

На правах рукописи

Филипъчева Юлия Анатольевна

ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM*
РАЗЛИЧНЫХ РАСТИТЕЛЬНО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ

03.02.08 – экология (биологические науки)
03.02.03 – микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов – 2011

Работа выполнена в государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» на кафедре биохимии и биофизики и в УРАН Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов в лаборатории иммунохимии

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Коннова Светлана Анатольевна

кандидат биологических наук, с.н.с.
Бурыгин Геннадий Леонидович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Сачков Сергей Анатольевич

доктор биологических наук, профессор
Щербаков Анатолий Анисимович

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск

Защита диссертации состоится «18» февраля 2011 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 212.243.13 при государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83; E-mail: biosovet@sgu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич ГОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Автореферат разослан «__» января 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

С.А. Невский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В исследованиях в области почвенной микробной экологии преобладают два основных подхода. Во-первых, микроорганизмы рассматриваются как интегральная часть растительного сообщества; во-вторых, почвенные микроорганизмы изучаются с точки зрения их собственных интересов по отношению к растению, обеспечивающему их жизнедеятельность (Ohtonen, 1997; Wardle, Giller, 1997; Steenhoudt, Vanderleyden, 2000). Одним из важных свойств ризобактерий, в том числе представителей рода *Azospirillum*, является их способность к азотфиксации в микроаэробных условиях. Вклад микробной азотфиксации в круговорот азота в природе существенен. В зоне умеренного климата продуктивность ассоциативной азотфиксации достигает 50–150 кг/га за сезон, а в тропиках – 200–600 кг/га, т.е. приближается к уровню эффективности симбиотической азотфиксации (Аристовская, 1985).

Для микроорганизмов, в частности, для почвенных диазотрофных ассоциативных бактерий рода *Azospirillum*, растения являются средой обитания, которая заселяется на конкурентной основе, благодаря мобилизации адаптивных возможностей, выработанных в процессе эволюции. В ходе совместного существования микроорганизмов и растений формируются различные нормы реакции взаимодействующих сторон как следствие адаптиогенеза к новым условиям. Выяснение механизмов этих взаимодействий является одной из важнейших проблем современной экологии (Нетрусов и др., 2004; Atlas, Bartha, 1998). Для азоспирилл характерно чрезвычайное разнообразие заселяемых растений, что говорит о многочисленности экологических стратегий, реализуемых данными бактериями, а также их широких адаптационных возможностях (Мулюкин и др., 2009; Boyer et al., 2008). Среди них – способность к адгезии, колонизации, продукции физиологически активных веществ, синтезу антибиотиков, сидерофоров, деструкции многих поллютантов и т.д. (Муратова и др., 2004; 2005; Steenhoudt, Vanderleyden, 2000; Bashan et al., 2004).

Важную роль в микробно–растительных взаимодействиях играют высокомолекулярные вещества, локализованные на поверхности азоспирилл, в том числе полисахаридсодержащие (Коннова и др., 1995; 2001; 2005в; 2008; Федоненко и др., 2001; Матора и др., 2005; 2008; Del Gallo, Haegi, 1990; Skvortsov and Ignatov, 1998; Fedonenko et al., 2004). Среди них особый интерес представляет исследование липополисахаридов (ЛПС) или О-антигенов азоспирилл, как правило, содержащих антигенные детерминанты, определяющие серологическую специфичность бактерий и доступные для взаимодействия с клетками других организмов. К настоящему моменту проведено изучение структуры (хемотипа) и серологических свойств О-антигенов только 13 штаммов азоспирилл, которые разделены на две серогруппы (Коннова и др., 2008; Смолькина и др., 2010). Исследования выполнены главным образом на типовых культурах, среди которых микроорганизмы, изолированные из почв Саратовской области, единичны.

Дальнейшее изучение серологических особенностей О-антигенов бактерий рода *Azospirillum*, особенно с привлечением большой выборки местных штаммов, является актуальным как для таксономических исследований, так и для выяснения роли ЛПС при формировании ассоциативных и эндофитных симбиозов со многими высшими растениями. Разнообразие экологических стратегий, реализуемых данными бактериями, а также их значительный адаптационный потенциал делают исследование серологических свойств азоспирилл актуальным как для экологии, так и для микробиологии.

