

В монографии раскрыты методологические подходы к выделению и изучению ассоциативных с определенным видом растений штаммов микроорганизмов, обобщены результаты исследований по идентификации и эффективности штаммов, выделенных с апикальной части корней томата (*Solanum lycopersicum* L.), капусты (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), огурца (*Cucumis sativus* L.), пшеницы (*Triticum aestivum* L.), риса (*Oryza sativa* L.) и других культур (*Sorghum bicolor* L., *Salvia sclarea* L. и *Coriandrum sativum* L.), а также цианобактериальных консорциумов на основе симбиотических и ассоциативных микроорганизмов для целей агробιοтехнологии.



АССОЦИАТИВНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ РАСТЕНИЙ: ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММОВ И ИХ ИЗУЧЕНИЕ

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА КРЫМА»

АССОЦИАТИВНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ РАСТЕНИЙ: ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММОВ И ИХ ИЗУЧЕНИЕ

Симферополь, 2021

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Российская академия наук
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»

**АССОЦИАТИВНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ
РАСТЕНИЙ: ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММОВ И ИХ
ИЗУЧЕНИЕ**

Симферополь
ИТ «АРИАЛ»
2021

УДК 579.64:58.083:58.071

ББК 579

А 90

Рекомендовано к печати Ученым советом ФГБУН
«Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»
Протокол № 2 от 29.03.2021 г.

Под редакцией д. с.-х. н. Мельничук Т.Н., к.б.н. Якубовской А.И.,
к. с.-х. н. Каменевой И.А., к. с.-х. н. Дидович С.В., д. с.-х. н. Паштецкого В.С.

Рецензенты:

Завалин А.А. – академик РАН, доктор сельскохозяйственных наук, профессор,
заместитель академика-секретаря Отделения сельскохозяйственных наук РАН;

Чайковская Л.А. – доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник
отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «НИИСХ Крыма»;

Дегтярева И.А. – доктор биологических наук, доцент, главный научный
сотрудник Татарского научно-исследовательского института агрохимии и почвоведения
ФИЦ КазНЦ РАН.

А 90 **Ассоциативные микроорганизмы растений: выделение штаммов и их изучение :**
коллективная монография / Под редакцией Мельничук Т.Н., Якубовской А.И.,
Каменевой И.А. и др. – Симферополь : ИТ «АРИАЛ», 2021. – 180 с.

ISBN 978-5-907506-71-8

DOI 10.33952/2542-0720-2022-978-5-907506-71-8

В монографии раскрыты методологические подходы к выделению и изучению ассоциативных с определенным видом растений штаммов микроорганизмов, обобщены результаты исследований по идентификации и эффективности штаммов, выделенных с апикальной части корней томата (*Solanum lycopersicum* L.), капусты (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), огурца (*Cucumis sativus* L.), пшеницы (*Triticum aestivum* L.), риса (*Oryza sativa* L.) и других культур (*Sorghum bicolor* L., *Salvia sclarea* L. и *Coriandrum sativum* L.), а также цианобактериальных консорциумов на основе симбиотических и ассоциативных микроорганизмов для целей агробиотехнологии.

Монография предназначена для микробиологов, биотехнологов, экологов, физиологов, аспирантов и студентов высших учебных учреждений.

В монографии приведены результаты исследований, выполненные в рамках государственных заданий фундаментальных исследований №0834-2015-0005, №0834-2015-0001, №0834-2019-0005, №0834-2019-0001 и при поддержке грантов РФФИ: №18-016-00197, 14-44-01621, 5-29-01272, 18-016-00184, 16-34-50060.

УДК 579.64:58.083:58.071

ББК 579

© Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки «Научно-исследовательский
институт сельского хозяйства Крыма», 2021

© Коллектив авторов, 2021

© ИТ «АРИАЛ», макет, оформление, 2021

ISBN 978-5-907506-71-8

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
1. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ВЫДЕЛЕНИЮ И ИЗУЧЕНИЮ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ, АССОЦИАТИВНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ РАСТЕНИЙ Мельничук Т.Н., Шерстобоев Н.К.	9
1.1 Подготовка семян перед закладкой опыта	11
1.2 Выделение штаммов ассоциативных бактерий в стерильных и полустерильных условиях	13
1.3 Процесс выделения изолятов бактериальных культур	17
1.4 Порядок осуществления первичного испытания полученных изолятов	18
1.5 Изучение интенсивности колонизации интродуцированными штаммами бактерий корневых сфер растения.....	19
2. СЕЛЕКЦИЯ АССОЦИАТИВНЫХ ШТАММОВ РИЗОБАКТЕРИЙ С РАСТЕНИЯМИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ Мельничук Т.Н., Шерстобоев Н.К., Якубовская А.И., Каменева И.А., Егочева А.Ю., Абдурашитов С.Ф., Абдурашитова Э.Р., Радченко А.Ф., Радченко Л.А., Паптецкий В.С., Ганоцкая Т.Л., Гритчин М.В.	23
2.1 Ассоциативные штаммы бактерий к овощным культурам	24
2.1.1 Выделение изолятов, ассоциативных с <i>Solanum lycopersicum</i> L., <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L. и <i>Cucumis sativus</i> L.	25
2.1.2 Морфологические, физиолого-биохимические свойства и идентификация ассоциативных изолятов овощных культур.....	27
2.1.3 Влияние нововыделенных штаммов на овощные растения.....	32
2.2 Ассоциативные штаммы бактерий к <i>Triticum aestivum</i> L.	39
2.2.1 Условия получения штаммов ассоциативных с растениями пшеницы бактерий	39
2.2.2 Характеристика ассоциативных штаммов бактерий к <i>Triticum aestivum</i> L. и их идентификация	48
2.2.3 Влияние ассоциативных штаммов бактерий на структуру микробоценоза ризосферы <i>Triticum aestivum</i> L.	51
2.2.4 Влияние нововыделенных штаммов ассоциативных с <i>T. aestivum</i> бактерий на продуктивность растений	73
2.3 Ассоциативные штаммы бактерий к растениям риса (<i>Oryza sativa</i> L.)	82
2.3.1 Выделение штамма с высокой степенью ассоциативности к растениям риса (<i>Oryza sativa</i> L.)	82
2.3.2 Изучение полезных свойств выделенных штаммов.....	92
2.3.3 Технологические свойства штаммов и условия их культивирования.....	104
2.3.4 Эффективность функционирования ассоциативных ризобактерий риса.....	110
2.4 Ассоциативные штаммы бактерий с <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench, <i>Salvia sclarea</i> L. и <i>Coriandrum sativum</i> L.	114
2.4.1 Селекция штаммов бактерий, образующих ассоциативный симбиоз с <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench.....	114

<i>2.4.2 Первичная оценка штаммов бактерий, ассоциативных с <i>Salvia sclarea</i> L. и <i>Coriandrum sativum</i> L.</i>	119
3. ЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ КОНСОРЦИУМЫ НА ОСНОВЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ И АССОЦИАТИВНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ЗЕМЛЕДЕЛИЯ Дидович С.В., Горгулько Т.В., Алексеенко О.П., Пась А.Н., Ремесло Е.В.	123
<i>3.1 Конструирование цианобактериальных консорциумов</i>	124
<i>3.2 Потенциал взаимодействия «цианобактерии – растения»</i>	131
Заключение	153
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	157
ПРИЛОЖЕНИЕ А	172
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	173
ПРИЛОЖЕНИЕ В	177
СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	179

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

абс. сух. – абсолютно сухая

АМГ – грибы арбускулярной микоризы

БД – База Данных

Б – Биополицид

ГТК – гидротермический коэффициент

ККМ – Крымская коллекция микроорганизмов

КОЕД – клубенькообразующая единица

КОЕ – колониобразующая единица

об. / мин – оборотов в минуту

ОТЕ – операционная таксономическая единица

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Р – Ризобифит

тыс. – тысяч

Ф – препарат на основе штамма *Lelliottia nimipressuralis* 32-3

ЦБК – цианобактериальная препаративная форма

ЦРК – цианобактериальный консорциум

шт. – штук

g – гомогенизированная препаративная форма

NA – неатрибутированные (неопределенные) таксоны

NGS – next-generation sequencing (технологии массивного параллельного секвенирования)

Other – другие последовательности

PGPR – plant growth promoting rhizobacteria

ВВЕДЕНИЕ

Повышение продуктивности сельскохозяйственных культур и качества продукции растениеводства, а также снижение пестицидной нагрузки на агроэкосистемы является важной задачей, решение которой возможно путем биологизации агротехнологий. В настоящее время исследования по применению в сельском хозяйстве микробных препаратов на основе ростстимулирующих микроорганизмов вызывают все больший интерес.

Использование биологического азота в современном земледелии является приоритетом сельскохозяйственной науки и практики. Естественный процесс симбиотической азотфиксации обеспечивает получение высоких урожаев растительного белка бобовых культур без применения минеральных азотных удобрений и повышает плодородие почвы для последующих культур, являясь основой биологизации земледелия. За счет биологической фиксации азота воздуха на одном гектаре зернобобовые культуры в симбиозе с соответствующими видами клубеньковых бактерий могут усвоить из воздуха до 60–200 кг/га [1, 2] азота ежегодно и на 50–90 % удовлетворить свои потребности в этом элементе.

Одним из важных направлений исследований прошлого века стала ассоциативная азотфиксация. Несмотря на то, что по своей эффективности, она уступала симбиотической, интерес возрастал как в фундаментальном, так и прикладном направлении. Учитывая, что в масштабах сельскохозяйственных угодий бобовые культуры не превышают 25% (это в самом лучшем случае), даже 30 кг/га биологического азота, полученного при взаимодействии с небобовыми растениями на значительной площади, вносит весомый вклад в агроценозы. Исследования ассоциативных микроорганизмов показали их роль не только в вопросах азотфиксации, но и стимуляции роста, развития растений и защиты от фитопатогенов. Микроорганизмы осуществляют также значительное влияние на продукционный процесс у растений и качество растительной продукции.

Ассоциативные микроорганизмы обитают в прилегающей к корням почве, зоне прямого влияния растений. Они могут достигать плотности, значительно превышающей количество растительных клеток [3] и формировать на корнях растений сложные по таксономическому составу и структурно-функциональной организации сообщества. Для каждого вида и даже сорта растений необходим индивидуальный подбор штаммов, который наиболее соответствует биологическим характеристикам растительного организма, особенно специфике корневых экссудатов [4], определяющей приживаемость штаммов в ризосфере [5]. Стимулирующий эффект

ассоциативных бактерий обеспечивают разнообразные механизмы: прямое поглощение минеральных элементов питания (азотфиксация, перевод неорганических фосфатов в биологически доступную форму, производство сидерофоров, облегчающих поглощение ионов металлов и т.д.), синтез биологически активных гормоноподобных веществ, активация генов «устойчивости» растения, прямой антибиоз против болезнетворных микроорганизмов [6]. Полезные для растений ризобактерии способствуют устойчивости растений к фитопатогенным микробам и фитофагам [7, 8] и могут снизить глобальную зависимость от опасных сельскохозяйственных химикатов, дестабилизирующих агроэкосистемы [9].

Поиск активных штаммов ассоциативных бактерий среди аборигенной почвенной микробиоты и формирование растительно-микробных систем с подбором выращиваемых сортов является перспективным для использования в конкретной почвенно-климатической зоне. Имеющиеся особенности и разнообразие почвенно-климатических условий формирования агроценозов обуславливают актуальность таких исследований.

Изучение формирования и функционирования продуктивной системы растение – микроорганизмы – почва позволяет выявить новые свойства ее отдельных компонентов и расширить представление о механизме ассоциативного взаимодействия, а разработка таких эффективных систем, адаптированных к почвенно-климатическим условиям, обеспечить повышение экологической безопасности сельскохозяйственного производства. Активизация природного потенциала растительно-микробных систем создает основу для разработки экологически безопасных и экономически обоснованных технологий в растениеводстве, направленных на повышение плодородия почвы и формирование стабильности агроэкосистем.

В отделе сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма» создана коллекция агрономически полезных микроорганизмов (<http://www.ckp-rf.ru>), которые служат для разработки микробных препаратов и экологически безопасных технологий возделывания сельскохозяйственных культур. География отбора микроорганизмов обширна. Классические методы выделения штаммов бактерий с полезными свойствами предполагает длительный процесс, особенно в части испытаний эффективности штаммов на сельскохозяйственных культурах. Для пополнения коллекции штаммов предложен оригинальный методологический подход к выделению и изучению ассоциативных микроорганизмов к определенному виду растений.

В монографии раскрыты методологические подходы к выделению и изучению ассоциативных микроорганизмов к определенному виду растений штаммов, обобщены результаты исследований по идентификации и эффективности штаммов, выделенных с апикальной части корней томата (*Solanum lycopersicum* L.), капусты (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), огурца (*Cucumis sativus* L.), пшеницы (*Triticum aestivum* L.), риса (*Oryza sativa* L.), сорго (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.) и кориандра (*Coriandrum sativum* L.), а также цианобактериальных консорциумов на основе симбиотических и ассоциативных микроорганизмов для целей агробιοтехнологии.

Авторы выражают глубокую благодарность рецензентам академику РАН А.А. Завалину, доктору сельскохозяйственных наук, с.н.с. Л.А. Чайковской и доктору биологических наук, доценту И.А. Дегтяревой за ценные замечания, сотрудникам отдела сельскохозяйственной микробиологии за помощь в выполнении научно-исследовательских работ, а также Российскому фонду фундаментальных исследований за финансовую поддержку.

1. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ВЫДЕЛЕНИЮ И ИЗУЧЕНИЮ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ, АССОЦИАТИВНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ РАСТЕНИЙ

Мельничук Т.Н., Шерстобоев Н.К.

Поиск эффективных микросимбионтов и интродукция штаммов в ризосферу растений являются актуальными и перспективными направлениями исследований для решения проблемы биологизации агротехнологий выращивания сельскохозяйственных культур [10, 11]. Одним из важных условий для создания эффективных микробно-растительных систем является селекция штаммов ассоциативных к определенному виду растений микроорганизмов, адаптированных к почвенно-климатическим условиям и корневым выделениям. Ассоциативными считаются микроорганизмы, колонизирующие поверхность корней растений и использующие корневые экссудаты как источник питательных элементов для своего развития и выполнения функциональных свойств, которые являются полезными для макроорганизма. В конце 70-х годов прошлого столетия появилась мысль о том, что ассоциации азотфиксаторов с растениями могут быть весьма специфическими и в разной степени тесными. Однако механизм распознавания ассоциативных партнеров менее специфичен, чем в симбиотических системах. В последнем случае он более жестко определяется видовой принадлежностью партнеров.

Среди представителей ассоциативных микроорганизмов есть такие, которые могут колонизировать как поверхность растений, так и их внутренние ткани. Ассоциативные микроорганизмы, в том числе и эндофитные, считаются перспективными в практическом отношении, поскольку обеспечивают большой вклад в рост и развитие растения-хозяина [12-14].

Одним из первых этапов микробиологических исследований, направленных на решение вопроса активизации природных процессов растительно-микробного взаимодействия в агроэкосистемах является поиск новых активных агрономически ценных штаммов. В научной литературе описано достаточно большое количество методов, где используются различные способы и приемы для выделения ассоциативных микроорганизмов с корневой зоны небобовых растений [15-19].

Например, Д. Доберейнер предложено получение азотфиксирующих бактерий при размещении отмытых водой корней на питательную среду с малатом (источник углерода) для отбора поверхностно локализованных бактерий и применения химической стерилизации поверхности корней с целью выделения бактерий гистосферы [15]. Хорошо известный в селекции

микроорганизмов модифицированный метод накопительных культур для выделения симбиотрофных азотфиксаторов, опубликованный в работе О. Берестецким с соавторами [16], который со временем дополнен Л. Кравченко с соавторами [17]. А. Белимовым предложен метод для поиска интродуцентов с высокой способностью к колонизации ризосферы корней растений через скрининг штаммов ассоциативных ростстимулирующих бактерий по признаку доминирования популяции в бактериальном сообществе ризосферы [18]. Выделение diaзотрофов с эндофитов семян предложено В. Волкогоном [19].

Исследования растительно-микробного взаимодействия требуют разработки новых доступных и результативных методологических подходов к выделению отдельных штаммов или консорциумов микроорганизмов, которые проявляют ассоциативность к определенному виду растений, а также определения этого свойства у перспективных для биотехнологии коллекционных штаммов.

В последнее время установилось понимание того, что селекция штаммов и изучение ассоциированных с корневой системой растений микроорганизмов должны основываться на принципе избирательности, следовательно, на использовании нативных выделений растений как трофической основы их функционирования.

Важным и принципиальным является методологический подход к выделению штаммов ассоциативных микроорганизмов, поскольку существует мнение о том, что физиологическая активность выделенных штаммов зависит от зоны корня, из которой их выделяли.

Авторами разработана и опубликована методологическая система [19] изучения ассоциативных микроорганизмов, основанная на введенном С. Виноградским принципе элективности, методе изучения эпифитов по Я. Худякову [20] с использованием модифицированных сосудов Леонарда [21]. Предложенная схема представляет сочетание различных методов с внесением необходимых модификационных изменений, позволяющих получать требуемый результат, в зависимости от поставленной цели.

Разработка системного подхода к выделению и изучению ассоциативных микроорганизмов базируется на том, что главным селективным фактором отбора микроорганизмов является функционирующая во взаимодействии с ними корневая система конкретного вида и сорта растений. При этом в элективной среде создаются условия, в которых энергетические потребности микроорганизмов на ключевых этапах их жизнедеятельности удовлетворяются за счет корневых выделений растения, а

влияние лимитирующего развитие растений фактора компенсируется в результате функционирования ассоциативных микроорганизмов.

Предложенная схема отбора эффективных штаммов ассоциативных микроорганизмов для определенного вида растений включает несколько этапов, как подготовительных, так и по отбору и оценке образцов (рис. 1).

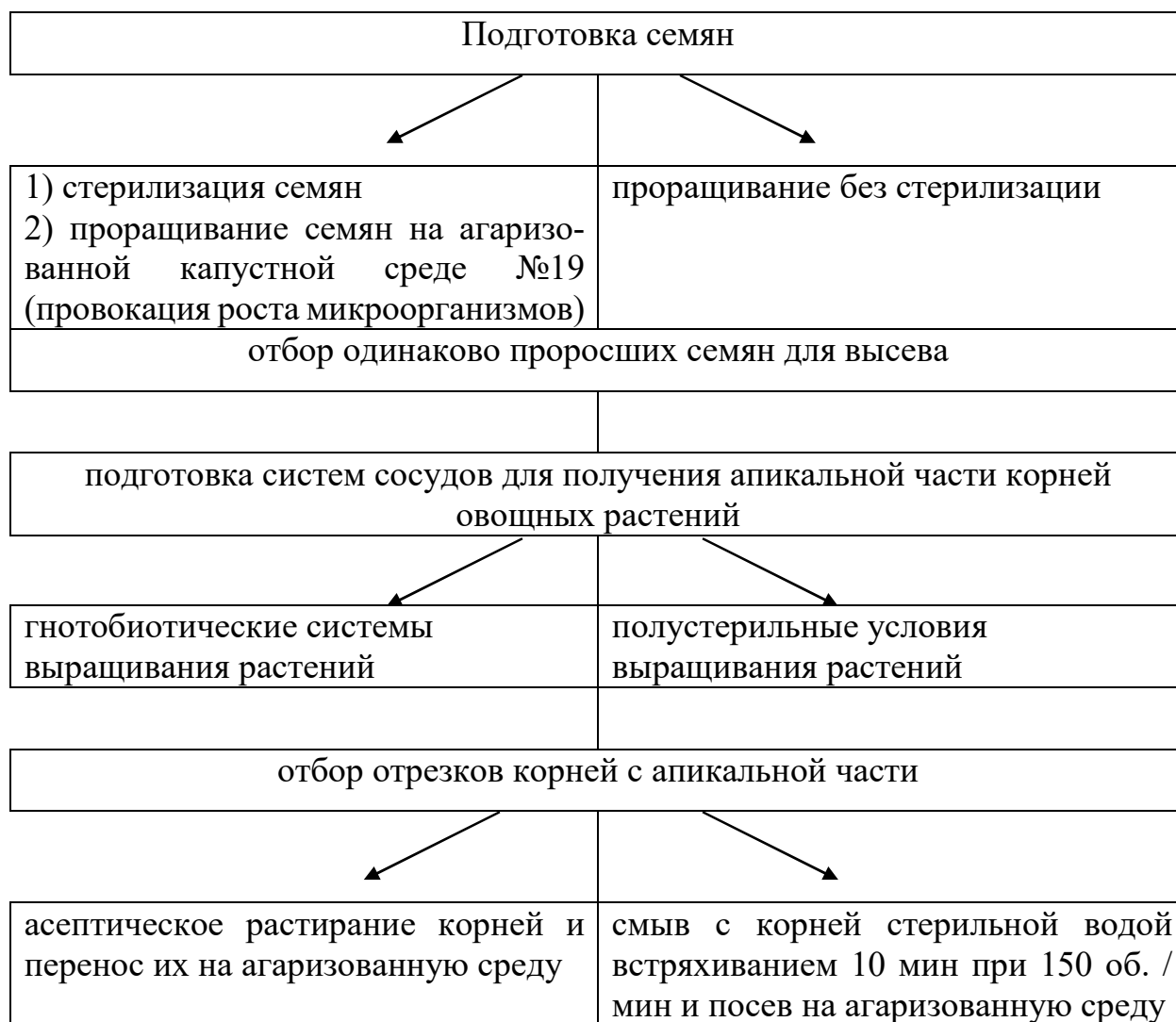


Рисунок 1 – Схема подготовки и отбора эффективных штаммов ассоциативных микроорганизмов к определенному виду растений

Таким образом, предложенная схема подготовки и отбора эффективных штаммов ассоциативных микроорганизмов к определенному виду или сорту растений составляет основу системного методологического подхода и отражает последовательность этапов селекционного процесса.

1.1 Подготовка семян перед закладкой опыта

Начальным этапом селекционного процесса является подготовка семян, которая зависит от задачи исследований. Выделение штаммов почвенных

микроорганизмов при участии эпифитов семян не требует их обработки. При исследованиях, исключающих присутствие эпифитной микробиоты семян, требуется их стерилизация. Любой из методов стерилизации должен обеспечивать главное требование – обеспечение полного отсутствия микроорганизмов на поверхности семян при полном сохранении их жизнеспособности. С целью установления наиболее эффективного способа стерилизации семян исследование проведено по схеме: 1) контроль; 2) 5% гипохлорит натрия; 3) 95% этиловый спирт 4) 0,1% сулема; 5) марганцовокислый калий.

В результате исследований установлено наиболее эффективный способ стерилизации семян томата, капусты и огурца – обработка раствором 0,1% сулемы с экспозицией 5 мин. С целью провокации роста оставшихся микроорганизмов стерилизованные семена проращивали на агаризованной капустной среде №19, после чего отбирали одинаково развитые проростки, не имеющие вокруг себя признаков бактериального или грибного роста.

С целью сохранения эпифитов семян и предотвращения контаминации нестерильные семена выращивают в стерильных чашках Петри на стерильной фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой. Подготовка сосудов для выращивания растений осуществляется по-разному, в зависимости от задачи исследований. Это могут быть гнотобиотические системы или системы для полустерильного выращивания растений.

Важно отметить, что при этом свободные от субстрата корни растения, обладая апикальным ростом, механически ничего не выносят из субстрата на своей поверхности. Прорастая сквозь слой почвы, корни контактируют с содержащейся в ней микробиотой и заселяются теми микроорганизмами, которые проявляют ассоциативность к данному виду растения. Учитывая то, что микроорганизмы и растение находятся в тесном взаимодействии и взаимовлиянии друг на друга, создаются условия накопительной культуры микроорганизмов при селективном воздействии корневых экссудатов и лимитирующего фактора. Лимитирующий фактор для растений можно создавать искусственно, изменяя с разным уровнем и составом питательных элементов субстрат, на котором растут и развиваются макроорганизмы. Таким образом обеспечиваются условия, при которых поверхность корней, начиная с апикальной части, активно заселяют ассоциативные микроорганизмы. Свободную от субстрата часть корня отрезают стерильным инструментом и используют для микробиологического анализа или для инокуляции семян в последующих опытах.

Уже на этом этапе корни заселяются небольшим количеством видов микроорганизмов, которое еще больше уменьшается при следующих пассажах на растениях, выращиваемых на селективном субстрате. Это упрощает процесс поиска и выделения активных ассоциативных штаммов микроорганизмов. После выделения и очистки штаммов в селективных условиях оценивается их индивидуальная способность ассоциироваться с корневой системой определенного вида или сорта растения.

1.2 Выделение штаммов ассоциативных бактерий в стерильных и полустерильных условиях

Первый вариант методики выделения штаммов в стерильных условиях. Важным этапом—методики является подготовка вегетационных сосудов (рис. 2), которая заключается в обвязке горловины бутылки (3) из темного стекла с удаленным дном мелко ячеечной капроновой сеткой или мельничным газом (2), удерживающими от высыпания субстрат, но не препятствующими проникновению корней растений. Это позволяет получить корни растений, которые благодаря их апикальному росту свободные от субстрата. Подготовленную таким образом бутылку вставляют в сосуд (1) соответствующего диаметра, в который предварительно вливают дистиллированную воду (слой воды на уровне 1-3 см) для поддержания высокой влажности воздуха. Иногда, для длительных опытов, к горловине бутылки прикрепляют фитиль (8), нижний конец которого размещают в сосуд со слоем воды для увлажнения субстрата. В месте соединения с сосудом бутылку обвязывают ватно-марлевой повязкой (4), обеспечивающей плотность соединения сосудов и асептические условия в них. При необходимости уменьшения газовой проницаемости, место соединения сосудов дополнительно уплотняют 3-5 слоями целлофановой ленты, размоченной в воде и закрепленной несколькими витками ниток. После заполнения бутылки (2) кварцевым песком или другим подходящим субстратом (например, вермикулитом) до необходимого уровня, его насыщают селективным питательным раствором, не содержащим азота и источников энергии к моменту стока его в сосуд (1). На бутылку из темного стекла (2) ставят аналогичную, но из бесцветного стекла (6), а место соединения (5) обвязывают лентой целлофана, размоченного в воде, как описано выше. Горловину верхней (бесцветной) бутылки закрывают ватно-марлевой пробкой (7) и накрывают бумажным колпаком. Подготовленный комплекс сосудов из трех частей (см. рис. 2) стерилизуют в автоклаве. После автоклавирования целлофан плотно прижимается к стеклу, что обеспечивает необходимую прочность и герметичность соединения. В качестве сосудов можно

использовать подобранные по размерам пробирки, стеклянные бутылки, банки и бутылки.

В остывшие сосуды через горловину верхней бесцветной бутылки асептически вносят семена, присыпают их слоем стерильного речного песка (1,5 см) и закрывают ватно-марлевой пробкой, что обеспечивает стерильность и газообмен.

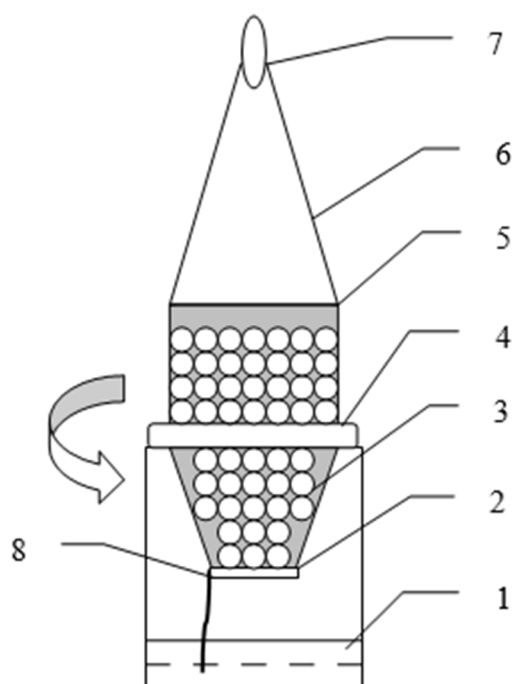


Рисунок 2 - Модифицированные вегетационные сосуды Леонарда для получения апикальной и свободной от субстрата части корня растения (гнотобиотическая система, 1-й вариант методики): 1 – сосуд, наполненный водой; 2 – мелкая ячейчатая капроновая сетка; 3 – бутылка из темного стекла, наполненная субстратом; 4 – ватно-марлевая повязка для плотности соединения сосудов; 5 – место соединения двух сосудов, обвязанное лентой целлофана; 6 – бутылка из бесцветного стекла; 7 – ватно-марлевая пробка; 8 – фитиль, обеспечивающий увлажнение субстрата

Выращивание растений проводится в люминостате. Вегетирующие растения образуют корни, которые проходят через горловину темной бутылки, обвязанной мельничным газом. Для анализа отбирают фрагменты свободных от субстрата корней с их апикальной частью. В таких условиях на корнях будут развиваться исключительно бактерии из семян, поскольку других источников (при поддержке стерильных условий) не существует. Если в опыте использовать поверхностно стерилизованные семена, можно получить корни, заселенные эндофитами семян.

Второй вариант методики (полустерильные условия) получения штаммов ассоциативных микроорганизмов. Отличие излагаемой методики

от предыдущей состоит в том, что из комплекса сосудов исключается верхняя прозрачная бутылка, а заселение свободных от субстрата корней растений микроорганизмами осуществляется по восходящему типу (рис. 3).

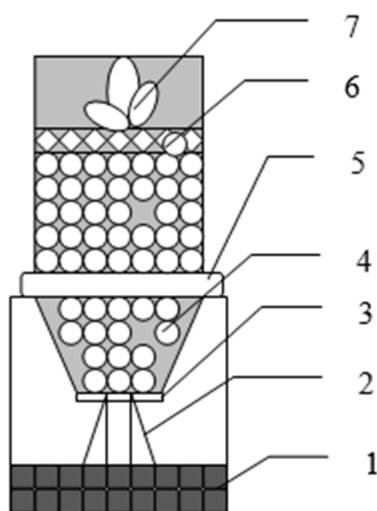


Рисунок 3 – Модифицированные вегетационные сосуды Леонарда (полустерильные условия, 2-й вариант методики): 1 - сосуд, наполненный почвой; 2 – корни растений, свободные от субстрата; 3 – мелко ячеечная капроновая сетка или мельничичный газ; 4 – бутылка из темного стекла, наполненная субстратом; 5 – ватно-марлевая повязка для плотности соединения сосудов; 6 – слой стерильного парафинированного по Ван-Шревену песка; 7 – нестерильная часть растения

Бутылку из темного стекла (4) заполняют кварцевым песком или другим подходящим носителем-наполнителем (например, вермикулитом) до необходимого уровня, субстрат насыщают (в случае выделения diaзотрофов) безазотистым питательным раствором до стекания его в банку (1). Перед стерилизацией бутылку (4) закрывают широкой ватно-марлевой пробкой с бумажным колпачком.

С охлажденной после стерилизации системы снимают ватно-марлевую пробку, асептически раскладывают семена на субстрате и засыпают 1,5 см слоем стерильного парафинированного по Ван-Шревену песка (6), который предотвращает проникновение микроорганизмов из воздуха к корням во время вегетации растений. Приготовление парафинированного песка заключается в следующем: 10 г парафина с высокой температурой плавления растворяют в 1 л бензола и тщательно смешивают с 10 кг отмытого кварцевого песка. После выпаривания бензола песок в течение двух часов стерилизуют сухим жаром при 160 °С [21].

Выращивание растений проводится в люминостате. В день появления свободного от субстрата корня (2) заменяют нижний сосуд на аналогичный, но наполненный нестерильной, увлажненной до 60% от полной влагоемкости почвой исследуемого образца слоем 2,5-3,5 см (1).

В этих условиях растение продолжает развиваться. Стерильный корень, свободный от субстрата, дорастает до почвы, погружается в нее, контактирует с микроорганизмами и заселяется ими. В сложившихся условиях по свободной от субстрата части корня могут в восходящем направлении распространяться только те микроорганизмы, которые ассоциируются с корневой системой исследуемого растения. Чем выше уровень подъема микроорганизмов по корневой системе растения, тем выше степень их ассоциативности. Наиболее конкурентоспособные в этом смысле микроорганизмы поднимаются к базальной части корня. Поэтому в опытах со сроком вегетации, например, пшеницы, в течение 1-1,5 месяца, предлагаем для анализа использовать отрезки корней, отобранные на расстоянии до 4 см от узла кущения [19].

Практически постановка опыта в сосудах завершается срезанием и удалением нижней, свободной от субстрата, части корня (ближе к мельничному газу), осторожным ссыпанием защитного слоя парафинированного песка, изъятием корневой системы растений из субстрата, встряхиванием его остатков и стерильным отбором необходимой для анализа части корня.

Третий вариант методики выделения ассоциативных микроорганизмов. Метод предложен для выращивания растений в полустерильных условиях и получения микроорганизмов от нисходящего направления заселения корней. При этом вегетационный сосуд (бутыль из темного стекла (3)) заполняют почвой исследуемого образца, увлажненной до 60% от полной влагоемкости (рис. 4). На дно нижнего сосуда (1) слоем 1-3 см наливают воду для поддержания высокой влажности воздуха. Корни, которые прорастают сквозь слой почвы, контактируют с почвенными микроорганизмами. В таких условиях свободные от субстрата корни в процессе формирования заселяются теми из них, которые самостоятельно или при взаимодействии с другими микроорганизмами способны ассоциироваться с корневой системой растения и распространяться по ней. Поскольку микроорганизм и растение находятся во взаимодействии друг с другом, складываются условия накопительной культуры микроорганизмов при селективном воздействии корневой системы растения и его экссудатов. Выделение ассоциативных diaзотрофов осуществляется с апикальной и прилегающей части корней, свободных от субстрата.

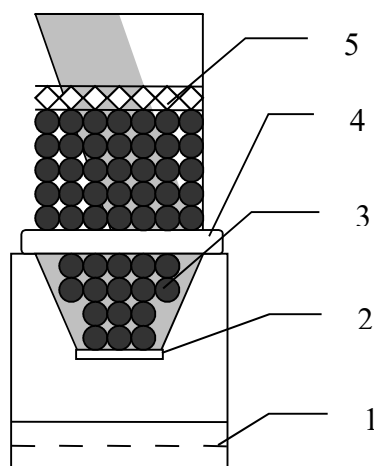


Рисунок 4 – Модифицированные вегетационные сосуды Леонарда для получения апикальной и свободной от субстрата части корня растения (полустерильные условия, 3-ий вариант методики): 1 – сосуд, наполненный водой; 2 – мелко ячеечная капроновая сетка; 3 – бутылка из темного стекла, наполненная почвой; 4 – ватно-марлевая повязка для плотности соединения сосудов; 5 – слой стерильного парафинированного по Ван-Шревену песка

1.3 Процесс выделения изолятов бактериальных культур

Изоляты diaзотрофов с апикальной части корней можно выделять несколькими способами:

- отрезки полученных корней асептически подвергают контакту с поверхностью агаризованной среды в чашке Петри;

- фрагменты корней помещают в колбу со стерильной дистиллированной водой, интенсивно перемешивают и инокулируют агаризованные среды Доберейнер и Эшби (при обоих способах будут изолированы бактерии, которые развиваются на поверхности апикальной и свободной от субстрата частях корня);

- гомогенизируют корни, готовят разведения и высевают на селективные агаризованные среды (выделяют бактерии, как с поверхности корней, так и из внутренних тканей). Колбы с разведенным в дистиллированной воде гомогенизатом корней выдерживают в термостате 3-4 суток до образования заметной пленки роста бактерий или четко видимого локального помутнения среды. Часть из полученной пленки (помутнение) роста бактерий петлей переносят на соответствующие агаризованные среды (безазотные, но с добавлением 1 г/л дрожжевого экстракта в качестве стимулирующей добавки).

Выделение изолятов осуществляется по отдельным колониям, которые в дальнейшем подвергаются проверке на чистоту и тестирование на способность к фиксации атмосферного азота, стимуляции роста растений.

Оценка эффективности изолята на растениях является основанием для дальнейшего изучения технологичности, а также физиолого-биохимических свойств, генетических особенностей с целью его идентификации в качестве штамма.

Используя изложенные модификации метода, можно выделять штаммы ассоциативных бактерий как с эпифитного микробиома нестерилизованных семян, так и из почвы, применяя поверхностно стерилизованные семена. Возможно также выделение ассоциаций почвенных микроорганизмов и на конкурентном фоне эпифитной микробиоты семян при использовании в опытах нестерилизованных семян.

Следует отметить, что возможности этого метода принципиально расширены с использованием при закладке опыта семян, инокулированных одним из активных, ассоциативных к этому виду растений, коллекционным штаммом (который в данном случае называем «ведущим»). Ассоциации микроорганизмов, которые селекционируются корневой системой растений, инокулированных ведущим штаммом, с исследуемого образца почвы, определяются как «сопутствующие» к использованной ассоциативной бактерии.

Учитывая перспективность использования смешанных культур азотфиксирующих микроорганизмов [18] и отсутствие методов отбора и селективного формирования таких консорциумов, указанный методологический подход способен в определенной степени обеспечить достижение поставленной цели.

1.4 Порядок осуществления первичного испытания полученных изолятов

В дальнейших исследованиях изолированные из корневых сфер (ризосферы, ризопланы, гистосферы) штаммы азотфиксирующих бактерий оцениваются по их перспективности. При этом основное внимание должно быть сосредоточено на следующих вопросах: способность штаммов положительно влиять на ход процесса азотфиксации на корнях бактеризованных растений; возможность сохранять свойства и выполнять функции интродуцированного бактериального штамма в корневой зоне; оценка влияния бактеризации на продукционный процесс культурных растений.

Методологические подходы относительно перспектив интродукции ассоциативных diaзотрофов в зону корней растений предусматривают испытание в моноксеничной культуре и в нестерильных условиях. Следует

отметить, что более правильными являются испытания в нестерильных условиях, поскольку при отсутствии конкурирующих микроорганизмов бактерии могут достичь интенсивной колонизации корня даже нетипичного для нее культурного растения. Инокуляция в нестерильных условиях может представить комплексную характеристику изолята: его вирулентность, конкурентоспособность, влияние на продукционный процесс у растений и т.д.

Первичное испытание изолятов (микровегетационные опыты) производится в следующей последовательности:

- инокуляция семян (из расчета 200-300 тыс. клеток / семя);
- посев бактеризованных семян в вегетационные сосуды небольшого объема (главное, чтобы их можно было герметизировать для ввода ацетилена и определения интенсивности азотфиксации), предварительно заполненные почвой со смесью Прянишникова (азот вносят из расчета 13-15 мкг/кг почвы);
- выращивание растений в течение 30 суток;
- определение ацетиленовым методом активности азотфиксации в ассоциации с исследуемым штаммом. Критерием активности являются показатели контрольного (без инокуляции) варианта;
- отбор для дальнейшего исследования перспективных штаммов.

После первичного тестирования изолятов в микровегетационных опытах следует провести их испытания в условиях вегетационных опытов. При этом учитывают биометрические показатели растений (высота, масса побега и корня), влияние бактеризации на активность ассоциативной азотфиксации, содержание азота в продукции. Поскольку для определения активности азотфиксации ацетиленовым методом главным требованием является герметизация сосудов, в своих опытах авторы используют пластмассовые сосуды емкостью 1100 мл, которые после среза надземной массы герметично накрываются крышками.

Наиболее активные изоляты испытывают в полевых условиях. Параллельно проводят идентификацию бактериальных культур и определяют степень колонизации корневых сфер растения-хозяина для оценки ассоциативности изолята и выяснения особенностей его пространственных связей с растением.

1.5 Изучение интенсивности колонизации интродуцированными штаммами бактерий корневых сфер растения

Изучение интенсивности колонизации интродуцированными штаммами бактерий корневых сфер (ризосферы, ризопланы и гистосферы) растения необходимо проводить для возможной дифференциации их на те, которые:

- интенсифицируют рост растений и процесс ассоциативной азотфиксации благодаря первичному воздействию на организм растения-хозяина бактериальных фитогормонов, и не развиваются при этом в прикорневой зоне (до 5 мм от поверхности корня – ризосфера), то есть продуцентов физиологически активных веществ;

- интенсивно развиваются в ризосфере, на поверхности (ризоплане) и внутри корня (гистосфере), связывая атмосферный азот и снабжая растения биологически активными соединениями в течение вегетационного периода.

В первом случае инокуляция может быть эффективной, поскольку физиологически активные вещества, фитогормоны в том числе, могут положительно влиять на процесс ассоциативной азотфиксации [22-24]. Следует учесть, что при этом влияние микроорганизма на развитие растений будет только на начальных этапах их вегетационного периода. При бактериализации семян физиологически активные вещества бактериального происхождения могут повлиять на развитие корневой системы и предоставить дополнительную нишу для развития аборигенных diaзотрофов почвы. Такие штаммы могут быть потенциально полезным для растениеводства, но они не могут считаться ассоциативными азотфиксаторами. Поэтому внимание следует сосредоточить на поиске штаммов, способных развиваться в ризосфере и ризоплане растений или гистосфере, активно влиять на рост и развитие растений, обеспечивая их при этом азотом и биологически активными соединениями, в течение вегетационного периода.

Для изучения интенсивности развития интродуцированных бактерий в эконишах одним из доступных методов является использование в опытах мутантов, устойчивых к определенным концентрациям антибиотиков в питательной среде.

Для получения мутантов, возникающих спонтанно, целесообразно использовать метод Зибальского [25], который дает возможность плавно манипулировать концентрациями антибиотика. Это гарантирует возможность получения мутантов бактерий без изменения их основных функциональных свойств. Метод состоит из следующих этапов.

1. В стерильные чашки Петри разливают по 10 мл стерильной агаризованной среды, приемлемой для выращивания исследуемой бактерии, и оставляют их для остывания в наклонном положении, чтобы образовался скошенный агар. Отмечают на стекле направление скоса.

2. После застывания агара чашки размещают горизонтально и наливают в каждую еще по 10 мл агаризованной среды с одним из антибиотиков (например, сульфатом стрептомицина, 100 мкг/мл). Антибиотик (раствор

антибиотика) добавляют в расплавленную и охлажденную стерильную питательную среду асептически.

3. Агару второго слоя дают возможность застыть в горизонтальном положении.

4. Чашки с двумя слоями агара выдерживают 24 часа. При этом антибиотик верхнего слоя проникает в нижний, в результате чего формируется градиент его концентрации от 0 мкг/мл в одном из краев чашки до максимально выбранной концентрации.

5. На агар пипеткой наносят каплю бактериальной суспензии выбранного штамма (или петлей небольшое количество биомассы, если штамм выращивают на агаризованной среде), равномерно распределяют стерильным шпателем на поверхности.

6. Инкубируют чашки в термостате в течение времени, необходимого для роста данного вида бактерий.

7. Колонии, выросшие ближе к высокой концентрации, отбирают асептически петлей и переносят на другую градиентную чашку, распределяют на поверхности и инкубируют в течение необходимого для роста времени. Как правило, после второго пересева на агаре наблюдается сплошной бактериальный рост.

8. Колонии, выросшие на уровне максимальной концентрации антибиотика, пересевают в чашки с большим градиентом концентрации антибиотика (в 5-10 раз) и проводят дальнейшие адаптации вышеописанным способом.

9. Отобранные колонии пересевают на агар с антибиотиком (без градиента концентрации) для проверки закрепленности признака.

10. Антибиотикоустойчивые мутанты пересевают несколько раз в агар без антибиотика и последний раз – на агар с антибиотиком для окончательной проверки закрепления нового признака.

Как правило, мутанты, устойчивые к стрептомицину с концентрацией 2000 мкг/мл среды, получают в течение месяца. Для других антибиотиков такая концентрация может быть слишком высокой, и, следовательно, лишней. При выборе антибиотика следует обратить внимание на особенности его растворения (в воде, этаноле и т.д.).

После получения антибиотикоустойчивого мутанта его используют в опытах с инокуляцией параллельно с исходным штаммом. Исследование следует проводить в условиях вегетационных опытов, поскольку интродукция в окружающую среду антибиотикоустойчивых бактерий нежелательна. В динамике материал (разведение ризосферной почвы, гомогенатов корня)

высевают на среды с антибиотиком. При этом антибиотикоустойчивый мутант будет иметь преимущества в развитии на среде с антибиотиком. Теоретически, должны формироваться исключительно колонии исследуемого штамма, но на практике, чаще развиваются представители нескольких таксономических подразделений. Однако, при этом «отсекается» возможность развития большей части почвенных микроорганизмов, что позволяет провести учет численности исследуемой бактерии. В своей практике авторы используют следующий методический подход для учета ассоциативных diaзотрофов, адаптированных к антибиотикам. В связи с тем, что метод получения антибиотикоустойчивых мутантов по Зибальскому позволяет плавно манипулировать концентрациями антибиотиков, бактериями не утрачивается способность к фиксации атмосферного азота. Это позволяет использовать полужидкие среды с антибиотиком и соответствующими конкретной бактерии источниками углерода и методику предельных разведений, и ацетиленовый тест. Численность бактерий при этом определяют по таблицам Мак-Креди, за «плюсовые» принимают показатели с активностью не ниже 5 нмоль C_2H_4 / час. В этих условиях элективность среды кроме действия антибиотика усиливается необходимым источником питания и возможностью развития только азотфиксирующих бактерий.

Проведение этого анализа дает возможность определить, какие корневые зоны колонизируют мутанты (то есть, топологические сферы заселения) и с какой интенсивностью. В комплексе с оценкой влияния на процесс ассоциативной азотфиксации и продуктивность растения, как интегральный показатель, это позволяет определить степень ассоциативности исследуемой бактерии. Считается, что изменения в активности азотфиксации на корнях или в ризосферной почве могут вызвать микробные популяции плотностью не ниже $1 \cdot 10^5$ клеток в 1 г. При этом, чем ближе к поверхности корня будут развиваться клетки исследуемой бактерии, тем выше можно считать степень ассоциативности.

Для определения численности и локализации ассоциативных микроорганизмов в ризосфере, ризоплане или гистосфере растений существует ряд современных методов и подходов молекулярной биологии с использованием высокопроизводительного секвенирования библиотек гена 16SpPHK (таксономический анализ) и ПЦР с детекцией в реальном времени (количественный анализ микробиоты) и др.

Селекционированные в ходе скрининга штаммы в дальнейшем следует изучать на специфичность по видам растений, технологичность при разработке биопрепарата, а также условия их эффективного использования (оптимальный агрофон, совместимость с ядохимикатами и т.д.).

2. СЕЛЕКЦИЯ АССОЦИАТИВНЫХ ШТАММОВ РИЗОБАКТЕРИЙ С РАСТЕНИЯМИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ

Мельничук Т.Н., Шерстобоев Н.К., Якубовская А.И., Каменева И.А., Еговцева А.Ю., Абдурашитов С.Ф., Абдурашитова Э.Р., Радченко А.Ф., Радченко Л.А., Паштецкий В.С., Ганоцкая Т.Л., Гритчин М.В.

Ассоциативность исследуемого бактериального штамма к конкретному виду растений и его специфичность удобно оценивать также с использованием предлагаемых методов. Вышеизложенная методика получения свободных от субстрата корней в сосудах Леонарда с песком, насыщенным соевым раствором безазотистой среды Виноградского, и высеянными инокулированными различными бактериальными штаммами семенами, может быть с успехом приспособленной для этого. Штаммы ассоциативных микроорганизмов существенно отличаются между собой по скорости заселения свободных от субстрата корней растений, включая их апикальную часть. Дифференцирование штаммов ассоциативных бактерий по скорости заселения свободного от субстрата корня позволяет условно разделять их на три группы.

К первой группе высокоассоциативных к определенному виду или даже сорту растения можно отнести бактериальные штаммы, которые высеваются в первые сутки образования свободного от субстрата корня, то есть быстро распространяются по корню в процессе его формирования. Вторую группу составляют среднеассоциативные штаммы, наличие которых регистрируется на третьи сутки после формирования свободного от субстрата корня. Третью группу составляют низкоассоциативные или неассоциативные штаммы, которые не встречаются на свободных от субстрата корнях в течение 3 суток наблюдений.

Предложенная методика апробирована на различных видах растений с целью изучения специфичности бактерий и позволяет удобно и быстро дифференцировать штаммы по степени ассоциативности к конкретному виду растений. Например, показано, что штаммы *Flavobacterium* sp. L 30 и Кл-9 появляются на апикальной части корня ячменя в первые сутки его формирования, а на свободных от субстрата частях корня пшеницы оба штамма не обнаружены в течение всего периода наблюдений (14 суток). Приведенный пример четко демонстрирует наличие видовой специфичности штаммов diaзотрофов и удобство её определения предложенным методом. Отобранные по предложенным методикам активные штаммы ассоциативных diaзотрофов используются в дальнейшей работе для создания микробных препаратов.

Дальнейшие исследования были направлены на выделение штаммов микроорганизмов, ассоциативных к растениям следующих видов: *Solanum lycopersicum* L., *Brassica oleracea* var. *capitata* L., *Cucumis sativus* L., *Triticum aestivum* L., *Oryza sativa* L., *Sorghum bicolor* L., *Salvia sclarea* L. и *Coriandrum sativum* L., а также изучение их свойств и влияние на растения.

2.1 Ассоциативные штаммы бактерий к овощным культурам

Овощи являются незаменимыми продуктами рационального питания человека, потребляемыми преимущественно в свежем виде. Этим обусловлены достаточно высокие требования к их качеству. Следовательно, выращивание овощных культур должно ориентироваться на биологические технологии, элементом которых является применение микробных препаратов.

Начальный этап исследований состоял в подборе субстратов, способных обеспечить поступление ассоциативных микроорганизмов к тому или другому виду овощных растений. Для выращивания капусты сорта Дитмаршер Фрюер, томата сорта Шанс и огурца сорта Феникс подобрано три субстрата на основе чернозема южного. Образцы чернозема южного были отобраны с целинного участка и поля овощного севооборота. Третьим субстратом представлена тепличная смесь на основе полевой почвы овощного севооборота с добавлением торфа 20% и перегноя 10%. В таких условиях получены свободные от субстрата корни, с которых выделяли штаммы ассоциативных бактерий.

Предварительный микробиологический анализ образцов субстратов, из которых проводили выделение ассоциативных микроорганизмов к определенным видам растений, показал, что в тепличной смеси почти вдвое больше бактерий и микромицетов, чем в черноземе южном целины и овощного севооборота, где их количество отмечено на одном уровне (табл. 1).

Таблица 1 – Количество микроорганизмов в образцах чернозема южного, использованных для выращивания растений при выделении штаммов ассоциативных бактерий

Образец почвы (чернозем южный)	Бактерии, выросшие на капустной среде, $\times 10^6$ КОЕ/г абс. сух. почвы	Микромицеты, выросшие на сусло-агаре, $\times 10^3$ КОЕ/г абс. сух. почвы
Целина	1,03 \pm 0,65	21,9 \pm 9,9
Овощной севооборот (ОС)	1,12 \pm 0,25	25,2 \pm 4,4
Тепличная смесь (ОС+ 20% торф и 10% перегной)	2,80 \pm 0,56	69,5 \pm 9,1

Следовательно, образцы чернозема южного целины и овощного севооборота, с близким по количеству содержанием бактерий и

микромикетов, и вдвое превышающим тепличной смеси стали основой для выделения штаммов ассоциативных бактерий к овощным растениям.

2.1.1 Выделение изолятов, ассоциативных с *Solanum lycopersicum* L., *Brassica oleracea* var. *capitata* L. и *Cucumis sativus* L.

Качественный состав микроорганизмов апикальной части и свободных от субстрата корней растений определяли путем поверхностного посева на агаризованную капустную среду №19. На 4-5-е сутки проводили количественный учет выросших микроорганизмов по морфологии колоний, с описанием и присвоением отдельному морфотипу порядкового номера. Из различных по морфотипу колоний микроорганизмов проводили отсев в пробирки на ту же среду.

С целью выявления доминирующих форм определяли обилие морфотипов микроорганизмов и их частоту встречаемости в зависимости от вида растения и образца почвы или субстрата, с которым контактировали корни. Микробиологический анализ апикальной части корней капусты сорта Дитмаршер Фрюер показал, что морфотипы микроорганизмов малочисленны и только один из них превышал 65% рубеж по их обилию (рис. 5).



Рисунок 5 - Частота встречаемости морфотипов микроорганизмов на апикальной части корней капусты (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) сорта Дитмаршер Фрюер, выращенной на различных образцах чернозема южного: целина (1-10), тепличная смесь (12-21), почва овощного севооборота (23-33)

Морфотип с высоким показателем обилия вида получен при выращивании растений на тепличном субстрате, где отмечена наиболее высокая частота встречаемости всех морфотипов: половина из них имела показатель более 80%, а остальные – не менее 50% по сравнению с другими

субстратами. Следует отметить, что именно в тепличной смеси исходное количество микроорганизмов наиболее высоко.

Аналогичные исследования микроорганизмов, полученных с апикальной части корней растений огурца сорта Феникс, выращенных на черноземе южном, показали наименьшее количество морфотипов среди других исследуемых видов растений. Морфотипы, выделенные с тепличной смеси, отличались высокой частотой встречаемости (до 70%), тогда как полученные с целины максимальным обилием их (рис. 6).



Рисунок 6 – Частота встречаемости морфотипов микроорганизмов на апикальной части корней огурца (*Cucumis sativus* L.) сорта Феникс, выращенного на различных образцах чернозема южного: целина (1-9), тепличная смесь (10-19), почва овощного севооборота (20-27)

Проведена сравнительная оценка разнообразия видов микроорганизмов, выделенных из апикальной части корней трех видов растений (*Solanum lycopersicum* L., *Brassica oleracea* var. *capitata* L., *Cucumis sativus* L.) и выращенных на трех образцах чернозема южного. Показано, что наибольшая частота встречаемости морфотипов наблюдалась среди микроорганизмов, выделенных с апикальной части корней капусты сорта Дитмаршер Фрюер независимо от субстрата и томата сорта Шанс при выращивании его на целинной почве; наименьшая – в полученных из корней огурца сорта Феникс (табл. 2). Количество морфотипов микроорганизмов, полученных из апикальной части корней томата сорта Шанс, превышала показатели среди исследуемых видов растений и достигала 20. При сравнении субстратов, на которых выращивали томат, отмечено наибольшее количество (20) морфотипов на целинной почве. В этом субстрате обилие морфотипов достигала максимального показателя – 49,9%, как и частота встречаемости –

100%. На двух других субстратах обилие морфотипов составляла 27 и 28 %, их частота встречаемости не превышала 80 %.

Таблица 2 – Разнообразие морфотипов микроорганизмов на апикальной части корня овощных растений (почва – чернозем южный)

Растения	Образец почвы	Количество морфотипов, шт.?	Частота встречаемости морфотипа, %		Обилие морфотипа, %	
			min	max	min	max
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.	целина	10	20	90	0,3	54,5
	овощной севооборот	11	17	100	0,5	43,6
	тепличная смесь	10	50	100	0,5	65,4
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	целина	20	10	100	0,2	49,9
	овощной севооборот	16	10	80	0,2	28,0
	тепличная смесь	16	10	80	0,3	27,0
<i>Cucumis sativus</i> L.	целина	10	10	60	1,8	41,3
	овощной севооборот	8	10	40	2,2	22,8
	тепличная смесь	9	10	70	0,2	29,8

Таким образом, разработанный методологический подход обеспечивает получение новых штаммов микроорганизмов, ассоциированных к определенному виду растений. Количество полученных видов микроорганизмов, их обилие и частоту встречаемости обеспечивает в первую очередь вид растения (корневые экссудаты различные по составу), во вторую – виды микроорганизмов в почве или её смеси с другими компонентами (торф, перегной и т.д.), но не зависят от исходного количества микроорганизмов в образцах.

2.1.2 Морфологические, физиолого-биохимические свойства и идентификация ассоциативных изолятов овощных культур

Учитывая возможности современных методологических подходов к изучению и идентификации выделенных штаммов, необходимо сочетать исследования морфологических, культуральных, физиологических, биохимических, структурных, генетических, молекулярно-биологических, экологических свойств с целью выявления в них уникальных и достаточно стабильных признаков [26].

Обязательным условием изучения свойств микроорганизма и его идентификации является чистота штамма. Предварительная оценка характера роста на агаризованных средах и микроскопирования полученных в результате отбора микроорганизмов показала, что среди 107 морфотипов, выделенных из апикальной части корней капусты (31), томата (52), огурца (24), достаточно много ассоциаций, состоящих с двух, а иногда из трех видов. Для идентификации отобраны предварительно подготовленные, выделенные из отдельных колоний, изоляты. Микроскопирование культур показало, что в большинстве клетки имеют палочкообразную форму, различную по размерам и отношению толщины к длине.

Среди микроорганизмов, выделенных по разработанному методу, с апикальной части корней капусты *Brassica oleracea* var. *capitata* L., выросших на черноземе южном овощного севооборота, выделен штамм, который при культивировании на агаризованной капустной среде №19 формировал колонии с характерным пигментом голубого цвета (рис. 7).



Рисунок 7 – Колонии штамма П10 на агаризованной капустной среде №19

В научной литературе описаны представители вида *Pseudomonas lemonnieri*, которые образуют красно-оранжевый пигмент, диффундирующий в среду и извлекаемый бутанолом, 290 и 510 нм, наряду с пигментом образуются антибиотики (производные флюороглюцина). Возможны беспигментные варианты со слабым синтезом антибиотика, образуют леван, активные денитрификаторы, хорошо усваивают ксилозу, сахарозу, масляную кислоту, этанол и пропанол [27]. Представители известного биовара IV *P.*

fluorescens способны образовывать пигменты подобны выделенному штамму П10.

При исследовании штамма П10 установлен его хороший рост на средах с органическими источниками азота. В среде №19 (капустный агар) форма колонии 3-х суточной культуры округлая, профиль чуть выпуклый с поднятым ровным краем, поверхность гладкая, размер 2-3 мм в диаметре, полупрозрачная. Цвет желтовато-бежевый на просвет с голубоватым оттенком, способен образовывать синий пигмент; консистенция слизистая; структура однородная. При микроскопировании клетки представляют собой подвижные мелкие короткие палочки с зауженными концами, одиночные и соединены попарно. Рост на средах с минеральными источниками азота хороший. На среде Козера 5-суточная культура дает хороший рост, пигмент не образует. На МПБ образует кольцо и осадок, помутнение интенсивное.

На картофеле рост хороший, слизистой консистенции, цвет косяка светло-коричневый, потемнение отмечено в основания (внизу). Среда с желатином: рост поверхностный средней интенсивности. Разжижение желатина медленное. Происходит осветление лакмусового молока до цвета топленого молока (подщелачивание), а также коагуляция с образованием полупрозрачной сыворотки (слоем до 1/3 столбика) и сгустка; пристенное кольцо белое, внутри зелено-голубое, пленка тонкая, постепенно расслаивается. На среде МПА с крахмалом гидролиз крахмала отсутствует. Происходит восстановление нитратов до газообразного азота: в среде Гильтая интенсивное посинение и газообразование. Рост при 37 °С интенсивный.

Для установления таксономической принадлежности штамма *Pseudomonas* sp. П10 – аплифицирован фрагмент гена 16S рРНК с использованием праймеров ВD/RD. Проведенное секвенирование данного фрагмента позволило получить следующие нуклеотидные последовательности:

```
GCAGTCTCTTAGAGTGCCACCATGACGTGCTGGTAACTAAGGACAGGTTGCG
CTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAG
CACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCATTGGATGTC
AAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTG
TGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACSTTGCGGCCGTA CTCCCCAGGCGG
TCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAGTTGA
CATCGTTTACGGCGTGGA CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCG
CACCTCAGTGTCAGTATCAGTCCAGG.
```

В результате BLASTn анализа в NCBI подтверждено, что исследуемый штамм *Pseudomonas* sp. П10 относится к роду *Pseudomonas*. Можно

предположить о его принадлежности к виду *Pseudomonas fluorescens*, поскольку уровень гомологии гена 16S рРНК между штаммами составляет 98,0%.

В исследование по изучению свойств микроорганизмов и их идентификации включено 24 изолята, среди которых представители, выделенные из различных видов растений, выращиваемых на различных субстратах. Проводили исследования морфологических, культуральных, биохимических и физиологических свойств изолятов по общепринятым в микробиологии методикам.

Как референтный использован штамм *Azotobacter vinelandii* 10702, который имел следующие культурально-морфологические и физиолого-биохимические особенности. В односуточной культуре клетки подвижны, благодаря перитрихальным жгутикам. Клетки овальной формы 2 мкм в ширину, длина варьирует к коковидной форме, особенно при старении культуры. На вторые сутки начинает образовывать цисты. Культура грамотрицательная, каталазоположительная, аэроб, оптимум рН 7,2, температуры 28°C, хорошо растет на безазотистой среде Виноградского с сахарозой, образуя водорастворимый флюоресцирующий пигмент зеленого цвета, который при старении приобретает буроватый оттенок. Крахмал не ферментирует, усваивает глюкозу, маннит, рафинозу и рамнозу. Протеолитическая активность отсутствует, но на гороховой среде способен расти. Все бактерии рода *Azotobacter* патогенными свойствами не обладают.

