

УДК 579.26

UDC 579.26

03.00.00 Биологические науки

Biological sciences

**ВИДОВОЙ СОСТАВ ЭПИФИТНОЙ
МИКРОФЛОРЫ НЕКОТОРЫХ РАСТЕНИЙ
СЕМЕЙСТВА GROSSULARIACEAE И
РАЗЛИЧНЫЕ ТИПЫ ИХ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ**

**SPECIES' COMPOSITION OF EPIPHYTIC
MICROFLORA OF SOME PLANTS OF
GROSSULARIACEAE FAMILY AND VARIOUS
TYPES OF THEIR INTERACTIONS**

Ерина Надежда Викторовна

Erina Nadezhda Viktorovna

Коптева Татьяна Сергеевна

Kopteva Tatiana Sergeevna

Заикина Ирина Аркадьевна
*ФГАОУ ВПО Северо-Кавказский федеральный
университет, Россия*

Zaikina Irina Arkadievna
North-Caucasus federal university, Russia

В статье представлены результаты исследований, проведенных в 2007-2014 годах. Целью изучения стал состав микрофлоры филлоплана некоторых растений семейства **Grossulariaceae**. На основе полученных данных авторы выделяют типичных представителей микрофлоры филлоплана. Авторы изучают особенности взаимодействий выделенных штаммов микроорганизмов

The article presents the results of the research carried out in 2007-2014. The aim of the study was the composition of the microflora of the leaf surface of some plants of the family *Grossulariaceae*. Based on these data, the authors distinguish the typical representatives of the leaf surface microflora. The authors study the features of isolated strains interactions

Ключевые слова: ФИЛЛОПЛАН, ЭПИФИТНАЯ МИКРОФЛОРА, ЭПИФИТНЫЕ БАКТЕРИИ, ЭПИФИТНЫЕ МИКРОМИЦЕТЫ, ЭПИФИТНЫЕ ДРОЖЖИ, АНТАГОНИЗМ, МУТУАЛИЗМ, НЕЙТРАЛИЗМ, СИМБИОЗ, ЧЕРНАЯ СМОРОДИНА, БЕЛАЯ СМОРОДИНА, КРАСНАЯ СМОРОДИНА, КРЫЖОВНИК

Keywords: SURFACE OF LEAF, EPIPHYTIC MICROFLORA, EPIPHYTIC BACTERIA, EPIPHYTIC MICROMYCETES, EPIPHYTIC YEAST, ANTAGONISM, MUTUALISM, NEUTRALISM, SYMBIOSIS, BLACK CURRANT, WHITE CURRANT, RED CURRANT, GOOSEBERRY

Растения являются неотъемлемой частью всех биосистем. При этом все растения сосуществуют с микроорганизмами. Сложные комплексы растения - микрофлора сосуществуют в виде мутуалистических, антагонистических и нейтральных взаимоотношений. При этом подобного рода взаимодействия происходят как между микроорганизмами, так и сообществ микроорганизмов с растением. В литературе все больше накапливается фактов о влиянии микроорганизмов на рост растений, полнее познается видовой состав, глубже изучаются свойства отдельных микроорганизмов, становится понятной роль этой микрофлоры [1,2,3,4,9,10,11].

Любой вид эпифитного микроорганизма обнаруживается и способен жить на поверхности самых различных видов растений. Часто

при анализах микрофлоры растений наблюдаются очень существенные различия. Эти различия могут выражаться в присутствии совершенно разных микроорганизмов или в различном сочетании одних и тех же видов [1].

В то же время в литературе содержатся данные об относительно стабильном составе эпифитной микрофлоры многих растений [2,3,4]. Исходя из этого можно предположить, что микроорганизмы, постоянно обитающие на поверхности растений, формируют относительно стабильные сообщества, для которых условия этой экологической ниши оптимальны.

Целью исследования было изучение микробных сообществ эпифитной микрофлоры филлоплана здоровых растений семейства Крыжовниковые (*Grossulariaceae*) и особенностей взаимодействия выделенных культур.

Для решения поставленной цели были определены задачи:

- Изучение состава микробных сообществ филлоплана растений семейства *Grossulariaceae*;
- выявление наиболее распространенных микроорганизмов филлоплана изучаемых растений;
- Выявление типов взаимоотношений выделенных культур.