Цель и задачи исследования. Цель работы – охарактеризовать эколого-физиологические и серологические особенности бактерий рода *Azospirillum*, изолированных из различных растительно-бактериальных сообществ.

Для достижения указанной цели решались следующие задачи:

1. На основе применения эколого-иммунологического подхода к изучению растительно-бактериальных ассоциаций провести серотипирование бактерий рода *Azospirillum*, изолированных из различных растений в разных регионах.

2. Сравнить адаптивные возможности азоспирилл, различающихся по серологическим свойствам бактериальной поверхности, при колонизации корней проростков пшеницы.

3. Исследовать эколого-физиологическую активность популяций разных штаммов бактерий рода *Azospirillum* по воздействию на морфометрические параметры растительного партнера *in vitro*.

4. Провести сравнительный анализ эколого-физиологической активности азоспирилл по отношению к однодольным и двудольным растениям на образцах почв Саратовской области *in situ*.

Научная новизна работы. В работе обоснован и применен эколого-иммунологический подход при изучении ассоциативных взаимоотношений бактерий рода *Azospirillum* с растительными партнерами. Предложена схема серотипирования 70-ти штаммов бактерий рода *Azospirillum* на основании их эколого-физиологических и серологических особенностей. Исследованы адаптивные возможности при образовании ассоциативных отношений с растениями популяций азоспирилл, изолированных из сообществ с различными растительными объектами, в связи с особенностями серологических свойств их клеточной поверхности. Впервые установлена способность у популяций штаммов *A. lipoferum* SR38 и SR61 и *A. brasilense* SR8, SR41, SR64 и SR87 стимулировать рост проростков мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L. cv. Саратовская 29) при инокуляции бактериями в концентрации 10^8 м.к./мл. В данной работе впервые была показана способность популяции штамма *A. brasilense* SR75 эффективно вступать в ассоциативные отношения с однодольными (пшеница и кукуруза) и двудольными (рапс и подсолнечник) растениями *in situ* на разных почвах (черноземе обыкновенном, каштановой типичной, солонце лугово-каштановом) Саратовской области.

Практическая значимость работы. Результаты исследований по серологической классификации бактерий рода *Azospirillum* могут быть рекомендованы для экспресс-диагностики, экологического мониторинга, а также прогнозирования фитостимулирующей активности данных бактерий в

составе различных природных сообществ. Предложенный эколого-иммунологический подход к серотипированию бактерий рода *Azospirillum* может быть применён в ряде экологических, биотехнологических и хемотаксономических исследований сотрудниками институтов и лабораторий, занимающихся изучением ассоциативных симбиозов, а также микробиоценозов почвы в целом. Результаты диссертационной работы использованы при подготовке учебно-методического пособия «Руководство для малого практикума по микробиологии» для студентов, обучающихся по специальности «Экология» (Саратов, 2008). Полученные данные были использованы при выполнении плановых НИР в лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН и на кафедре биохимии и биофизики СГУ. Работа выполнена при частичном финансировании грантом Президента РФ на поддержку молодых российских ученых и ведущих научных школ НШ-6177.2006.4.

Апробация работы. Основные положения диссертации были представлены на: научной конференции студентов и аспирантов биологического факультета СГУ им. Н.Г. Чернышевского (Саратов, 2005); международной конференции «Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды» (Саратов, 2005); международной научной конференции «Modern problems of microbiology and biotechnology» (Одесса, 2007); международной научно-практической конференции «Вавиловские чтения» (Саратов, 2008, 2009, 2010); IV-той и V-той межрегиональных конференциях молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2008, 2010); XII-той международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2008); V-той молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2009); Первых международных Беккеровских чтениях (Волгоград, 2010).

Декларация личного участия автора. Экспериментальные исследования выполнялись автором лично или при непосредственном участии в составе научных групп в период с 2004 по 2010 гг. Анализ полученных данных, их интерпретация и оформление осуществлены автором самостоятельно. В совместных публикациях вклад соискателя составил от 40 до 70%.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 работ, из них две статьи в журналах, рекомендованных Перечнем ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, содержащего 289 отечественных и зарубежных источников, четырех приложений. Работа изложена на 142 страницах, содержит 23 рисунка и 9 таблиц.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Эколого-иммунологический подход в изучении взаимодействия бактерий рода *Azospirillum* с растительными партнерами может быть использован для прогнозирования эффективности ассоциативного симбиоза.

