

ВИДОВОЙ СОСТАВ СООБЩЕСТВ ЭПИФИТНОЙ МИКРОФЛОРЫ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

SPECIES COMPOSITION OF EPIPHYTIC MICROFLORA COMMUNITIES OF PLANT UNDER CONDITIONS OF ANTHROPOGENIC LOAD

I. Kovaleva
N. Ivantsova
N. Penkova
L. Timchenko
O. Ivko

Summary. The article presents a study in which the qualitative composition of microorganisms associated with conifers was identified using the molecular genetic identification method MALDI-TOF mass spectrometry. As a result of the work done, 44 strains of microorganisms isolated from the phylloplane of plants of the family were identified: Cypress (*Cupressaceae*): genus *Thuja*, Juniper (*Juniperus*); Pine family (*Pinaceae*): genus *Pinus*, Spruce (*Picea*) and Yew family (*Taxaceae*): genus *Yew* (*Taxus*). When selecting plants, we considered their remote systematic position and some morphological features that affect the formation of epiphytic plant microflora. Studies of microbial-plant associations can be aimed both at a fundamental understanding of microbial communities and at the practical application of research results in various fields, such as: phytopathology, agriculture, ecology, and biotechnology (use in the development of biopreparations from associations of epiphytic microorganisms in the fight against phytopathogenic microflora).

Keywords: MALDI-TOF, mass spectrometry, phylloplane, epiphytic microflora, microbial communities, *Cupressaceae*, *Thuja*, *Juniperus*, *Pinaceae*, *Pinus*, *Picea*, *Taxaceae*, *Taxus*.

Исследование эпифитных бактерий имеет большую актуальность в современной науке и практике из-за их потенциального влияния на рост, развитие и здоровье растений [3]. Изучение эпифитной микрофлоры способствует формированию знаний о механизмах взаимодействия растений с микроорганизмами, а также их влияния на экосистемы в целом [8].

Ковалева Ирина Аркадьевна

кандидат биологических наук, доцент, ФГАОУ ВО
 «Северо-Кавказский федеральный университет»
 Kovalevairina3006@gmail.com

Иванцова Нина Владимировна

ФГАОУ ВО
 «Северо-Кавказский федеральный университет»
 Ninalvko57@gmail.com

Пенькова Надежда Ивановна

биолог лаборатории клинической микробиологии, ГБУЗ
 СК «Ставропольская краевая клиническая больница»
 ladyzimina@yandex.ru

Тимченко Людмила Дмитриевна

доктор ветеринарных наук, профессор, ФГАОУ ВО
 «Северо-Кавказский федеральный университет»
 ltimchenko@ncfu.ru

Ивко Ольга Алексеевна

учитель химии и биологии высшей категории,
 МОУ СОШ №4, г. Буденновск
 Ivcoolia213@yandex.ru

Аннотация. В статье представлено исследование, в ходе которого выявлен качественный состав микроорганизмов, ассоциированных с хвойными растениями с помощью молекулярно-генетического метода идентификации MALDI-TOF-масс-спектрометрии. В результате проделанной работы было идентифицировано 44 штамма микроорганизмов, выделенных с филлоплана растений семейства: Кипарисовые (*Cupressaceae*): род *Туя* (*Thuja*), Можжевельник (*Juniperus*); семейства Сосновые (*Pinaceae*): род *Сосна* (*Pinus*), *Ель* (*Picea*) и семейства Тисовые (*Taxaceae*): род *Тис* (*Taxus*).

При подборе растений нами учитывались их отдаленное систематическое положение и некоторые морфологические признаки, оказывающие влияние на формирование эпифитной микрофлоры растений. Исследования микробно-растительных ассоциаций могут быть направлены как на фундаментальное понимание микробных сообществ, так и на практическое применение результатов исследований в различных областях, таких как: фитопатологии, сельском хозяйстве, экологии и биотехнологии (использование при разработке биопрепаратов из ассоциаций эпифитных микроорганизмов в борьбе с фитопатогенной микрофлорой).

Ключевые слова: MALDI-TOF, масс-спектрометрия, филлоплан, эпифитная микрофлора, микробные сообщества, *Cupressaceae*, *Thuja*, *Juniperus*, *Pinaceae*, *Pinus*, *Picea*, *Taxaceae*, *Taxus*.