Кроме того, в качестве референтных использованы еще два штамма: *Rhizobium (Agrobacterium) radiobacter* 10 и *Lelliottia nimipressuralis* 32-3. Штамм *R. radiobacter* 10 выделен как фосфатмобилизующий, то есть способен превращать труднорастворимые соединения фосфора в легкодоступные для растения. Он удовлетворительно растет на средах, содержащих органические формы азота, и хорошо – с минеральным азотом. На мясопептонном бульоне образует пленку, помутнение и осадок. Пептонизирует молоко, но не разжижает желатину и не ферментирует крахмал. Штамм является денитрификатором, поскольку восстанавливает NO_3 до N_2 . Не усваивает маннит и глюкозу, тогда как растет на среде с сахарозой и этанолом, подщелачивая ее. Может удовлетворительно расти при 37°C. Обладает штамм слабой каталазной и хорошей амилазной активностью.

Штамм *L. nimipressuralis* 32-3 имеет хорошую способность расти на средах как с органическим, так и минеральным азотом. Может использовать различные углеводороды, подкисляя при этом среду [28].

Морфология колоний выделенных штаммов разнообразна: от белых и желтых, блестящих и матовых, плоских и выпуклых, очень мелких, средних, прозрачных, сметано- и пастообразных, способных диффундировать желтый пигмент в среду, до больших круглых серых, диффундирующих черный пигмент. Можно отметить преобладание округлых и плоских форм колоний с морщинистой, матовой поверхностью.

По морфологии клеток также отмечено разнообразие. Некоторые клетки имели вид тонких длинных неподвижных палочек или с утолщенными округлыми краями. Встречались мелкие, короткие овальные палочки, много спаренных, подвижные. В подавляющем большинстве преобладали палочковидные и подвижные формы различных размеров.

Анализ микроорганизмов на наличие спор показал, что 57% всех исследованных изолятов составляют споровые бактерии: 60% – от изолятов, выделенных с апикальной части корней огурца, 62% – томата, 50% – капусты. На безазотистой среде Виноградского хорошо росли 30% из исследованных изолятов и столько же вообще не росли, а у 40% бактерий отмечен слабый рост. Строгими аэробами оказались 12% изолятов.

Установлено, что выделенные изоляты используют углеводы (маннит, глюкозу, сахарозу) и этанол, и только 18% из них цитрат натрия. Разной степени каталазную активность проявляли 88% исследованных изолятов, уреазную активность – 52%, амилазную – 35%. Способность к нитратредукции наблюдали у 18% микроорганизмов.

По фенотопическим и физиолого-биохимическим признакам нововыделенных изолятов и штаммов проведен кластерный анализ, который позволил объединить их в следующие группы (рис. 8).

Высокий уровень сходства имеют штаммы, выделенные из апикальной части корней различных видов растений, выращенных на различных субстратах, что подтверждает сходство этих штаммов с представителями рода *Bacillus*, установленное результатами исследований. На рисунке отмечено по меньшей мере две группы родства спорообразующих микроорганизмов и только средний уровень сходства между штаммами грамтрицательных бактерий.

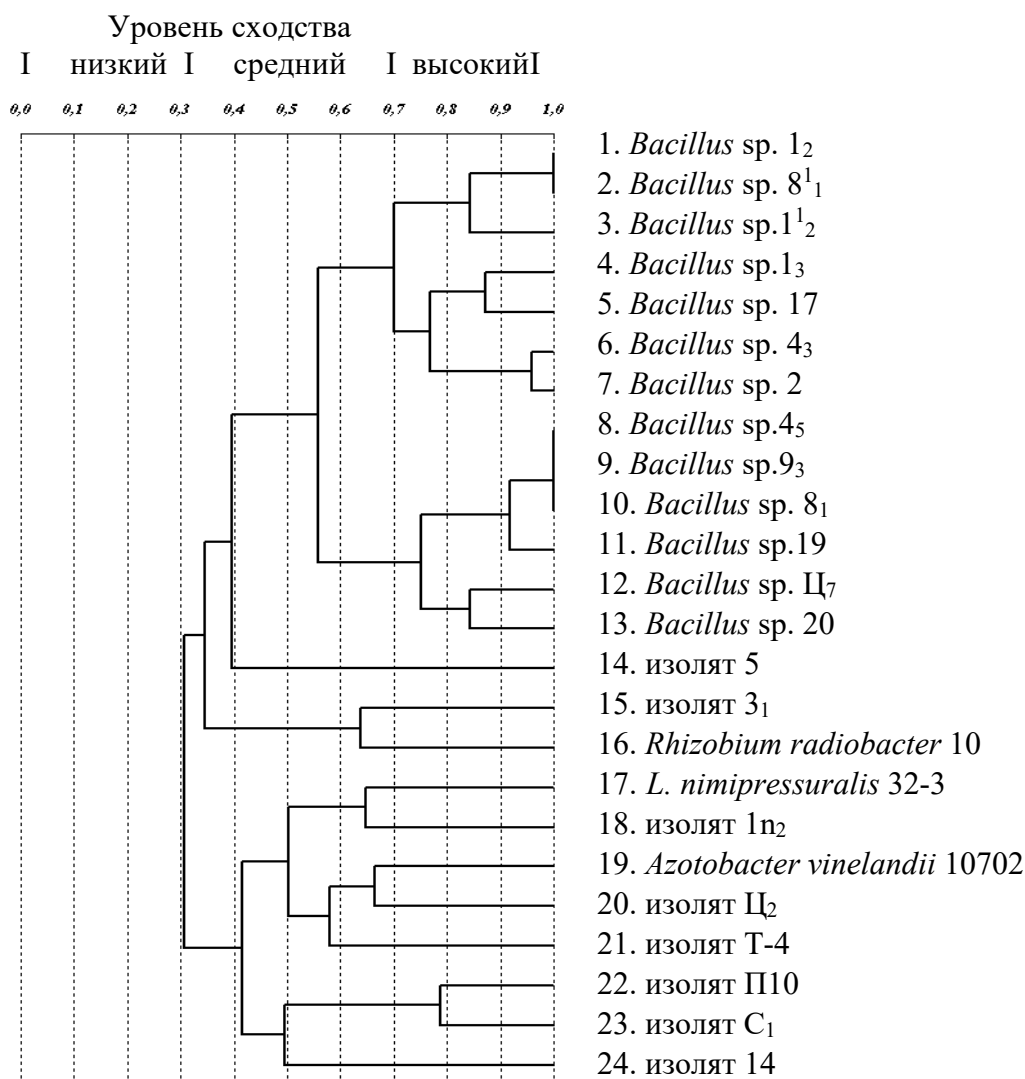


Рисунок 8 – Дендрограмма родства по фенотипическим и физиолого-биохимическим признакам изолятов, выделенных из апикальной части корней овощных растений (Clusters.xls.)

2.1.3 Влияние нововыделенных штаммов на овощные растения

Положительное влияние микроорганизмов на растения может быть обусловлено различными факторами. Среди них наиболее распространенным является стимуляция роста и развития растений за счет продукции микроорганизмами разнообразных фитогормональных веществ. Способность к синтезу фитогормонов имеют большинство исследованных почвенных микроорганизмов. Активное воздействие на растения оказывают микроорганизмы, благодаря продукции таких важных фитогормонов, как ауксины, гиббереллины, цитокинины, этилен и др. [29]. Бактерии родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, как и *Azospirillum* относятся к числу наиболее исследованных представителей ростстимулирующих ризобактерий (PGPR – plantgrowthpromoting rhizobacteria). В естественных условиях они обычно

колонируют корни растений и, имея значительный адаптивный потенциал, могут заселять и другие экологические ниши. Реакция растений на бактеризацию семян может быть различной в зависимости от вида макро- и микроорганизмов, функциональной активности последних, состава их продуктов метаболизма.

Исследование положительного влияния нововыделенных штаммов на овощные растения проводили параллельно с изучением их свойств. Среди объектов исследованы растения не только того вида, с апикальной части корней которого выделяли новые штаммы, но и другие виды овощных культур. Целью проведенных нами исследований являлось выявление видов растений, отзывчивых на инокуляцию тем или иным штаммом. Ранее установлена высокая чувствительность и положительная реакция растений салата на инокуляцию микроорганизмами различной функциональной активности, что послужило примером для изучения нововыделенных штаммов на салате сорта Кучерявец одесский (табл. 3).

Таблица 3 – Влияние нововыделенных штаммов на продуктивность растений салата сорта Кучерявец одесский (вегетационный опыт, субстрат – тепличная почвосмесь)

Вариант	Надземная масса*		Масса корня*		Количество листьев	
	г	% к контролю	г	% к контролю	шт.	% к контролю
Контроль (вода)	5,88	100	3,11	100	6,6	100
<i>L. nimipressuralis</i> 32-3	6,59	112,1	3,16	101,6	7,1	107,6
<i>P. polymyxa</i> П	6,65	113,1	3,47	111,6	7,1	107,6
<i>Bacillus</i> sp. 2	7,83	133,2	3,57	114,8	7,1	106,1
<i>P. fluorescens</i> П 10	7,05	119,9	3,29	105,8	6,9	104,5
НСР ₀₅	1,19		0,45		0,7	

* – Приведены данные по сырой массе

Штаммы *Bacillus* sp. 2, *P. fluorescens* П10 наряду со штаммами – биоагентами препаратов *L. nimipressuralis* 32-3 и *P. polymyxa* П – положительно влияли на развитие растений салата. Достоверное превышение растений контрольного варианта по надземной массе при инокуляции штаммами *Bacillus* sp. 2, *P. fluorescens* П10 составило 33,2 и 19,9 % соответственно. По развитию корневой системы отмечены также растения, семена которых обрабатывали штаммом *Bacillus* sp. 2, масса корня на 0,46 г/растение больше или на 14,8 % по сравнению с контролем (3,11 г/растение).

Растения кресс-салата чувствительны к присутствию ростстимулирующих веществ, поэтому семена этих растений инокулировали штаммами и наблюдали их развитие в условиях вегетационного опыта.

Полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии инокуляции на продуктивность растений кресс-салата. Из семи исследованных, только штаммы *P. fluorescens* П10, *Bacillus* sp. 2, изолят 3, обеспечили достоверный прирост сухой надземной массы на 27,3 % и сухой массы корней более чем на 50 %, изолят П₄ – только сухой массы корня на 45,5 % в сравнении с контролем (табл. 4).

Таблица 4 – Влияние нововыделенных ассоциативных штаммов на продуктивность растений кресс-салата (вегетационный опыт, субстрат – вермикулит)

Вариант	Сухая надземная масса		Сухая масса корня	
	г	% к контролю	г	% к контролю
Контроль (без обработки)	0,22	100	0,11	100
<i>Pseudomonas fluorescens</i> П 10	0,28	127,3	0,18	163,6
<i>Bacillus</i> sp. 2	0,28	127,3	0,17	154,5
Изолят С	0,25	113,6	0,13	118,2
Изолят 9 ₃	0,24	109,1	0,13	118,2
Изолят 4 ₃	0,24	109,1	0,14	127,3
Изолят 3	0,28	127,3	0,17	154,5
Изолят П ₄	0,25	113,6	0,16	145,5
НСР ₀₅	0,05		0,04	

Положительное влияние штаммов на развитие растений капусты сорта Дитмаршер Фрюер установлено при выращивании растений на вермикулите, достоверно возростала сухая масса корня на 26,7% при инокуляции штаммом *P. fluorescens* П 10 и изолятом 8₁ (табл. 5).

Таблица 5 – Влияние ассоциативных штаммов на продуктивность растений капусты сорта Дитмаршер Фрюер (вегетационный опыт, субстрат – вермикулит)

Вариант	Сухая надземная масса		Сухая масса корня	
	г	% к контролю	г	% к контролю
Контроль (без обработки)	0,52	100	0,15	100
<i>Pseudomonas fluorescens</i> П 10	0,56	107,7	0,19	126,7
Изолят 9 ₃	0,56	107,7	0,17	113,3
Изолят 8 ₁	0,60	115,4	0,19	126,7
НСР ₀₅	0,12		0,04	

Среди четырех сортов капусты (Ярославна, Слава, Июньская, Дитмаршер Фрюер) вида *Brassica oleracea* var. *capitata*, выращиваемых на вермикулите и тепличной почвосмеси, достоверные прибавки получены в вариантах, где использованы штаммы *Bacillus* sp. 2 и *P. fluorescens* П10 на двух сортах и обоих субстратах. Так, на тепличной почвосмеси инокуляция всеми исследуемыми штаммами обеспечила достоверный прирост сухой массы корней капусты сорта Дитмаршер Фрюер почти в два раза и даже более (66,7-133,3 % к контролю) (табл. 6). Развитие надземной массы также имело тенденцию к возрастанию под действием штаммов, однако достоверный показатель ее прироста (18,8%) к контролю установлено при обработке семян штаммом *Bacillus* sp. 2.

Таблица 6 – Влияние ассоциативных штаммов на развитие растений капусты сорта Дитмаршер Фрюер (вегетационный опыт, субстрат – тепличная почвосмесь)

Вариант	Сухая надземная масса		Сухая масса корня	
	г	% к контролю	г	% к контролю
Контроль (вода)	0,32	100	0,03	100
<i>Azotobacter vinelandii</i> 10702	0,34	106,3	0,05	166,7
<i>L. nimipressuralis</i> 32-3	0,33	103,1	0,07	233,3
<i>Pseudomonas fluorescens</i> П 10	0,34	106,3	0,07	233,3
<i>Bacillus</i> sp. 2	0,38	118,8	0,06	200,0
НСП ₀₅	0,04		0,01	

В вегетационных опытах изучали влияние изолятов ассоциативных с овощными растениями микроорганизмов и коллекционных штаммов на рост и развитие растений перца и баклажана. В качестве референтных использованы штаммы с различной доминирующей функцией: азотфиксация – *A. vinelandii* 10702, фосфатмобилизация – *L. nimipressuralis* 32-3, антагонизм к фитопатогенов – *P. polytuxa* П. В условиях высоких температур теплицы на вермикулите наблюдали угнетение всходов и развития растений перца сладкого сорта Самоцвет. Именно в таких условиях референтный штамм *P. polytuxa* П обеспечил существенное влияние на развитие растений, прирост сухой массы к контролю составил 58,3% (надземной части – 37,5%, корня – 75,0%) (табл. 7). На уровне референтного штамма были: изолят 14, *Bacillus* sp. 17, *Bacillus* sp. 19, изолят Т-4. В этих вариантах прирост массы надземной части растения составил 37,5-62,5%, корня – 50-125% к контролю.

Таблица 7 – Влияние штаммов и изолятов на развитие растений перца сладкого сорта Самоцвет (вегетационный опыт, субстрат – вермикулит)

Вариант	Высота растения, см	Количество листьев		Сухая масса растения					
				надземной части		корня		всего	
		шт.	%	г	%	г	%	г	%
Контроль (вода)	6,8	5	100	0,08	100	0,04	100	0,12	100
<i>A. vinelandii</i> 10702	6,8	6	120	0,10	125	0,04	100	0,14	116,7
<i>L. nimipressuralis</i> 32-3	6,0	4,7	94	0,08	100	0,05	125	0,13	108,3
<i>P. polytuxa</i> П	6,9	5,5	110	0,11	137,5	0,07	175	0,19	158,3
Изолят 14	7,5	5,3	106	0,13	162,5	0,08	200	0,21	175
<i>Bacillus</i> sp. 17	7,0	5,5	110	0,13	162,5	0,09	225	0,21	175
<i>Bacillus</i> sp. 19	7,3	6,2	124	0,11	137,5	0,06	150	0,17	141,7
<i>Bacillus</i> sp. 20	7,2	5,8	116	0,09	112,5	0,05	125	0,14	116,7
Изолят Т-4	7,5	6,2	124	0,11	137,5	0,06	150	0,17	141,7
<i>P. fluorescens</i> П 10	7,4	6,2	124	0,09	112,5	0,05	125	0,14	116,7
НСП ₀₅	0,88	0,91		0,03		0,02		0,04	

Реакция растений баклажана сорта Алмаз в аналогичных условиях повышенных температур теплицы на инокуляцию была положительной только в двух вариантах: с использованием референтного штамма *P. polytuxa* П и изолята 14 (табл. 8). В этих вариантах прирост к контролю сухой массы корня составил 37,5 %. Инокуляция *P. polytuxa* П обеспечила прирост массы надземной части растения к контролю 41,7 %. Не обеспечили эффективность в таких условиях референтные штаммы *A. vinelandii* 10702 и *L. nimipressuralis* 32-3, а два штамма *Bacillus* sp. 17 и 19 негативно влияли на показатели сухой массы частей растения, что на 40 % снизило продуктивность баклажана по сравнению с контролем.

Положительное влияние референтного штамма *P. polytuxa* П на растения в стрессовых условиях опыта обусловлено, вероятно, продукцией экзополисахаридов, выполняющих защитную функцию от стресс-факторов, но не антифунгальным действием на микромицеты, поскольку изолят 14, который обеспечил положительное влияние на растения перца и баклажана, совсем не влиял ни на один из 12 фитопатогенов лабораторного опыта.

Таблица 8 – Влияние штаммов и изолятов на продуктивность растений баклажана сорта Алмаз (вегетационный опыт, субстрат – вермикулит)

Вариант	Сухая масса растения					
	надземной части		корня		всего	
	г	%	г	%	г	%
Контроль (вода)	0,12	100	0,08	100	0,20	100
<i>A. vinelandii</i> 10702	0,12	100	0,08	100	0,20	100
<i>L. nimipressuralis</i> 32-3	0,11	91,7	0,08	100	0,19	95
<i>P. polytuxa</i> П	0,17	141,7	0,11	137,5	0,28	140
Изолят 14	0,14	116,7	0,11	137,5	0,25	125
<i>Bacillus</i> sp. 17	0,06	50	0,06	75	0,12	60
<i>Bacillus</i> sp.19	0,08	66,7	0,04	50	0,12	60
<i>Bacillus</i> sp.20	0,11	91,7	0,07	87,5	0,18	90
Изолят Т-4	0,10	83	0,07	87,5	0,17	85
<i>P. fluorescens</i> П 10	0,09	75	0,08	100	0,17	85
НСР ₀₅	0,03		0,03			

Следовательно, в стрессовых условиях вегетационных опытов (субстрат – вермикулит), существенное влияние на развитие перца сладкого и баклажана обеспечил референтный штамм *P. polytuxa* П и изолят 14: прибавка сухой массы растения к контролю составила 58,3, 40, 75, и 25% соответственно.

Энергия прорастания семян характеризует не только интенсивность обмена веществ, активность плазмы клетки, но и степень устойчивости растений к болезням в полевых условиях [28]. Установлено положительное влияние выделенных изолятов на массу проростков томата, при инокуляции исходной суспензией изолятов 31, 14, Ц 2: превышение по сравнению с контролем составило от 2,9 до 8,0 % (рис. 9).

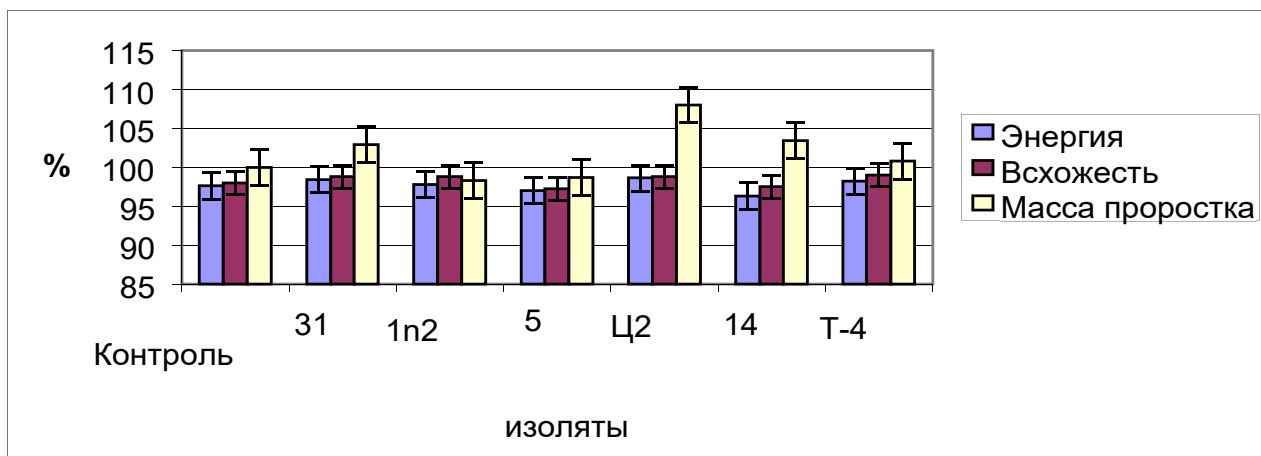


Рисунок 9 – Влияние изолятов на посевные свойства семян томата сорта Шанс (энергия прорастания и всхожесть семян представлены в абсолютных %, масса проростка – в относительных % к контролю)

Выявлено положительное влияние изолятов 5 и 1n2 на посевные качества семян огурца: возросли по сравнению с контролем показатели энергии на 3,0 и 6,4% и всхожести на 2,7 и 3,1% соответственно (рис. 10). Однако масса проростков огурца при инокуляции штаммами оставалась без изменений.

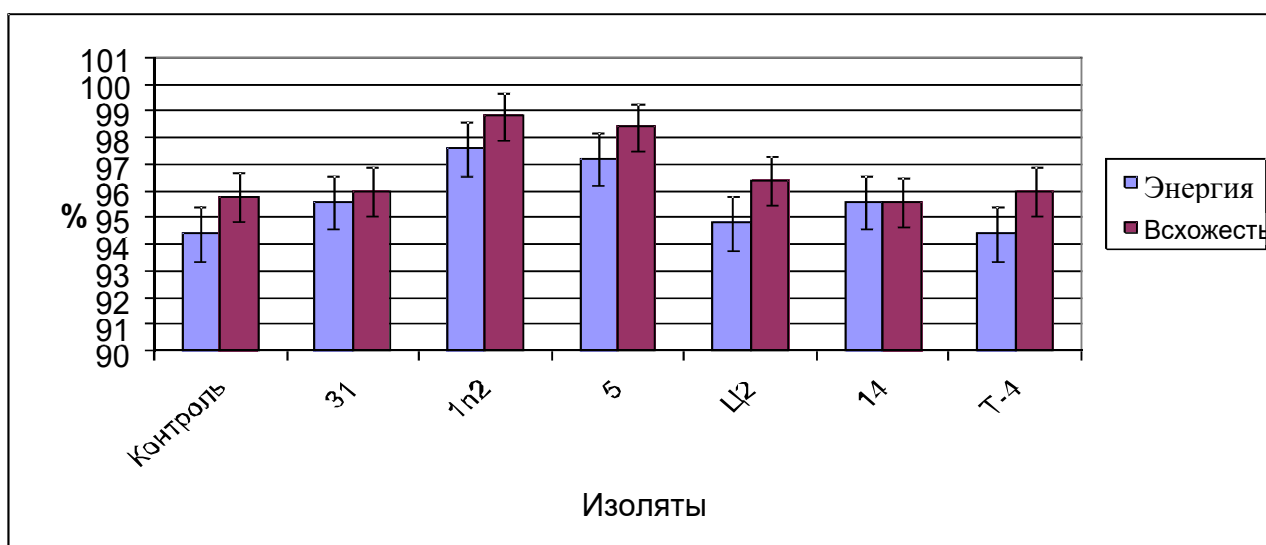


Рисунок 10 – Влияние выделенных изолятов на посевные свойства семян огурца сорта Лялюк

Таким образом, выделенные штаммы положительно влияют на рост и развитие различных видов овощных растений. Отмечено повышенное стимулирующее действие штаммов на развитие корневой системы, что является важным фактором для укоренения рассады овощных культур.

Полученные с помощью предложенного методологического подхода штаммы ассоциативных бактерий являются перспективными для проведения исследований при разработке биопрепаратов для биологизации овощеводства.

2.2 Ассоциативные штаммы бактерий к *Triticum aestivum* L.

2.2.1 Условия получения штаммов ассоциативных с растениями пшеницы бактерий

Исследования по поиску ассоциативных штаммов проводили в условиях 2018 и 2019 годов на озимой пшенице *Triticum aestivum* L. шести сортов: Багира, Лидия, Ермак, Алексеич, Безостая 100 и Гром. При использовании первого варианта методики субстратом служили образцы почвы чернозема (Chernozems):

- чернозем южный из степной зоны Крыма, слабо гумусированный, развит на четвертичных желто-бурых лессовидных легких глинах. Мощность гумусового горизонта составляет 24–36 см, всего 57–70 см. Содержание гумуса в пахотном горизонте составляет 2,4–2,7%. В 100 г абсолютно сухой почвы пахотного слоя содержится 5,2 мг легкогидролизуемого азота, 1,0 – 2,5 мг фосфора, 42 мг калия. Реакция почвенного раствора в верхнем горизонте слабощелочная (рН 7,7–7,9);

- чернозем южный тяжелосуглинистый карбонатный чернозём, типичный для предгорной зоны Крыма, рН – 7,0-7,2, содержание гумуса в пахотном слое – 2,7-3,0%, общего азота – 0,12%, общего фосфора – 0,10%, калия – 1,0%; суммы поглощенных оснований – 27–32 мг/100 г абсолютно сухой почвы). Мощность гумусового горизонта достигает 35–60 см;

- чернозем обыкновенный карбонатный тяжелосуглинистый мощный Ростовской области, обладающий значительной порозностью, аэрацией, газообменом, водопроницаемостью и влагоемкостью. Для почвы характерна высокая карбонатность (до 2,5 – 4.0% CaO₃ в пахотном слое). Содержание гумуса – 3,6–4,0 %, подвижного фосфора – в пределах 20 – 23 мг/кг, обменного калия – от 300 – 380 мг/кг почвы, рН7,1;

- чернозем обыкновенный мощный малогумусный тяжелосуглинистый Ставропольского края, сформированный на карбонатных лессовидных суглинках Центрального Предкавказья. Содержание гумуса в пахотном слое почвы 4,45 %, общего азота 0,25 %, валового фосфора 0,12 % подвижного фосфора и обменного калия соответственно 17 и 210 мг/кг почвы, рН 7,3-7,5.

- чернозем выщелоченный слабогумусный сверхмощный тяжелосуглинистый Краснодарского края. Пахотный слой (0-20 см) характеризуется близкой к нейтральной реакции почвенного раствору (рН 5,75-5,90), низким содержанием гумуса (3,39-3,46 %), средним – подвижного фосфора (26,8-27,3 мг/кг), высоким – обменного калия (438-453 мг/кг), низким – подвижной серы (1,9-2,1).

Известно, что изменения состава микробных сообществ ризосферы вызывает тип почвы, вид растения и сорт [31, 32]. Результаты метагеномного анализа также подтверждают влияние, как сорта пшеницы, так и почвенно-климатических условий ее выращивания на микробиоценоз ризосферы. Сообщество прокариот черноземов ризосферы *T. Aestivum* состояло преимущественно из представителей 10 фил (доля каждой составила более 1 %): *Crenarchaeota* из домена археи и бактерии: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia* (рис.11). Наряду с присутствием определённых фил выявлены представители неатрибутируемого домена прокариот, доля которого в образцах чернозёмов составляла 2,4-4,0 %. Наиболее высокой долей у исследуемых сортов отмечена фила *Proteobacteria*, разница её по почвам находилась в интервале 25,5–27,3 % у сорта Багира, 24,3–29,1 % – у сорта Ермак и 23,7–26,1 %– у сорта Лидия.

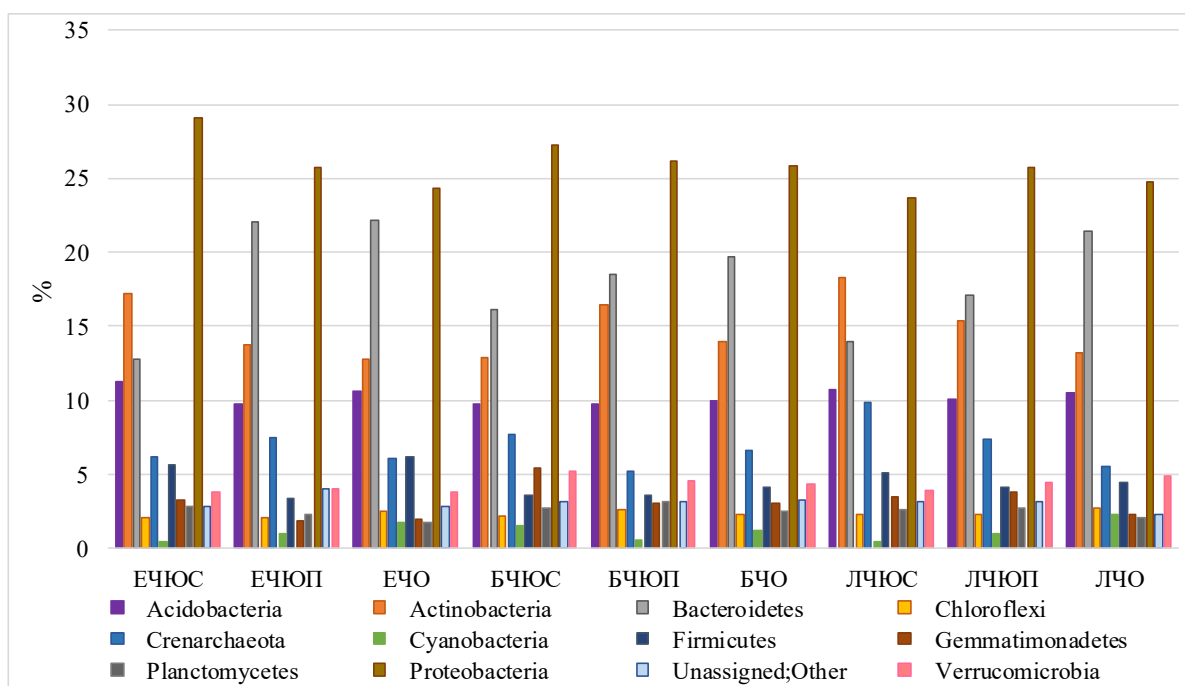


Рисунок 11 – Таксономическая структура мажорных компонентов на уровне фил прокариотного биома ризосферы пшеницы сортов Ермак (Е), Багира (Б) и Лидия (Л), выращенных в условиях чернозёма южного (ЧЮ) Степи (С) и предгорной зоны (П) и чернозёма обыкновенного (ЧО)

Наиболее высокая доля представителей доминирующих фил (кроме *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* и *Proteobacteria*) и неатрибутируемого домена отмечена в чернозёме южном степной зоны ризосферы пшеницы сорта Лидия. Доля представителей *Bacteroidetes* отмечена максимальным показателем в чернозёме обыкновенном (21,4%). В черноземе южном предгорной зоны он составил 20,3 %, тогда как в зоне степи она была меньше в 1,5 раза по

сравнению с максимальным значением. В ризосфере пшеницы сорта Ермак также доля представителей этой фило в чернозёме обыкновенном достигала максимального показателя и составила 22,2 %, что больше в 1,4 раза чернозёма южного Степи.

Среди минорных фил более высокие проценты отмечены в чернозёме обыкновенном и черноземе южном предгорной зоны. Например, доля представителей *Cyanobacteria* в чернозёме обыкновенном ризосферы пшеницы сортов Лидия и Ермак составила 2,2 и 1,7% соответственно, что в 2,3 и 1,8 раза выше, чем в черноземе южном предгорной зоны и в 5,2 и 4,1 раза степной. Развитие автотрофных групп микроорганизмов может указывать на высокий уровень функционального разнообразия, ведущего к диверсификации экологических ниш [33].

Анализ ризосферы сорта Багира показал превышение доли *Crenarchaeota* (7,7 %) в 1,5 раза в черноземе южном Степи над предгорной зоной и в 1,4 раза над чернозёмом обыкновенным. Здесь доля представителей фило *Bacteroidetes* отмечена максимальной также, как и у сортов Лидия и Ермак в чернозёме обыкновенном и составила 22,1%, тогда как в зоне Степи она меньше в 1,4 раза. Напротив, наиболее высокая доля *Gemmatimonadetes* (5,4 %) отмечена в чернозёме южном Степи, что в 3,2 раза больше, чем в чернозёме обыкновенном. Чернозём южный предгорной зоны отличался высокой долей *Planctomycetes*, составившей 3,2 %, что в 2,1 раза выше чернозёма обыкновенного. Максимальная среди почвенных образцов доля фило *Cyanobacteria* в чернозёме южном Степи в ризосфере пшеницы сорта Багира составила 1,5 %, что в 2,5 раза выше предгорной зоны и в 1,5 раза чернозёма обыкновенного.

Фила *Actinobacteria* имеет большую долю в микробиомах почв сухого и теплого климата [34], что объясняется приспособленностью его представителей к таким условиям [35]. В условиях Степи, где гидротермический коэффициент самый низкий (ГКТ 0,7), доля актинобактерий превышала показания в других образцах, за исключением сорта Багира.

Фила *Firmicutes* в пахотных почвах представлена бактериями, способными разлагать сложные органические вещества [36]. Доля представителей данной фило у сорта Лидия не имела больших отличий в зависимости от условий выращивания и находилась в пределах от 4,5 % (чернозем обыкновенный) до 5,1 % (чернозем южный Степи). В ризосфере пшеницы сортов Багира и Ермак её показатели были максимальными в

чернозёме обыкновенном 5,8 и 6,1% соответственно, что в 1,6 и 1,8 раза выше показателей чернозёма южного предгорной зоны.

В результате проведенного анализа таксономической структуры прокариотных сообществ ризосферы пшеницы различных сортов выявлено 945 операционных таксономических единиц (ОТЕ) родов. Отмечено также, что на уровне рода нет значительных изменений в количестве выявляемых ОТЕ как в зависимости от сорта, так и от почвенно-климатических условий. Их показатели варьировали в среднем по сорту Багира от 455,8 до 500,0 ОТЕ, а по сорту Ермак – от 475,8 до 504,8 (рис. 12).

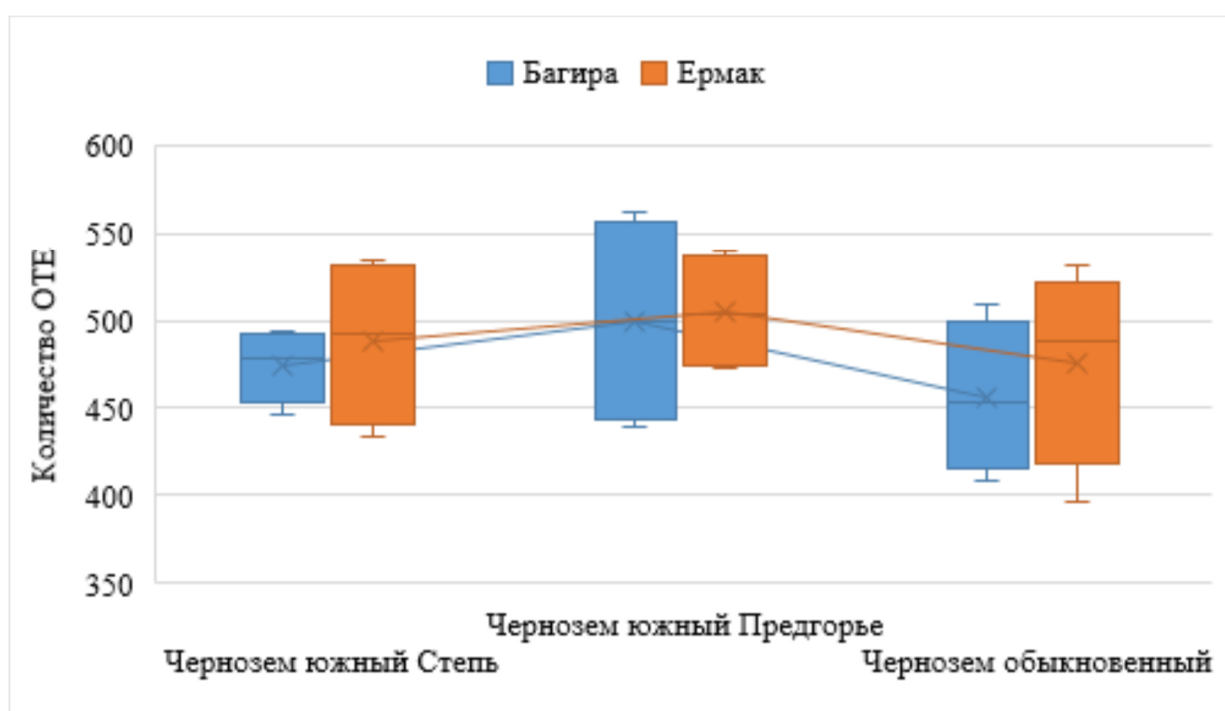


Рисунок 12 – Количество ОТЕ прокариот на уровне рода в ризосфере двух сортов пшеницы озимой в различных почвенно-климатических условиях (полевой опыт, 2018 г.)

В ризосфере пшеницы наиболее существенными были различия среди представителей 28 родов, что определено с помощью анализа главных компонент (приложение А). Суммарная доля указанных 28 родов составила почти половину каждого из сообществ (рис. 13). Суммарные доли наиболее отличались друг от друга на (10,4%) у пшеницы сорта Ермак, выращенной на черноземе южном Степии на черноземе обыкновенном. В перечень попали представители 9 родов: *Candidatus Nitrososphaera*, *Rubrobacter*, *Adhaeribacter*, *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Segetibacter*, *Bacillus*, *Kaistobacter*, *Steroidobacter*, а остальные неатрибутированные (NA).

Чернозем южный степной зоны, по сравнению с двумя другими регионами выращивания пшеницы, выделялся повышенным обилием рода

Kaistobacter и неатрибутированных родов, обозначенных NA_616, NA_620 и NA_664 из порядков *Gemmatimonadales*, *Ellin5301* (фила *Gemmatimonadetes*) и *WD2101* (фила *Planctomycetes*) соответственно. С более низким показателем доли отмечены следующие: NA_334 (*Saprospirales* из *Bacteroidetes*), NA_423 (*Stramenopiles* из *Cyanobacteria*), NA_920 (*Syntrophobacterales* из *Proteobacteria*). В условиях чернозема южного предгорья (ChF) на двух сортах доля родов NA_24 (*iii1-15* из *Acidobacteria*), NA_334, *Steroidobacter* была выше, чем в остальных исследуемых образцах почв, а *Bacillus* – ниже. В ризосфере пшеницы, выращенной в условиях чернозема обыкновенного (ChH), доля родов NA_314 (*Sphingobacteriales* из *Bacteroidetes*), Other453 (*Bacillales* из *Firmicutes*), Other828 (*Burkholderiales* из *Proteobacteria*) была выше, чем на других участках отбора.

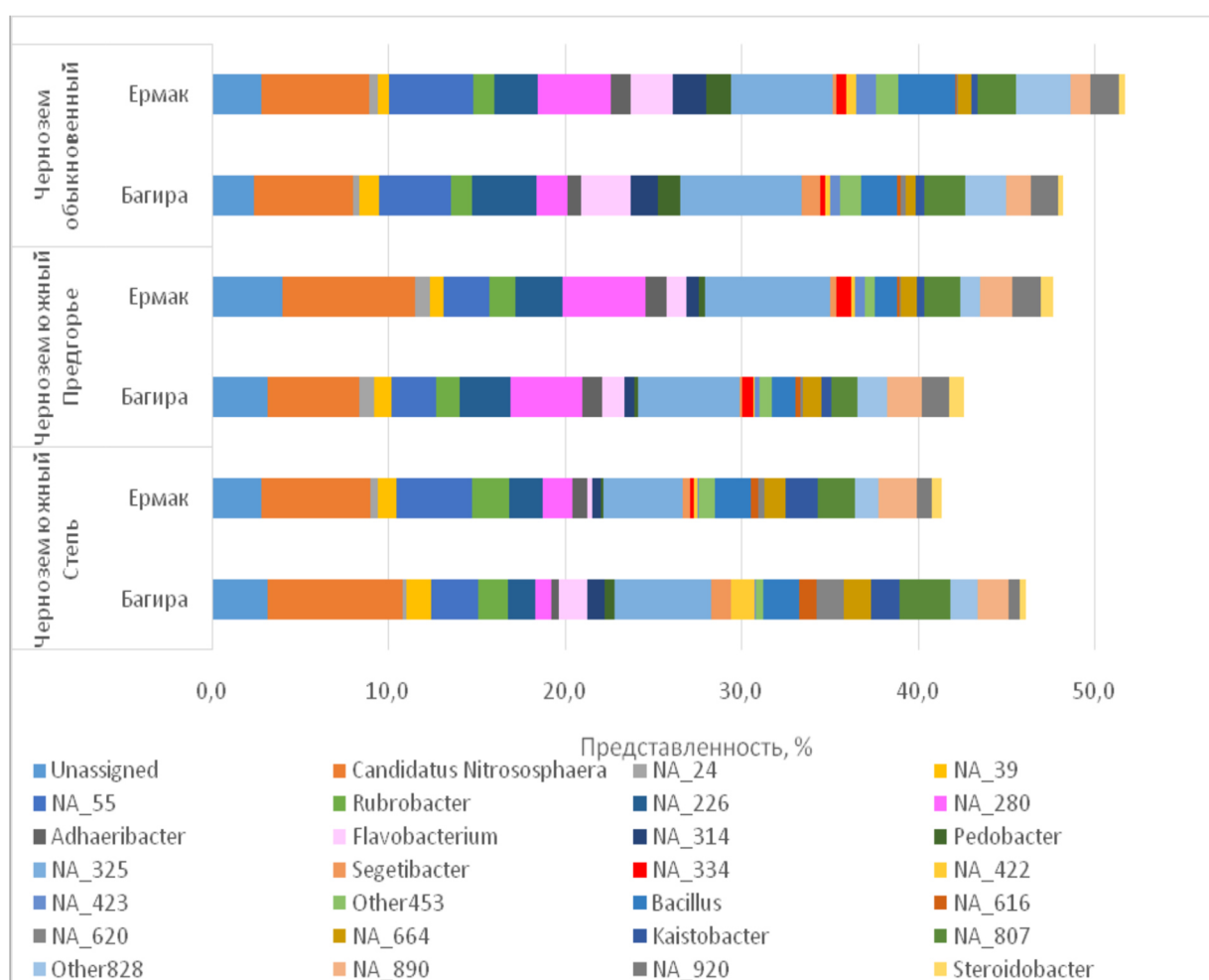


Рисунок 13 – Представленность родов прокариот с наибольшим уровнем межгрупповых коэффициентов главных компонент в ризосфере пшеницы различных сортов из различных мест выращивания (полевой опыт, 2018 г.):
NA – неатрибутированные последовательности; Other – другие последовательности, не включенные в NA; цифры в названиях родов указывают на их порядковый номер в исследованиях этого года

По данным литературы среди микроорганизмов из рода *Steroidobacter* встречаются представители, разрушающие агар-агар, натуральный каучук, микроцистин и другие органические вещества [37-40]. Микроорганизмы из рода *Bacillus* обладают различными положительными свойствами для роста и развития растений. Микроорганизмы из остальных родов еще недостаточно изучены, но встречаются в значительной степени и в ризосфере других растений и в различных почвах [41].

Проведенный статистический анализ позволил установить существенные различия в представленности родов микробиома ризосферы пшеницы, выращенной на различных черноземах, что подтверждают индексы альфа-разнообразия прокариот. В таблице 9 представленные статистические данные показывают увеличение индекса Шеннона у сорта Багира по сравнению с сортом Ермак на 0,10 и 0,17 соответственно в черноземе обыкновенном и черноземе южном предгорья. Условия этих регионов характеризуются более высоким гидротермическим коэффициентом (ГТК), на которые, скорее всего, микробиомризоферы пшеницы сорта Багира отреагировал увеличением биологического разнообразия прокариот. Индекс видового богатства Маргалёфа на сорте Багира выше в черноземе южном (степной и предгорной зон Крыма) по сравнению с черноземом обыкновенным.

Таблица 9 – Статистические данные о представленности родов прокариот в ризосфере пшеницы сортов Багира и Ермак, выращенных на различных черноземах

Индекс разнообразия	Чернозем южный степной зоны		Чернозем южный предгорной зоны		Чернозем обыкновенный	
	Багира	Ермак	Багира	Ермак	Багира	Ермак
Шеннона	4,72±0,05	4,78±0,06	4,84±0,04	4,67±0,04	4,71±0,03	4,61±0,04
Выравненность	0,24±0,01	0,25±0,02	0,26±0,01	0,21±0,01	0,24±0,01	0,22±0,02
Фишера α	47,7±1,2	49,2±2,8	50,6±3,4	51,1±1,9	45,6±2,4	47,9±3,2
Маргалёфа	34,3±0,8	35,3±1,8	36,1±2,2	36,5±1,2	32,9±1,6	34,4±2,1

Условия чернозема обыкновенного способствовали увеличению бета-разнообразия прокариот микробиомризоферы пшеницы сортов Багира и Ермак, о чем свидетельствуют наиболее высокие показатели индекса Уиттакера (рис. 14). В ризосфере пшеницы сорта Багира, выращенной на черноземе южном предгорной зоны, бета-разнообразии прокариот увеличивалось по сравнению с условиями Степи, тогда как у сорта Ермак отмечены обратные тенденции.

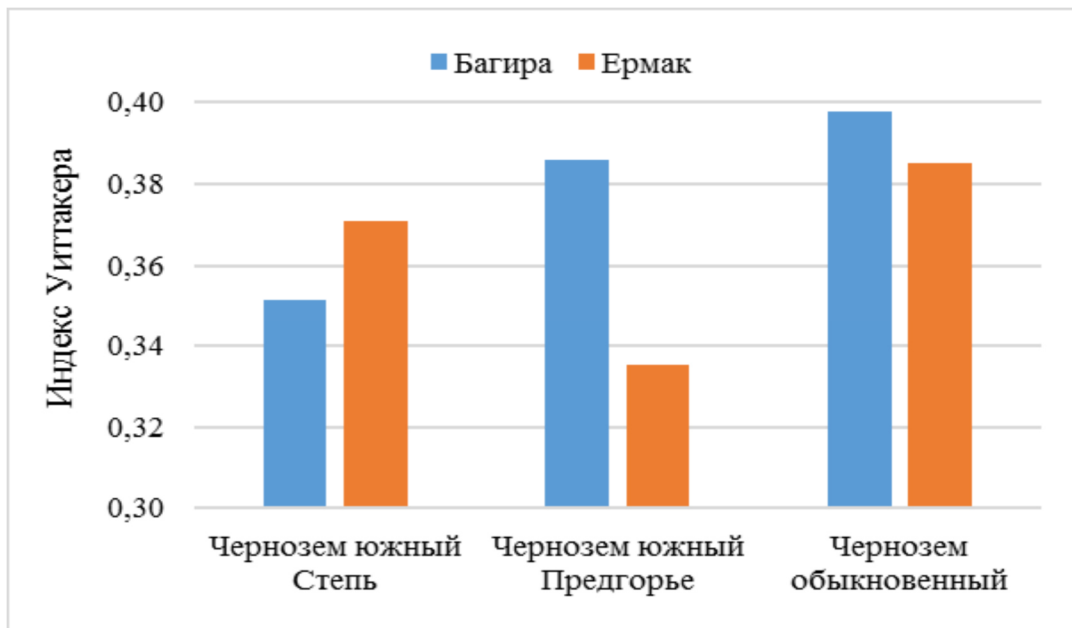


Рисунок 14 – Индекс бета-разнообразия Уиттакера прокариот в ризосфере пшеницы сортов Багира и Ермак из различных почвенно-климатических условий (полевой опыт, 2018 г.)

По метрике Брея-Кертиса наблюдается разделение микробных сообществ ризосферы, как из разных почвенно-климатических условий, так и сортов пшеницы в системе главных координат (PCoA – principlecoordinateanalysis) (рис. 15).

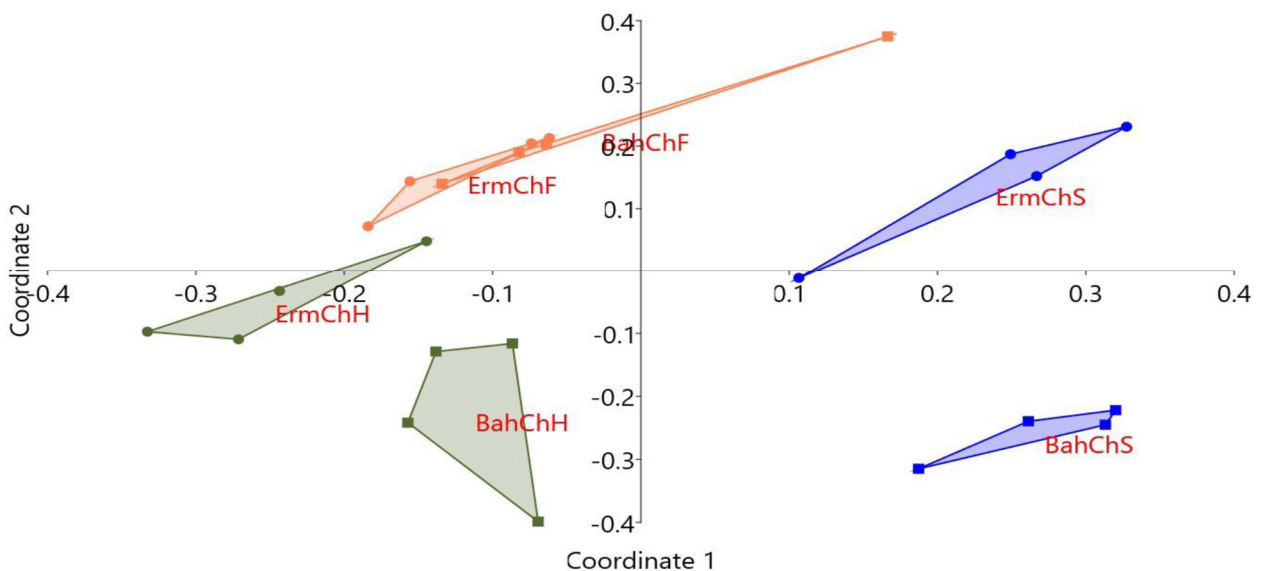


Рисунок 15 – Анализ главных координат различий в сообществах прокариот в ризосфере пшеницы различных сортов из различных почвенно-климатических условий по метрике Брея-Кертиса (PCoA principlecoordinateanalysis) (полевой опыт, 2018 г.): ChF (оранжевый) – чернозем южный предгорья Крыма, ChS (синий) – чернозем южный степи Крыма, ChH (оливковый) – чернозем обыкновенный; Erm – Ермак, Bah – Багира

Метагеномный анализ микробиомаризосферы пшеницы трех сортов (Алексеич, Безостая 100 и Гром) показал наличие представителей 19 фил,

относящихся к доменам археи и бактерии. Значительную долю составляли неопределенные филоотипы, показатели которых варьировали в пределах от 34,8 до 44,6 %, в зависимости от сорта и условий его произрастания (рис. 16).

Представленность архей филоты *Thaumarchaeota* существеннейшей *Euryarchaeota* и позволила ей войти в состав доминирующих (доля выше 1%) среди прокариот. Важно отметить, что в условиях чернозема южного Степи их доля была ниже единицы по всем сортам (0,62–0,78 %), тогда как в предгорной зоне составила 1,83–2,27 %, а в черноземе, выщелоченном еще выше – 2,07–3,05 %. Минимальные значения отмечены у сорта Безостая 100. Общее количество доминирующих фил составило семь, куда вошли бактерии *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*. Влияние почвенно-климатических условий выращивания отразилось и на доле наиболее представительной среди всех фил *Proteobacteria*. В черноземе южном предгорной зоны она находилась в зависимости от сорта в пределах 16,28–17,67 %, Степи – 19,46–20,28, в черноземе выщелоченном – 19,90–22,43 %. У сорта Безостая 100 отмечены как минимальное (в условиях Степи), так и максимальное (чернозем выщелоченный) значения доли протеобактерий. Условия чернозема южного предгорной зоны были наиболее благоприятны для представителей *Bacteroidetes*, их доля составила 15,97–16,28 %. Максимальный показатель отмечен у пшениц сорта Алексеич, как и минимальный (10,38) – в зоне Степи.

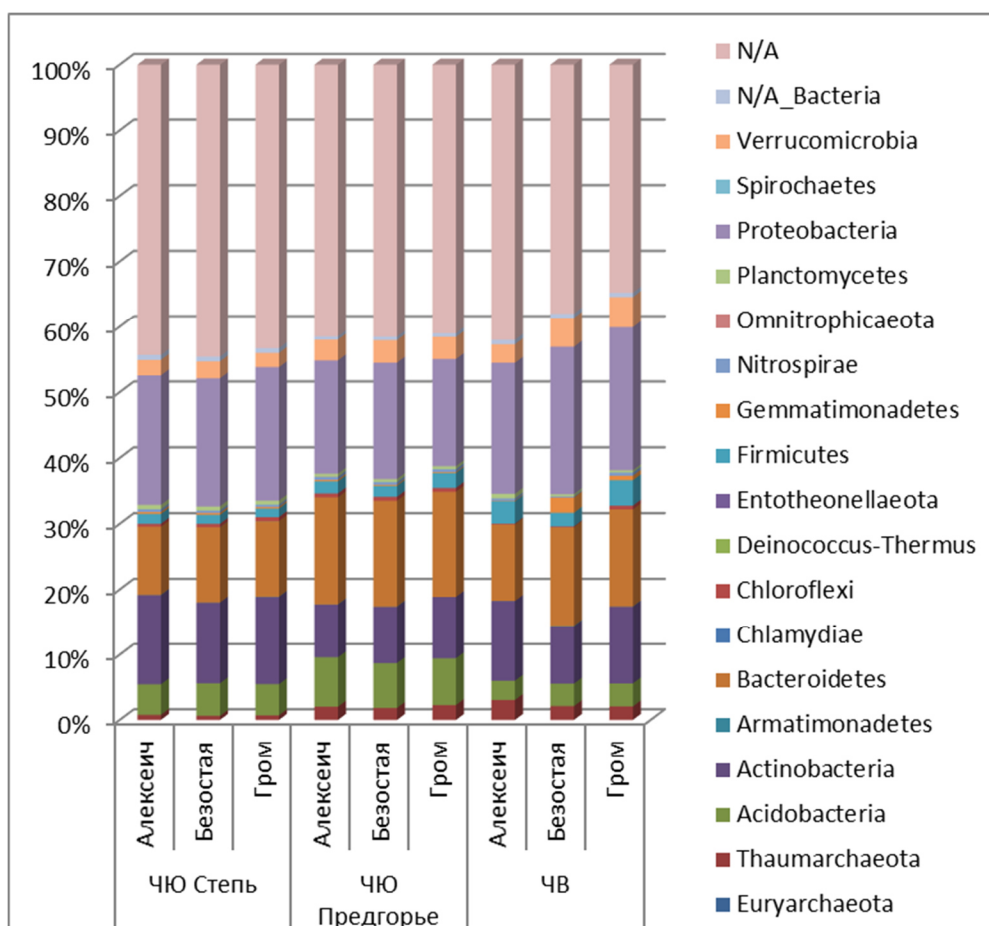


Рисунок 16 – Таксономическая структура (на уровне фил) микробиома ризосферы пшеницы, выращенной на черноземе южном (ЧЮ) и черноземе выщелоченном (ЧВ)

Сухой и теплый климат способствует увеличению доли филы *Actinobacteria* [33]. В степной зоне, где гидротермический коэффициент наименьший (0,7) среди исследуемых условий, фила обладала наибольшей представленностью (12,41-13,70%). Фила *Acidobacteria*, напротив, имеет большую долю в почвах влажного климата. В черноземе южном предгорной зоны она выше по всем сортам (6,86-7,55 %).

Индикатором почвенного плодородия могут выступать представители филы *Verrucomicrobia* [42]. Среди исследуемых образцов отмечена наибольшая доля этой филы в ризосфере пшеницы сортов Безостая 100 и Гром, выращенных на черноземе выщелоченном (4,43 и 4,64 % соответственно), который характеризовался более высоким содержанием гумуса (3,39-3,46%) по сравнению с черноземом южным (2,4-2,7 – 2,7-3,0%).

Среди фил, играющих важную роль в поддержании стабильности ризосферных микробных сообществ, находится и *Firmicutes* [43], представители которой участвуют в разложении сложных органических

веществ [36]. Представленность её в ризосфере пшеницы зависела от почвенно-климатических условий выращивания сорта. Так, наибольшая доля *Firmicutes* отмечена в черноземе выщелоченном (2,07-3,85 %), наименьшая – в черноземе южном степной зоны (1,29-1,50 %). Доля *Chloroflexi* в 5-6 раз у сорта Гром была больше, чем у других сортов в условиях чернозема выщелоченного. Представителей *Gemmatimonadetes* у сорта Безостая 100 в этих же условиях больше в 3,3 раза, чем у сорта Гром и в 28,0 раз, чем у сорта Алексеич. Влияние почвенных условий и сорта на изменение в составе микробного сообщества ризосферы согласуется с литературными данными [31, 32].

Таким образом, проведенные исследования микробиома ризосферы *T. aestivum* подтвердили, что влияние почвенно-климатических условий являлось более существенным, чем влияние сорта пшеницы, на представленность доминирующих фил и неопределенного домена. Филы, обладающие меньшей долей (до 1%), больше реагировали на сортовое разнообразие.

2.2.2 Характеристика ассоциативных штаммов бактерий к *Triticum aestivum* L. и их идентификация

Ризосфера растений пшеницы являлась источником для получения новых штаммов ассоциативных микроорганизмов. Их выделяли с апикальной части ризопланы пшеницы методом получения изолированных от внешней среды корней в сосуде Леонарда (глава 1). Штаммы отобраны из различных почв: L1 и R1 из чернозема обыкновенного, M3 и B5 – чернозема южного (степной Крым), Ant, Bb, Br – чернозема выщелоченного (Краснодарский край), Gr - чернозема южного (предгорный Крым). Наиболее активные по действию на растения штаммы идентифицированы по генам 16SpPHK и gyrB: *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend 1907) Conn 1942 R1 [регистрация последовательности в GenBankNCBI под номером MH443751], *Bacillus wiedmannii* (Miller et al. 2016) B5 [MH443749], *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* (Kotoucková et al. 2004), Busse 2016 M3 [MH443746], *P. nitroguajacolicus* L1 [MH443747], *Sphingomonas paucimobilis* (Holmes et al. 1977) Yabuuchi et al. 1990 Gr, *B. halotolerans* (Delaporte and Sasson 1967) Tindall 2017 Bb [MW453149], *B. licheniformis* (Weigmann 1898) Chester 1901 Br [MW453149] и *B. velezensis* Ruiz-Garcia et al. 2005 Ant [MW453148].

Современные технологии массивного параллельного секвенирования (next-generationsequencing – NGS) позволяют получать информацию о полногеномных последовательностях широкого спектра бактерий и вирусов,

и проводить молекулярно-генетические исследования на качественно новом уровне. Поэтому следующим этапом исследования было определение нуклеотидных последовательностей полных геномов перспективных штаммов. Секвенирование полных геномов проводили двумя способами штаммы L1,R1, M3 и B5 с помощью платформы Illumina (США), а Ant, Bb, Br и Gr – OxfordNanopore (Великобритания), сборку осуществляли в программах CLC GenomicWorkbench и Flye соответственно.

Статистические данные о собранных геномах представлены в таблице 10. Диапазон G + C состава и общая длина полученных контигов и были сопоставимы с другими штаммами тоже вида из ГенБанка. Геномы собранные по технологии OxfordNanopore позволили получить кольцевые хромосомы у штаммов *B. halotolerans* Bb, *B. licheniformis* Br, *B. velezensis* Ant и *S. paucimobilis* Gr, а у последнего собрались в кольца также и плазмиды. При этом покрытие каждого нуклеотида составило от 57 до 753. Штаммы, секвенированные на платформе Illumina, имеют различное количество контигов от 28 до 66.

Таблица 10 – Статистические данные о собранных геномах новых штаммов

Штамм бактерий	Метод секвенирования	GC состав, %	Средняя длина ридов, п.н.	Количество контигов, шт.	Общая длина контигов, п.н.	N50 контигов, п.н.
<i>A. tumefaciens</i> R1	I	59,4	271,6	28	5435015	654519
<i>B. wiedmannii</i> B5	I	34,9	267,1	66	5808458	161041
<i>P. nitroguajacolicus</i> M3	I	62,4	277,4	28	4788008	332077
<i>P. nitroguajacolicus</i> L1	I	61,7	277,6	39	4972536	245565
<i>B. halotolerans</i> Bb	ON	44,0	3470	1	4108599	4108599
<i>B. licheniformis</i> Br	ON	46,3	7352	1	4238545	4238545
<i>B. velezensis</i> Ant	ON	46,5	4786	1	4006164	4006164
<i>S. paucimobilis</i> Gr	ON	65,6	5582	5	4453535	3960017

Примечания: I – Illumina, ON – Oxford Nanopore.

Геномы аннотированы в RAST под номерами *P. nitroguajacolicus* L1 – 211146.8, *P. nitroguajacolicus* M3 – 211146.9, *A. tumefaciens* R1 – 358.223; *B. wiedmannii* B5 – 1428.1083, *S. paucimobilis* Gr – 196159.3, *B. halotolerans* Bb – 260554.80, *B. licheniformis* Br – 1402.460, *B. velezensis* Ant – 492670.970. Наибольшая доля (42 %) идентифицированных подсистем была у штамма

B. wiedmannii B5, наименьшая – у трех штаммов *P. nitroguajacolicus* L1 и M3 и *S. paucimobilis* Gr где выявлено только 25-27% (табл. 11). Это связано с небольшим числом доступных полных геномов вида *P. nitroguajacolicus*, которых на момент загрузки полученных данных, было 8, у вида *S. paucimobilis* только 3. Количество же сиквенсов вида *Bacillus thuringiensis* (ближайший гомолог к нашему штамму B5) составляло 1082 единицы.