2. Результаты серотипирования 70-ти штаммов бактерий рода *Azospirillum* являются существенным дополнением для построения системы серологической классификации бактерий, необходимой для штаммовой идентификации их в растительно-бактериальных сообществах.

3. Особенности серологических свойств О-антигена позволяют дополнить известные ранее серотип I – бактериями *Azospirillum* sp. SR81, серотип II – *A. brasilense* SR14, а бактерии *A. lipoferum* Sp59b выделить из серотипа II и вместе с одиннадцатью другими штаммами *A. lipoferum* объединить в серотип III.

4. Адаптивные возможности популяции штамма *A. brasilense* SR75 позволяют данным бактериям эффективно вступать в ассоциативные взаимоотношения как с однодольными, так и с двудольными растительными партнерами в условиях разных почв Саратовской области *in situ*.

Содержание работы

Во введении обосновывается актуальность исследования, сформулированы основная цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования.

Глава 1. ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АССОЦИАТИВНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM* (обзор литературы)

В главе охарактеризованы бактерии рода *Azospirillum* как представители ризосферных микроорганизмов, их распространение в разных географических и климатических зонах, в том числе и в Саратовской области, описаны стратегии жизни азоспирилл, реализуемые в ходе адаптации к разнообразным местообитаниям, и роль в этом процессе компонентов бактериальной поверхности.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на базе кафедры биохимии и биофизики СГУ и лаборатории иммунохимии УРАН Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов в период с 2004 по 2010 год.

Объектом исследований служили 70 штаммов ассоциативных бактерий рода *Azospirillum*, относящиеся к семи видам (*A. amazonense*, *A. brasilense*, *A. doebereinae*, *A. irakense*, *A. lipoferum*, *A. picis*, *A. thiophilum*), из которых 67 штаммов выделено из ризосферы растений подсемейства настоящие злаки, трибы: бородачевниковые (Германия, Россия, Эквадор), мятликовые, костровые и овсовые (Россия), просовые (Бразилия, Индия, Россия), пшеницевые (Бразилия, Россия); один штамм – из ризосферы растения (*Sericostoma pauciflorum* L.) семейства бурачниковых; по одному штамму – из микробиоценозов серного мата сульфидного источника (Россия) и отработанного дорожного топлива (Китай). Систематика растений семейства

злаков приведена по Н.Н. Цвелеву (1976). Бактериальные культуры были предоставлены сотрудниками коллекции ризосферных микроорганизмов УРАН Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов. Бактерии выращивали при 30°C на синтетической селективной для азоспирилл малатной среде (Döbereiner, Day, 1976) до окончания экспоненциальной фазы роста. В качестве растительных объектов использовали подсолнечник масличный (*Helianthus annuus* L. cv. Саратовский 20), рапс (*Brassica napus* L. cv. Веймар), кукурузу (*Zea mays* L. cv. Диана) и пшеницу (*Triticum aestivum* L. cv. Саратовская 29). Отбор почвенных образцов и дальнейшее определение типа почв проводили в соответствии со стандартными методиками (Теппер и др., 2004; Болдырев, Пискунов, 2006).

В экспериментах использованы антитела (Ат) к О-антигенам (Коннова и др., 2006; Bogatyrev et al., 1992) бактерий, изолированных из ризосферы различных растений в разных регионах: пшеницы – *A. brasilense* Sp107 (Ат/Sp107), Sp245 (Ат/Sp245) и *A. lipoferum* Sp59b (Ат/Sp59b) (Бразилия), *A. brasilense* SR55 (Ат/SR55_{лпс}) и SR80 (Ат/SR80) (Россия); росички – *A. brasilense* Sp7 (Ат/Sp7) (Бразилия); кукурузы – *A. brasilense* JM125A2 (Ат/JM125A2) (Эквадор); африканского проса – *A. brasilense* S17 (Ат/S17_{лпс}) (Индия); риса – *A. irakense* KBC1 (Ат/KBC1) (Ирак); типчака – *A. lipoferum* SR16 (Ат/SR16) (Россия). Для подтверждения родовой принадлежности использованы Ат, полученные на интактные клетки *A. brasilense* Sp7 (Ат/7).