Материалы и объекты исследований

Наши эксперименты были направлены на изучение эпифитного микробиологического комплекса поверхности растений семейства *Grossulariaceae* (*Ribes nigrum*, *R. rubrum*, *R. niveum*, *Grossularia reclinata*). Изучение состава эпифитной микрофлоры проводили с 2007 по 2014 год на базе лаборатории кафедры ботаники, зоологии и общей биологии СКФУ в летний, осенний, весенний периоды. Для проведения работы был выбран опытный участок в г. Ставрополе, на котором все исследуемые растения содержались в идентичных условиях.

Отбор проб проводили с филлоплана методом отпечатка листовой пластинки (верхняя и нижняя поверхности). Забор материала производили 1 раз в месяц при соблюдении определенных правил: от момента изъятия листовой пластинки до отпечатка его на питательную среду проходило не более 3 часов, забор материала производился не менее чем через 3 дня после дождя, либо очень влажной погоды, при транспортировке биологического материала соблюдалась стерильность.

Культивирование микроорганизмов проводили при 28±2°C, 37±2°C, 45±2°C в течение 2-9 суток на ГРМ – агаре и среде Сабуро. Выделенные культуры бактерий, плесневых и дрожжеподобных грибов идентифицировали, пользуясь стандартными методиками [6,7,8,12]. Видовой состав микроорганизмов, полученный при исследовании, отражен в таблице 1.

Таблица 1

Состав микрофлоры филлоплана растений семейства *Grossulariaceae*

Вид растения	Бактерии		Грибы	
	Грамм положительные	Грамм отрицательные	дрожжи	плесневые
<i>Ribes nigrum</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. pumilis</i> , <i>B. megaterium</i> ; <i>Paenibacillus polymyxa</i> , <i>P. macerans</i> , <i>P. durus</i> , <i>P. humicus</i> ; <i>Lactobacillus plantarum</i> ; <i>Kocuria rhizophila</i> , <i>K. rosea</i> , <i>K. kristinae</i> , <i>Arthrobacter flavescens</i> , <i>A. album</i> , <i>Rhodococcus flavum</i> , <i>Sarcina maxima</i>	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Ps. fluorescens</i> , <i>Ps. syringae</i> ; <i>Ps. liquefaciens</i> , , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>P. dispersa</i> ;; <i>Escherichia coli</i> , <i>Hafnia alvei</i>	<i>Cryptococcus albidus</i> , <i>C. gatti</i> ; <i>Candida tolerans</i> , <i>C. oleophila</i> ; <i>Aerobasidium pullulans</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Mucor racemosus</i> , <i>M. oblongata</i> , <i>M. mucedo</i> , <i>Mycosphaerella ribis</i>
<i>R. rubrum</i>	<i>Bacillus subtilis</i> ,	<i>Pseudomonas</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Aspergillus</i>

	<i>B. cereus, B. pumilis, B. mycoides, B. megaterium; Paenibacillus polymyxa, P. macerans, P. humicus; Lactobacillus plantarum;</i>	<i>putida, Ps. chlororaphis, Ps. syringae; Ps. aeruginosa, Pantoae agglomerans, P. dispersa; Escherichia coli, Hafnia alvei</i>	<i>albidus, C. magnus, C. glutinis, C. gatti; Pichia anomala; Candida tolerans, C. oleophila; Aerobasidium pullulans, Rhodotorula glutinis</i>	<i>niger, Mucor racemosus, M. oblongata, M. mucedo,</i>
<i>R. niveum</i>	<i>Bacillus subtilis, B. licheniformis, B. mycoides, B. megaterium; Paenibacillus polymyxa, P. macerans, P. durus, P. humicus; Lactobacillus plantarum; Kocuria rhizophila, K. rosea,</i>	<i>Pseudomonas putida, Ps. chlororaphis, Ps. aureofaciens, Ps. fluorescens, Ps. liquefaciens, Ps. aeruginosa, Ps. desmolytica, Pantoae agglomerans, Escherichia coli, Hafnia alvei</i>	<i>Cryptococcus albidus, C. glutinis, C. gatti; Candida tolerans, C. oleophila; Aerobasidium pullulans, Rhodotorula glutinis</i>	<i>Aspergillus niger, Mucor mucedo</i>
<i>Grossularia reclinata</i>	<i>Bacillus subtilis, B. cereus, B. polymyxa, B. pumilis, B. mycoides, Paenibacillus polymyxa, P. macerans, P. humicus; Lactobacillus plantarum; Kocuria rosea, K. kristinae, Arthrobacter flavescens, A. album</i>	<i>Pseudomonas putida, Ps. chlororaphis, Ps. fluorescens, Ps. syringae; Ps. desmolytica, Pantoae agglomerans, P. dispersa; Erwinia amylovora, Escherichia coli, Hafnia alvei</i>	<i>Cryptococcus albidus, C. magnus, C. glutinis, C. gatti; Pichia anomala; Candida tolerans, Aerobasidium pullulans, Rhodotorula glutinis, Rh. rubra</i>	<i>Aspergillus niger, Mucor mucedo, Mycosphaerella ribis</i>

