–2068.
80. Cadillo–Quiroz H., Yavitt J.B., Zinder S.H. *Methanosphaerula palustris* gen. nov., sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from a minerotrophic fen peat– land // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2009. – No.59. – P.928–935.
81. Cai T.M., Chen L.W., Wu S.Z., Qian L.H., Ren Q. Selection of denitrifying phosphorus– removing bacteria and its characteristic // *Huan Jing Ke Xue.* – 2010. – Vol.31. – No.10. – P.2487–2492.
82. Cascales E., Buchanan S.K., Duché D., Kleantous C., Llobès R., Postle K., Riley M., Slatin S., Cavard D. Colicin Biology // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2007. – No.71. – P.158–229.
83. Cavanaugh C. M. Methanotroph– invertebrate symbioses in the marine environment: ultrastructural, biochemical and molecular studies. In: *Microbial growth on C1 compounds / Murrell J.C., Kelley D.P. (ed.).* – Andover: Intercept Press, Ltd., 1993. – P.315–328.
84. Chaban B., Ng S.Y.M., Jarrell K.F. Archaeal habitats – from the extreme to the ordinary // *Can. J. Microbiol.* – 2006. – No.52. – P.73–116.
85. Chabot R., Antoun H., Cescas M.P. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique // *Can. J. Microbiol.* – 1993. – No.39. – P.941–947.
86. Chabot R., Antoun H., Kloepper J.W., Beauchamp C.J. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – No.62. – P.2767–2772.
87. Chapin D.M., Bledsoe C.S. Nitrogen fixation in arctic plant communities. In: *Arctic Ecosystems in a Changing Climate / Chapin F.S., Jefferies R.L., Reynolds J.F., Shaver G.R., Svoboda J. (eds.).* – San Diego: Academic Press Inc., 1992. – P.301–319.
88. Chebotar' V.K., Makarova N.M., Shaposhnikov A.I., Kravchenko L.V. Antifungal and phytostimulating characteristics of *Bacillus subtilis* Ch– 13 rhizospheric strain, producer of biopreparations // *Applied Biochemistry and Microbiology.* – 2009. – Vol. 45. – No. 4. – P.419–423.
89. Chen S., Wilson D.B. Proteomic and transcriptomic analysis of extracellular proteins and mRNA levels in *Thermobifida fusca* grown on cellobiose and glucose // *J. Bacteriol.* – 2007. – No.189. – P.6260–6265.
90. Chew K. *Georgics / Indianapolis: Hackett Publishing Company, 2002. – 152 p.*
91. Chin– A– Woeng TF, Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria // *New Phytol.* – 2003. – No.157. – P.503– 523.
92. Chistoserdova L., Vorholt J.A., Thauer R.K., Lidstrom M.E. C1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic Archaea // *Science.* – 1998. – No.281. – P.99–102.
93. Choudhary D.K., Johri B.N., Prakash A. Volatiles as priming agent that initiate plant growth and defense responses // *Curr. Sci.* – 2008. – No.94. – P.595–604.
94. Choudhary D.K., Prakash A., Johri B.N. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action // *Indian J. Microbiol.* – 2007. – No.47. – P.289–297.
95. Clymo R.S. The limits to peat bog growth // *Phil. Trans. R. Soc. Bull.* – 1984. – No.303. – P.605–654.

96. Compant S., Duffy B., Nowak J. Use of PGPB for biological control of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol.71. – No.9. – P.4951–4959.
97. Compant S., Duffy B., Nowak J. et al. Use of PGPB for biological control of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol.71. – No.9. – P.4951–4959.
98. Conn V.M., Walker A.R., Franco C.M.M. Endophytic Actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Plant. Microbe. Inter.* – 2008. – No.21. – P.208–218.
99. Conrath U., Beckers G.J.M., Flors V., Garcia– Agustin P., Jakab G., Mauch F., Newman M.A., Pieterse C.M.J., Poinssot B., Pozo M.J., Pugin A., Schaffrath U. Priming: Getting ready for battle // *Mol. Plant. Microbe. Inter.* – 2006. – No.19. – P.1062–1071.
100. Cook R.J. Advances in plant health management in the twentieth century // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2002. – No.38. P.95–116.
101. Crosa J.H., Walsh C.T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2002. – No.66. – P.223– 249.
102. Crowley D.E. Microbial siderophores in the plant rhizosphere. In: *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms* / Barton L.L., Abadía J., (eds.). – Dordrecht: Springer, 2006. – P.169–198.
103. Dagley S. Determinants of biodegradability // *Q. Rev. Biophys.* – 1978. – No.11. – P.577–602
104. Daims H., Bruhl A., Amann R., Schleifer K.H., Wagner M. The domain– specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set // *Syst. appl. microbiol.* – 1999. – Vol.22. – P.434–444.
105. Daniels R.E., Eddy A. *Handbook of european Sphagna*. Aberystwyth: Institute of Terrestrial Ecology, 1985. – 257 p.
106. Datta M., Banish S., Gupta R.K. Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland // *Plant Soil.* – 1982. – No.69. – P.365–373.
107. de Bruijn I., de Kock M.J.D., Yang M., de Waard P., van Beek T.A., Raaijmakers J.M. Genome– based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species // *Mol. Microbiol.* – 2007. – No.63. – P.417–428.
108. de Souza J.T., Arnould C., Deulvot C., Lemanceau P., Gianinaz– zi– Pearson V., Raaijmakers J.M. Effect of 2,4– dia– cetylphloroglucinol on *Pythium*: Cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species // *Phytopathology.* – 2003. – No.93. – P.966–975.
109. Dedysh S.N., Panikov N.S., Tiedje J.M. Acidophilic methanotrophic communities from Sphagnum peat bogs // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – No.64. – P.922–929.
110. Dedysh S.N. Cultivating uncultured bacteria from northern wetlands: knowledge gained and remaining gaps // *Frontiers in Microbiology.* 2. – 2011. – No.184. – P.1–15.
111. Dedysh S.N. Exploring methanotroph diversity in acidic northern wetlands: molecular and cultivation– based studies // *Microbiology.* – 2009. – No.78. – P.655–669.
112. Dedysh S.N., Derakshani M., Liesack W. Detection and enumeration of methanotrophs in acidic Sphagnum peat by 16S rRNA fluorescence in situ hybridization, including the use of newly developed oligonucleotide probes for *Methylo– cella palustris* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – No.67. – P.4850–4857.
113. Dedysh S.N., Liesack W., Khmelenina V.N., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Semrau J.D., Bares A.M., Panikov N.S., Tiedje J.M. *Methylo– cella palustris* gen. nov., sp. nov., a new

- methane- oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs representing a novel subtype of serine pathway methanotrophs // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2000. – No.50. – P.955–969.
114. Dedysh S.N., Panikov N.S., Liesack W., Großkopf R., Zhou J., Tiedje J.M. Isolation of acidophilic methane- oxidizing bacteria from northern peat wetlands // *Science.* – 1998. – No. 282. – P.281–284.
 115. Dedysh S.N., Pankratov T.A., Belova S.E., Kulichevskaya I.S., Liesack W. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria community composition in an acidic Sphagnum peat bog // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – No.72. – P.2110–2117.
 116. DeLong E.F., Pace N.R. Environmental diversity of Bacteria and Archaea // *Syst. Biol.* – 2001. – No.50. – P.470–478.
 117. Deppenmeier U. The unique biochemistry of methanogenesis // *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* – 2002. – No.71. – P.223–283.
 118. Dickson L.G. Constraints tonitrogen fixation by cryptogamic crusts in a polar desert ecosystem, Devon Island, N.W.T. // *Canada Arc. Antarc. Alp. Res.* – 2000. – No.32. – P.40–45.
 119. Dijkhuizen L., Levering P.R., de Vries G. E. The physiology and biochemistry of aerobic methanol- utilizing gram- negative and grampositive bacteria. In: *Methane and methanol oxidizers* / Murrell J. C., Dalton H.(ed.). – New York: Plenum Press, 1992. – P.149–181.
 120. Din N., Gilkes R.N., Tekant B., Miller R.C. Jr., Warren R.A.J., Kilburn D.G. Non- hydrolytic disruption of cellulose fibers by the binding domain of a bacterial cellulose // *BioTechnology.* – 1991. – No.9. – P.1096–1099.
 121. Ding S.Y., Xu Q., Crowley M., Zeng Y., Nimlos M., Lamed R., Bayer E.A., Himmel M. A biophysical perspective on the cellulosome: newopportunities for biomass conversion // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2008. – No.19. – P.218–227.
 122. Distel D.L., Cavanaugh C.M. Independent phylogenetic origins of methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbionts in marine bivalves // *J. Bacteriol.* – 1994. – No.176. – P.1932–1938.
 123. Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Ptacek D. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum* // *Aust. J. Plant. Physiol.* – 2001. – No.28. – P.871–879.
 124. Dodds W.K., Gudder D.A., Mollenhauer D. The ecology of *Nostoc* // *J. Phycol.* – 1995. – No.31. – P.2–18.
 125. Doi R.H., Tamaru Y. The *Clostridium cellulovorans* cellulosome: an enzyme complex with plant cell wall degrading activity // *Chem. Rec.* – 2001. – No.1. – P.24–32.
 126. Domenech J., Ramos S.B., Probanza A., Lucas G.J.A., Gutierrez M.F.J. Elicitation of systemic resistance and growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by PGPRs from *Nicotiana glauca*: a study of the putative induction path-way // *Plant Soil.* – 2007. – No.290. – P.43–50.
 127. Dong Z., McCully M.E., Canny M.J. Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data // *Ann. Bot.* – 1997. – No.80. – P.147–158.
 128. Dowding E.S. Ecology of *Endogone* // *Trans. Br. Mycol. Soc.* – 1959. – No.42. – P.449–457.
 129. Dror T.W., Rolider A., Bayer E.A., Lamed R., Shoham Y. Regulation of major cellulosomal endoglucanases of *Clostridium thermocellum* differs from that of a prominent cellulosomal xylanase // *J. Bacteriol.* – 2005. – No.187. – P.2261– 2266.

