



7. *Deshpande L. M., Jones R. N.* Bactericidal activity and synergy studies of BAL9141, a novel pyrrolidinone-3-ylidene cephem, tested against streptococci, enterococci and methicillin-resistant staphylococci // *Clin. Infect. Dis.* 2003. Vol. 9. P. 1120–1124.
8. *Graffunder E. M., Venezia A. R.* Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection including previous use of antimicrobials // *J. Antimicrob. Chemother.* 2002. Vol. 49, № 6. P. 999–1005.
9. *Нечаева О. В., Шуришалова Н. Ф., Заярский Д. А., Тихомирова Е. И., Сорокин В. В., Вакараева М. М., Веденеева Н. В.* Биологическая активность соединений ряда енаминов и их модифицированных аналогов в отношении референс-штаммов и клинических изолятов бактерий // *Фундаментальные исследования.* 2013. № 12-1. С. 127–130.
10. *Нечаева О. В., Тихомирова Е. И., Шуришалова Н. Ф., Плотников О. П.* Перспективы использования гетероциклических соединений в медико-биологической практике // *Международ. журн. эксперимент. образования.* 2014. № 3–2. С. 186–187.
11. *Нечаева О. В., Заярский Д. А., Вакараева М. М., Веденеева Н. В., Тихомирова Е. И.* Изучение биологической активности полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами галогенов, и его модификаций в отношении микроорганизмов // *Вестн. развития науки и образования.* 2014. № 1. С. 32–36.
12. *Нечаева О. В., Ульянов В. Ю., Заярский Д. А., Тихомирова Е. И., Вакараева М. М.* Влияние биосовместимого полимерного соединения на выживаемость возбудителей инвазивных микозов // *Проблемы мед. микологии.* 2014. Т. 6, № 2. С. 106.
13. Пат. 2492773 РФ. Способ хранения продуктов / *Заярский Д. А., Камалян А. Б., Нечаева О. В.*
14. Пат. 2446852 РФ. Способ получения экстрактов растительного сырья и продуктов пчеловодства / *Заярский Д. А., Портнов С. А., Матросов Н. А.*
15. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам // МУК 4.2.1890-04. М. : Изд. отдел Федерального центра Госсанэпиднадзора Минздрава РФ, 2004. 91 с.
16. *Кузин М. И., Костюченко Б. М.* Раны и раневая инфекция : руководство для врачей. М. : Медицина, 1990. 592 с.
17. *Gul N. Y., Topal A., Cangul T.* The effects of topical tripeptide copper complex and helium-neon laser on wound healing in rabbits // *Veterinary Dermatology.* 2008. Vol. 19, № 1. P. 7–14.
18. *Ашмарин И. П.* Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л. : Изд-во мед. лит., 1986. 184 с.

УДК 579.26

АССОЦИАТИВНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ПОБЕГОВ ЯБЛОНЬ (*MALUS P. MILL, 1754*) В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Х. Мохамед, А. М. Петерсон, А. В. Козлова

Саратовский государственный университет
E-mail: alexandra.peterson@yandex.ru



Изучены видовой состав, количественные показатели и встречаемость бактерий и грибов, ассоциированных с побегами яблонь в Саратовской области. С поверхности побегов выделено 12 видов бактерий и 4 вида грибов, из внутренней среды – 14 видов бактерий и 3 вида грибов. Наиболее распространёнными ассоциантами поверхности побегов яблонь оказались бактерии *Bacillus subtilis*, *Pantoea agglomerans*, грибы *Alternaria sp.* и *Fusarium tricinctum*, внутренней среды побегов – *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Penicillium sp.* Выявлена незначительная сорто-специфичность микробных ассоциаций побегов яблонь.

Ключевые слова: побеги яблонь, бактерии, грибы.

Associative Microorganisms Shoots Apple Tree (*Malus P. Mill, 1754*) in Saratov Region

H. Mohamed, A. M. Peterson, A. V. Kozlova

Species composition, quantitative indicators and the occurrence of bacteria and fungi associated with apple shoots in the Saratov region were studied. On the surface shoots isolated 12 species of bacteria, and 4 species of fungi, of the internal environment – 14 species of bacteria

and 3 species of fungi. The most common surface associates apple shoots appeared bacterium *Bacillus subtilis*, *Pantoea agglomerans*, fungus *Alternaria sp.* and *Fusarium tricinctum*, internal environment shoots – *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Penicillium sp.* Few sorts specificity of microbial associations shoots of apple was found.