Микроорганизмы, ассоциированные с растениями, формируют сложные микробные сообщества филлопланы, ризопланы и ризосферы [4]. Условно состав таких комплексов можно разделить на эпифитную нормофлору и фитопатогенную [7]. Непатогенная составляющая (нормофлора) выполняет разнообразные функции: синтезирует как дополнительные питательные (аминокис-

лоты: глицин, глютамин, лейцин; витамины группы В), так и защитные вещества, например, многие ризосферные бактерии способны синтезировать различные фитогормоны: ауксины, цитокинины, гиббереллины, которые стимулируют рост растений и повышают их устойчивость к патогенам на разных стадиях развития [1; 6]. Поэтому изучение эпифитных бактерий является важной частью решения такой задачи, как повышение экологической устойчивости городских насаждений хвойных растений с применением биопрепаратов.

Изменения в окружающей среде могут приводить к трансформации как количественных показателей, так и качественного состава микроорганизмов, а также приводить к смене биотических взаимоотношений [10]. Например, в условиях антропогенной нагрузки, высокие концентрации токсинов могут привести к изменению функций микрофлоры, снижая ее способность к переработке питательных веществ, и тем самым способствовать развитию патогенов. Расширение ассортимента биопрепаратов, способных ликвидировать очаги развития вредителей городских насаждений, является необходимым компонентом для развития экологической обстановки и функционирования хвойных растений в условиях техногенной нагрузки [3].

Среди микроорганизмов имеются и антагонисты насекомых, которые представляют наибольшую опасность для целостности леса, например, биоинсектицид, в состав которого входит *Bac. thuringiensis var. dendrolimus* ЦМПМ В-3269 — продуцент d-эндотоксина, используется в борьбе с гусеницами сибирского шелкопряда. Действие таких биопрепаратов видоспецифично, что делает их безопасными для других организмов [12].

Таким образом, исследования в этой области могут привести к разработке новых методов улучшения городских биоценозов, снижению использования химических удобрений и пестицидов и созданию более благоприятных условий для существования отдельных видов хвойных растений в условиях техногенной нагрузки.

Цель исследования — изучение видового разнообразия микробных сообществ хвойных растений с целью определить резидентную и транзиторную микрофлору.

Предмет исследования — качественный состав эпифитных микробных сообществ, ассоциированных на филлоплане хвойных растений.

Задачи исследования:

- Выделить эпифитные микроорганизмы с филлоплана хвойных растений методом реплик;
- Провести анализ динамики качественного состава микроорганизмов, ассоциированных на хвойных насаждениях.

— Провести идентификацию микроорганизмов с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

Исследования проводились в 2023–2024 гг. в осенне-зимний и весенне-летний периоды в лаборатории геномных технологий базовой кафедры генетики и селекции ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет» г. Ставрополь. Объектами исследования послужила эпифитная микрофлора хвойных растений семейств: Сосновые (*Pinaceae*), Кипарисовые (*Cupressaceae*) и Тисовые (*Taxaceae*).

Выделение эпифитной микрофлоры проводили методом реплик филлоплана модельных растений на плотную питательную среду №1 (ГРМ), инкубировали в термостате 3 сут. при $t = 27^{\circ}\text{C}$, далее проводили отливку колоний в чистые культуры.

Идентификацию выделенных микроорганизмов осуществляли с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии в несколько этапов:

- нанесение материала, содержащего микробные белки, на специальную мишень, которая соответствует используемому типу MALDI-TOF масс-спектрометра;
- обработка нанесенного материала раствором матрицы — вещества, обеспечивающего включение микробных протеинов в свою структуру при высыхании, и лазер-индуцированное получение из этих протеинов ионизированных пептидов;
- установку мишени с обработанной матрицей микробным материалом в соответствующее устройство MALDI-TOF масс-спектрометра;
- внесение данных об источнике микробного материала (идентификационный номер) в программу компьютера, управляющего MALDI-TOF масс-спектрометром;
- запуск измерения и биоинформатической обработки полученных масс-спектров, нацеленных на идентификацию таксономической принадлежности исследуемых микроорганизмов [10; 13].