130. Dwivedi D., Johri B.N. Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation // *Curr. Sci.* – 2003. – No.12. – P.1693–1703.
131. Erturk Y., Ercisli S., Haznedar A., Cakmakci R. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings // *Biol. Res.* – 2010. – No.43. – P.91–98.
132. Esitken A., Karlidag H., Ercisli S., Turan M., Sahin F. The effect of spraying a growth promoting bacterium on the yield, growth and nutrient element composition of leaves of apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacıhaliloglu) // *Aust. J. Agric. Res.* – 2003. – Vol.54. – No.4. – P.377–380.
133. Fernández H.M., Carpena A.O., Cadakia L.C. Evaluacion de la solubilizacion del fósforo mineral en suelos calizos por *Bacillus cereus*. Ensayos de invernadero // *Anal. Edaf. Agrobiol.* – 1984. – No.43. – P.235–245.
134. Fields M.W., Mallik S., Russell J.B. *Fibrobacter succinogenes* S85 ferments ball-milled cellulose as fast as cellobiose until cellulose surface area is limiting // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – No.54. – P.570–574.
135. Fisher C.R., Brooks J.M., Vodenichar J.S., Zande J.M., Childress J.J., Burke R.A. The cooccurrence of methanotrophic and chemo-autotrophic sulfur-oxidizing bacterial symbionts in a deep-sea mussel // *Mar. Ecol.* – 1993. – No.114. – P.277–289
136. Fisk, M., Ruether, K., Yavitt, J. Microbial activity and functional composition among northern peatland ecosystems // *Soil Biology & Biochemistry.* – 2003. – No.35. – P.591–602.
137. Forney L.J., Zhou X., Brown C.J. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2004. – No.7. – P.210–220.
138. Franzmann P.D., Liu Y., Balkwill D.L., Aldrich H.C., Conway de Macario E., Boone D.R. *Methanogenium frigidum* sp. nov., a psychrophilic, H₂-using methanogen from Ace Lake, Antarctica // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1997. – No.47. – P.1068–1072.
139. Fumanti B., Cavacini P., Alfinito S. Benthic algae mats of some lakes of Inexpressible Island (Northern Victoria Land, Antarctica) // *Polar Biol.* – 1997. – 7. – P.97–113.
140. Galand P.E., Fritze H., Yrjälä K. Microsite-dependent changes in methanogenic populations in a boreal oligotrophic fen // *Environ. Microbiol.* – 2003. – No.5. – P.1133–1143.
141. Galand P.E., Saarnio S., Fritze H., Yrjälä K. Depth related diversity of methanogen Archaea in Finnish oligotrophic fen // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2002. – No.42. – P.441–449.
142. Garcia J.L., Patel B.K.C., Ollivier B. Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic Archaea // *Anaerobe.* – 2000. – No.6. – P.205–226.
143. Gaur A.C., Ostwal K.P. Influence of phosphate dissolving Bacilli on yield and phosphate uptake of wheat crop // *Indian J. Exp. Biol.* – 1972. – No.10. – P.393–394.
144. Gaur A.C., Ostwal K.P. Influence of phosphate dissolving Bacilli on yield and phosphate uptake of wheat crop // *Indian J. Exp. Biol.* – 1972. – No.10. – P.393–394.
145. Gentili F., Nilsson M.C., Zackrisson O., DeLuca T.H., Sellstedt A. Physiological and molecular diversity of feather moss associative N₂ fixing cyanobacteria // *Journal of Experimental Botany.* – 2005. – No.56. – P.3121–3127.
146. Gerdemann J.W. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 1968. – No.6. – P.397–481.
147. Glick B.R., Cheng Z., Czarny J., Duan J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria // *Eur. J. Plant. Pathol.* – 2007. – No.119. – P.329–339.

148. Goldstein A.H., Rogers R.D. Biomediated continuous release phosphate fertilizer / US Patent No.5912398. – 1999.
149. Golovchenko A.V., Sannikova Y.V., Dobrovolskaya T.G., Zvyagintsev D.G. The saprotrophic bacterial complex in the raised peat bogsof western Siberia // *Microbiology*. – 2005. – No.74. – P.545–551.
150. Gordon S.A., Weber R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid // *Plant Physiol.* – 1951. – No.26. – P.192–195.
151. Graner G., Persson P., Meijer J., Alstrom S. A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum* // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2003. – Vol. 224. – P.269–276.
152. Granhall U., Hofsten A. Nitrogenase activity in relation to intracellular organisms in *Sphagnum* mosses // *Physiol. Plant.* – 1976. – No.36. – P.88–94.
153. Granhall U., Lindberg T. Nitrogen fixation in some coniferous forest ecosystems // *Ecol. Bull.* – 1978. – No.26. – P.178–192.
154. Granhall U., Selander H. Nitrogen fixation in a subarctic mire // *Oikos*. – 1973. – No.24. – P.8–15.
155. Gray N.D., Head I.M. Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacteria // *Environ. Microbiol.* – 2001. – No.3. – P.481–492.
156. Green P.N. Taxonomy of methylotrophic bacteria. In: *Microbial growth on C1 compounds* / Murrell C., Kelley D.P.(ed.). – Andover, United Kingdom: Intercept Press Ltd., 1992. – P.23–84.
157. Gribaldo S., Brochier–Armanet C. The origin and evolution of Archaea: a state of the art // *Phil. Trans. R. Soc. B.* – 2006. – No.361. – P.1007–1022.
158. Griffiths B.S., Ritz K., Ebbelwhite N., Dobson G. Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates // *Soil. Biol. Biochem.* – 1999. – No.31.– P.145–153.
159. Grosskopf R., Stubner S., Liesack W. Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – No.64. – P.4983–4989.
160. Haas D., Défago G. Biological control of soil–borne pathogens by fluorescent pseudomonads // *Nat. Rev. Micro.* – 2005. –No.3. – P.307–319.
161. Hales B.A., Edwards C., Ritchie D.A., Hall G., Pickup R.W., Saunders J.R. Isolation and identification of methanogen– specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – No.62. – P.668–675.
162. Hallam S.J., Girguis P.R., Preston C.M., Richardson P.M., DeLong E.F. Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane–oxidizing archaea // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – No.69. – P.5483–5491.
163. Hameeda B., Reddy Y.H., Rupela O.P., Kumar G.N., Reddy G. Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from composts and macrofauna // *Curr. Microbiol.* – 2006. – Vol.53. – No.4. – P.298–302.
164. Han J., Sun L., Dong X., Cai Z., Sun X., Yang H., Wang Y., Song W. Characterization of a novel plant growth–promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2005. – Vol.28. – No.1. – P.66–76.

165. Hansgate A.M., Schloss P.D., Hay A.G., Walker L.P. Molecular characterization of fungal community dynamics in the initial stages of composting // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2005. – No.51. – P.209–214.
166. Hanson R., Hanson T. Methanotrophic bacteria // *Microbiological reviews.* – 1996. – P. 439–471.
167. Hanson R.S., Netrusov A. I., Tsuji K. The obligate methanotrophic bacteria *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylosinus* and related bacteria. In: *The prokaryotes* / Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H.(ed.). – New York: Springer-Verlag, 1991. – P.2350–2365.
168. Hanson R.S. Introduction. In: *Methane and methanol utilizers* / Murrell J. C., Dalton H. (ed.). – New York: Plenum Press, 1992. – P.1–22.
169. Harley J.L. *The biology of mycorrhiza* / London: Leonard Hill, 1969. – 233 p.
170. Harris P.V., Welner D., McFarland K.C., Re E., Navarro Poulsen J.C., Brown K., Salbo R., Ding H., Vlasenko E., Merino S. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family // *Biochemistry.* – 2010. – No.49. – P.3305–3316.
171. Hartman W.H., Richardson C.J., Vigalys R., Bruland G.L. Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2008. – No.105. – P.17842–17847.
172. Head I.M., Saunders J.R., Pickup R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms // *Microb. Ecol.* – 1998. – No.35. – P.1–21.
173. Heil M., Ton J. Long– distance signalling in plant defense // *Trends Plant Sci.* – 2008. – No.13 – P.264–272.
174. Hellriegel H., Wilfarth H. Untersuchungen über die Stickstoff–nahrung der Gramineen und Leguminosen / Beilageheft zu der Zeitschrift des Vereins für Rubenzucker– Industrie Deutschen Reichs, 1888. – 234 p.
175. Henry G.H.R., Svoboda J. Dinitrogen fixation (acetylene reduction) in High Arctic sedge meadow communities // *Arct. Alp. Res.* – 1986. – No.18. – P.181–187.
176. Hesham A.L., Mohamed H. Molecular genetic identification of yeast strains isolated from Egyptian soils for solubilization of inorganic phosphates and growth promotion of corn plants // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol.21. – No.1. – P.55–61.
177. Heyer J. Results of enrichment experiments of methane– assimilating organisms from an ecological point of view, In: *Microbial growth on C1 compounds* / Skryabin G.A., Ivanov M.B., Kondratjeva E.N., Zavarzin G.A., Trostsenko Y.A., Netrosev A.I.(ed.). – U.S.S.R.: Academy of Sciences, 1977. – P.19–21.
178. Hill D.S., Stein J.I., Torkewitz N.R., Morse A.M., Howell C.R., Pachlatko J.P., Becker J.O., Ligon J.M. Cloning of genes involved in the synthesis of pyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and role of pyrrolnitrin synthesis in biological control of plant disease // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – No.60. – P.78–85.
179. Hoj L., Olsen R.A., Torsvik V.L. Effects of temperature on the diversity and community structure of known methanogenic groups and other archaea in high Arctic peat // *ISME J.* – 2008. – No.2. – P.37–48.
180. Holliday P. *A dictionary of plant pathology* / Cambridge: Cambridge University Press, 1989. – 369 p.

181. Hori T., Haruta S., Ueno Y., Ishii M., Igarashi Y. Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – No.72. – P.1623– 1630.
182. Hovland M., Judd A.G. Seabed pockmarks and seepages. Impact on geology, biology and the marine environment / London: Graham & Trotman, 1988. – 293 pp.
183. Hugenholtz P., Goebel B.M., Pace N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity // *J. Bacteriol.* – 1998. – No.180. – P.67–93
184. Ignatov M.S., Afonina O.M., Ignatova E.A. et al. Check-list of mosses of East Europe and North Asia // *Arctoa.* – 2006. – Vol.15. – P.1–130.
185. Imhoff J.F. Transfer of *Rhodopseudomonas acidophila* to the new genus *Rhodoblastus* as *Rhodoblastus acidophilus* gen. nov., comb. nov. // *Int. J. S. st. Evol. Microbiol.* – 2001. – No.51. – P.1863–1866.
186. Irwin D.C., Spezio M., Walker L.P., Wilson D.B. Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects // *Biotechnol. Bioeng.* – 1993. – No.42. – P.1002– 1013.
187. James E.K., Olivares F.L., de Oliveira A.L.M., dos Reis F.B, da Silva L.G., Reis V.M. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions // *J. Exp. Bot.* – 2001. – No. 52. – P.747–760.
188. Jordan D.C., McNicol P.J., Marshall M.R. Biological nitrogen fixation in the terrestrial environment of a high Arctic ecosystem (Truelove Lowland, Devon Island, N.W.T.) // *Can. J. Microbiol.* – 1978. – No.24. – P.643– 649.
189. Juottonen H. Archaea, bacteria, and methane production along environmental gradients in fens and bogs / *Academic Dissertation in General Microbiology.* – Helsinki, 2008. – 48 pp.
190. Juottonen H., Galand P., Tuittila E.S., Laine J., Fritze H., Yrjälä K. Methanogen communities and bacteria along an ecohydrological gradient in a northern raised bog // *Environ. Microbiol.* – 2005. – No.7. P.1547–1557.
191. Kachalkin A.V., Glushakova A.M., Yurkov A.M., Chernov I.Yu. Characterization of yeast groupings in the phyllosphere of Sphagnum mosses // *Microbiology.* – 2008. – Vol. 77. – No.4. – P.474–481.
192. Kamilova F., Validov S., Azarova T., Mulders I., Lugtenberg B. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria // *Environ. Microbiol.* – 2005. – No.7. – P.1809–1817.
193. Kandler O., König H. Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria) // *Cell Mol. Life Sci.* – 1998. – No.54. – P.305–308.
194. Kanokratana P., Uengwetwanit T., Rattanachomsri U., Bunternngsook B., Nimchua T., Tangphatsornruang S., Plengvidhya V., Champreda V., Eurwilaichitr L. Insights into the phylogeny and metabolic potential of a primary tropical peat swamp forest microbial community by metagenomic analysis // *Microb. Ecol.* – 2011. – No.61. – P. 518–528.
195. Karlidag H., Esitken A., Turan M., Sahin F. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple // *Sci. Hort.* – 2007. – Vol.114. – No.1. – P.16–20.