Полученные данные позволили нам определить виды, встречающиеся в составе эпифитной микрофлоры большинства изученных растений на протяжении всего срока изучения. Их мы отнесли к типичным представителям микрофлоры филоплана. Грамположительные бактерии: *Bacillus spp., Paenibacillus spp., Lactobacillus plantarum*; грамотрицательные бактерии: *Pseudomonas spp., Pantoae spp.*; дрожжи и дрожжеподобные организмы: *Aerobasidium pullulans, Rhodotorula spp., Candida spp.*

Плесневые грибы выделяли не каждый месяц, но к наиболее часто выявляемым видам эпифитов можно отнести: *Mucor mucedo* и *Aspergillus niger*.

Анализ полученных данных позволил определить стабильность микробных сообществ в сезонной и годовой динамике. Это позволяет говорить о постоянстве видового состава типичных эпифитных бактерий, которые сосуществуют с растением-хозяином на протяжении длительного времени.

Важным аспектом нашего исследования являлось изучение различных бактериально - фунгальных и межбактериальных взаимодействий выделенных эпифитных штаммов.

При изучении межбактериальных взаимодействий использовали метод перпендикулярных штрихов. На питательный агар в чашке Петри высевают штрихом предполагаемый продуцент антибиотического вещества. Посев штрихом делают по диаметру чашки Петри. Время инкубации продуцента зависит от скорости его роста. После того как продуцент вырастет и образует антибиотическое вещество, диффундирующее в толщу агара, перпендикулярно к его штриху подсевают штрихами тест-организмы, начиная от периферии чашки. Для посева используют густые суспензии тест-организмов в стерильной водопроводной воде. Чашки выдерживают в термостате при 28-30°C в течение 2-8 суток в зависимости от скорости роста тест-организмов. Нечувствительные к антибиотическому веществу тест-организмы растут вблизи штриха продуцента. Если антибиотик оказывает действие на тест-организм, то рост последнего будет наблюдаться вдали от штриха продуцента[6,7].

Для изучения бактериально-фунгальных взаимоотношений пользовались методом агаровых блочков. Метод предусматривает использование разных питательных сред для выращивания продуцента

антибиотика и тест-организмов. После застывания агара продуцент антибиотического вещества высевают сплошным газоном. Для этого споры переносят петлей на агаровую пластинку, распределяют по всей поверхности шпателем и инкубируют при 28-30°C в течение 8-10 суток. Затем стерильным пробочным сверлом (диаметр 6-8 мм) вырезают агаровые блочки с газоном исследуемой культуры и переносят их на поверхность агаризованной среды, например, МПА, только что засеянной тест-организмом. Агаровые блочки раскладывают по шаблону на равном расстоянии один от другого и на расстоянии 1,5-2,0 см от края чашки мицелием вверх и плотно прижимают к агаровой пластинке. Для лучшей диффузии антибиотических веществ в толщу питательной среды, засеянной тест-организмом, блочки можно закладывать непосредственно в лунки, предварительно вырезанные тем же сверлом. На одной чашке можно разместить 4-5 агаровых блочков с различными продуцентами антибиотиков. Чашки выдерживают 1 ч при комнатной температуре для диффузии антибиотических веществ в толщу агара, затем помещают в термостат при температуре, благоприятной для развития тест-организма на сутки и более в зависимости от скорости его роста. Если тест-организм чувствителен к антибиотическому веществу продуцента, то после инкубации вокруг агаровых блочков образуются зоны отсутствия его роста. Чем больше выделяется антибиотика и чем он активнее, тем больше будет диаметр зоны отсутствия роста тест-организма. Тест-организм, не чувствительный к антибиотическому веществу данного продуцента, растет по всей поверхности среды и даже вблизи блочка продуцента.

Используя описанные выше методы, мы выявили штаммы бактерий, которые не проявляли антагонистическое влияние на остальные штаммы бактерий, а также не обладали фунгицидным действием. К этой группе мы отнесли следующие виды: *Paenibacillus macerans*, *P. durus*, *P. humicus*; *Lactobacillus plantarum*; *Kocuria rhizophila*, *K. rosea*, *K. kristinae*,

Pseudomonas putida, *Ps. syringae*; *Ps. liquefaciens*, *Pantoea agglomerans*, *P. dispersa*; *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Arthrobacter flavescens*, *A. album*, *Rhodococcus flavum*, *Sarcina maxima*.

