

**АДАМЧУК-ЧАЛАЯ Н.И.<sup>1</sup>, ТИТОВА Л.В.<sup>2</sup>, ИУТИНСКАЯ Г.А.<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины,  
Украина, 01601, Киев, ул. Терещенковская, 2, e-mail: m\_nv@mail.ru*

*<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,  
Украина, Д03680, Киев, ГСП, ул. Заболотного, 154, e-mail: cenoza@serv.imv.kiev.ua*

### **ОСОБЕННОСТИ МИКРОБНОГО ПЕЙЗАЖА РИЗОСФЕРЫ СОИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ**

Одной из наиболее актуальных в почвенной и сельскохозяйственной микробиологии является проблема микробно-растительных взаимоотношений. Важный аспект этой проблемы — колонизация почвенными микроорганизмами поверхности корня и почвы прикорневой зоны. Корни в почве окружены плотно прилегающими минеральными частицами и почвенными коллоидами. В таком субстрате микрофлора организована пространственно-градиентно (Buckley et al., 2003; Hinsinger et al., 2005; Watt et al., 2006). Непосредственно на корнях обитают микроорганизмы, которые существуют в градиенте корневых выделений. Концентрированный максимум такого градиента приходится на поверхность корней и резко падает по мере удаления от корня. Падение градиента вызвано диффузией корневых выделений в рыхло-непрерывный субстрат, которым и является почва, а также непрерывным поглощением доступных органических веществ всей почвенной микробиотой. Следствием такой пространственной организации растения в субстрате является организация субстратной микрофлоры (Buckley et al., 2003; Whalley et al., 2005). Выделяют такие зоны распределения: непосредственно на корнях — ризоплана, в первых миллиметрах от корней — прикорневая, несколько далее — ризосфера. В свою очередь, на корнях микроорганизмы тоже располагаются по градиенту концентраций питательных веществ и фитонцидов. Принципиально такая же организация системы растения-субстрат имеет место и в других ареалах обитания (иле водоёмов, прибрежном песке и т.д.) (Young et al., 1998; Greaver et al., 2007). Проблема возникает при изучении самой биологии сосуществования микроорганизмов с растением. Термин «ризосфера» несёт совершенно чётко определённую смысловую нагрузку, неразрывно связанную с экологией растений (Hinsinger et al., 2005; Whalley et al., 2005). Ассоциированные с растением микробные сообщества являются живыми системами, которые подвергаются влиянию внешних факторов, что ведёт как к качественным, так и количественным изменениям в сообществе микроорганизмов. В природных условиях такие самоорганизующиеся микробные ценозы функционируют успешно (хотя познанию их и попыткам управления ими уделяют очень большое внимание) (El-Shatnawi et al., 2001; Gregory, 2006). Мониторинг микроорганизмов в их естественной среде обитания необходим для лучшего понимания микробных экосистем и стратегий их выживания, что важно, в том числе, и для оценки

риска введения ГМ микроорганизмов в естественные сообщества (Roszak & Colwell, 1987; Akkermans et al., 1994), а также эффективности интродукции хозяйственно-полезных микроорганизмов — биоагентов микробных препаратов. С практической и теоретической точек зрения представляет интерес изучение влияния на колонизацию микроорганизмами ризосферы различных агрономических мероприятий, в частности, инокуляции. Для эффективного управления микробными популяциями необходимо также знать особенности развития и взаимодействия микроорганизмов разных групп в ризосфере.

Однако, возможности мониторинга микроорганизмов имеют ряд принципиальных ограничений, поскольку микроорганизмы, которые могут быть изолированы из микробного сообщества на отдельных питательных средах, составляют лишь малую часть микробного сообщества почв (Kaeberlein T., et al., 2002; Totte J.R., et al., 2003). Микробные ценозы очень гетерогенны и состоят из клеток с самыми разнообразными метаболическими способностями. И на сегодняшний день не существует подходов к работе с микробными сообществами в их естественной ненарушенной уникальной структуре.