Двойную радиальную иммунодиффузию проводили по стандартной методике (Ouchterlony, Nilsson, 1979) с препаратами О-антигенов, полученными экстракцией ЭДТА-содержащим буфером (Leive et al., 1968). Непрямой иммуноферментный анализ (вариант ELISA) проводили, как описано в работе А.И. Красова (2009). Реакцию агглютинации ставили по стандартной методике (Практикум по иммунологии, 2004). Дот-анализ целых бактериальных клеток и ЭДТА-экстрактов проводили по методике, описанной в статье В.А. Богатырева и др. (1992).

Выявление способности бактерий рода *Azospirillum* к колонизации корней проростков пшеницы проводили в соответствии с работой Егоренковой и др. (2010). В экспериментах по изучению влияния азоспирилл на суточные проростки пшеницы использовали методику Н.В. Евсеевой и др. (2010) с модификациями.

Для исследования влияния бактерий рода *Azospirillum in situ* были использованы образцы следующих почв: чернозема обыкновенного, каштановой типичной и солонча лугово-каштанового. В качестве модели «неплодородной почвы» был взят речной песок. Бактерии вносили в виде концентрированной суспензии в забуференном физиологическом растворе из расчета 1×10^8 м.к./г почвы. В экспериментах были использованы семена подсолнечника, рапса, кукурузы и пшеницы. Культивирование растений проводили при температуре 23–25°C со световым периодом 14/10 ч (день/ночь), интенсивности освещения 8000 люкс в течение 28 дней. В каждом эксперименте проводили учет морфометрических и морфофизиологических параметров 15–20 растений.

Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Для статистической обработки данных использовали параметрический t-критерий Стьюдента. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0.05$ (Ашмарин, 1974; Урбах, 1975). Расчёт результатов осуществляли с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0, MS Excel 2003.

Глава 3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM* РАЗНЫХ РАСТИТЕЛЬНО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ

При изучении популяций чистых культур бактерий рода *Azospirillum*, выделенных из разных растительно-микробных сообществ, был использован эколого-иммунологический подход. Такой подход предполагает комплексное изучение, включающее исследование не только серологических свойств бактериальной поверхности, но и влияния на эти свойства места и объекта выделения бактерий. У азоспирилл среди мажорных поверхностных антигенов наиболее вариабельным, а следовательно, и более значимым для иммунохимического изучения, является соматический, или О-антиген (Матора и др., 2002; 2008). На основании сходства и различий серологических свойств О-антигенов исследованные бактерии рода *Azospirillum* были разделены на четыре серотипа.

Отнесенные к серотипу I штаммы выделены преимущественно из ризосферы растений триб пшеницевые и мятликовые подсемейства настоящие злаки в России и Бразилии. Несмотря на то, что для пяти из семи отнесенных к серотипу I штаммов азоспирилл установлена идентичность повторяющегося звена О-специфических полисахаридов (ОПС) (Коннова и др., 2008), выявленные различия в серологических свойствах О-антигенов позволили разделить серотип на семь серовариантов (табл. 1). Кроме того, к данному серотипу отнесена культура *A. brasilense* S27, выделенная в Пакистане из ризосферы кустарника (*Sericostoma pauciflorum* L.) семейства бумбачниковых.

Серотип II включает микроорганизмы, выделенные из ризосферы растений четырех триб – мятликовые, свиноевые, пшеницевые, рисовые – подсемейства настоящие злаки в Бразилии, Ираке, России и США. Из семи штаммов азоспирилл, отнесенных к серотипу II, для четырех описана структура повторяющегося звена ОПС (Коннова и др., 2006; 2008). У бактерий *A. irakense* KBC1 и *A. brasilense* Cd ОПС идентичны по моносахаридному составу повторяющегося звена, но отличаются по структуре, что проявилось в различии антигенных свойств ЛПС и позволило отнести данные штаммы в разные сероварианты серотипа II (табл. 1).

Из бактерий рода *Azospirillum*, отнесенных к серотипу III, большая часть выделена из ризосферы разных сортов пшеницы и ржи (триба пшеницевые), но некоторые – из дикорастущих злаков (трибы мятликовые и тимофеевковые) подсемейства настоящие злаки в России.

