

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОЦЕНОЗА РИЗОСФЕРЫ И РИЗОПЛАНЫ *LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL

¹Алексеева А.С., ¹Потатуркина - Нестерова Н.И.

¹ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск, email: junau@yandex.ru

Проведено сравнительное изучение качественного и количественного состава микробиоценоза ризосферы и ризопланы *Lycopersicon esculentum* Mill. В ходе исследования были выделены бактерии, заселяющие прикорневую зону томата обыкновенного. Проведена идентификация выделенных микроорганизмов по совокупности морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств. Результаты исследования показали, что качественный состав микробного сообщества ризосферы и ризопланы представлен бактериями родов *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Bacillus*. Изучение количественного состава показало, что более плотно заселена бактериями ризосфера, по сравнению с ризопланой. В ризосфере и ризоплане *Solanum lycopersicum* доминирующими видами являются *Acinetobacter Iwofii* и *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Полученные результаты могут стать основой для разработки новых методов борьбы с патогенной микрофлорой растений, имеющих широкое практическое применение. Изученные штаммы ризобактерий могут быть использованы при создании современных биопрепаратов для защиты растений.

Ключевые слова: ризосфера, ризоплана, ризобактерия, микробиоценоз

COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF THE MICROFLORA OF THE RHIZOSPHERE AND RHIZOPLANE *LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.

¹Alekseeva A.S., ¹Potaturkina- Nesterova N.I.

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, email: junau@yandex.ru

A comparative study of the qualitative and quantitative composition of microbiocenosis rhizosphere and rhizoplane *Lycopersicon esculentum* Mill. In the course of the study were selected bacteria that inhabit the root zone of tomato ordinary. Identification of selected microorganisms by a set of morphological, cultural and biochemical properties. The results showed that the qualitative composition of the microbial community of the rhizosphere and rhizoplane represented by bacteria of the genera *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Bacillus*. The study of quantitative structure showed that more densely populated by bacteria in the rhizosphere compared with rhizoplane. In the rhizosphere and rhizoplane the dominant species are *Acinetobacter Iwofii* and *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. In the rhizosphere and rhizoplane *Solanum lycopersicum* the dominant species are *Acinetobacter Iwofii* and *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. The results of research would be basis for work out of new methods of struggle with pathogenic microflora of plants which have practical using. The studied stains of rhizobacteria would be using for making of modern biopreparats to defend plants.

Keywords: rhizosphere, rhizoplan, rhizobacteria, microbiocenosis

Микроорганизмы, ассоциированные с растениями, в последние годы стали объектами активных исследований. К настоящему времени накоплен большой экспериментальный материал, доказывающий значительную роль ризобактерий в жизнедеятельности многих сельскохозяйственных растений [1,4]. Активная секреция клетками корня различных веществ обеспечивает питательными субстратами микроорганизмы, образующие с ним прочные ассоциации как внутри корневых тканей, так и на корневой поверхности (ризоплане), а также в почве, непосредственно окружающей корни (ризосфере) [5, 13]. В связи с этим в ризосфере и ризоплане в значительных количествах концентрируются бактерии, актиномицеты, грибы, водоросли и нематоды, существенно превышая количество этих организмов в обычной почве [3, 15]. Для изучения взаимодействий растений с полезными формами бактерий в ризосфере продуктивна концепция, согласно которой ризобактерии образуют с растением единую

растительно-микробную систему (ассоциацию) с новыми свойствами, детерминированными положительным взаимодействием партнеров [2, 6, 8].

В образуемом эктосимбиозе корневые экссудаты растений являются субстратом и факторами роста некоторых групп микробных сообществ, которые выполняют роль антифитопатогенов, утилизаторов нежелательных продуктов метаболизма растений, регуляторов общей концентрации микроорганизмов в почве, регуляторов подвижности и кругооборота минеральных веществ в агроэкосистеме [7, 9, 11]. Это проявляется в улучшении минерального питания растений, интенсификации партнерства хозяина с доминантным симбионтом за счет локальной продукции фитогормонов; в поддержании в почве пула потенциальных микросимбионтов при высвобождении спор доминантного симбионта и, наконец, прямой защите растений от фитопатогенов [14,12].

В настоящее время изучен микробиоценоз корневой системы у представителей семейств злаковые и бобовые [10, 16, 17], состав ризосферы и ризопланы других растений, имеющих агропромышленное значение остается неизвестным.