В соответствии с целью и задачами работы, путём сопоставления получаемых масс-спектров белков с обширной базой данных удалось идентифицировать 44 штамма, относящиеся к 18 родам эпифитных микроорганизмов (табл. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о сопряженном развитии микрофлоры хвойных, так в результате исследования определен резидентный состав эпифитов в осенне-зимний и весенне-летний периоды: *Bacillus siamensis*, *Bacillus mojaviensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Planomicrobium chinense*, а также транзиторный видовой состав, связанный со сменой погодных условий и фитонцидной активно-

Таблица 1.

Качественный состав микроорганизмов, ассоциированных на хвойных насаждениях за 2023–2024 гг.

№	2023 г. Осенне-зимний период	2024 г. Весенне-летний период
1.	<i>Bacillus siamensis*</i> <i>Bacillus mojavensis*</i> <i>Bacillus pumilus*</i> <i>Bacillus subtilis*</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus oceanisediminis</i> <i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus siamensis*</i> <i>Bacillus mojavensis*</i> <i>Bacillus pumilus*</i> <i>Bacillus subtilis*</i> <i>Bacillus halotolerans</i> <i>Bacillus atrophaeus</i> <i>Bacillus flexus</i> <i>Bacillus cohnii</i> <i>Bacillus methylotrophicus</i>
2.	<i>Lysinibacillus fusiformis*</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis*</i> <i>Lysinibacillus sphaeticus</i> <i>Lysinibacillus macrolides</i>
3.	<i>Paenibacillus motobuensis</i> <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> <i>Paenibacillus lautus</i>	<i>Paenibacillus amulolyticus</i>
4.	<i>Planomicrobium chinense*</i>	<i>Planomicrobium chinense*</i>
5.	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
6.	<i>Clostridium septicum</i> <i>Clostridium baratii</i>	<i>Clostridium clostridioforme</i>
7.	<i>Dietzia natronolimnaea</i>	–
8.	<i>Pseudozyma aphidis</i>	–
9.	<i>Mannheimia varigena</i>	–
10.	<i>Rhizopus arrhizus</i>	–
11.	<i>Trichoderma asperelloides</i>	–
12.	<i>Candida catenulata</i>	–
13.	–	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
14.	–	<i>Lactobacillus fermentum</i>
15.	–	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
16.	–	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
17.	–	<i>Morganella morganii</i>
18.	–	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>

Примечание: * — штаммы, выявленные в зимне-осенний и весене-летний период

стью хвойных: *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus oceanisediminis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus halotolerans*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus flexus*, *Bacillus cohnii*, *Bacillus methylotrophicus*, *Paenibacillus motobuensis*, *Paenibacillus*

glucanolyticus, *Paenibacillus lautus* *Paenibacillus amulolyticus*, *Lysinibacillus sphaeticus*, *Lysinibacillus macrolides* *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus hominis*, *Clostridium septicum*, *Clostridium baratii*, *Clostridium clostridioforme*, *Dietzia natronolimnaea*, *Pseudozyma aphidis*, *Mannheimia varigena*, *Rhizopus arrhizus*, *Trichoderma asperelloides*, *Candida catenulate*, *Brevibacillus laterosporus*, *Lactobacillus fermentum*, *Enterobacter cancerogenus*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Morganella morganii*, *Rhodococcus rhodochrous*.

Анализ качественного состава показал, что в основном преобладают симбиотические грамположительные споровые формы в течение осенне-зимнего и весене-летнего периодов. Эти виды микроорганизмов эффективно конкурируют с фитопатогенными грибами путем производства антибиотиков или литических ферментов и уже входят в состав многих биопрепаратов для защиты растений от патогенов, а также используются для мониторинга экосистем и биоремедиации.

В осенне-зимний период были выявлены потенциально патогенные микроорганизмы: *Clostridium septicum*, *Clostridium baratii*, *Mannheimia varigena* которые как у животных, так и у людей являются возбудителями инфекционных заболеваний [5]. Это означает, что последние микроорганизмы не могут использоваться в целях производства биопрепаратов. Среди фитопатогенных микроорганизмов обнаружен *Rhizopus arrhizus* возбудитель мучороза культурных растений, что связано с меньшим количеством выработки фитонцидов и прекращением активной вегетации хвойных (табл. 2).