Характеристика серологических свойств О-антигенов азоспирилл,
отнесенных к серотипам I и II

Серовариант	Характеристика сероварианта										Штаммы, отнесенные к сероварианту
	Ат/Sp7	Ат/Sp245	Ат/Sp59b	Ат/JM125A2	Ат/S-17лпс	Ат/SR55лпс	Ат/SR80	Ат/Sp107	Ат/SR16	Ат/KBC1	
серотип I											
A				+	++	—	—	+	—	—	<i>A. brasilense</i> SR75
B				+	+	—	—	++	—	+	<i>A. brasilense</i> S27
C	—	++	—	+	+	—	—	+	—	+	<i>A. brasilense</i> Sp107
D				+	+	—	—	+	—	—	<i>A. brasilense</i> Sp245
E				+	+	—	—	++	—	—	<i>A. brasilense</i> SR15
F				—	++	—	—	+	—	—	<i>Azospirillum</i> sp. SR81
G	—	+	—	+	++	—	—	—	—	+	<i>A. lipoferum</i> RG20a
серотип II											
A			+	+	++	—	+	—	—	—	<i>A. brasilense</i> Sp7
B				+	+	+	+	—	—	—	<i>A. brasilense</i> SR55
C	++			+	+	—	+	—	—	—	<i>A. brasilense</i> 7k2
D		—	—	+	+	—	—	—	—	—	<i>A. brasilense</i> Cd
E	+			+	++	—	+	—	—	—	<i>A. brasilense</i> SR80
F				+	—	+	+	—	—	—	<i>A. brasilense</i> SR14
G				+	++	н/о	н/о	—	+	++	<i>A. irakense</i> KBC1

Примечание: «++», «+» – наличие взаимодействия О-антигена с Ат
 («++») – две полосы преципитации в ИД, «+» – одна полоса преципитации в ИД),
 «—» – отсутствие взаимодействия О-антигена с Ат, «н/о» – не определялось

У большей части из них установлена высокая степень сходства серологических свойств О-антигена, на основании чего они были объединены в сероварианты С и D серотипа III (табл. 2). Однако у двух штаммов, изолированных с корней дикорастущих злаков, выявлены уникальные серологические свойства О-антигена, что позволило отнести их в отдельные сероварианты. О.Н. Конновой и др. (2004) показана идентичность моносакхаридного состава и структуры повторяющегося звена ОПС *A. brasilense* Cd и *A. lipoferum* Sp59b, но значительные отличия в антигенных свойствах их ЛПС, на основании чего указанные бактерии отнесены к разным серотипам. Возможно, отличия антигенных свойств являются адаптацией азоспирилл к своим растительным партнерам, относящимся к разным трибам (свиноевые и пшеницевые) подсемейства настоящих злаков.

Характеристика серологических свойств О-антигенов азоспирилл,
отнесенных к серотипу III

Серовариант	Характеристика сероварианта						Штаммы, отнесенные к сероварианту	
	Ат/Sp7	Ат/Sp245	Ат/Sp59b	Ат/JM125A2	Ат/S-17лпс	Ат/SR16		Ат/КВС1
A			++	+	++	+	—	<i>A. lipoferum</i> Sp59b
B				+	+	++	—	<i>A. lipoferum</i> SR38
C			+	+	+	—	—	<i>A. lipoferum</i> : SR33, SR35, SR61, SR62
D				+	—	—	—	<i>A. lipoferum</i> : SR43, SR65, SR85, SR98, SR99
E				—	—	—	—	<i>A. lipoferum</i> SR4

Примечание: «++», «+» – наличие взаимодействия О-антигена с Ат («++» – две полосы преципитации в ИД, «+» – одна полоса преципитации в ИД), «—» – отсутствие взаимодействия О-антигена с Ат

У бактерий *A. irakense* KBC1 и *A. lipoferum* Sp59b идентичен моносахаридный состав повторяющегося звена ОПС, но структура олигосахарида разная (Коннова и др., 2006), что сказывается на серологических свойствах О-антигена данных бактерий. Так, у штаммов отнесенных к серотипу III, не выявлено детерминант, связывающих Ат/КВС1, в отличие от азоспирилл других серотипов (табл. 2).