196. Kasana R., Salwan R., Dhar H., Dutt S., Gulati A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. // *Current microbiology*. – 2008. – Vol. 57. – No.5. – P.503–507.
197. Kazda J. *Mycobacterium sphagni* sp. nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1980. – No.30. – P.77–81.
198. Kazda J., Müller K. *Mycobacterium komossense* sp. nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1979. – No.29. – P.361–365.
199. Kelley A.P. *Mycotrophy in plants* / Waltham, MA: Chronica Botanica, 1950. – 223 pp.
200. Khalid A., Arshad M., Zahir Z.A. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat // *J. Appl. Microbiol.* – 2004. – Vol. 96. – No.3. – P.473–480.
201. Khan M.S., Zaidi A., Wani P.A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review // *Agron. Sustain. Develop.* – 2007. – No.27. – P.29–43
202. King G.M. Ecological aspects of methane oxidation, a key determinant of global methane dynamics // *Adv. Microb. Ecol.* – 1992. – No.12. – P.432–468.
203. Kip N., Ouyang W., van Winden J., Raghoebarsing A., van Niftrik L., Pol A., Pan Y., Bodrossy L., van Donselaar E.G., Reichart G.J., Jetten M.S., Damsté J.S., Op den Camp H.J. Detection, isolation, and characterization of acidophilic methanotrophs from Sphagnum mosses // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011a. – Vol.77. – No.16. – P.5643– 5654.
204. Kip N., Dutilh B.E., Pan Y., Bodrossy L., Neveling K., Kwint M.P., Jetten, M.S.M., and Op den Camp H.J.M. Ultradeep pyrosequencing of pmoA amplicons confirms the prevalence of *Methylomonas* and *Methylocystis* in Sphagnum mosses from a Dutch peat bog // *Environ. Microbiol. Rep.* – 2011b. – No.3. – P.667–673.
205. Kip N., van Winden J.F., Pan Y., Bodrossy L., Reichart,G., Smolders A.J.P., Jetten M.S.M., Sinninghe Damste J.S., Op den Camp H.J.M. Global prevalence of symbiotic bacterial methane oxidation in peat moss ecosystems // *Nat. Geosci.* – 2010. – No.3. – P.617–621.
206. Klenk H.P., Clayton R.A., Tomb J.F., White O., Nelson K.E., Ketchum K.A. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* // *Nature*. – 1997. – No.390. – P.364–370.
207. Kloepper J.W., Leong J., Teintz M., Schroth M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria // *Nature*. – 1980a. – Vol. 286. – P.665.
208. Kloepper J.W., GutierrezEstrada A., McInroy J.A. Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria // *Can. J. Microbiol.* – 2007. – Vol.53. – No.2. – P.159–167.
209. Kloepper J.W., Leong J., Teintze M., Schroth M.N. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils // *Curr. Microbiol.* – 1980b. – No.4. – P.317– 320.
210. Kloepper J.W., Lifshitz K., Schroth M.N. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production // *ISI Atlas Sci. Anim. Plant. Sci.* – 1988. – P.60–64.
211. Kloepper J.W., Ryu C.M., Zhang S.A. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. // *Phytopathology*. – 2004. – No.94. – P.1259–1266.
212. Kloepper J.W., Schroth M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: *Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria* / Gilbert–Clarey, Tours, 1978. – P.879–882.

213. Kobayashi Y., Shinkai T., Koike S. Ecological and physiological characterization shows that *Fibrobacter succinogenes* important in rumen fiber digestion // *Folia Microbiol.* – 2008. – No.53. – P.195–200.
214. Koizumi Y., Takii S., Fukui M. Depth-related change in archaeal community structure in a fresh water lake sediment as determined with denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rRNA genes and reversely transcribed rRNA fragments // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2004. – No.48. – P.285–292.
215. Kokalis-Burelle N., Kloepper J.W., Reddy M.S. Plant growth-promoting rhizobacteria as trans plant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms // *Appl. Soil Ecol.* – 2005. – No.31. – P.91–100.
216. Kotsyurbenko O.R., Friedrich M.W., Simankova M.V., Nozhevnikova A.N., Golyshin P.N., Timmis K.N., Conrad R. Shift from acetoclastic to H₂-dependent methanogenesis in a west Siberian peat bog at low pH values and isolation of an acidophilic *Methanobacterium* strain // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – No.73. – P.2344–2348.
217. Kotsyurbenko O.R. Trophic interactions in the methanogenic microbial community of low-temperature terrestrial ecosystems // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2005. – No.53. – P.3–13.
218. Kotsyurbenko O.R., Chin K.J., Glagolev M.V., Stubner S., Simankova M.V., Nozhevnikova A.N., Conrad R. Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog // *Environ. Microbiol.* – 2004. – P.1159–1173.
219. Krechel A., Faupel A., Hallmann J., Ulrich A., Berg G. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) // *Can. J. Microbiol.* – 2002. – V.48. – P.772–786.
220. Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction // *Mol. Plant. Microbe. Interact.* – 2004. Vol.17. No.1. P.6–15.
221. Kulichevskaya I.S., Guzev V.S., Gorlenko V.M., Liesack W., Dedysh S. N. *Rhodoblastus sphagnicola* sp. nov., a novel acidophilic purple non-sulfur bacterium from *Sphagnum* peat bog // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2006. – No.56. – P.1397–1402.
222. Kulichevskaya I.S., Baulina O.I., Bodelier P.L.E., Rijpstra W.I.C, Sinninghe Damste G.S., Dedysh S.N. *Zavarzinella formosa* gen. nov., sp. nov., a novel stalked, Gemmatolike planctomycete from a siberian peat bog // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2009. – No.59. – P.357–364.
223. Kumar V, Aggarwal N.K., Singh B.P. Performance and persistence of phosphate solubilizing *Azotobacter chroococcum* in wheat rhizosphere // *Folia Microbiol.* – 2000. – Vol.45. – No.4. – P.343–347.
224. Kurr M., Huber R., König H., Jannasch H.W., Fricke H., Trincone A. *Methanopyrus kandleri*, gen. nov. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C // *Arch. Microbiol.* – 1991. – No.156. – P.239–247.
225. Laine J., Vasander H. Ecology and vegetation gradients of peatlands. In: *Peatlands in Finland* / Vasander H. (ed.) – Helsinki: Finnish Peatland Society, 1996. – P.10–19.
226. Larmola T., Tuittila E.S., Tirola M., Nykanen H., Martikainen P.J., Yrjala K., Tuomivirta T., Fritze H. The role of *Sphagnum* mosses in the methane cycling of a boreal mire // *Ecology.* – 2010. – No.91. P.2356–2365.

227. Li L.L., McCorkle S.R., Monchy S., Taghavi S., van der Lelie D.: Bioprospecting metagenomes: glycosylhydrolases for converting biomass // *Biotechnol. Biofuels.* – 2009. – No.18. – P.2–10.
228. Lidstrom M. E. The aerobic methylotrophic bacteria. In: *The prokaryotes* / Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H. (ed.). – New York: Springer-Verlag, 1991. – P.431–445.
229. Lifshitz R., Kloepper J.W., Kozlowski M., Simonson C., Carlson J., Tipping E.M., Zalesca I. Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions // *Can. J. Microbiol.* – 1987. – No.33. – P.390–395.
230. Lindow S.E., Brandl M.T. Microbiology of the phyllosphere // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – No.69. – P.1875–1883.
231. Liu W., He Y., Zhang K., Fan J., Cao H. Isolation, identification and characterization of a strain of phosphate-solubilizing bacteria from red soil // *Wei Sheng Wu Xue Bao.* – 2012. – Vol.52. – No.3. – P.326–333.
232. Lloyd D, Thomas K.L., Hayes A., Hill B., Hales B.A., Edwards C. Micro-ecology of peat: Minimally invasive analysis using confocal laser scanning microscopy, membrane inlet mass spectrometry and PCR amplification of methanogen-specific gene sequences // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1998. – No.25. – P.179–188.
233. Lueders T., Friedrich M.W. Effects of amendment with ferrihydrite and gypsum on the structure and activity of methanogenic populations in rice field soil // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – No.68. – P.2484–2494.
234. Lugtenberg B., Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2009. – No.63. – P.541–555.
235. Luton P.E., Wayne J.M., Sharp R.J., Riley P.W. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill // *Microbiology* – 2002. – No.148. – P.3521–3530.
236. Magnusson J., Schnurer, J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2001. – Vol.67. – No.1. – P.1–5.
237. Maksimov I.V., Abizgildina R.R., Pusenkova L.I. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (Review) // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2011. – No.47. – P.333–345.
238. Malhotra M., Srivastava S. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth // *Eur. J. Soil Biol.* – 2009. – No.45. – P.73–80.
239. Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleifer K.-H. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. // *Syst. appl. microbiol.* – 1992. – Vol.15. – P.593–600.
240. Marchesi J.R., Weightman A.J., Cragg B.A., Parkes R.J., Fry J.C. Methanogen and bacterial diversity and distribution in deep gas hydrate sediments from the Cascadia Margin as revealed by 16S rRNA molecular analysis // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2001. – No.34. – P.221–228.
241. Martinez A.T., Speranza M., Ruiz-Duenas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillen F., Martinez M.J., Gutierrez A., del Rio J.C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical,

- and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin // *Int. Microbiol.* – 2005. – No.8. – P.195–204.
242. Martinez D., Challacombe J., Morgenstern I., Hibbett D., Schmoll M., Kubicek C.P., Ferreira P., Ruiz-Duenas F.J., Martinez A.T., Kersten P. Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – No.106. – P.1954–1959.
243. Martinez-Viveros O., Jorquera M.A., Crowley D.E., Gajardo G., Mora M.L. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria // *J. Soil. Sci. Plant Nutr.* – 2010. – No.10. – P.293–319.
244. Maurhofer M., Hase C., Meuwly P., Metraux J.P., Defago G. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production // *Phytopathology.* – 1994. – No.84. – P.139–146.
245. McCully M.E. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view // *Aust. J. Plant. Physiol.* – 2001. – No.28. – P.983–990.
246. McGrath C.E., Wilson D.B. Characterization of a *Thermobifida fusca* beta-1,3-glucanase (Lam81A) with a potential role in plant biomass degradation // *Biochemistry.* – 2006. – No.45. – P.14094–14100.
247. McInroy J., Klopper J. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. // *Plant and Soil.* – 1995. – Vol.73. – P.337–342.
248. Merila P., Galand P.E., Fritze H., Tuittila E., Kukkoja K., Laine J., Yrjala K. Methanogen communities along a primary succession transect of mire ecosystems // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2006. – No.55. – P.221–229.
249. Minorsky P.V. On the inside // *Plant Physiol.* – 2008. – No.146. – P.323–324.
250. Misaghi I.J., Donndelinger C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants // *Phytopathology.* – 1990. – Vol.80. – P.808–811.
251. Mishina T.E., Zeier J. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis* // *Plant. J.* – 2007. – No.50. – P.500–513.
252. Morales S.E., Mouser P.J., Ward N., Hudman S.P., Gotelli N.J., Ross D.S., Lewis T.A. Comparison of bacterial communities in New England Sphagnum bogs using terminal restriction fragment length polymorphism // *Microb. Ecol.* – 2006. – No.52. – P.34–44.
253. Moser F., Irwin D., Chen S., Wilson D.B. Regulation and characterization of *Thermobifida fusca* carbohydrate-binding module proteins E7 and E8 // *Biotechnol. Bioeng.* – 2008. – No.100. – P.1066–1077.
254. Moyer C.L., Dobbs F.C., Karl D.M. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – No.60. – P.871–879.
255. Neeraja C., Anil K., Purushotham P., Suma K., Sarma P., Moerschbacher B.M., Podile A.R. Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2010. – No.30. – P.231–241.
256. Ohtani S., Kanda H. Epiphytic algae on moss community of *Grimmia lawiana* around Syowa Station, Antarctica, Proceeding NIPR Symposium // *Polar Biol.* – 1987. – No.1. P.255–264.