Другую группу бактерий образуют штаммы, обладающие мутуалистическим взаимодействием – при их совместном росте наблюдалось усиление роста двух штаммов. В состав этой группы вошли: *Pseudomonas liquefaciens*, *Bacillus. cereus* *Arthrobacter flavescens*, *A. album*.

Третью группу составили бактерии, обладающие выраженным антибиотическим или фунгицидным действием. В эту группу вошли следующие штаммы бактерий, относящиеся к видам: *Bacillus subtilis*, *Вас. pumilis*, *Вас. polymуха*, *Вас. megaterium*, *Paenibacillus polymуха*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas fluorescens*. Результаты эксперимента отражены в таблице 2 .

Таблица 2

Фунгицидные свойства микроорганизмов филлоплана

Наименование штамма	Тестируемая культура, зоны подавления роста, мм				
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Mucor racemosus</i>	<i>M. oblongata</i>	<i>M. mucedo</i>	<i>Mycosphaerella ribis</i>
<i>B. subtilis</i> -34	21	17	26	28	0
<i>B. subtilis</i> -41	17	15	13	10	7
<i>B. subtilis</i> -49	37	57	33	37	42
<i>B. subtilis</i> -82	12	16	21	25	28
<i>B. subtilis</i> -112	31	45	33	27	33
<i>B. subtilis</i> -136	26	24	20	18	18
<i>B. pumilus</i> -155	27	23	17	15	12
<i>B. subtilis</i> -187	34	53	33	35	28
<i>B. polymуха</i> -133	35	31	15	13	13
<i>B. megaterium</i> -156	33	17	12	11	18
<i>B. megaterium</i> -176	11	13	9	14	11
<i>Paenibacillus polymуха</i> -123	12	10	16	12	0
<i>Paenibacillus polymуха</i> -131	28	22	26	18	15
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> -88	19	22	31	37	26
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> -79	39	56	29	33	38
<i>Pseudomonas fluorescens</i> -139	17	19	0	0	48
<i>Pseudomonas fluorescens</i> -146	33	42	17	19	10
<i>Pseudomonas fluorescens</i> -153	21	17	15	16	8

Эксперимент позволил выявить бактериальные штаммы, обладающие наиболее выраженной и широко представленной фунгицидной активностью. К ним можно отнести штаммы *Bacillus subtilis* - 49, *Bac. subtilis* - 112, *Bac. subtilis* - 187, *Pseudomonas aureofaciens*- 79 и *Ps. fluorescens*-146. Эти бактерии выполняют в сложном комплексе эпифитной микрофлоры роль стабилизатора роста микромицетных форм.

Анализируя полученные результаты, мы пришли к выводу, что в состав комплекса эпифитных микроорганизмов растений семейства *Grossulariaceae* входит большое количество бактериальных, дрожжевых и плесневых грибов. Они сосуществуют в составе микрофлоры филлоплана и представляют собой сложный экологический комплекс, представители которого взаимодействуют по типу взаимовыгодных, нейтральных и антагонистических отношений.

Литература

1. Возняковская, Ю.М. Микрофлора растений и урожай / Ю.М. Возняковская. — Л.: Изд-во «Колос», 1969. 240 с.
2. Возняковская, Ю.М. Видовой состав эпифитной микрофлоры живых растений / Ю.М. Возняковская, Я.П. Худяков // «Микробиология». 1960. - т. XXIX. - вып. 1.-С. 124-125.
3. Делова, Г.Д. Микробные ценозы на листьях растений / Г.Д. Делова, Т.Т. Кузнецова // Микрофлора растений и почв. Новосибирск: Наука, 1973. - С. 3245.
4. Звягинцев, Д.Г. Растения как центры формирования бактериальных сообществ / Д.Г. Звягинцев, Т.Г. Добровольская, Л.В. Лысак // Журнал общей биологии, 1993. Т. 54. - № 2. - С. 183-199.
5. Сидоренко, О.Д. Лабораторный практикум по микробиологии / О.Д. Сидоренко. М.: МСХА, 1999. - 119 с.
6. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З.Теппер, В.К. Шильникова, К.И. Переверзева. - М.: Колос, 1994. – 326 с.
7. Практикум по микробиологии: Учеб. Пособие для студ. высш. учеб. заведений/ А.И. Нетрусов, М.А.Егорова, Л.М.Захарчук и др., Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
8. Бабьева, И.П. Методы выделения и идентификации дрожжей / И.П. Бабьева, В.И. Голубев. – М.: Пищевая промышленность, 1979. 120 с.
9. Делова, Г.В. Ультратонкая структура слизистых капсул желтопигментных эпифитных бактерий / Г.В. Делова // Структурные и функциональные связи высших растений и микроорганизмов. – Новосибирск: Наука, 1977. – С. 189– 203.