К серотипу IV отнесено 24 штамма *A. brasilense*, 11 штаммов *A. lipoferum*, а также по одному штамму *A. amazonense*, *A. doebereinae*, *A. irakense*, *A. picis*, *A. thiophilum* и четыре штамма *Azospirillum* sp., которые по различиям серологических свойств О-антигена были разделены на 18 серовариантов (табл. 3). Азоспириллы серотипа IV выделены из ризосферы растений подсемейства настоящие злаки, трибы бородачевниковые, костровые, мятликовые, овсовые, пшеницевые, свиноевые, а также из микробиоценозов отработанного дорожного топлива и серного мата.

Выявлена высокая степень сходства серологических свойств О-антигенов бактерий рода *Azospirillum*, выделенных с корней проса, перистошестинника (триба просовые) (*A. brasilense* S17, SR111) и сорго (*A. brasilense* SR115, *Azospirillum* sp. SR120), хотя имеются и некоторые различия, позволяющие отнести их к разным серовариантам (табл. 3). Установлено сходство О-антигена *A. thiophilum*, изолированного из микробиоценоза серного мата, с О-антигенами азоспирилл, выделенных из ризосферы растений, относящихся к разным трибам (бородачевниковые, пшеницевые, свиноевые) подсемейства настоящие злаки, что позволило объединить их в один серовариант H (табл. 3).

Бактерии рода *Azospirillum*, выделенные из ризосферы растений трибы бородачевниковые (сорго, веерник, кукуруза), отнесены только к серотипу IV. Вариабельность серологических свойств О-антигена бактерий *A. brasilense* и

A. lipoferum, выделенных из ризосферы пшеницы в Саратовской области, позволила включить их во все четыре серотипа.

Таблица 3

Характеристика серологических свойств О-антигенов азоспирилл, отнесенных к серотипу IV

Серовариант	Характеристика сероварианта							Штаммы, отнесенные к сероварианту
	Ат/Sp7	Ат/Sp245	Ат/Sp59b	Ат/JM125a2	Ат/S-17лпс	Ат/SR16	Ат/КВС1	
A	—	—	—	+	+++	—	+	<i>A. lipoferum</i> SR47
B	—	—	—	+	+++	—	—	<i>A. lipoferum</i> SR42
C	—	—	—	+	++	+	+	<i>A. brasilense</i> : SR56, SR88, SR100
D	—	—	—	+	++	—	+	<i>A. brasilense</i> : S17, SR7, SR64, SR37, SR52, SR57, SR60, SR92, SR96, SR103, <i>A. lipoferum</i> : SR46, SR77, SR94; <i>Azospirillum</i> sp.: SR59, SR74, SR79
E	—	—	—	+ / —	++	—	+	<i>Azospirillum</i> sp. SR120
F	—	—	—	+	+	+	+	<i>A. brasilense</i> SR111
G	—	—	—	+	+	—	+	<i>A. brasilense</i> : SR87, Br14
H	—	—	—	+	+	—	—	<i>A. amazonense</i> Am14, <i>A. brasilense</i> : SR50, SR41, <i>A. doebereineriae</i> DSM 13131 ^T , <i>A. lipoferum</i> SR54, <i>A. thiophilum</i> DSM 21654 ^T
I	—	—	—	+	+	+	—	<i>A. lipoferum</i> SR44
J	—	—	—	+	—	++	+	<i>A. lipoferum</i> SR16
K	—	—	—	+	—	—	—	<i>A. brasilense</i> : Jm125A2, Sp246
L	—	—	—	—	—	+	—	<i>A. lipoferum</i> SR5
M	—	—	—	+ / —	++	—	—	<i>A. brasilense</i> Jm6B2
N	—	—	—	— / +	+	—	+	<i>A. brasilense</i> SR115
O	—	—	—	+ / —	—	—	+	<i>A. brasilense</i> : SR8, KR77
P	—	—	—	— / +	—	—	+	<i>A. brasilense</i> SR72
Q	—	—	—	— / +	+	—	—	<i>A. brasilense</i> SR32
R	—	—	—	+	—	—	+	<i>A. irakense</i> KA3
S	—	—	—	+ / —	+	—	—	<i>A. picis</i> DSM 19922 ^T

Примечание: «++», «+» – наличие взаимодействия О-антигена с Ат («++» – две полосы преципитации в ИД, «+» – одна полоса преципитации в ИД), «—» – отсутствие взаимодействия О-антигена с Ат, «+ / —» и «— / +» – вариабельность взаимодействия О-антигена с Ат при культивировании бактерий на плотных/жидких питательных средах