257. Okon Y., Labandera-Gonzalez C. Agronomic applications of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation experiments // *Soil. Biol. Biochem.* – 1994. – No.26. – P.1591–1601.
258. Okunishi S., Sako K., Mano H., Imamura A., Morisaki H. Bacterial flora of endophytes in the maturing seeds of cultivated rice (*Oryza sativa*). // *Microbes and Environments* – 2005. – Vol.20. – P.168–177.
259. Opelt K., Berg C., Berg G. The bryophyte genus *Sphagnum* is a reservoir for powerful and extraordinary antagonists and potentially facultative human pathogens // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2007c. – Vol.61. – No.1. – P.38–53.
260. Opelt K., Berg C., Schonmann S., Eberl L., Berg G. High specificity but contrasting biodiversity of *Sphagnum*- associated bacterial and plant communities in bog ecosystems independent of the geographical region // *The ISME Journal.* – 2007a. – Vol.1. – P.502–516.
261. Opelt K., Berg G. Diversity and antagonistic potential of bacteria associated with bryophytes from nutrient-poor habitats of the Baltic Sea coast // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2004. – Vol.70. – No.11. – P.6569–6579.
262. Opelt K., Chobot V., Hadacek F., Schönmann S., Eberl L., Berg G. Investigations of the structure and function of bacterial communities associated with *Sphagnum* mosses // *Environ. Microbiol.* – 2007b. – Vol.9. – No.11. – P.2795–809.
263. Pandey A., Soccol C.R., RodriguezLeon J.A., Nigam P. *Solid-state fermentation in biotechnology—fundamentals and applications* / New Delhi: Asia-Tech Publishers, Inc, 2001 – P.100–221.
264. Pankratov T. A., Dedysh, S.N. *Granulicella paludicola* gen. nov., sp. nov., *G. pectinivorans* sp. nov., *G. aggregans* sp. nov. and *G. rosea* sp. nov., novel acidophilic, polymer degrading acidobacteria from *Sphagnum* peat bogs // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2010. – No.60. – P.2951–2959.
265. Pankratov T.A., Kulichevskaya I.S., Liesack W., Dedysh S.N. Isolation of aerobic, gliding, xylanolytic and laminarinolytic bacteria from acidic *Sphagnum* peatlands and emended description of *Chitinophaga arvensicola* Kämpfer et al // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2006. – No.56. – P.2761–2764.
266. Pankratov T.A., Tindall B.J., Liesack W., Dedysh S.N. *Mucilaginibacter paludis* gen. nov., sp. nov. and *Mucilaginibacter gracilis* sp. nov., pectin-, xylan-, and laminarin degrading members of the family Sphingobacteriaceae from acidic *Sphagnum* peat bog // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007. – No.57. – P.2349–2354.
267. Pankratov T. A., Dedysh S. N. *Granulicella paludicola* gen. nov., sp. nov., *G. pectinivorans* sp. nov., *G. aggregans* sp. nov. and *G. rosea* sp. nov., novel acidophilic, polymer-degrading acidobacteria from *Sphagnum* peat bogs // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2010. – No.60. – P.2951–2959.
268. Pankratov T.A., Ivanova A.O., Dedysh S.N., Liesack W. Bacterial populations and environmental factors controlling cellulose degradation in an acidic *Sphagnum* peat // *Environ. Microbiol.* – 2011. – No.13. – P.1800–1814.
269. Pankratov T.A., Serkebaeva Y.M., Kulichevskaya I.S., Liesack W., Dedysh S.N. Substrate-induced growth and isolation of Acidobacteria from acidic *Sphagnum* peat // *ISME J.* – 2008. – No.2. – P.551–560.

270. Pare P.W., Farag M.A., Krishnamachari V., Zhang H., Ryu C.-M., Kloepper J.W. Elicitors and priming agents initiate plant defense responses // *Photosynthesis Res.* – 2005. – No.85. – P.149–159.
271. Park K.H., Lee O.M., Jung H.I., Jeong J.H., Jeon Y.D., Hwang D.Y., Lee C.Y., Son H.J. Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol.86. – No.3. – P.947–55.
272. Parke J.L., Linderman R.G. Association of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi with the moss *Funaria hygrometrica* // *Can. J. Bot.* – 1980 – No.58. – P.1898–1904
273. Parmentier F., Huissteden van J., Kip N., Op den Camp H., Jetten M., Maximov T., Dolman A. The role of endophytic methane-oxidizing bacteria in submerged *Sphagnum* in determining methane emissions of Northeastern Siberian tundra // *Biogeosciences.* – 2011. – No.8. – P.1267–1278.
274. Patel D.K., Murawala .P, Archana G., Kumar G.N. Repression of mineral phosphate solubilizing phenotype in the presence of weak organic acids in plant growth promoting fluorescent pseudomonads // *Bioresour. Technol.* – 2011. – Vol.102. – No.3. – P.3055–3061.
275. PattT.E., Cole G.C., Bland J., Hanson R.S. Isolation and characterization of bacteria that grow on methane and organic compounds as sole sources of carbon and energy // *J. Bacteriol.* – 1974. – No.120. – P.955–964.
276. Payette S. Les principaux types de tourbières. In: *Écologie des tourbières du Québec–Labrador / Payette S., Rochefort L. (Eds.).* – Québec: Université Laval, 2001. – P.39–89.
277. Pfennig N. *Rhodopseudomonas acidophila*, sp. n., a new species of the budding purple nonsulfur bacteria // *J. Bacteriol.* – 1969. – No.99. – P.597–602.
278. Pozo M.J., Azcón–Aguilar C. Unraveling mycorrhiza induced resistance // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2007. – No.10. – P.393–398.
279. Purdy K.J., Munson M.A., Cresswell–Maynard T., Nedwell D.B., Embley T.M. Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate function and phylogeny of sulphate-reducing bacteria and methanogenic archaea in a UK estuary // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2003. – No.44. – P.361–371.
280. Putkinen A., Larmola T., Tuomivirta T., Siljanen H., Bodrossy L., Tuittila E. Water dispersal of methanotrophic bacteria main tainsfunctional methaneoxidation in *Sphagnum* mosses // *Front. Microbiol.* – 2012. – Vol.3:15. – doi: 10.3389/fmicb.2012.00015.
281. Raaijmakers J.M., de Bruijn I., Nybroe O., Ongena M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2010. – No.34. – P.1037–1062.
282. Rabatin S.C. The occurrence of the vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus tenuis* with moss // *Mycologia.* – 1980. – No.72. – P.191–195.
283. Rabinovich M.L., Melnick M.S., Bolobova A.V. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes // *Biochemistry.* – 2002. – No.67. – P.850–871.
284. Raghoebarsing A.A., Smolders A.J.P., Schmid M.C., Rijkstra W.I.C., Wolters–Arts M., Derksen J.M. Methanotrophic symbionts provide carbon for photosynthesis in peat bogs. // *Nature.* – 2005. – Vol.436. – P.1153–1156.
285. Raghoebarsing A.A., Pol A., van de Pas–Schoonen K.T., Smolders A.J., Ettwig K.F., Rijkstra W.I., Schouten S., Damsté J.S., Op den Camp H.J., Jetten M.S., Strous M. A microbial

- consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification // *Nature*. – 2006. – No.7086. – P.918–921.
286. Rai A.N., Söderback E. Bergman B. Cyanobacterium–plant symbioses // *New Phytol.* – 2000. – No.147. – P.449–481.
287. Ramos Solano B., Barriuso Maicas J., Pereyra de la Iglesia M.T., Domenech J., Gutierrez Manero F.J. Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhi–zobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors // *Phytopathology*. – 2008. – No.98. – P.451–457.
288. Rappe M.S., Giovannoni S.J. The uncultured microbial majority // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2003 – No.57. – P.369–394.
289. Raskin L., Stromley J.M., Rittmann B.E., Stahl D.A. Group–specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994 – No.60. – P.1232–1240.
290. Rawat R.,Tewari L. Effect of abiotic stress on phosphate solubilization by biocontrol fungus *Trichoderma* sp. // *Curr. Microbiol.* – 2011. – Vol.62. – No.5. – P.1521–1526.
291. Rayner M.C. *Mycorrhiza* / London: Wheldon and Wesley, 1927. – 134 p.
292. Reeve J.N., Nölling J., Morgan R.M., Smith D.R. Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first? // *J. Bacteriol.* – 1997. – No.179. – P.5975–5986.
293. Rennie R.J, Freitas J.R.D, Ruschel A.P, Vose P.B. Isolation and identification of N₂– fixing bacteria associated with sugarcane (*Saccharum* sp.). // *Can J Microbiol.* – 1982. – Vol. 28. – P.462–467.
294. Rheims H., Schumann P., Rohde M., Stackebrandt E. *Verrucosipora gifhornensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the actinobacterial family Micromonosporaceae // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 1998. – No.48. – P.1119–1127.
295. Ribaud C., Krumpholz E., Cassan F., Bottini R., Cantore M., Cura A. *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene // *J. Plant. Growth Regul.* – 2006. – No.24. – P.175–185.
296. Richardson A.E. Soil microorganisms and phosphorus availability. In: *Soil Biota* / Pankhurst C.E., Doube B.M., Gupta V.V.S.R., Grace P.R., (eds.). – Melbourne, Australia: CSIRO, 1994. – P.50–62.
297. Rijavec T., Lapanje A. Rupnik M. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels // *Can. J. Microbiol.* – 2007. – Vol.53. – P.802–808.
298. Riley M. Molecular mechanisms of colicin evolution // *Mol. Biol. Evol.* – 1993. – No.10. – P.1380–1395.
299. Riley M.A., Wertz J.E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2002. – No.56. – P.117–137.
300. Rodriguez H., Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion // *Biotechnol. Adv.* – 1999. – No.17. – P.319–339.
301. Rodriguez H., Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion // *Biotechnol. Adv.* – 1999. – No.17. – P.319–339.
302. Rooney–Varga J.N., Giewat M.W., Duddleston K.N., Chanton J.P., Hines M.E. Links between archaeal community structure, vegetation type and methanogenic pathway in Alaskan peatlands // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2007. – No.60. – P.240–251.