Key words: apple shoots, bacteria, fungi.

DOI: 10.18500/1816-9775-2015-15-3-80-84

Введение

Любой растительный организм является средой обитания для огромного количества микроорганизмов, выполняющих множество значимых для хозяина функций. Поддерживая на поверхности своих органов, в тканях и клетках микробный консорциум, отдавая ему часть своих ресурсов, растения получают взамен улучшение минерального питания, защиту от фитопатогенов, фитофагов, абиотических стрессов и т.д. [1–6]. Исследования



последних лет свидетельствуют, что не только поверхность, но и внутренние ткани здоровых растений могут быть заселены различными микроорганизмами [7, 8]. Сегодня бактерии, ассоциированные с поверхностью и внутренней средой растений, привлекают внимание исследователей перспективой их хозяйственного использования в практике экологически чистых биотехнологий растениеводства [9]. Однако большая часть работ в этой области посвящена микроорганизмам, ассоциированным с корневой системой растений. Микрофлора надземных вегетативных частей растений изучена значительно хуже. В связи с этим целью данной работы явилось изучение бактерий, ассоциированных с побегами яблонь.

Материал и методы

Исследования проводились в 2014 г. Материалом послужили одно- и двулетние побеги яблонь сортов Беркутовское, Уэлси и Голден Делишес, произрастающие в фермерских садах Саратовского (с. Багаевка) и Хвалынского (г. Хвалынк) районов Саратовской области. Беркутовское – зимний сорт селекции Саратовской опытной станции садоводства, Голден Делишес и Уэлси — зимние сорта американской селекции.

Побеги срезали секатором и помещали в стерильные пакеты. Материал для исследований доставлялся в лабораторию в течение 4–5 часов. Всего было исследовано 100 побегов яблонь.

При изучении микрофлоры поверхности побегов осуществляли посев методом отпечатка на картофельную среду (картофель – 300 г, агар-агар – 15 г, вода – 1 л) и среду PDA (картофель – 200 г, агар-агар – 15 г, глюкоза – 20 г, вода – 1 л). Для выявления микроорганизмов, обитающих во внутренней среде растения, первоначально производили стерилизацию поверхности побегов по экспериментально подобранной методике. Для этого побег помещали в 70%-ный раствор этилового спирта (C_2H_5OH) на 5 минут, затем – в моющее средство «Белизна», содержащее гипохлорит натрия ($NaOCl$) на 30 минут. После обработки побег дважды промывался в стерильном физиологическом растворе. Далее проводился тест на стерильность методом отпечатка на картофельную среду. Затем 0,1 г побега растирали с 0,9 мл физиологического раствора и по 0,1 мл полученной суспензии высевали на чашки с картофельной средой и PDA. Посевы на картофельной среде культивировались в течение 2–3 суток, на PDA – 5–7 суток при 28°C.

Для идентификации выделенных штаммов бактерий были изучены морфологические, культуральные, биохимические свойства изолятов. С каждым исследуемым штаммом было поставлено 30 биохимических тестов.

Видовую принадлежность бактерий определяли с помощью 9-го и 10-го издания определителя бактерий Берджи [10, 11]. Видовую принадлежность доминирующих штаммов бактерий и грибов подтверждали путём выявления видоспецифичных участков рибосомальных РНК методом ПЦР. Молекулярные исследования проводили в Институте фармацевтической биологии и биотехнологии (г. Дюссельдорф, Германия).

Индексы общности видового состав микробных ассоциаций побегов разных сортов яблонь рассчитывали как отношение видов, общих для двух сравниваемых групп, к общему количеству выделенных из них видов, выраженное в процентах. Встречаемость рассчитывали как число проб, в которых обнаруживались микроорганизмы данной таксономической группы, к общему числу проб, выраженное в процентах.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований было установлено, что побеги яблонь являются средой обитания для большого количества микроорганизмов. Причём богатая микрофлора была характерна не только для поверхности побегов, но и для их внутренней среды (рис. 1). Большее видовое разнообразие было характерно для эпифитной микрофлоры: в 55,2% проб изолировалось по 4–5 видов микроорганизмов, в 6,9% проб одновременно изолировалось 6 и более видов. Из внутренней среды побегов чаще выделялось 2–3 вида (45,7% проб) или 1 вид (37,1%). В 17,1% проб из внутренней среды побега роста микроорганизмов на используемых питательных средах не наблюдалось.