Таблица 11 – Статистические данные о полных геномах новых штаммов из системы RAST

Штамм	Количество			Покрытие подсистем, %
	кодирующих последовательностей	подсистем	генов РНК	
<i>A.tumefaciens</i> R1	5350	361	47	29
<i>B.halotolerans</i> Bb	8474	340	115	32
<i>B.licheniformis</i> Br	8478	342	105	31
<i>B.wiedmannii</i> B5	5916	482	104	42
<i>B.velezensis</i> Ant	8023	345	112	34
<i>S.paucimobilis</i> Gr	4941	290	63	25
<i>P.nitroguajacolicus</i> M3	4744	314	59	27
<i>P.nitroguajacolicus</i> L1	4504	314	59	27

Количество кодирующих последовательностей ДНК (CDS) составило 4744 у штамма *P. nitroguajacolicus* L1 и 4504 – у *P. nitroguajacolicus* M3. Среди «генов домашнего хозяйства» различия незначительны у штаммов этого вида. Например, подсистема мембранного транспорта состоит из 79 функций у штамма L1 и 80 – у M3; ДНК метаболизма – 93, 92; РНК – 39, 31; белка – 194, 197 соответственно и т.д. (приложение Б1, Б2). Различия отмечены в подсистемах: аминокислоты и производные – 452 функции у L1 и 389 – у M3; по продукции кофакторов, витаминов, пигментов – 195, 159; жирных кислот, липидов, изопреноидов – 115, 97; ароматических веществ – 63, 44; вторичных метаболитов – 13, 7 соответственно.

У штамма *A. tumefaciens* R1 в общей сложности 5350 CDS идентифицированы в RAST, при этом 29% из них классифицированы в 361 подсистему. Среди полученных последовательностей не обнаружено генов вирулентности, отвечающих за проникновение ДНК в клетки растений, что определяется наличием Ri- и Ti-плазмид [45]. Не выявлено также генов нодуляции и фиксации азота (является особенностью семейства *Rhizobiaceae*, к которому относится этот вид), а также ростстимуляции (отмечена некоторыми исследователями [46]). Адаптивность *A. tumefaciens* R1 к

окружающей среде может быть объяснена генами, такими как 34 CDS, связанными с устойчивостью к антибиотикам и токсическим соединениям, 58 с подвижностью и хемотаксисом и 77 с ответом на стресс (приложение Б3). Определены также гены, отвечающие за продукцию фитогормонов и ароматических веществ.

У *B. wiedmannii* B5 большее количество CDS на 9,6-19,2% по сравнению с остальными штаммами (приложение Б4). Энтомопатогенная активность у вида *B. thuringiensis* обеспечивается присутствием генов эндотоксина на плаزمиде. Плазмид не обнаружено у штамма *B. wiedmannii* B5 при аннотации в RAST.

Анализируя полученные данные, можно предположить, что для эффективного взаимодействия с пшеницей штамму *P. nitroguajacolicus* M3, выделенному из чернозема южного (степной Крым), потребовался меньший набор генов, отвечающих, в том числе, за реакцию на внешнюю среду и контакт с другими организмами. Выделенные из различных почв новые штаммы, по-видимому, «интересны» растениям пшеницы с точки зрения продукции фитогормонов. По имеющимся распознанным подсистемам у *B. wiedmannii* B5 и *A. tumefaciens* R1 выявлено по 4 группы генов, отвечающих за синтез ауксинов, у *P. nitroguajacolicus* L1 и M3 – по 9 и 7, соответственно (приложение Б1-Б8).

На данный момент не удалось распознать большую часть геномов изучаемых штаммов бактерий, что позволило бы выявить новые их особенности, в том числе по взаимодействию с растением-хозяином.

2.2.3 Влияние ассоциативных штаммов бактерий на структуру микробоценоза ризосферы *Triticum aestivum* L.

Полученные данные по численности микроорганизмов основных эколого-трофических групп чернозема южного ризосферы *Triticum aestivum*, которые являются показателем состояния микробоценоза почв [47], позволили установить особенности формирования микробоценоза чернозема южного в ризосфере пшеницы под влиянием четырех исследуемых штаммов ассоциативных бактерий.

Аммонификаторы наряду с другими микроорганизмами обуславливают высвобождение доступного для растений аммонийного азота [48]. В условиях 2019 г. у пшеницы сортов Ермак и Багира наибольшие показатели численности данной группы микроорганизмов наблюдали в случае инокуляции штаммом L1 – на 33 и 41% соответственно по сравнению с вариантом без обработки

(табл. 12). У сорта Лидия в варианте с применением штамма В5 наблюдали максимальное увеличение количества аммонификаторов в различающихся условиях исследований по годам. В 2020 г. у сортов Ермак и Лидия увеличение числа микроорганизмов, использующих в качестве питания преимущественно органические источники азота, обусловлено влиянием штамма R1 и составило 1,5 и 2,6 раза соответственно по сравнению с контролем. У сорта Багира обработка всеми штаммами, кроме L1 и R1, приводила к увеличению количества аммонификаторов от 1,5 до 2,2 раза в сравнении с контролем.

Численность амилोलитиков характеризует потенциальную способность микробного сообщества почвы иммобилизовать азот в микробной биомассе [49]. Влияние инокуляции на количество амилолитической группы микроорганизмов, трансформирующих преимущественно минеральные соединения азота, было более существенным на сортах Ермак и Багира. За два года на сорте Ермак увеличение численности данной группы наблюдали при инокуляции всеми штаммами. Исключение составил вариант с инокуляцией штаммом P4 в условиях 2020 года, где отмечено снижение на 9 % относительно контроля. В условиях 2019 г. максимальное возрастание (в 3,4 раза в сравнении с контролем) количества амилолитиков произошло в результате инокуляции этого сорта штаммом L1.

За 2019–2020 гг. наибольшее увеличение численности амилолитических микроорганизмов (в 2,7 раза к контролю) наблюдали в ризосфере сорта Багира в результате действия штамма В5, выделенного из ризопланы данного сорта. Сорт Лидия оказался более избирательным к действию штаммов. В 2019 г. произошло увеличение количества амилолитиков на 34% при инокуляции P4 и на 28% – при инокуляции В5 по сравнению с контролем. В сложном по погодным условиям 2020 году наблюдалась обратная реакция снижения численности амилолитической группы микроорганизмов на сорте Лидия от 32-66 %. Это можно объяснить тем, что микробное сообщество является одним из наиболее чувствительных экологических индикаторов, которое первым реагирует на изменения окружающей среды и является маркером различных стадий почвообразования. При повышении температурного режима и снижении влагообеспеченности изменяются физические и химические показатели почвы. Эти факторы также влияют на активность ферментов и колебания биомассы микроорганизмов ризосферы, путем изменения состава и количества корневой экссудации.

Таблица 12 – Влияние штаммов с высоким ассоциативным потенциалом на численность микроорганизмов, трансформирующие органические и минеральные формы азота, ризосферы пшеницы озимой, млн КОЕ/г почвы (полевой опыт, 2018–2020 гг.)

Вариант		Аммонификаторы		Амилолитики	
		2019 г.	2020 г.	2019 г.	2020 г.
Ермак	P4	5,2 ± 0,3	2,3 ± 0,2	2,9 ± 0,4	3,4 ± 0,5
	M3	2,3 ± 0,2	3,7 ± 0,3	4,5 ± 0,1	5,5 ± 0,3
	B5	4,7 ± 0,1	2,3 ± 0,3	5,0 ± 0,3	4,0 ± 0,0
	R1	5,7 ± 0,1	5,4 ± 0,7	7,1 ± 0,2	5,0 ± 0,3
	L1	9,2 ± 0,2	2,9 ± 0,3	8,1 ± 0,3	6,5 ± 0,7
	Контроль*	6,9 ± 0,5	3,7 ± 0,4	2,4 ± 0,1	3,7 ± 0,2
Багира	P4	5,7 ± 0,1	3,8 ± 0,4	6,4 ± 0,3	3,4 ± 0,1
	M3	4,0 ± 0,2	2,6 ± 0,4	3,8 ± 0,1	5,3 ± 0,7
	B5	4,4 ± 0,1	3,0 ± 0,6	10,9 ± 0,1	5,5 ± 0,1
	R1	4,0 ± 0,1	1,6 ± 0,3	6,8 ± 0,1	5,3 ± 0,6
	L1	10,6 ± 0,1	1,8 ± 0,1	4,6 ± 0,4	2,6 ± 0,3
	Контроль*	7,5 ± 0,3	1,7 ± 0,3	4,0 ± 0,3	2,0 ± 0,1
Лидия	P4	7,1 ± 0,2	2,9 ± 0,4	8,9 ± 0,2	2,8 ± 0,5
	M3	5,8 ± 0,1	2,0 ± 0,2	4,1 ± 0,2	2,2 ± 0,2
	B5	9,4 ± 0,1	5,1 ± 0,5	8,6 ± 0,7	4,4 ± 0,2
	R1	2,7 ± 0,3	6,3 ± 1,2	3,6 ± 0,5	2,4 ± 0,4
	L1	4,4 ± 0,3	1,5 ± 0,2	3,4 ± 0,3	2,6 ± 0,2
	Контроль*	3,6 ± 0,1	2,4 ± 0,5	6,7 ± 0,2	6,5 ± 0,2

Примечания: контроль* – без обработки семян; данные достоверны относительно контроля при $p \leq 0,05$.

По численности олиготрофной части микробоценоза наблюдали следующие тенденции. В условиях 2019 г. инокуляция штаммом R1 способствовала увеличению количества олиготрофов в ризосфере всех сортов: Ермак – в 2,6 раза, как и со штаммом B5, Багира – в 2,1 раза, Лидия – в 3,2 раза по сравнению с контролем (табл. 13). Наблюдалась также значительная разница по количеству микроорганизмов данной группы по годам исследований. В 2019 г. более благоприятном по погодным условиям, численность олиготрофов была меньше. Например, в контроле отмечено снижение их количества в 2,8 раза (в среднем на трех исследуемых сортах пшеницы) по сравнению с 2020 г., характеризующимся стрессовыми для растений условиями, вызванными засухой (приложение В). Это может быть связано с тем, что данная группа микроорганизмов приспособлена к эконизмам с низким содержанием питательных элементов почвы и участвует в этапе завершения минерализации органического вещества.

В условиях 2020 г. обработка семян штаммом L1 (выделен из ризопланы пшеницы сорта Лидия) и M3 привела к возрастанию численности данной

группы на сортах Лидия и Багира в 1,6 и 2,3 раза соответственно по сравнению с контролем. На сорте Ермак при показателе в контроле $2,5 \cdot 10^6$ КОЕ/г почвы наблюдалось снижение количества олиготрофов на 8-56% к контролю при инокуляции всеми штаммами (кроме В5).

Таблица 13 – Влияние штаммов с высоким ассоциативным потенциалом на численность олиготрофных и педотрофных микроорганизмов ризосферы пшеницы озимой, млн КОЕ/г почвы (полевой опыт, 2018–2020 гг.)

Вариант		Олиготрофы		Педотрофы	
		2019 г.	2020 г.	2019 г.	2020 г.
Ермак	P4	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,9 ± 0,4	4,1 ± 0,5
	M3	0,7 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,5 ± 0,1	6,9 ± 0,4
	B5	2,1 ± 0,3	2,7 ± 0,2	1,2 ± 0,0	6,8 ± 0,0
	R1	2,1 ± 0,1	1,5 ± 0,4	1,0 ± 0,1	7,5 ± 0,8
	L1	0,5 ± 0,1	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,3	8,3 ± 0,4
	Контроль*	0,8 ± 0,1	2,5 ± 0,4	1,8 ± 0,3	3,4 ± 0,1
Багира	P4	0,4 ± 0,0	2,0 ± 0,2	2,1 ± 0,2	7,4 ± 0,6
	M3	0,5 ± 0,1	2,3 ± 0,5	1,6 ± 0,1	5,5 ± 0,4
	B5	0,6 ± 0,0	2,4 ± 0,2	1,3 ± 0,1	4,4 ± 0,2
	R1	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,3	1,4 ± 0,1	4,9 ± 0,3
	L1	0,4 ± 0,1	2,3 ± 0,3	2,9 ± 0,3	2,3 ± 0,0
	Контроль*	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	2,6 ± 0,2	3,2 ± 0,5
Лидия	P4	2,4 ± 0,1	0,7 ± 0,2	2,3 ± 0,1	4,1 ± 0,3
	M3	0,5 ± 0,2	3,1 ± 0,4	5,9 ± 0,1	3,5 ± 0,6
	B5	0,5 ± 0,1	2,1 ± 0,2	8,3 ± 0,1	3,4 ± 0,3
	R1	1,6 ± 0,2	0,8 ± 0,2	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,3
	L1	0,9 ± 0,0	3,0 ± 0,1	1,6 ± 0,0	3,6 ± 0,2
	Контроль*	0,5 ± 0,1	1,9 ± 0,1	6,0 ± 0,1	4,5 ± 0,5

Примечания: контроль* – без обработки семян; данные достоверны относительно контроля при $p \leq 0,05$.

Отмечена тенденция уменьшения численности педотрофов, учтенных на почвенном агаре, в ризосфере пшеницы, исследуемых трех сортов под влиянием штаммов в условиях 2019 г. Установлено увеличение её в 1,4 раза в варианте со штаммом M3 на сорте Ермак и на 38% под влиянием штамма B5 на сорте Лидия. В 2020 г инокуляция семян пшеницы сорта Ермак привела к повышению численности педотрофных микроорганизмов под влиянием всех исследуемых штаммов от в 1,2-2,5 раза по сравнению с контролем. На сорте Багира отмечено увеличение численности микроорганизмов данной экологотрофической группы в вариантах с применением штаммов P4, M3, B5 и R1. Сорт Лидия оказался не отзывчивым на инокуляцию в условиях 2020 года.

Важным показателем состояния почв любого типа является присутствие азотфиксирующих бактерий [50]. Главной особенностью олигонитрофилов, фиксирующих атмосферный азот, является способность развиваться при очень низком содержании азота в субстрате. В условиях 2019 г инокуляция штаммами L1 и B5 способствовала лучшему развитию азотфиксаторов ризосферы пшеницы сорта Ермак. Их общая численность в 1,4 и 1,3 раза превысила контроль. В варианте со штаммом M3 отмечено их снижение, как и в большинстве вариантов на сорте Багира, за исключением L1, где увеличение составило 1,2 раза (рис.17). В условиях 2020 г на сорте Багира максимальное увеличение было в результате инокуляции штаммом P4 и составило 3,3 раза по сравнению с вариантом без обработки. На сорте Лидия в результате инокуляции B5 и R1 число олигонитрофилов выросло на 44 и 40% относительно контроля, соответственно.

Для рода *Azotobacter* определяющим является способность к фиксации молекулярного азота атмосферы, синтез веществ гормональной и антибиотической природы, витаминов [51]. Этот азотфиксатор является очень требовательным к условиям среды, особенно влажности, поэтому в жестких условиях засухи 2020 г наблюдалось пониженное количество бактерий рода *Azotobacter* в ризосфере пшеницы. В условиях предыдущего года содержание этого микроорганизма под влиянием исследуемых штаммов (кроме B5) превысило контроль на 6,7-16,0% в ризосфере пшеницы сортов Ермак и Багира. В результате инокуляции штаммом R1 на сорте Багира в условиях 2020 г, наблюдалось увеличение численности азотобактера в 2,0 раза, но в условиях предыдущего года наблюдалась обратная реакция – снижение на 67% относительно контроля под влиянием этого штамма. На сорте Лидия увеличение численности азотобактера зафиксировано в результате инокуляции штаммом L1, который выделен из ризопланы данного сорта, на 8 и 33% по сравнению с вариантом без инокуляции в условиях 2019 и 2020 гг., соответственно.

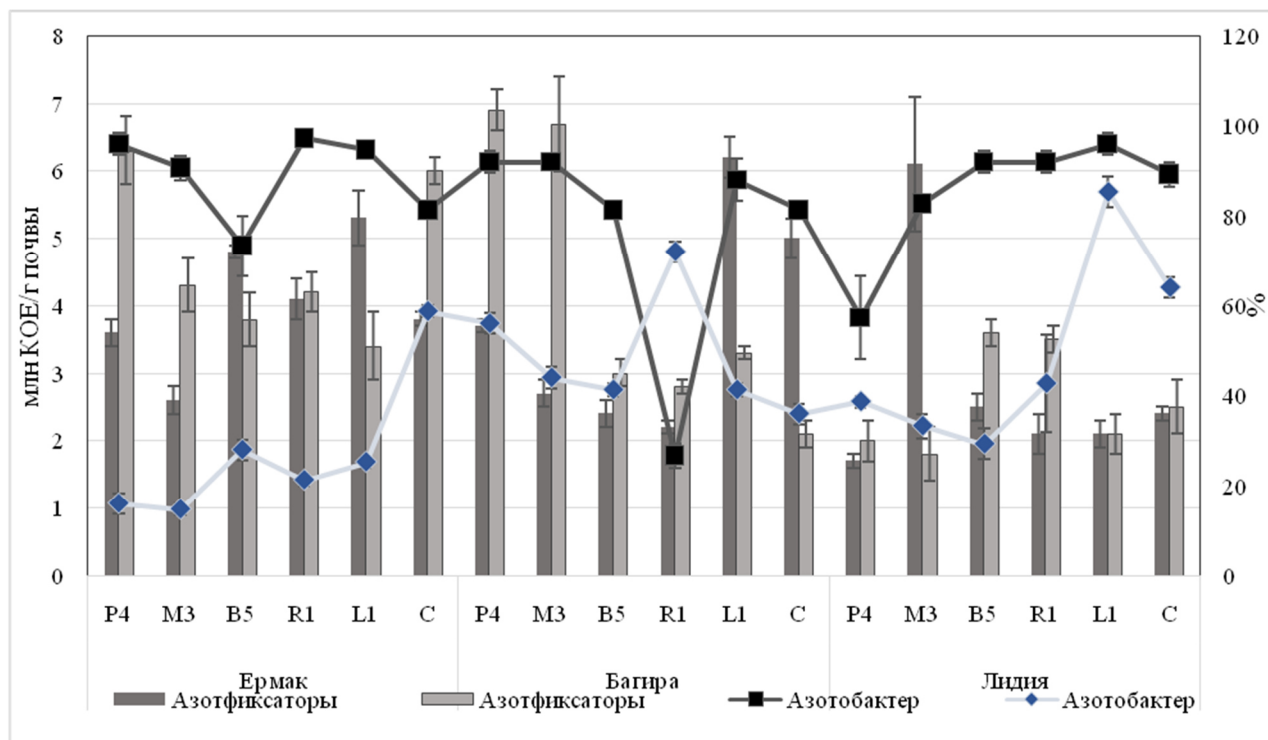


Рисунок 17 – Влияние штаммов с высоким ассоциативным потенциалом на численность азотфиксирующих микроорганизмов ризосферы пшеницы озимой (полевой опыт, 2019-2020 гг.)

Определение численности актинобактерий, микромицетов и целлюлозолитиков позволяет учесть группу, которая активна не только в отношении утилизации практически всего спектра природных и искусственных органических и минеральных соединений, но и способна к участию в образовании гумуса. В условиях 2020 г. выявлена тенденция снижения количества микроорганизмов эколого-трофических групп (актинобактерии, микромицеты и целлюлозолитики) по сравнению с условиями предыдущего года, что возможно связано с засухой, оказывающей неблагоприятное воздействие на их рост и развитие. Отмечены также различия по численности микроорганизмов у отдельных сортов при инокуляции некоторыми штаммами.

Актинобактерии играют важную роль в рециркуляции веществ, так как способны метаболизировать сложные органические вещества и ксенобиотические соединения, такие как пестициды, тяжелые металлы и т.д. [52]. В 2019 г. численность микроорганизмов этой группы увеличивалась в 2,0 раза под влиянием штаммов L1, R1 и B5 у сорта Ермак. На сорте Лидия под влиянием этих же штаммов увеличение варьировало в пределах от 1,7 до 2,7 раза по сравнению с контролем (рис.18). Снижение от 1,2 до 6,0 раз во всех вариантах отмечено на сорте Багира. Численность микромицетов в ризосфере пшеницы Ермак и Багира увеличивалась в 1,2-3,4 раза под влиянием

инокуляции, за исключением вариантов со штаммом L1 у сорта Ермак и R1 у сорта Багира, находившихся на уровне контроля.

Количество целлюлозолитических микроорганизмов в ризосфере пшеницы реагировало на инокуляцию штаммами в обратной зависимости от сорта. У сорта Ермак штаммы P4, B5 и R1 способствовали его снижению в 1,5-2,0 раза, тогда как у сорта Багира – увеличению в 1,3-2,7 раза. В варианте со штаммом M3 отмечено увеличение численности целлюлозолитиков в 1,5 раза у сорта Ермак и такое же снижение наблюдалось у сорта Багира. Эти показатели оставались на уровне контроля в варианте со штаммом L1. На сорте Лидия снижение целлюлозолитических микроорганизмов в ризосфере пшеницы отмечено во всех вариантах, в условиях 2019 и 2020 гг.

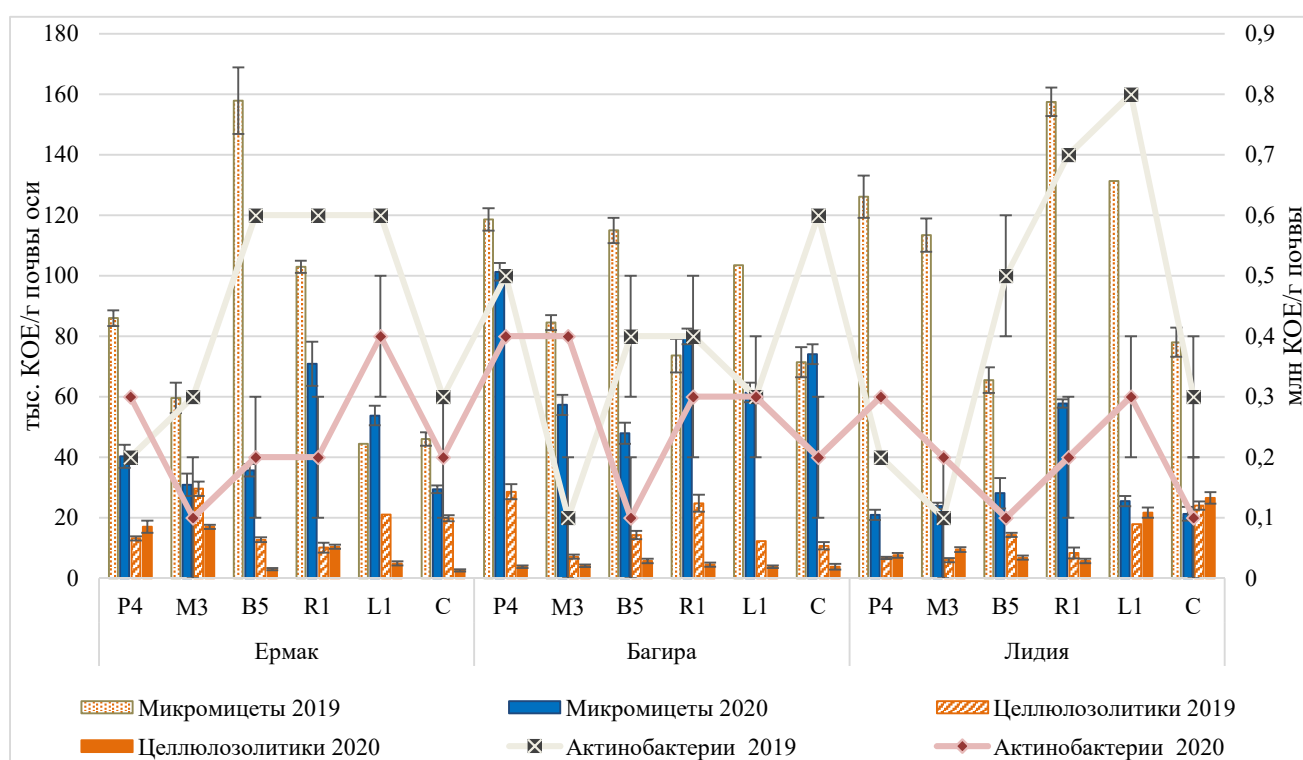


Рисунок 18 – Влияние штаммов с высоким ассоциативным потенциалом на численность микроорганизмов ризосферы пшеницы озимой (полевой опыт, 2019-2020 гг.)

Почвенные микроскопические грибы представляют крупную экологическую группу, участвующую в минерализации органических остатков растений и животных, а также в образовании гумуса и являются основными деструкторами сложных соединений [53], делая возможным дальнейшее их использование другими организмами. Под воздействием инокуляции численность микромицетов увеличивалась во всех вариантах в 1,4-2,0 раза, за исключением штамма B5, где было незначительное снижение.

Микробная биомасса, являясь лабильным компонентом органического вещества, в первую очередь реагирующим на изменения окружающей среды, отражает тренд накопления или минерализации органического вещества почвы [54]. Расчет коэффициентов и индексов [80], указывающих на направленность минерализационных процессов в почве, позволил установить, что инокуляция способствует их активизации (табл.14). В неблагоприятных погодных условиях 2020 г. наблюдали повышение активности минерализационных процессов, что свидетельствует об увеличении иммобилизационных процессов в ризосфере пшеницы. На сорте Лидия инокуляция всеми исследуемыми ассоциативными штаммами снижала коэффициент минерализации до оптимальных значений.

Таблица 14 – Влияние штаммов с высоким ассоциативным потенциалом на направленность минерализационных процессов в ризосфере пшеницы озимой (полевой опыт, 2019–2020 гг.)

Вариант		Коэффициент минерализации		Индекс олиготрофности		Коэффициент олигонитрофильности		Индекс педотрофности	
		2019	2020	2019	2020	2019	2020	2019	2020
Ермак	P4	0,6	1,4	0,2	0,5	0,7	2,7	0,4	1,7
	M3	1,9	1,5	0,3	0,6	1,1	1,2	1,1	1,9
	B5	1,1	1,8	0,5	1,2	1,0	1,7	0,3	3,0
	R1	1,3	0,9	0,4	0,3	0,7	0,8	0,2	1,4
	L1	0,9	2,2	0,1	0,7	0,6	1,2	0,2	2,8
	C*	0,4	1,0	0,1	0,7	0,6	1,6	0,3	0,9
Багира	P4	1,1	0,9	0,1	0,5	0,6	1,8	0,4	1,9
	M3	1,0	2,1	0,1	0,9	0,7	2,6	0,4	2,1
	B5	2,5	1,9	0,1	0,8	0,5	1,0	0,3	3,1
	R1	1,7	3,3	0,4	1,1	0,6	1,8	0,4	1,3
	L1	0,4	1,4	0,3	1,3	0,6	1,8	0,3	0,8
	C*	0,5	1,18	0,9	0,6	0,7	1,3	0,3	1,4
Лидия	P4	1,3	1,0	3,4	0,2	0,2	0,7	0,3	1,8
	M3	0,7	1,1	0,9	1,6	1,1	0,9	1,0	0,7
	B5	0,9	0,9	0,5	0,4	0,3	0,7	0,9	0,4
	R1	1,3	0,4	6,0	0,1	0,8	0,6	0,9	2,4
	L1	0,8	1,7	2,1	2,0	0,5	1,4	0,4	2,9
	C*	1,9	2,7	1,5	2,0	0,7	1,0	1,7	1,9

Примечание. *С – контроль без обработки.

Повышение индекса олиготрофности может свидетельствовать о замедлении процессов деструкции органического вещества. При определении его показателей отмечена зависимость их от сорта, погодных условий года и штамма, использованного при инокуляции. В ризосфере пшеницы сорта

Ермак в более благоприятных условиях 2019 г установлена тенденция к повышению индекса олиготрофности в вариантах с использованием штаммов по сравнению с контролем. В засушливых условиях следующего года наблюдали обратную тенденцию – к снижению. Исключение составил вариант со штаммом В5, где отмечено увеличение данного индекса в 1,7 раза к контролю. Кроме того, в варианте с L1 показатели оставались на уровне варианта без инокуляции независимо от года исследований.

Противоположные тенденции по годам исследований наблюдали на сорте Багира, характеризующемся более высокой пластичностью по сравнению с другими исследуемыми сортами. Инокуляция семян всеми исследуемыми ассоциативными штаммами в условиях первого года способствовала снижению показателей индекса олиготрофности в 2,2-9,0 раз по сравнению с контролем. В условиях засухи, напротив, отмечено повышение данного индекса в 1,3–2,2 раза к контролю под влиянием ассоциативных бактерий, за исключением варианта с применением штамма Р4 (незначительное снижение).

В ризосфере пшеницы сорта Лидия только в условиях засухи наблюдали тенденции к снижению индекса олиготрофности под влиянием всех исследуемых штаммов в 1,3–20,0 раз в сравнении с контролем. Исключение составил штамм L1, выделенный с ризопланы этого сорта. Показатели оставались на уровне варианта без инокуляции. В более благоприятных условиях года показатели данного индекса зависели от влияния штамма и изменялись в сторону увеличения в 1,4–4 раза (L1, Р4, R1) или снижения в 1,7 и 3 раза (М3 и В5 соответственно) к контролю.

Коэффициент олигонитрофильности показывает степень обеспеченности почвы азотфиксирующими микроорганизмами. В ризосфере пшеницы всех исследуемых сортов в условиях засухи 2020 г. данный коэффициент выше, чем в предыдущем году, более благоприятном по метеорологическим показателям (приложение В). Увеличение или снижение его в условиях конкретного года зависело от влияния штамма ассоциативных с *T. aestivum* бактерий.

Считается, что чем выше индекс педотрофности, тем более биогеоценоз приближен кестественным ценозам изучаемой почвенно-климатической зоны и обладает большей устойчивостью к негативным воздействиям со стороны различных антропогенных вмешательств. Проведенное изучение ризосферы пшеницы сортов Ермак и Багира показало, что данный индекс реагировал на инокуляцию штаммами значительно в условиях засухи. Увеличение его показателей от 1,6 до 3,3 раза установлено под влиянием инокуляции во всех

вариантах опыта на сорте Ермак. На сорте Багира в этих же засушливых условиях возрастанию индекса педотрофности способствовали штаммы Р4, М3 и В5 (в 1,4–2,2 раза), тогда как его снижению штаммы L1 в 1,8 раза и R1 – незначительно по сравнению с контролем. На сорте Лидия в благоприятных условиях отмечено снижение его показателей в 1,7–5,7 раза под влиянием всех исследуемых штаммов по сравнению с контролем, тогда как в условиях засухи данный индекс зависел от конкретного штамма. Так, в вариантах со штаммами L1 и R1 установлено увеличение индекса педотрофности в 1,5 и 1,3 раза, с В5 и М3 – снижение в 4,7 и 2,7 раза соответственно к контролю, с Р4 – показатель оставался на уровне варианта без инокуляции.

Метагеномный анализ чернозема южного ризосферы пшеницы сортов Ермак и Багира в условиях 2019 г. показал наличие представителей 18 фил, относящихся к доменам археи и бактерии. Значительную долю составляли неопределенные представители среди доменов, показатели которых колебались от 40,8 до 43,3% в зависимости от сорта и его инокуляции штаммом (рис. 20-22). В состав доминирующих (доля выше 1%) фил прокариот вошли семь: *Thaumarchaeota*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*. Доля неопределенных филотипов из домена *Bacteria* составила 1,4-1,7%.

Представленность архей филы *Thaumarchaeota*, которые являются окислителями аммиака и играют ключевую роль в азотном цикле [53], находилась в пределах 1,7-2,1% у сортов Лидия и Ермак и 1,5-2,4% у сорта Багира. В ризосфере пшеницы исследуемых сортов штамм L1 способствовал незначительному её увеличению.

Инокуляция способствовала увеличению доли бактерий филы *Acidobacteria*, за исключением варианта со штаммом R1, где отмечено незначительное снижение по сравнению с контролем. Максимальные показатели доли данной филы отмечены в вариантах с инокуляцией штаммами В5 и М3, которые превышали контроль в 1,5 и 1,7 раза соответственно на сорте Багира (рис.19).

Среди минорных представителей установлены изменения доли архей филы *Euryarchaeota* в ризосфере пшеницы под влиянием исследуемых штаммов ассоциативных бактерий. В ризосфере пшеницы сорта Багира отмечено снижение их доли с 1,2 раза под влиянием инокуляции штаммом L1 до 5 раз штаммом Р4, тогда как в вариантах со штаммами В5 и М3 различий с контролем не выявлено.

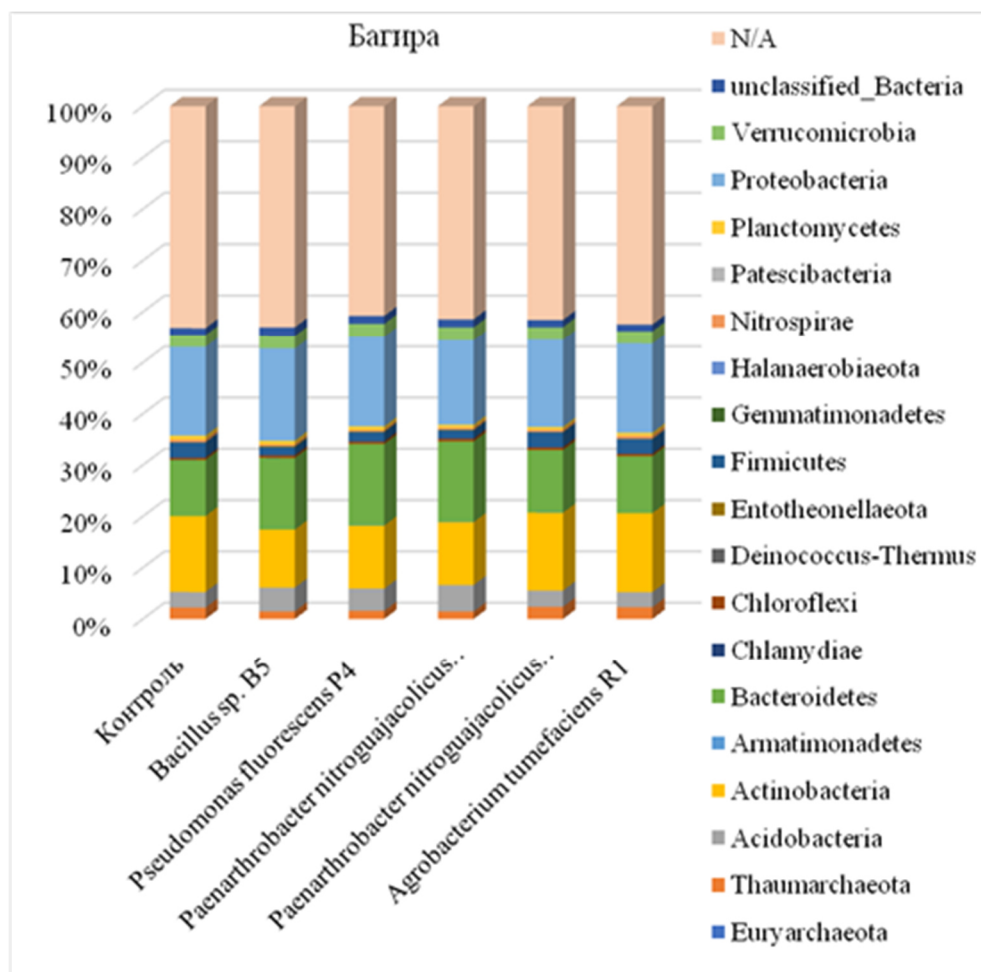


Рисунок 19 – Влияние штаммов ассоциативных бактерий на таксономическую структуру (на уровне фил) микробиома ризосферы пшеницы сорта Багира (полевой опыт, 2019 г.)

Максимальные показатели доли филы *Acidobacteria* на сорте Ермак отмечены также в вариантах с инокуляцией штаммами В5 и М3, превышение к контролю составило 1,7 и 1,3 раза соответственно (рис.20).

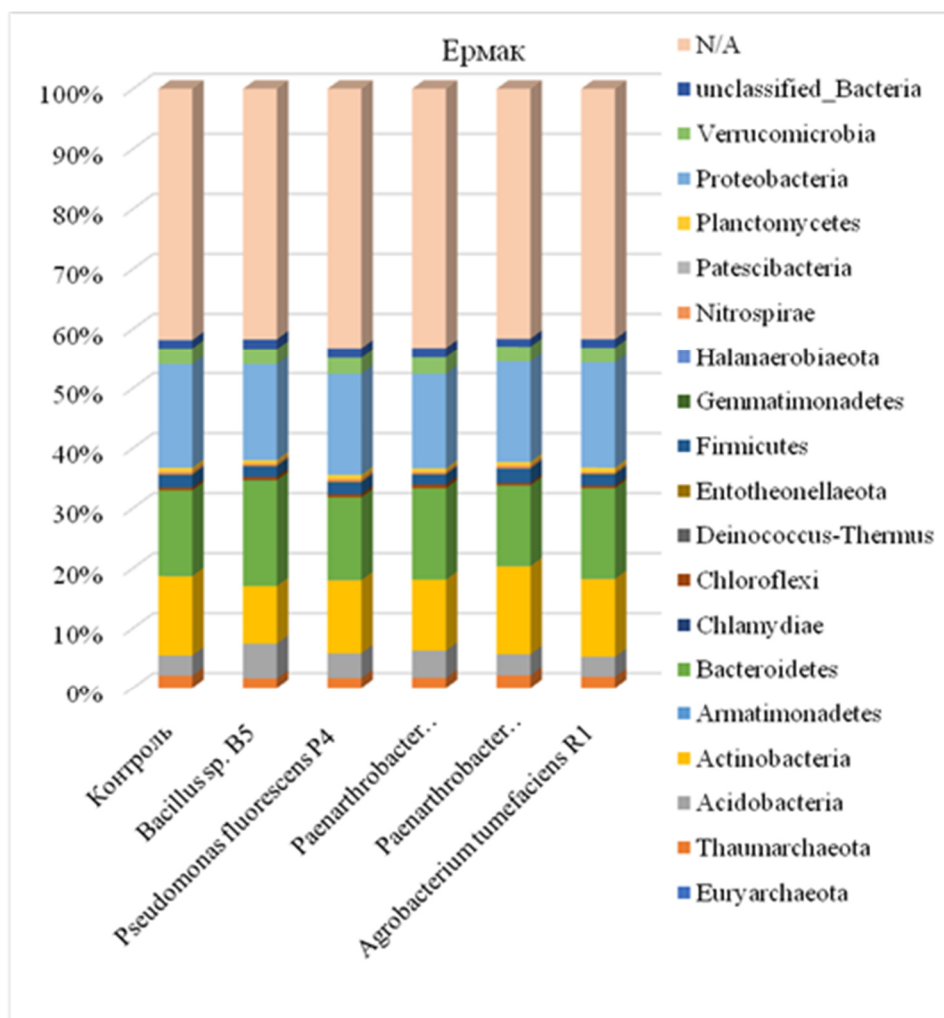


Рисунок 20 – Влияние штаммов ассоциативных бактерий на таксономическую структуру (на уровне фил) микробиома ризосферы пшеницы сорта Erмак (полевой опыт, 2019 г.) центрировать рис.

В ризосфере пшеницы сорта Лидия отмечено увеличение доли бактерий филы *Acidobacteria* до 4,0-4,5 % по отношению к контролю (3,7%) во всех вариантах опыта с применением штаммов ассоциативных бактерий (рис. 21). Исключение составил также вариант со штаммом МЗ с показателями на уровне контроля.

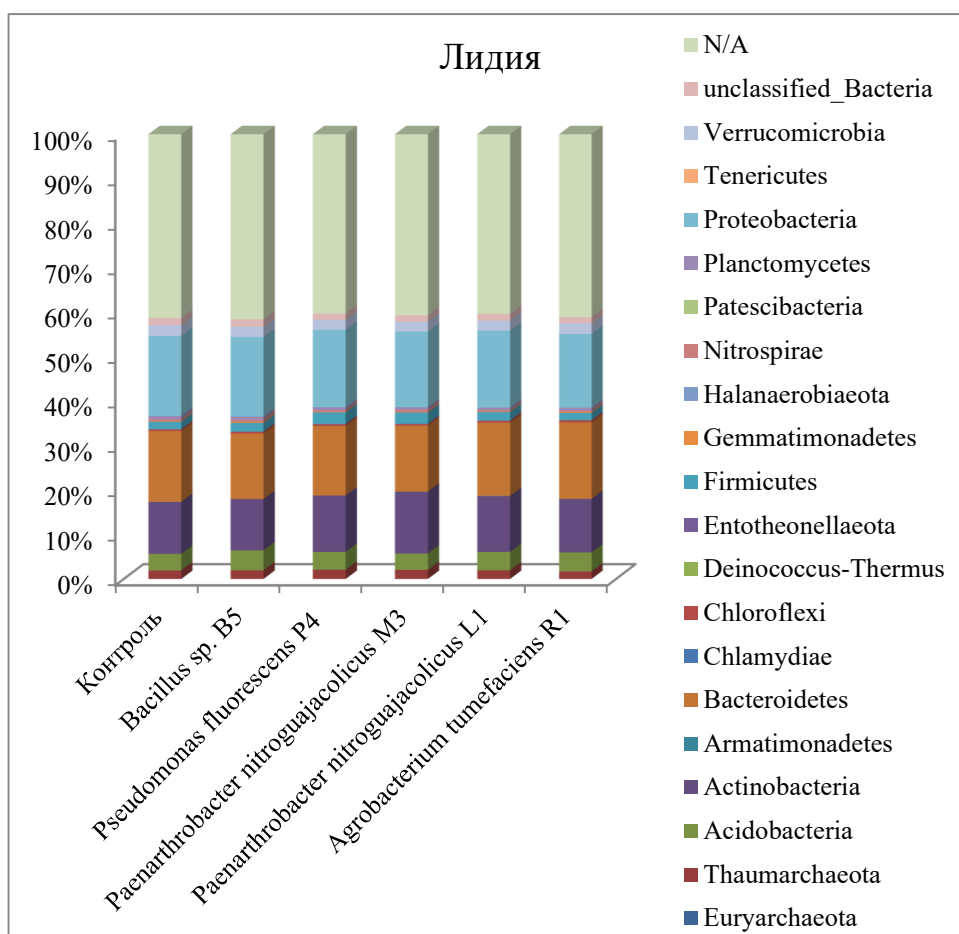


Рисунок 21 – Влияние штаммов ассоциативных бактерий на таксономическую структуру (на уровне фил) микробиома ризосферы пшеницы сорта Лидия (полевой опыт, 2019 г.)

Высоким потенциалом к биоремедиации почв известны представители фила *Actinobacteria* [56], а также их приспособленностью к сухим и теплым условиям, [33], что может объяснить высокую (на порядок) ее долю в исследуемом микробиоме. Под влиянием штамма B5 отмечено максимальное снижение доли *Actinobacteria* 1,3 и 1,4 раза по обоим сортам. На сорте Ермак максимальный показатель 14,7% отмечен в варианте с L1, в контроле 13,2%, на сорте Багира в этом варианте также отмечено повышение, но максимальное с долей 15,4% с инокуляцией R1 при 14,8% в контроле. Такого же порядка значения доли отмечены у представителей фила *Bacteroidetes*, которые увеличивались под влиянием инокуляции у сорта Багира с 10,96% в контроле до 11,13% (минимальное значение) в варианте с R1 и 15,9% (максимальное значение) со штаммом P4. У сорта Ермак их представительство в контроле составило 14,26% и возросло под влиянием штаммов R1, M3 и B5 до 15,08, 15,20 и 17,62% соответственно. Незначительное снижение отмечено в вариантах с P4 (13,75%) и с L1 (13,42%).

Представители филы *Firmicutes* участвуют в разложении сложных органических веществ, служат в поддержании стабильности ризосферного микробиома, способствуют биоремедиации почвы [43, 57]. В условиях чернозема южного полевых исследований представленность *Firmicutes* снижалась под влиянием штаммов у обоих сортов. Исключение составил вариант с L1, где доля незначительно (на 0,3 %) выше и на уровне контроля (2,9 %) у сорта Багира.

Снижением доли в микробиоме реагировали на инокуляцию и представители филы *Proteobacteria*, характеризующейся как самая многочисленная группа бактерий чернозема. В ризосфере пшеницы сорта Ермак отмечено наиболее значительное снижение доли на 1,5% в варианте со штаммом M3 по сравнению с контролем. Исключение составил вариант со штаммом R1 с незначительным повышением ее на 0,3%. У сорта Багира снижению доли *Proteobacteria* также способствовал штамм M3 на 0,8%, увеличению на 0,6% – штамм B5, в остальных вариантах показатели были близки к контролю.

Представители филы *Verrucomicrobia* являются индикаторами химических свойств почвы, связанных с ее плодородием [42]. В исследуемых образцах отмечены тенденции к незначительному увеличению доли бактерий этой филы под влиянием инокуляции у сорта Багира, тогда как у сорта Ермак только в вариантах с P4 и M3 в сравнении с контролем.

Анализ главных координат, представленных в ризосфере пшеницы фил прокариот не выявил существенных различий между вариантами (рис. 22). Полученный результат свидетельствует о том, что обработка штаммами семян незначительно влияет на изменение состава микробиома ризосферы пшеницы сорта Лидия.

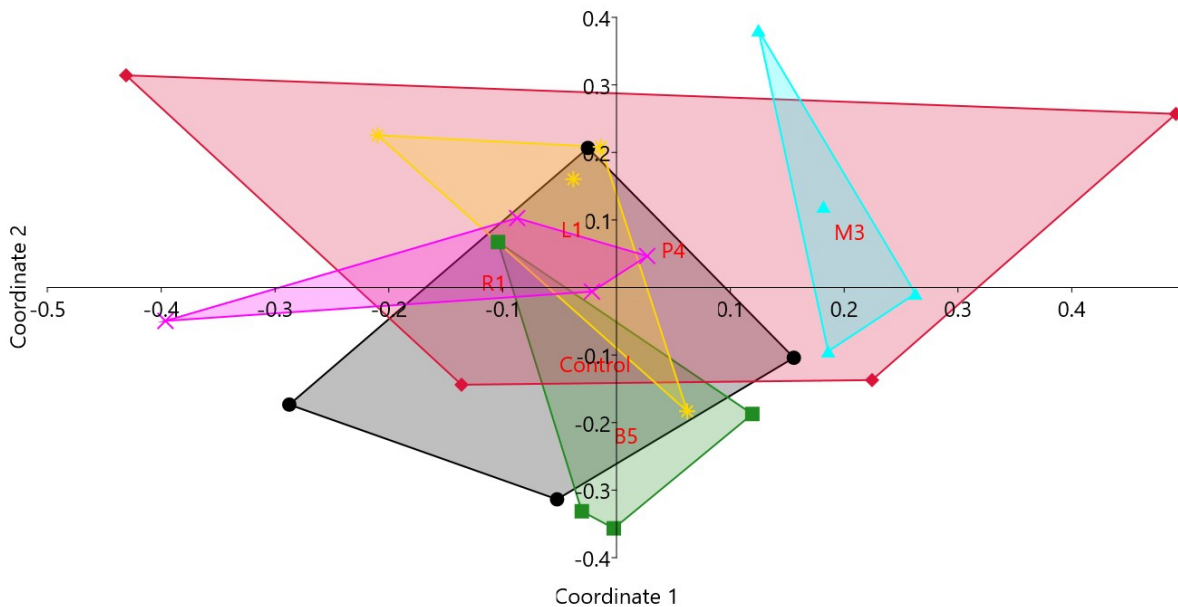


Рисунок 22 – Анализ главных координат фил прокариот, представленных в ризосфере пшеницы сорта Лидия: черная область – контроль, зеленая – B5, розовая – R1, желтая – L1, Голубая – M3, красная – P4

В условиях 2020 г., который характеризовался повышенной засухой, проведенный метагеномный анализ таксономической структуры микробиома ризосферы пшеницы показал наличие представителей 17–20 фил, относящихся к доменам археи и бактерии. Значительную долю составляли неопределенные представители среди доменов, показатели которых колебались от 18,3 до 22,8% в зависимости от сорта и его инокуляции штаммом (рис. 24–26). В состав доминирующих (доля выше 1%) фил прокариот вошли девять: *Thaumarchaeota*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*. Доля неопределенных филотипов из домена *Bacteria* составила 1,2–1,6%.

Представленность архей филы *Thaumarchaeota* находилась в пределах 4,5–5,8% у сорта Багира (рис. 23) и 5,1–5,8% у сорта Ермак (рис. 24). Инокуляция исследуемыми штаммами способствовала увеличению доли бактерий филы *Acidobacteria* (от 10,5–12,6%) на сорте Ермак, тогда как во всех вариантах на сорте Багира отмечено ее снижение по сравнению с контролем.

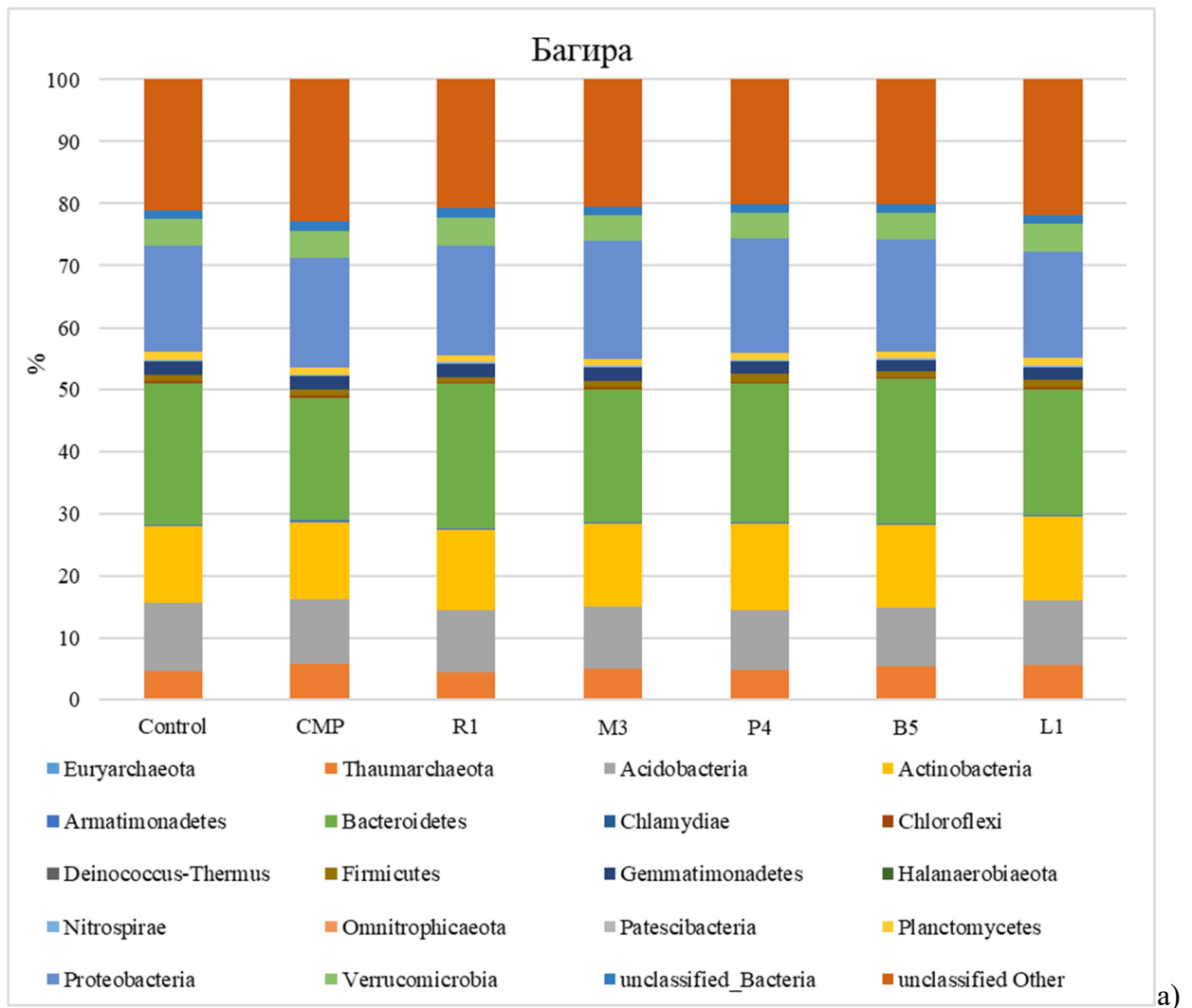


Рисунок 23 – Влияние штаммов ассоциативных бактерий натаксономическую структуру (на уровне фил) микробиома ризосферы озимой пшеницы сорта Багира (полевой опыт, 2020 г.)

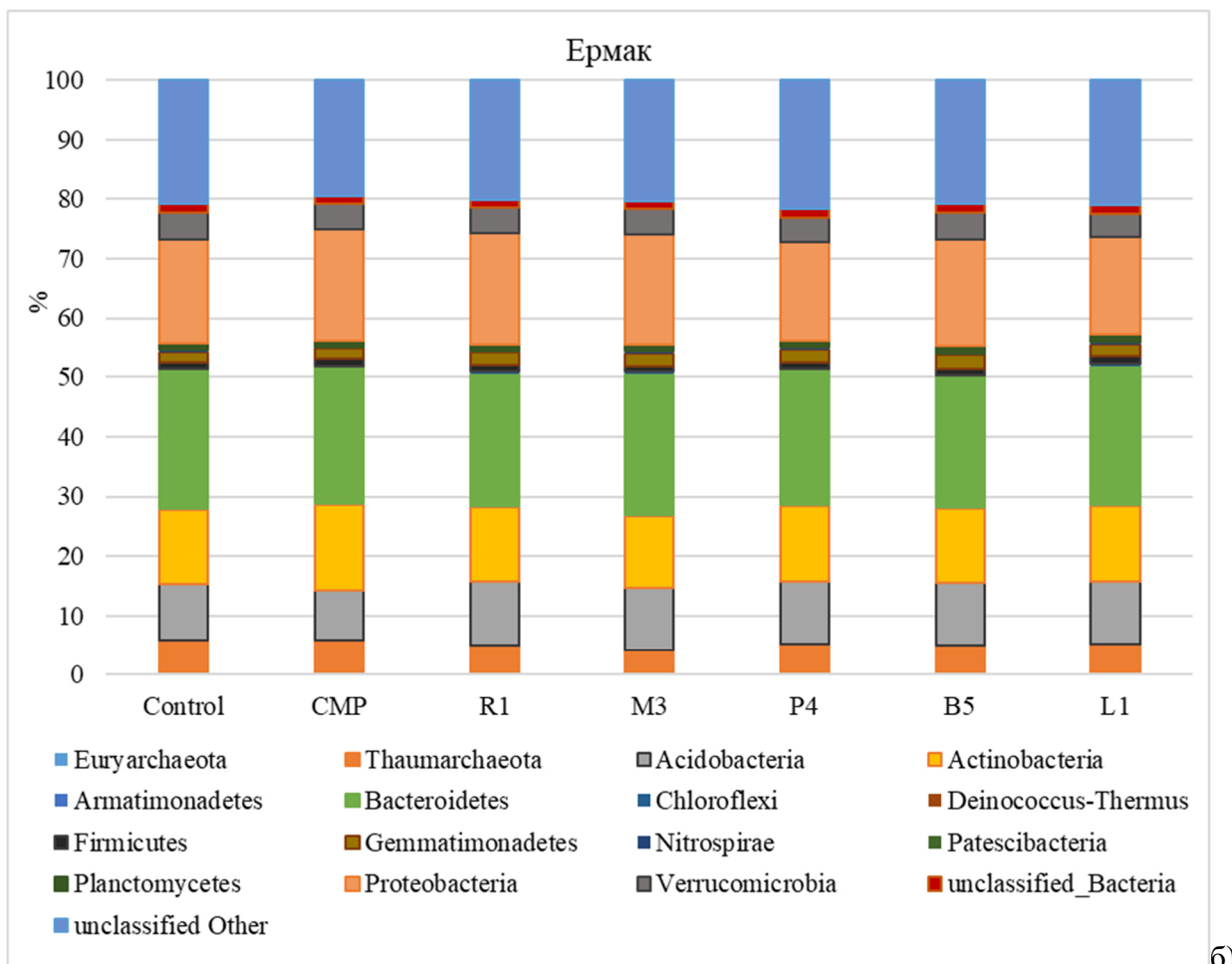


Рисунок 24 – Влияние штаммов ассоциативных бактерий натаксономическую структуру (на уровне фил) микробиома ризосферы пшеницы озимой сорта Ермак (полевой опыт, 2020 г.)

Представители филы *Actinobacteria* играют важную роль в качестве симбионтов в растительных ассоциированных микробных сообществах, а также некоторые из них известны своей способностью продуцировать органические кислоты, способствуя тем самым растворению кальция и фосфора [58]. Под влиянием всех исследуемых штаммов отмечено увеличение доли этой филы на двух сортах от 1,0-16,1%, кроме штамма М3 на сорте Ермак, где наблюдалось незначительное снижение доли. Доля представителей филы *Bacteroidetes* увеличивалась под влиянием инокуляции у сорта Багира с 22,7% в контроле до 23,3% в вариантах с R1 и B5. У сорта Ермак их представительство в контроле составило 23,2 % и незначительно увеличивалось под влиянием штаммов L1 и M3 до 23,3-23,7%, соответственно.

Представленность филы *Firmicutes*, представители которой способны разлагать сложные органические вещества [59], увеличивалась под влиянием штаммов M3 и L1 у обоих сортов 18,2-33,3%. Максимальное значение

отмечено в результате инокуляции Р4 на сорте Багира, что составило 55,6% по сравнению с контролем.

Увеличением доли реагировали на инокуляцию всеми штаммами представители фило *Gemmatimonadetes* в ризосфере сорта Ермак в 1,1-1,5 раза, тогда как в ризосфере сорта Багира наоборот отмечено снижение доли данной фило.

Доля фило *Planctomycetes* изменялась под влиянием инокуляции в зависимости от сорта. На сорте Ермак отмечена тенденция к незначительному увеличению представленности данной фило, тогда как на сорте Багира наблюдалась обратная тенденция.

Представители фило *Proteobacteria* реагировали увеличением доли на инокуляцию в ризосфере двух сортов, за исключением варианта с Р4 и L1 на сорте Ермак со снижением на 6,7 и 6,2%, соответственно. На сорте Багира максимальный показатель 19,1% отмечен в варианте с МЗ, в контроле 17,3 %, на сорте Ермак в этом варианте также отмечено повышение, но максимальное с долей 18,9 % с инокуляцией R1 при 17,8 % в контроле.

В исследуемых нами образцах отмечены тенденции к незначительному снижению доли *Verrucomicrobia*, представителей которой чувствительны к влажности и аэрации почвы [60], под влиянием инокуляции у сорта Ермак, тогда как у сорта Багира в вариантах СМР и R1 отмечена тенденция к увеличению по сравнению с контролем.

Таксономический анализ микробиома ризосферы пшеницы сорта Лидия показал, что представленность архей фило *Thaumarchaeota* возросла в результате инокуляции всеми ассоциативными штаммами от 4,2% в варианте с штаммом R1 до 45,8% – с Р4 (рис. 25). Увеличение доли бактерий фило *Acidobacteria* до 9,9-11,3% отмечено во всех вариантах по отношению к контролю (9,6%). Исключение составил вариант со штаммом МЗ и СМР с показателями на уровне контроля.

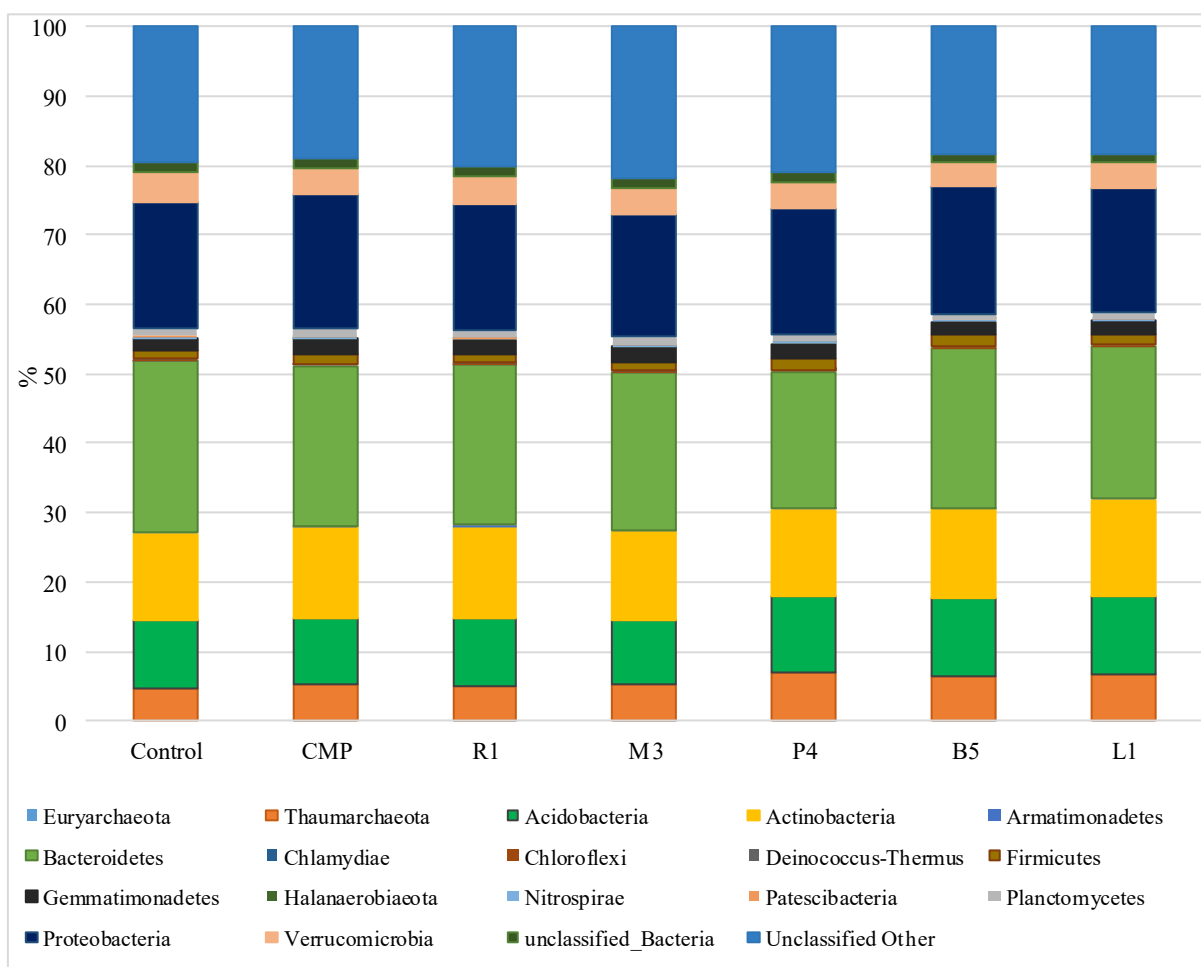


Рисунок 25 – Влияние штаммов ассоциативных бактерий натаксономическую структуру (на уровне фил) микробиома ризосферы пшеницы озимой сорта Лидия (полевой опыт, 2020 г.)