303. Russell J., Bulman S. The liverwort *Marchantia foliacea* forms a specialized symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi in the genus *Glomus* // *New Phytol.* – 2005. – No.165. – P.567–579.
304. Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H.–Y., Hunt M.D. Systemic acquired resistance // *Plant Cell.* – 1996. – No.8. – P.1808–1819.
305. Rydin H., Jeglum J.K., Hooijer A. *The Biology of Peatlands* / Oxford: University Press, 2006. – 343 p.
306. Ryu C.M., Farag M.A. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – No.100. – P.4927–4932.
307. Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Kloepper J.W. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2004. – No.134. – P.1017–1026.
308. Sagoe C.I., Ando T., Kouno K., Nagaoka T. Relative importance of protons and solution calcium concentration in phosphate rock dissolution by organic acids // *Soil Sci. Plant Nutr.* – 1998. – No.44. – P.617–625.
309. Salkowski E. Ueber das Verhalten der Skatolcarbonsaureim Organismus // *Z. Physiol. Chem.* – 1885. – No.9. – P.23–33.
310. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition / New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. – 2344 p.
311. Saravanakumar D., Samiyappan R. ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants // *J. Appl. Microbiol.* – 2007. – Vol.102. – No.5. – P.1283–1292.
312. Scervino J.M., Papinutti V.L., Godoy M.S., Rodriguez M.A., Della Monica I., Recchi M., Pettinari M.J., Godeas A.M. Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production // *J. Appl. Microbiol.* – 2011. – Vol.110. – No.5. – P.1215–1223.
313. Scheirer D.C., Brasell H.M. Epifluorescence microscopy for the study of nitrogen fixing blue–green algae associated with *Funaria hygrometrica* (Bryophyta) // *Am. J. Bot.* – 1984. – No.71. – P.461–465.
314. Scheirer D.C., Dolan H.A. Bryophyte leaf epiflora: An SEM and TEM study of *Polytrichum commune* Hedw. // *Am. J. Bot.* – 1983. – No.70. – P.712–718.
315. Schippers B. Biological control of pathogens with rhizobacteria // *Philos. Trans. R. Soc. B.– Biol. Sci.* – 1988. – No.318. – P.283–293.
316. Schippers B., Bakker A.W., Bakker P.A.H.M. Interaction of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 1987. – No.25. – P.339–358.
317. Schippers B., Scheffer R.J., Lugtenberg B.J.J., Weisbeek P.J. Biocoating of seeds with plant growth–promoting rhizobacteria to improve plant establishment // *Outlook Agric.* – 1995. – No.25. – P.179–185.
318. Schleper C., Jurgens G., Jonscheit M. Genomic studies of uncultivated archaea // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2005. – No.3. – P.479–488.
319. Schloss P.D., Hay A.G., Wilson D.B., Gossett J.M., Walker L.P. Quantifying bacterial population dynamics in compost using 16S rRNA gene probes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2005. – No.66. – P.457–463.

320. Schulz B., Boyle C. What are endophytes? In: *Microbial Root Endophytes* / Boyle C.J.C., Sieber T.N., eds.). – 2006. – P.1–13.
321. Schüßler A. *Glomus clarioideum* forms an arbuscular mycorrhiza-like symbiosis with the hornwort *Anthoceros punctatus* // *Mycorrhiza*. – 2000. – No.10. – P.15–21.
322. Shigematsu T., Tang Y., Kobayashi T., Kawaguchi H., Morimura S., Kida K. Effect of dilution rate on metabolic pathway shift between acetoclastic and nonacetoclastic methanogenesis in chemostat cultivation // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – No.70. – P.4048–4052.
323. Shoseyov O., Shani Z., Levy I. Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2006. – No.70. – P.283–295.
324. Silo-Suh L.A., Lethbridge B.J., Raffel S.J., He H., Clardy J., Handelsman J. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85 // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – No.60. – P.2023–2030.
325. Simankova M.V., Parshina S.N., Tourova T.P., Kolganova T.V., Zehnder A.J.B., Nozhevnikova A.N. *Methanosarcina lacustris* sp. nov., a new psychrotolerant methanogenic archaeon from anoxic lake sediments // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2001. – No.24. – P.362–367.
326. Sizova M.V., Panikov N.S., Tourova T.P., Flanagan P.W. Isolation and characterization of oligotrophic acidotolerant methanogenic consortia from a Sphagnum peat bog // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2003. – No.45. – P.301–315.
327. Sizova M.V., Panikov N.S., Spiridonova E.M., Slobodova N.V., Tourova T.P. Novel facultative anaerobic acidotolerant *Telmatospirillum sibiricense* gen. nov. sp. nov. isolated from mesotrophic fen // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2007. – No.30. – P.213–220.
328. Sizova M.V., Panikov N.S., Tourova T.P., Flanagan P.W. Isolation and characterization of oligotrophic acidotolerant methanogenic consortia from a Sphagnum peat bog // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2003. – No.45. – P.301–315.
329. Sjörs H., On the relation between vegetation and electrolytes in north Swedish mire waters // *Oikos*. – 1950. – No.2. – P.241–259.
330. Slobodkin A.I., Zavarzin G.A. Methane production in halophilic cyanobacteria mats in lagoons of Lake Sivash // *Mikrobiologiya*. – 1992. – No.61. – P.198–201.
331. Smith V.R. Effects of abiotic factors on acetylene reduction by cyanobacteria epiphytic on moss at a subarctic island // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1984. – No.48. – P.594–600.
332. Sohngen N.L. Über bakterien, welche methan ab kohlenstoffnahrung and energiequelle gebrauchen // *Parasitenkd. Infectionskr. Abt.* – 1906. – No.2.15. – P.513–517.
333. Solheim B., Johanson U., Callaghan T.V., Lee J.A., Gwynn-Jones Björn L.O. The nitrogen fixation potential of arctic cryptogram species is influenced by UV-B radiation // *Oecologia*. – 2002. – No.133. – P.90–93.
334. Solheim B., Zielke M. Associations between Cyanobacteria and Mosses // *Cyanobacteria in Symbiosis*. – 2003. – P.137–152.
335. Solheim B., Endal A., Vigstad H. Nitrogen fixation in Arctic vegetation and soils from Svalbard, Norway // *Polar Biol.* – 1996. – No.16. – P.35–40.
336. Somers E., Vanderleyden J., Srinivasan M. Rhizosphere bacterial signalling, a love parade beneath our feet // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2004. – No.30. – P.205–235.
337. Soucie E.L., Saggin-Júnior O.J., Silva E.M., Campello E.F., Azcón R., Barea J.M. Communities of P-solubilizing bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi in grass

- pasture and secondary forest of Paraty, RJ–Brazil // *An. Acad. Bras. Cienc.* – 2006. – Vol.78. – No.1. – P.183–193.
338. Spadaro D., Gullino M.L. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens // *Crop Prot.* – 2005. – No.24. – P.601–613.
339. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole–3–acetic acid in microbial and microorganism–plant signaling. In: *FEMS microbial. rev.* / Uden F. (ed). – New York: Blackwell Publishing Ltd., 2007. – P.1–24.
340. Spezio M., Wilson D.B., Karplus P.A. Crystal structure of the catalytic domain of a thermophilic endocellulase // *Biochemistry.* – 1993. – No.32. – P.9906–9916.
341. Stephens P.M., Crowley J.J., O’Connell C. Selection of pseudomonas strains inhibiting *Pythium ultimum* sugar–beet seeds in soil // *Soil Biol. Biochem.* – 1993. – No.25. – P.1283–1288.
342. Stewart W.D.P. Nitrogen Fixation in Plants / London: Athlone Press, 1966. – 168 p.
343. Sturz A.V., Christie B.R., Matheson B.G. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential foe beneficial allelopathy // *Can. J. Microbiol.*, – 1998. – Vol.44. – P.162–167.
344. Suen G., Scott J.J., Aylward F.O., Adams S.M., Tringe S.G., PintoToma’s A.A., Foster C.E., Pauly M., Weimer P.J., Barry K.W. An insect herbivore microbiome with high plant biomass–degrading capacity // *PLoS. Genet.* – 2010. – No.6. – P.100–112.
345. Sunita S., Kapoor K.K., Goyal S., Sharma P.K. Establishment of lacZ marked strain of phosphate solubilizing bacterium in the rhizosphere and its effect on plant growth in mungbean // *Indian J. Microbiol.* // 2010. – No.50.(Suppl.1). – P.117–121.
346. Sutton M.A., Howard C., Erisman J.W., Billen G., Bleeker A., Grennfelt P., van Grinsven H., Grizzetti B. The european nitrogen assessment / Cambridge: University Press, 2011. – 612p.
347. Suzuki M.T., Giovannoni S.J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – No.62. – P.625–630.
348. Swain M.R., Naskar S.K., Ray R.C. Indole–3–acetic acid production and effect on sprouting of yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora // *Pol. J. Microbiol.* – 2007. – No.56. – P.103–110.
349. Szekely A.J., Sipos R., Berta B., Vajna B., Hajdu C., Marialigeti K. DGGE and T–RFLP analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence–aided T–RFLP profile of mature compost // *Microb. Ecol.* – 2009. – No.57. – P.522–533.
350. Thauer R.K. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson // *Microbiology.* – 1998. – No.144. – P.2377–2406.
351. Tisdale S.L., Nelson W.L. Soil fertility and fertilizers, 3rd edn / New York: Macmillan Publishing, 1975. – 694 p.
352. Tjamos S.E., Flemetakis E., Paplomatas E.J., Katinakis P. Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K165 and pathogenesis–related proteins gene expression // *Mol. Plant Microbe. Inter.* – 2005. – No.18. – P.555–561.
353. Torsvik V., Goksøyr J., Daae F.L. High diversity in DNA of soil bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – No.56. – P.782–787.
354. Trotel–Aziz P., Couderchet M., Biagianti S., Aziz A. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating

- grapevine resistance against *Botrytis cinerea* // *Environ. Exp. Bot.* – 2008. – No.64. – P.21–32.
355. Turnau K., Ronikier M., Unrug J. Role of mycorrhizal links between plants in establishment of liverworts thalli in natural habitats // *Acta. Soc. Bot. Pol.* – 1999 – No.68. – P.63–68.
356. Uz I., Rasche M., Townsend T., Ogram A., Lindner A. Characterization of methanogenic and methanotrophic assemblages in landfill samples. // *Proc. R. Soc. Lond.* – 2003. – P.202–205.
357. Van Hulst M., Pelser M., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J., Ton J. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – No.103. – P.5602–5607.
358. Van Loon L.C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria // *Eur. J. Plant. Pathol.* – 2007. – P.119. – P.243–254.
359. Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M. Root-associated bacteria inducing systemic resistance. In: *Plant-Associated Bacteria / Gnanamanickam S.S. (ed.)*. – Dordrecht: Springer, 2006. – P.269–316.
360. Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 1998. – No.36. – P.453–483.
361. Van Peer R., Niemann G.J., Schippers B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r // *Phytopathology.* – 1991. – No.91. – P.728–34.
362. Van Wees S.C.M., De Swart E.A.M., Van Pelt J.A., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2000. – No.97. – P.8711–8716.
363. Van Wees S.C.M., Van der Ent S., Pieterse C.M.J. Plant immune responses triggered by beneficial microbes // *Curr. Opin. Plant. Biol.* – 2008. – No.11. – P.443–448.
364. Vandamme P., Opelt K., Knochel N., Berg C., Schonmann S., Brandt E. D., Eberl L., Falsen E., Berg G. *Burkholderia bryophila* sp. nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2007. – Vol.57. – P.2228–2235.
365. Vassilev N., Baca M., Franco I., Vassileva M., Leita L., De Nobili M. Mineralization of three agro-industrial wastes by acid-producing *Aspergillus niger*. In: *The science of composting, vol 2. / de Bertoldi M., Sequi P., Lemmes B., Papi T. (eds)*. – London: Blackie Academic & Professional, 1998. – P.1376–1379.
366. Vassilev N., Baca M.T., Vassileva M. Lignocellulose and Fungi: from nature to industrial use // *Mycologist.* – 1994. – No.8. – P.113–114.
367. Vassilev N., Vassileva M., Fenice M., Federici F. Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition // *Bioresour. Technol.* – 2001a – No.79. – P.263–271.
368. Vessey J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers // *Plant Soil.* – 2003 No.255. – P.571–586.
369. Vincent W.F. Cyanobacterial dominance in the polar regions, in: *The Ecology of Cyanobacteria / Whitton B.A., Potts M. (eds)*. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. – P.321–340.
370. Viruel E., Lucca M.E., Sifneriz F. Plant growth promotion traits of phosphobacteria isolated from Puna, Argentina // *Arch. Microbiol.* – 2011. – Vol.193. – No.7. – P.489–496.

371. Vlassak K., Paul E.A., Harris R.E. Assessment of biological nitrogen fixation in grassland and associated sites // *Plant Soil*. – 1973. – No.38. – P.637–649.
372. Vleeschauwer D., Höfte M. Rhizobacteria–induced systemic resistance // *Adv. Bot. Res.* – 2009. – No.51. – P.223–281.
373. Vornolt J., Kunow J., Stetter K.O., Thauer R.K. Enzymes and coenzymes of the carbonmonoxide dehydrogenase pathway for autotrophic CO₂ fixation in *Archaeoglobus lithotrophicus* and the lack of carbon monoxide dehydrogenase in the heterotrophic *A. profundus* // *Arch. Microbiol.* – 1995. – No.163. – P.112–118.
374. Warnecke F., Luginbuhl P., Ivanova N., Ghassemian M., Richardson T.H., Stege J.T., Cayouette M., McHardy A.C., Djordjevic G., Aboushadi N. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood–feeding higher termite // *Nature*. – 2007. – No.450. – P.560–565.
375. Watanabe T., Asakawa S., Nakamura A., Nagaoka K., Kimura M. DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil // *FEMS Microbiol Lett.* – 2004. – No.232. – P.153–163.
376. Watson B.J., Zhang H., Longmire A.G., Moon Y.H., Hutcheson S.W. Processive endoglucanases mediate degradation of cellulose by *Saccharophagus degradans* // *J. Bacteriol.* – 2009. – No.191. – P.5697–5705.
377. Wei G., Kloepper J.W., Tuzun S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology*. – 1991. – No.81. – P.1508–1512
378. Weiner R.M., Taylor L.E., Henrissat B., Hauser L., Land M., Coutinho P.M., Rancurel C., Saunders E.H., Longmire A.G., Zhang H. Complete genome sequence of the complex carbohydrate–degrading marine bacterium, *Saccharophagus degradans* strain 2–40T // *PLoS Genet.* – 2008. – No.4. – P.100–108.
379. Weller D.M. Biological control of soilborne plant pathogenesis in the rhizosphere with bacteria // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 1988. – Vol.26. – P.379–407.
380. Weller D.M., Raaijmakers J.M., Gardener B.B., Thomashow L.S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2002. – No.40. – P.309–348.
381. Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Onckelen H.V., Schmullig T. Cytokinin deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity // *Plant Cell*. – 2003. – No.15. – P.2532–2550.
382. Whitelaw M.A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate–solubilizing fungi // *Adv. Agron.* – 2000. – No.69. – P.99–151.
383. Whittenbury R., Dalton H. The methylotrophic bacteria. In: *The prokaryotes* / M.P. Starr, H. Stolph, H.G. Truper, A. Balows, H.G. Schlegel (ed.). – Berlin: Springer–Verlag KG, 1981. – P.894–902.
384. Whittenbury R., Krieg N.R. *Methylococcacea* fam. nov. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1 / Krieg N.R., Holt J.G.(ed.). – Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1984. – P.256–262.
385. Whittenbury R., Phillips K.C., Wilkinson J.G. Enrichment, isolation and some properties of methane utilizing bacteria // *J. Gen. Microbiol.* – 1970. – No.61. – P.205–218.

386. Williams R.T., Crawford R.L. Methanogenic bacteria, including an acid tolerant strain, from peatlands // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1985. – No.50. – P.1542–1544.
387. Williams R.T., Crawford R.L. Microbial diversity of Minnesota peatlands // *Microb. Ecol.* – 1983. – 9. P.201–214.
388. Wilson D.B. Studies of Thermobifida fuscaplant cell wall degrading enzymes // *Chem. Rec.* – 2004. – No.4. – P.72–82.
389. Wilson D.B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis // *Current Opinion in Microbiology.* – 2011. – No.14. – P.259–263.
390. Wilson D.B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – No.1125. – P.289–297.
391. Wise M.G., McArthur J.V., Shimkets L.J. Methanotrophic diversity in landfill soil: isolation of novel type I and type II methanotrophs whose presence was suggested by culture-independent 16S rDNA analysis // *Applied and environmental microbiology.* – 1999. – No.61. – P.205–218.
392. Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1990. – No.87 – P.4576–4579.
393. Wright A.G., Pimm C. Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S riboprinting // *J. Microbiol. Methods.* – 2003. – No.55. – P.337–349.
394. Xie G., Bruce D.C., Challacombe J.F., Chertkov O., Detter J.C., Gilna P., Han C.S., Lucas S., Misra M., Myers G.L. Genome sequence of the cellulolytic gliding bacterium *Cytophaga hutchinsonii* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – No.73. – P. 3536–3546.
395. Chen Y.P., Rekha P.D., Arun A.B., Shen F.T., Lai W–A., Young C.C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities // *Applied Soil Ecology.* – 2006. – No.34. – P.33–41.
396. Zhang Y., Guo L. Arbuscular mycorrhizal structure and fungi associated with mosses // *Mycorrhiza.* – 2007. – No.17. – P.319–325
397. Zaied K.A., El-Diasty Z.M., El-Rhman M.M.A., El-Sanossy A.S.O. Effect of horizontal DNA transfer between *Azotobacter* strains on protein patterns of *Azotobacter* transconjugants and biochemical traits in bioinoculated Okra (*Abelmoschus Esculentus*, L.) // *Aust. J. Basic. Appl. Sci.* – 2009. – Vol.3. No.2. – P.748–760.
398. Zehnder G., Kloepper J., Yao C., Wei G. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles (Coleoptera, Chrysomelidae) by plant growth-promoting rhizobacteria // *J. Econ. Entomol.* – 1997. – No.90. – P.391–396.
399. Zellner G., Winter J. Secondary alcohols as hydrogen donors for CO₂-reduction by methanogens // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1987. – No.44. – P.323–328.
400. Zhang S., Wolfgang D., Wilson D.B. Substrate heterogeneity causes the nonlinear kinetics of insoluble cellulose hydrolysis // *Biotechnol. Bioeng.* – 1999. – No.66. – P.35–41.

Благодарности

Автор выражает особую благодарность и признательность своему научному руководителю Чеботарю Владимиру Кузьмичу за чуткое и внимательное руководство. Также автор выражает благодарность всему коллективу ГНУ ВНИИСХМ и его директору Тихоновичу Игорю Анатольевичу. Автор хотел бы поблагодарить коллег из других институтов за помощь в осуществлении исследований по данной тематике: Брагину А.В, Берг Г. (Институт природоведческой биотехнологии, Технологический университет, Грац, Австрия), Берг К. (Ботанический институт, Карл-Франсес университет, Грац, Австрия), Кузьмину Е.Ю. (Ботанический институт им. Комарова РАН, С.Петербург, Россия), Лапшину Е.Д. (Югорский государственный университет, Ханты-Мансийск, Россия). Также автор выражает благодарность своим близким и жене Елене за неоценимую поддержку, оказанную в ходе подготовке работы.

Краткий отчет

ГНУ ВНИИОУ по выполнению этапа 02.06.03.01 Изучить влияние новых микробиологических препаратов на процессы трансформации пожнивных остатков зерновых культур в дерново-подзолистой почве за 2012 г.

Руководитель и отв. исполнитель – канд. биол. наук Русакова И.В.

02.06.03.01. Изучить влияние новых микробиологических препаратов на процессы трансформации пожнивных остатков зерновых культур в дерново-подзолистой почве

Цель исследований – изучить влияние микробиологических препаратов нового поколения на процессы гумификации и минерализации соломы в почве и дать агроэкологическую оценку эффективности использования соломы зерновых культур совместно с микробиологическими препаратами в специализированном зерновом севообороте на дерново-подзолистой супесчаной почве для разработки высокоэффективных способов применения биопрепаратов при использовании не товарной части зерновых на удобрение.

Новизна исследований. Впервые получены экспериментальные данные по агроэкологической эффективности новых микробиологических препаратов, полученных на основе эффективных микроорганизмов и предназначенных для ускорения разложения послеуборочных остатков зерновых культур, установлены количественные параметры, характеризующие влияние инокулирования биопрепаратами на скорость и направленность процессов трансформации растительных остатков зерновых культур в дерново-подзолистой супесчаной почве.

Методика исследований. Исследования проводили в микрополевым опыте, заложенном осенью 2011 г. после уборки ячменя на опытном поле ГНУ ВНИИОУ согласно следующей схеме: 1 – Контроль без удобрений; 2 – Солома ячменя 5т/га; 3 - Солома ячменя 5т/га + N50 ; 4 – Солома ячменя 5т/га + N50 + Баркон ; 5 – Солома ячменя 5т/га + N50 + Экстрасол С ; 6 – Солома ячменя 5т/га + N50 + Экстрасол ЦС; 7 – Солома ячменя 5т/га + N50 + Bioforce.

Опыт закладывается в 2-х полях. Площадь опытной делянки 3,36 м² (2,1 x 1,6м). Повторность 4-х кратная.

Почва дерново-подзолистая супесчаная. В эксперименте использовали солому ячменя (измельчённую до размеров 1 – 3 см) с опытного поля ГНУ ВНИИОУ, микробиологические препараты, разработанные во Всероссийском научно-исследовательском институте сельскохозяйственной микробиологии (ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии):

1. Баркон – на основе культур микроорганизмов деструкторов целлюлозо- и лигнинсодержащих растительных отходов;
2. Экстрасол С – на основе культуры эффективных штаммов *Bac. Subtilis*;
3. Экстрасол ЦС – с усиленной целлюлозолитической активностью;
4. Bioforce – Биопрепарат компании Bionick, применяемый для ускорения компостирования органических отходов различного происхождения, в том числе растительных.