С помощью генетических (MALDI-TOF) и микробиологических (иммерсионная микроскопия) методов исследования обнаружены микромицеты: *Pseudozyma aphidis*, *Candida catenulate*, *Trichoderma asperelloides*, *Rhizopus arrhizus*. Следует отметить антагонистические свойства бактериальной микрофлоры по отношению к грибковой, так как в полученной накопительной среде бактерии практически полностью подавляли рост микромицетов. На способность бактерий ингибировать грибы, скорее всего, влияет конкуренция за рецепторные участки (сайты связывания), питательные вещества и факторы роста. Кроме того, выработка перекиси водорода (H₂O₂) и высвобождение органических кислот, таких как: молочная и уксусная кислоты, также участвуют в противогрибковых механизмах многих бактерий [12].

Видовой состав идентифицированных микроорганизмов в весене-летний период представлен с преобладанием споровых грамположительных бактерий. Патогенная микрофлора не была обнаружена, что, вероятно, связано с пиком фитонцидной активности у большинства хвойных пород в летний период, подавляющей развитие фитопатогенов (табл. 3).

Таблица 2.

Видовой состав эпифитной микрофлоры хвойных (осенне-зимний период, 2023 г.)

Семейства хвойных Группы мик-мов	Сосновые (<i>Pinaceae</i>)	Кипарисовые (<i>Cupressaceae</i>)	Тисовые (<i>Taxaceae</i>)
Гр+ микроорганизмы	<i>Paenibacillus motobuensis</i> , <i>Clostridium septicum</i> , <i>Staphylococcus hominis</i> , <i>Dietzia natronolimnaea</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Clostridium baratii</i> , <i>Planomicrobium chinense</i>	<i>Bacillus oceanisediminis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus mojavensis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus siamensis</i> , <i>Planomicrobium chinense</i> , <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> , <i>Paenibacillus lautus</i>
Гр – микроорганизм	–	<i>Mannheimia varigena</i>	–
Микромицеты	<i>Trichoderma asperelloides</i> , <i>Pseudozyma aphidis</i>	<i>Candida catenulata</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
Фитопатогенные	<i>Rhizopus arrhizus</i>		
Условно-патогенные для человека	<i>Clostridium septicum</i> , <i>Clostridium baratii</i>		
Общие микроорганизмы	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Planomicrobium chinense</i>		

Таблица 3.

Видовой состав эпифитной микрофлоры хвойных растений (весенне-летний период, 2024 г.)

Семейства хвойных Группы мик-мов	Сосновые (<i>Pinaceae</i>)	Кипарисовые (<i>Cupressaceae</i>)	Тисовые (<i>Taxaceae</i>)
Гр+ микроорганизмы	<i>Brevibacillus laterosporus</i> <i>Paenibacillus amulolyticus</i> <i>Bacillus siamensis</i> <i>Bacillus halotolerans</i> <i>Bacillus flexus</i> <i>Bacillus mojavensis</i> <i>Clostridium clostridioforme</i>	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> <i>Lysinibacillus fusiformis</i> <i>Lysinibacillus macrolides</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Bacillus siamensis</i> <i>Bacillus atrophaeus</i> <i>Bacillus pumillus</i> <i>Bacillus cohnii</i>	<i>Planomicrobium chinense</i> <i>Lysinibacillus sphaeticus</i> <i>Staphylococcus warneri</i> <i>Rhodococcus rhodochrous</i> <i>Bacillus siamensis</i> <i>Bacillus halotolerans</i> <i>Bacillus methylotrophicus</i> <i>Bacillus atrophaeus</i> <i>Bacillus subtilis</i>
Гр — микроорганизм	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	<i>Enterobacter cancerogenus</i> <i>Morganella morganii</i>	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
Микромицеты	–	–	–
Фитопатогенные	–		
Условно-патогенные для человека	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> , <i>Clostridium clostridioforme</i> , <i>Enterobacter cancerogenus</i> , <i>Morganella morganii</i>		
Общие микроорганизмы	<i>Bacillus siamensis</i> , <i>Enterobacter cancerogenus</i>		