Представители филы *Actinobacteria* вносят огромный вклад в глобальный углеродный цикл через расщепление растительной биомассы [60]. Максимальной долей этой филы была в варианте с L1 (14,0%), минимальной с P4 (12,3%), что близко к контролю (12,5%). Инокуляция всеми штаммами вызывала снижение доли *Bacteroidetes* от 6,9–20,6% по сравнению с контролем (24,8%).

Доля филы *Gemmatimonadetes* увеличивалась при инокуляции в вариантах с CMP, P4, M3 и R1 от 10,5–21,1% при показателе в контроле 1,9%.

Firmicutes относится к филам, которые играют важную роль в превращении сложных органических веществ [62]. Представленность этой филы возрастала под влиянием штаммов и максимальной долей достигла при B5 (1,7%), при показателе в контроле 1,1%. Представленность филы *Proteobacteria*, являющаяся наиболее многочисленной группой бактерий, увеличивалась в результате применения только варианта с CMP на 7,2% относительно контроля (18,0 %). Доля филы *Planctomycetes*, представители

которой способны к фиксации азота [63], увеличивалась в варианте с применением СМР на 20,0% к контролю (1,0%).

Представленность фила *Verrucomicrobia* связана с почвенными факторами, связанными с плодородием почвы, такими как общий азот, фосфор, калий и т.д. [40]. В исследуемых нами образцах доля этой фила снижалась в сравнении с контролем, объяснением чему может быть более активное использование питательных веществ растениями.

Проведенный факторный анализ показал, что 7 фил (*Euryarchaeota*, *Armatimonadetes*, *Chlamydiae*, *Deinococcus-Thermus*, *Halanaerobiaeota*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*), включающие и неопределенные филотипы на уровне домена, выступают синтез-аргументами, способствующими формированию урожайности пшеницы. Роль деструкторов определена для остальных 10 фил из девятнадцати, участвующих в анализе (см. рис. 25).

Анализ главных координат, представленных в ризосфере пшеницы фил прокариот, показал, что обработка семян пшеницы комплексом микробных препаратов (СМР), новыми штаммами *P. nitroguajacolicus* М3 и *A. tumefaciens* R1 не привела к значительным изменениям таксономического состава сообщества микроорганизмов в ризосфере пшеницы по сравнению с контролем (рис. 26). В отличие от вариантов с бактеризацией *P. fluorescens* P4 и *P. nitroguajacolicus* L 1, оказавшие положительное влияние на урожайность и *Bacillus* sp. B5. Штаммы значительно отличаются от контроля и друг от друга.

В прокариотном биоме чернозёма южного ризосферы пшеницы сорта Багира определено 126 семейств с минорной долей, не превышающей 1%. В их число вошло семейство *Enterobacteriaceae*, пектобактерии которого относятся к наиболее вредоносным возбудителям заболеваний растений [64], доля которого снижалась в варианте применения М3, Р4 и L1 на 25,0-62,5%, относительно варианта без обработки.

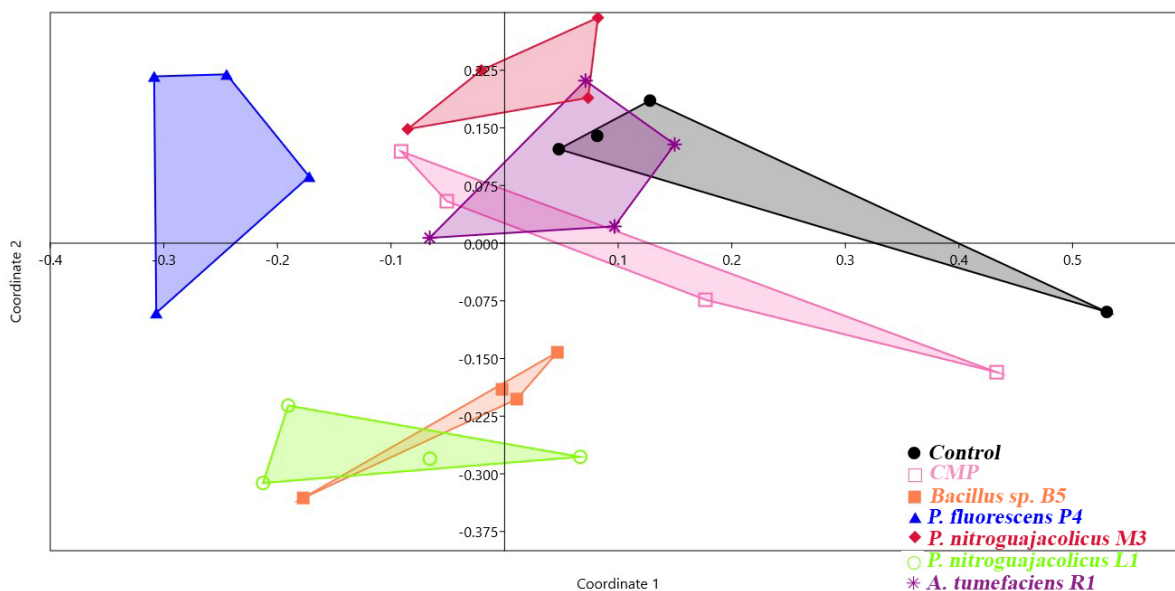


Рисунок 26 – Анализ главных координат фил прокариот, представленных в ризосфере пшеницы сорта Лидия при бактеризации (РСоА, метрика Брея-Кертиса, полевой опыт, 2020 г.)

На уровне доминирующих 26 семейств показано влияние штаммов на их представительство в микробиоме ризосферы пшеницы сорта Багира (рис. 27). Во всех вариантах, кроме R1, где значения на уровне контроля, отмечено увеличение доли архей семейства *Nitrososphaeraceae* в 1,1-1,3 раза. Обратная реакция – уменьшение доли, в ответ на инокуляцию, наблюдалась среди бактериальных семейств *Blastocatellaceae*, *Gemmatimonadaceae* и *Pyrinomonadaceae*. Доля семейства *Chitinophagaceae*, представители которого способны разлагать сложные органические вещества, такие как хитин и целлюлоза [65], а также преобладают на залежных почвах [64], увеличилась на 12,2% в варианте M3 относительно контроля. Увеличение доли представительства семейства *Sphingomonadaceae*, некоторые виды которого обладают биопротекторными свойствами [67] в 1,1 раза и семейства *Flavobacteriaceae* в 1,5 раза установлено под влиянием штамма R1.

Представители семейства *Micrococcaceae* способны использовать широкий спектр субстратов для химических реакций [68]. Доля этого семейства увеличивалась при инокуляции штаммами P4 и M3 на 12,5 и 25,0% соответственно относительно контроля. Штаммы P4, M3 и B5 обеспечили возрастание доли семейства *Xanthomonadaceae*, находившегося среди минорных представителей и объединяющее на ряду с микроорганизмами с различными свойствами и бактерии, стимулирующие рост растений [69], в 1,1-1,4 раза.

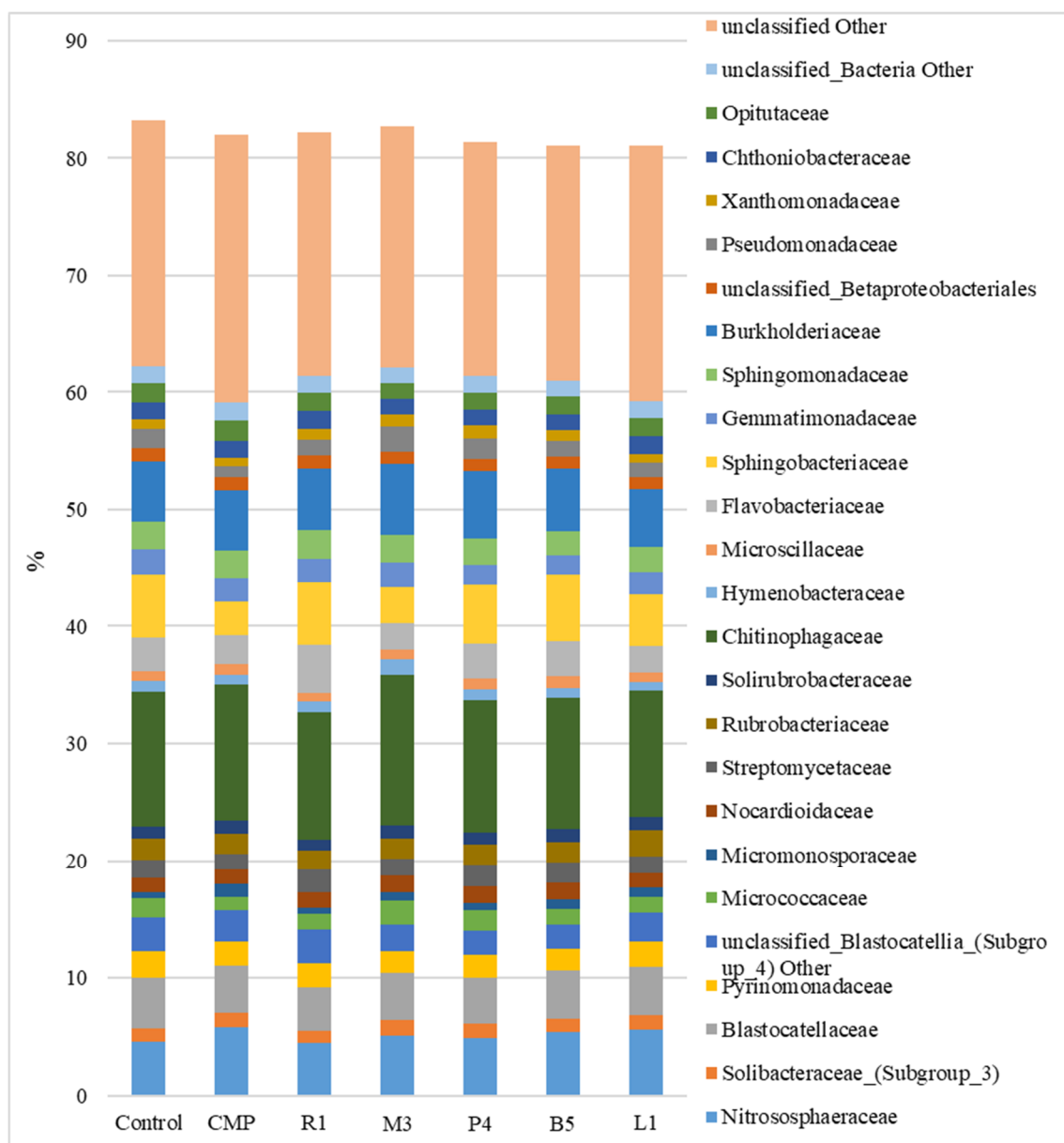


Рисунок 27 – Влияние штаммов ассоциативных бактерий на таксономическую структуру (на уровне семейств) микробиома ризосферы пшеницы сорта Багира

Опубликованные результаты исследования показали, что бактерии семейства *Chthoniobacteraceae* доминируют в почвах урбанизированных [66]. Доля их представителей в черноземе южном ризосферы пшеницы имела тенденции к уменьшению под влиянием всех штаммов кроме L1 и R1, где отмечено незначительное возрастание.

В результате инокуляции в вариантах P4 и M3 возросла доля представителей семейства *Pseudomonadaceae* на 12,5 и 37,5%, соответственно, в сравнении с контролем. Это семейство объединяет большое количество микроорганизмов с различными функциями, в том числе азотфиксирующие и ростстимулирующие бактерии [70, 71].

Среди мажорных представителей таксономической группы в ризосфере *T. aestivum* находилось семейство *Rubrobacteraceae*, характеризующееся устойчивостью к экстремальным условиям [66], доля которого снижалась под влиянием всех исследуемых штаммов, кроме L1. Более интенсивное снижение доли представителей семейства *Sphingobacteriaceae* на 2,4-47,3% отмечено также во всех вариантах, кроме B5, по сравнению с контролем.

Таким образом, в результате исследований установлено, что на таксономическую структуру микробиома ризосферы (на уровне фил) пшеницы влияют как штаммы ассоциативных бактерий к *T. aestivum*L., так и почвенные условия.

2.2.4 Влияние нововыделенных штаммов ассоциативных с *T. aestivum* бактерий на продуктивность растений

Скрининг выделенных штаммов по эффективности проводили в условиях лабораторного опыта, оценивая всхожесть и биомассу проростков сортов пшеницы, семена которых инокулировали исходной суспензией штаммов. Исследование влияния выделенных бактерий на посевное качество семян пшеницы показало, что отдельные штаммы (*Pseudomonas koreensis* V4 и *Sinorhizobium meliloti* B2) обеспечили повышение энергии прорастания семян сорта Багира и их всхожести на 5,3% (табл. 15).

Таблица 15

Влияние штаммов на посевные качества семян (%) сортов пшеницы мягкой

Вариант	Багира		Ермак	
	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %
Контроль	92,7	92,7	98,0	98,7
Штамм С5	96,0	96,7	98,7	98,7
<i>Bacillus</i> sp. B5	94,7	96,0	95,3	96,7
<i>Pseudomonas koreensis</i> V4	98,0	98,0	95,3	96,0
<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> M3	96,0	97,3	98,7	98,7
<i>Sinorhizobium meliloti</i> B2	98,0	98,0	96,7	97,3
Штамм P1	93,3	94,0	98,7	98,7
НСР ₀₅	3,51	3,75	2,97	2,30

Установлено влияние выделенных штаммов на всхожесть и биомассу проростков трех сортов пшеницы (табл. 16).

Таблица 16

Влияние выделенных штаммов на всхожесть и биомассу проростков трех сортов пшеницы (лабораторный опыт, 2019 г.)

Вариант опыта	Биомасса, мг						Всхожесть, %		
	корня			побега			Безостая 100	Алексеич	Гром
	Безостая 100	Алексеич	Гром	Безостая 100	Алексеич	Гром			
Контроль	5,67	4,97	4,6	6,2	4,50	4,13	100,0	99,3	100,0
Gv	5,75	5,21	5,03	6,08	4,79	4,43	98,7	97,3	99,3
Mk	6,83	4,67	4,53	6,55	4,53	4,33	96,7	100,0	100,0
Ant	5,20	4,12	4,73	6,0	3,90	4,33	100,0	97,3	100,0
Bb	6,26	4,80	4,91	6,19	4,00	4,50	98,0	100,0	98,0
Br	6,53	4,40	4,87	5,8	4,47	4,33	100,0	100,0	100,0
Tf	5,61	4,93	4,53	5,81	4,13	4,33	98,7	100,0	100,0
204	6,24	4,27	4,90	6,31	3,80	4,36	99,3	100,0	99,3
НСР ₀₅	0,73	0,54	0,56	0,47	0,50	0,73	1,4	3,0	2,3

Штаммы Mk и Bb повышали массу корешков проростков пшеницы сорта Безостая 100 на 1,16 мг (20,5%) и 8,6 мг (15,2%) соответственно к контролю. В остальных вариантах отмечены тенденции как к увеличению, так и снижению показателей, что указывает на необходимость изучения инокуляционной нагрузки на семя.

Выделенные штаммы ассоциативных бактерий пшеницы показали различную эффективность на сортах при выращивании на чернозёмах южном и обыкновенном (рис. 28-30). В условиях чернозёма обыкновенного большинство исследованных штаммов положительно влияли на продуктивность растений пшеницы сорта Багира. Штаммы *Bacillus* sp. B5 и R1 обеспечили прирост сухой биомассы побега на 0,10 г (48%) и 0,13 г (62%) соответственно, по сравнению с контролем (0,21 г).

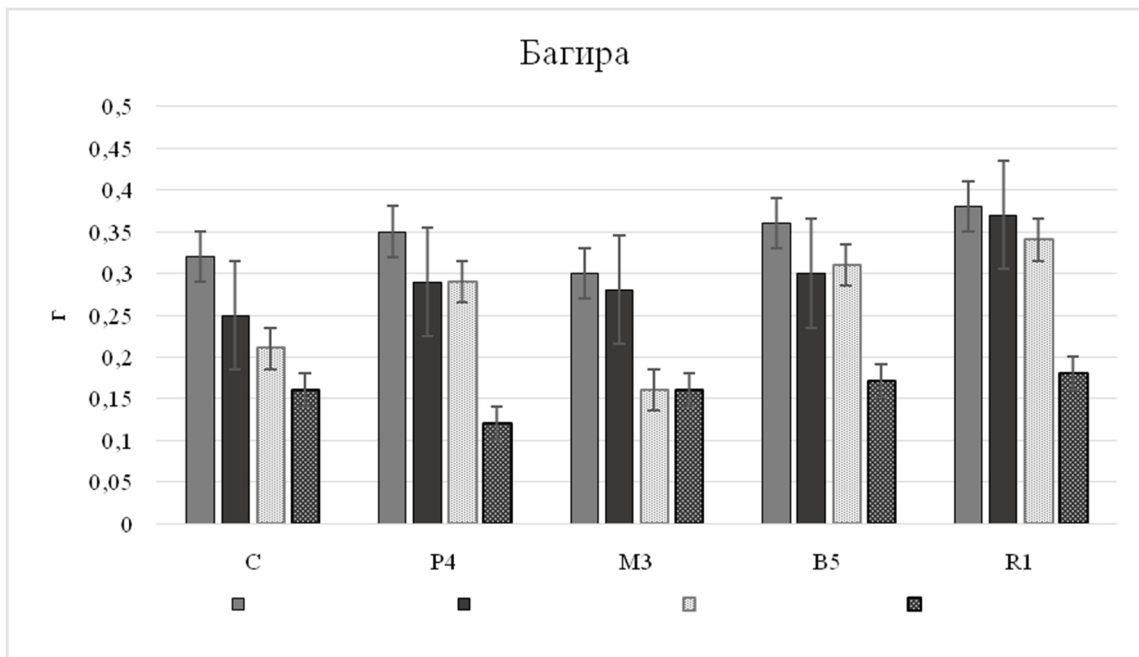


Рисунок 28 – Влияние штаммов (P3, P4, M3, L1, B5, R1, St1) ассоциативных бактерий с *T. aestivum* на продуктивность растений пшеницы озимой сорта Багира по сравнению с контролем (C)

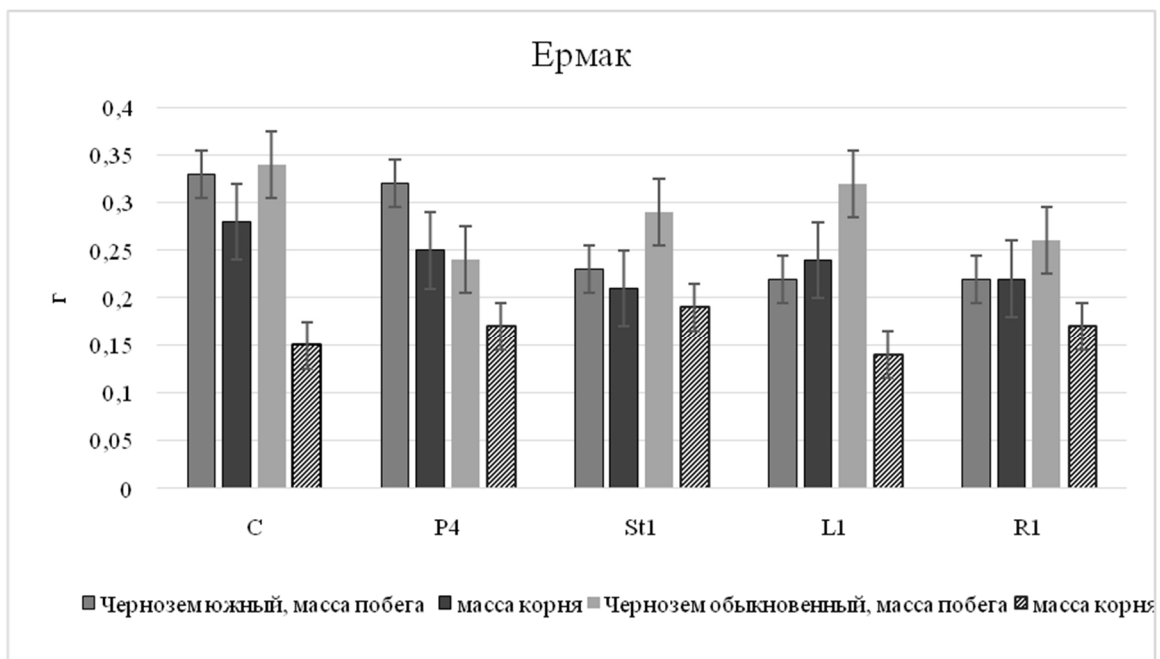
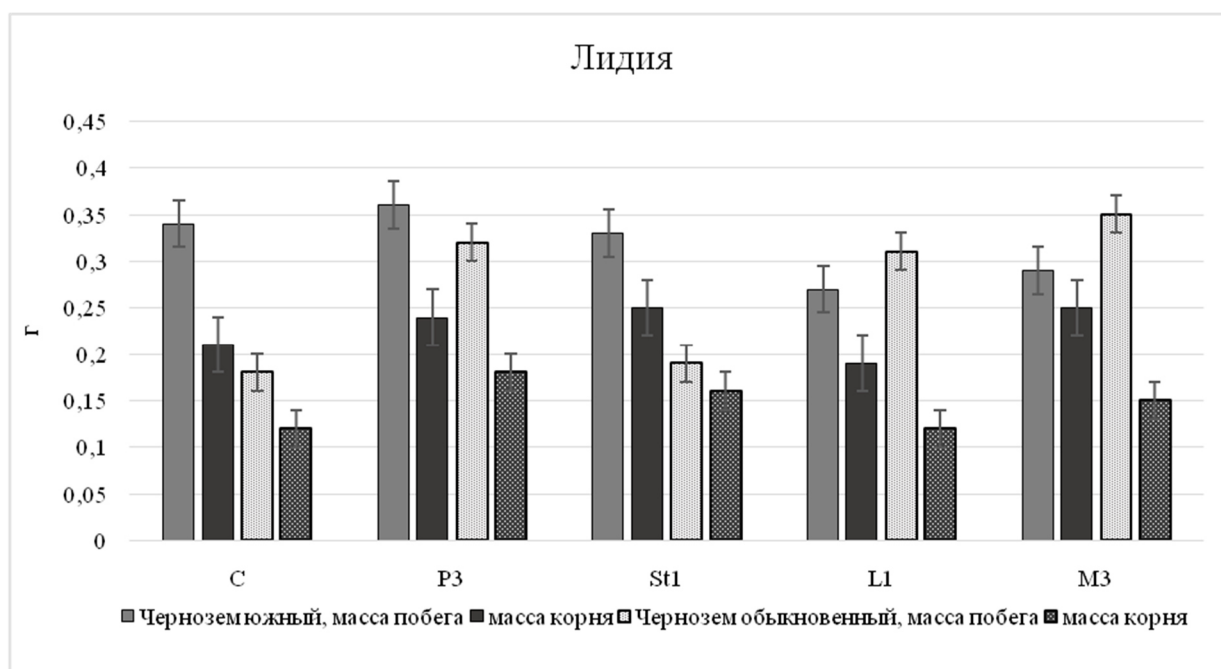


Рисунок 29 – Влияние штаммов (P3, P4, M3, L1, B5, R1, St1) ассоциативных бактерий с *T. aestivum* на продуктивность растений пшеницы озимой сорта Ермак по сравнению с контролем (C)



В)

Рисунок 30 – Влияние штаммов (P3, P4, M3, L1, B5, R1, St1) ассоциативных бактерий с *T. aestivum* на продуктивность растений пшеницы озимой сорта Лидия по сравнению с контролем (С)

Влияние нововыделенных штаммов ассоциативных с *T. aestivum* бактерий на развитие растений пшеницы трёх сортов, выращенных на черноземах южном и выщелоченном, изучали в условиях вегетационных опытов. Установлено влияние сорта на длину побега на черноземе южном, по мере возрастания их можно разместить в следующем порядке: Гром, Безостая 100, Алексеич (табл. 17). Инокуляция сорта Безостая 100 штаммами Bг и Tг повысила этот показатель на 1,63 см (4,4%) и 1,4 см (3,8%) соответственно по сравнению с контролем. Все штаммы, за исключением Bв, способствовали лучшему развитию корней сорта Гром, превышение к контролю составило 0,04–0,11 г или 30,7–86,6%.

Таблица 17

Влияние нововыделенных штаммов ассоциативных с *T. aestivum* бактерий на продуктивность пшеницы трёх сортов, выращенных на черноземе южном (вегетационный опыт, 2019 г.)

Сорт	Штамм	Длина побега, см	Биомасса побега, г	Биомасса корня, г
Алексеич	Ant	39,35	0,33	0,21
	Br	38,53	0,28	0,23
	Bb	39,42	0,36	0,41
	Gr	39,8	0,33	0,36
	Tf	38,88	0,34	0,25
	Mk	40,06	0,36	0,21
	Контроль	39,43	0,33	0,27
Безостая 100	Ant	36,76	0,33	0,27
	Br	38,84	0,37	0,23
	Bb	37,71	0,27	0,21
	Gr	36,55	0,35	0,42
	Tf	38,61	0,37	0,25
	Mk	37,03	0,33	0,22
	Контроль	37,21	0,35	0,41
Гром	Ant	34,31	0,29	0,17
	Br	35,15	0,30	0,19
	Bb	35,26	0,27	0,11
	Gr	35,28	0,30	0,17
	Tf	35,42	0,31	0,21
	Mk	35,21	0,30	0,24
	Контроль	36,03	0,33	0,13
НСР ₀₅ АБ		1,46	0,05	0,03
НСР ₀₅ А (сорт)		0,55	0,02	0,01
НСР ₀₅ Б (штамм)		0,84	0,03	0,02

В условиях чернозема выщелоченного по длине побега первенство принадлежит сорту Безостая 100, тогда как сорт Гром также имел наименьший показатель (табл. 18). Инокуляция способствовала его повышению у сорта Алексеич на 1,78–2,46 см или 4,4–6,1%. Увеличение биомассы побега на 0,04 г (15,4%) обеспечили штаммы Gr и Mk, тогда как массы корня, за их исключением, все другие штаммы, где превышение к контролю составило 0,04–0,14 г (33,3 –116,7%). На сорте Безостая 100 три штамма способствовали увеличению массы побега на 0,05 г (16,7%) и корня: Br на 0,04 г (25,0%), Tf на 0,07 г (43,7 %) и Mk на 0,06 г (37,5%) к контролю. На сорте Гром установлено увеличение биомассы корня при инокуляции штаммами: Br на 0,03 г (21,4%) и Ant на 0,07 г (50,0%).

Таблица 18

Влияние выделенных штаммов ассоциативных с *T. aestivum* бактерий на развитие растений пшеницы трёх сортов, выращенных на черноземе выщелоченном (вегетационный опыт, 2019 г.)

Сорт	Штамм	Длина побега, см	Биомасса побега, г	Биомасса корня, г
Алексеич	Ant	42,67	0,28	0,19
	Br	42,20	0,24	0,16
	Bb	43,13	0,28	0,18
	Gr	42,64	0,30	0,12
	Tf	41,95	0,28	0,26
	Mk	42,10	0,30	0,12
	Контроль	40,17	0,26	0,12
Безостая 100	Ant	38,20	0,32	0,17
	Br	40,73	0,35	0,20
	Bb	40,91	0,31	0,14
	Gr	41,20	0,32	0,16
	Tf	39,34	0,35	0,23
	Mk	40,68	0,35	0,22
	Контроль	41,12	0,30	0,16
Гром	Ant	35,84	0,29	0,21
	Br	36,05	0,32	0,17
	Bb	35,51	0,25	0,10
	Gr	34,10	0,23	0,15
	Tf	36,99	0,33	0,16
	Mk	36,85	0,29	0,15
	Контроль	36,35	0,33	0,14
НСР ₀₅ АБ		1,92	0,05	0,04
НСР ₀₅ А (сорт)		0,73	0,02	0,01
НСР ₀₅ Б (штамм)		1,11	0,03	0,02

Ростовые процессы являются интегральным показателем физиологического состояния растений. В фазу цветения растений установлено положительное влияние выделенных штаммов на продуктивность растений трёх сортов пшеницы озимой (табл. 19). Влияние штамма В5 на длину побега установлено у сорта Ермак, увеличение было на 4,3 см (5,9%), на массу высушенного побега – на 0,5 г (31,2%) по сравнению с контролем, у сорта Багира масса была ещё выше – на 1,0 г (62,5 %). Штамм R1 также способствовал повышению массы у сорта Ермак на 0,6 г (37,5%), как и L1 у сорта Багира на 0,8 г (50%).

Таблица 19

Влияние выделенных штаммов на продуктивность растений трёх сортов пшеницы (полевой опыт, 2019 г.)

Вариант		2019 г.		2020 г.	
		Длина побега, см	Масса высушенного побега, г	Длина побега, см	Масса высушенного побега, г
Ермак	П4	74,8	1,7	59,5	4,3
	М3	73,1	1,9	60,8	4,8
	Б5	77,3	2,1	65,3	5,2
	Р1	74,3	2,2	57,7	5,2
	Л1	73,7	1,8	63,0	5,3
	КМП	-	-	66,5	5,9
	К	73,0	1,6	62,9	5,9
Багира	П4	70,4	1,4	60,6	5,5
	М3	72,8	1,7	55,9	4,3
	Б5	70,6	2,6	57,1	4,0
	Р1	74,3	2,0	63,5	6,9
	Л1	73,6	2,4	60,0	6,5
	КМП	-	-	61,2	5,6
	К	72,4	1,6	59,3	6,3
Лидия	П4	75,5	2,1	65,5	5,1
	М3	74,4	2,0	59,9	5,1
	Б5	76,4	2,4	63,5	5,5
	Р1	77,2	1,8	62,1	6,1
	Л1	75,7	1,7	63,2	4,7
	КМП	-	-	61,6	5,7
	К	75,1	2,4	65,9	5,4
НСР05		3,9	0,7	5,05	1,67
Фактор А (сорт)		1,6	0,3	2,91	0,63
Фактор В (штамм)		1,9	0,3	1,91	0,84

Увеличение урожайности и ее компонентов за счет взаимодействия с интродуцируемыми в ризосферу микроорганизмами можно объяснить повышением азотфиксации, солюбилизацией фосфатов, мобилизацией калия и продукцией стимулирующих рост растений веществ, активизирующих микробиологические процессы в почве, что способствует доступности питательных веществ растениям [72]. Из таблицы 20 следует, что в условиях более благоприятного 2019 г. происходила достоверная прибавка урожайности в варианте применения Л1: на 0,63 т/га (13 %) – у сорта Ермак, на 0,4 т/га (8 %) – Багира и на 0,21 т/га (4 %) – Лидия ($p \leq 0,05$). На зерновую продуктивность пшеницы в среднем за два года исследований у сортов Ермак и Лидия штаммы практически не оказали влияния, но и снизили ее в некоторых случаях. Сорт Багира является пластичным по своей характеристике и, возможно поэтому, оказался восприимчивым к инокуляции

ассоциативными штаммами. Максимальное увеличение урожайности в среднем за два года у сорта Багира отмечено в результате обработки штаммом В5 и составило 0,4 т/га (10 %) ($p \leq 0,05$).

Таблица 20

Влияние штаммов с высоким ассоциативным потенциалом на урожайность зерна пшеницы озимой (полевой опыт, 2019–2020 гг.)

Вариант опыта		Урожайность, т/га по вариантам инокуляции штаммами (фактор В)			Прибавка урожайности средняя	
		2019	2020	Среднее	т/га	%
Ермак	P4	5,45	2,98	4,2	-	-
	M3	5,43	3,08	4,3	0,1	2,4
	B5	5,15	2,88	4,0	-	-
	R1	5,24	2,64	4,0	-	-
	L1	5,53	3,15	4,3	0,1	2,4
	Контроль	4,90	3,51	4,2	-	-
Багира	P4	4,91	3,12	4,0	-	-
	M3	5,09	3,47	4,3	0,3	7,5
	B5	5,17	3,65	4,4	0,4	10,0
	R1	5,11	3,19	4,2	0,2	5,0
	L1	5,41	2,92	4,2	0,2	5,0
	Контроль	5,01	3,00	4,0	-	-
Лидия	P4	5,12	3,52	4,3	0,1	2,4
	M3	5,11	3,25	4,2	-	-
	B5	5,14	3,25	4,2	-	-
	R1	5,17	3,32	4,2	-	-
	L1	5,29	3,50	4,4	0,2	4,8
	Контроль	5,08	3,42	4,2	-	-
НСР ₀₅		A – 0,06 B – 0,11 AB – 0,15	A – 0,24 B – 0,37 AB – 0,65			

Результаты корреляционного анализа по двухлетним данным трех сортов пшеницы озимой показали, что на урожайность наибольшее влияние, ($r=0,81$, $p<0,05$) оказывает численность бактерий рода *Azotobacter* (рис.31), который является показателем плодородия почвы и благоприятно воздействует на продукционный процесс у растений [73]. Эти микроорганизмы оказывают положительное влияние на развитие растений и продуктивность сельскохозяйственных культур за счет биосинтеза биологически активных веществ, производства фитопатогенных ингибиторов, изменения поглощения питательных веществ и, в конечном счете, увеличения биологической азотфиксации [74].

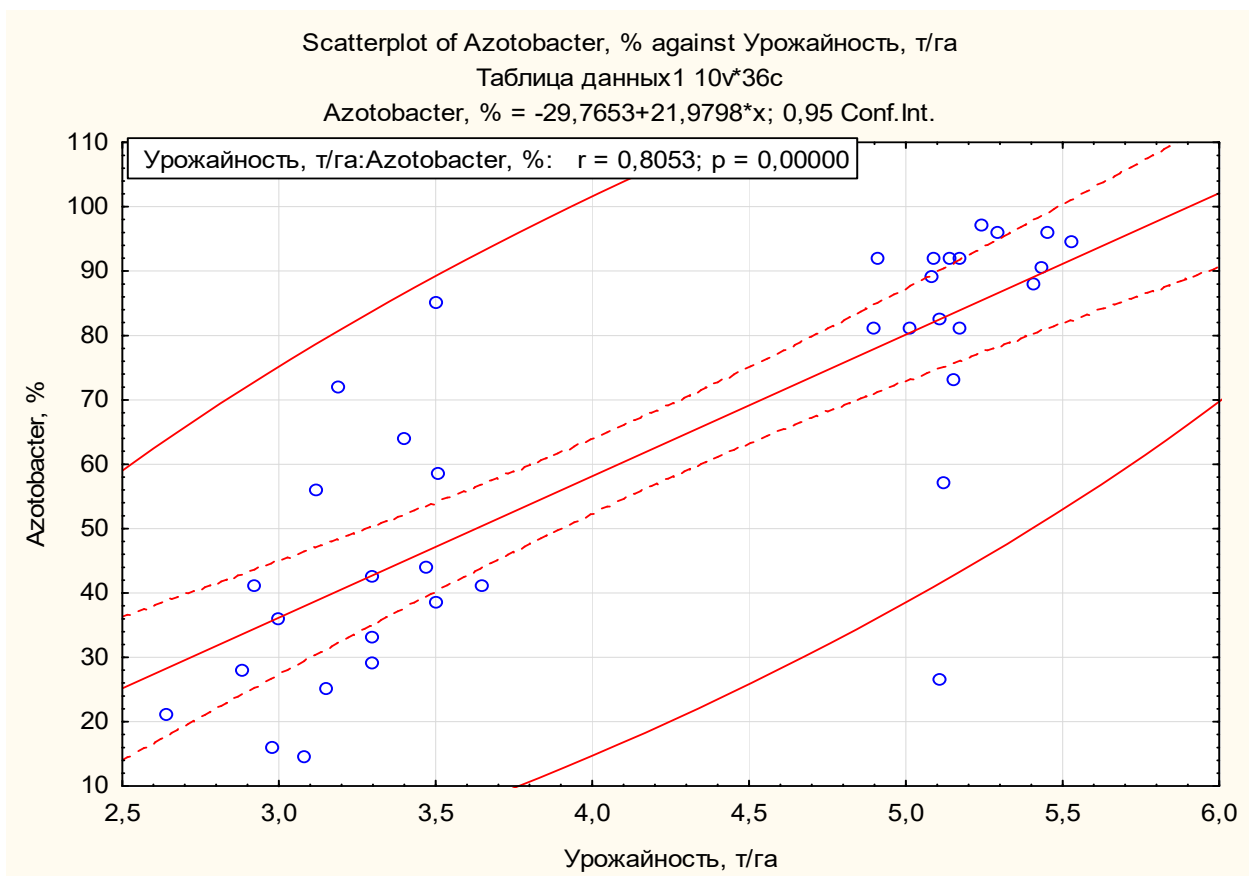


Рисунок 31 – Диаграмма рассеяния для численности *Azotobacter* и урожайности пшеницы озимой трех сортов (полевой опыт, 2019-2020 гг.)

Таким образом, предпосевная обработка семян штаммами микроорганизмов с высоким ассоциативным потенциалом к пшенице озимой может стать эффективным биологическим приемом для экологически ориентированного земледелия и оптимизации питания растений. Установлено положительное влияние выделенных штаммов ассоциативных к *T. aestivum* бактерий на развитие растений. Инокуляция штаммом Vr способствовала лучшему развитию корневой системы у всех сортов. Другие штаммы оказывали избирательное действие в зависимости от сорта и почвенных условий.

Показано, что под влиянием ассоциативных к *T. aestivum* штаммов бактерий происходят изменения численности микроорганизмов различных экологотрофических групп чернозема южного. Установлено, что инокуляция микробными биоагентами способствует активизации минерализационных процессов в ризосфере пшеницы озимой. В более засушливых условиях 2020 года иммобилизационные процессы протекали интенсивнее, так как показатели коэффициента минерализации в большинстве вариантов полевого опыта были больше единицы. Об этом свидетельствуют также показатели численности некоторых групп микроорганизмов, которые участвуют в синтезе гумуса. Выявлен наиболее отзывчивый на бактериализацию семян

ассоциативными штаммами сорт Багира: увеличение по сравнению с контролем урожайности в среднем за два года исследований находилось в пределах 0,2–0,4 т/га или 5–10%.

2.3 Ассоциативные штаммы бактерий к растениям риса (*Oryz asativa* L.)

Ассоциативные микроорганизмы обеспечивают растения элементами минерального питания, стимулируют рост, повышают адаптивный потенциал к стресс-факторам [73, 74]. Важным этапом является выделение штаммов бактерий, способных формировать эффективные ассоциации с растениями риса и повышать его биологический потенциал.

В природных условиях микроорганизмы существуют в тесной эколого-трофической взаимосвязи друг с другом и высшими растениями. Взаимодействие микроорганизмов и растений осуществляется, главным образом, в ризосфере и их численность регулируется корневыми экссудатами, тем самым формируя и обеспечивая ризосферный эффект, описанный Н.А. Красильниковым [75]. Специфика корневых выделений определяет состав различных групп микроорганизмов в ризосфере [73, 76, 77].

В настоящее время, в рамках концепции органического земледелия, экологически безопасным и экономически выгодным агроприемом для возделывания сельскохозяйственных культур является внесение в ризосферу растений активных полифункциональных бактерий. Данный метод позволяет создавать растительно-микробные симбиосистемы, что обеспечивает стабильность прохождения всех фаз онтогенеза культуры, повышая иммунный статус растений и их обеспеченность доступными элементами питания, а также способствует улучшению качества товарной продукции.

2.3.1 Выделение штамма с высокой степенью ассоциативности к растениям риса (*Oriza sativa* L.)

Для выделения ассоциативных с растениями риса штаммов азотфиксирующих бактерий, использовали описанный выше методический подход (рис. 2). Особенностью является получение апикальной части корней свободных от субстрата, так как рис выращивают в условиях затопления и корневая система растений располагается в верхнем слое почвы (до 5-10 см). Наличие аэренхимы в анатомическом строении корня обеспечивает благоприятные условия для развития аэробной микробиоты в ризосфере риса.

Не менее актуальным является выбор почвы для отбора растений ассоциативных бактерий. В почве под культурой риса формируется

специфическое направление биологических процессов и своеобразное развитие различных сообществ микробиоты.

С целью выбора субстрата для выделения ассоциативных diaзотрофов, исследовали два образца лугово-каштановой почвы: отобранного из рисовых чеков монокультуры и пласта люцерны соответственно. Первый интересен упрощенной структурой и накоплением патогенных микроорганизмов, а второй – как благоприятный для развития различной микробиоты. Оба образца имели приток свежего органического вещества в виде растительных остатков. При изучении микробиоты почв рисовых полей внимание уделялось основным эколого-трофическим группам, ассимилирующим соединения азота.

Для выделения diaзотрофов высокой степенью ассоциативности с растениями риса была взята почва по пласту люцерны.

В условно-стерильном опыте из апикальной части корней, были изолированы ассоциативные с растениями риса бактерии, отличающиеся друг от друга по морфологии колоний (табл. 21).

В эпифитном микробоценозе корня риса доминировал морфотип, колонии которого имели округлую форму, диаметром 5-7 мм, поверхность гладкую, выпуклую, блестящую, края ровные, грязно-белого цвета или прозрачные. Их количество было максимальным (34,4%), а частота встречаемости 100%. Обилие морфотипов, колоний, имеющих округлую форму диаметром 1-1,5 мм, ровные края, поверхность гладкую, выпуклую, блестящую, белого цвета составила 16,6%, их частота встречаемости равна 50%.

Таблица 21 – Обилие морфотипов микроорганизмов апикальной части корней риса

№ изолята	Внешний вид колоний на агаризованной капустной среде №19	Частота встречаемости, %	Обилие вида,%
1	Округлой формы, диаметром 2-3 мм, поверхность гладкая, края ровные, середина более темная и вокруг шершавый ободок серо-синего цвета, блестящие, плоские	10	2,6
2	Ризоидной формы, диаметром 7-8 мм, поверхность гладкая, плоские, блестящие, с четкой круглой серединкой	10	1,0
3	Округлой формы, диаметром 5-7 мм, поверхность гладкая, выпуклые, блестящие, края ровные, грязно-белого цвета или прозрачные	100	34,4
4	Округлой формы. Диаметр 5-7 мм, поверхность гладкая, края ровные, плоские, матовые, белые	50	3,6
5	Округлой формы, диаметром 5 мм, поверхность гладкая, края ровные, выпуклые, с белыми ободками	50	3,6
6	Округлой формы, диаметром 1-1,5 мм, края ровные, поверхность гладкая, выпуклые, блестящие, белого цвета	50	16,6
7	Округлой формы, диаметром 2-4 мм, поверхность гладкая, края ровные, блестящие, плоские, оранжевого цвета	80	10,6
8	Ризоидной формы, диаметром 3 мм, матовые, плоские, кремового цвета	10	1,4
9	Неправильной формы, диаметром 8-10 мм, плоские, матовые, шероховатая поверхность, оранжевого цвета	30	13,4
10	Округлой формы, диаметром 2 мм, поверхность гладкая, края ровные, блестящие, выпуклые, с вогнутой серединой, белого цвета	10	0,8
11	Округлой формы, диаметром до 5 мм, поверхность гладкая, края ровные, выпуклые, блестящие, бледно-розовые	10	0,6
12	Округлой формы, поверхность гладкая, края ровные, плоские, блестящие, ярко – красные	10	0,2
13	Круглой формы, выпуклые, блестящие, белого цвета с розовым валиком по краю, диаметром 2-3 мм, края ровные	10	10,3

В полученной коллекции выделенных морфотипов 46,2% имели разного цвета пигмент. Обнаружено два морфотипа, имеющих оранжевый пигмент и отличающихся по морфологическим признакам колоний. Колонии, видовое

обилие которых составляло 13,4%, неправильной формы, диаметром 8-10 мм, с шероховатой поверхностью имели оранжевый пигмент (рис. 32) и характеризовались высокой скоростью роста при пересеве. Частота встречаемости этого морфотипа колоний 30%. Видовое обилие другого морфотипа составляло 10,6%, а частота встречаемости – 80%. Следует отметить, что в бактериальном сообществе ризобактерий корня риса преобладали колонии округлой формы, с ровными краями.

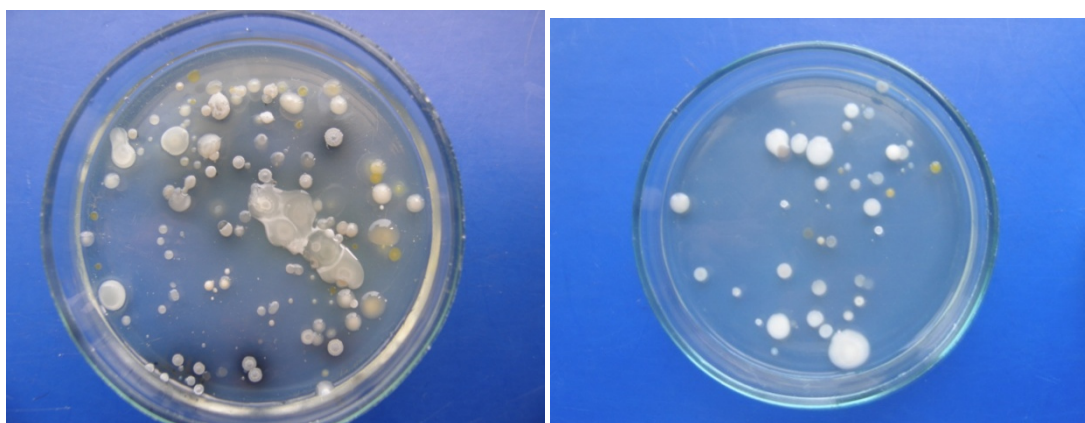


Рисунок 32 – Изоляты, полученные по принципу ассоциативности с растениями риса

Не отмечено зависимости видового обилия и частоты встречаемости. Обилие вида 10,3% имел морфотип округлой формы, с валиком по краю (розового цвета) сама же колония белая, диаметром 2-3 мм, края ровные, выпуклые, блестящие, а частота встречаемости – 10%.

Обязательным условием начала изучения свойств микроорганизма и его идентификации является чистота штамма. Оценка характера роста на агаризованных средах и микроскопические методы исследований показали, что некоторые колонии образованы ассоциациями из двух, а иногда из трех видов бактерий, преимущественно палочковидных. Путем последовательных пересевов были получены идентичные культуры бактерий, пригодные для идентификации и создана коллекция штаммов, ассоциативных с растениями риса бактерий. Часть морфотипов при повторном пересеве на агаризованной среде №19 оказались не жизнеспособными.

Таким образом, из тринадцати морфотипов бактерий в эпифитном микробоценозе апикальной части корней риса доминирующими являются пять, количество которых составило более 10% от общего числа учтенных бактерий и шесть видов колоний, имеющих частоту встречаемости более 30%. Создана коллекция новых штаммов, ассоциативных с растениями риса

бактерий, перспективных как PGPR. Установлено, что при пересеве культур отдельные морфотипы теряют свою жизнеспособность.

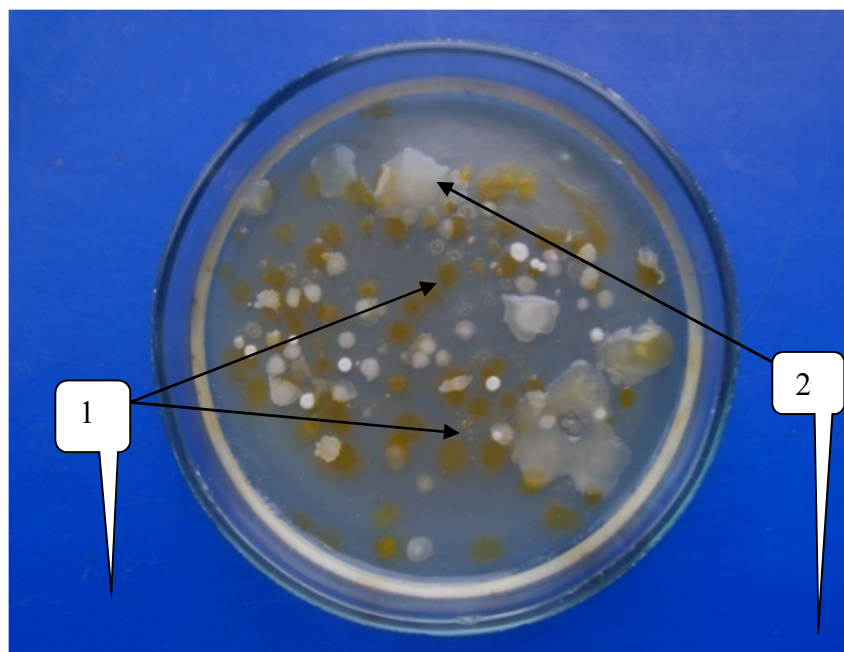
Современные методы изучения свойств выделенных штаммов и их идентификации многочисленны (морфологические, культуральные, физиологические, биохимические, структурные, генетические, молекулярно-биологические, экологические). Поэтому их необходимо сочетать для того, чтобы выявить все положительные возможности штаммов (идти по принципу «от простого к сложному»). И, как итог, подтверждать полученные данные генетическими методами или проводить дополнительные тесты [80].

Предварительная оценка характера роста на агаризованных средах и микроскопирование выделенных микроорганизмов показали, что среди 13 колоний, выделенных из апикальной части корней риса, достаточно много ассоциаций из двух, а иногда из трех видов. В полученной коллекции 46,2% выделенных морфотипов имели разного цвета пигмент. Часть морфотипов при повторном пересеве на агаризованной среде №19 оказались не жизнеспособными.

Микроскопирование культур показало, что в большинстве, клетки имеют вид палочек, различных по размерам и отношению толщины к длине. При дальнейших исследованиях, среди морфотипов были обнаружены палочки, способные образовывать споры.

Исследованы морфологические, культурально-биохимические свойства штаммов и на основе определенных признаков установлено биоразнообразие эпифитной микробиоты корней риса (изолятов). Установлена родовая принадлежность ряда выделенных штаммов (рис.33)

Бактерии рода *Flavobacterium* [81] кокковидные, или тонкие палочки. Подвижные, с помощью перитрихально расположенных жгутиков, грамположительные, спор не образуют. Колонии на поверхности агаризованных сред желтые, оранжевые, красные. Хемоорганотрофы, образование кислоты и газа на средах с углеводами не характерно. Большинство видов ассимилирует глюкозу, мальтозу, лактозу. Аэробные, некоторые - факультативные анаэробы. По совокупности исследуемых признаков, штамм 72 идентифицирован, как *Flavobacterium* sp.



**Рисунок 33 – Морфотипы эпифитов апикальной части корней риса:
1) штамм *Flavobacterium* sp. 72; 2) штамм *Agrobacterium tumefaciens* 32**

Штамм *Agrobacterium tumefaciens* 32, отнесен к виду *Agrobacterium* по следующим признакам: клетки – короткие прямые палочки с округлыми концами, подвижные, споры не образует; растет на средах как с органическим, так и минеральным азотом; использует различные углеводы, подкисляя среду за счет образования органических кислот. На средах с углеводами образует газ. Факультативный анаэроб, нитраты восстанавливает до нитритов. Разжижает желатин, продуцирует каталазу.

Из эпифитного микробоценоза корней риса выделен штамм бактерий рода *Pseudomonas*. У штамма *Pseudomonas* sp. 13 форма колонии 3-х суточной культуры округлая, профиль выпуклый, поверхность гладкая, размер 2-3 мм в диаметре, полупрозрачная; цвет желтовато-коричневый; консистенция слизистая; структура однородная. Рост на средах с минеральным источником азота обильный (среда Козера), пигмент не образует. На МПБ образует пристенное кольцо, осадок, мутность колонки бульона. На картофельном косяке рост хороший с образованием слизи, цвет светло-коричневый, потемнение отмечено по всей поверхности столбика. Разжижение желатина медленное. Происходит осветление лакмусового молока до цвета топленого молока (подщелачивает), а также коагуляция с образованием полупрозрачной сыворотки (слоем до 1/3 столбика) и сгустка. На среде МПА с крахмалом гидролиз крахмала отсутствует. На среде Гильята – интенсивное посинение и газообразование. Рост при 37⁰С интенсивный. Клетки подвижные мелкие короткие палочки с зауженными концами, одиночные и соединены попарно.

Род *Bacillus* объединяет прямые или почти прямые палочковидные бактерии, размеры которых $0,3-2,2 \times 1,2-7,0$ мкм. Большинство из них подвижные. Жгутики расположены перитрихально, образуют термостойкие эндоспоры, но не более одной в клетке – спорангии. Спорообразование не подавляется экспозицией на воздухе. Окраска по Граму строго положительная или положительная только при окраске молодой культуры. Большинство видов *Bacillus* – типичные хемоорганотрофы. Они не нуждаются в факторах роста и способны ассимилировать минеральные формы азота как единственного его источника. Метаболизм дыхательный, бродильный или дыхательный и бродильный одновременно при использовании различных субстратов. Конечным акцептором электронов в дыхательном метаболизме служит молекулярный кислород, который для некоторых видов может быть заменен нитратами. Большинство видов образует каталазу и являются облигатными аэробами или факультативными анаэробами. Некоторые виды образуют антибиотики и способны подавлять рост микромицетов [81]. Совокупность перечисленных свойств выявлена у изолятов 31, 71, 710, 92, 10. Эти штаммы идентифицированы, как *Bacillus* sp.

Изучение морфологических свойств выделенных штаммов, их трофических потребностей и биохимических особенностей проводили в сравнении с производственными штаммами коллекции отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «НИИСХ Крыма», а кластерный анализ позволил объединить их в группы по сходству признаков.

Следует отметить, что штаммы отличались между собой специфическими особенностями признаков разного характера, но их можно было разделить на группы с подобными свойствами. Обобщая результаты определения таксономической принадлежности штаммов, установлено, что два штамма из выделенных не используют углеводы (маннит, глюкозу, сахарозу, лактозу, арабинозу), остальные штаммы потребляли слабо. Только 13% из выделенных изолятов в качестве единственного источника углерода способны ассимилировать цитрат натрия, как и референтные штаммы *Agrobacterium radiobacter* 204, *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, *Pseudomonas fluorescens* П10. Разной степени каталазную активность проявляли 80% исследуемых изолятов. Грамположительные изоляты составили 60% коллекции. 46,7% не проявили способности разжижать желатину. На среде Лью-Лейфсона 93,3% изолятов росли в аэробных условиях, причем 27% подщелачивали среду, а в анаэробных условиях росли все микроорганизмы из коллекции и подкисляли среду.

Из исследуемых изолятов два имели сходство с референтным – *A. radiobacter* 204. Отдельные кластеры сформировали штаммы рода *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium*. Ни у одной культуры не выявлено сходства с *Cystobasidium minutum* 11 (рис.34).

Таким образом, из сформированного в монокультуре риса микробного ценоза почвы с использованием методологического системного подхода к выделению ассоциативных микроорганизмов из апикальной части корней риса селекционированы эффективные штаммы бактерий. По таксономической оценке, штаммов доминирующими являются бактерии родов *Flavobacterium*, *Agrobacterium*, *Bacillus* и *Pseudomonas*. Штаммы имеют специфические сходные свойства, которые позволяют объединить их в кластеры.

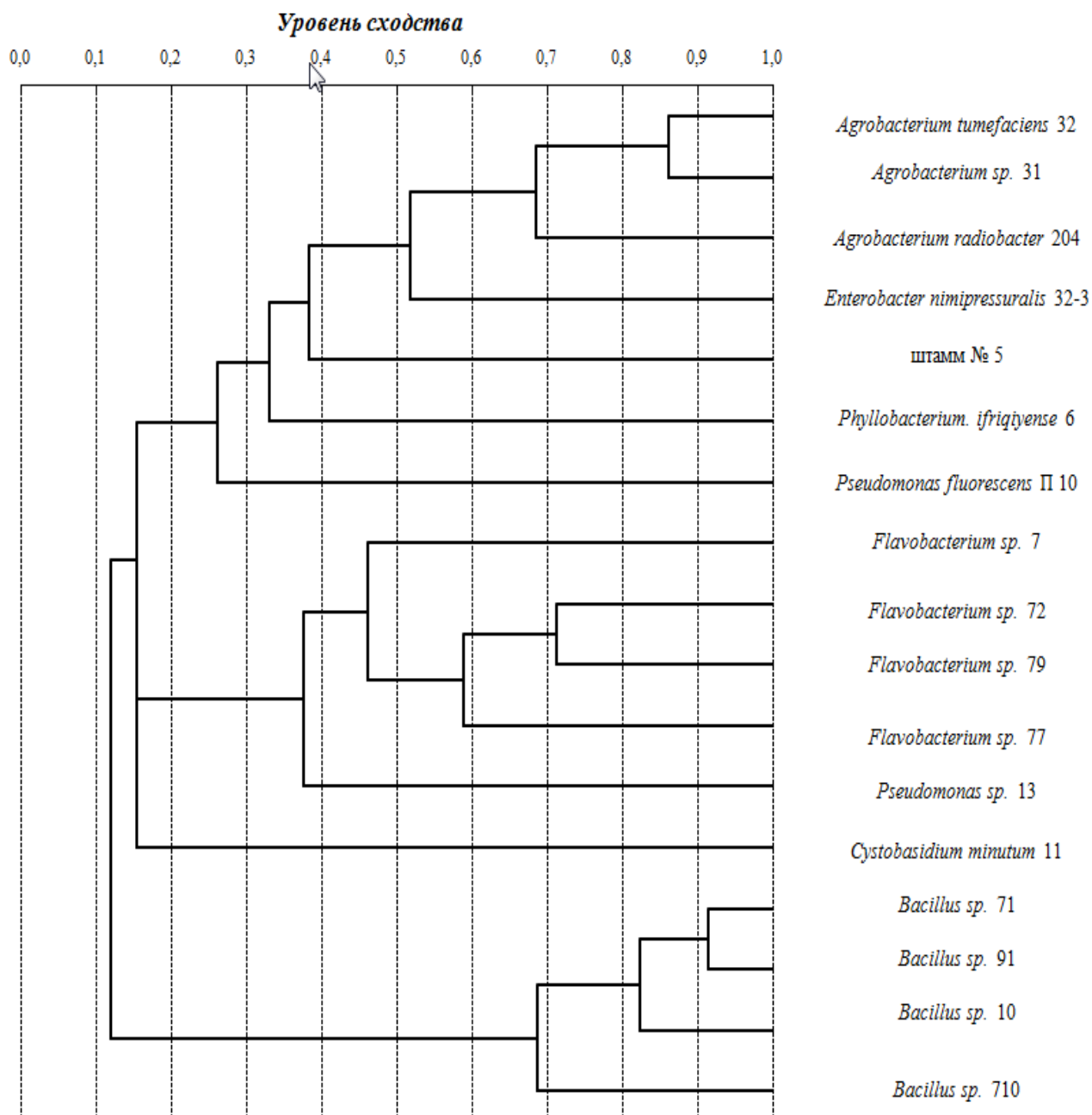


Рисунок 34 – Дендрограмма сходства биохимических признаков штаммов, выделенных из апикальной части корней риса (кластерный анализ, Clusters.xls.)

Таксономическое положение изучаемых штаммов бактерий изучено с помощью секвенирования последовательностей гена 16S рРНК. Для амплификации использованы: тотальная ДНК бактерий, экстрагированная из суточных клеток, и универсальные для этого гена праймеры.