10. Бабаджанова В.А. Калимбетова Р.Ю. Биологические особенности эпифитной (дрожжевой) микрофлоры в Каракалпакстане// Труды второй международной научно-практической конференции молодых ученых «Индикация состояния окружающей среды: теория, практика, образование»/.25-28 апреля 2013 года: сборник статей. – М.: ООО «Буки Веди», 2013.
11. Торопова, Г.В. Особенности жизнедеятельности комнатных растений в сезонной динамике по индикаторным симбиотрофным бактериям: Дис.... канд. биол. наук / Г.В. Торопова. – Москва, 2005. – 124 с.
12. Определитель бактерий Берджи. В 2 - х т. Т. 1, 2: Пер. с англ./ Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. - М.: Мир, 1997. 432 с., ил.

REFERENCES:

1. Voznyakovskaya, YU.M. Mikroflora rastenij i urozhaj / YU.M. Voznyakovskaya. — L.: Izd-vo «Kolos», 1969. 240 s.
2. Voznyakovskaya, YU.M. Vidovoj sostav eh-pifitnoj mikroflory zhivyh rastenij / YU.M. Voznyakovskaya, YA.P. Hudyakov // «Mikrobiologiya». 1960. - t. XXIX. - vyp. 1.-S. 124-125.
3. Delova, G.D. Mikrobnye cenozy na list'yah rastenij / G.D. Delova, T.T. Kuznecova // Mikroflora rastenij i pochv. Novosibirsk: Nauka, 1973. - S. 3245.
4. Zvyagincev, D.G. Rasteniya kak centry formirovaniya bakterial'nyh soobshchestv / D.G. Zvyagincev, T.G. Dobrovol'skaya, JI.B. Lysak // ZHurnal obshchej biologii, 1993. T. 54. - № 2. - S. 183-199.
5. Sidorenko, O.D. Laboratornyj praktikum po mikrobiologii / O.D. Sidorenko. M.: MSKHA, 1999. - 119 s.
6. Tepper, E.Z. Praktikum po mikrobiologii / E.Z.Tepper, V.K. SHil'nikova, K.I. Pereverzeva. - M.: Kolos, 1994. – 326 s.
7. Praktikum po mikrobiologii: Ucheb. Posobie dlya stud. vyssh. ucheb. zavedenij/ A.I. Netrusov, M.A.Egorova, L.M.Zaharchuk i dr., Pod red. A.I. Netrusova. – M.: Izdatel'skij centr «Akademiya», 2005. – 608 s.
8. Bab'eva, I.P. Metody vydeleniya i identifikacii drozhzhej / I.P. Bab'eva, V.I. Golubev. – M.: Pishchevaya promyshlennost', 1979. 120 s.
9. Delova, G.V. Ul'tratonkaya struktura slizistyh kapsul zheltopigmentnyh eh-pifitnyh bakterij / G.V. Delova // Strukturnye i funkcional'nye svyazi vysshih rastenij i mikroorganizmov. – Novosibirsk: Nauka, 1977. – S. 189– 203.
10. Babadzhanova V.A. Kalimbetova R.YU. Biologicheskie osobennosti eh-pifitnoj (drozhzhevoj) mikroflory v Karakalpakstane// Trudy vtoroj mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii molodyh uchenyh «Indikaciya sostoyaniya okruzhayushchej sredy: teoriya, praktika, obrazovanie»/.25-28 aprelya 2013 goda: sbornik statej. – M.: ООО «Buki Vedi», 2013.
11. Toropova, G.V. Osobennosti zhiznedeyatel'nosti komnatnyh rastenij v sezonnoj dinamike po indikatornym simbiotrofnym bakteriyam: Dis.... kand. biol. nauk / G.V. Toropova. – Moskva, 2005. – 124 s.
12. Определитель бактерий Берджи. В 2 - х т. Т. 1, 2: Пер. с англ./ Под ред. Дзх. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дзх. Стейли, С. Уилльямса. - М.: Мир, 1997. 432 с., ил.