Целью настоящей работы было изучение процессов колонизации ризосферы сои микроорганизмами и состояния микрофлоры корня под влиянием инокуляции с использованием прямых микроскопических методов в сочетании с новыми методологическими подходами. Мы попытались, исходя из современных возможностей, создать необходимую технологию, совмещающую работу с микробным ценозом в его естественной архитектуре с использованием современных техник с разными уровнями разрешения. Анализ микробного пейзажа ризосферы сои проводили с использованием шадящей методики (Кордюм и др., 2008, 2009), позволяющей работать с ценозом в его нативной архитектуре.

### **Материалы и методы**

В работе изучали серую лесную почву ризосферы сои сорта Алиса. Опыты проводили в полевых условиях (Киевская обл., Украина). Исследовали образцы ризосферной почвы вариантов с традиционной моноинокуляцией семян гомологичными ризобиями *Bradyrhizobium japonicum*, с бинарной инокуляцией семян ризобиями совместно с фосфатмобилизующими бациллами *Bacillus megaterium*, а также контрольного варианта без инокуляции.

Для изучения пространственной структуры ризосферного микробного ценоза сои в фазе развития 2–3 настоящих листьев в течение 3 суток проводили экспозицию лавсановых пленок в корневой зоне растений. Затем лавсановые пластинки вынимали из почвы, при этом сохранялась целостность сформированной на поверхности обрастания микробной ассоциации. Каждую отдельную пластинку фиксировали в парах 37% формалина в течение 1 часа, высушивали в эксикаторе с притёртой крышкой, содержащем 80 шариков силикагеля (3–4 мм в диаметре каждый) в течение 48 часов. После этого пластинку наклеивали на металлический столик силикатным клеем с алюминиевой стружкой и осуществляли напыление золота, толщина напы-

лённого слоя составляла 15–20 А. Работы проводили на сканирующих электронных микроскопах Jeol JSM 35С и Jeol JSM 6060LA. Поля зрения фотографировали последовательно, с перекрыванием. В дальнейшем фотографии совмещали в пейзажную панораму (Adobe Photoshop CS, version 8.0) и подвергали статистической обработке по программе STAT.

### Результаты и обсуждение

Проведение исследований с применением электронной сканирующей микроскопии позволило составить пейзажную панораму микробного ценоза ризосферы сои (рис. 1).

На панорамном пейзаже акцептировались клетки ризобий, располагающиеся на биопленке как дисперсно, так и в виде контактных групп из 2–5-ти бактерий. Были зафиксированы межклеточные контакты участников ценоза и количественно-морфологические характеристики доминирующих популяций бактерий пленок обрастания в ризосфере сои разных вариантов.

Исследовали по 10 полей зрения на 5-ти участках биопленки на расстоянии 1 мм друг от друга для каждого варианта (таблица).

По результатам микроскопических наблюдений наибольшее количество клеток на 100 мкм<sup>2</sup> наблюдалось в варианте с двойной инокуляцией, в остальных вариантах эта величина была в 1,3–1,4 раза меньше.

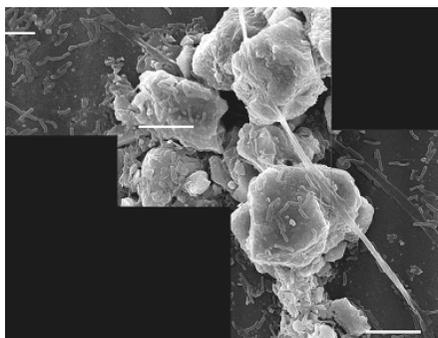


Рис. 1. Микробный пейзаж ризосферы сои, инокулированной ризобиями, шкала 10 мкм

Таблица

Численность и морфологические характеристики бактерий пленок обрастания в ризосфере сои

Вариант	Количество клеток на 100 мкм <sup>2</sup>	Средние размеры клеток доминирующей популяции, мкм	
		длина	ширина
Контроль	17,83±1,22	1,52±0,11	0,42±0,01
Инокуляция ризобиями	19,71±2,03	2,24±0,13	0,52±0,02
Двойная инокуляция	25,54±2,26	1,98±0,11	0,62±0,03