Генетическая идентификация показала, что изучаемый штамм №6 относится к виду *Phyllobacterium ifriqiense* и имеет следующие нуклеотидные последовательности:

GCTTACACATGCAAGTCGAACGCCCCGCAAGGGGAGTGGCAGACGGGTGAGTAACG
CGTGGGAATCTACCCAATTCTTCGGAACAACACATGGAAACGTGTGCTAATACCGA

ATGAGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGGAATTGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCT
AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGG
TCTTAGGATTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGA
AGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGT
TCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTTTTAAGTCAGGGGTGAAAT
CCCCGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTTTGATACTGGAAGTCTTGAGTTCGAGAGAG
GTGAGTGGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAGGAACACCAG
TGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGANGTGCGAAAGCGTGGGGAG
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACTATGAGAGCTAGCCGTC
GGGCAGTATACTGTTTCGGTGGCGCAGCAAACGCATTAAGCTCTCCGCCTGGGGAGT
ACGGTCGCAAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA
GCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCCGA
TCGCGGTTACCAGAGATGGTTTCCTTCAGTTAGGCTGGATCGGTGACAGGTGCTGCA
TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTCGCCCTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAA
GCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTA
CACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCA

Выделенный штамм №32 отнесен к виду *Agrobacterium tumefaciens*, который хорошо известен как фитопатоген. К настоящему времени известно, что *A. tumefaciens* может фиксировать азот в свободном состоянии, расти на безазотной среде, восстанавливать ацетилен до этилена, а аэробные условия подавляют фиксацию азота *A. tumefaciens*. Нитрогеназная система содержит молибден [80]. Нуклеотидные последовательности данного штамма имели следующий вид:

GCTTAACACATGCAAGTCGAACGCCCCGCAAGGGGAGTGGCAGACGGGTGA
GTAACGCGTGGGAATCTACCGTGCCCTGCGGAATAGCTCCGGGAAACTGGAATTA
TACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGATTTATCGGGGTATGATGAGCCCGCGTTGG
ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGA
GAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTG
ATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGTATCCG
GAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTA
GCGTTGTTCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGG
GTGAAATCCCAGAGCTCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATG
GAAGAGGTAAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTAAGTACGCTGAGGTGCGAAAGCGT

Одним из действенных средств повышения азотфиксирующей активности в ризосфере сельскохозяйственных культур является интродукция высокоэффективных конкурентоспособных штаммов бактерий – diaзотрофов в ризосферу растений [87-89]. Известно, что diaзотрофы обладают как правило комплексом полезных для растений свойств: стимуляция роста и развития, контроль фитопатогенов [85].

Ассоциативные бактерии могут улучшать питание растений такими элементами, как азот, фосфор, калий. Большинство необходимых растениям соединений фосфора относится к минеральным и органическим нерастворимым солям, которые недоступны для растений [76]. Ризосферные бактерии способны к растворению труднодоступных почвенных фосфатов, что положительно сказывается на фосфорном питании растений [90, 91].

При использовании в исследованиях селективных сред для характеристики хозяйственно-полезных свойств выделенных нами штаммов ассоциативных бактерий у 92,3% культур отмечен рост разной интенсивности на глюкозо-аспаргиновой среде (среде Муромцева для выделения фосфатмобилизующих бактерий), однако, зоны растворения отсутствовали. Из выделенных нами штаммов 53,5% способны расти в условиях дефицита азота (среда Виноградского).

Учитывая, что продуктивность растений определяется наличием доступного азота, именно этот элемент оказывается первым в минимуме. Дальнейшие исследования были направлены на изучение diaзотрофных микроорганизмов. Следует отметить, что из злаковых культур, рис в ассоциации с почвенными diaзотрофами имеет высокий уровень азотфиксирующей активности [92, 93]. Ассоциативные ризосферные микроорганизмы формируют на корнях растений сложные по таксономическому составу и структурно-функциональной организации сообщества, которые оказывают положительное полифункциональное воздействие на растения. К этой группе относятся бактерии рода *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Klebsiella* [94-101].

Скрининг выделенных штаммов по способности фиксировать азот атмосферы методом ацетилен-редукции позволил выявить наиболее активные из них (рис. 35).

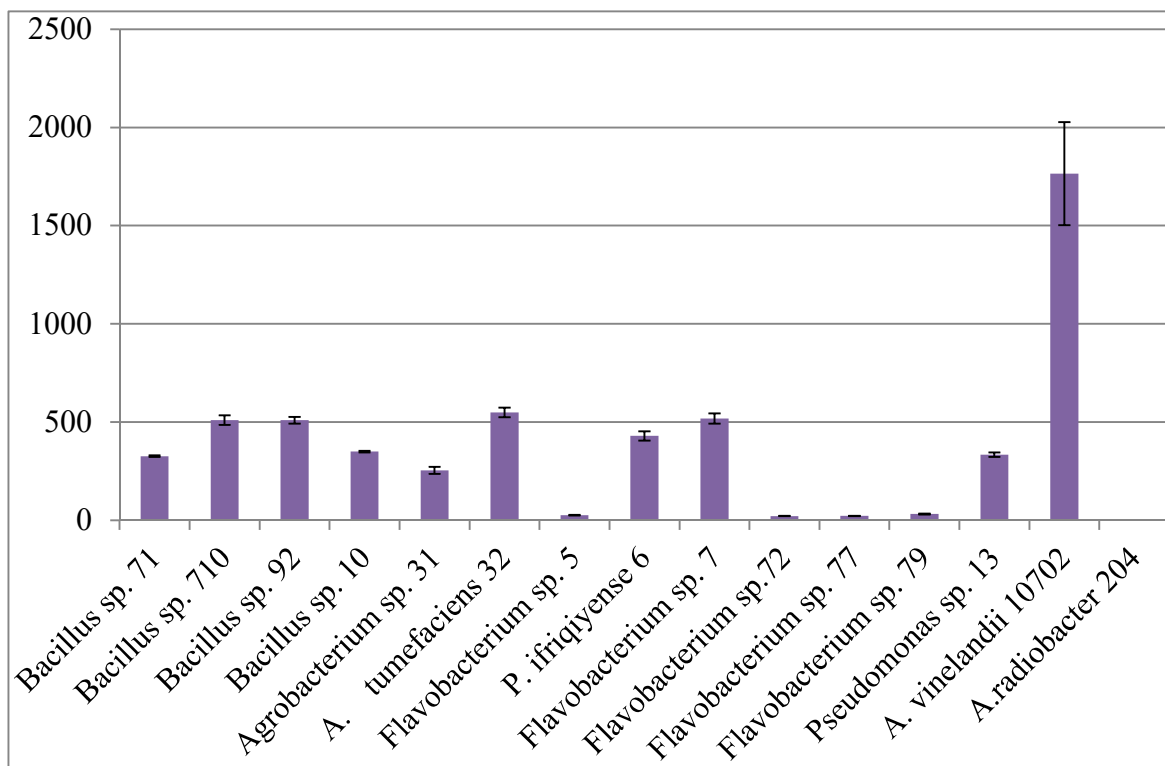


Рисунок 35 – Потенциальная азотфиксирующая активность штаммов, выделенных из апикальной части корней риса

Максимальную азотфиксирующую активность (549,7 $C_2H_4nM/мл/час$) отмечали у *A. tumefaciens* 32. Высокой азотфиксирующей активностью отличились штаммы *P. ifriqiyense* 6 и *Flavobacterium* sp. 7 (430,2 и 517,9 нМ/мл/час соответственно). У других штаммов флавобактерий этот показатель колебался в пределах 22,1-32,3 $C_2H_4nM/мл/час$. Высокую нитрогеназную активность отмечали у штаммов рода *Bacillus* (326,6 – 509,9 $C_2H_4nM/мл/час$).

Ни один штамм не превысил, взятый за эталон по азотфиксирующей активности *Azotobacter vinelandii* 10702. Азотфиксирующая активность *Flavobacterium* sp. 77 была на уровне с *P. fluorescens* П10, имеющего высокую степень ассоциативности к растениям капусты [100].

Таким образом, установлено, что штаммы, ассоциативные с растениями риса, в чистой культуре способны фиксировать азот атмосферы.

Наряду с азотфиксацией, важным механизмом взаимодействия diazotрофов с растением, является синтез веществ, стимулирующих рост (ауксины, цитокинины, гиббереллины) [103-105]. Обработка семян сельскохозяйственных растений перед посевом diazотрофами способствует повышению их всхожести, скорости развития проростков и развития растений [97, 106, 107].

Таблица 22 – Влияние бактериальных штаммов на всхожесть семян пшеницы

Вариант	Всхожесть семян, %	Прирост к контролю, %
Контроль	65	-
Штамм ARR 1	80	23,1
Штамм ARR 2	80	23,1
<i>A. Tumefaciens</i> 32	75	15,4
<i>Flavobacterium sp.</i> 5	85	30,8
<i>P. ifriqiyense</i> 6	75	15,4
<i>Flavobacterium sp.</i> 72	85	30,8
<i>Bacillus sp.</i> 92	85	30,8
<i>Bacillus sp.</i> 10	75	15,4
<i>Cystobasidium minutum</i> 11	80	23,1
<i>Pseudomonas sp.</i> 13	70	7,7
НСР _{0,05}	14,0	-

Анализ результатов лабораторного опыта показал, что восемь из десяти исследуемых штаммов стимулировали рост корней, а четыре из них – проростки пшеницы (рис.28). Три штамма *P. ifriqiyense* 6, *Flavobacterium sp.* 72, *Cystobasidium minutum* 11 оказали стимулирующее действие как на корень (на 31,5, 20,8 и 32,6% к контролю), так и на побеги пшеницы (6,4, 4,4 и 6,4% – соответственно). Неидентифицированный штамм ARR 1 оказывал угнетающее действие на корни и побеги семян на 76,8 и 36% соответственно в сравнении с контролем.

Положительное действие исследуемых штаммов на всхожесть семян и развитие проростков пшеницы позволило предположить о продуцировании фитогормонов ауксиновой природы, которое наиболее выражено у штаммов *P. ifriqiyense* 6, *Flavobacterium sp.* 72 и *A. tumefaciens* 32.

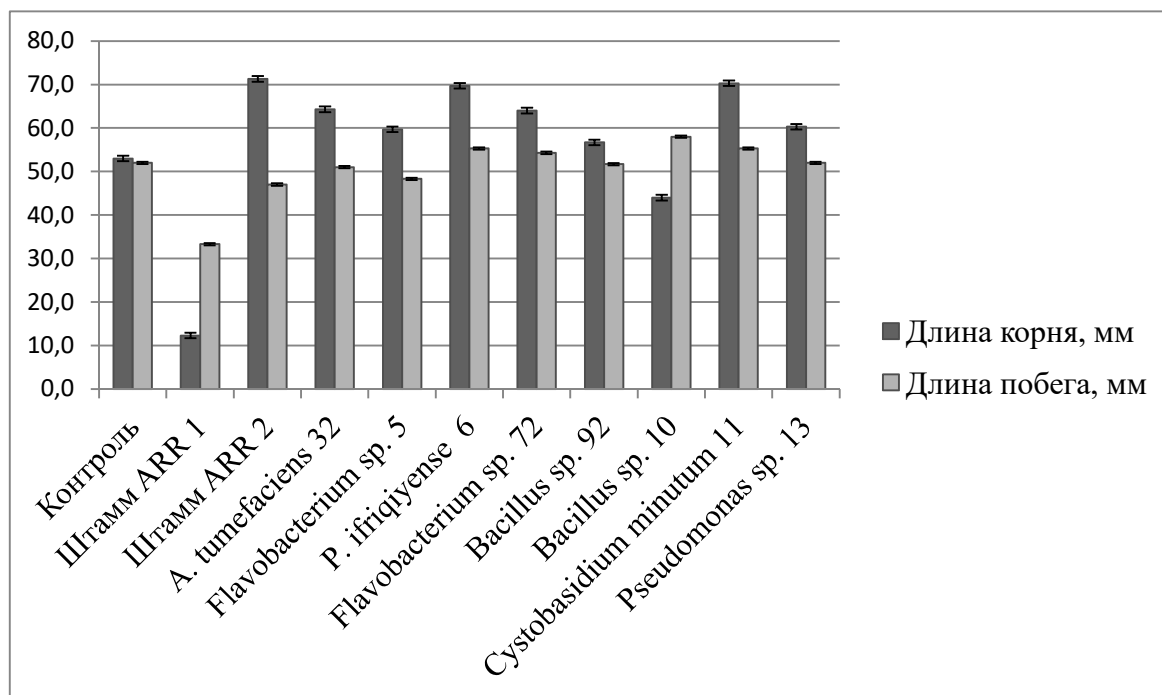


Рисунок 36 – Влияние штаммов на развитие проростков пшеницы

Важным механизмом взаимодействия в растительно-бактериальных ассоциациях является продуцирование бактериями фитогормонов (ауксинов, цитокининов и гиббереллинов), витаминов и других веществ [109-111].

Для выявления способности выделенных штаммов продуцировать ростстимуляторы были проведены фитотесты на семенах традиционных и перспективных для Крыма сельскохозяйственных культур.

В серии лабораторных опытов показано, что штаммы, выделенные по принципу ассоциативности с рисом, стимулируют рост корней бобовых культур: чечевицы красной на 2,8–17,9%, сои–3,6–65,2%, гороха – 4,2–29,4%, по сравнению с контролем. Максимальный стимулирующий эффект отмечен на корнях сои. Штаммы *Flavobacterium* sp. 5, *P. ifriqiense* 6, *Flavobacterium* sp. 72, *C. minutum* 11, *Pseudomonas* sp. 13 проявили ростстимулирующие свойства на всех тест-культурах (рис. 29).

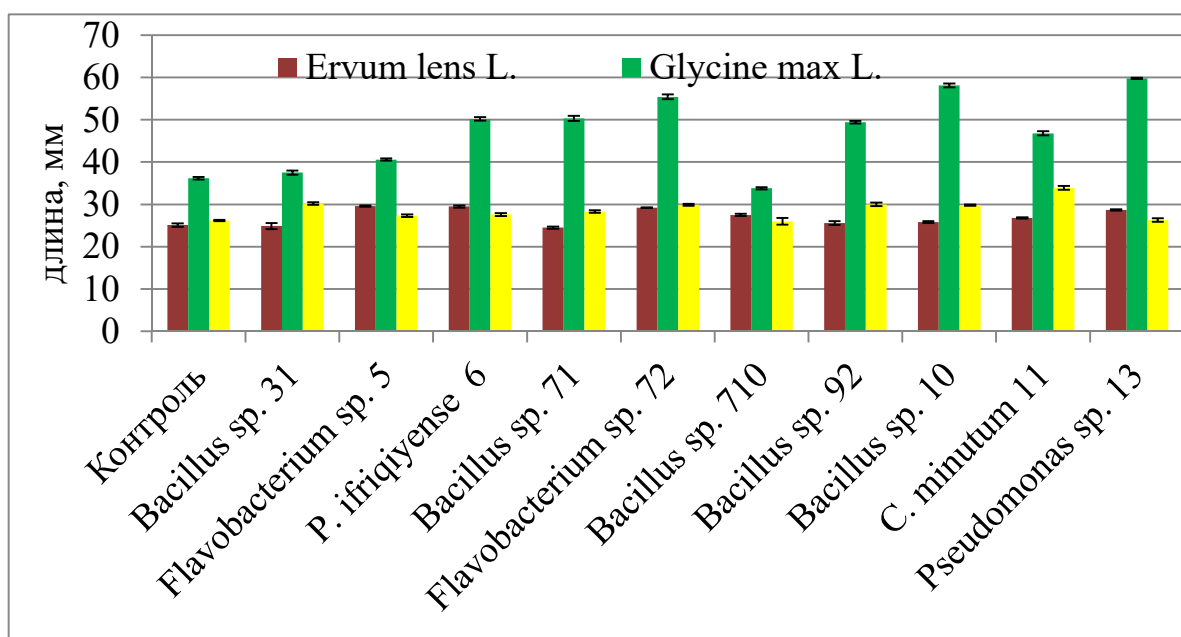


Рисунок 37 – Влияние штаммов ассоциативных с растениями риса бактерий на длину корней бобовых культур

В модельных вегетационных опытах на двух образцах почвы исследовали влияние бактериализации на развитие растений риса. Высота инокулированных растений увеличивалась на 34,8-40,5% относительно контроля и на 10,8-15,6% относительно варианта с референтным штаммом. Превышение по массе растений составило 61,9-76,2% и 54,5-68,2% соответственно (табл. 23).

Таблица 23

Влияние штаммов на биометрические показатели растений риса (вегетационный опыт, почва монокультуры риса, 2014 г.)

Вариант	Высота растений, см	Длина корней, см	Воздушно-сухая масса растений, г
Контроль	41,7	8,5	0,21
<i>A. radiobacter</i> 204	50,7	15,4	0,22
<i>A. tumefaciens</i> 32	56,3	17,7	0,36
<i>P. ifriqiense</i> 6	56,2	16,2	0,34
<i>Flavobacterium</i> sp. 72	58,6	17,3	0,37
НСР _{0,05}	3,29	3,40	0,05

При инокуляции семян *A. tumefaciens* 32 длина корней увеличивалась на 108 % по сравнению с контролем и на 15% –относительно референтного штамма *A. radiobacter* 204. При обработке семян риса ассоциативным штаммом *P. ifriqiense* 6 высота растений превышала контроль в 1,3 раза, длина корней – в 1,9 раза, а воздушно-сухая масса растений – в 1,8 раза.

В научной литературе имеются сведения о положительном влиянии diaзотрофов – продуцентов цитокининов на увеличение высоты растений [112] и их биомассы [113].

Дальнейшие исследования показали способность штаммов флаво- и агробактерий, ассоциативных с растениями риса, продуцировать фитогормоны, в частности индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) (табл.24). Анализ результатов показал, что ассоциативные с растениями риса штаммы бактерий синтезируют фитогормоны ауксиновой природы. Штамм *A. tumefaciens* 32 в концентрации суспензии 1:50 проявил стимуляцию роста на 32%, *P. ifriqiyense* 6 (1:10) – на 16% превышали показатель контроля. Следует отметить, что *A. tumefaciens* 32 в разведениях 1:10 и 1:100, *P. ifriqiyense* 6 – 1:50 увеличивали прирост coleoptилей пшеницы на уровне аутентичного раствора (ИУК 10^{-5}).

Таблица 24

Ростстимулирующие свойства штаммов ассоциативных бактерий

Вариант	Увеличение coleoptилей пшеницы, мм	Прирост к контролю	
		мм	%
Контроль (дистиллированная вода)	2,5	-	-
Контроль (ИУК 10^{-4})	1,6	-	-
Контроль (ИУК 10^{-5})	2,7	0,2	8,0
<i>A. tumefaciens</i> 32 (1:10)	2,7	0,2	8,0
<i>A. tumefaciens</i> 32 (1:50)	3,3	0,8	32,0
<i>A. tumefaciens</i> 32 (1:100)	2,7	0,2	8,0
<i>P. ifriqiyense</i> 6 (1:10)	2,9	0,4	16,0
<i>P. ifriqiyense</i> 6 (1:50)	2,7	0,2	8,0
<i>P. ifriqiyense</i> 6 (1:100)	2,6	0,1	4,0
<i>Flavobacterium</i> sp. 72 (1:10)	3,6	1,1	44,0
<i>Flavobacterium</i> sp. 72 (1:50)	2,8	0,3	1,2
<i>Flavobacterium</i> sp. 72 (1:100)	3,3	0,8	32,0
НСР _{0,05}	0,06	-	-

При обработке coleoptилей *Flavobacterium* sp. 72 в концентрациях 1:10 и 1:100 были получены максимальные стимулирующие эффекты, которые на 44 и 32% превышали показатели контроля (вода) и 33 и 22% контроль (ИУК 10^{-5}).

Способность бактерий образовывать фитогормоны (в том числе ауксины, гиббереллины, цитокинины), а также витамины и другие биологические активные вещества является одним из важнейших факторов, определяющим функционирование бактериально-растительного ассоциативного комплекса [114-117]. Среди ауксинов индолил-3-уксусная

кислота (ИУК) является фитогормоном, который синтезирует большинство ризобактерий [118-122]. Продукция индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) установлена у бацилл [121]. Л.А.Чайковская и М.И. Баранская показали, что штамм *E. nimipressuralis* 32-3 синтезирует ауксины, гибберелины и цитокинины (зеатин и зеатин-рибозид) [124].

В дальнейших исследованиях методами ультраэффективной жидкостной хроматографии изучена способность данных бактерий продуцировать и деградировать фитогормоны ауксины и абсцизовую кислоту путем культивирования на жидких питательных средах по разработанным методикам [125]. Установлено, что изучаемые штаммы существенно различались по количеству синтезируемых ауксинов (табл.25).

Таблица 25 – Биосинтез ауксинов изучаемыми штаммами, нг/мл

Штамм	Индолилмолочная кислота	Индолилкарбоновая кислота	Индолилуксусная кислота
<i>A. radiobacter</i> 204	4,7±2,2	3666,6±192,6	1447,6±45,4
<i>A. tumefaciens</i> 32	229,6 ±131,0	1770,6 ±379,4	461,6 ±9,7
<i>P. ifriqiyense</i> 6	27,1±10,5	909,1±236,6	1164,5±291,6
<i>Flavobacterium</i> sp. 72	23,7±4,1	1386,5±238,0	38,6±0,7

Примечание – представлены средние величины со стандартным отклонением.

Интенсивность продукции индолилуксусной кислоты, основного ауксина, определяющего ростстимулирующую активность ризобактерий, была максимальной у штаммов *P. Ifriqiyense* 6 и стандартного штамма-продуцента биопрепарата ризоагрина *A. Radiobacter* 204 (положительный контроль), наименьшей – у штамма *Flavobacterium* sp. 72. Штамм *A. tumefaciens* 32 продуцировал в 3 раза меньше ИУК, чем штаммы *P. ifriqiyense* 6 и *A. Radiobacter* 204, но в культуральной жидкости данного штамма было обнаружено высокое содержание одного из предшественников биосинтеза ИУК – индолилмолочной кислоты (ИМК). Как известно, промежуточным метаболитом L-триптофана на основном пути биосинтеза ИУК является индолилпировиноградная кислота (Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling // FEMS Microbiol. Rev. 2007. V. 31. P. 425–448). Однако, она нестабильна и быстро превращается в ИМК. Высокое содержание ИМК в культуральной жидкости свидетельствует о том, что штамм *A. tumefaciens* 32 способен к интенсивной метаболизации L-триптофана, и потенциальный выход ИУК при определенных условиях может быть выше. В культуральных жидкостях всех штаммов обнаружено высокое содержание индолилкарбоновой кислоты (ИКК) – продукта деградации ИУК. Ни один из исследуемых штаммов не

продуцировал абсцизовую кислоту (АБК) и не использовал ИУК или АБК в качестве источника углерода. Результаты показали, что продукция ауксинов изучаемыми штаммами может быть механизмом их ростстимулирующего действия на растения.

Молекулы хлорофилла отвечают за поглощение света, превращая его в потенциальную химическую энергию органических продуктов фотосинтеза и молекулярного кислорода[211].

На процесс фотосинтеза влияет комплекс часто взаимодействующих внешних и внутренних факторов: генетический потенциал растений, достаточный приток углеводов, свет, температура, минеральное питание, вода и кислород. При отсутствии кислорода не образуется хлорофилл. Это указывает на то, что аэробное дыхание необходимо для некоторых процессов образования промежуточных соединений, и что для синтеза хлорофилла необходим прилив метаболической энергии. Нельзя также не учитывать сезонные изменения, и то, что в полевых условиях фотосинтез намного сильнее, чем в лабораторных.

В затопленных почвах избыток гравитационной воды вытесняет воздух из пор. Плохая аэрация усложняет поглощение воды корнями, вызывая подсыхание листьев, которое и приводит к уменьшению фотосинтеза. Нехватка фосфора может немного тормозить процесс фотосинтеза вследствие нарушения переноса энергии. Недостаточное содержание железа замедляет фотосинтез, вызывая хлороз, и влияет на активность ферментов. Инсектициды также могут снижать эффективность фотосинтеза. В научной литературе имеются сведения о влиянии фитогормонов, в частности кинетина, на увеличение суммарного содержания хлорофиллов [126].

В вегетационных опытах установлено, что инокуляция способствует увеличению содержания хлорофиллов в листьях риса (рис. 38). Наибольшее количество хлорофилла (13,2 мг/г листьев) содержалось в листьях растений, в варианте с *Flavobacterium* sp. 72, что на 25,7% больше, чем в контрольном варианте и на 9,1%, чем в варианте с референтным штаммом *A. radiobacter* 204.

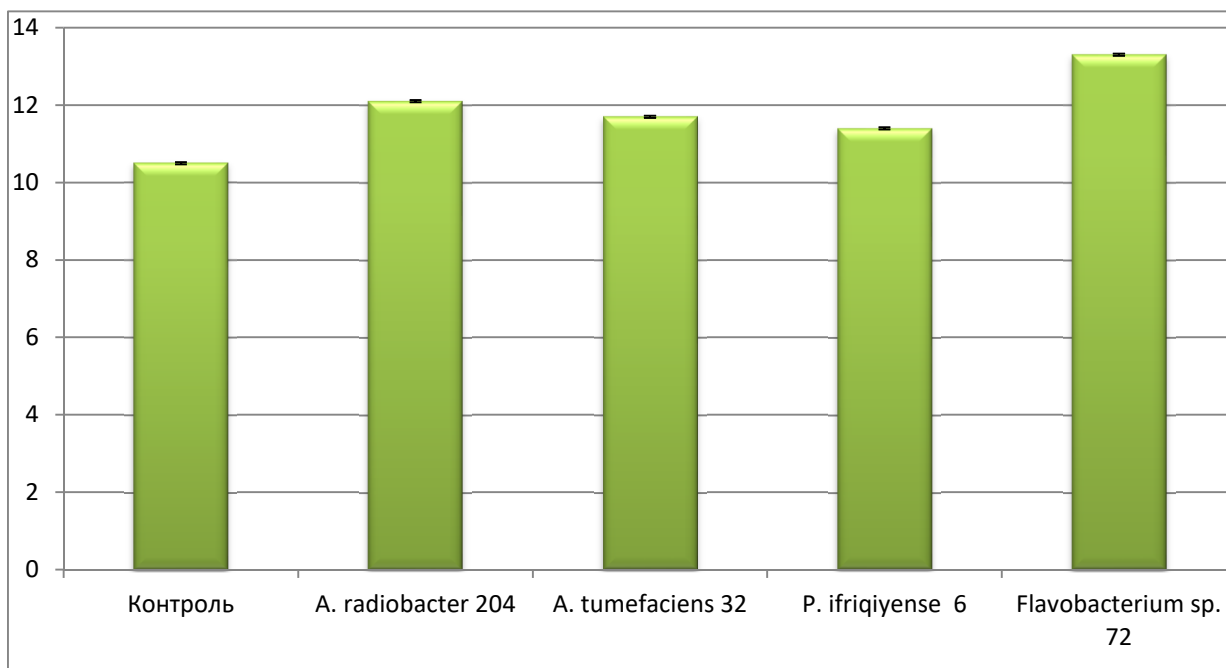


Рисунок 38 – Содержание хлорофилла в листьях растений риса в фазу цветения (вегетационный опыт, лугово-каштановая почва, 2014г.), мг/г листьев

Таким образом, установлено, что отобранные для дальнейших исследований штаммы продуцируют фитогормоны. Бактеризация семян перед посевом увеличивает лабораторную всхожесть семян, способствует увеличению высоты растений, фитомассы, а также содержание суммы хлорофиллов в листьях.

В реализации потенциала микробно-растительных систем важную роль играет способность интродуцируемых штаммов колонизировать корни растений (приживаемость). Установлено, что бактерии родов *Azospirillum* и *Pseudomonas* способны приживаться в ризосфере озимой ржи [127]. В условиях вегетационных опытов на вермикулите и почвенном субстрате изучена способность штаммов *A. radiobacter* 10 [128] и *Bacillus* [129] приживаться в ризосфере растений капусты. При этом исследованные штаммы хорошо приживались на корнях капусты, однако их численность постепенно снижалась.

Выделение штаммов с использованием предложенного методического подхода по принципу ассоциативности позволяет сделать предположение о высокой приживаемости выделенных бактерий в ризосфере растений. Установлено, что исследуемые штаммы приживаются в ризосфере риса и через 25 суток экспозиции численность *P. ifriqiense* 6, *Flavobacterium sp.* 72, и *A. tumefaciens* 32 составила 97×10^3 , 687×10^3 и 12300×10^3 КОЕ/г почвы соответственно (табл.26). В контроле количество устойчивых к антибиотик у бактерий было на уровне 0,2 тыс. в 1 г почвы.

Таблица 26 – Приживаемость антибиотикорезистентных (цефтриаксон) штаммов бактерий, ассоциативных с растениями, в ризосфере растений риса (вегетационный опыт)

Вариант	КОЕ / г почвы
Контроль	$2,3 \times 10^2 \pm 0,10 \times 10^2$
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 32 ^{cef.res}	$12,3 \times 10^6 \pm 1,11 \times 10^6$
<i>Phyllobacterium friquiyense</i> 6 ^{cef.res}	$9,7 \times 10^4 \pm 0,45 \times 10^4$
<i>Flavobacterium</i> sp. 72 ^{cef.res}	$68,7 \times 10^4 \pm 1,83 \times 10^4$

Приживаемость перспективных штаммов ассоциативных бактерий, в частности *A. tumefaciens* 32^{cef.res}, была подтверждена сравнением геномных фингерпринтов (рис.39).

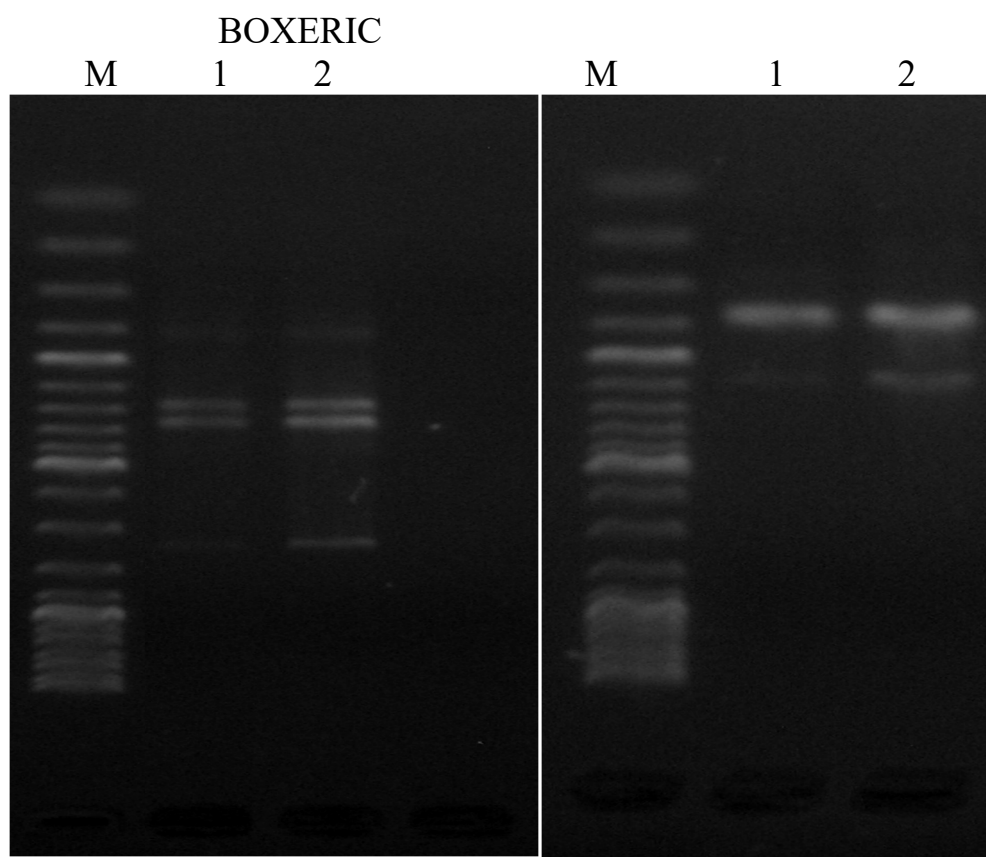


Рисунок 39 – Геномные фингерпринты штамма *A. tumefaciens* 32^{cef.res} (1) и выделенного из ризосферы риса на среде с антибиотиком цефтриаксоном (2) (праймеры BOX и ERIC)

Таким образом, установлено, что коллекционные штаммы бактерий, выделенные по принципу ассоциативности с растениями риса при интродукции в ризосферу с инокулированными семенами приживаются в ней и функционируют, что опосредованно проявляется в повышении урожая.

Наибольшая активность выявлена у штамма *A. Tumefaciens* 32, численность которого максимальна в опыте – 12,3 млрд в 1 г почвы.

Способность бактерий продуцировать биологически активные вещества, в частности антибиотики, широко используется в практике сельского хозяйства для контроля возбудителей заболеваний и особенно грибных.

Для комплексной оценки хозяйственно полезных свойств ризобактерий исследовали их фунгистатическую активность (табл.27).

Таблица 27 – Влияние ассоциативных штаммов на развитие фитопатогенных микромицетов рода *Fusarium*

Штамм	Зоны угнетения роста тест-культур, мм		
	<i>F. glumarum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. moniliforme</i>
Контроль	0	0	0
<i>Bacillus</i> sp. 92	2	0	0
<i>Bacillus</i> sp.71	5	0	0
<i>Bacillus</i> sp.710	6	0	0
<i>Bacillus</i> sp. 10	7	0	0
<i>Agrobacterium</i> sp. 31	4	1	1
<i>A. Tumefaciens</i> 32	1	1	1
<i>Flavobacterium</i> sp. 5	1	0	0
<i>P. ifriqiense</i> 6	0	0	0
<i>Flavobacterium</i> sp. 7	0	0	0
<i>Flavobacterium</i> sp.72	0	0	0
<i>Flavobacterium</i> sp. 77	0	0	0
<i>Flavobacterium</i> sp. 79	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> sp. 13	0	0	0

Способность к подавлению роста *F. glumarum* выявлена у исследуемых штаммов рода *Bacillus*. Наибольшая зона (7 мм) подавления роста отмечена у *Bacillus* sp. 10, а наименьшая (2 мм) – у *Bacillus* sp. 92. Штамм *Agrobacterium* sp. 31 проявил антагонистическую активность к исследуемым грибам (*F. oxysporum* и *F. moniliforme*). У штамма *A. tumefaciens* 32 отмечалась слабая (1 мм) активность к трем исследуемым фитопатогенам, у *Flavobacterium* sp. 5 – к *F. glumarum*.

Следует отметить, что защита растений от фитопатогенов является опосредованным (косвенным) эффектом воздействия diaзотрофов на растения [130] и может проявляться в повышении иммунного статуса растений за счет оптимизации питания и создания бактериального «барьера» при интродукции.

Таким образом, из исследуемых коллекционных культур штаммы бактерий рода *Bacillus* проявили антифунгальную активность к *F. glumarum*. Для биоконтроля фитопатогенных микромицетов перспективными штаммами являются *Bacillus* sp. 71, *Bacillus* sp. 710, *Bacillus* sp. 10.

2.3.3 Технологические свойства штаммов и условия их культивирования

Для широкого применения эффективных штаммов бактерий с комплексом полезных для растений свойств важным этапом является получение биопрепаратов на их основе. Разработка технологии изготовления препаратов базируется на удовлетворении трофических и физиологических потребностей штамма-продуцента. Однако не менее важным в микробных технологиях остается экономический аспект, а именно использование доступных недорогих субстратов, которые обеспечат низкую стоимость и конкурентоспособность микробиологической продукции.

Первичную технологическую оценку перспективных штаммов бактерий, ассоциативных с растениями риса, проводили на твердых (агаризованных) и жидких средах, рекомендованных для культивирования промышленных штаммов и получения препаратов на их основе. Установлено, что исследуемые штаммы хорошо развиваются на гороховом агаре, рекомендованном для накопления биомассы агробактерий, энтеробактерий, флавобактерий и других бактериальных культур.

Через ряд пассажей на гороховой среде штаммы *A. tumefaciens* 32, *P. Ifriqiense* 6, *Flavobacterium* sp. 72 сохраняли морфологические признаки колоний и воспроизводились на капустной среде. Аналогичные результаты получены и при длительном (2–3 месяца) хранении культур на гороховом агаре. Данная среда рекомендуется для получения посевного материала перспективных культур микроорганизмов.

Технологии микробиологического производства основаны на глубинном культивировании бактерий. Важным этапом в технологии микробных препаратов является получение жидкой культуры. Следует отметить, что жидкие препараты, благодаря упрощенной технологии изготовления и применения, были и остаются наиболее распространенной формой инокулюма для обработки семян сельскохозяйственных культур [131, 132]. В современных микробных биотехнологиях перспективным является получение гельных препаратов, основанных как на способности штаммов почвенных микроорганизмов синтезировать вещества полисахаридной природы [133-135], так и на подборе компонентов питательных сред для

интенсификации их синтеза. Для получения препарата в отделе микробиологии ФГБУН НИИСХ Крыма разработаны питательные среды, обеспечивающие оптимальный режим питания и гелеобразования микроорганизмами-продуцентами [136-138].

В условиях периодического глубинного культивирования в двух жидких средах исследовали технологические свойства перспективных штаммов *A. tumefaciens* 32, *P. Ifriqiyense* 6, *Flavobacterium* sp. 72. Среда отличалась по содержанию и количеству компонентов, но обе имели в составе кукурузный экстракт и мелассу – источники питательных веществ и регуляторов роста и определены как промышленная и гелевая. Результаты исследований показали, что штамм *A. tumefaciens* 32 набирает высокий титр в промышленной среде и низкий – в гелевой по сравнению с другими штаммами, оба они достаточны для инокуляции семян. Для штаммов *P. Ifriqiyense* 6 и *Flavobacterium* sp. 72 более оптимальной оказалась гелевая среда и титры бактерий составляли $14,3 \cdot 10^7$ и $18,2 \cdot 10^7$ КОЕ/мл млрд КОЕ в 1 мл (табл. 28).

Таблица 28 – Титр штаммов ассоциативных с растениями риса бактерий в средах для разработки жидкой (№1) и гелевой (№2) препаративных форм, 10^7 КОЕ/мл

Штамм бактерий	Среда для культивирования	
	№1	№2
<i>A. tumefaciens</i> 32	4,3±0,11	3,1±0,17
<i>P. ifriqiyense</i> 6	3,3±0,09	14,3±0,20
<i>Flavobacterium</i> sp. 72	3,7±0,10	18,2±0,15

Динамика роста бактериальных культур свидетельствует, что в гелевой среде более интенсивно развиваются штаммы *P. Ifriqiyense* 6 и *Flavobacterium* sp. 72 (рис. 40).

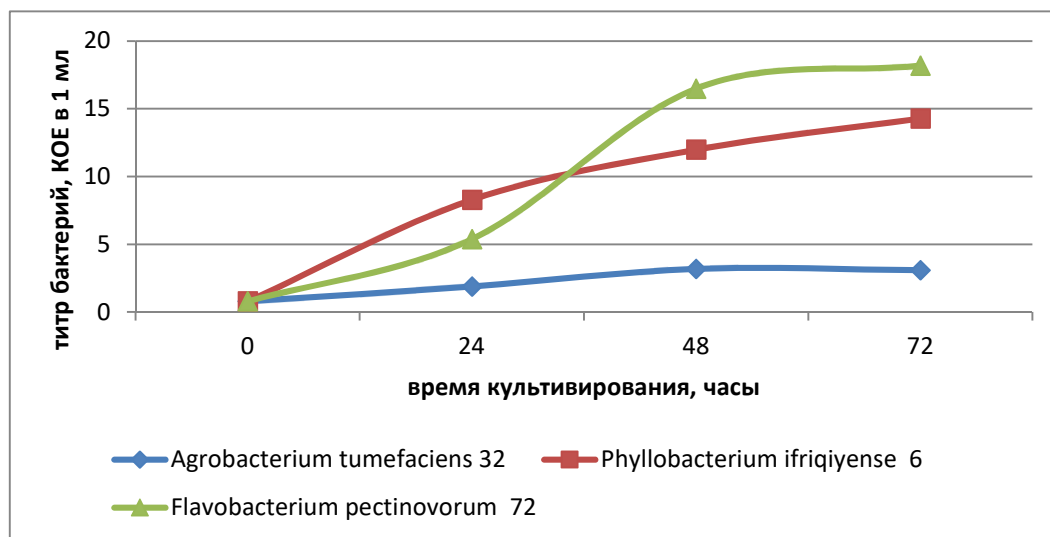


Рисунок 40 – Динамика роста перспективных штаммов в условиях периодического культивирования в гельной среде

В промышленной же среде наиболее интенсивный рост отмечен у *A. tumefaciens* 32 (рис.41), это подтверждено расчетом абсолютной скорости роста.

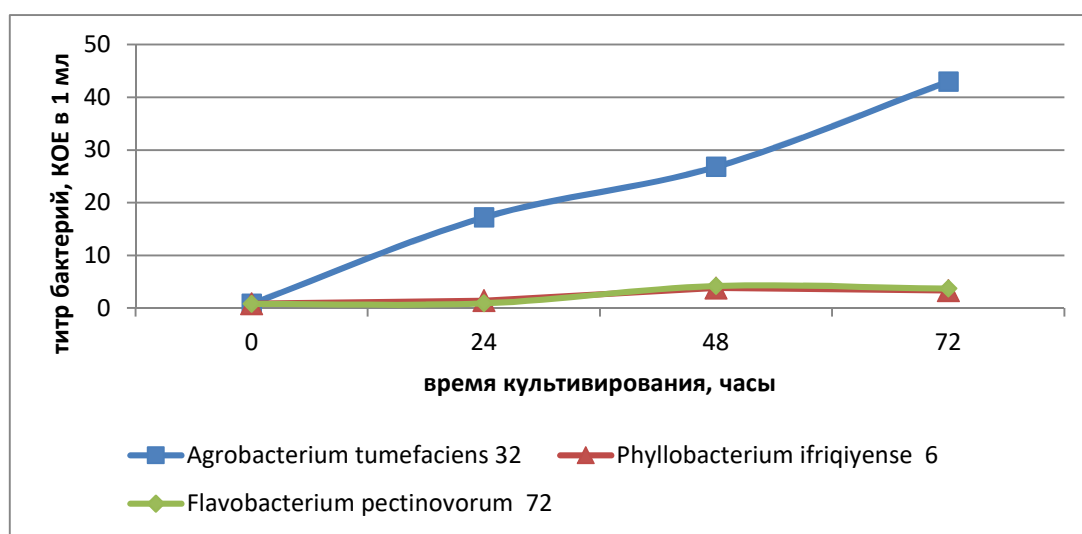


Рисунок 41 – Динамика роста перспективных штаммов в условиях периодического культивирования в промышленной среде

Определена удельная скорость роста штаммов в экспоненциальной фазе (табл. 29). Показано, что штамм *A. tumefaciens* 32 в регламентированной для культивирования флавобактерий среде имеет достаточно высокую абсолютную скорость роста по сравнению с исследуемыми штаммами. В среде, рекомендованной для культивирования diazotrophs-производителей экзополисахаридов, *Flavobacterium* sp. 72 характеризовался более высокой скоростью роста и отличался по удельной скорости роста, рассчитанной в экспоненциальной фазе в среде, оптимальной для флавобактерий.

Таблица 29 – Скорость развития культур на разных средах

Штамм бактерий	Промышленная		Гельная	
	абсолютная, КОЕ/час	удельная, КОЕ/час	абсолютная, КОЕ/час	удельная, КОЕ/час
<i>A. tumefaciens</i> 32	0,4	0,01	0,05	0,01
<i>P. ifriqiyense</i> 6	0,1	0,03	0,2	0,01
<i>Flavobacterium</i> sp.72	0,1	0,07	0,5	0,02

Установлено, что штаммы *A. tumefaciens* 32, *P. ifriqiyense* 6, *Flavobacterium* sp. 72 являются технологичными и рекомендуются для разработки микробных препаратов на их основе.

Таким образом, изучен механизм действия штаммов бактерий, ассоциативных с растениями риса. Азотфиксирующая активность бактерий колеблется от 24,3-549,7 нмоль. Выявлен стимулирующий эффект штаммов, который проявляется в повышении всхожести семян (от 15,4% до 30,8%), стимуляции развития корня и побега тест-культуры. Показано, что штаммы *A. tumefaciens* 32, *P. ifriqiyense* 6 и *Flavobacterium* sp.72 положительно влияют на развитие растений, увеличивая высоту, длину корня, фитомассу, а также содержание хлорофиллов в листьях. Установлено, что штаммы *A. tumefaciens* 32, *P. ifriqiyense* 6 и *Flavobacterium* sp.72 продуцируют фитогормоны ауксиновой природы. Штаммы бактерий рода *Bacillus* проявили антифунгальную активность к *Fusarium glumarum*. Показано, что штаммы *A. tumefaciens* 32, *P. ifriqiyense* 6, *Flavobacterium* sp. 72 являются высокотехнологичными.

По комплексу полезных для растений свойств (ростстимуляция, азотфиксация, фосфатмобилизация) перспективными для интродукции определены штаммы *A. tumefaciens* 32, *P. ifriqiyense* 6 и *Flavobacterium* sp. 72.

Для выявления сохранения способности синтезировать фитогормоны штамм *P. ifriqiyense* 6 в условиях периодического культивирования были проведены фитотесты на семенах бобовых (чечевицы, сои гороха, чины, нута) и озимых зерновых (пшеницы и ячменя) культур. Зерновые культуры показали отзывчивость на бактеризацию семян штаммом *P. ifriqiyense* 6. Длина корней бактеризованных семян озимых пшеницы и ячменя увеличилась на 16-23% соответственно, в сравнении с контрольными вариантами (табл. 30).

Таблица 30 – Стимуляция развития корней и проростков зерновых культур при обработке семян суспензией штамма *P. ifriqiyense* 6 разной концентрацией

Вариант	Длина корня, см	Стимуляция роста корня к контролю, %	Длина побега, см	Стимуляция роста побега к контролю, %
ячмень				
Контроль	15,2±0,47	-	≤0,1	-
P.6 – 1:10	18,0±0,67	18,6	≤0,1	0
P.6 - 1:100	17,6±0,48	15,8	≤0,1	0
пшеница				
Контроль	23,4±0,76	-	≤0,1	-
P.6 – 1:10	28,8±0,94	23,0	≤0,1	0
P.6 - 1:100	27,9±0,87	19,2	≤0,1	0

Бактерии рода *Phyllobacterium* принадлежат к семейству *Rhizobiaceae* и впервые описаны D.H. Knosel как бактерии, образующие клубенек подобные структуры на листьях некоторых тропических растений [139]. Имеются сведения, что бактерии *Phyllobacterium* обнаружены как в клубеньках бобовых растений [140], так и в ризосфере сельскохозяйственных культур [141]. Известно, что данный вид бактерий образует ассоциативный симбиоз с зерновыми культурами [142,143].

Изучена симбиотическая эффективность штамма клубеньковых бактерий *Ph. ifriqiyense* 6 с высокой степенью ассоциативности с *Orizasetiva* L. Известно, что предпосевная обработка семян гороха посевного штаммом *Phyllobacterium* sp. способствовала повышению надземной массы, увеличению количества и массы бобов [144]. Результаты исследований показали, что *Ph. ifriqiyense* 6 не образует клубеньков на корнях исследуемых (горох, соя, чина, чечевица, нута) культур, но оказывает стимулирующее действие на растения (табл. 31).

Таблица 31 – Влияние *Ph. ifriqiyense* 6 на развитие проростков бобовых культур (лабораторный опыт)

Вариант	Длина корня, см	Стимуляция роста корня к контролю, %	Длина побега, см	Стимуляция роста побега к контролю, %
Горох				
Контроль	4,63±0,15	-	0,80±0,06	-
<i>Ph. ifriqiyense</i> 6 – 1:10	5,65±0,11	22,0	0,79±0,08	0
<i>Ph. ifriqiyense</i> 6 – 1:100	5,58±0,18	20,5	0,86±0,08	7,5
Соя				
Контроль	5,44±0,25	-	≤0,1	-
<i>Ph. ifriqiyense</i> 6 – 1:10	7,30±0,32	34,2	≤0,1	0
<i>Ph. ifriqiyense</i> 6 – 1:100	6,70±0,21	23,2	≤0,1	0
Нут				
Контроль	4,76±0,19	-	0,69±0,11	-
<i>Ph. ifriqiyense</i> 6 – 1:10	4,70±0,15	0	0,63±0,11	0
<i>Ph. ifriqiyense</i> 6 – 1:100	5,13±0,14	7,8	0,93±0,10	34,8
Чечевица				
Контроль	2,20±0,15	-	2,55±0,20	-
<i>Ph. ifriqiyense</i> 6 – 1:10	2,68±0,12	21,8	2,79±0,14	9,4
1	2	3	4	5
<i>Ph. ifriqiyense</i> 6 – 1:100	2,77±0,16	25,9	2,73±0,09	7,0
Чина				
Контроль	3,32±0,10	-	1,56±0,17	-
<i>Ph. ifriqiyense</i> 6 – 1:10	3,53±0,20	6,3	1,68±0,09	7,7
<i>Ph. ifriqiyense</i> 6 – 1:100	3,61±0,12	8,7	1,75±0,08	12,2

Так, длина корней гороха увеличивалась до 22%, сои – 34,2%, чечевицы – 25,9%, относительно контрольных вариантов. У растений нута и чины этот показатель изменялся незначительно, при этом рост побега увеличился на 34,8 и 12,2% соответственно в сравнении с контрольным вариантом.

Оценка влияния интродукции штамма *Ph. ifriqiyense* 6 в ризосферу бобовых культур позволила выявить, что в условиях вегетационного опыта для культур гороха, сои, чечевицы и чины оптимальная суспензионная культура была в соотношении 1:100, а для нута – 1:10 (табл. 32). Стимуляция роста корня и побега у гороха составила 43,6 и 33,2%, у сои – 48,1 и 19,4%, соответственно по сравнению с контрольным вариантом. Прямо пропорционально отмечалось увеличение воздушно-сухой массы инокулированных растений.

Таблица 32 – Влияние инокуляции бобовых культур штаммом *Ph. ifriqiyense 6* на биометрические показатели растений (вегетационный опыт)

Вариант	Длина корня, см	Длина побега, см	Воздушно-сухая масса растений, г
Горох			
Контроль	18,1±0,16	25,0±0,16	0,20
<i>Ph. ifriqiyense 6</i> – 1:10	20,2±0,12	32,3±0,28	0,19
<i>Ph. ifriqiyense 6</i> – 1:100	26,0±0,30	33,3±0,17	0,22
Соя			
Контроль	13,5±0,15	31±0,17	0,32±0,11
<i>Ph. ifriqiyense 6</i> – 1:10	14,0±0,22	34±0,21	0,34±0,10
<i>Ph. ifriqiyense 6</i> – 1:100	20,0±0,27	37±0,19	0,41±0,14
Нут			
Контроль	19,1±0,19	50,0±0,31	0,23±0,01
<i>Ph. ifriqiyense 6</i> – 1:10	22,0±0,15	69,3±0,21	0,31±0,08
<i>Ph. ifriqiyense 6</i> – 1:100	18,0±0,14	49,6±0,33	0,22±0,02
Чечевица			
Контроль	9,2±0,15	23,0±0,21	0,03±0,01
<i>Ph. ifriqiyense 6</i> – 1:10	9,8±0,22	23,0±0,11	0,04±0,01
<i>Ph. ifriqiyense 6</i> – 1:100	11,7±0,16	29,0±0,16	0,04±0,01
Чина			
Контроль	14,9±0,17	93,1±0,17	0,03±0,01
<i>Ph. ifriqiyense 6</i> – 1:10	16,3±0,22	96,2±0,09	0,03±0,01
<i>Ph. ifriqiyense 6</i> – 1:100	18,8±0,19	110,1±0,08	0,04±0,01

Таким образом, установлено, что исследуемый штамм бактерий, ассоциативный с растениями риса, *P. ifriqiyense 6* стимулирует развитие корней и проростков бобовых и зерновых культур, что подтверждают исследования о способности продуцирования стимуляторов ауксиновой природы. Исследуемые штаммы являются перспективными для агробiotехнологий широкого спектра сельскохозяйственных культур.

2.3.4 Эффективность функционирования ассоциативных ризобактерий риса

Рис дает наибольшее количество зерен с единицы площади: по валовому сбору он стоит на одной ступени с пшеницей, а по посевным площадям занимает второе место [145]. Спрос на производство риса ежегодно растет. Поэтому важной задачей является увеличение урожая и качества зерна риса. Растения риса отзывчивы на различные агроприемы интенсификации производства зерна, в том числе бактеризацию семян. Одним из основных компонентов структуры урожая риса является продуктивность метелки, которая в зависимости от сорта, уровня минерального питания растений, температурных условий года существенно колеблется. Формирование

элементов продуктивности метелки определяется уровнем притока к ней азотистых и углеродных соединений из вегетативных органов растений [146].

В фазе кущения температура оказывает значительное влияние на развитие растений и последующий урожай культуры. Оптимальной температурой почвы и воды в этот период считается 28-30°C [147]. Установлена прямолинейная зависимость урожайности риса от количества тепла (коэффициент корреляции равен 0,968) [148].

По сумме температур за вегетационный период 2012 г был благоприятным для развития растений риса. Предпосевная бактериализация семян положительно влияла на такие структурные элементы урожая как количество зерен в колосе и массу 1000 семян (табл. 33).

Таблица 33 – Влияние предпосевной инокуляции семян на структуру урожая риса (лугово-каштановая почва, полевой опыт 2012 г.)

Вариант	Количество колосьев, шт./ м ²	Количество зерен в колосе, шт.	Масса 1000 семян, г	Урожайность		
				т/га	прибавка	
					т/га	%
Контроль	390,0	106,3	27,0	11,7	-	-
<i>A. radiobacter</i> 204	226,3	149,7	29,8	10,2	-	-
<i>A. tumefaciens</i> 32	253,0	157,7	30,4	12,0	0,3	2,6
<i>P. ifriqiense</i> 6	251,0	195,7	32,0	15,7	4,0	34,2
<i>Flavobacterium</i> sp. 72	324,7	144,3	30,8	14,4	2,7	23,1
НСР _{0,05}	50,29	18,68	-	1,70	-	-

Высокая зерновая продуктивность отмечалась у инокулированных растений риса в благоприятном по агроклиматическим условиям 2013 г., прибавка урожая составляла от 32,9 до 65,9% (табл. 34).

В условиях 2015 г. инокуляция обеспечила увеличение исследуемых структурных элементов урожая. В варианте с *P. ifriqiense* 6 зарегистрированы максимальные значения количества зерен в колосе 206,7 шт. и масса 1000 зерен – 25 г, против 122,3 шт. и 23,5 г в контроле. В этом варианте урожай зерна риса в 2,5 раза был больше, чем в контроле (табл. 35). В целом инокуляция семян риса перспективными штаммами обеспечила прибавку урожая на 5,6-10,4 т/га или 80,0-148,6% к контролю.

Таблица 34 – Влияние предпосевной инокуляции семян на структуру урожайности риса (лугово-каштановая почва, полевой опыт 2013 г.)

Вариант	Количество колосьев, шт./ м ²	Количество зерен в колосе, шт.	Масса 1000 семян, г	Урожайность		
				т/га	прибавка	
					т/га	%
Контроль	317,7	92,0	27,9	8,2	-	-
<i>A. radiobacter</i> 204	414,3	104,7	28,5	12,4	4,2	51,2
<i>A. tumefaciens</i> 32	415,0	116,0	28,3	13,6	5,4	65,9
<i>P. ifriqiyense</i> 6	344,0	119,7	30,1	12,4	4,2	51,2
<i>Flavobacterium</i> sp. 72	269,3	135,7	29,9	10,9	2,7	32,9
НСР _{0,05}	20,20	5,92	-	1,11	-	-

Таблица 35 – Влияние предпосевной инокуляции семян на структуру урожая риса (лугово-каштановая почва, полевой опыт 2015 г.)

Вариант	Количество колосьев, шт./ м ²	Количество зерен в колосе, шт.	Масса 1000 семян, г	Урожайность		
				т/га	прибавка	
					т/га	т/га
Контроль	244,3	122,3	23,5	7,0	-	-
<i>A. radiobacter</i> 204	283,3	170,0	24,5	11,8	4,8	68,8
<i>A. tumefaciens</i> 32	213,0	187,0	24,3	13,7	6,7	95,7
<i>P. ifriqiyense</i> 6	336,7	206,7	25,0	17,4	10,4	148,6
<i>Flavobacterium</i> sp. 72	277,7	184,3	24,6	12,6	5,6	80,0
НСР _{0,05}	129,5	25,61	-	1,66	-	-

Анализ урожайности за три года (табл. 36) показал стабильное повышение продуктивности риса при инокуляции семян перед посевом штаммами ассоциативных бактерий. Отмечено, что при бактеризации семян количество зерен в колосе увеличивается на 31,8-43,9%. Масса 1000 семян, которая является одним из показателей качества риса (крупность зерен), при бактеризации увеличивалась на 5,1-12,8% относительно контроля.

Таблица 36 – Влияние предпосевной инокуляции семян на структуру урожая риса (лугово-каштановая почва, полевой опыт среднее за 2012-2015 гг.)

Вариант	Количество колосьев, шт./ м ²	Количество зерен в колосе, шт.	Масса 1000 семян, г	Урожайность		
				т/га	прибавка	
					т/га	%
Контроль	317	107	27,0	9,2	-	-
<i>A. radiobacter</i> 204	307	141	27,6	12,0	2,8	30,4
<i>A. tumefaciens</i> 32	294	153	27,6	12,4	3,2	34,8
<i>P. ifriqiense</i> 6	310	173	29,0	15,6	6,4	69,6
<i>Flavobacterium</i> sp. 72	290	154	28,4	12,6	3,4	37,0
НСР _{0,05}	68,4	19,7	-	2,06	-	-

Такой агротехнологический прием, как предпосевная обработка семян штаммами ассоциативных бактерий обеспечивал прибавку урожая зерна на 30,4-69,6%. Наиболее эффективной является инокуляция штаммом *P. ifriqiense* 6, обеспечивающая стабильную прибавку урожая в среднем за три года на 6,4 т/га к контролю и на 3,6 т/га выше референтного *A. radiobacter* 204.

Одним из показателей качества зерна является содержание влаги, которая влияет на интенсивность биохимических и микробиологических процессов, а они в свою очередь на технологические и пищевые качества зерна. Анализ качества зерна (табл. 37) показал тенденцию уменьшения массовой доли влаги в зерне при инокуляции семян исследуемыми штаммами, что имеет большое значение при хранении продукции.

Таблица 37 – Показатели качества зерна риса (полевой опыт 2012-2013 гг.)

Вариант	Массовая доля органического вещества, %	Массовая доля сырого протеина, % ГОСТ 13496.4-93	Массовая доля строй клетчатки, % ГОСТ 13496.4-91	Массовая доля влаги, % ГОСТ 13496.4-92	Массовая доля золы, %
Контроль	95,2	5,4	7,5	11,9	4,9
<i>A. radiobacter</i> 204	94,7	5,3	7,5	11,7	5,3
<i>A. tumefaciens</i> 32	94,6	5,5	7,4	11,5	5,5
<i>P. ifriqiense</i> 6	94,9	5,2	7,5	11,6	5,1
<i>Flavobacterium</i> sp. 72	95,0	5,4	7,2	11,5	5,1

В вариантах с инокуляцией увеличивается массовая доля золы, что является положительной характеристикой качества продукции, так как зола содержит необходимые макро- и микроэлементы. В отдельных случаях массовая доля сырой клетчатки уменьшается, что можно считать положительным фактом, ведь рис содержит 3% клетчатки и 80% углеводов, что обуславливает его высокую усвояемость.

Качество производимого в Крыму риса получило высокую международную оценку. Европейский центр по изучению рынка в 2004 году (г. Брюссель, Бельгия), проведя экспертизу риса выращиваемого на севере Крыма, не только рекомендовал его реализацию на международном рынке, но и выдал Сертификат о качестве, подтверждающий его соответствие мировым стандартам и конкурентоспособность. Международная Золотая медаль качества и Сертификат качества были получены в июле 2005 г. на IV международной деловой встрече «Мальта: средиземноморские перспективы» [149].

Таким образом, предпосевная обработка семян ассоциативными штаммами diaзотрофов является эффективным агротехнологическим приемом современного земледелия для оптимизации азотного питания растений. Показано, что перспективные штаммы повышают биологическую продуктивность риса. Прирост урожая зерна риса при инокуляции семян штаммом *P. ifriqiense* 6 в условиях 2012 г составил 4,0 т/га (34%), в 2013 – 4,2 т/га (51%) , в 2015 г. – 10,4 т/га (148%) к контролю. Максимальный урожай риса в 2013 г. получено в варианте с инокуляцией *A. tumefaciens* 32, который составил 13,6 т/га против 8,2 т/га в контроле. Обработка семян риса перед посевом ассоциативными штаммами является эффективным технологическим приемом, обеспечивающим прибавку урожая в среднем за три года исследований от 30,4 до 69,6% за счет повышения массы семян и количества зерен в колосе.

2.4 Ассоциативные штаммы бактерий с *Sorghum bicolor* (L.) Moench, *Salvia sclarea* L. и *Coriandrum sativum* L.

2.4.1 Селекция штаммов бактерий, образующих ассоциативный симбиоз с *Sorghum bicolor* (L.) Moench

В условиях засухи, которая все чаще повторяется последние годы, земледелие испытывает недостаток продуктивной влаги в разные периоды онтогенеза растений. Поэтому наибольшее внимание должно предоставляться культурам, которые обеспечат максимальную отдачу с единицы площади. Важное значение для стабилизации и увеличения производства зерна является

выращивание сорго, которое отличается чрезвычайной засухоустойчивостью, солевыносливостью, неприхотливостью к почвам и универсальностью использования. Зерно сорго имеет высокие кормовые и продовольственные свойства и может быть использовано для изготовления круп, крахмала, спирта. Велико и агротехническое значение сорго, оно является культурой, которую можно использовать в случае массовой гибели озимых культур [150, 151]. В мировом земледелии сорго занимает пятое место после пшеницы, риса, кукурузы и ячменя. Около 60 млн га приходится на зерновое сорго [152].