С поверхности побегов яблонь было выделено 12 видов бактерий и 4 вида грибов, из внутренней среды побегов – 14 видов бактерий и 3 вида грибов.

Наиболее разнообразно в видовом отношении оказался представлен род *Bacillus*, по 7 представителей которого было изолировано с поверхности и из внутренней среды побегов, остальные роды были представлены единичными видами.

Показано, что часть микроорганизмов (9 видов) может обитать как на поверхности, так и во внутренней среде побегов яблонь. Некоторые виды встречались лишь в одном из вышеперечисленных мест обитания (табл. 1). Если это виды с низкой встречаемостью, то их обнаружение только в одном местообитании может быть случайностью. Однако были микроорганизмы, которые достаточно часто выделялись с поверхности побегов и очень редко или совсем не выделялись из внутренней среды. К числу таких видов можно отнести бактерий *Bacillus neidei* (встречаемость

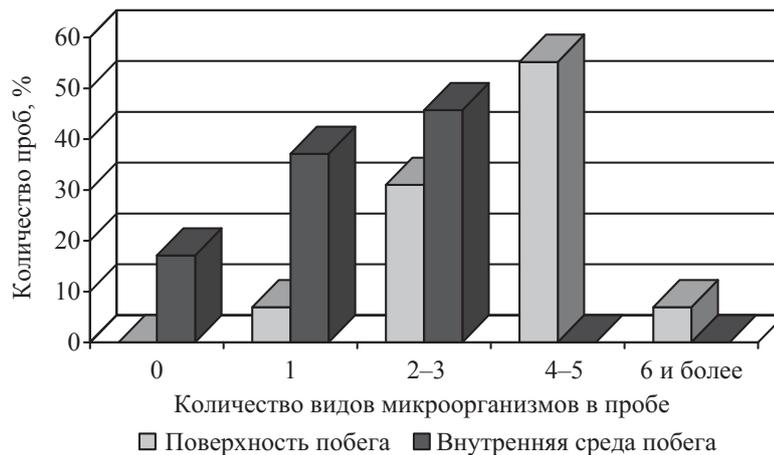


Рис. 1. Видовое разнообразие микроорганизмов на поверхности и во внутренней среде побегов яблони

10 и 0% соответственно), *B. pumillus* (16 и 2%), *Microbacterium lacticum* (8 и 0%), *Pantoea agglomerans* (22 и 8%), грибы *Cladosporium cladosporioides* (8 и 0%), *Fusarium tricinctum* (40 и 3%), *Alternaria sp.* (79 и 3%). Реже встречались виды,

обитающие преимущественно во внутренней среде побегов. К их числу можно отнести бактерию *Bacillus amyloliquefaciens* (встречаемость на поверхности и во внутренней среде побегов 10 и 16% соответственно) и гриб *Penicillium sp.* (4 и 13%).

Таблица 1

Встречаемость отдельных видов микроорганизмов (%) на поверхности и во внутренней среде исследованных побегов яблони

	Таксоны микроорганизмов	Поверхность побега	Внутренняя среда побега
Бактерии	<i>Aureobacterium barkeri</i>	2	0
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	10	16
	<i>B. farraginis</i>	0	1
	<i>B. lentus</i>	0	2
	<i>B. megaterium</i>	2	0
	<i>B. methylotrophicus</i>	11	9
	<i>B. neidei</i>	10	0
	<i>B. pumillus</i>	16	2
	<i>B. simplex</i>	5	6
	<i>B. subtilis</i>	31	31
	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	2	0
	<i>Deinobacter grandis</i>	0	1
	<i>Listeria welshmeri</i>	14	0
	<i>Microbacterium lacticum</i>	8	0
	<i>M. nishinomyaenis</i>	0	1
	<i>Micrococcus sedentarius</i>	0	2
	<i>Pantoea agglomerans</i>	22	8
	<i>Serratia ficaria</i>	0	1
	<i>Staphylococcus auricularis</i>	0	2
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	2
Грибы	<i>Alternaria sp.</i>	79	3
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	8	0
	<i>Fusarium tricinctum</i>	40	3
	<i>Penicillium sp.</i>	4	13