Цель: сравнительное изучение микробного сообщества ризосферы и ризопланы *Lycopersicon esculentum Mill.*

Материал и методы исследования

Объектом исследования явились микроорганизмы, выделенные из ризосферы и ризопланы томата (*Lycopersicon esculentum Mill.*). Для выделения микроорганизмов ризосферы и ризопланы использовали метод последовательных отмываний корней по Теппер. Из почвенных монолитов с растениями стерильным пинцетом и ножницами отобрали 1,0 г молодых корней (примерно одного диаметра) с приставшими к ним частицами почвы. Корни помещали в колбу со 100,0 мл стерильной водопроводной воды и взбалтывали в течение 2,0 мин. Стерильным крючком или пинцетом корни извлекали из колбы и переносили последовательно во вторую, третью, четвертую, пятую, шестую и седьмую колбы, также содержащие по 100,0 мл стерильной водопроводной воды. В каждой колбе корни отмывали по 2 мин. В последней (седьмой) колбе в воду перед стерилизацией добавляли 5,0-7,0 г песка. Из каждой колбы отдельно стерильной пипеткой брали по капле суспензии и делали посев на поверхность питательной среды на чашки Петри.

Для определения количественного и качественного состава микрофлоры растения пользовались методом посева полученной суспензии на плотные питательные среды: МПА, Эндо, Симмонса, культуры инкубировали при температуре 37°C в течении 48 ч. Идентификацию микроорганизмов осуществляли на основе изучения морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств выделенных микроорганизмов с

помощью программного обеспечения для автоматизированной идентификации бактерий производства ООО «НПО Диагностические системы».

В процессе идентификации у неферментирующих бактерий определяли подвижность, наличие оксидазы, окисление глюкозы OF, желатина, мочевины, лизиндекарбоксилазы, лактозы, чувствительность к пенициллину, образованию индола и сероводорода, рост на среде Симмонса.

Энтеробактерии идентифицировали по отношению к мочеvine, малонату натрия, орнитиндекарбоксилазе, лизиндекарбоксилазе, фенилаламиндезаминазе, подвижность, образование индола, сероводорода, реакцию Фогеса-Проскауэра и окисление глюкозы OF.

Для идентификации бацилл определяли подвижность, наличие спор, наличие каталазы, маннита, крахмала, мочевины, способность к гемолизу и реакцию Фогес-Проскауэра.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что в состав микробиоценоза корней томатов входили неферментирующие бактерии, энтеробактерии и бациллы.

Неферментирующие бактерии были представлены родами *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и *Alcaligenes*. Бактерии имели палочковидную форму, по Граму окрашивались отрицательно, обладали типичной ферментативной активностью (табл. 1).

Таблица 1

Биохимические свойства неферментирующих бактерий ризосферы и ризопланы томатов

Виды микроорганизмов	подвижность	оксидаза	окисление глюкозы OF	желатин	мочевина	лизиндекарбоксилаза	аргинидекарбоксилаза	10% лактоза	чувствительность к пенициллину	индол	Симмонса	сероводород
1. <i>Acinetobacter lwofii</i>	-	-	щ/-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2. <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	+	+	щ/-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
3. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+	+	+/-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
4. <i>Alcaligenes faecalis</i>	+	+	-/-	-	-	-	-	-	+	-	+	-

Сем. *Enterobacteriaceae* и в ризоплане, и в ризосфере было представлено только одним видом – *Enterobacter aerogenes*. При микроскопии данные бактерии имели палочковидную форму, по Граму окрашивались отрицательно, обладали подвижностью и выраженной ферментативной активностью, связанной с образованием многочисленных

сахаролитических, протеолитических и других ферментов. Они не обладали способностью к образованию индола и сероводорода, не расщепляли мочевины, не выделяли фениламиндезаминазу. Энтеробактерии давали положительную пробу с цитратом натрия на среде Симмонса, Фогеса-Проскауера, синтезировали малонат натрия, орнитиндекарбоксилазу, лизиндекарбоксилазу, вызывали окисление глюкозы.