Растения сорго хорошо переносят почвенную и воздушную засуху, но отзывчивы на орошение. Культура пригодна для выращивания на засоленных почвах, так как выдерживает концентрацию солей до 0,6-0,8%, нетребовательна к почвенным условиям, кроме повышенной кислотности. Важное значение в питании имеет азот, максимальная потребность в котором приходится на интенсивную фазу роста растения (выбрасывание метелки). Фосфор поглощается корнем с начала вегетации, а в фазе интенсивного роста растений поглощается до 50% общего содержания подвижного фосфора в почве. Калий потребляется равномерно в течение всего периода вегетации. Сорго чувствительное к содержанию в почве таких микроэлементов, как молибден, медь, йод и др. [153]. Одним из важных факторов повышения продуктивности растений является оптимизация минерального питания: внесение минеральных удобрений (N45-60 P45-60 K45-60) и микроэлементов [154-156].

Следовательно, для реализации биологического потенциала сорго нужен комплекс агротехнических мероприятий по мобилизации эффективного потенциала плодородия почвы. Создание таких технологий предусматривает решение проблем микробной трансформации гумуса, азота, фосфора и других питательных элементов в почве, биологическую защиту растений от болезней и вредителей, а также микробиологические методы повышения качества растениеводческой продукции.

Многолетние проведенные исследования показали, что обработка семян сорго перед посевом микробными препаратами на основе ризобактерий *Agrobacterium radiobacter* 204 (Диазофит/Ризоагрин), *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 (Фосфоэнтерин) и *Painibacillus polymyxa* П (Биополицид) в зависимости от агрофона способствовала повышению урожайности зерна до 20 – 24,6% [157]. Установлено, что предпосевная инокуляция семян и обработка растений по вегетации положительно влияют на численность микроорганизмов, участвующих в трансформации азотсодержащих веществ в ризосфере [158]. Вместе с тем для оптимизации минерального питания сорго и

сокращением доз минеральных удобрений актуальной остается проблема вовлечения в трофическую цепь системы почва – микроорганизмы – растение сорго биологического азота.

Сорго относится к тропическим видам растений с C₄-типом фотосинтетического метаболизма, который характеризуется высокой скоростью данного процесса при высоких температурах, интенсивным выделением корнями углеводовсодержащих веществ, являющихся энергетическим субстратом для развития diaзотрофов и активизации процессов азотфиксации в ризосфере [159, 160]. При использовании оригинальной методики по выделению и оценке ассоциативных микроорганизмов проведена селекция штаммов diaзотрофов, при которой фактором отбора являлась корневая система сорго зернового. Из эпифитного микробоценоза апикальной части корня *S. bicolor* свободного от субстрата (чернозем южный) с использованием разработанного методологического подхода к выделению и изучению бактерий, ассоциативных с растением получена коллекция штаммов С1-С9.

При пересеве на агаризованные питательные среды (Эшби, Виноградского, Федорова), не содержащие азот, отмечали обильный рост штаммов бактерий, что позволило отнести их к diaзотрофам. Выделенные штаммы бактерий имели высокий уровень потенциальной азотфиксирующей активности: 778,3 – 1038,3 нмоль C₂H₄/мл среды за один час (табл. 38). К активным азотфиксаторам относят штаммы с нитрогеназной активностью 11,22 – 71,06 нмоль C₂H₄/5 мл среды за сутки [161].

Таблица 38 – Потенциальная азотфиксирующая активность перспективных штаммов diaзотрофных бактерий, ассоциативных с растениями *Sorghum bicolor* L.

Штамм	Нмоль/мл/час
С-1	778,3±67,49
С-2	961,3±37,86
С-3	1038,3±23,60
С-4	991,3±91,40
С-6	1027,0±15,28
С-7	974,7±22,66
С-8	891,0±8,66
С-9	778,3±9,28

Способность бактерий синтезировать биологически активные вещества является одним из важнейших факторов, определяющих бактериально-растительное взаимодействие. Штаммы бактерий, ассоциативные с растениями сорго, продуцируют ростстимулирующие вещества ауксиновой

природы, что было выявлено в фитотестах на семенах зерновых культур[20]. Так, бактеризация семян сорго сорта Днепровский 39, за исключением штаммов С-2 и С-9, стимулировала развитие корня на 4,3–19,6% (рис. 42), побега – на 16,7 –266,7% (рис.43). Наибольшая стимуляция побега сорго отмечена при обработке семян штаммом С-2 (266,7%), в этом же варианте длина корня на 4,5% меньше, чем в контроле.

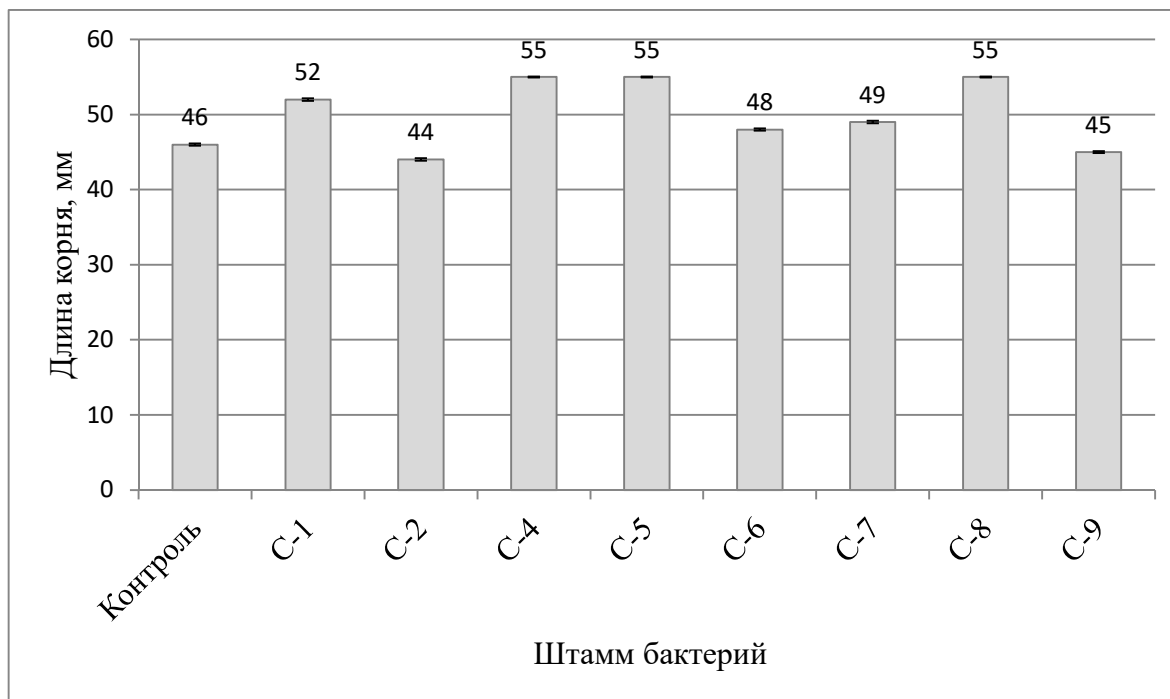


Рисунок 42 – Влияние бактеризации на длину корня *Sorghum bicolor* L.

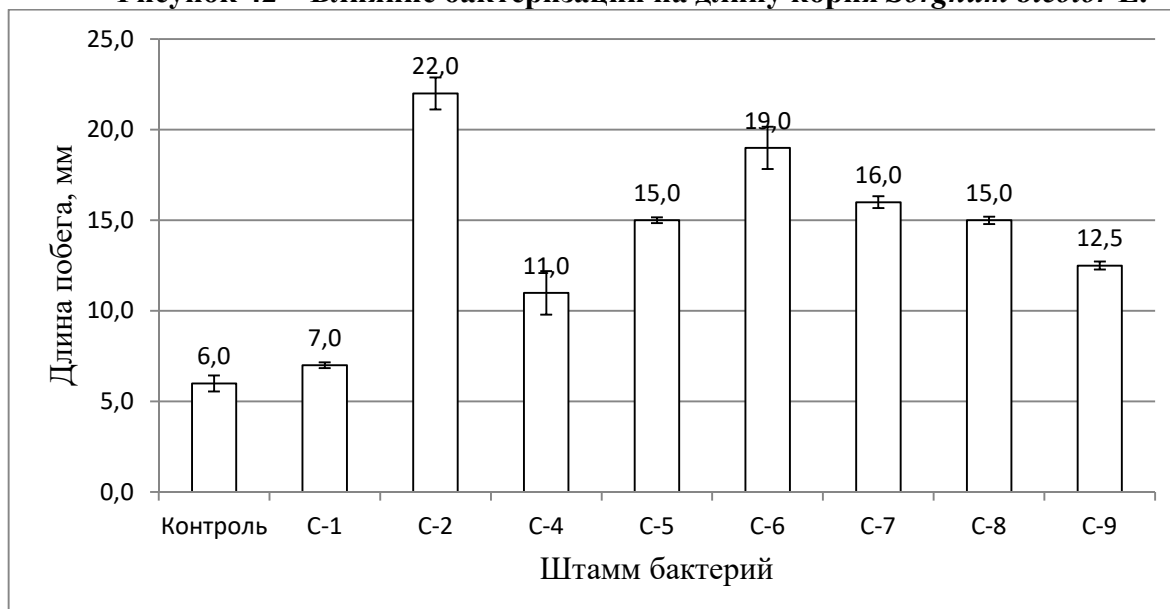


Рисунок 43 – Влияние бактеризации на длину побега *Sorghum bicolor* L.

При обработке семян *Triticum aestivum* L. (озимая пшеница) сорта Тарасовская и *Hordeum vulgare* L. (озимого ячменя) сорта Шторм отмечено стимуляция как корня, так и побега (табл. 39). Так, длина корня пшеницы на

2,5–37,5% превышала контроль, побега – на 22,7–40,9% (рис. 4). Все штаммы способствовали увеличению длины корня ячменя на 9,1–29,5%, побега – на 17,6–90,9%.

Таблица 39 – Влияние бактериализации семян на длину побегов и корней *Triticum aestivum* L. и *Hordeum vulgare* L., мм

Вариант	<i>Triticumaestivum</i> L.		<i>Hordeumvulgare</i> L.	
	корень	побег	корень	побег
Контроль	40,0±1,20	22,0±1,53	44,0±2,33	17,0±0,33
С-1	49,0±0,58	31,0±0,33	48,0±4,37	20,0±2,00
С-2	47,0±0,58	31,0±1,45	54,0±1,76	26,3±1,33
С-4	55,0±1,53	29,0±1,20	57,0±1,86	23,0±1,53
С-5	49,0±1,45	27,0±0,00	56,0±2,33	28,0±0,33
С-6	50,0±0,33	31,0±1,20	52,0±1,67	23,0±2,52
С-7	46,0±2,40	30,0±1,86	52,0±1,20	22,0±0,88
С-8	47,0±0,58	27,0±0,58	52,0±2,96	24,0±0,88
С-9	41,0±1,00	28,0±0,58	53,0±0,58	23,0±0,33

Интересными представляются данные по реакции тритикале на обработку семян штаммами бактерий, ассоциативных с растениями сорго. Анализ таблицы 40 показал, что стимуляция корня отмечена при бактериализации семян штаммами С-4 (на 5%), С-5 (на 16,7%), С-6 (на 3,3%) и С-8 (на 6,7%). В остальных вариантах отмечено угнетение роста корня. Вместе с тем, инокуляция штаммами бактерий, ассоциативных с сорго, обеспечила увеличение длины побега тритикале на 9,1–40,9% (табл. 40). Исключением являются штаммы С-7 и С-9. При обработке тритикале, как и в случае с сорго более проявились эффект стимуляции побега.

Таблица 40 – Влияние бактериализации на длину проростка тритикале

Вариант	Длина корня, мм	Длина побега, мм
Контроль	60,0±1,33	22,0±1,20
С-1	58,0±0,58	25,0±0,33
С-2	59,0±0,88	28,0±1,20
С-4	63,0±1,76	24,0±0,88
С-5	70,0±3,61	31,0±2,33
С-6	62,0±0,67	29,0±1,00
С-7	58,0±1,20	19,0±0,58
С-8	64,0±2,67	26,0±0,88
С-9	60,0±0,33	22,0±0,88

Таким образом, разработанный методологический подход позволил выделить штаммы азотфиксирующих бактерий, ассоциативных с растением сорго зерновое, которые имеют высокий уровень потенциальной азотфиксирующей активности и продуцируют фитогормоны преимущественно цитокининовой природы, что было установлено в фитотестах с основными зерновыми культурами агроценозов юга Российской Федерации. Введение в агротехнологии выделенных штаммов при подборе инокуляционной нагрузки позволит повысить продуктивность зерновых агроценозов.

2.4.2 Первичная оценка штаммов бактерий, ассоциативных с *Salvia sclarea* L. и *Coriandrum sativum* L.

Агроклиматические условия Крыма благоприятны для выращивания многих эфиромасличных, лекарственных и пряно-ароматических растений [162]. Для повышения качества эфиромасличного и лекарственного сырья перспективны исследования по биологизации технологий выращивания этих культур. Важная роль в оптимизации минерального питания и защите растений от фитопатогенов отводится микробным препаратам [163]. В ризосфере под влиянием корневых экссудатов формируются сложные по таксономическому составу эколого-физиологические сообщества микроорганизмов, в свою очередь оказывающие полифункциональное действие на растение [164]. Эфиромасличные, лекарственные и пряно-ароматические культуры обладают бактерицидными и фитонцидными свойствами. Поэтому актуальными являются исследования по поиску активных штаммов микроорганизмов, изучению механизмов взаимодействия с растениями и условий их успешной интродукции в агроценозы.

В 2018-2019 гг. из эпифитного микробоценоза апикальной части корней *S. sclarea* и *C. sativum* выделены штаммы ассоциативных с растениями бактерий. Для ускорения поиска эффективных штаммов и оценки степени ассоциативности применяли методологический подход, суть которого заключается в селективности ризопланы культур – растение само отбирает полезную микробиоту, вынося ее на поверхности корней свободных от субстрата. [165]. В итоге создана коллекция штаммов бактерий, ассоциативных с растениями *S. sclarea* (штаммы 1ШМ, 2ШМ, 3ШМ и 4ШМ) и *C. sativum* (штамм 7К).

В эпифитном бактериальном сообществе свободных от субстрата корней *Salvia sclarea* L. преобладали блестящие колонии округлой формы, с ровными краями и диаметром от 0,2 и до 1,5 мкм, отличающиеся бежевым

пигментом. Для дальнейших исследований были изолированы колонии бактерий близких по морфологии, обилие которых составляло 38,9%, а частота встречаемости – 40%. Микроскопические методы исследований показали, что некоторые колонии образованы ассоциациями бактерий. Далее путем последовательных пересевов были получены идентичные культуры бактерий, вошедших в коллекцию штаммов бактерий, ассоциативных с растениями *Salvia sclarea* L. Штаммам присвоены буквенные значения номера 1ШМ, 2ШМ, 3ШМ и 4ШМ. В микробоценозе *Coriandrum sativum* L. преобладали колонии молочного цвета, округлой формы, с блеском, обилие которых составило 35,1%, частота встречаемости – 35%. Однако большинство изолятов при дальнейших пересевах имели слабый рост или утрачивали способность к воспроизводству на питательных средах, за исключением штамма 7К.

Микроскопическими исследованиями установлено, что культуры однородные, клетки подвижные палочки. По строению клеточной стенки культуры грамотрицательные. Выделенные штаммы обильно росли на агаризованной среде, не содержащей азот (среда Эшби), что позволило считать их диазотрофами (азотфиксаторами). У штаммов не выявлена способность трансформировать труднодоступные соединения фосфора. Отмечена остановка роста микромицетов рода *Fusarium* на границе соприкосновения со штаммами 7К и 3ШМ и 4ШМ, что может свидетельствовать о пассивной конкуренции между исследуемыми микроорганизмами.

Семена являются носителем биологических свойств сельскохозяйственных культур и определяют количество будущего урожая. Исследовали влияние, штаммов бактерий, ассоциативных с растениями *Salviasclarea* L. и *Coriandrum sativum* L. на всхожесть семян шалфея мускатного (рис. 44). Повышение всхожести отмечено при бактериализации семян штаммами 1ШМ и 2АШ на 7 и 9% соответственно по сравнению с контролем. Всхожесть семян в остальных вариантах оставалась на уровне контроля (70,8%), а штамм 7К (ассоциативный с кориандром) угнетал прорастание семян шалфея на 11%.

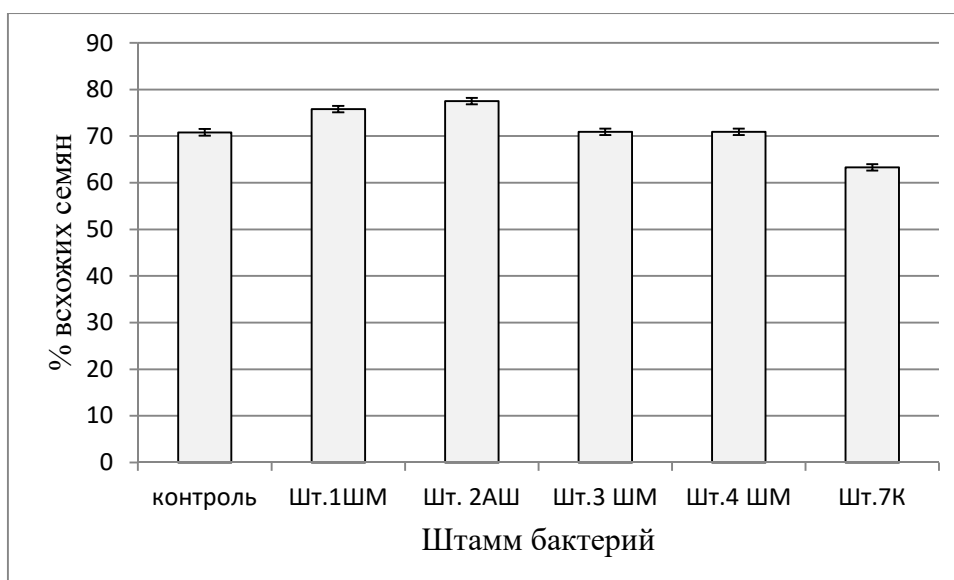


Рисунок 44 – Влияние выделенных штаммов на всхожесть семян *Salvia sclarea* L.

Биотесты [20] на семенах пшеницы, нута, капусты и укропа показали, что исследуемые штаммы продуцируют вещества, стимулирующие рост как близкородственных, так и отдаленных видов растений. При обработке семян нута штаммом 4ШМ выявлен стимулирующий эффект – длина побега в 1,3 раза превышала контроль (табл. 41).

Таблица 41 – Влияние бактериализации на развитие проростков бобовых культур

Вариант	Длина, см	
	корня	побега
Нут (<i>Cicer arietinum</i> L.) сорт Приво		
Контроль	0,5±0,06	3,3±0,30
1ШМ	0,4±0,05	3,5±0,25
2АШ	0,4±0,10	4,0±0,23
3 ШМ	0,5±0,07	3,9±0,23
4 ШМ	0,6±0,22	4,4±0,27
7К	0,4±0,07	4,0 ±0,24
Горох (<i>Pisum sativum</i> L.) сорт Софья		
Контроль	4,0±0,18	1,4±0,03
1ШМ	3,8 ±0,14	1,5±0,06
2АШ	3,6±0,12	1,5±0,04
3 ШМ	3,7±0,16	1,6±0,06
4 ШМ	3,6±0,11	1,3±0,05
7К	3,7±0,17	1,3±0,06

Из исследуемых сельскохозяйственных культур только у капусты отмечена стимуляция роста как побега, так и корня, которые в 1,6-2,2 и 1,8-2,4 раза соответственно по длине превышали контроль (табл. 42). Длина побегов

проростков укропа, инокулированного исследуемыми штаммами ассоциативных бактерий, в 1,3-2,7 раза превышала контроль.

Таблица 42 – Влияние бактериализации на развитие проростков овощных культур

Вариант	Длина, см	
	корня	побега
Томат (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) сорт Шанс		
Контроль	2,1±0,23	0,9±0,16
1ШМ	1,3±0,11	0,8±0,13
2АШ	2,4±0,17	1,4±0,15
3 ШМ	1,1±0,06	1,2±0,17
4 ШМ	1,4±0,24	0,7±0,23
7К	1,1±0,10	0,9±0,17
Капуста (<i>Brássica olerácea</i> var. <i>capitata</i> L.) сорт Амагер 611		
Контроль	1,1±0,08	1,4±0,12
1ШМ	2,0 ±0,15	2,6±0,14
2АШ	2,3±0,18	2,3±0,08
3 ШМ	2,6±0,20	2,9±0,10
4 ШМ	2,5±0,15	2,7±0,13
7К	2,4±0,26	3,1±0,09
Укроп (<i>Anethum graveolens</i> L.) сорт Скиф		
Контроль	1,2±0,12	1,8±0,22
1ШМ	1,1±0,05	4,9±0,18
2АШ	0,9±0,04	3,2±0,21
3 ШМ	0,8±0,04	4,6±0,24
4 ШМ	0,9±0,04	3,9±0,21
7К	0,8±0,05	2,3 ±0,13

Таким образом, выделены штаммы бактерий, ассоциативных с растениями *S. sclarea* L. и *C. sativum* L. и проведена их первичная оценка. Показана способность штаммов расти на безазотных средах, что свидетельствует об их способности к азотфиксации. Выделенные штаммы продуцируют физиологически активные вещества и являются перспективными для разработки биотехнологии в ризосфере шалфея мускатного и кориандра посевного.

Метагеномный анализ микробиома ризосферы растений и полногеномное секвенирование выполнены отделением Геномные Технологии Центра коллективного пользования научным оборудованием «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. Авторы выражают глубокую признательность за помощь и участие в проведении исследований сотрудникам ФГБНУ ВНИИСХМ к.б.н. Андронову Е.Е., к.б.н. Белимову А.А.

3. ЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ КОНСОРЦИИ НА ОСНОВЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ И АССОЦИАТИВНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ЗЕМЛЕДЕЛИЯ

Дидович С.В., Горгулько Т.В., Алексеенко О.П., Пась А.Н., Ремесло Е.В.

Цианобактерии / цианопрокариоты / синезеленые водоросли относятся к сложно организованной и морфологически разнообразной группе окислительных фототрофных бактерий, обладающих уникальной физиологией и морфологией, широкой экологической валентностью и пластичностью. Цианобактерии для альгоиндустрии и биотехнологии являются ценнейшим возобновляемым сырьевым ресурсом получения биологически активных веществ [166-170], которые могут применяться в пищевой продукции [171-173], медицине [174]; сельском хозяйстве [175-178]. На их основе возможно производство биотоплива и биопластиков [179, 180]. В отличие от эукариот цианобактерии способны производить ценные соединения гораздо быстрее и в больших количествах, а при изменении условий культивирования выход целевого продукта может быть существенно увеличен.

В природе цианобактерии всегда находятся в сообществах с другими микроорганизмами и способны менять состав своих спутников, что дает возможность конструирования ассоциаций, обладающих заданными свойствами. Функции цианобактерий в почвах определяются способностью продуцировать органическое вещество, фиксировать атмосферный азот, повышать доступность фосфора и других элементов, выделять фитогормоны и токсины, стимулировать рост и развитие растений, оказывать противозерозионную деятельность за счет слизистых веществ и нитевидных талломов [181].

По данным зарубежных и отечественных исследователей цианобактерии служат фактором дополнительной ассимиляции солнечной энергии и источником дополнительной биомассы [182, 183]. Они участвуют в формировании примитивных почв, а в сформированных влияют на их физико-химические свойства и биологическую активность. Органическое вещество цианобактерий доступно многим гетеротрофным организмам, поэтому их развитие стимулирует деятельность других почвенных микроорганизмов.

С точки зрения прикладного использования цианобактерии эффективны и технологичны, т.к. обладают высокой скоростью роста, не требуют дорогого процесса культивирования (оборудования и питательных сред) [184].

Препараты, созданные на основе цианобактерий, обладают комплексностью действия (азотфиксация, продукция биологически-активных

веществ, поглощение и трансформация фосфора, биопротекция, биоремедиация) и низкой себестоимостью производства. Биологическая фиксация азота позволяет экономить энергию, затрачиваемую при химическом синтезе удобрений, а биоудобрения на основе этих бактерий увеличивают урожайность сельскохозяйственных культур, улучшают фитосанитарное состояние агроценозов путем подавления фитопатогенов и детоксикации поллютантов.

Существует масса примеров создания и использования искусственных циано-бактериальных консорциумов (ЦБК) для целей агробиотехнологии, среди которых ЦБК на основе *Nostoc paludosum* для улучшения биологических показателей козлятника восточного [185]; *N. paludosum*, *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium radiobacter* для подавления развития килы и черной ножки на капусте [186]; *N. paludosum*, *N. linckia*, *Microchaeta tenera* для снижения инфицирования ржи и сеянцев и саженцев сосны и ели грибами рода *Fusarium* [187]; *N. paludosum*, *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas fluorescens* для повышения урожайности бобовых культур и защиты от грибов рода *Fusarium* [188]; *Trichormus variabilis* (= *Anabaena variabilis*), *Chlorella vulgaris* для стимуляции роста и развития риса [189]; *N. linckia* и клубеньковые бактерии для ростстимуляции бобовых культур [190]. Установлена эффективность использования цианобактерий при выращивании риса [191-195], пшеницы [196, 197], томата [198], гороха [199, 200].

Таким образом, цианобактерии и ассоциации, созданные на их основе, представляют значительный интерес в агробиотехнологии. Научно-исследовательские работы, представленные в данном разделе, проведены в рамках государственных заданий №0834-2015-0001, 0834-2015-0005 и при финансовой поддержке грантов РФФИ №14-44-01621 "р_юг_а", 5-29-01272 "офи_м", 18-016-00184 "а". Разработана стратегия выделения, идентификации цианобактериальных штаммов, получения препаративных форм на основе цианобактериальных консорциумов и изучения их эффективности для максимальной реализации потенциала растительно-микробного взаимодействия в агроценозах в аридных почвенно-климатических условиях юга России.

Авторы выражают глубокую признательность за помощь и участие в проведении исследований к.б.н. А.Д. Темралеевой (ИФХиБПП РАН), к.б.н. А.О. Берестецкому и к.б.н. Е.Л. Гасич (ФГБНУ ВИЗР), к.б.н. В.С. Зотову и к.б.н. С.А. Хапчаевой (ФИЦ Биотехнологии РАН).

3.1 Конструирование цианобактериальных консорциумов

Выделение микроорганизмов – спутников цианобактерии проводили на селективных бактериальных средах общепринятыми микробиологическими

методами [201, 202] и идентифицировали по определителю Бержи [203, 204]. Культивирование цианобактерий проводили на рекомендованной для выращивания среде Громова №6 [184] в условиях фитотрона (Т +23–25°C, LED-освещение с плотностью фотосинтетического фотонного потока PPFD (ФАР) – 115 мкмоль/м²/сек и энергетической освещённостью (ФАР) – 24,5 Вт/м² с четырьмя зонами спектра: синим (400-500 нм), зелёным (500-600 нм), красным (600-700 нм), инфракрасным (700-780 нм), фотопериод составлял 12 ч. Биомассу штаммов цианобактерий определяли по абсолютно сухой массе (а.с.м.) мг/мл среды гравиметрическим методом на аналитических весах РА Pioneer, pH измеряли на pH-метре Mettler Toledo Seven 2 Go. В цианобактериальный консорциум (ЦПК) с массой 0,021 мг (а.с.в.)/мл вводили ризобийный штамм – партнер в количестве 10⁶ КОЕ/мл. Использовали агаризованные (0,5% агар-агара) и жидкие среды с разным содержанием бобового отвара и углеводов. Совместное культивирование фото- и гетеротрофных микроорганизмов проводили в экспериментальной среде в течение трех суток на качалке (220 об/мин) при температуре 28°C.

Оценку эффективности бактеризации семян бобовых культур проводили, учитывая количество клубенькообразующих единиц (КОЕД)/мл согласно модифицированному методу Красильникова-Коренько [205] в вегетационных опытах на растениях, выращенных в теплице на стерильном безазотном субстрате – вермикулите [206] или по симбиотическим показателям, биометрическим данным и сухой фитомассе растений. Семена перед посевом стерилизовали 96% спиртом и обрабатывали водной суспензией штаммов / цианобактериальной препаративной формой (ЦБП). Повторность вегетационных опытов 6-ти разовая.

Из почвы мокрого солончака побережья озера Сиваш (Семеновский кут), где высшая растительность представлена популяцией *Salicornietum prostratae* Soo (1927), выделена альгелогически чистая культура цианобактерии *Nostoc linckia* (Roth; Born. et Flah 1880) и получен штамм 144 с нитчатый трихомом и гетероцистами – участками нитрогеназной активности (рис. 45).

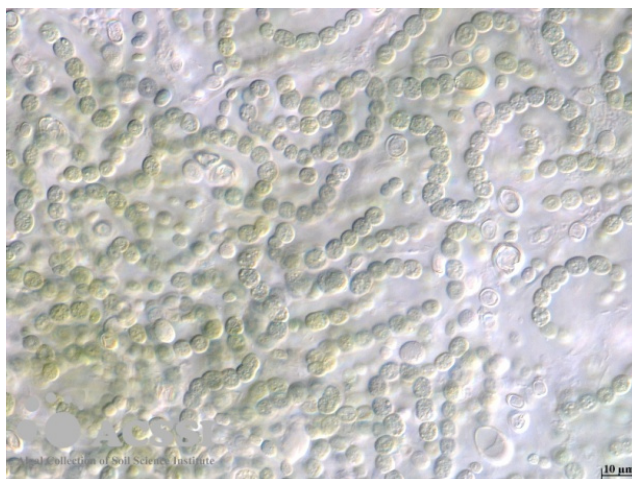


Рисунок 45 – Клетки штамма *Nostoc linckia* 144 (ACSSI 271), x 400

Штамм 144 исследован с использованием методов микроскопии и молекулярной биологии (ПЦР), депонирован в коллекции ACSSI Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН как *N. linckia* ACSSI 271 [207] и в коллекции микроводорослей ФГБУН «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН» под регистрационным номером IPPAS B-2044. Номер в GenBank: KY887478 (16S).

При микроскопировании нами установлено заселение штамма цианобактерии *N. linckia* 144 различными микроорганизмами, которые находятся с ней в ассоциативных отношениях. С данного штамма цианобактерии выделено в чистую культуру 13 штаммов микроорганизмов, которые идентифицированы как штаммы *Halococcus saccharaliticus* NR, *Halobacterium saccharovororum* GAFb, *Haloferax mediterranei* MB2, *Microbacterium laevaniformans* KAGK, *Pseudomonas* sp. ChPU-1, V2 и MB1, *Nocardioides albus* КАВТ, штамм микромицета G-1 и штаммы *Bacillus* sp. GAFm, V1, PK, ChP-2.

Штамм *N. linckia* 144 был проанализирован с помощью метагеномного секвенирования межгенного региона ITS (18S-28S рРНК) [208]. По результатам NGS в альгосфере цианобактериального штамма выявлена грибная составляющая, богатая по своему разнообразию и относящаяся к классу эндофитных грибов «dark septate endophytes (DSEs)», главным образом, обеспечивающих баланс почвенных биохимических процессов, в том числе в ризосфере растений, и набор уникальных грибных таксонов. В данном штамме на уровне ДНК показано отсутствие патогенных микроорганизмов (рис. 43), опасных для человека, теплокровных животных, полезных насекомых, рыб и почвенных микроорганизмов. Штамм *N. linckia* 144 представлен сбалансированным и богатым разнообразием почвенных микробных таксонов, обеспечивающих ключевые физиолого-биохимические функции,

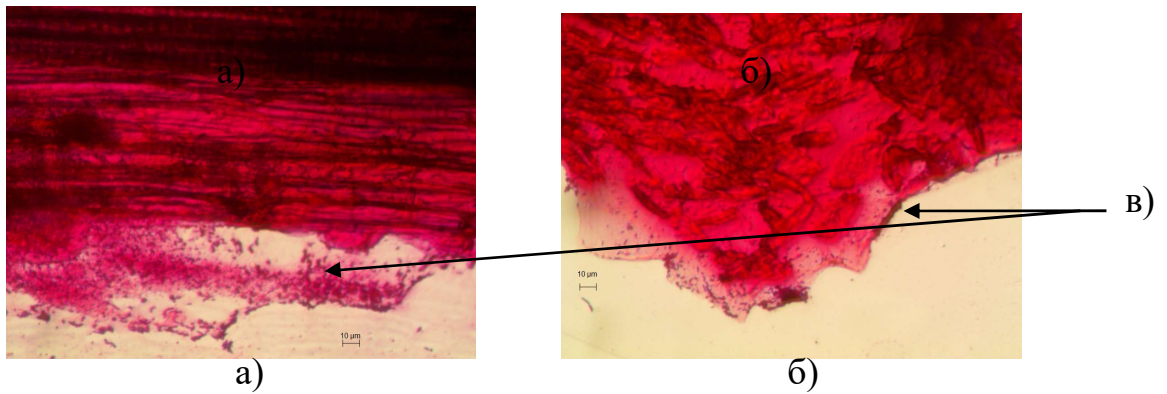


Рисунок 47 – Корень растения *Solanum lycopersicum* L., бактеризованного штаммом *N. linckia* 144 ($0,1 \times 10^{-3}$ а.с.м. клеток мг/мл/семя), 400х : а) зона растяжения корня, б) корневой чехлик, в) микроорганизмы ризопланы.

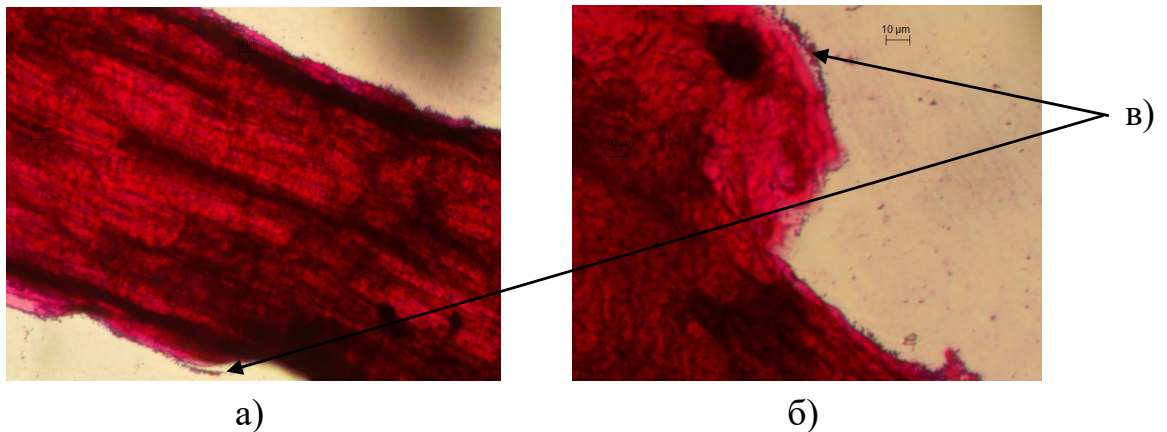


Рисунок 48 – Корень растения *Triticum aestivum* L., бактеризованного штаммом *N. sphaeroides* 4 ($0,1 \times 10^{-3}$ а.с.м. клеток мг/мл/семя), 400х : а) зона растяжения корня, б) корневой чехлик, в) микроорганизмы ризопланы.

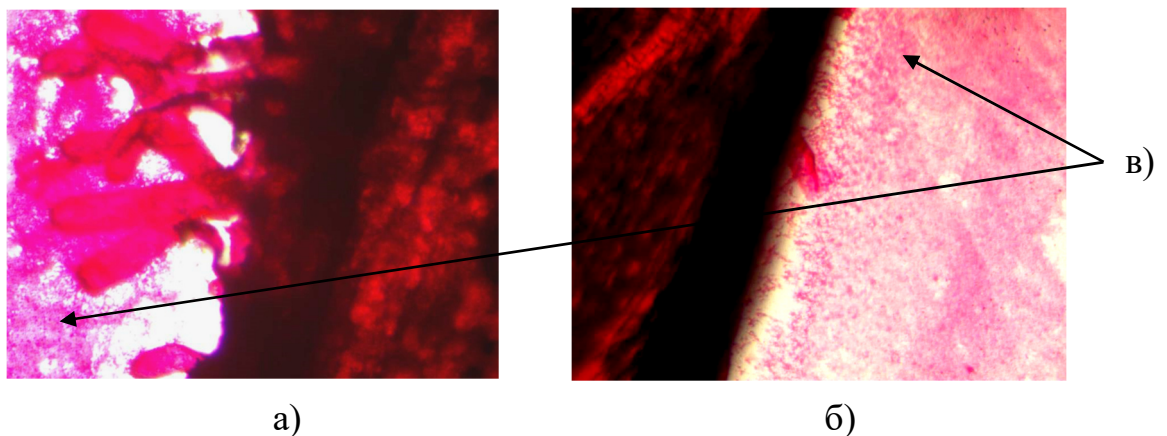


Рисунок 49 – Корень растения *Pisum sativum* L., бактеризованный консорциумом на основе штамма *N. sphaeroides* ($0,1 \times 10^{-3}$ а.с.м. клеток мг/мл/семя) и штамма *Rhizobium leguminosarum* 2616 (10^6 бактерий /семя) 400х : а) зона всасывания корня, б) зона роста корня, в) микроорганизмы ризопланы.

Таким образом, установлено, что бактериальные ассоцианты цианобактериальных штаммов не только ассоциативны штаммам фототрофной цианобактерии, но и ассоциативны бактеризованным растениям. Однако присутствие цианобактерий в ризоплане растений не выявлено. На

сое, нуте отмечали аналогичную картину присутствия ассоциативных с растениями различных гетеротрофных микроорганизмов.

Влияние совместной обработки цианабактериальным консорциумом на основе штамма *N. linckia* 144 с ризобиями на клубенькообразование у бобовых растений определяли в вегетационных опытах на безазотном субстрате – вермикулите (минерал класса алюмосиликатов, слюдяная крошка фракции 1-3 мм). Как свидетельствуют результаты исследований на нуте сорта Триумф, моноинокуляция штаммом *Mesorhizobium ciceri* 068 обеспечила формирование 27 азотфиксирующих клубеньков на корне, высоту растений повысила на 16 см (42,7%), количество бобов на растении – в 10 раз и сухую надземную массу – на 1,3 г/растение (44,8%) (табл. 34).

Таблица 44 – Влияние совместной обработки семян штаммами *M. ciceri* 068 и изолятами микроорганизмов ассоциативных со штаммом *N. linckia* 144 на эффективность симбиотической азотфиксации нута сорта Триумф (вегетационный опыт на вермикулите)

Вариант	Количество клубеньков, ед./растение	Масса клубеньков, мг/растение	Высота растений, см	Количество бобов, ед./растение	Сухая фитомасса, г/растение
Контроль (вода)	0	0	37,5	0,1	2,9
Штамм <i>M.ciceri</i> 068 (I)	27	525	53,5	1,0	4,2
Штамм <i>N. linckia</i> 144+I	38	648	48,8	2,5	5,4
Штаммы-заселенцы+I:					
R + I	31	440	50,2	0,4	4,7
GAFb + I	50	550	50,0	0,3	5,3
GAFm + I	58	575	53,3	0,2	5,4
MB1 + I	46	568	53,5	0,3	5,4
MB2 + I	61	608	54,5	0,3	5,3
КАВТ + I	48	727	56,0	0	5,7
V1 + I	57	693	52,2	0,1	5,6
V2 + I	56	650	56,7	0,2	5,4
ChPU-1 + I	55	758	52,3	0	5,3
ChP-2 + I	44	680	50,7	0,3	5,2
PK + I	58	483	50,3	0,2	4,4
КАГК + I	37	450	55,5	0,1	5,3
G-1 + I	60	730	56,2	0,2	5,5
НСР ₀₅	10,7	111,7	6,1	0,3	1,01

Примечание. * – изоляты микроорганизмов-ассоциантов, выделенных из *N. linckia* 144.

В лабораторном опыте изучали возможность совместимого культивирования штамма *N. linckia* 144 со штаммом *M. ciceri* 068 в жидких и полужидких средах. При культивировании штамма *N. linckia* 144 в жидкой среде Громова №6 в течение месяца отмечено подщелачивание среды до уровня рН 9,5 (табл. 45). Рост клубеньковых бактерий *M. ciceri* наблюдался в диапазоне рН 4,5-8,5, оптимальной для развития клеток штаммов является

близкая к нейтральной реакция среды рН 6,5-7,5. Имеются сведения о том, что клетки ризобий более чувствительны к низким значениям рН, чем к высоким, вплоть до 10,0 [209].

Таблица 45 – Нодулирующая способность клеток *M. ciceri* в условиях искусственного культивирования с цианобактериальным консорциумом *N. linckia* 144 для бактеризации нута

Вариант	<i>N. linckia</i> (N)	<i>M. ciceri</i> (R)	рН питательной среды				КОЕД*/ мл ЦБП
	исходная биомасса, мг (а.с.м.)/мл	исходный титр, млн. КОЕ/мл	исходное	после культи вирова ния с N	после культи вирова ния с R	после культи вирова ния с N+R	
R	–	14,1±0,52	7,2	–	7,4	–	3,5x10 ⁴
Агаризованная питательная среда							
R–6/2a	–	12,1±0,52	7,3	–	5,6	–	2,0x10 ³
N+R–6/2a	0,021±0,0001	11,2±0,52	7,0	7,8	–	7,0	4,4x10 ⁵
R–6/4a	–	13,0±0,52	7,3	–	5,3	–	3,0x10 ³
N+R–6/4a	0,019±0,0001	11,0±0,52	7,0	7,8	–	7,0	9,7x10 ⁵
R–6/10a	–	15,2±0,52	7,1	–	5,5	–	3,5x10 ³
N+R–6/10a	0,018±0,0001	12,8±0,52	7,0	7,6	–	7,0	9,5x10 ⁵
Жидкая питательная среда							
R–6/2b	–	17,4±0,52	7,3	–	5,8	–	2,5x10 ³
N+R–6/2b	0,019±0,0001	12,8±0,52	7,0	8,5	–	7,4	4,0x10 ⁵
R–6/4b	–	14,5±0,52	7,3	–	5,5	–	3,5x10 ⁴
N+R–6/4b	0,020±0,0001	10,7±0,52	7,0	8,5	–	7,5	1,5x10 ⁵
R–6/10b	–	12,2±0,52	7,0	–	5,5	–	2,5x10 ⁴
N+R–6/10b	0,017±0,0001	14,0±0,52	7,3	6,9	–	7,5	9,5x10 ³

Примечания: КОЕ – колониеобразующая единица, КОЕД – клубенькообразующая единица, а.с.в. – абсолютно сухая масса; * – определено по таблице Мак-Креди, „–“, – не определяли.

Как свидетельствуют результаты, культивирование ризобий в монокультуре активно сопровождалось подкислением среды R/2a, R/4a R/10a, что можно объяснить образованием органических кислот в процессе метаболизма углеводов. Применение полужидких препаративной формы для обработки семян в вегетационном опыте обеспечило 10³ КОЕД/мл среды.

При совместном культивировании ризобий и цианобактерий реакция полужидкой агаризованной среды N + R/2a, N + R/4a, N + R/10a практически не менялась. Применение данных препаративных форм повысило количество клеток ризобий на один порядок по сравнению с обработкой суспензией штаммом 068 и на два порядка по сравнению с препаративной формой на

основе этого штамма. Таким образом, установлено наличие стимулирующего действия штамма 144 на количество вирулентных клеток ризобий [210].

Моноштаммовая жидкая препаративная форма (R/2b, R/4b, R/10b) обеспечила нодуляцию растений на уровне 10^3 - 10^5 КОЕД/мл среды. Применение препаративной формы N + R/10b обеспечило высокую эффективность нодуляции – 10^6 КОЕД/мл среды. Данная препаративная форма стала основой создания высокоэффективного консорциума клубеньковых бактерий и цианобактерии для бактеризации семян нута.

3.2 Потенциал взаимодействия «цианобактерии – растения»

Следующим этапом исследования стало изучение потенциала взаимодействия «цианобактерии – растения», поиск функциональных связей в системе «физиолого-биохимический потенциал штаммов цианобактерий и возможности управления продуктивностью бактеризованных растений».

Исследования были проведены в условиях лабораторного опыта. В качестве тест – растения использовали *Triticum aestivum* L., которые обрабатывали штаммами почвенных цианобактерий из Крымской коллекции микроорганизмов «НИИСХ Крыма» *N. sphaeroides* 4, *N. linckia* 144 и Альгологической коллекции ИФХиБПП РАН (<http://acssi.org>) *N. calcicola* ACSSI 82, а также их гомогенатами. Культивирование цианобактериальных штаммов для получения из них накопительных культур проводили в течение месяца на среде Громова в климатокамере при температурах +23–25°C, фотопериод составлял 12 ч [182]. Перед бактеризацией растений определяли физиолого-биохимические параметры штаммов: биомассу клеток по абсолютно сухой массе мг/мл среды гравиметрическим методом на аналитических весах РА Pioneer; рН измеряли на рН-метре Mettler Toledo Seven 2 Go; ферментативную активность оксидоредуктаз (каталаз, пероксидаз, полифенолоксидаз) и содержание антиоксидантов (аскорбиновой кислоты и глутатиона) в биомассе штаммов выявляли согласно общепринятым биохимическим методам исследования растений и почв [211].

Растения *Triticum aestivum* L. выращивали в сосудах с перфорированным дном, объемом 200 мл на черноземе южном в условиях климатокамеры в течение трех недель, фотопериод составлял 12 ч. Предпосевную бактеризацию семян проводили суспензией цианобактерий или их препаративной гомогенизированной формой. Инокуляционная нагрузка составляла $0,1 \times 10^3$ абсолютно сухой массы клеток мг/мл/семя. Контролем служила дистиллированная вода. Гомогенизированную цианобактериальную препаративную форму получали путем перемешивания дисперсных систем с жидкой средой быстро вращающимся ротором гомогенизатора. Контрольный

и опытные варианты проводили в четырехкратной повторности. Статистическую обработку данных, в том числе вычисление значений коэффициентов корреляции Пирсона, проводили с использованием компьютерной программы Statistica–10.

Анализ полученных данных показал высокую функциональную зависимость всхожести семян и биомассы растений с физиолого-биохимическими параметрами цианобактериальных штаммов и их гомогенизированных препаративных форм.

При бактеризации растений штаммами цианобактерий установлены сильные положительные связи между всхожестью семян и биомассой клеток штаммов ($r=0,91$, $p<0,05$), содержанием в них глутатиона ($r=0,83$, $p<0,05$). В то же время, накопление биомассы растений достоверно отрицательно коррелировало с содержанием аскорбиновой кислоты и ферментативной активностью пероксидаз в культуральной среде ($r=-0,95$ и $-0,89$, $p<0,05$).

При бактеризации растений гомогенатами на основе штаммов цианобактерий выявлены статистически значимые ($p<0,05$) значения коэффициентов корреляции между всхожестью семян и содержанием в них аскорбиновой кислоты ($r=0,98$, $p<0,05$), также как и с биомассой клеток штаммов ($r=0,99$, $p<0,05$), рН культуральной среды ($r=0,99$, $p<0,05$). Установлена достоверная положительная связь между накоплением биомассы растений и содержанием в них глутатиона ($r=0,98$, $p<0,05$), в то время как накопление биомассы обратно коррелировало с ферментативной активностью пероксидаз цианобактериальных культур ($r=-0,97$, $p<0,05$).

Установленные достоверные связи между целым рядом показателей исследуемого растения и показателями культуральных сред с цианобактериями позволяют утверждать, что использованные штаммы имеют мощный физиолого-биохимический потенциал, который весьма перспективен в плане управления продуктивностью тест – растений *Triticum aestivum* L.

Результаты эксперимента указывают на перспективность использования цианобактерий для разработки микробных препаратов стимулирующего действия. Бактеризация растений штаммом *N. linckia* 144 и гомогенатом штамма *N. sphaeroides* 4 достоверно повысила всхожесть семян пшеницы соответственно на 22,2 и 11,0% ($p<0,05$), однако высота и фитомасса растений оставалась на уровне контроля (в пределах ошибки опыта) (таблица 4б). Необходимо отметить, что существенного влияния на фитомассу и высоту трехнедельных бактеризованных растений *Triticum aestivum* L. не выявлено.

Установлено, что обработка штаммом *N. calcicola* ACSSI 82 существенно снизила всхожесть семян – на 50% ($p<0,05$). Это указывает на перспективность

данного штамма для биотехнологии препаратов ингибирующего / гербицидного действия.

Таблица 46 – Показатели эффективности бактеризации тест растений *Triticum aestivum* L. штаммами цианобактерий и их гомогенатами

Вариант	Всхожесть, %, X ± SE	Высота растений, см, X ± SE	Биомасса растений, г, X ± SE
Контроль (вода)	60,00±0,10	23,90±2,98	0,44±0,03
<i>N. sphaeroides</i> 4	60,00±0,10	23,90±5,27	0,43±0,06
<i>N. calcicola</i> ACSSI 82	40,00±0,05	24,10±2,26	0,46±0,05
<i>N. linckia</i> 144	73,30±0,10	24,60±4,45	0,42±0,04
<i>N. sphaeroides</i> 4 g	66,60±0,10	23,48±1,77	0,41±0,04
<i>N. calcicola</i> ACSSI 82 g	60,00±0,10	21,31±3,65	0,41±0,04
<i>N. linckia</i> 144 g	60,00±0,10	22,80±2,98	0,48±0,03

Примечание: g – гомогенизированная препаративная форма.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлены достоверные корреляционные связи между рядом физиолого-биохимических параметров (биомассы клеток и рН культуральной среды; пероксидазной активности; содержания антиоксидантов: глутатиона и аскорбиновой кислоты) трех штаммов цианобактерий и всхожестью семян, а также продуктивностью бактеризованных ими тест – растений *Triticum aestivum* L.

На основе многолетних исследований агроценозов бобовых культур (гороха, нута, чины, чечевицы, сои) с применением бактеризации семян и возделываемых на черноземе южном в степной зоне Крыма изучено влияние различных растительно-микробных систем с применением полифункциональных микробных препаратов и сформирована База Данных биологических показателей (БД), позволяющая построить алгоритм оценки эффективности растительно-микробного взаимодействия и найти возможность управления продуктивностью агроценозов [212].

БД представляет собой последовательно изложенную информацию о структурно-функциональной организации микробоценоза почвы; ферментативной активности и дыхании почвы; симбиотической эффективности; интенсивности и направленности микробиологических и биохимических процессов в ризосфере пяти бобовых культур и их физиологическом статусе.

БД позволяет выполнять несколько операций: упорядочивать, сортировать данные в определенном порядке, выделять, фильтровать данные

для поиска нужной информации, составлять матрицы, взаимодействовать с программой Statistica_10, проводить анализ результатов исследования. БД включает в себя три основных структурированных блока и реализована в формате Microsoft Excel на 23 электронных листах xls, занимает 8 Мб.

При возделывании бобовых культур использовали предпосевную бактеризацию семян различными микробными препаратами: Ризобифитом (Р) – на основе специфичных симбиотических азотфиксирующих клубеньковых бактерий; фосфатмобилизующими и ростстимулирующими препаратами: на основе штамма *Lelliottia nimipressuralis* 32-3 (Ф); препаратом биопротекторного действия Биополицидом (Б) – на основе штамма рост стимулятора и антагониста фитопатогенов *Paenibacillus polymyxa* П; ЦРК – полифункциональным цианоризобияльным консорциумом на основе специфичного бобовой культуре штамма ризобий, штамма цианобактерий *N. linckia* 144 и ассоциативных с ним микроорганизмов с азотфиксирующей, фосфатмобилизующей, биопротекторной, рост стимулирующей функциями в ризосфере растений; препаратом грибов арбускулярной микоризы (АМГ).

В листах xls каждого биологического показателя в соответствующих полях указаны: наименование показателя, сокращенное название на англ. языке для удобства работы с программой Statistica_10, единицы измерения, количественная / качественная характеристика; вид и сорт бобовой культуры, вариант бактеризации; включены формулы расчета исследуемого биологического показателя согласно общепринятым методам исследования микроорганизмов, почв и растений, показан расчет среднего значения, расчет ошибки опыта и квадратичного отклонения. Показана возможность взаимодействия БД с программой Statistica.

В БД можно проводить выборку данных, группировать по различным показателям и характеристикам: структурно-функциональной организации микробценоза почвы (например, численности эколого-трофических групп в ризосфере по фазам развития растений, годам и т.д.); ферментативной активности и дыханию почвы (для расчета коэффициентов интенсивности и направленности микробиологических и биохимических процессов в ризосфере по каждой бобовой культуре агроценоза, по фазам развития растений, годам исследования и т.д.); по физиолого-биологической характеристике растений (структуре урожая, эффективности симбиотического взаимодействия, качеству зерна и т.д.).

Выборка данных зависит от выбранной цели исследования. Полный набор данных представлен в виде матриц. К каждой матрице прикреплены гиперссылки для перевода информации в StatSoft, Inc. (2011) Statistica (data

analysis software system), version 10 / www.statsoft.com. С помощью БД изучали следующие качественные критерии, оценивая их вклад в основные факторные нагрузки эффективности растительно-микробного взаимодействия в агроценозе: биологическая активность почвы, физиолого-биохимический статус бактеризованных растений и их продуктивность (рис. 50).

Биологическая активность включала исследование следующих особенностей:

– структурно-функциональная организация микробоценоза почвы ризосферы бобовых культур в три фазы развития растений (ветвление, цветение, созревание) по динамике численности следующих основных групп микроорганизмов: аминотрофов, аммонификаторов, олиготрофов, азотфиксаторов, фосфатмобилизаторов, целлюлозолитиков, микромицетов, актиномицетов, споровых форм микроорганизмов;

– активность ферментов ризосферы бобовых культур по фазам развития: пероксидаз, катализирующих окисление органического вещества почвы, в том числе полифенолов и участвующих в деструкции гумуса; полифенолоксидаз, окисляющих ароматические соединения в гуминовые вещества в присутствии кислорода воздуха и участвующих в синтезе гумуса; фосфатаз, катализирующих гидролиз фосфорорганических веществ; инвертаз, характеризующих интенсивность превращения безазотистых органических соединений; каталаз, катализирующих реакцию разложения перекиси водорода на воду и молекулярный кислород;

– дыхание почвы (интенсивность выделения CO_2), характеризующее активность микробоценоза и корневой системы, а также активность группы микроскопических одноклеточных животных (*Protozoa*);

– интенсивность и направленность микробиологических и биохимических процессов в ризосфере бобовых культур, активность которых оценивали по коэффициентам минерализации, олиготрофности, микробной трансформации органического вещества и условному коэффициенту гумификации.

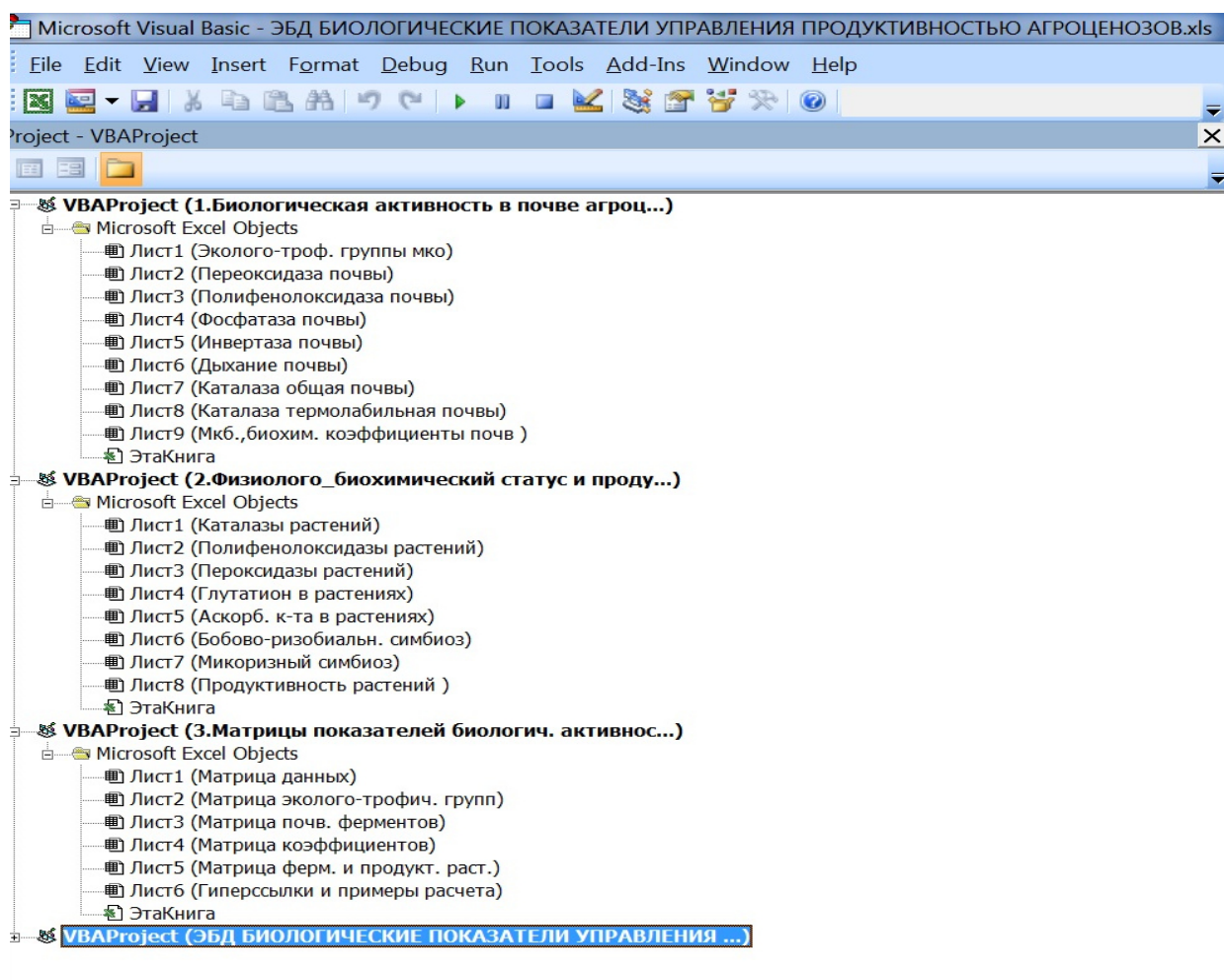


Рисунок 50 – Скриншот файла Microsoft Visual Basic БД_xls_Структура БД биологических показателей управления продуктивностью агроценозов.

Физиолого-биологический статус изучали в фазе цветения растений по следующим характеристикам:

- активность ферментов оксидоредуктаз: каталаз, катализирующих реакцию разложения токсичных перекисей, участвующих в дыхании; полифенолоксидаз, участвующих в регуляции окислительных процессов; пероксидаз, контролирующего адаптационный потенциал;

- содержание антиоксидантов клеточной системы, регулирующих рост и развитие растения, участвующих в защитных реакциях при неблагоприятных воздействиях и в окислительно-восстановительных процессах: глутатиона, аскорбиновой кислоты;

- симбиотическая эффективность: бобово-ризобиальный симбиоз. Данный показатель имеет качественные характеристики: количество азотфиксирующих клубеньков, биомасса клубеньков, нитрогеназная активность;

– эффективность микоризного симбиоза: частота встречаемости микоризной инфекции, интенсивность развития, количество арбускул, везикул.

Продуктивность бобовых культур оценивали по следующим качественным показателям: высота растений, густота стояния растений перед уборкой, семенная продуктивность: масса 1000 семян, урожайность семян, качество зерна – содержание сырого протеина в семенах.

Результаты многолетних исследований позволили констатировать, что применение препаратов оказывало влияние в большей степени (в 2 раза) на физиолого-биологический статус растений, структуру урожая, семенную продуктивность и качество зерна и в меньшей степени – на биологическую активность почвы в агроценозе (табл. 47).

Таблица 47 – Основные факторные нагрузки в агроценозах на основе корреляций

Вариант	Показатель	% влияния фактора ^a на показатели	% влияния фактора ^b на показатели	Σ влияние факторов, %	Средняя по факторам, %	Разница по показателям, %
Р	Биологическая активность почвы	22,42	17,66	40,08	58	36
	Физиолого-биохим. статус растений и их продуктивность	42,62	33,07	75,69		
Р+Ф+Б	Биологическая активность почвы	27,44	16,66	44,1	60	33
	Физиолого-биохим. статус растений и их продуктивность	43,44	33,33	76,77		
ЦРК	Биологическая активность почвы	27,33	18,41	45,74	60	29
	Физиолого-биохим. статус растений и их продуктивность	42,43	31,95	74,38		
Р+АМГ	Биологическая активность почвы	21,06	16,15	37,21	56	39
	Физиолого-биохим. статус растений и их продуктивность	44,55	31,2	75,75		

Примечание: a/b – набор факторов, кластеризованных по степени значимости и влияния на систему агроценоза ($p < 0,05$).

Минимальная разница в 29% между суммарным влиянием факторов отмечена при использовании ЦРК и Р+Ф+Б – 33% в сравнении с Ризобифитом

– 36%, и Р + АМГ – 39%, что может свидетельствовать о более сбалансированной реализации потенциала «растение – микроорганизмы – почва» в агроценозах в данном варианте.

Таким образом, показано преимущество использования полифункционального цианоризобияльного консорциума и комплекса препаратов Ризобифита, препарата на основе штамма *Lelliottia nimipressuralis* 32-3 и Биополицида при выращивании бобовых культур для реализации ресурса растительно-микробных взаимодействий в сравнении с бактеризацией Ризобифитом, грибами арбускулярной микоризы [212].