Наиболее распространёнными эпифитами побегов яблонь оказались бактерии *B. subtilis* (общая встречаемость в пробах 31%), *Pantoea agglomerans* (22%), грибы *Alternaria sp.* (79%) и *Fusarium tricinctum* (40%). Наибольшая встречаемость во внутренней среде растения была характерна для *B. subtilis* (31%), *Bacillus amyloliquefaciens* (16%), *Penicillium sp.* (13%). Однако количественное содержание этих микроорганизмов существенно варьировало в разных пробах: от 10^2 до 10^6 КОЕ/см² или КОЕ/г. Следует отметить, что виды с низкой встречаемостью в ряде случаев также могли достигать очень высокой численности как на поверхности, так и во внутренней среде растения. Так, на поверхности побегов могли активно размножаться такие редко встречающи-

еся виды как *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. neidei*, *B. pumillus* (10^6 КОЕ/см²), во внутренней среде – *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus*, *B. megaterium*, *B. simplex*, *Microbacterium lacticum*, *Stenotrophomonas maltophilia* (10^6 КОЕ/г).

Для выявления сортоспецифичности микробной ассоциации было исследовано по 30 побегов яблонь сортов Беркутовское, Уэлси и Голден Делишес, произрастающих в одинаковых условиях (табл. 2). Оказалось, что у всех исследованных сортов в микробных ассоциациях присутствуют только наиболее распространённые виды микроорганизмов: бактерии *B. subtilis*, *Pantoea agglomerans*, грибы *Fusarium tricinctum*, *Penicillium sp.*, *Alternaria sp.* Встречаемость остальных видов сильно варьировала.

Таблица 2

Сортоспецифичность микробной ассоциации побегов яблонь (встречаемость микроорганизмов (%) на поверхности и во внутренней среде побегов яблонь разных сортов)

Таксоны микроорганизмов	Беркутовское		Уэлси		Голден Делишес	
	поверх.	внутр. среда	поверх.	внутр. среда	поверх.	внутр. среда
<i>Aureobacterium barkeri</i>	0	0	6,7	0	0	0
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	0	26,7	40,0	6,7	13,4
<i>B. farraginis</i>	0	6,7	0	0	0	0
<i>B. lentus</i>	0	6,7	0	0	0	0
<i>B. megaterium</i>	0	26,7	0	0	6,7	0
<i>B. methylotrophicus</i>	0	0	36,7	36,7	0	6,7
<i>B. neidei</i>	33,4	0	0	0	0	0
<i>B. pumillus</i>	20,0	0	0	0	26,7	13,4
<i>B. simplex</i>	13,4	13,4	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	63,4	46,7	6,7	33,4	33,4	33,4
<i>Brevibacterium halotolerans</i>	0	0	3,4	0	6,7	0
<i>Deinobacter grandis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Listeria welshmeri</i>	13,4	0	0	0	0	0
<i>Microbacterium lacticum</i>	0	0	0	0	26,7	0
<i>M. nishinomyaenis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Micrococcus sedentarius</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Pantoea agglomerans</i>	26,7	6,7	40,0	0	20,0	13,4
<i>Serratia ficaria</i>	0	0	0	3,4	0	0
<i>Staphylococcus auricularis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0	0	6,7	0	0
<i>Alternaria sp.</i>	73,4	0	90,0	6,7	93,4	0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6,7	0	0	0	20,0	0
<i>Fusarium tricinctum</i>	46,7	3,4	73,4	6,7	73,4	0
<i>Penicillium sp.</i>	13,4	10,0	6,7	10,0	0	26,7

У некоторых таксонов микроорганизмов выявлена определённая приуроченность к тем или иным сортам яблонь. Так, *B. megaterium* и *B. neidei* чаще выделялись с побегов Беркутов-

ского, *B. amyloliquefaciens* и *B. methylotrophicus* – с побегов Уэлси, *Microbacterium lacticum* и *Cladosporium cladosporioides* – с побегов Голден Делишес.



При сравнении видового состава микрофлоры побегов яблонь разных сортов оказалось, что более схожими являются микробные ассоциации сортов американской селекции Уэлси и Голден Делишес (рис. 2, 3). Причём высокое сходство было характерно как для эпифитной микрофлоры, так и для микрофлоры внутренней среды побегов. Видовой состав микробной ассоциации побегов сорта Беркутовское был более специфичен и имел более низкие индексы общности как с микрофлорой Уэлси, так и с микрофлорой Голден Делишес.