Биопрепараты в опыте применялись согласно рекомендациям производителей.

Солома ячменя после уборки зерна измельчалась и распределялась по поверхности делянок опыта вручную в дозе из расчёта 5 т/га. После равномерного распределения соломы на её поверхность распределялась компенсирующая доза азота (N50) в виде аммиачной селитры и изучаемые биопрепараты согласно схеме опыта. В этот же день (28.08.2011 г.) обработанная биопрепаратами солома равномерно заделывалась в почву на глубину 0 – 20 см (модель зяблевой вспашки).

Для оценки эффективности влияния применяемых биопрепаратов в отношении скорости трансформации соломы, а также показателей плодородия дерново-подзолистой почвы в отчетном году проведено изучение: минерализационных потерь (эмиссии) CO₂ из

пахотного слоя почвы – абсорбционным методом по Шаркову; численности основных физиологических групп микроорганизмов (ФГМ) – методом посева почвенной суспензии на твердые и жидкие питательные среды; содержания микробной биомассы ($C_{\text{мб}}$) – методом регидратации – экстракции; динамики минерального азота – по ГОСТ; нитрифицирующей способности (НС) – по методу Кравкова; актуальной (полевой) целлюлозолитической активности – по % разложения целлюлозы; содержания углерода, экстрагируемого горячей водой – Сэгв; величины, структуры урожая, химического состава зерна и соломы яровой тритикале.

Обсуждение экспериментальных данных и результаты научных исследований.

Наблюдения за размерами эмиссии CO_2 из почвы опыта проводили в динамике, начиная с 1 суток после заделки соломы с БП, с интервалом 7 суток. На основе полученных экспериментальных данных рассчитывали кумулятивные кривые эмиссии двуокси углерода по вариантам опыта.

Согласно проведенным расчетам, за период наблюдений (63 суток) минимальное количества CO_2 выделилось из почвы контрольного варианта без удобрений – $72,5 \text{ г/м}^2$. На варианте с внесением 5 т/га соломы эта величина была выше в 1,5 раза и составила $109,42 \text{ г/м}^2$. Добавка компенсирующей дозы минерального азота к соломе способствовала увеличению эмиссии углерода на варианте 3 до $139,32 \text{ г/м}^2$. Все использованные в опыте биопрепараты проявили высокую эффективность в отношении интенсификации разложения растительной биомассы соломы, что зафиксировано по увеличению размеров выделения CO_2 , которые за истекший срок наблюдений были в сумме на 32-58 % выше, чем на варианте, где солома внесена без применения биопрепаратов и компенсирующей дозы азота (вар. 2), и на 4-24 % выше по сравнению с вариантом С+Н50 (рис.1).

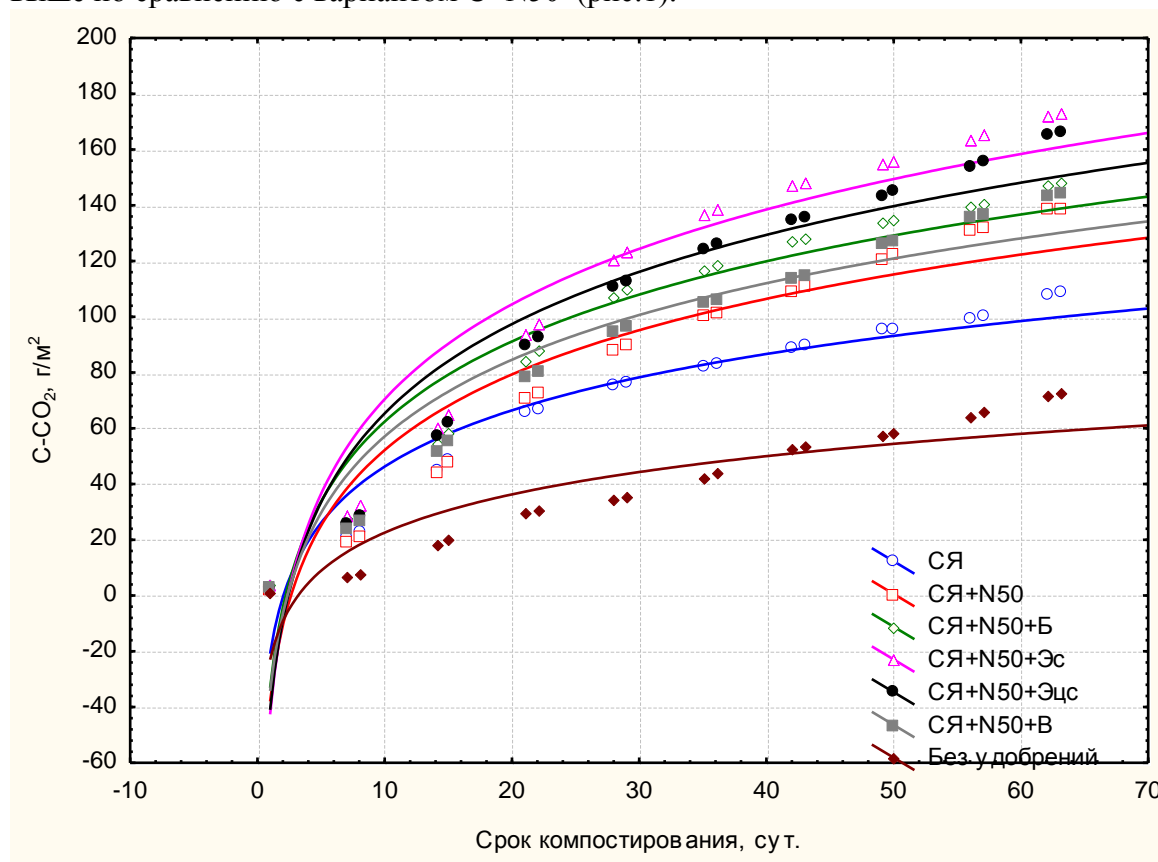


Рис. 1 Кумулятивные кривые эмиссии C – CO_2 в полевом опыте за 63 суток.

Согласно полученным экспериментальным данным, по интенсивности влияния на минерализационные потери CO_2 в данном опыте биопрепараты можно расположить в такой последовательности: Экстрасол С > Экстрасол ЦС > Баркон > Bioforce.

Микробная биомасса может служить важным показателем, характеризующим биологическое состояние пахотных почв и отражающим влияние агротехнических факторов. Углерод микробной биомассы определяли в динамике после заделки соломы ячменя (6.09.11; 22.09.11; 13.10.11; 9.11.2011) и в течение вегетационного периода 2012 г. (4.05.12; 6.09.12).

Согласно результатам анализа содержания микробной биомассы ($C_{\text{мб}}$) в пахотном слое почвы опыта можно отметить следующие особенности в характере динамики этого показателя. Все варианты с применением микробиологических препаратов и растительной биомассы (соломы) на 10 сутки после заделки соломы превосходили по уровню $C_{\text{мб}}$ контрольный на 15 – 30%. В последующие 2 срока наблюдений – 13.10 и 9.11 - на этих вариантах поддерживался более высокий уровень этого показателя, который был максимальным на вар. 5 и 6 – в среднем 529-541 мг/кг почвы, что на 10-13 % выше вар., где была внесена необработанная солома. Осенью, после уборки тритикале, наиболее высоким содержанием $C_{\text{мб}}$ характеризовались так же варианты 5 и 6 с Экстрасолом С и Экстрасолом ЦС (рис. 2).

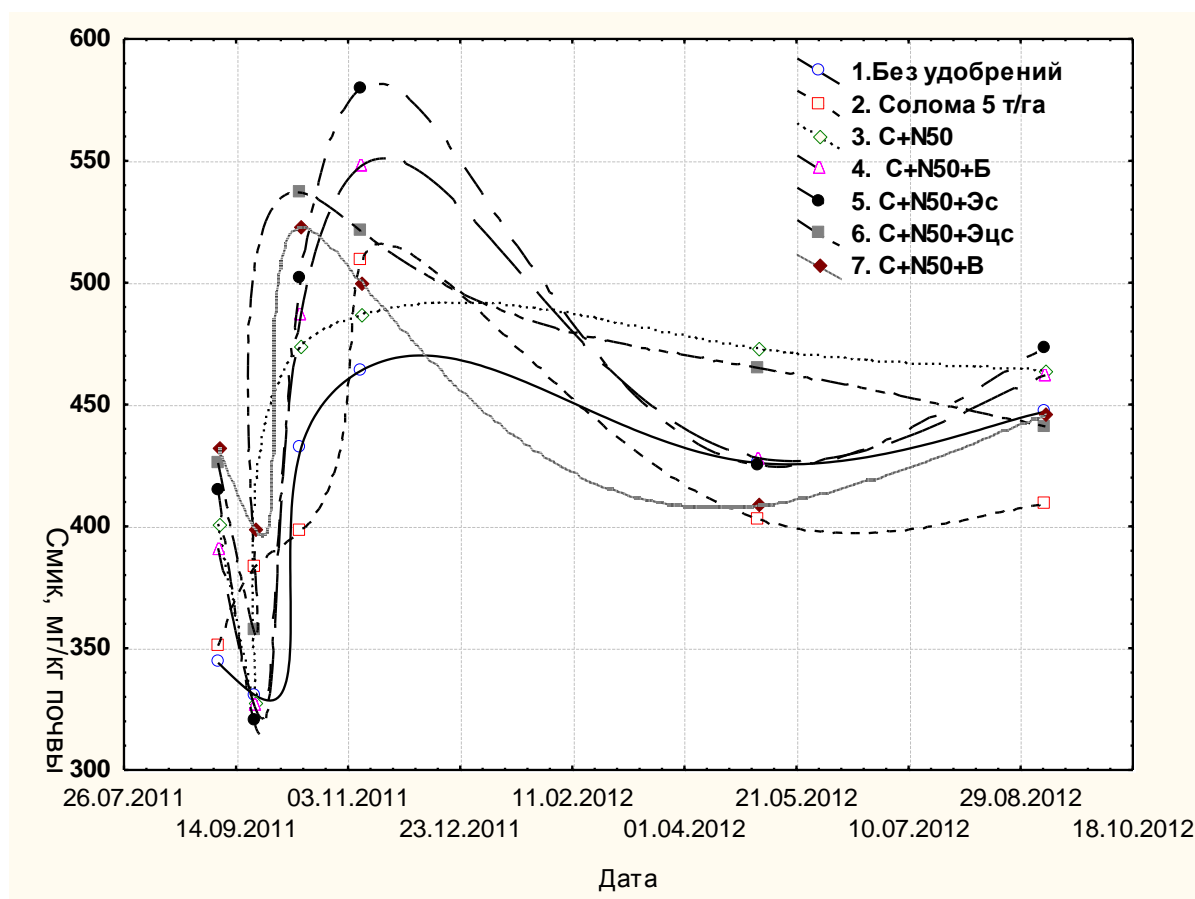


Рис. 2 Содержание микробной биомассы ($C_{\text{мик}}$) в пахотном слое дерново-подзолистой супесчаной почвы опыта

Экспериментальные данные, полученные при изучении динамики минерального азота, показали, что содержание $N_{\text{мин}}$ в пахотном слое почвы на вариантах, где вносилась компенсирующая доза азота, было значительно выше контроля во все сроки отбора проб. Следует отметить вариант с применением биопрепарата Экстрасол ЦС, где данный показатель во все сроки оставался наибольшим.