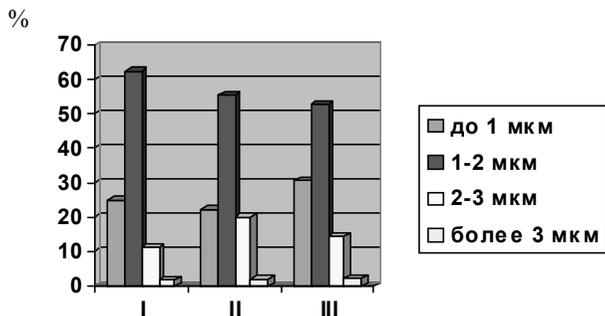


Рис. 2. Морфологическая структура доминирующих популяций бактерий в ризосфере сои при применении биопрепаратов:

I — двойная инокуляция, II — инокуляция ризобиями, III — контроль (без инокуляции)

В контрольном варианте доминировали мелкие клетки со средней длиной и шириной палочки в пределах нормы вариации аборигенной микрофлоры. В варианте с моноинокуляцией ризобиями средняя длина доминирующей бактерий возрастала в 1,5 раза, ширина увеличивалась на 0,1 мкм. В варианте с двойной инокуляцией доминирующая популяция бактерий была представлена палочками со средней длиной и шириной большей, чем в контроле. При этом, в сравнении с моноинокуляцией длина палочек несколько уменьшалась, а ширина — увеличивалась.

Обобщение этих результатов позволило установить распределение популяций бактерий по их длине (рис. 2).

Показано, что размеры клеток ризосферных микробных комплексов сои колебались в пределах нормы, характерной как для чистых культур, использованных нами для инокуляции, так и для аборигенных ассоциаций. Анализ пленок обрастания в ризосфере сои проведен в щадящем режиме, без разрушения контактных групп, с использованием пейзажных панорам, что позволяет исследовать все морфологическое разнообразие компонентов микроассоциаций.

### Выводы

Разработан новый подход, позволяющий определить морфологическое разнообразие бактериальных клеток в ненарушенных бобово-ризобияльных сообществах, базирующийся на использовании сканирующей электронной микроскопии. Структурный анализ составленных пейзажных панорамных снимков микробных ценозов ризосферы сои в их нативной архитектуре показал увеличение количества и морфологических параметров доминирующих популяций бактерий при применении исследованных биопрепаратов.

### Литература

1. Akkermans A.D.L., Mirza M.S., Hermie, Harmsen H.J.M., Blok H.J., Herron P.R., Sessitsch A., Akkermans W.M. Molecular ecology of microbes: A review of promises, pitfalls and true progress / FEMS Microbiology Reviews.— 1994.— 15.— P. 185–194.

2. *Buckley D.H.&Schmidt T.M.* Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems // *Environmental Microbiology*.— 2003.— 5, N6.— P. 441–452.
3. *El-Shatnawi M.K.J.&Makhadmeh. I.M.* Ecology of the plant-rhizosphere system. Review J. *Agronomy&Crop. Science*.— 2001.— 187.— P. 1–9.
4. *Greaver T.L.&Sternberg L.S.L.* Fluctuating deposition of ocean water drives plant function on coastal sand dunes // *Global Change Biology*.— 2007.— 13.— P. 216–223.
5. *Gregory P.J.* Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science? // *European Journal of Soil Science*.— 2006.— 57.— P. 2–12.
6. *Hinsinger P., Gobran G.R., Gregory P.J., Wenzel W.W.* Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from rootmediated physical and chemical processes // *New Phytologist*.— 2005.— 168.— P. 293–303.
7. *Kaerberlein T., Lewis K., Epstein S.S.* Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment // *Science*.— 202.— 296.— P. 1127–1129.
8. *Roszak D.B., Colwell R.R.* Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment. *Microbiological Reviews*.— 1987.— 51.— P. 365–379.
9. *Torre J.R., Brett M., Goebel E., Friedmann I., Pace N.R.* Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica // *Applied and Environmental Microbiology*.— 2003.— 69.— P. 3858–3867.
10. *Whalley W.R., Riseley B., Leeds-Harrison P.B, Bird N.R.A., Leech P.K., Ad-derley W.P.* Structural differences between bulk and rhizosphere soil // *European Journal of Soil Science*.— 2005.— 56.— P. 353–360.
11. *Watt M., Hugenholtz P., White R., Vinal K.* Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) // *Environmental Microbiology*.— 2006.— 8, N5.— P. 871–884.
12. *Кордюм В.А., Мошинец Е.В., Цапенко М.В., Адамчук-Чалая Н.И., Иродов Д.М., Андриенко В.И.* Микроорганизмы ризосферы — полный мониторинг // *Грунтознавство*.— 2008.— Т.9, №1–2.— С. 53–63.
13. *Кордюм В.А., Шпилевая С.П., Мошинец Е.В., Адамчук-Чалая Н.И., Иродов Д.И., Андриенко В.И.* Биополимеры и клетки в измерении архитектуры микроценозов. 1. Феноменология // *Биополимери і клітина*.— 2009.— Т.25, №2.— С.150–166.