Род *Bacillus* на поверхности корней и в прилегающей к ним почве был представлен двумя видами – *Bacillus subtilis* и *Bacillus megaterium*, имеющими типичные морфологические, тинкториальные и биохимические свойства (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика биологических свойств бацилл

Вид	наличие спор	ПОДВИЖНОСТЬ	каталаза	лецитиназа	гемолиз	маннит	крахмал	мочевина	реакция Фогеса-Проскауера
<i>Bacillus subtilis</i>	+		+	-	-	+	+	-	+
<i>Bacillus megaterium</i>	+	+		-	-	-	+	+	-

Сравнительное исследование состава микробиоценоза ризосферы и ризопланы томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.) показало, что количественные показатели бактерий *Acinetobacter Iwofii* ризосферы были в 1,13 раз больше, чем ризопланы, а *Acinetobacter calcoaceticus* – в 1,18 раза. Плотность колонизации *Pseudomonas pseudoalcaligenes* больше в 1,14 раза в ризосфере, по сравнению с ризопланой, а *Alcaligenes faecalis* – в 1,40 раза.

Показатели плотности колонизации *Enterobacter aerogenes* в ризосфере были в 1,24 раза, *Bacillus subtilis* – в 1,76 раз, *Bacillus megaterium* – в 1,22 раза выше, чем в ризоплане (табл. 3).

Таблица 3

Показатели плотности колонизации микробиоты ризосферы и ризопланы *Lycopersicon esculentum* Mill. (lgKOE/мл)

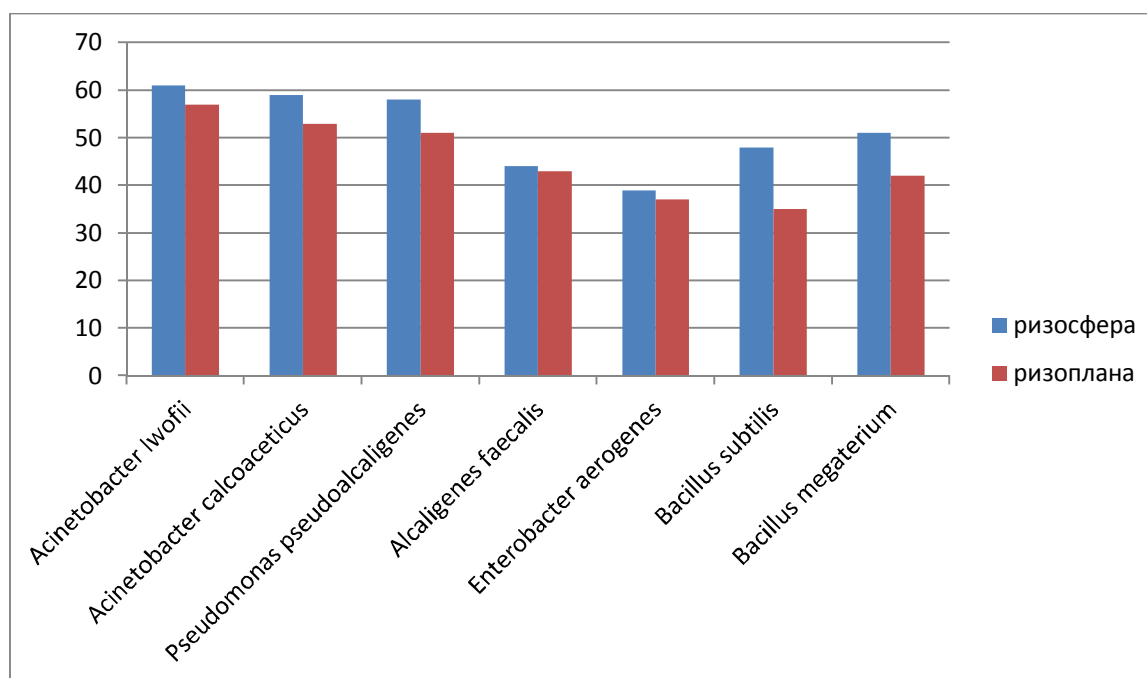
№	Виды	Ризосфера (lgKOE/мл)	ризоплана (lgKOE/мл)
1	<i>Acinetobacter Iwofii</i>	3,48±0,47*	3,08±0,11
2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	3,08±0,13*	2,60±0,17
3	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	3,18±0,50*	2,78±0,30
4	<i>Alcaligenes faecalis</i>	2,60±0,19*	2,00±0,15
5	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2,48±0,27*	2,00±0,14

6	<i>Bacillus subtilis</i>	2,08±0,23*	1,18±0,12
7	<i>Bacillus megaterium</i>	2,18±0,18	1,79±0,16

*– показатель достоверности различий показателей плотности колонизации микробиоты ризосферы и ризопланы *Lycopersicon esculentum* Mill. ($p < 0,05$).