В результате изучения динамики численности ФГМ, участвующих в круговороте углерода и азота, установлено, что заделка соломы совместно с микробиологическими препаратами в целом обеспечила значительное увеличение численности агрономически полезных групп микроорганизмов, особенно в срок 9.11.11 г. (через сут. после заделки соломы с БП). При применении биопрепарата Баркон отмечено увеличение численности несимбиотических азотфиксирующих бактерий в 18 раз по сравнению с контролем без удобрений, свидетельствующее о более интенсивном накоплении биологического азота в почве на данном варианте. На варианте с применением биопрепарата Экстрасол ЦС наблюдалось существенное увеличение численности аммонифицирующих и амилолитических микроорганизмов, которое было максимальным в опыте (табл. 1).

Таблица 1. Показатели биологического состояния дерново-подзолистой почвы при использовании соломы с микробиологическими биопрепаратами, в ср. 21.09.11 – 9.11.11 г.

Вариант	Численность микроорганизмов, тыс. КОЕ/г почвы						Км
	Протеолитических ср.МПА	Амилолитических ср.КАА	Целлюлолитических ср.Гетчинсона	Микромицетов ср.Чапека	Нитрифицирующих ср.водный агар	Cl. pasteurianum	
1.Без удобрений	7934	17333	25,0	49,5	7,4	$\frac{250}{25}$	2,29
2.Солома 5 т/га	17834	24700	36,7	73,7	15,5	$\frac{1500}{150}$	1,43
3.Солома 5 т/га + N50	24767	40767	45,9	126	18,2	$\frac{950}{450}$	1,68
4. Солома 5 т/га + N50 + Баркон	18100	37167	37,7	92,2	31,3	$\frac{45000}{25}$	2,08
5. Солома 5 т/га + N50 + Экстрасол С	15700	28534	30,9	109,5	24,2	$\frac{4500}{250}$	1,81
6. Солома 5 т/га + N50 + Экстрасол ЦС	47734	81000	38,2	100,2	24,6	$\frac{250}{95}$	1,73
7. Солома 5 т/га + N50 + Bioforce	13934	27734	39,5	91,8	23,9	$\frac{250}{45}$	2,00

Микробиологический анализ, проведенный перед посевом культур - 4.05.12 г- показал, что, несмотря на общее снижение численности определяемых ФГМ (по сравнению с осенними сроками определения) на вариантах с применением БП уровень суммарной БА был выше, чем на варианте с заделкой неинокулированной соломы. В вариантах с Экстрасолом ЦС и Bioforce отмечены более высокие показатели Км. Через 1 год после внесения соломы и БП (3.10.12 г.) интенсивность микробиологических процессов нивелировалась по всем вариантам и была выше варианта без удобрений на 28-39 % (табл. 2).

При проведении микробиологических анализов учет общей численности протеолитических почвенных микроорганизмов на МПА был дополнен учетом г-стратегов, быстро развивающихся за счет легкодоступных соединений, и рассчитана доля в общей численности микроорганизмов, выделяемых на этой среде. Их относительно высокая численность на вариантах с Экстрасолом С (52 %) и Экстрасолом ЦС (46 %) может свидетельствовать о более активном освоении внесенного органического субстрата и энергично протекающих процессах минерализации (рис. 3).

Таблица 2. Показатели биологического состояния дерново-подзолистой почвы при использовании соломы с микробиологическими биопрепаратами в 2012 г.

Вариант	Численность микроорганизмов, тыс. КОЕ/г почвы							Км	Сум. · БА, %
	Протеолитическ их ср.МПА	Амилолитическ их ср.КАА	Целлюлозолитическ их ср.ГЛЛ	Микром ицетов ср.Чапек	Нитрифицирующ их ср.Валл	Cl. pasteurianum			
1.Без удобрений	4070 4484	8284 8892	22,5 29,6	37,8 55,1	8,7	2,7 7,4	2,04 1,98	100 100	
2.Солома 5 т/га	5595 7676	10755 19760	30,5 33,1	62,1 91,2	14,5	4,9 5,1	1,92 2,57	151 138	
3.Солома 5 т/га + N50	6104 6764	11336 19076	34,1 36,5	61,8 76,7	21,8	4,9 7,4	1,86 2,82	175 139	
4. Солома 5 т/га + N50 + Баркон	6686 6080	12208 15048	42,5 50,5	63,2 81,7	15,6	4,9 5,1	1,83 2,48	171 131	
5. Солома 5 т/га + N50 + Экстрасол С	10537 6612	18385 9804	43,3 51,0	57,0 53,6	16,0	8,2 8,6	1,74 1,48	213 128	
6. Солома 5 т/га + N50 + Экстрасол ЦС	8502 6688	18530 9728	33,8 52,1	65,1 67,6	16,7	8,2 8,6	2,18 1,45	202 134	
7. Солома 5 т/га + N50 + Bioforce	8938 7600	19552 12160	36,0 51,6	77, 73,8	25,4	4,9 5,1	2,19 1,60	212 131	

Примечание. Над чертой – 4.05.12 г., под чертой – 3.10.12 г.

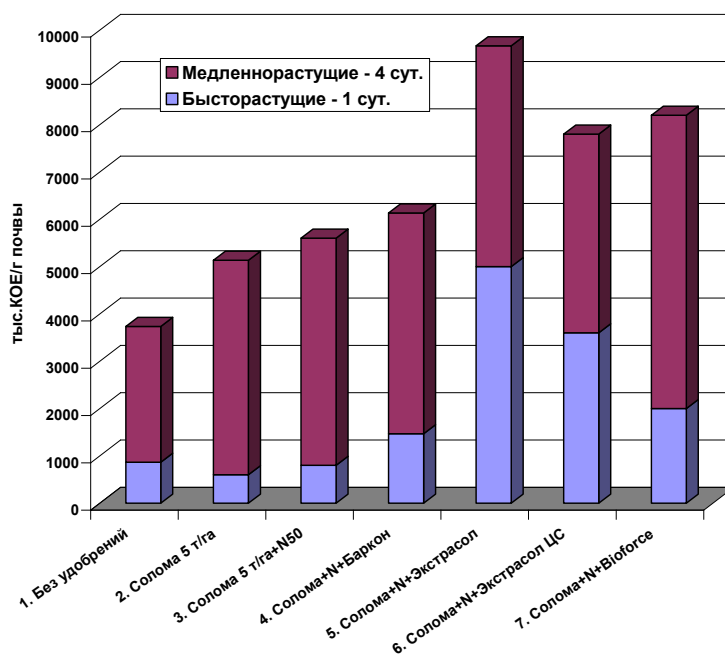


Рис. 3. Соотношение быстро- и медленнорастущих протеолитических микроорганизмов на мясо-пептонном агаре в пахотном слое почвы опыта

Влияние обработки соломы биопрепаратами отразилось на содержании углерода, эстрагируемого горячей водой – Сэгв. Можно отметить тенденцию увеличения этого показателя весной 2012 г. (4.05.12 г.) на вариантах с внесением инокулированной соломы по сравнению с вариантами, где послеуборочные остатки не были обработаны биопрепаратами (рис.4). В почве, отобранной после уборки тритикале, 6.09.12 г., различия по вариантам не зафиксированы.

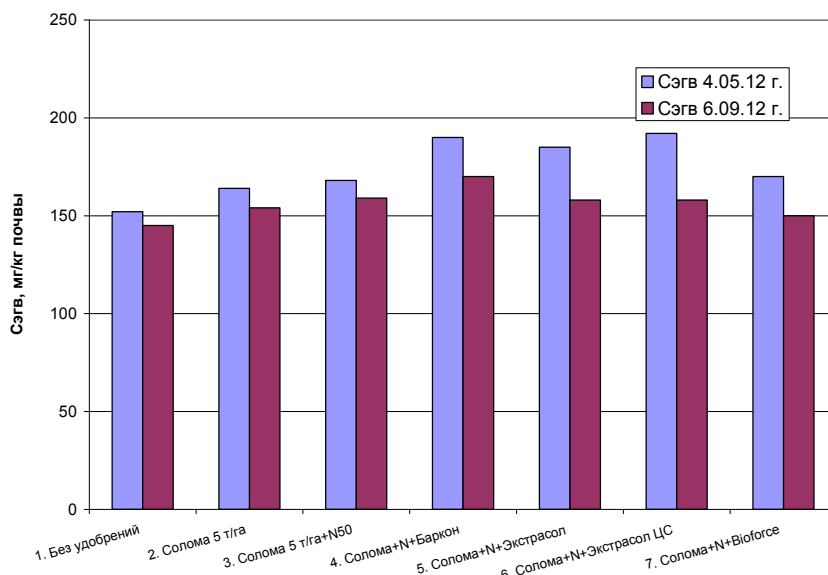


Рис. 4 Содержание Сэгв в пахотном слое микрополевого опыта

При учете урожайности яровой тритикале в опыте не выявлено достоверных различий по вариантам опыта. Можно отметить тенденцию к снижению урожайности на варианте 2 с заделкой 5 т/га соломы без добавок компенсирующего азота и тенденцию увеличения урожайности на вариантах с Экстрасолом С и Экстрасолом ЦС (табл. 3).

Таблица 3. Урожайность яровой тритикале, 2012 г.

Вариант	Урожайность, г/м ²	Прибавка урожайности	
		г/м ²	%
1.Без удобрений	150		
2.Солома 5 т/га	143	-7	-5
3.Солома 5 т/га+N50	158	8	5
4.Солома 5 т/га+N50	158	8	5
5 т/га+Баркон			
5.Солома 5 т/га+N50 +Экстрасол С	164	14	9
6.Солома+N50 5 т/га+Экстрасол ЦС	168	18	12
7.Солома+N50 5 т/га+Bioforce	155	5	3

НСР₀₅

22

Таким образом, в условиях 2011-2012 г.г. изучаемые БП проявили эффективность в отношении интенсификации минерализации и гумификации пожнивных остатков ячменя,

внесенных в пахотный слой дерново-подзолистой супесчаной почвы в качестве удобрения, что было зарегистрировано по изменению следующих показателей:

- увеличению численности микроорганизмов – деструкторов свежего органического вещества: аммонифицирующих, амилотических, целлюлозоразрушающих;
- увеличению коэффициента минерализации;
- росту содержания микробной биомассы;
- увеличению эмиссии CO₂;
- повышению актуальной целлюлозолитической активности;
- увеличению содержания легкоразлагаемого органического вещества – Сэгв.

Активность всех БП была максимальной в начальные сроки после инокуляции и заделки соломы в почву. Наиболее заметное влияние на изменение изучаемых показателей отмечено при применении микробиологического препарата Экстрасол ЦС с повышенной целлюлозолитической активностью.

В результате проведенных исследований получены экспериментальные данные по оценке влияния инокулирования послеуборочных остатков зерновых культур микробиологическими препаратами нового поколения на процессы их разложения в дерново-подзолистой супесчаной почве для разработки способа применения новых наиболее эффективных биопрепаратов при использовании соломы на удобрение.