### **Резюме**

В настоящей работе применен принципиально новый подход к изучению субстратных микробных ценозов бобово-ризобияльного симбиоза в нативной архитектуре. Структурный анализ пейзажных панорамных снимков биопленок обрастания показал увеличение количества и морфологических параметров доминирующих популяций бактерий при применении биопрепаратов.

У представлений роботі застосовано принципово новий підхід до вивчення субстратних мікробних ценозів бобово-ризобіального симбіозу в нативній архітектурі. Структурний аналіз пейзажних панорамних знімків біоплівок обрастання показав збільшення кількості та морфологічних параметрів домінуючих популяцій бактерій при застосуванні біопрепаратів.

In this work the principal new method of substrat microcenoosis in soybean-rhizobial symbiosis in their native structure was provided. Structural analysis of view panoramic biofilms presents the increase of number and morphological parameters of dominated bacterial populations under biopreparation using.

**АХТЕМОВА Г.А., ШТАРК О.Ю., ПЕРШИНА Е.В., ПИНАЕВ А.Г.,  
АНДРОНОВ Е.Е., БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А.**

*ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии,  
Россия, 196608, Санкт-Петербург, ш. Подбельского, д.3,  
e-mail: ahgulya@yandex.ru*

## **СОЗДАНИЕ НОВЫХ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ АДАПТИВНОГО СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА**

Известно, что полезные почвенные микроорганизмы улучшают минеральное питание и водный статус растений, синтезируют физиологически активные вещества — стимуляторы роста, предотвращают развитие патогенной микрофлоры в ризосфере, а также обеспечивают ряд важных признаков плодородия почвы [1–3]. Кроме того, показано, что различные полезные почвенные микроорганизмы могут проявлять синергизм, как в отношении друг друга, так и при воздействии на растение [4, 5].

Бобовые растения, являющиеся ключевым компонентом технологий адаптивного растениеводства (<http://www.grainlegumes.com/aep/>), формируют, по крайней мере, два типа мутуалистических эндосимбиозов: азотфиксирующий симбиоз с клубеньковыми бактериями и арбускулярную микоризу с грибами отдела *Glomeromycota*. Оба симбиоза характеризуются высокой степенью интеграции генетических систем партнеров и в значительной степени контролируются растением [6, 7]. Кроме того, бобовые образуют эктосимбиозы, или так называемые ассоциативные симбиозы, с различными полезными ризосферными бактериями, которые объединены под термином PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* — ризобактерии, стимулирующие рост растений) [1, 4, 5, 8, 9, 10]. Изучение генетического контроля формирования различных симбиозов бобовых привело к заключению, что бобовые обладают единой генетической системой, контролирующей развитие многокомпонентной растительно-микробной системы [7, 9–11].

Таким образом, становится очевидной возможность практического использования в сельском хозяйстве взаимовыгодных многокомпонентных растительно-микробных систем. Введение в сельскохозяйственную практику потенциала растительно-микробных взаимодействий означает, прежде всего, удаление и уменьшение роли синтетического компонента, и замену его натуральными компонентами, в том числе, биологическими микробными препаратами [5, 8, 10, 12].

Успешным примером многокомпонентного микробного препарата является “БисолбиМикс”, разработанный авторами в сотрудничестве с инновационной компанией “Бисолби-Интер”, содержащего высокоэффективные штаммы клубеньковых бактерий, полезных ризосферных бактерий и изоляты грибов арбускулярной микоризы из коллекций ГНУ ВНИИСХМ и “Бисолби-Интер” [13]. В полевых условиях была показана высокая эффективность этого препарата при использовании, как под бобовые [14], так и небобовые