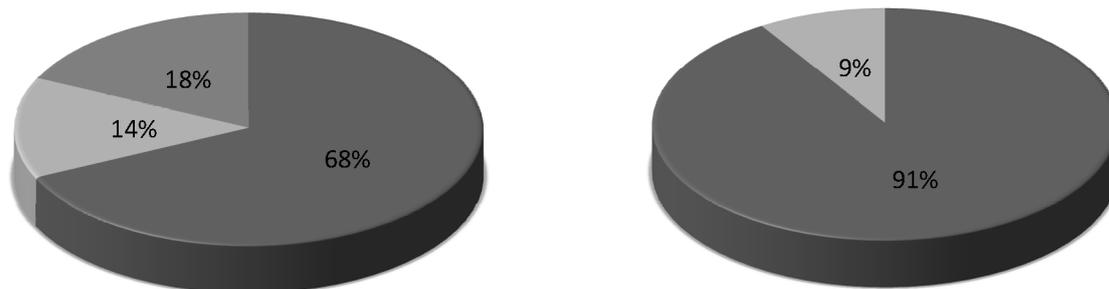


Рис. 1. Соотношение микроорганизмов эпифитной микрофлоры за 2023–2024 гг.:
А — осенне-зимний период; Б — весенне-летний период.

Большая часть выделенных микроорганизмов являются спорообразующими, что является очень перспективным в изучение таких микробных ассоциаций, так как позволяет на их основе повышать эффективность действия и рентабельность биопрепаратов (рис. 1).

Таким образом, метод идентификации микроорганизмов с использованием MALDI-TOF масс-спектрометров способен выявить уникальный набор белков исследуемых микроорганизмов — своеобразный «отпечаток пальца», с помощью чего проходит надежная и точная идентификация до вида путём сопоставления получаемых масс-спектров белков с обширной базой данных.

В результате выделены микроорганизмы, которые присутствуют постоянно на хвойных растениях: *Bacillus siamensis*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtillus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Planomicrobium chinense*, что позволяет нам сделать вывод о применении их в ка-

честве основы для биопрепаратов. Задачей дальнейшего исследования является изучение данных микроорганизмов на антифунгицидные и антибактериальные свойства по отношению к фитопатогенам с целью разработки новых методов биостимуляции и биозащиты хвойных растений.

В результате проделанной работы выделены микроорганизмы для дальнейших исследований в качестве составляющих компонентов биопрепаратов, которые составляют ключевую роль в росте и развитии растений. Используя молекулярно-генетический метод идентификации MALDI-TOF-масс-спектрометрии, удалось определить до вида 44 штамма принадлежащих к 18 родам эпифитных микроорганизмов хвойных растений. Динамика развития эпифитной микрофлоры непостоянна и зависит от экологических факторов, фитонцидной активности и фазы вегетации хвойных.

ЛИТЕРАТУРА

- ГОСТ 21507–2013 Защита растений. Термины и определения. М.: Стандартинформ, 2014. 23 с.
- Возняковская Ю.М. Взаимоотношения растений с микроорганизмами ризосферы и филлосферы. Л.: Колос, 1976. С. 141–143.
- Воронцов А.И. Биологическая защита леса. М.: Лесная промышленность, 1984. 264 с.
- Гарипова С.Р. Формирование продуктивности и стрессоустойчивости бобовых растений в ассоциации с эндофитными бактериями // Успехи современной биологии. 2012. Т.132(5). С. 493–505.
- Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г., Багирова С.Ф. Общая и молекулярная фитопатология. М.: «Общество фитопатологов», 2001. 301 с.
- Заикина, И.А. Экологическая роль бактериального сообщества эпифитов филлосферы в жизнедеятельности растений — автореф...дис. кан. био. наук. — С.: ВАК РФ, 2008. — 12 с.
- Киреева Н.А. Экология микроорганизмов: учебное пособие. Уфа: РИО БашГУ, 2004. 121 с.
- Лысак В.В. Важнейшие группы микроорганизмов: пособие. Минск: БГУ, 2012. 92 с.
- Максимов И.В., Абизгильдина, Р.Р., Пусенкова, Л.И. Стимулирующие рост растений микроорганизмы как альтернатива химическим средствам защиты от патогенов // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 4. С. 373–385.
- Нетрусов А.И. Экология микроорганизмов. М.: Академия, 2004. 198 с.
- Онищенко Г.Г. Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08.

© Ковалева Ирина Аркадьевна (KovalevaIrina3006@gmail.com); Иванцова Нина Владимировна (Ninalvko57@gmail.com);
Пенькова Надежда Ивановна (ladyzimina@yandex.ru); Тимченко Людмила Дмитриевна (ltimchenko@ncfu.ru);
Ивко Ольга Алексеевна (lvcoolia213@yandex.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»