Рис. 2. Индексы общности видового состава эпифитной микрофлоры побегов яблонь разных сортов



Рис. 3. Индексы общности видового состава эндофитной микрофлоры побегов яблонь разных сортов

Большая часть выделенных нами микроорганизмов является широко распространёнными обитателями окружающей среды. На поверхность растений они могут попадать из почвы, с осадками, из воздуха, во внутреннюю среду – через корневые волоски с раствором минеральных веществ с дальнейшим распространением через ксилему. Часть видов может попадать на растения с мигрирующими насекомыми, в частности с тлями [12, 13]. Доминирующий вид *B. subtilis* часто выделяется и при исследованиях микрофлоры других видов растений, причём ряд авторов указывают его как эндофита, способствующего устойчивости растения-хозяина к широкому кругу возбудителей болезней [14, 15].

Наряду с сапрофитическими микроорганизмами в состав нормальной микрофлоры побегов яблонь входят и фитопатогены: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Fusarium tricinctum*, *Alternaria* sp. Причём фитопатогенные грибы имели очень высокие показатели встречаемости на здоровых побегах яблонь. При благоприятных условиях они не наносят значительного вреда растениям, так как некоторые эпифитные микроорганизмы являются антагонистами фитопатогенных

грибов и сдерживают их развитие [9]. Если же в микрофлоре растения произойдёт дисбаланс, то это может повлечь за собой бурное развитие фитопатогенных организмов и, как следствие, развитие патологического процесса.

Список литературы

1. Боронин А. М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Сорос. образоват. журн. 1998. № 10. С. 25–31.
2. Заикина И. А. Эпифитная микрофлора здоровых растений. Пенза : РИО ПГСХА, 2007. С. 40–44.
3. Заикина И. А. Экологическая роль бактериального сообщества эпифитов филлосферы в жизнедеятельности растений : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ставрополь, 2008. 150 с.
4. Dunn R. M., Mikola J., Bol R., Bardgett R. D. Influence of microbial activity on plant-microbial competition for organic and inorganic nitrogen // Plant and Soil. 2006. № 289. P. 321–334.
5. Clarholm M. Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen // Soil Biology and Biochemistry. 1985. № 17. P. 181–187.
6. Harrison M. J. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis // Ann. Rev. Microbiol. 2005. № 59. P. 19–42.
7. Reinhold-Hurek B., Hurek T. Living inside plants : bacterial endophytes // Curr. Opin. Plant Biol. 2011. Vol. 14, № 4. P. 435–443.
8. Rosenblueth M., Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2006. Vol. 19, № 8. P. 827–837.
9. Романенко Н. Д., Попов И. О., Таболин С. Б., Бугаева Е. Н., Заец В. Г. Перспективы использования бактерий-антагонистов против наиболее фитопатогенных видов нематод, вирусов и грибов // АГРО XXI. 2008. № 1. С. 23–27.
10. Определитель бактерий Берджи : в 2 т. Т. 2. М. : Мир, 1997. 368 с.
11. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. N.Y. : Springer, 2001. Vol. 3. 1450 p.
12. Петерсон А. М., Глинская Е. В., Зарезина Д. О., Малышина М. С. Динамика микроценоза яблонной тли (*Aphis pomi* Deg.) в Саратовской области в 2007–2009 годах // Энтومол. и паразитол. исслед. в Поволжье. Саратов : Изд-во Саратов. ун-та, 2010. Вып. 8. С. 96–100.
13. Глинская Е. В., Петерсон А. М., Малышина М. С. Организм тли как резервуар сапрофитных и фитопатогенных бактерий // Фундаментальные проблемы энтомологии в XXI веке : материалы международ. науч. конф. СПб., 2011. С. 32.
14. Хайруллин Р. М., Минина Т. С., Иргалина Р. Ш., Загребин И. А., Уразбахтина Н. А. Эффективность новых эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* в повышении устойчивости пшеницы к болезням // Вестн. ОГУ. 2009. № 2. С. 133–137.
15. Егоршина А. А. Биологическая активность эндофитных штаммов *Bacillus subtilis*, перспективных в качестве основы новых препаратов для растениеводства : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 2012. 24 с.