Частота встречаемости исследуемых микроорганизмов в ризосфере и ризоплане была следующая: *Acinetobacter Iwofii* 61% и 57%, *Acinetobacter calcoaceticus* 59% и 53%, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 58% и 51%, *Alcaligenes faecalis* 44% и 43%, *Enterobacter aerogenes* 39% и 37% *Bacillus subtilis* 48% и 35%, *Bacillus megaterium* 51% и 42% соответственно (рисунке).

Показатели частоты встречаемости видового состава микроценоза ризосферы и ризопланы *Lycopersicon esculentum* Mill. (%)



В результате сравнительного изучения микробиоценоза корней томатов установлено, что качественный состав ризосферы и ризопланы одинаков, но имеются количественные различия микробного населения, ризосфера является более плотно заселенной нишей по сравнению с ризопланой.

Выводы

1. Видовой состав ризосферы и ризопланы томатов представлен неферментирующими бактериями – *Acinetobacter Iwofii*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes faecalis*; энтеробактериями – *Enterobacter aerogenes* и бациллами – *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*.

2. Доминирующими видами и ризосферы являются *Acinetobacter Iwofii*, частота встречаемости которых составляет 61% и *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, с частотой

встречаемости 58%.

3. Доминирующими видами ризопланы являются *Acinetobacter Iwofii*, частота встречаемости которых составляет 57% и *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, с частотой встречаемости 51%.

4. Наиболее плотнозаселенной нишей из изученных биотопов является ризосфера. Наибольший уровень плотности колонизации имеет вид *Acinetobacter Iwofii*, его показатели и в ризосфере, и в ризоплане составляет $3,48 \pm 0,47$ IgKOE/мл и $3,08 \pm 0,11$ IgKOE/мл соответственно ($p < 0,05$).

Список литературы

1. Боронин А.М., Кочетков В.В. Биологические препараты на основе псевдомонад // АГРО XXI. 2000. 140 с
2. Бухарин О.В. Ассоциативный симбиоз / О. В. Бухарин, Е. С. Лобакова, Н. В. Немцева, С. В. Черкасов. - Екатеринбург: УрО РАН, 2006. - 264с.
3. Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв / Т. Г. Добровольская. - М.: Наука, 2002. - 282с.
4. Завалин А. А. Биопрепараты, удобрения и урожай. – М.: Изд-во ВНИИА, 2005. – 302 с.
5. Звягинцев Д. Н. Растения как центры формирования бактериальных сообществ / Т.Г. Добровольская, Л.В. Лысак // Журн. общей биологии. - 1993. - Т. 54.- С. 183-199.
6. Кравченко Л.В., Макарова Н.М., Азарова Т.С. и др. Выделение и фенотипическая характеристика ростстимулирующих ризобактерий (PGPR), сочетающих высокую активность колонизации корней и ингибирования фитопатогенных грибов. Микробиология, 2002, 71(4): 521-525.
7. Кравченко Л.В. Роль корневых экзометаболитов в интеграции микроорганизмов с растениями. Автореф. докт. дис. М., 2000.
8. Проворов Н.А. Генетико-эволюционные основы учения о симбиозе // Журн. общ. биологии, 2001. Т. 62. С. 472-495.
9. Рыбальский Н.Г., Лях С.П. Экобиотехнологический потенциал консорциумов микроорганизмов. В 3 т. М.: ВНИИПИ, 1990. Т. 1. С. 3-25.
10. Умаров М.М. Микробиологическая трансформация азота в почве / М.М. Умаров, А.В. Кураков, А.Л. Степанов. - М.: Геос, 2007. -137с.
11. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А. и др. Микробные продуценты стимуляторов роста растений и их практическое использование: обзор. Прикл. биохим. микробиол., 2006, 2: 133-143.

12. Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloemberg G.V. e.a. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *MPMI*, 2004, 17(1): 6-15.
13. Mantelin S., Touraine B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp. Bot.*, 2004, 55: 27-34.
14. Neilands J.B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.*, 1995, 45: 26723-26726.
15. Rodriguez H., Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Adv.*, 1999, 17: 319-339.
16. Weller D.M., Raaijmakers J.M., McSpadden Gardener B.B. e.a. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2002, 40: 309-348.
17. Whipps J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, 2001, 52: 487-511.

Рецензенты:

Золотухин В.В., д.б.н., профессор кафедры зоологии ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И. Н. Ульянова», г. Ульяновск;

Артемьева Е.А., д.б.н., профессор кафедры зоологии ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И. Н. Ульянова», г. Ульяновск.