Штаммы цианобактерий обладают не только ростстимулирующим действием на растения, но и способны ингибировать их рост и развитие. Такой эффект наблюдали при длительном культивировании цианобактериальных штаммов (6-9-ти мес. возраста) на рекомендованной для выращивания среде BG11 без азота (1%-ный агар, рН = 7.0) в климаточкамере (Т +23–25 °С, LED-освещение с плотностью фотосинтетического фотонного потока PPFD (ФАР) – 115 мкмоль/м²/сек и энергетической освещённостью (ФАР) – 24,5 Вт/м² с четырьмя зонами спектра: синим (400-500 нм), зелёным (500-600 нм), красным (600-700 нм), инфракрасным (700-780 нм), фотопериод составлял 12 ч. Далее из накопительной культуры получали препаративную форму в виде гомогенизированного фильтрата и изучали эффективность бактеризации на растениях амброзии полыннолистной (*A. artemisiifolia* L.). Оценивали активность оксидоредуктаз растений при бактеризации штаммами *N. sphaeroides* 4 (6-ти месячная культура), *N. linckia* 144 (10-ти месячная культура) и *N. calcicola* ACSSI 82 (9-ти месячная культура) и их гомогенатами.

Известно, что пероксидаза обладая повышенной чувствительностью к внешним воздействиям, участвует в защитных реакциях растения, и ее можно считать стрессовым ферментом [213, 214]. В наших исследованиях бактеризация увеличивала уровень пероксидаз в зеленой массе амброзии полыннолистной в 1,6-2,6 раза в сравнении с контролем (табл. 48).

Пероксидазы клеточных стенок ответственны за продукцию перекиси в ходе окислительного «взрыва» в ответ на патогенез, а защиту клеточных структур от разрушения перекисью водорода, обеспечивает фермент каталаза, активность которой увеличивалась на 6-86% кроме варианта с бактеризацией *N. sphaeroides* 4 (g), где была ниже контроля на 4%.

Таблица 48 – Эффективность бактеризации *Ambrosia artemisiifolia* L. цианобактериями рода *Nostoc* (вегетационный опыт на черноземе южном)

Вариант	Пероксидаза, мкмоль гваякола/г/минуту	Полифенол-оксидаза, мкмоль C ₆ H ₈ O ₆ /г/минуту	Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ /г/минуту	Фитомасса, г/растение
Контроль (вода)	3,6±0,01	4,0±0,01	1061,4±0,01	12,59
<i>N. sphaeroides</i> 4	5,7±0,01	7,8±0,01	1472,6±0,01	11,21
<i>N. sphaeroides</i> 4 (g)	5,9±0,01	79,6±0,01	1018,8±0,01	7,64
<i>N. linckia</i> 144	9,3±0,01	15,5±0,01	1973,2±0,01	8,98
<i>N. linckia</i> 144 (g)	6,6±0,01	5,5±0,01	1172,6±0,01	13,18
<i>N. calcicola</i> ACSSI 82	9,3±0,01	48,4±0,01	1222,0±0,01	8,18
НСП ₀₅	-	-	-	2,31

Примечание. g – гомогенизированная препаративная форма.

При бактеризации отмечена высокая активность фермента полифенолоксидазы – на 6-86% больше, чем в контроле, что свидетельствовало о снижении интенсивности дыхания и торможения процессов роста и повышении стойкости растений к неблагоприятным стрессовым факторам. Установлены корреляции активности пероксидаз и полифенолоксидаз с фитомассой растений ($r = -0,59$ и $-0,84$) (рис. 51).

Визуализация полученных результатов указывает на функциональную зависимость ферментативной системы оксидоредуктаз и продуктивности растений от бактеризации штаммами рода *Nostoc*.

Таким образом, можно предположить, что для получения максимального гербицидного эффекта (ингибирования растений) необходимо достичь пролонгированного воздействия штаммов. Одним из путей решения может стать исследование гербицидной эффективности бактеризации растений при различной инокуляционной нагрузке клеток цианобактерий определенного физиологического возраста и выявления фазы развития растений, восприимчивой к ингибированию.

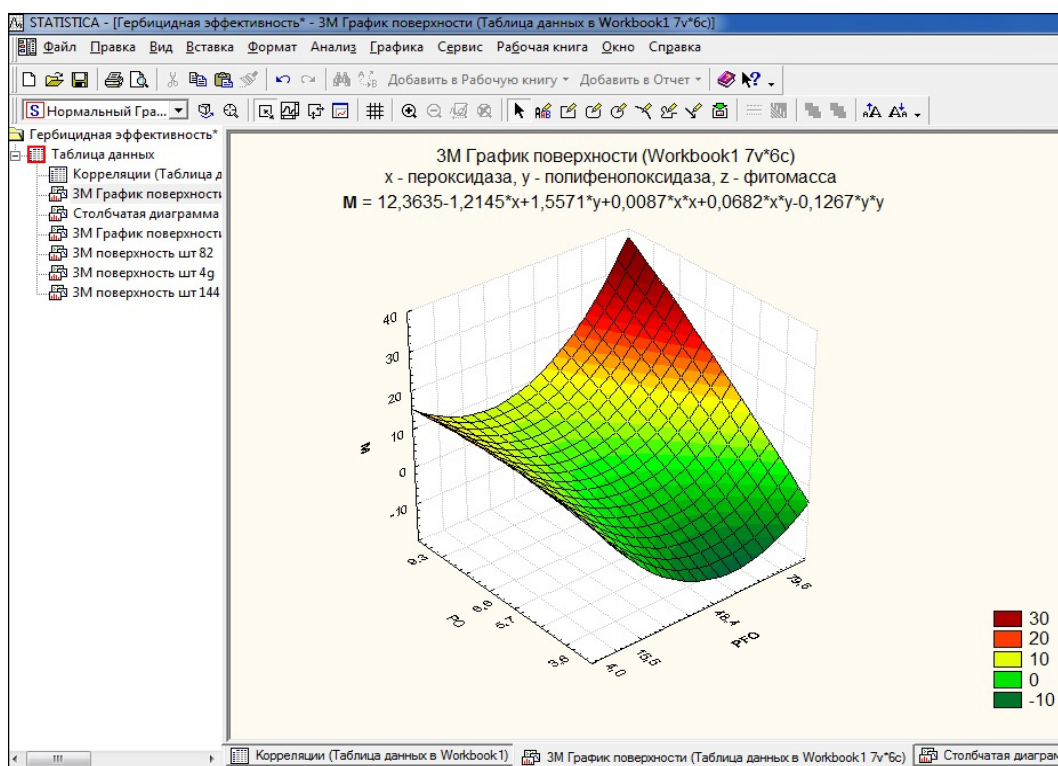


Рисунок 51 – Визуализация нелинейных связей в системе «бактеризация штаммами цианобактерий рода *Nostoc* – физиологический потенциал *A. artemisiifolia* L.»: PO – активность пероксидаз, PFO – активность полифенолоксидаз, M – масса растений.

В лабораторном опыте на вермикулите изучали влияние штаммов цианобактерий (6-9-мес. возраста) на растения амброзии полыннолистной, обработанные в разные фазы развития. Установлено, что самой эффективной для ингибирования была бактеризация в фазы развития 4-х, 6-ти листьев растений. Обработка обеспечила снижение фитомассы растений на 0,3-0,6 г/растение (в 1,6-4,0) и 0,5-0,8 г/растение (1,7-3,0 раза) по сравнению с контролем (рис. 52).

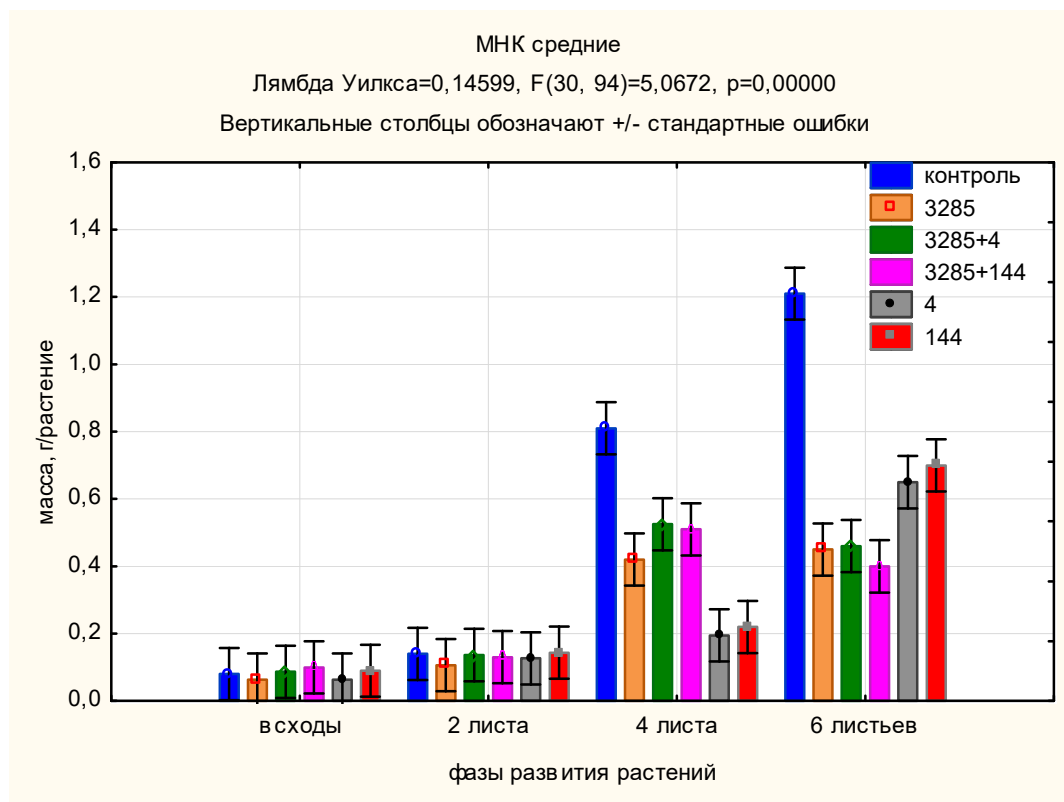


Рисунок 52 – Влияние бактеризации биогербицидными штаммами в разные фазы развития *Ambrosia artemisiifolia* L. на фитомассу растений: 3285 – штамм *S. heliopsisidis* 32.85 из коллекции ВИЗР, 4 – штамм *N. sphaeroides* 4, 144 – штамм *N. linckia* 144.

Бактеризация штаммами фототрофных бактерий *N. sphaeroides* 4 и *N.* в фазе 4-х листьев снизила фитомассу растений на 0,2-0,22 г/растение (в 1,9-2,1 раза) в сравнении с фитотоксичным для амброзии штаммом *S. heliopsisidis* 32.85 из коллекции ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений».

Влияние цианобактериальных штаммов на сорные растения изучали в условиях полевых опытов на протяжении трех лет в степной зоне Крыма в отделении полевых культур ФГБУН «НИИСХ», с. Клепинино Красногвардейского района, расположенного в центральной части степного Крыма (38 м над уровнем моря). Климат района степной, умеренно холодный, полусухой, характеризуется большими годовыми и суточными колебаниями температур, наблюдаются резкие переходы от низких температур к высоким как в течение суток, так и среднесуточно, подекадно и ежемесячно.

Почва – чернозем южный малогумусный на лессовидных легких глинах. Мощность гумусового горизонта до 40 см, всего гумусового слоя до 70 см. Количество гумуса (по Тюрину) – 2,00–2,20 %, подвижного фосфора (по Мачигину) – 4,00–4,20, обменного калия до 40 мг на 100 г почвы.

Гранулометрический состав черноземов южных крупнолегкоглинистый пылевато-иловатый. Количество водостойких агрегатов размером более 0,25 мм в гумусовом горизонте целинных почв составляет 72–77%. Содержание агрономически ценных агрегатов размером более 1 мм составляет 33–42%. Плотность сложения (объемная масса) в пахотном слое 1,14–1,28, а в подпахотном 1,33–1,48 г/см³. Изменение показателей общей пористости происходит обратно пропорционально изменению плотности сложения. Общая пористость верхних горизонтов составляет 50,2%, что, по агрономической оценке, является удовлетворительным показателем. Водоудерживающее свойство почв достаточно высокое, они могут накапливать больше 300-350 мм влаги, но запасы продуктивной влаги доступной для растений всего составляют только 160-180 мм.

Весной 2018 г. (4 апреля) был заложен полевой опыт на посевах озимого ячменя сорта Онега. Предшественник – фацелия, площадь делянки – 25 м², повторность – 3-х кратная, норма высева 150 кг/га. В схему опыта были включены: контроль – обработка водой; варианты биогербицидов на основе гомогенатов (г) цианобактериальных штаммов 9 месячного возраста *N. sphaeroides* 4 и *N. linckia* 144 с титром 0,021 мг/мл а.с.м. Обработка составляла 5 л/га.

Перед внесением биогербицидов был проведен подсчет сорняков с определением их видового состава. Учет сорняков проводили на фиксированных площадках – 0,25 м² по 4 площадки на вариант в 3-х кратной повторности. Учеты гибели сорняков проводили на фиксированных площадках через 10 и 20 сут. после внесения биогербицидов ручным опрыскивателем.

Учет, проведенный 4 апреля 2018 г. показал, что видовой и количественный состав сорняков перед внесением биогербицидом был представлен одно- и двулетними яровыми и зимующими сорняками в количестве 1-43,3 шт./м², среди которых выявлены вероника плющелистная (*Veronica hederifolia* L.), ясколка стеблеобъемлющая (*Caryophyllaceae* Juss L.), яснотка стеблеобъемлющая (*Lamium amplexicaule* L.), пастушья сумка (*Capsella bursa-pastoris*), дискурейния Софии (*Descurainia Sophia* L.), хориспора нежная (*Chorispora tenella* (Pall.)), мак самосейка (*Papaver rhoeas* L.), воробейник полевой (*Lithospermum arvense* L.), двойчатка лучистая (*Bifora radians* Bieb.) (табл. 49).

Таблица 49 – Видовой и количественный состав сорняков до и после внесения биогербицидов (полевой опыт, степная зона Крыма, 2018 г.)

Сорные растения	Контроль			<i>N. sphaeroides</i> 4 (g)			<i>N. linckia</i> 144 (g)		
	Кол-во, шт./м ²		Гибель, %	Кол-во, шт./м ²		Гибель, %	Кол-во, шт./м ²		Гибель, %
	*	**		*	**		*	**	
Вероника плющелистная	41,0	0,0	100	42,0	0	100	43,3	0,0	100
Мак самосейка	8,0	7,7	4,2	6,7	4,0	40,0	7,0	6,3	9,5
Хориспора нежная	5,0	1,7	66,7	2,3	0,3	85,7	3,7	0,0	100
Пастушья сумка	2,0	0,0	100	1,3	0,0	100	2,3	0,0	100
Двойчатка лучистая	6,7	0,3	95,0	6,7	0,3	95,0	9,7	0,0	100
Ясколка стеблеоб.	4,7	2,0	57,1	6,0	0,0	100	6,0	0,0	100
Яснотка стеблеоб.	6,7	1,0	85,0	2,7	0,0	100	3,0	0,3	100
Дискурейния Софии	5,0	1,7	66,7	4,0	0,7	83,3	3,3	0,3	90,0
Воробейник полевой	1,7	0,7	60,0	1,0	0,0	100	2,7	0,7	87,5

Примечания: * – до обработки, ** – после обработки, g – гомогенизированная препаративная форма.

Во всех вариантах доминирующим видом сорняков была отмечена вероника плющелистная (*Veronica hederifolia* L.) – 41,0 – 43,3 шт./м²

Через 10 сут. после внесения биогербицидов не отмечали гибель сорных растений, однако наблюдали ухудшение роста и развития как в контрольном варианте, так и в вариантах с биогербицидами, что возможно являлось следствием засухи. В вариантах с биогербицидами на листьях сорных растений наблюдали появление хлороза.

Через 20 сут. после внесения биогербицидов учет сорняков показал, что во всех вариантах опыта все растения вероники плющелистной, пастушьей сумки высохли и погибли. В вариантах с биогербицидами гибель мака самосейки составила 9,5-40% (контроль – 4,2%), хориспоры нежной – 85,7-100% (контроль – 66,7%), двойчатки лучистой 95-100% (контроль – 95%), ясколки стеблеобъемлющей – 100% (контроль – 57,1%), яснотки стеблеобъемлющей – 100% (контроль – 85%), дискурейнии Софии – 83,3-90% (контроль – 66,7%), воробейника полевого – 87,5-100% (контроль – 60%). Выжившие сорные растения находились в увядшем состоянии с хлоротичными пятнами.

Однако появление новых сорняков в вариантах через 20 сут. после внесения биогербицидов свидетельствует, что данные биогербициды не обладают почвенным действием и не препятствуют прорастанию новых сорных растений.

Воздействие биогербицидов на растениях озимого ячменя не наблюдали. Следует отметить, что сильному увяданию и гибели сорных

растений способствовали погодные условия апреля 2018 года, которые характеризовались экстремально повышенным температурным режимом без осадков. Во второй декаде апреля минимальная температура понижалась в воздухе до -1°C , на почве до -3°C , абсолютный максимум температуры воздуха составил 25°C и отмечен 11 апреля. Почва на глубине 10 см прогрелась до 15°C , что на 4°C выше нормы. Сумма эффективных температур воздуха выше 10° составила 43°C , в среднем, выше многолетней на 30°C . Количество дней с относительной влажностью воздуха менее 30% отмечено вдвое больше нормы. При таких высоких на этот период времени температурах осадки практически отсутствовали. Третья декада апреля характеризовалась резко повышенным температурным режимом без осадков. За декаду отмечено четыре дня с максимальной температурой 25°C и выше. Сумма эффективных температур воздуха выше 10°C составила 100°C , в среднем, выше многолетней на 65°C .

Урожайность озимого ячменя в опыте была практически одинаковой и составила 16,1-16,23 ц/га. Таким образом, в полевом опыте в погодноклиматических условиях 2018 г. показана перспективность использования препаративных гомогенизированных форм на основе цианобактериальных штаммов *N. sphaeroides* 4 и *N. linckia* 144 для ингибирования сорняков.

В 2019 г. (26 апреля) полевой опыт закладывали на товарном посеве кориандра сорта Янтарь. В первые десять дней после внесения биогербицидов отмечался повышенный температурный режим в дневные часы $19-25^{\circ}\text{C}$, в ночные часы $12-16^{\circ}\text{C}$ без выпадения осадков. В последующие 10 дней (6-15 мая) преобладала пасмурная погода с пониженным температурным режимом в отдельные дни до $14-15^{\circ}\text{C}$ в дневные часы и до 10°C в ночное время, с выпадением осадков.

Среднемесячная температура воздуха в апреле 2019 г. превышала средне многолетние показатели на $2,7^{\circ}\text{C}$, а в мае находилась на уровне средне многолетних показателей.

Сумма осадков в апреле находилась практически на одном уровне со средними многолетними показателями и составила 26,9 мм, а в мае отмечен существенный недобор осадков (14,4 мм), что составило 35% от средне многолетних показателей.

В схему опыта включали: контроль – обработка водой; варианты биогербицидов на основе гомогенизированных препаративных форм с штаммами 9-месячного возраста *N. sphaeroides* 4, *N. linckia* 144, *N. calcicola* ACSSI 82 и мицелиальная препаративная форма (m) с штаммом *S. heliopsisidis* 32.85 в дозе 5 л/га.

Учет, проведенный 26 апреля 2019 г., показал, что видовой и количественный состав сорняков перед внесением биогербицидов был представлен одно- и двулетними яровыми и зимующими сорняками в количестве 0,5-21 шт./м², (марь белая (*Chenopodium album* L.), осот полевой (*Sónchus arvensis* L.), амброзия полыннолистная (*Ambrósia artemisiifólia* L.), хориспора нежная (*Chorispora tenella* (Pall.)), мак самосейка (*Papaver rhoeas* L.), вьюнок полевой (*Convólvyulus arvensis* L.), котовник мелкоцветковый (*Nepeta parviflora* L.), горец птичий (*Polýgonum aviculáre* L.). По всем вариантам доминирующим видом сорняков отмечали марь белую (*Chenopodium album* L.) – 4,0-21,0 шт./м².

Через 10 дней после внесения биогербицидов не наблюдали гибель сорных растений, но визуально отмечали угнетение растений, как в контрольном варианте, так и в вариантах с биогербицидами, что возможно вызвано засухой, однако в вариантах с биогербицидами увядание сопровождалось хлоротичными пятнами на листьях сорных растений.

Через 20 сут. после внесения биогербицидов учет показал, что по сравнению с контролем в вариантах опыта отмечалась частичная гибель сорняков, в зависимости от вида и фенологической фазы (табл. 50).

Осот полевой, корневищный многолетник, находился в фазе развития всходы и розетка. Эта фаза развития является наиболее уязвимой, но в связи с морфологическими особенностями строения листовой пластины (лист прочный, жесткий, покрыт колючками) процент гибели составил 40% в варианте 82g, 25% в варианте 4g и 0% в вариантах 144g и штамм 32.85 (табл. 51).

Таблица 50 – Видовой и количественный состав сорняков до и после внесения биогербицидов (полевой опыт, степная зона Крыма, 2019 г.)

Вариант		Марь белая	Мак самосейка	Хориспора нежная	Осот полевой	Амброзия полыннолистная	Вьюнок полевой	Котовник мелкоцветковый	Горец птичий
Контроль	До внесения., шт./м ²	21	-	-	0,5	2,5	2,0	0,5	3,5
	После внесения, шт./м ²	21	-	-	0,5	2,5	2,0	0,5	3,5
	Гибель, %	0,0	-	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
82g	До внесения., шт./м ²	7,5	0,5	-	2,5	11,5	-	0,5	-
	После внесения, шт./м ²	3,5	0,0	-	1,5	6,0	-	0,5	-
	Гибель, %	53,3	100	-	40	47,8	-	0,0	-
4g	До внесения., шт./м ²	4,0	-	-	4,0	9,5	0,5	-	-
	После внесения, шт./м ²	3,5	-	-	3,0	9,5	0,5	-	-
	Гибель, %	12,5	-	-	25	0,0	0,0	-	-
144g	До внесения., шт./м ²	8,5	-	-	2,0	8,5	1,0	-	-
	После внесения, шт./м ²	8,0	-	-	2,0	8,5	1,0	-	-
	Гибель, %	5,9	-	-	0,0	0,0	0,0	-	-
32.85m	До внесения., шт./м ²	12,0	-	0,5	1,0	4,0	-	-	1,0
	После внесения, шт./м ²	0,0	-	0,0	1,0	4,0	-	-	0,0
	Гибель, %	100	-	100	0,0	0,0	-	-	100

Примечания: здесь и далее g – гомогенизированная препаративная форма; m – мицелиальная препаративная форма; 4 – штамм *N. sphaeroides* 4; 82 – штамм *N. calcicola* 82; 144 – штамм *N. linkia* 144; 32.85 – штамм *S. heliopsisidis* 32.85.

Таблица 51 – Эффективность бактеризации биогербицидами (полевой опыт в степной зоне Крыма, 2019 г.)

Растение		Биогербициды			
название	семейство	82g	4g	144g	32.85m
Кориандр	Зонтичные	–	–	–	–
Амброзия полыннолистная	Астровые	+	–	–	–
Вьюнок полевой	Вьюнковые	*	–	–	*
Горец птичий	Гречишные	*	*	*	+++
Котовник мелкоцветковый	Яснотковые	–	*	*	*
Мак самосейка	Маковые	+++	*	*	*
Марь белая	Маревые	++	–	–	+++
Осот полевой	Астровые	+	+	–	–
Хориспора нежная	Капустные	*	*	*	+++

Примечания: +++ (80–100 %) – высокая токсичность, ++ (50–79 %) – средняя токсичность, + (25–49 %) – слабая токсичность, – (менее 25%) – практически не токсичен, * – нет данных.

Марь белая, яровой ранний однолетник, находилась фазе развития всходы. Всходы мари белой мучнистые и покрыты мелкими пузырчатými волосками, что затрудняет удерживанию капель раствора гербицидов на поверхности листовой пластины. Процент гибели составил 53,3% в варианте 82g, 12,5% в варианте 4g, 5,9% в варианте 144g и 100% гибель в варианте штамм 32.85.

Мак самосейка был выявлен лишь на делянке, где применяли биогербицид 82g, процент гибели составил 100%.

Хориспора нежная отмечалась только в варианте с биогербицидом на основе штамма 32,85, процент гибели составил 100%.

Амброзия полыннолистная – сорняк, который требует особого внимания в связи с тем, что он является чрезвычайно опасным карантинным объектом и борьба с ним затруднена и опушенной поверхностью растения короткими прижатыми щетинистыми волосками. На делянках амброзия полыннолистная находилась фазе развития – всходы. Процент гибели в варианте 82g составил 47,8%, в остальных вариантах гибели сорняка не отмечено.

Вьюнок полевой, многолетний корнеотпрысковый сорняк, находился в фазе развития всходы. Вьюнок полевой был выявлен на делянках – контроль, 4g и 144g, гибели сорняка после внесения данных биогербицидов не наблюдалось.

Котовник мелкоцветковый, однолетнее, полностью опушенное растение, находился в фазе развития всходы. Котовник мелкоцветковый был отмечен лишь на делянках контроль, 82g. Гибели сорняка после внесения биогербицида не наблюдалось.

Горец птичий, однолетник, отмечен лишь на делянках контроль, штамм 32.85, гибели сорняка после внесения биогербицида составил 100%.

Судя по появлению новых сорняков в вариантах через 20 дней после внесения биогербицидов можно предварительно предположить, что данные препаративные формы не относятся к гербицидам сплошного действия и не препятствуют прорастанию новых сорняков.

На растениях кориандра визуального воздействия биогербицидов не отмечено. Урожайность кориандра в опыте существенно не различалась.

В 2020 г. (2 июня) закладывали полевой опыт на товарном посеве сафлора сорта Александрит с нормой высева 20 кг/га по предшественнику – чабер, площадь делянки – 3 м², повторность – 3-х кратная (рис. 53). Схема опыта была аналогична схеме 2019 г.

Перед внесением биогербицидов проводили подсчет сорняков с определением их видового состава. Учет сорняков проводили на фиксированных площадках 0,25 м² в 3-х кратной повторности.

Внесение биогербицидов проводили ручным опрыскивателем 2 июня в утренние часы, температура воздуха составляла 19°C, относительная влажность 65%.



Рисунок 53 – Полевой опыт по изучению влияния обработки биогербицидными препаративными формами на основе микроорганизмов (степная зона Крыма, 2020 г.)

В первые десять дней после внесения биогербицидов отмечался повышенный температурный режим в дневные часы 19-32°C, в ночные часы 11-19,5°C без выпадения осадков. В отдельные дни первой декады среднесуточные температуры превышали норму на 5-7°. Абсолютный максимум температуры воздуха составили 37°C, на поверхности почвы 60-56°C (9, 10 июня, соответственно). Минимальная температура, в ночные часы, понижалась в воздухе и на почве до 6°C. Осадков в первой декаде не было (при норме 20 мм), к концу первой декады период без хозяйственно – полезных дождей (10 мм и более) длился уже 50 дней.

В целом, июнь 2020 г. характеризовался повышенным температурным режимом, среднемесячная температура воздуха составила 22,1°C, что на 2°C выше нормы. Во второй декаде сумма осадков составила 58 мм, 243% нормы; в третьей декаде – 26 мм, 175% нормы.

В результате проведенного учета 2 июня 2020 г. установлено, что видовой и количественный состав сорняков перед внесением биогербицидов представлен одно – двулетними яровыми и зимующими сорняками в количестве 1-128 шт./м², (марь белая (*Chenopodium album*), осот полевой (*Sónchus arvensis*), амброзия полыннолистная (*Ambrósia artemisiifolia*), вьюнок полевой (*Convólulus arvensis*), ластовень острый (*Cynanchum acutum* L.), щетинник зеленый (*Setaria viridis*), щирица запрокинутая (*Amaranthus retroflexus* L.), молочай огородный (*Euphórbia peplus*), гречишка вьюнковая (*Fallopia convolvulus* L.), молочан татарский (*Lactúca tatáríca*), амброзия

полыннолистная (*Ambrósia artemisiifólia*). Во всех вариантах доминирующим видом сорняков был отмечен молокáн татарский (*Lactúca tatárica*) – 20-128,0 шт./м².

Учет через 10 сут. после внесения биогербицидов показал, что гибель и увядание сорных растений не отмечается.

При учете, проведенном через 20 сут. после внесения биогербицидов, показал ухудшение состояния некоторых сорняков, полное или частичное увядание, сопровождающееся хлоротичными и красноватыми пятнами на листьях. Наблюдался хлороз листьев – заболевание растений, при котором нарушается образование хлорофилла в листьях сорняков, в зависимости от вида и фенологической фазы (табл. 42).

Осот полевой, корневищный многолетник, находился в фазе развития всходы и розетка. Эта фаза является наиболее уязвимой, но в связи с морфологическими особенностями строения листовой пластины (лист прочный, жесткий, покрыт колючками) эффективность биогербицидов была невысокой. В варианте со штаммом 82 растения осота не произрастали, в вариантах со штаммами 4 и 144 – гибель и увядание 0%. В варианте со штаммом 3285 наблюдалось увядание растений и хлороз листьев – 50% (табл. 52).

Марь белая, яровой ранний однолетник, находилась в фазе развития 2-3 пар листьев и стеблевания. Марь белая относится к сорнякам, чувствительным к воздействию пестицидов, однако листья быстро наращивают восковый слой, превращающийся в броню. Поэтому оптимальнее всего использовать ингибиторы растений в фазу семядолей – максимум первой пары настоящих листьев, то есть тогда, когда гидрофобный слой тонкий и непрочный. Защитная система мари – сочная структура, позволяющая сорняку сохранять свою численность. Например, толщина воскового налета на листьях всходов автоматически возрастает пропорционально появляющимся парам листьев. Поэтому на молодых растениях восковых слой в разы больше, чем на семядолях. В этом кроется основная трудность при борьбе с переросшими растениями в посевах. Для их уничтожения пригодны препараты, растворяющие растительный воск. Полное и частичное увядание растений мари белой (фаза 2-3 пары листьев) в варианте со штаммом 82 составило 16,7%, 14,3% в варианте со штаммом 4,0 % в вариантах со штаммами 144 и 20% в варианте со штаммом *S. heliopsidis* 32.85.

Таблица 52
Видовой и количественный состав сорняков до и после внесения биогербицидов (полевой опыт, степная зона Крыма, 2020 г.)

Сорняки	Варианты бактерицизации																		
	Контроль				<i>N. sphaeroides</i> 4				<i>N. imckia</i> 144				<i>N. calcicola</i> ACSSI 82				<i>S. heliopsisidis</i> 32.85		
	Кол-во, шт./м ²		После обработки, Гибель, %	Кол-во, шт./м ²		Полная или частичная гибель, %	Визуальные физиологические изменения	Кол-во, шт./м ²		Полная или частичная гибель, %	Визуальные физиологические изменения	Кол-во, шт./м ²		Полная или частичная гибель, %	Визуальные физиологические изменения				
	До обработки	После обработки		До обработки	После обработки			До обработки	После обработки			До обработки	После обработки						
Марь белая	10,7	10,7	0	9,3	8	14,3	++	44	44	0	+	8	6,7	16,7	++	13,3	10,7	20	++
Мак самосейка	3,0	3	0	1,3	1	25	++	2,3	1,3	42,9	++	1,3	0	100		2,7	2	25	++
Молокан татарский	33,3	33,3	0	26,7	26,7	0	+	64	61,3	4,2	+	62,7	57,3	8,5	++	17,3	14,7	15,4	++
Гречишка вьюнковая	6,7	6,7	0	-	-	-		5,3	5,33	0		6,7	6,7	0		2,7	2,7	0	
Щирица запрокинутая	2,7	2,7	0	1,3	1,3	0		2,7	2,7	0		4	4	0		4	4	0	
Щетинник зеленый	4	4	0	2,7	2,7	0		2,7	2,7	0		4	4	0		5,3	5,3	0	
Ластовень острый	1,3	1,3	0	1,3	1,3	0		-	-	-		1,3	1,3	0		-	-	0	
Вьюнок полевой	6,7	6,7	0	4	4	0		5,3	5,3	0		4	4	0		6,7	6,7	0	
Осот полевой	2,7	2,7	0	1,3	1,3	0		2,7	2,7	0		-	-	-		2,7	1,3	50	+++
Амброзия польнолистная	8	8	0	32	32	0		41,3	41,3	0		36	36	0		25,3	25,3	0	

Примечания: "++++" – 70–100% встречаемость заболевания, "+++" 69–50% встречаемость заболевания, "++" – менее 50% встречаемость заболевания, "-" – отсутствует.

Однако, нижние листья мари белой во всех испытуемых вариантах, были покрыты светло-желтыми пятнами, наблюдается хлороз листьев – заболевание растений, при котором блокируется образование хлорофилла в листьях.

Мак самосейка находился в фазе всходов и розетки. Увядание отмечено в вариантах со штаммом 4 – 25%, штаммом 144 – 42,9%, штаммом 82 – 100% и штаммом 32.85 – 25%. Кроме того, хлороз листьев отмечен на всех неувядших листьях.

Гречишка вьюнковая и щирица запрокинутая – яровые однолетники. Гречишка вьюнковая находилась в фазе второй пары листьев и стеблевания, щирица – в фазе второй пары листьев. Увядания и гибели сорняков после внесения биогербицида не наблюдалось.

Щетинник (мышей) зеленый – однолетний яровой сорняк семейства мятликовые (злаковые), находился в фазе 2-4 листа. Увядания и гибели сорняка после внесения биогербицида не наблюдалось.

Амброзия полыннолистная – сорняк, который требует особого внимания в связи с тем, что он является чрезвычайно опасным карантинным объектом и борьба с ним затруднена и опушенной поверхностью растения короткими прижатыми щетинистыми волосками. На делянках амброзия полыннолистная находилась фазе развития 6–8 листьев. Во всех вариантах гибели и визуальных физиологических изменений сорняка не отмечали.

Вьюнок полевой, многолетний корнеотпрысковый сорняк, находился в фазе стеблевания. Гибели сорняка и визуальных физиологических изменений после внесения биогербицидов не наблюдалось.

Молокан (латук) татарский является многолетним корнеотпрысковым растением семейства Астровые или Сложноцветные. В варианте со штаммом 82 полное и частичное увядание через 20 суток после внесения составило 8,5%, в варианте со штаммом 4 – 0%; в варианте со штаммом 144 – 4,2% и в варианте со штаммом 32.85 – 15,4%. Следует отметить, что нижние листья молокана татарского во всех испытуемых вариантах, кроме контроля, были покрыты хлоротичными и красноватыми пятнами на листьях.

Появление новых сорных растений в вариантах через 20 сут. после внесения биогербицидов свидетельствует о том, что данные препараты не обладают механизмом сплошного действия и не препятствуют прорастанию новых сорняков.

На растениях сафлора визуального воздействия биогербицидов не отмечено. Урожайность сафлора в опыте была практически одинаковой.

Таким образом, эффективность биогербицидов проявилась через 20 сут. после внесения, отмечалось ухудшение состояния некоторых сорняков, увядание,

сопровождается хлоротичными и красноватыми пятнами на листьях, частичная гибель, в зависимости от вида, фенологической фазы сорных растений и внесенного биогербицида. Наиболее эффективным против мака самосейки стали препаративные формы на основе штаммов *N. sphaeroides* 4, *N. linckia* 144, *N. calcicola* ACSSI 82, *S. heliopsisidis* 32.85; против молокана татарского – на основе штаммов *N. calcicola* ACSSI 82 и *S. heliopsisidis* 32.85. По воздействию на осот эффективным был препарат на основе штамма *S. heliopsisidis* 32.85.

Исходя из вышеизложенного материала по изучению цианобактериальных консорциумов на основе симбиотических и ассоциативных микроорганизмов для целей растениеводства и земледелия можно заключить, что цианобактериальные штаммы в зависимости от условий культивирования способны проявлять ростстимулирующее на растения действие в возрасте 1,5-месячных культур и ингибирующий эффект в возрасте 6,0-9,0-месячных культур. Изучаемые штаммы фототрофных цианобактерий не проявляли ассоциативные связи к растениям, однако микроорганизмы их заселяющие в цианобактериальных консорциумах были ассоциативны как растению, так и цианобактерии. Разработанные препаративные формы на основе цианобактериальных штаммов перспективны для биотехнологии микробных препаратов, стимулирующих и ингибирующих рост и развитие растений, повышают биологическую активность почв и могут быть использованы для экологизации земледелия.

Заключение

Аналитическая селекция является важным средством получения новых штаммов микроорганизмов – эффективных продуцентов биопрепаратов различной функциональной направленности для повышения продуктивности растений в современных агроценозах. Включение в сельскохозяйственное производство новейших технологий требует срочного реагирования на изменения условий для микроорганизмов и обеспечения стабильно действующих биопрепаратов. В решении этой проблемы важное место способен занять предложенный авторами методологический подход, позволяющий ускорить селекционный процесс. Полученные таким образом штаммы микроорганизмов способны вступать в ассоциативные отношения с определенным видом растений, что исключает необходимость в адаптации.

В процессе исследований установлено, что количество полученных видов микроорганизмов, обилие и частоту их встречаемости предопределяет в первую очередь вид растения (корневые экссудаты различные по составу), во вторую – виды микроорганизмов в почве, но не зависят от исходного количества микроорганизмов в образцах.

Проведенный метагеномный анализ микробиома ризосферы *T. aestivum* подтвердил опубликованные данные [31, 32] о влиянии почвенных условий и сорта растений на изменения таксономической структуры микробных сообществ. Следует отметить, что влияние почвенно-климатических условий являлось более существенным, чем влияние сорта пшеницы, на представленность доминирующих фил и неопределенного домена. Филы, обладающие меньшей долей (до 1%), больше реагировали на сортовое разнообразие.

Установлено положительное влияние штаммов и изолятов, полученных как ассоциативные с различными видами сельскохозяйственных культур, на энергию прорастания и всхожесть семян, а также на биомассу проростка и развитие растений. Отмечено повышенное стимулирующее влияние на развитие корневой системы, что является важным фактором для укоренения рассады овощных культур.

Изучено влияние выделенных штаммов ассоциативных бактерий на микробные сообщества ризосферы и продуктивность *T. aestivum* в условиях чернозема южного степи Крыма. Предпосевная обработка семян штаммами микроорганизмов с высоким ассоциативным потенциалом к озимой пшенице может стать эффективным биологическим приемом для экологически ориентированного земледелия и оптимизации питания растений. Установлено положительное влияние выделенных штаммов ассоциативных к *T. aestivum* бактерий на развитие растений. Инокуляция штаммом Br способствовала

лучшему развитию корневой системы у всех сортов. Другие штаммы оказывали избирательное действие в зависимости от сорта и почвенных условий. Показано, что под влиянием ассоциативных к *T. aestivum* штаммов бактерий происходят изменения численности микроорганизмов различных экологотрофических групп чернозема южного. Установлено, что инокуляция микробными биоагентами способствует активизации минерализационных процессов в ризосфере пшеницы озимой. Выявлен наиболее отзывчивый на бактеризацию семян ассоциативными штаммами сорт пшеницы Багира. Увеличение его урожайности в среднем за два года исследований находилось в пределах 0,2-0,4 т/га или 5-10% по сравнению с контролем.

Впервые были установлены изменения в таксономической структуре микробиома ризосферы пшеницы при инокуляции семян штаммами ассоциативных бактерий. Метагеномный анализ микробиома ризосферы пшеницы показал наличие представителей 19 фил, относящихся к доменам археи и бактерии. Значительную долю (18,3-21,8%) составляли неопределенные филотипы. В состав доминирующих (доля выше 1%) фил прокариот вошли девять: *Thaumarchaeota*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*. Доля неопределенных филотипов из домена *Bacteria* составила 1,2–1,5 %. Анализ главных координат фил прокариот, представленных в ризосфере пшеницы, показал, что обработка семян пшеницы штаммами *Pseudomonas fluorescens* P4, *Raenarthrobacter nitroguajacolicus* L1, и *Bacillus* sp. B5, оказавшими положительное влияние на её продуктивность, способствовала значительным изменениям таксономического состава сообщества микроорганизмов ризосферы по сравнению с контролем.

В результате проведенных исследований из сформированного в монокультуре (10 лет) микробного ценоза почвы, при использовании методологического системного подхода к выделению ассоциативных микроорганизмов с апикальной части корней риса, селекционированы эффективные штаммы бактерий. Биохимический и генетический анализ наиболее эффективных штаммов позволил идентифицировать их как *Flavobacterium pectinovorum* 72, *Phyllobacterium ifriqiense* 6 и *Agrobacterium tumefaciens* 32. Азотфиксирующая активность их составила 22,1-549,7 нМоль / мл/час, наиболее высокая – у штамма *A.tumefaciens* 32. Штаммы способны продуцировать фитогормоны и приживаться в ризосфере, являются технологичными и могут быть основой в разработке микробных препаратов.

Установлено, что предпосевная обработка семян ассоциативными штаммами микроорганизмов является эффективным агротехнологическим

приемом современного земледелия для оптимизации азотного питания растений и повышения биологической продуктивности риса. Прирост урожая зерна при инокуляции семян ассоциативными штаммами бактерий составил от 3,2 т/га или 34,8% (*A. tumefaciens* 32) до 6,4 т/га или 69,6% (*P. ifriqiense* 6) к контролю. Также установлено, что инокуляция зерна новыми ассоциативными штаммами повышает массу 1000 семян и количество зерен в колосе. При бактеризации *P. ifriqiense* 6 эти показатели превышали контроль на 7,4 и 61% соответственно.

Цианобактерии и ассоциации, созданные на их основе, перспективны для агробиотехнологии. Показана возможность конструирования эффективных микробных полифункциональных цианобактериальных консорциумов для направленного растительно-микробного взаимодействия и микробиологических процессов ризосферы, повышения / ингибирования продуктивности растений. Выявлена ассоциативность бактерий, входящих в цианобактериальный консорциум, не только со штаммом фототрофной цианобактерии рода *Nostoc*, но и с инокулированным растением.

Таким образом, полученные с помощью предложенного методологического подхода штаммы ассоциативных бактерий являются ценным биологическим ресурсом проведения исследований при разработке микробных препаратов для повышения продуктивности агрофитоценозов и устойчивости агроэкосистем.

Analytical breeding is an important means of obtaining new strains of microorganisms - effective producers of biological products of various functional orientations to increase plant productivity in modern agrocenoses. The inclusion of the latest technologies in agricultural production requires an urgent response to changes in conditions for microorganisms and the provision of stably acting biological products. The proposed methodological approach, which makes it possible to accelerate the breeding process, can take an important place in solving existing problems, since the strains of microorganisms obtained in this way are able to enter into associative relationships with a certain type of plant, which eliminates the need for adaptation in the prevailing conditions.

The number of species of microorganisms obtained, the abundance and frequency of their occurrence determines, first of all, the type of plant (root exudates are different in composition), and secondly, the types of microorganisms in the soil or its mixture with other components (peat, humus, etc.), but not depend on the initial number of microorganisms in the samples, what is established. The performed metagenomic analysis of the rhizosphere microbiome of *T. aestivum* confirmed the published data on the influence of soil conditions and plant varieties on changes in the taxonomic structure of microbial communities. It should be noted that the influence of soil and climatic

conditions was more significant than the influence of the wheat cultivar on the representation of dominant phyla and an undefined domain. Phyla with a lower proportion (up to 1%) reacted more to varietal diversity.

For the first time, changes were established in the taxonomic structure of the rhizosphere microbiome of wheat upon inoculation of seeds with strains of associative bacteria. Analysis of the main coordinates presented in the rhizosphere of wheat in phyla prokaryotes showed that the treatment of wheat seeds with *Pseudomonas fluorescens* P4 and *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* L1, which had a positive effect on productivity, and *Bacillus sp.* B5 resulted in significant changes in the taxonomic composition of the microbial community in the rhizosphere compared to the control.

Effective strains of bacteria were selected from the microbial soil cenosis formed in a monoculture of rice (10 years): *Flavobacterium pectinovorum* 72, *Phyllobacterium ifriqiyense* 6 and 32. Their nitrogen-fixing activity was 22.1-549.7 nMol / ml / hour. The strains are capable of producing take root in the rhizosphere, are technological and increase the productivity of rice plants. The increase in grain yield upon inoculation of seeds with associative bacterial strains was 3.2–6.4 t / ha, or 34.8–69.6% against the control.

The positive effect of strains and isolates obtained as associative with various types of agricultural crops on the germination energy and seed germination, as well as on the biomass of the seedling and plant development has been established. An increased stimulating effect on the development of the root system was noted, which is an important factor for the rooting of vegetable seedlings.

Cyanobacteria and associations created on their basis are promising for agrobiotechnology. The possibility of constructing effective microbial polyfunctional cyanobacterial consortia for directed plant-microbial interaction and microbiological processes in the rhizosphere, increasing / inhibiting plant productivity is shown. The associativity of bacteria included in the cyanobacterial consortium was revealed not only with a strain of phototrophic cyanobacteria of the genus *Nostoc*, but also with an inoculated plant.

Thus, the strains of associative bacteria obtained using the proposed methodological approach are a valuable biological resource for research in the development of microbial preparations to increase the productivity of agrophytocenoses and the stability of agroecosystems.

Key words: methodological approach, strains of microorganisms associative with a certain plant species, *Solanum lycopersicum* L., *Brassica oleracea* var. *capitata* L., *Cucumis sativus* L., *Triticum aestivum* L., *Oryza sativa* L., microbiome, rhizosphere, cyanobacterial consortium, productivity.

Key words: methodological approach, strains of microorganisms associative with a certain plant species, *Solanum lycopersicum* L., *Brassica oleracea* var. *capitata* L., *Cucumis sativus* L., *Triticum aestivum* L., *Oryza sativa* L., microbiome, rhizosphere, cyanobacterial consortium, productivity

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Завалин А.А., Соколов О.А. Потоки азота в агроэкосистеме: от идей Д.Н. Прянишникова до наших дней. – Москва: ВНИИА, 2016 – 591 с.
2. Кожемяков А.П., Лактионов Ю.В., Попова Т.А., Орлова А.Г., Кокорина А.Л., Вайшля О.Б., Агафонов Е.В., Гуживин С.А., Чураков А.А., Яковлева М.Т. Агротехнологические основы создания усовершенствованных форм микробных биопрепаратов для земледелия // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50. – № 3. – С. 369–376.
3. Mendes R., Garbeva P., Raaijmakers J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms // FEMS microbiology reviews. 2013. Vol. 37. №. 5. P. 634–663.
4. Шапошников А.И., Белимов А.А., Кравченко Л.В., Виванко Д.М. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями: механизмы образования и факторы эффективности ассоциативных симбиозов // Сельскохозяйственная биология. 2011. Т. 3. С. 16–22.
5. Shcherbakova E.N., Shcherbakov A.V., Andronov E.E., Gonchar L.N., Kalenskaya S.M., Chebotar V.K. Combined pre-seed treatment with microbial inoculants and Mo nanoparticles changes composition of root exudates and rhizosphere microbiome structure of chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants // Symbiosis. 2017. Vol. 73. No. 1. P. 57–69. DOI: 10.1007/s13199-016-0472-1.
6. Chandra D., Srivastava R., Gupta V.V., Franco C.M., Sharma A.K. Evaluation of ACCdeaminase-producing rhizobacteria to alleviate water-stress impacts in wheat (*Triticum aestivum* L.) plants // Canadian journal of microbiology. 2019. Vol. 65. No. 5. P. 387–403. DOI: 10.1139/cjm-2018-0636.
7. Науметов Р.В. Сабитов М.М. Способы формирования агроценозов яровой пшеницы в различных типах агроландшафта // Современный ученый. 2017. №5. С. 26-33.
8. Kumar A. et al. Does a plant growth-promoting rhizobacteria enhance agricultural sustainability // J Pure Appl Microbiol. 2015. Vol. 9. №. 1. С. 715–724.
9. Ahemad M., Kibret M. Mechanism and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective // Journal of King saud University-science. 2014. Vol. 26. No. 1. P. 1–20. DOI: 10.1016/j.jksus.2013.05.001.
10. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Сельскохозяйственная микробиология как основа экологически устойчивого агропроизводства: фундаментальные и прикладные аспекты // Сельскохозяйственная биология: серия биология растений. 2011. № 3. С. 3–9.
11. Дмитричева Д.С., Яппаров А.Х., Дегтярева И.А. Ризосферные аборигенные микроорганизмы, способствующие росту и развитию растений // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. 2011. №207. С.186–190.
12. Волкогон В.В. Ассоциативные азотфиксирующие микроорганизмы // Микробиол. журн. 2000. Т. 62, № 2. С. 51–68.

13. Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Berg G., Pirttilä AM., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsche A. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2015. Vol. 79. No. 3. P.293-320.
14. Васильева Е.Н., Ахтемова Г.А., Жуков В.А., Тихонович И.А. Эндофитные микроорганизмы в фундаментальных исследованиях и сельском хозяйстве // *Экологическая генетика*. 2019. Т. 17. № 1. С. 19–32. <https://doi.org/10.17816/ecogen17119-32>.
15. Dobereiner J., Day J. M. Associated symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites // *Proc. Intern. symp. on nitrogen fixation*: Ed. W.E. Newton, C.J. Nyman. – Washington: Wash, State Univ. Press, Pullman, 1976. P. 518–538.
16. Берестецкий О.А., Шерстобоев Н.К., Шерстобоева Е.В. [и др.] Модифицированный метод накопительных культур для выделения симбиотрофных азотфиксирующих микроорганизмов // *Микробиол. журн.* 1986. Т. 48, № 2. С. 85–88.
17. 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. Т. 71, № 4. С. 521–525.
18. Belimov A.A., Kunakova A.M., Khamova O.F. [et al.] Survival of associative bacteria on roots and efficiency of inoculation under various environmental conditions // *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*. Dordrecht etc. 1995. P. 751.
19. Експериментальна ґрунтова мікробіологія: монографія // наук. ред. Волкогон В.В. Київ: Аграрна наука, 2010. 464 с.
20. Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов / [под ред. Н.А. Красильникова]. – М.: Изд. МГУ. 1966. 216 с.
21. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги. – Минск: Колос, 1983. 296 с.
22. Белимов А.А. Взаимодействия ассоциативных бактерий с растениями: роль биотических и абиотических факторов // Saarbrücken: Palmarium Academic Publishing. 2012. 228 с. ISBN-13: 978-3-8473-9692-5.
23. Nagata M., Suzuki A. Effects of Phytohormones on Nodulation and Nitrogen Fixation in Leguminous Plants // *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*. Chapter 6. DOI: 10.5772/57267.
24. Kuan K.B., Othman R., Rahim K. A., Shamsuddin Z.H. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilization of maize under greenhouse conditions // *PloS One*. 2016. Vol.11. No. 3. P. e0152478. DOI: 10.1371/journal.pone.0152478
25. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта и др.; пер. с англ.: в 3 т. – М.: Мир, 1983. – Т. 2. – С. 29-31.

- 26.Скрипаль І.Г. Описи видів прокариотів: проблема, вимоги, шляхи вирішення // Мікробіологічний журнал. 2005. Т. 67. № 6. С. 3–11.
- 27.Смирнов В.В. Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas* // Киев: Наукова думка, 1990. – 264 с.
- 28.Фосфатмобилизующие бактерии в агроценозах Крыма / под ред. Л.А. Чайковской.- Симферополь: ИТ»АРИАЛ», 2018. – 156 с.
- 29.Frankenberger W.T. Arshad M. Phytohormones in soil: microbial production and function // NewYork. Marcel Dekker. 1995. p.503
- 30.Патыка В.Ф., Наумов Г.Ф., Подоба Л.В. и др. Агроэкологическая роль азотфиксирующих микроорганизмов в аллелопатии высших растений // под ред. В.Ф. Патыки. – Киев:Основа, 2004. – 318 с.
- 31.Bulgarelli D., Garrido-Oter R., Münch P.C., Weiman A, Dröge J, Pan Y, McHardy A.C., Schulze-Lefert P. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley // Cell Host Microbe. 2015. V.17. No. 3. P.392–403.
- 32.Donn S., Kirkegaard J., Perera G., Richardson A.E., Watt M. Evolution of bacterial communities in the wheat crop rhizosphere // Environ Microbiol. 2015.V.17. Vol. 3. P. 610–621.
- 33.Основные достижения и перспективы почвенной метагеномики // Ред. Першина Е.В., Кутовая О.В., Когут Б.М., Андронов Е.Е. СПб. Информ-Навигатор, 2017. 288 с.
- 34.Ventura M., Sanchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F., van Sinderen D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2007. V. 71. No. 3. P. 495–548.
- 35.Манучарова Н.А., Власенко А.Н., Менько Е.В., Звягинцев Д.Г. Специфика хитинолитического микробного комплекса в почвах, инкубируемых при различных температурах // Микробиология. 2011. Т.80, №2. С.219-229.
- 36.Hartmann M., Frey B., Mayer J., Mäder P., Widmer F. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming // ISME J. 2015. Vol.9. No.5. P.1177-1194.
- 37.Fahrbach M., Kuever J., Remesch M., Huber B.E., Kämpfer P., Dott W., HollenderJ. Steroidobacter denitrificans gen. nov., sp. nov., a steroidal hormone degrading Gamma proteobacterium // Int J Syst Evol Microbiol. 2008. Vol.58. No. 9. P. 2215-2223. [https://doi: 10.1099/ijms.0.65342-0](https://doi.org/10.1099/ijms.0.65342-0). 56.
- 38.Gong Z.L., Zhang C.F., Jin R., Zhang Y.Q. Steroidobacter flavus sp. nov., a microcystin-degrading Gamma proteobacterium isolated from soil // Antonie Van Leeuwenhoek. 2016. Vol. 9. No. 8. P. 1073-1079. [https://doi: 10.1007/s10482-0160706-5](https://doi.org/10.1007/s10482-0160706-5).
- 39.Sakai M., Hosoda A., Ogura K., Ikenaga M. The growth of Steroidobacteragariperforans sp. nov., a novel agar-degrading bacterium isolated from soil, is enhanced by the diffusible metabolites produced by bacteria belonging to Rhizobiales. // Microbes Environ. 2014. Vol. 29. No. 1. P. 89-95.
- 40.Sharma V, Siedenburg G, Birke J, Mobeen F, Jendrossek D, Prakash T. Metabolic and taxonomic insights into the Gram-negative natural rubber

- degrading bacterium *Steroidobacterium oxidans* sp. nov., strain 35Y // PLoS ONE. 2014. Vol. 13. No. 5. P. e0197448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197448> 59.
41. Wei Y.J., Wu Y., Yan Y.Z., Zou W., Xue J., Ma W.R., Wang W., Tian G., Wang L.Y. High-through put sequencing of microbial community diversity in soil, grapes, leaves, grapejuice and wine of grapevine from China. PLoS One. 2018. Vol. 22 No. 13(3). P. e0193097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193097>.
 42. Navarrete A.A., Soares T., Rossetto R., Antonie van Veen J., Tsai S. M., Kuramae E.E. Verrucomicrobial community structure and abundance as indicators for changes in chemical factors linked to soil fertility // Antonie van Leeuwenhoek. 2015. Vol. 108. P. 741-752. DOI 10.1007/s10482-015-0530-3.
 43. Wei Z., Hu X., Li X., Zhang Y., Jiang L., Li J., et al. The rhizospheric microbial community structure and diversity of deciduous and evergreen forests in Taihu Lake area, China. // PLoS ONE. 2017. Vol. 12. No. 4. P. e0174411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174411>.
 44. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics 2014. Vol. 30. P. 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
 45. Slater S.C., Goodner B.W., Setubal J.C., Goldman B.S., Wood D.W., Nester E.W. The *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*. 2008. P. 149-181. doi.org/10.1007/978-0-387-72290-0_4
 46. Фунг Тхи Ми, Манучарова Н.А., Степанов А.Л., Поздняков Л.А., Селицкая О.В., Емцев В.Т. *Agrobacterium tumefaciens* – ассоциативная азотфиксирующая бактерия // Вестн. моск. ун-та. Сер. 17. Почвоведение. 2015. № 3. С. 50-55.
 47. Schloter M. et al. Microbial indicators for soil quality // *Biology and Fertility of Soils*. 2018. Т. 54. №. 1. С. 1-10.
 48. Hui C., Sun P., Guo X., Jiang H., Zhao Y., Xu L. Shifts in microbial community structure and soil nitrogen mineralization following short-term soil amendment with the ammonifier *Bacillus amyloliquefaciens* DT // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2018. Vol. 132. P. 40–48. DOI: 10.1016/j.ibiod.2018.05.008.
 49. Круглов Ю.В. Микробное сообщество почвы: физиологическое разнообразие и методы исследования // *Сельскохозяйственная биология*. 2016. Т. 51. № 1. DOI: 10.15389/agrobiology.2016.1.46rus.
 50. Гонтарев С.А., Смирнов С.В. Биотехнология культивирования азотфиксирующих почвенных микроорганизмов. Барнаул. 2020. 48 с.
 51. Кириченко Е., Титова Л., Коць С. Эффективность бактеризации семян пшеницы яровой новым штаммом *Azotobacter chroococcum* T79 // *Stiinta agricola*. 2017. № 1. С. 21–24.
 52. Alvarez A., Saez J.M., Costa J.S.D., Colin V.L., Fuentes M.S., Cuozzo S.A., Amoroso M.J. Actinobacteria: current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals // *Chemosphere*. 2017. Vol. 166. P. 41–62. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.070.

53. Shirokikh I. G. et al. Effects of tillage technologies and application of biopreparations on micromycetes in the rhizosphere and rhizoplane of spring wheat // *Eurasian soil science*. 2017. Т. 50. №. 7. С. 826-831.
54. Завьялова Н.Е., Васбиева М.Т., Фомин Д.С. Микробная биомасса, дыхательная активность и азотфиксация в дерново-подзолистой почве предуралья при различном сельскохозяйственном использовании // *Почвоведение*. 2020. № 3. С. 372-378. DOI: 10.31857/S0032180X20030120.
55. Lu X., Seuradje B.J., Neufeld J.D. Biogeography of soil Thaumarchaeota in relation to soil depth and land usage // *FEMS microbiology ecology*. 2017. Т. 93. №. 2. С.246.
56. Polti M.A. et al. Simultaneous bioremediation of Cr (VI) and lindane in soil by actinobacteria // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2014. Т. 88. С. 48-55.
57. Gupta A. et al. Low-abundance members of the Firmicutes facilitate bioremediation of soil impacted by highly acidic mine drainage from the Malanjkhanda copper project, India // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – Т. 9. – С. 2882.
58. Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H.P., Clement C., Ouhdouch Y., Wezel G.P. van. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016. V. 80. No. 1. P. 1-43
59. Simmons C.W., Higgins B., Staley S., Joh L.D., Simmons B.A., Singer S.W., Stapleton J.J., VanderGheynst J.S. The role of organic matter amendment level on soil heating, organic acid accumulation, and development of bacterial communities in solarized soil // *Applied Soil Ecology*. 2016. V. 106. P. 37-46.
60. Bonanomi G., Filippis F., Cesarano G., Stora A., Ercolini D., Scala F. Organic farming induces changes in soil microbiota that affect agro-ecosystem functions // *Soil Biology and Biochemistry*. 2016. V. 103. P. 327-336.
61. Lewin, G.R. Evolution and ecology of *Actinobacteria* and their bioenergy applications / G.R. Lewin et al. // *Annual review of microbiology*. 2016. Vol. 70. P. 235–254. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095748>
62. Li G. Roles of non-ionic surfactant sucrose ester on the conversion of organic matters and bacterial community structure during composting / G. Li et al. // *Bioresource Technology*. 2020. P. 123279. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123279>
63. Kavamura V.N. Inorganic nitrogen application affects both taxonomical and predicted functional structure of wheat rhizosphere bacterial communities / V.N. Kavamura et al. // *Frontiers in microbiology*. 2018. Vol. 9. P. 1074. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01074>
64. Гоголев Ю.В., Сайганова М.А., Бойцова М.Д., Балкин А.С., Горшков В.Ю. Метагеномные и метатранскриптомные исследования патоккомплексов растений // Сборник тезисов IV он-лайн школы-конференции для молодых ученых «Молекулярно-генетические и клеточные аспекты растительно-микробных взаимодействий». Санкт-Петербург, 2020. С. 6.

65. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. The Family Chitinophagaceae // The Prokaryotes. Springer, Berlin, Heidelberg. 2014. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_137.
66. Aleksandrovich G. D., Gennadievich Y. I. Comparative analysis of prokaryotic communities associated with conventional croplands and fallow lands // European science review. 2018. No. 5-6.
67. Meena M. et al. PGPR-mediated induction of systemic resistance and physiochemical alterations in plants against the pathogens: Current perspectives // Journal of Basic Microbiology. 2020. V. 60. No. 10. P. 828-861.
68. Ortiz-Cornejo N.L. et al. Incorporation of bean plant residue in soil with different agricultural practices and its effect on the soil bacteria // Applied Soil Ecology. 2017. V. 119. P. 417-427.
69. Cutiño-Jiménez A. M. et al. Protein signatures to identify the different genera within the Xanthomonadaceae family // Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]. 2020.
70. Roquigny R. et al. Pseudomonadaceae: From biocontrol to plant growth promotion // Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation. Springer, Singapore. 2017. P. 39-68.
71. Maheshwari D.K., Dheeman S., Agarwal M. Phytohormone-producing PGPR for sustainable agriculture // Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem. Cham. 2015. P. 159-182.
72. Game B.C., Ilhe B.M., Pawar V.S., Khandagale P.P. Effect of Azotobacter, phosphate solubilizing bacteria and potashmobilising bacteria in inoculants on productivity of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2020. Vol. 9. No. 3. P. 2800–2807. DOI: 10.20546/ijcmas.2020.903.322.
73. Налбандян А.А., Безлер Н.В., Черепухина И.В. ПЦР-идентификация гена азотфиксации *nifH* у *Azotobacter sp.* // Сахар. 2019. № 9. С. 7–9.
74. Sumbul A., Ansari R.A., Rizvi R., Mahmood I. *Azotobacter*: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management // Saudi Journal of Biological Sciences. 2020. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.08.004.
75. Шерстобоев М.К., Мельничук Т.М., Мельник Л.І. Методичні аспекти вивчення асоціативності бактерій до рослин пшениці та ячменю // Сільськогосподарська мікробіологія: міжвідомчий тематичний науковий збірник. 2005. №3. С.34–41.
76. Mantelin, S., Touraine B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impact on root development and nitrate uptake // J. Exp. Bot. 2004. Vol. 55. P. 27-34.
77. Красильников Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения. М.: Изд-во АН СССР, 1958. 181с.
78. Теппер Е.З. Практикум по микробиологии: учебное пособие для вузов / Е.З. Теппер, В.К., Шильникові, Г.И. Переверзева [ред. Шильниковой В. К.] – 6-е изд. перераб. и доп. – М.: Дрофа, 2005. – 256 с.
79. Шерстобоев Н.К. Мельничук Т.Н. Методологический подход к изучению ассоциативных микроорганизмов // Вестник Одесского национального университета. 2005. Т. 10, № 7. С. 311–315.

- 80.Скрипаль І.Г. Описи видів прокариотів: проблема, вимоги, шляхи вирішення // Мікробіологічний журнал. 2005. Т. 67. № 6. С. 3–11.
- 81.Определитель бактерий Берджи: 9-е изд. 2-х томах / [под ред.Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса; пер. с англ. под ред. Г. А.Заварзина]. – М.: Мир, 1997.– Т.1.– 432 с.
- 82.Kanvinde L. Sastry G.R.K. *Agrobacterium tumefaciens* Is a Diazotrophic Bacterium // Applied and Environmental microbiology. 1990. Vol. 56. №7. P. 2087-2092.
- 83.Dixon R., Kahn D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation // Nat. Rev. Microbiol. 2004. Vol. 2. P. 621- 631.
- 84.Игнатов, В.В. Биологическая фиксация азота / Игнатов В.В. // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 9. С. 28-33.
- 85.Коць С.Я., Моргун В.В., Патыка В.Ф., Маличенко С.М. та ін. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобияльный симбиоз // монография: в 4-х т. Т.2. К.: Логос. 2011. 523 с.
- 86.Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация. М.: Наука. 1986. С. 133.
- 87.Мельничук Т.М. Чайковська Л.О., Каменєва І.О, Якубовська А.І., Лолойко О.А. Фізіолого-біохімічні аспекти взаємодії біоагентів мікробних препаратів та рослин // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені В.Гнатюка. Серія:біологія. 2014. Т. 3. № 60. С. 134 – 138 с.
- 88.Методологія і практика використання мікробних препаратів у технологіях вирощування сільськогосподарських культур / [Волкогон В.В., Заришняк А.С., Гриник І.В., Бердников О.М. та ін.] – К.: Аграрна наука, 2011. – 156 с.
- 89.Okon Y., Labandera-Gonzalez C. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years world wide field inoculation experiments // Soil. Biol. Biochem. 1994. Vol. 26. P. 1591-1601.
- 90.Naiman A.D., Latro'nico A., Ines Garcı'a de Salamone. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact on the production and culturable rhizosphere microflora // European Journal of Soil Biology. 2009. Vol 45. P. 44 – 51.
- 91.Rodriguez H., Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion // Biotech. Adv. 1999. Vol. 17. P. 319339.
- 92.Патика В.П., Макаренко Н.А. Концепція сталого розвитку агроєкосистем в Україні на період до 2025 р. // Вісник аграрної науки Причорномор'я. 2003. Вип. 3. № 23. С. 144–149.
- 93.Умаров М.М. Кураков А.В., Степанов А.Л. Микробиологическая трансформация азота в почве / М.: ГЕОС. 2007. 138 с.
- 94.Волкогон В.В., Хальчинский А.Е., Миняйло В.Г. и др. Азотфиксирующие микроорганизмы корневой зоны райграса и костреца // Микробиол. Ж. 1991. Т. 53. № 6. с. 3-10.
- 95.Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв / М.: ИКЦ „Академкнига”, 2002. 282 с.

96. Лукин С.А., Кожевин П.А., Звягинцев Д.Г. Азоспириллы и ассоциативная азотфиксация у небобовых культур в практике сельского хозяйства // Сельскохозяйств. Биол. 1987. № 1. С. 51-58.
97. Мордухов Е.А., Скворцова Н.П., Кочетков В.В. и др. Синтез фитогормона индолил-3-уксусной кислоты ризосферными бактериями рода *Pseudomonas* // Микробиология. 1991. Т.60. № 3. С.494 -500
98. Bibikova T., Gilroy S. Root hair development // J. Plant Growth Regul. 2002. Vol. 21. P. 383–415.
99. Boonjawat J., Chaisiri P., Limpananont J. et al. Biology of nitrogen-fixing rhizobacteria II Nitrogen Fixation I Proceedings V Int. Symp. Of Nitrogen Fixation with non-legumes. Florence, Italy. 1990. P.97-103.
100. Elmerich C, Zimmer W., Vieille C Associative nitrogen-fixing bacteria II // In: Biological Nitrogen fixation I Stacey G., Burriss R.H., Evans H.J. (eds.). 1992. Chapman & Hall: London. P. 212-259.
101. Vessey J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers II // Plant Soil. 2003. V. 255. – P. 571-586.
102. Воробьев Н.В., Скаженник М.А., Пшеницына Т.С. Формирование продуктивности метелки у сортов риса на разных фонах минерального питания // Сб. науч. тр. Эволюция научных технологий в растениеводстве: Биотехнология. Краснодар. 2004. Т.3. С. 234-239.
103. Кравченко Л.В. Роль корневых экзометаболитов в интеграции микроорганизмов с растениями: автореф. дис. на соискание ученой степени докт. биол. наук: спец. 03.00.07 „Микробиология” / Л. В. Кравченко. М.: МГУ, 2000. 45 с.
104. 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. С. 133-143.
105. Frankenberger W.T., Arshad M. Phytohormones in soils: production and function // New York. 1995. 503 p.
106. Shewky B.T. Effect of Azotobacters and Azospirilla on germination of seeds of some agricultural crops // Zbl. Microbiol. 1990. Vol. 145, No. 3. P. 209 -217.
107. Tien T., Gaskina M., Habbell D. Plant Growth Substances Produced by *Azospirillum brasilense* and Their Effect on the Growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.) // Appl. Envir. Microbiol. 1979. Vol. 37. N 5. P. 1016-1024.
108. Берестецкий О.А. Методы определения токсичности почв // Микробиологические и биохимические исследования почв // К.: Урожай, 1971. С.239-243.
109. De Werra P., Pichy-Tarr M., Keel C., Maurhofer M. Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 4162–4174.
110. Боронин А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 109. С. 25-31.

111. Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Botina S.G., Netrusov A. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin // Microbiological research. 2007. Vol. 162. № 1. P. 69-76.
112. Pandey A., Shenda S.T., Apte R.G. Effect of Azotobacter chroococcum seed inoculation on its establishment in rhizosphere, on growth and yield attributing parameters of cotton // Zbl. Microbiol. 1991. Vol. 26, No. 4. P. 542-545.
113. Архипова Т.Н., Веселов С.Ю., Кудояров Г.Р. Влияние цитокинин продуцирующих микроорганизмов на рост салата при различном уровне их водообеспечения // Агрехимия. 2003. № 5. С. 36 – 41.
114. Емцев В.Т. Ассоциативный симбиоз почвенных diaзотрофных бактерий и овощных культур // Почвоведение. 1994. № 4. С. 74-84.
115. Каменев С.В., Муромец Е.М. Генетический контроль процессов взаимодействия бактерий с растениями в ассоциациях // Генетика. 1999. Т. 35. № 4. С. 1480 – 1494.
116. Цавкелова Е.А., Александрова А.В., Чердынцева Т.А., Коломейцева Г.Л., Нетрусов А.И. Ассоциативные микромицеты тропических вьетнамских орхидей // Микология и фитопатология. 2005. Т. 39, № 1. С. 46-52.
117. Lebuhn M., Heulin T., Hartmann A. Production of auxin and other phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots // FEMS Microbiol. Ecol. 1997. Vol. 22, № 4. P. 325.
118. Кацы Е.И. Молекулярно-генетические процессы, влияющие на ассоциативное взаимодействие почвенных бактерий с растениями / Под ред. В.В. Игнатова // Саратов: Сарат. ун-та, 2003. С. 17.
119. Costacurta A., Vanderleyden J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria // Crit. Rev. Microbiol. 1995. Vol. 21. № 1. P. 1-18.
120. Leveau, J.H.J., Lindow S.E. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290 // Appl. Environ. Microbiol. 2005. Vol. 71 № 5. P.: 2365-2371.
121. Somers E., Ptacek D., Gysegon P., Srinivasan M., Vanderleyden Z. *Azospirillum brassilense* produces the auxin like phenylacetic acid bu using the key enzyme for indol-3-acetic acid biosynthesis // Appl. and Environ. Microbiol. 2005. Vol. 71. № 4. P. 1803 – 1830.
122. Yasmin, S., Baker M.A.R., Malik K.A., Hafeez F.Y. Isolation, characterization and beneficial effects of rice associated plant growth promoting bacteria from Zanzibar // J. Basic Microbiol. Vol. 44. № 3. P. 241-252.
123. Попов Ф.А., Чикилева А.Е., Коломиец Э.И. Фитозащитное и ростстимулирующее действие бактерий *Bacillus subtilis* 12А в условиях лабораторных и полевых опытов // Междунар. конф. Минск, 26-28 мая, 2004. С. 375-377
124. Чайковская Л.А., Баранская М.И. Бактерия *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 – продуцент физиологически активных веществ // Биологические препараты в растениеводстве: материалы меж- дунар. конф. Radostim. Киев, 10-13 июня, 2008. С. 61-62.
125. Jiang F., Chen L., Belimov A.A., Shaposhnikov A.I., Gong F., Meng X., Hartung W., Jeschke D.W., Davies W.J., Dodd I.C. Multiple impacts of the plant

- growth-promoting rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2 on nutrient and ABA relations of *Pisum sativum*// J. Exp. Botany. 2012. Vol. 63. No 18. P. 6421-6430.
126. Широкова Н.П. Физиологические особенности засухоустойчивости яровой пшеницы и роль фитогормонов в её регуляции у сортов Росинка и Омская 23. Автореф. диссертации на соискание ученой степени к.б.н., Красноярск, 2012. 18 с.
 127. Maltseva N.N., Nadkernichnaya E.V., Kanivets N.A. Associations of nitrogenfixing bacteria with winterrue // Proceedings of the 10 th International Congress of Nitrogen Fixation “Nitrogen Fixation: Fundamental and Applications”, St. Petersburg, Russia, 1995. Kluwer Academic Publisher. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. 1995. Vol. 27. P. 769.
 128. Мельничук Т.Н., Патика В.Ф., Осенний Н.Г. Некоторые аспекты эффективного использования биопрепаратов при выращивании овощных культур // Нетрадиционное растениеводство, экология и здоровье: мат-лы 7 Междунар. научно-практ. конф. Симферополь, 1998. С. 441-442.
 129. Пархоменко Т.Ю. Интродукция штаммов рода *Bacillus* в ризосферу капусты // Научные записки Тернопольского национального педагогического университета им. Владимира Гнатюка. Серия: Биология. 2007. №2 (32). С. 101—103 (укр.).
 130. Shewky V.T. Effect of Azotobacters and Azospirilla on germination of seeds of some agricultural crops// Zbl. Microbiol. 1990. Vol. 145, No. 3. P. 209 -217.
 131. Хотянович А.В. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применения препаратов на их основе // Метод.реком. Л.-1991. 60 с.
 132. Хотянович А.В. Микробные препараты: технология их производства и применения в растениеводстве // 9-й Баховский кол. по азотфиксации Москва, 24 - 26 января, 1995. Тез. докл. Пушино, ОНТИ ПНЦ РАН. 1995. С. 101.
 133. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малащенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез эндополисахаридов на C1-C2 соединениях // Киев: Наук. думка. 1992. 212с.
 134. Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов // Киев: Наукова думка.1982. 182с.
 135. Шлегель Г. Общая микробиология.- М.:Мир, -1987.-566 с.
 136. Дудинова І.О. Розробка технології виробництва та застосування біопрепаратів азот фіксуючих бактерій під рис і сою (Автореф. дис. канд. с.-г. наук). –Київ, 1997. – 24.
 137. Патика В.П., Мельничук Т.М., Шерстобоев М.К., Каменева І.О., Шерстобоева О.В., Грітчина Л.Ю. Спосіб одержання гелічних препаратів на основі азотфіксуючих бактерій-продуцентів екзополісахаридів. Декл. Пат. України на винахід № 56032 А. Опубл. 15.04.2003. Бюл. №4.
 138. Шерстобоева Е.В. Дудинова И.А., Шерстобоев Н.К. Биопрепараты азотфиксирующих бактерий: Проблемы и перспективы применения // Мікробіол. журн. 1997. Т. 59, № 4. С. 109–117.

139. Knosel D.H. Prüfung von bakterien auf Fähigkeit zur Stembildung // Zentralbl Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten Hygiene. 1962. Vol. 116. P. 79–100
140. Баймиев Ал. Х., Баймиев Ан. Х., Губайдуллин И. И., и др. В клубеньках эспарцета песчаного обнаружены бактерии, близкие по гену 16S рРНК к *Phyllobacterium trifolii* // Генетика. 2007. Т. 43. №5. С. 716–719.
141. Mergaert J., Snockaert M.C., Swings J. *Phyllobacterium myrsinacearum* (subjective synonym *Phyllobacterium rubiacearum*) emend // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. Vol. 52 (Pt 5). P. 1821–1823.
142. Патент №2649362 Якубовская А.И., Мельничук Т.Н., Каменева И.А., Белимов А.А. Штамм ассоциативных бактерий *Phyllobacterium ifriqiense* 6, активный азотфиксатор и ростстимулятор для повышения продуктивности риса. https://patents.s3.yandex.net/RU2649362C1_20180402.pdf
143. Кірюянц М.О., Пати́ка Т.І., Пати́ка М.В. Філогенетичний аналіз домінантних мікроорганізмів родів *Bacillus* і *Phyllobacterium*, ізольованих з ризосфери ячменю ярого // Вісник аграрної науки. 2020. № 5 (806). С.48–53.
144. Баймиев А.Х., Иванова Е.С., Гуменко Р.С., Чубукова О.В., Баймиев А.Х. Анализ влияния ризосферных бактерий *Phyllobacterium sp.* штамма СА8 на урожайность бобовых культур // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15. № 3–5. С. 1559–1562.
145. Кольцов А.В., Титков А.А., Сычевский М.Е., Барило В.Н., Макушин А.В. Агроэкологическая обстановка и перспективы развития рисосеяния на юге Украины. — Симферополь, 1994г: Красноперекопская межрайонная типография. 225 с.
146. Воробьев Н.В., Скаженник М.А., Пшеницына Т.С. Формирование продуктивности метелки у сортов риса на разных фонах минерального питания // Сб.науч.тр. Эволюция научных технологий в растениеводстве. Краснодар. 2004. Т.3: Биотехнология. С. 234-239.
147. Зеленский Г.Л., Макунду А. Влияние слоя воды на продуктивность сортов риса//Сб.науч.тр. Эволюция научных технологий в растениеводстве. Краснодар. 2004. Т.3: Биотехнология. С. 245-248.
148. Титков А.А., Кольцов А.В. Эволюция рисовых ландшафтно-мелиоративных систем Украины. – Симферополь: СОНАТ, 2007. – 308 с.
149. Вожегова Р., Вожегов С., Якуб В. Рис в Україні: сьогодні та перспективи // Пропозиція. 2005. № 12. С. 50-52 ГРНТИ.
150. Болдырева Л.Л. Сорго перспективная культура/Болдырева Л.Л., Бондаренко В.П.//Крымский агротехнологический университет. Специальный выпуск. № 6. 2007.
151. Авдеев Ю.И. Ресурсосберегающие основы орошаемого земледелия /Ю.И. Авдеев и др. – Астрахань: Нова, 2003. 337 с.
152. Катков В.А. О ситуации на мировом рынке семян // Селекция и семеноводство. 1999. № 1. С. 42-45.
153. Щербаков В.Я. Зерновое сорго // Киев; Одесса: Вища школа. 1983. 192 с.
154. Пронько В.В. Удобрения под сорго // Кукуруза и сорго. 1992. № 2. С.38–39.

155. Олексенко Ю.Ф., Красненков С.В. Сроки и способы внесения удобрений // Кукуруза и сорго. 1988. № 1. С. 27–28.
156. Оптимізація мікроелементного живлення сільськогосподарських культур: рекомендації / За ред. А. І. Фатєєва. – [2-е вид.]. – Харків, 2012. – 38 с. (НААНУ; ННЦ «Ін-т ґрунтознавства та агрохімії ім. О. Н. Соколовського»).
157. Пергаев О.А., Алексеенко Н.В. Микробные препараты как фактор повышения продуктивности посевов сорго зернового *Sorghum bicolor* (L.) Moench. // Евразийский Союз Ученых (ЕСУ). 2014. № 8. С.94-96
158. Пергаев О.А., Каменева Ш.О., Паштецкий В.С., Алексеенко Н.В. Мікробні препарати, хелатні мікродобрива, гуміновий препарат торфовит в технології вирощування зернового сорго» Підвищення продуктивності сорго зернового в умовах Криму (Методичні рекомендації), Сімферополь, 2014. – 51 с.
159. Day J.M., Neves V.C., Dobereiner J. Nitrogenase activity on the roots of tropical forage grasses // Soil Biol. And Biochem. 1978. Vol. 12. No. 7. P.71-84.
160. Чеботарь В. К. Ассоциативная азотфиксация в ризосфере сорго / В. К. Чеботарь, В. Н. Малиновский // Вестник сельскохозяйственной науки. 1989. № 10. С. 106–110.
161. Сидоренко О.Д. Азотфиксирующие микроорганизмы затопляемых почв под рисом // Известия ТСХА. 2012. Вып.1. С.181 – 184.
162. Паштецкий В.С., Невкрытая Н.В., Мишнев А.В., Назаренко Л.Г. Эфиромасличная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра: 2-ое издание, дополненное. Симферополь: ИТ «АРИАЛ». 2018. 320 с.
163. Тихонович И.А., Круглов Ю.В. Биопрепараты в сельском хозяйстве. Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве. М.: ВНИИСХМ, 2005. 154 с.
164. Dodd I. C., Zinovkina N. Y., Safronova V. I. et al. Rhizobacterial mediation of plant hormone status // Annals of Applied Biology. 2010. Vol. 157. P. 361–379.
165. Шерстобоев Н. К., Мельничук Т.Н. Методологический подход к изучению ассоциативных микроорганизмов // Вестник Одесского национального университета. 2005. Т. 10. Вып. 7. С. 311-3154.
166. Singh S., Kate B.N., Banerjee U.C. Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview // Critical Reviews in Biotechnology. 2005. Vol. 25. P. 73-95.
167. Volk R.B., Furkert F. Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth // Microbiol. Res. 2006. Vol. 161. P. 180-186.
168. Abdel-Hafez S.I.I., Abo-Elyousr K.A.M., Abdel-Rahim I.R. Fungicidal activity of extracellular products of cyanobacteria against *Alternaria porri* // Eur. J. Phycol. 2015. Vol. 50. P. 239–245.
169. Senhorinho G.N.A., Ross G.M., Scott J.A. Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as potential sources and antibiotics // Phycologia. 2015. Vol. 54. P. 271-282.

170. Shishido T.K., Humisto A., Jokela J., Liu L., Wahlsten M., Tamrakar A., Fewer D.P., Permi P., Andreote A.P.D., Fiore M.F., Sivonen K. Antifungal compounds from cyanobacteria. *Mar. Drugs*, 2015. Vol. 13, No. 4. P. 2124-2140.
171. Thajuddin N., Subramanian G. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology // *Curr Sci*. 2005. Vol. 89, No. 1. P. 47-57.
172. Chen Z. Effects of three pesticides on the growth, photosynthesis and photoinhibition of the edible cyanobacterium Ge-Xian-Mi (*Nostoc*) // Chen Z., Juneau P., Qiu B. (eds.). *Aquatic Toxicol.* 2007. Vol. 81. P. 256–265.
173. Barka A., Blecker C. Microalgae as a potential source of single-cell proteins. A review // *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2016. Vol. 20, No. 3. P. 427-436.
174. Abed R.M.M., Dobretsov S., Sudesh K. Applications of cyanobacteria in biotechnology // *Journal of Applied Microbiology*. 2009. Vol. 106. P. 1-12.
175. Sergeeva E., Liaimer A., Bergman B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria // *Planta*. 2002. Vol. 215. P. 229-238.
176. Rodríguez A.A., Stella A.M., Storni M.M. et al. Effects of cyanobacterial extracellular products and gibberellic acid on salinity tolerance in *Oryza sativa* L. // *Saline Systems*. 2006. No 2. P. 7-10.
177. Prasanna R., Nain L., Tripathi R. et al. Evaluation of fungicidal activity of extracellular filtrates of cyanobacteria – possible role of hydrolytic enzymes // *J. Basic Microbiol.* 2008. No. 48. P. 86-94.
178. Домрачева Л.И. Потенциал цианобактерий в биомониторинге состояния почвы и становлении ее супрессивности // *Вестник Института биологии Коми Научного центра Уральского отделения РАН*. 2012. № 3. С. 22-28.
179. Ali I., Basit M.A. Significance of hydrogen content in fuel combustion // *J. Hydrogen Energy*. 1993. V. 18. P. 1009–1011.
180. Angermayr S.A., Hellingwerf K.J., Lindblad P., De Mattos M.J. Energy biotechnology with cyanobacteria // *Curr. Opin. Biotech.* 2009. Vol. 20. No. 3. P. 257–263.
181. Дидович С.В., Москаленко С.В., Темралева А.Д., Хапчаева С.А. Биотехнологический потенциал почвенных цианобактерий (обзор) // *Вопросы современной альгологии*. 2017. № 2 (14). URL: <http://algology.ru/1170>
182. Голлербах М.М., Штина Э.А. Почвенные водоросли. – Л.: Наука, 1969. – 227 с.
183. Штина Э.А., Голлербах М.М. Экология почвенных водорослей. – М.: Наука, 1976. – 143 с.
184. Temraleeva A.D., Dronova S.A., Moskalenko S.V., Didovich S.V. Modern methods for isolation, purification, and cultivation of soil cyanobacteria // *Microbiology*. 2016. Vol. 85. No. 4. pp. 389-399. doi: 10.1134/S0026261716040159
185. Панкратова Е.М., Зяблых Р.Ю., Калинин А.А., Ковина А.Л., Трефилова Л.В. Конструирование микробных культур на основе синезеленой водоросли *Nostoc paludosum* Kütz. // *Альгология*. 2004. Т. 14. № 4. С. 445-458.

186. Трефилова Л.В. Использование цианобактерий в агробиотехнологии: автореф. канд. биолог. наук. – Саратов, 2008. – 26 с.
187. Домрачева Л.И., Трефилова Л.В., Третьякова А.Н., Гребнева О.И., Дудолодова Г.М. Биологическая защита сеянцев от болезней в питомниках // Видякина А.И., Ашихминой Т.Я., Новоселова С.Д. (ред.). Леса Кировской области. – Киров: ОАО «Кировская областная типография», 2008. – С. 292-299.
188. Зяблых Р.Ю. Консорциумы микроорганизмов на основе почвенных азотфиксирующих цианобактерий и их агробиотехнологический потенциал: автореф. дисс. канд. биол. наук. – Киров, 2008. – 175 с.
189. Баймаханова Г.Б. Получение активных штаммов азотфиксирующих цианобактерий различных экосистем и их применение в агробиотехнологии: дисс. докт. философии. – Алматы, 2014. – 103 с.
190. Svetlana Didovich, Tatiana Gorgulko, Alexander Didovich "Control of productivity of agrosenosis"// BIO Web of Conferences 17, 00138 (2020)
191. Патыка В.Ф., Андреева Н.А. Штамм цианобактерий *Nostoc muscorum* f. *linckia* (Roth) Born et. Flash 28-1 106 (коллекция ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии) активный несимбиотический азотфиксатор.
192. Андреева Н.А. Азотфиксирующие цианобактерии в ризосфере риса и их влияние на урожай растений : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07. – Л., 1990. – 19 с.
193. Kaushik B.D. Developments in Cyanobacterial Biofertilizer // Proc. Indian. Natn. Sci. Acad. 2014. Vol. 80, No. 2. P. 379–388
194. Prasanna R. et al. Evaluating the potential of rhizo-cyanobacteria as inoculants for rice and wheat // Journal of Agricultural Technology. 2012. Vol. 8, iss. 1. P. 157–171
195. Saadatnia H., Riahi H. Cyanobacteria from paddy fields in Iran as a biofertilizer in rice plants // Plant Soil Environ. 2009. Vol. 55, No. 5. P. 207–212
196. Karthikeyan N. et al. Evaluating the potential of plant growth promoting cyanobacteria as inoculants for wheat // European Journal of Soil Biology. 2007. Vol. 43, iss. 1. P. 23–30;
197. Fadl-Allah E.M. et al. In vitro creation of artificial nitrogen fixing Cyanobacterium (*Nostoc muscorum*) association with wheat // African Journal of Microbiology Research. 2011. Vol. 5. No 3. P. 302–310
198. Al-Khiat S.H. Effect of cyanobacteria as a soil conditioner and biofertilizer on growth and Some biochemical characteristics of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings // Tesis de M. Sc., Dept. Botany and Microbiology, King Saud Univ., Arabia Saudita. 2006. 191 p.
199. Трефилова Л.В., Патрушева М.Н. Эффективность использования цианоризобияльного консорциума при выращивании гороха посевного // Теоретическая и прикладная экология. 2009. № 3. С. 67–75
200. Зяблых Р.Ю. Консорциумы микроорганизмов на основе почвенных азотфиксирующих цианобактерий и их агробиотехнологический потенциал: дисс. канд. биол. наук. Киров. 2008. 175 с.

201. Методические указания по идентификации неспорных бактерий, доминирующих в ризосфере растений / [Составители: Ю.М.Возняковская, Ж.П.Попова]. – Л., 1995. – 48 с.
202. Методическое пособие по почвенной микробиологии / [Составитель: Т.П.Боровикова]. – Кривой Рог, 2003. – 68 с.
203. Определитель бактерий Бержи в 2-х т. / [Под ред. Дж.Хоулта, Н. Крига и др.]. – М.: Мир, 1997. – Т.1. – 432 с.
204. Определитель бактерий Бержи в 2-х т. / [Под ред. Дж.Хоулта, Н. Крига и др.]. – М.: Мир, 1997. – Т.2. – 368 с.
205. Толкачёв Н.З. Модифицированный метод определения количества клубеньковых бактерий сои в почве // Труды ВНИИСХМ.- Л., 1990. – С. 37 – 50.
206. Методы исследований клубеньковых бактерий / Методические рекомендации для курсов повышения квалификации научных сотрудников по сельскохозяйственной микробиологии / Под ред. Л.М. Доросинского – Л. – 1981.- 48 с.
207. Коллекции ACSSI Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://acssi.org/index.php?option=com_content&view=article&id=66 (дата обращения 16.12.2020).
208. Хапчаева С.А., Дидович С.В., Топунов А.Ф., Мулюкин А.Л., Зотов В.С. Специфичность симбиотических взаимодействий бактерий рода *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* с растениями трибы *Viciae* // Экологическая генетика. 2018. Т. 16. № 4. С. 51-60.
209. Yadov N.K., Vyas B.R. Effects of salts and pH on the growth of *Rhizobium* strains / *Indian J. Microbiology*. Vol. 11. №1-2, 1971. p. 97-102.
210. Дидович С.В., Мальцева І.А. Ефективність застосування альгобактериального консорциуму при вирощуванні бобових культур // Биологический вестник Мелитопольского государственного педагогического университета им. Богдана Хмельницкого. 2012. Т. 2. № 2. С. 58–66.
211. Методи біологічних і агрохімічних досліджень рослин і ґрунтів /З.М. Грицаєнко, А.О. Грицаєнко, В.П. Карпенко. – К.: ЗАТ „НІЧЛВА”, 2003. – 320 с.
212. Дидович С.В., Горгулько Т.В. «База данных биологических показателей управления продуктивностью агроценозов / Database of Biological indicators of control of agrocenosis productivity» Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2019622407, заявка №2019622397, дата госрегистрации в реестре баз данных 18.12.2019.
213. Zhao L., Sakai K. Peroxidases are involved in biosynthesis and biodegradation of P-thujaplicin in fungal elicitor-treated *Cupressus lusitanica* cell cultures // *NewPhytopath*. 2003. Vol. 159. P.719-731.
214. Максимов В.И., Черепанова Е.А. Про-Антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам // *Успехи совр. биол.* 2006. Т.126(3). С.250-261.

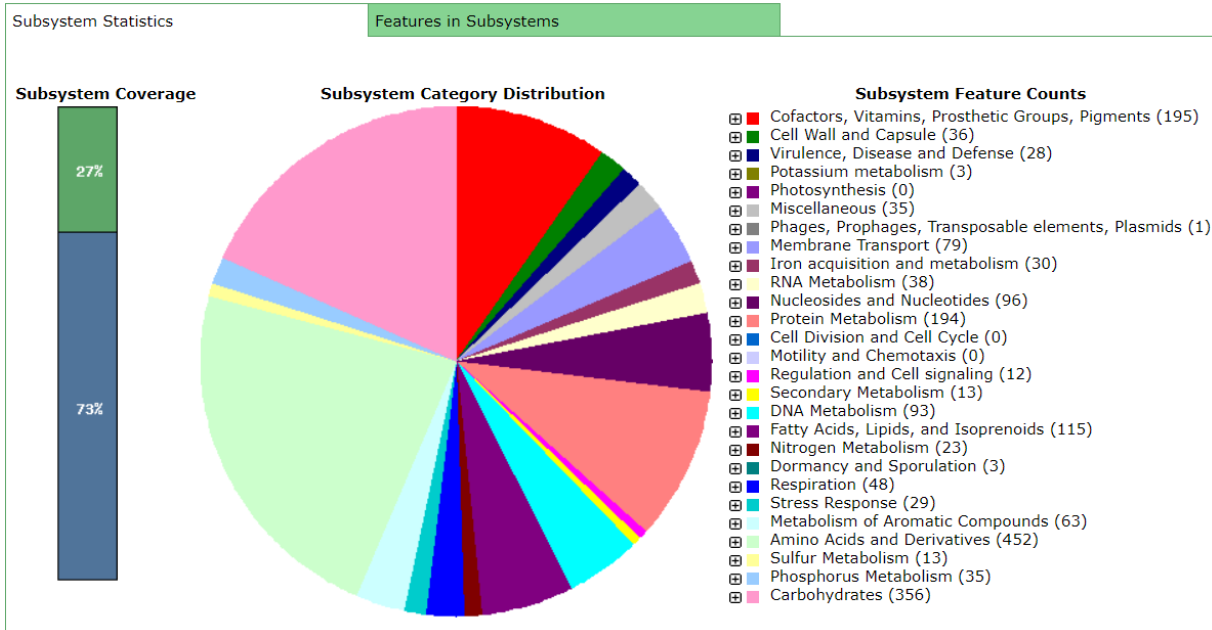
ПРИЛОЖЕНИЕ А

Коэффициенты главных компонент на уровне рода, рассчитанных по доле отдельных существующих ОТЕ из ризосферы пшеницы сортов Багира и Ермак и трех мест отбора, и их принадлежность к высшим систематическим таксонам

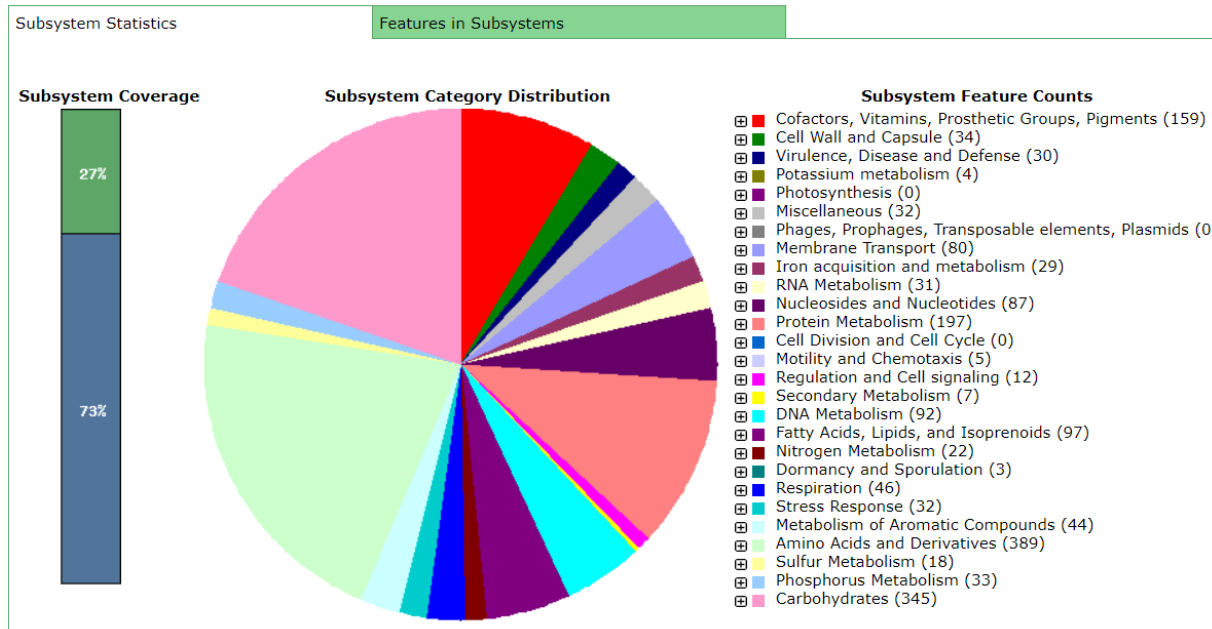
Фила	Класс	Порядок	Семейство	Род	PC 1	PC 2
Unassigned	Unassigned	Unassigned	Unassigned	Unassigned	-0,02048	0,22227
Crenarchaeota	Thaumarchaeota	Nitrososphaerales	Nitrososphaeraceae	Candidatus Nitrososphaera	0,18462	0,12587
Acidobacteria	Acidobacteria-6	iii1-15	mb2424	NA_24	-0,08749	0,10140
	Solibacteres	Solibacterales	NA	NA_39	0,10272	-0,02775
	[Chloracidobacteria]	RB41	NA	NA_55	-0,07417	-0,34157
Actinobacteria	Rubrobacteria	Rubrobacterales	Rubrobacteraceae	Rubrobacter	0,12513	0,06495
	Thermoleophilia	Gaiellales	Gaiellaceae	NA_226	-0,23773	-0,08623
Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	NA_280	-0,56792	0,38965
	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Adhaeribacter	-0,10999	0,05960
	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Flavobacterium	-0,17464	-0,34613
				NA_314	-0,09729	-0,23986
	[Saprospirae]	[Saprospirales]	Chitinophagaceae	Pedobacter	-0,10546	-0,23707
NA_325				-0,25018	-0,01441	
Segetibacter				0,10824	-0,10223	
Cyanobacteria	Chloroplast	Stramenopiles	Saprospiraceae	NA_334	-0,10504	0,08073
			NA	NA_422	0,10979	-0,08085
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Other	NA_423	-0,13607	-0,08003
				Other453	-0,07124	-0,10699
Gemmatimonadetes	Phycisphaerae	Gemmatimonadales	Bacillaceae	Bacillus	-0,03593	-0,27811
				NA	NA_616	0,12936
Planctomycetes	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Eillin5301	NA_620	0,19897	-0,04983
				NA	NA_664	0,12789
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Kaistobacter	0,25616	0,02211
				Other828	0,12322	-0,12542
	Deltaproteobacteria	Mycococcales	Syntrophobacteriales	NA	-0,16383	-0,28155
				NA_890	0,08994	0,14500
				NA_920	-0,17956	0,00389
Gammaaproteobacteria	Xanthomonadales	Sinobacteraceae	Steroidobacter	NA_920	-0,17956	0,00389
				NA_920	-0,17956	0,00389
					-0,02472	0,10056

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

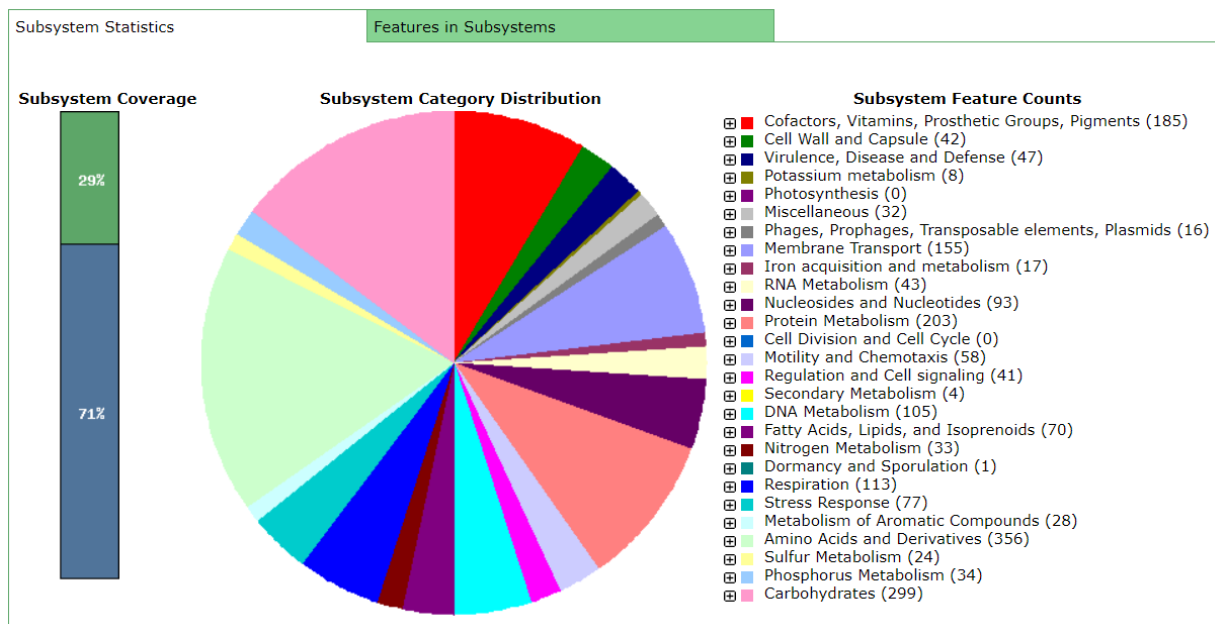
Приложение Б1 – Распределение подсистем RAST у штамма *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* L1 (метод секвенирования Illumina, метод аннотации RASTtk)



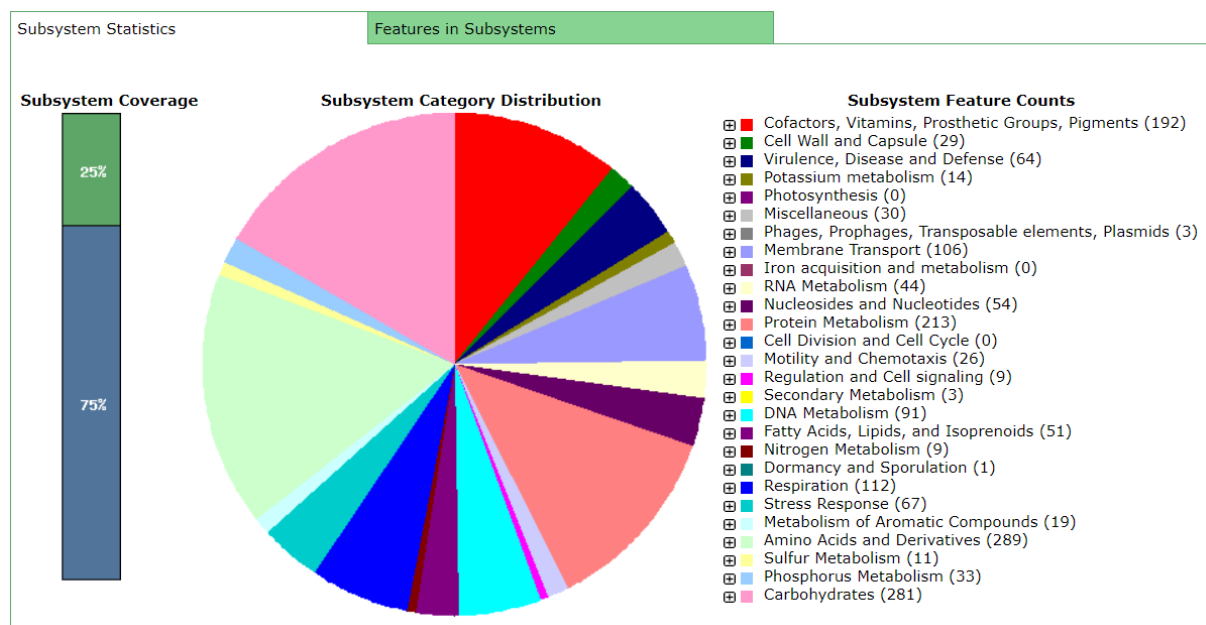
Приложение Б2 – Распределение подсистем RAST у штамма *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* M3 (метод секвенирования Illumina, метод аннотации RASTtk)



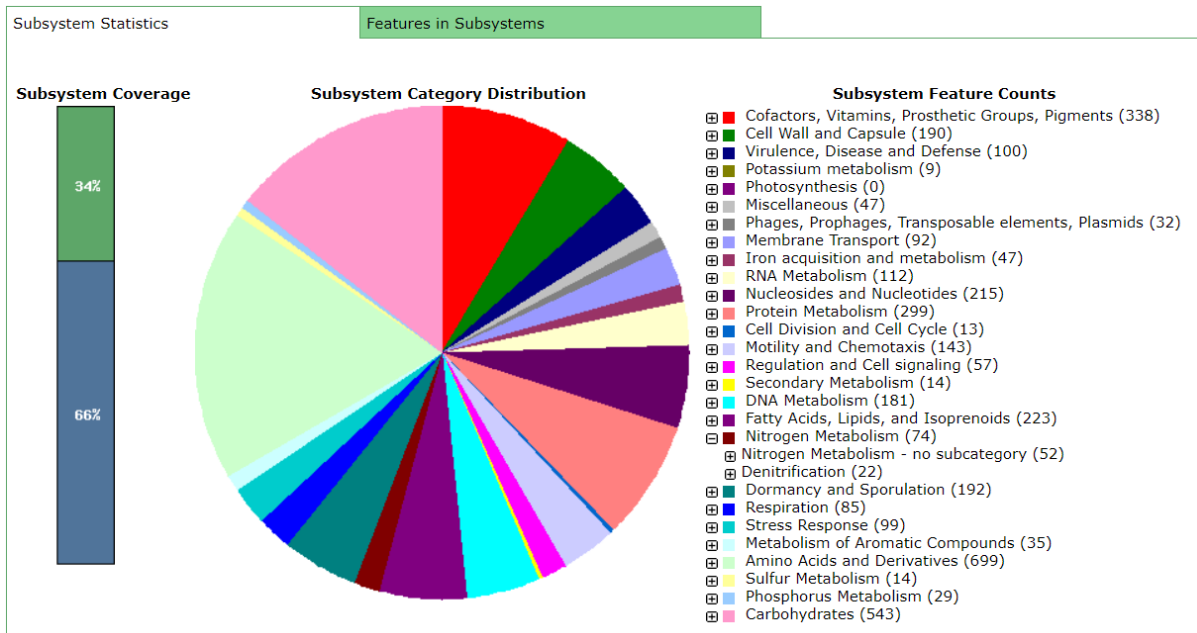
Приложение Б3 – Распределение подсистем RAST у штамма *Agrobacterium tumefaciens* R1 (метод секвенирования Illumina, метод аннотации RASTtk)



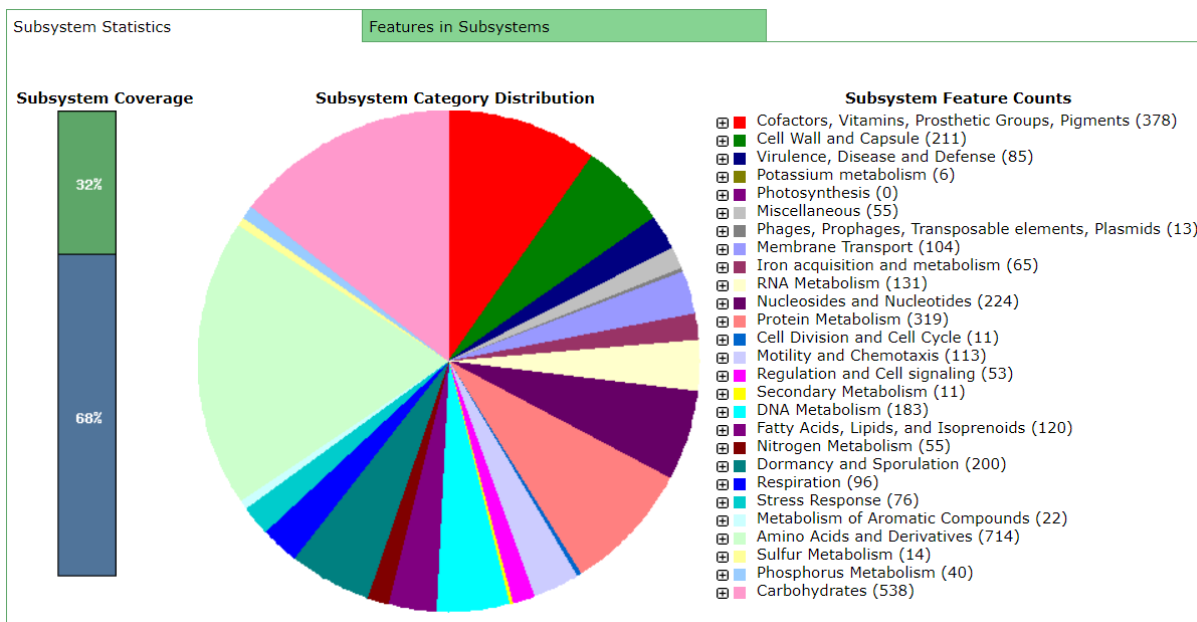
Приложение Б4 – Распределение подсистем RAST у штамма *Bacillus wiedmannii* B5 (метод секвенирования Illumina, метод аннотации RASTtk)



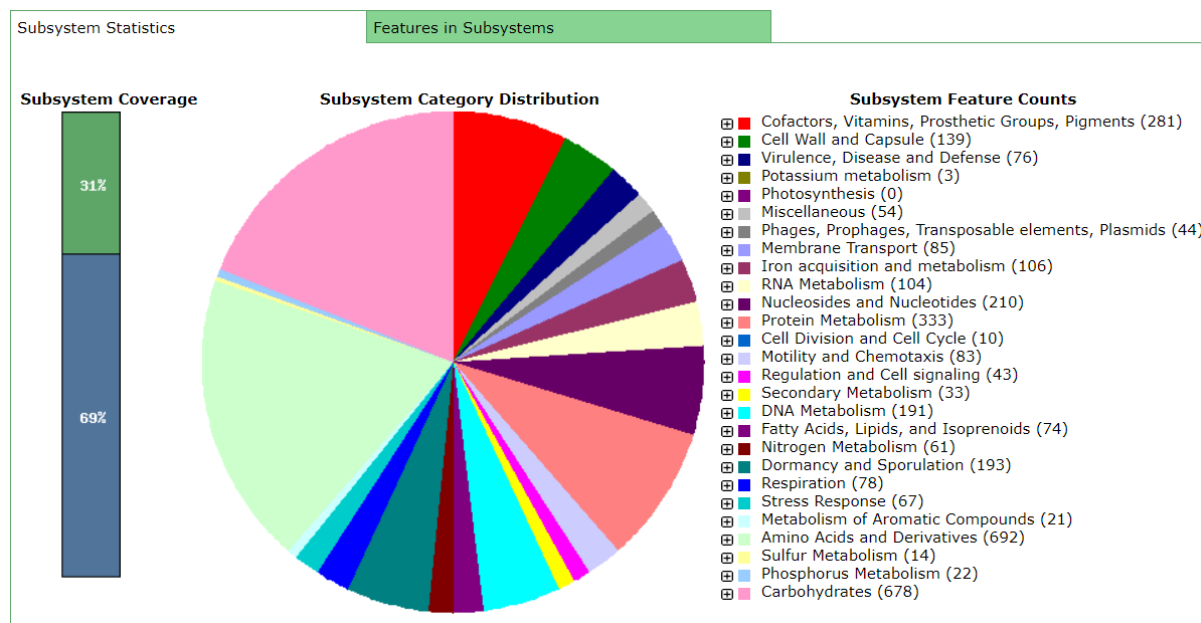
Приложение Б5 – Распределение подсистем RAST у штамма *Bacillus velezensis* Ant (метод секвенирования Nanopore, метод аннотации RASTtk)



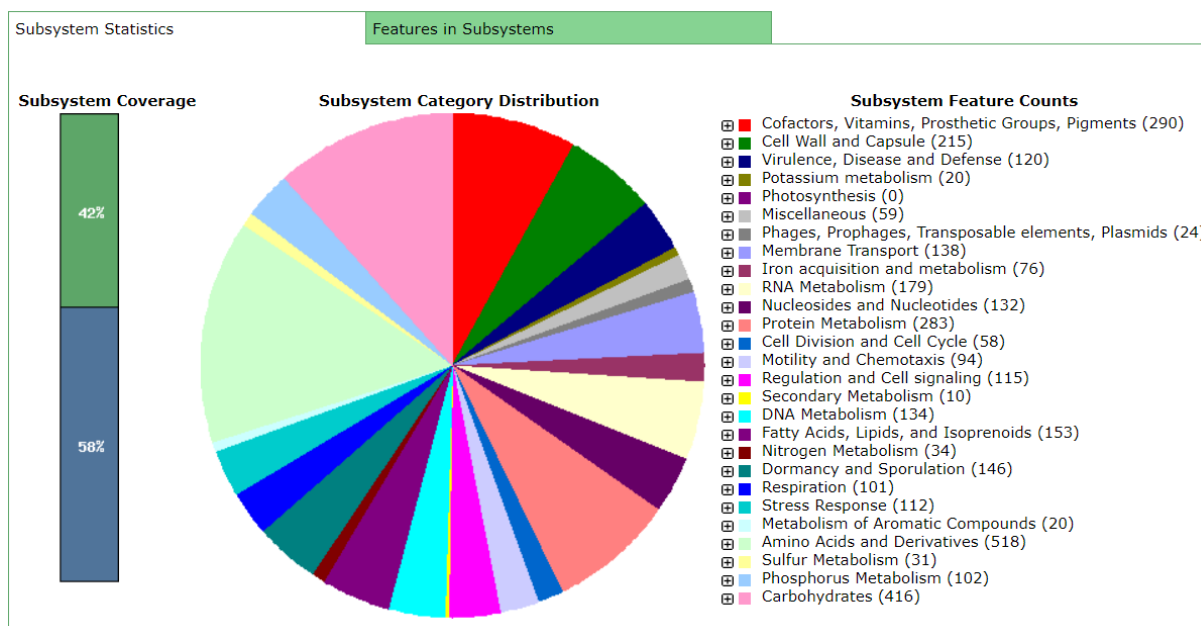
Приложение Б6 – Распределение подсистем RAST у штамма *Bacillus halotolerans* Bb (метод секвенирования Nanopore, метод аннотации RASTtk)



Приложение Б7 – Распределение подсистем RAST у штамма *Bacillus licheniformis* Br (метод секвенирования Nanopore, метод аннотации RASTtk)



Приложение Б8 – Распределение подсистем RAST у штамма *Sphingomonas paucimobilis* Gr (метод секвенирования Nanopore, метод аннотации RASTtk)



ПРИЛОЖЕНИЕ В

Погодные условия за период проведения исследований

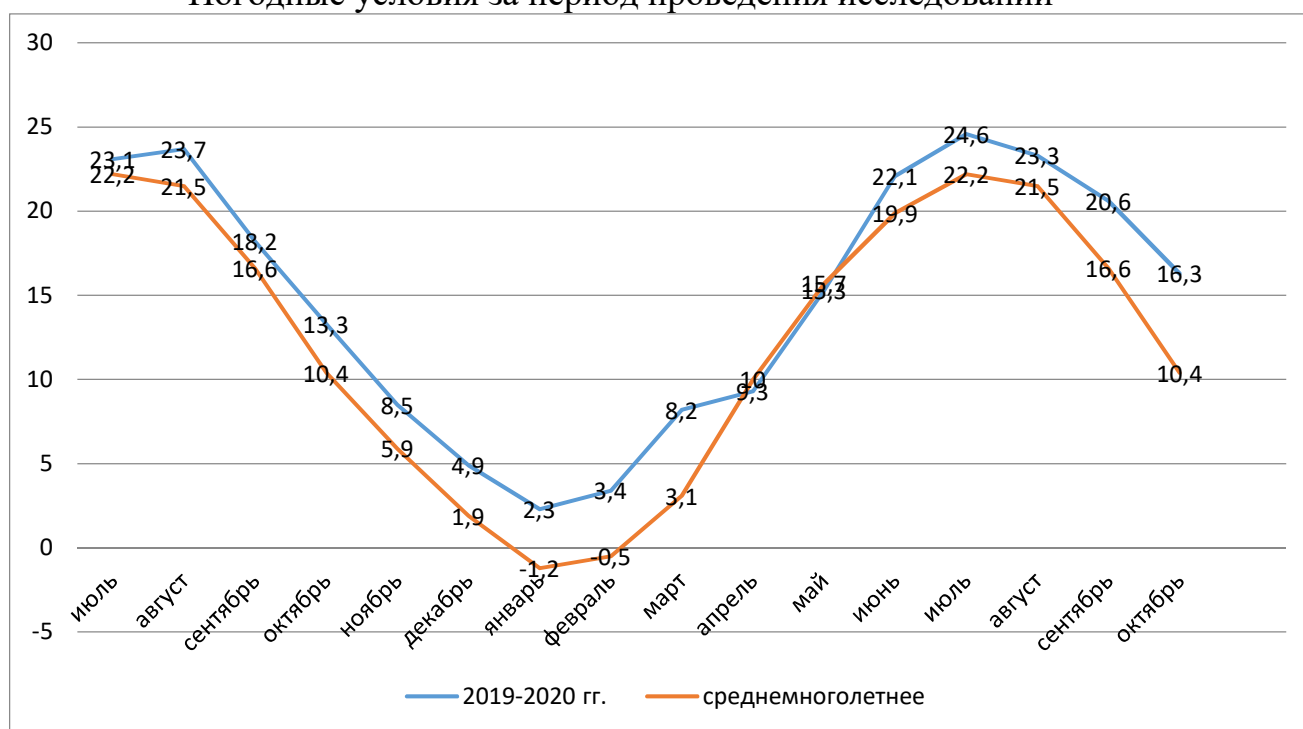


Рисунок В.1 – Среднемесячная температура воздуха за период проведения исследований в сравнении со среднемноголетними показателями, °С

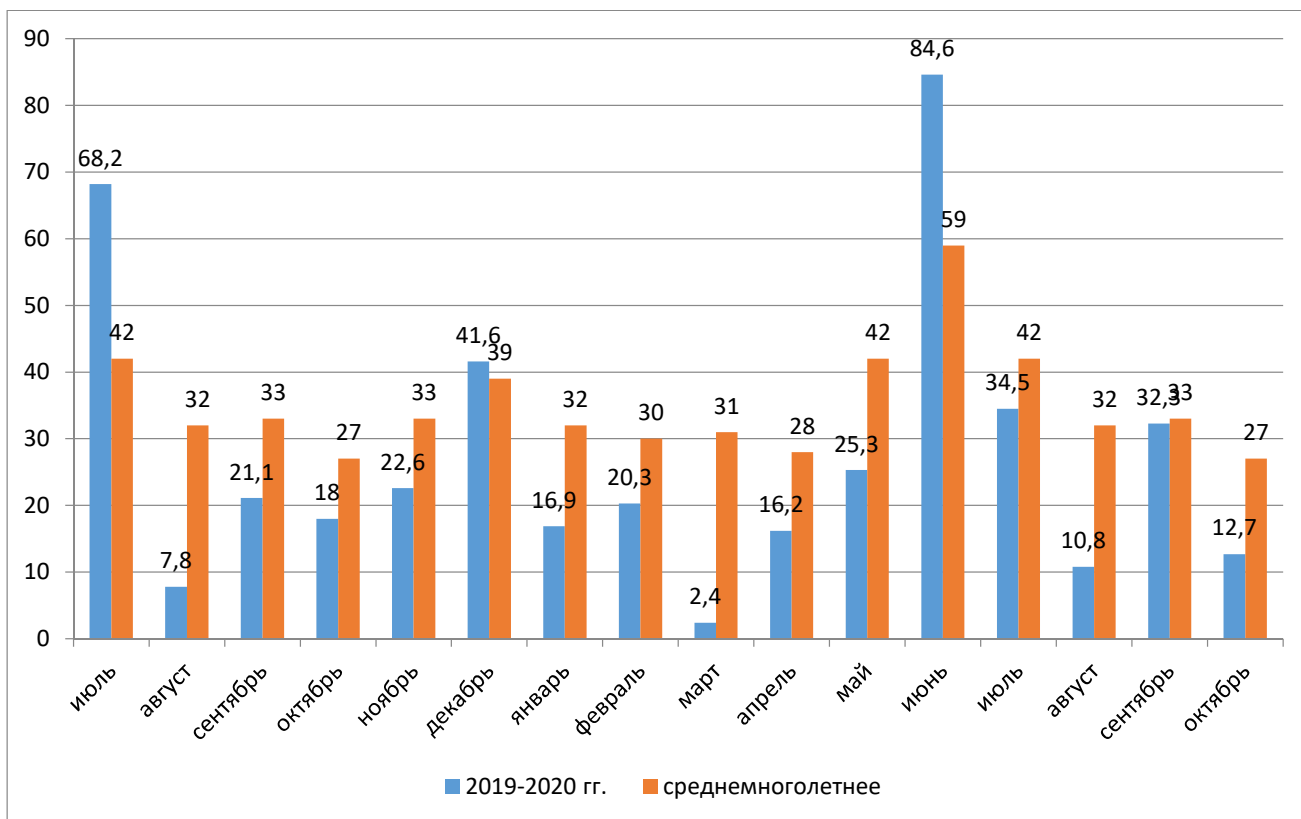


Рисунок В.2 – Сумма осадков ежемесячно за период проведения исследований в сравнении со среднегодовыми показателями, мм

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Абдурашитов С.Ф., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «НИИСХ Крыма»

Абдурашитова Э.Р., научный сотрудник отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «НИИСХ Крыма»

Алексеенко О.П., младший научный сотрудник отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «НИИСХ Крыма»

Ганоцкая Т.Л., младший научный сотрудник отделения полевых культур ФГБУН «НИИСХ Крыма»

Горгулько Т.В., научный сотрудник отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «НИИСХ Крыма»

Гритчин М.В., научный сотрудник отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «НИИСХ Крыма»

Дидович С.В., кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «НИИСХ Крыма»

Еговцева А.Ю., научный сотрудник отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «НИИСХ Крыма»

Каменева И.А., кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «НИИСХ Крыма»

Мельничук Т.Н., доктор сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, главный научный сотрудник отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «НИИСХ Крыма»

Пась А.Н., младший научный сотрудник отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «НИИСХ Крыма»

Паштецкий В.С., доктор сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, директор ФГБУН «НИИСХ Крыма»

Радченко А.Ф., старший научный сотрудник отделения полевых культур ФГБУН «НИИСХ Крыма»

Радченко Л.А., кандидат сельскохозяйственных наук, заместитель директора по научной работе ФГБУН «НИИСХ Крыма»

Ремесло Е.В., научный сотрудник отделения полевых культур ФГБУН «НИИСХ Крыма»

Шерстобоев Н.К., старший научный сотрудник отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «НИИСХ Крыма»

Якубовская А.И., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «НИИСХ Крыма»

Научное издание

**АССОЦИАТИВНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ РАСТЕНИЙ:
ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММОВ И ИХ ИЗУЧЕНИЕ**

Монография

Под редакцией Мельничук Т.Н., Якубовской А.И., Каменевой И.А. и др.

Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 10,7. Тираж 500 экз.

ИЗДАТЕЛЬСТВО ТИПОГРАФИЯ «АРИАЛ»

295015, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Севастопольская, 31-а/2,
тел.: +7 978 71 72 901, e-mail: it.arial@yandex.ru, www.arial.3652.ru

Отпечатано с оригинал-макета в типографии «ИТ «АРИАЛ»
295015, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Севастопольская, 31-а/2,
тел.: +7 978 71 72 901, e-mail: it.arial@yandex.ru, www.arial.3652.ru