Проведенные исследования позволили дополнить новыми штаммами предложенное ранее разделение на два серотипа (Коннова и др., 2008) тринадцати штаммов бактерий рода *Azospirillum*: серотип I – *Azospirillum* sp. SR81, а серотип II – *A. brasilense* SR14. Кроме того, использованный эколого-иммунологический подход позволил выявить более тонкие различия и выделить в отдельные серотипы бактерии *A. lipoferum* Sp59b и *A. brasilense* S17 (табл. 2, 3).

Антигенные детерминанты, взаимодействующие с Ат на О-антигены бактерий *A. brasilense* S17 и/или *A. brasilense* JM125A2, выделенных из ризосферы африканского проса (триба просовые) и кукурузы (триба бородачевниковые) соответственно, имеются у всех исследованных азоспирилл, за исключением двух штаммов (*A. lipoferum* SR4 и SR5, выделенных из ризосферы диких злаков триб тимофеевковые и костровые). Эпитопы, выявляемые Ат/JM125A2, имеются и у бактерий *A. picis*, изолированных из микробиоценоза отработанного топлива. Возможно, антигенные детерминанты, связывающиеся с Ат/JM125A2, имеют родовую специфичность, что требует дальнейшего изучения.

Серологические свойства О-антигена бактерий рода *Azospirillum*, не зависят от географического места их выделения. Так, к одному сероварианту отнесены азоспириллы, изолированные в различных климатических зонах, и наоборот, – изолированные в одной географической точке, разнесены в разные серотипы. Выявленное нами отсутствие жесткой приуроченности к климатическим условиям, возможно, объясняется показанной для некоторых штаммов азоспирилл способностью к факультативному эндосимбиозу с растениями, опосредующими взаимодействие бактерий с неблагоприятной средой (Schloter et al., 1998).

Глава 4. СПОСОБНОСТЬ К КОЛОНИЗАЦИИ И ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM IN VITRO*

Формирование ассоциативного симбиоза бактерий рода *Azospirillum* с растительными партнерами начинается с процесса колонизации растения. Первым этапом колонизации является адсорбция бактерий на корнях растений. Для сравнения адаптивных возможностей популяций чистых культур азоспирилл при колонизации проростков пшеницы был использован эколого-иммунологический подход.

Количество адсорбированных клеток популяций большинства штаммов, отнесенных к серотипам I и II, составило 10^8 м.к./см корня. Бактерии, отнесенные к серотипу III, адсорбировались на поверхности корня хуже, чем штаммы серотипов I и II (рис. 1). У азоспирилл серотипа III, большая часть которых выделена из ризосферы разных сортов пшеницы, количество клеток, сорбированных на поверхности корня составляло 10^7 м.к./см. Из бактерий рода *Azospirillum*, отнесенных к серотипу IV, адсорбционная способность к корням проростков пшеницы была изучена лишь у части штаммов в связи со сложностью выявления представителей данного серотипа методом ИФА в гомогенатах корней. Наибольшая способность к адсорбции выявлена у бактерий *A. lipoferum* SR46 и SR47 и составила 10^{10} м.к./см корня.

Однако не все штаммы, отнесенные к одному серотипу, обладали одинаковой способностью к колонизации пшеницы. Эколого-иммунологический подход позволил показать, что на адаптивные возможности бактерий при колонизации пшеницы оказывает влияние комплекс факторов

таких как серологические свойства клеточной поверхности, вид растительно-микробного сообщества первоначального изолирования штамма. Так, популяции бактерий *A. brasilense* Sp107 и Sp245, а также *A. lipoferum* RG20a были изолированы из ризосферы пшеницы в Бразилии, но серологические свойства бактерий *A. lipoferum* RG20a несколько отличаются от двух других штаммов (табл. 1), что сказывается на их адсорбционной способности (рис. 1). У бактерий *A. brasilense* Sp107 и S27 серологические свойства поверхности клетки очень похожи (табл. 1), но популяция штамма *A. brasilense* S27 изолирована из ризосферы растения семейства бумажниковых, что может быть причиной более низкой способности к колонизации корней пшеницы (рис. 1).

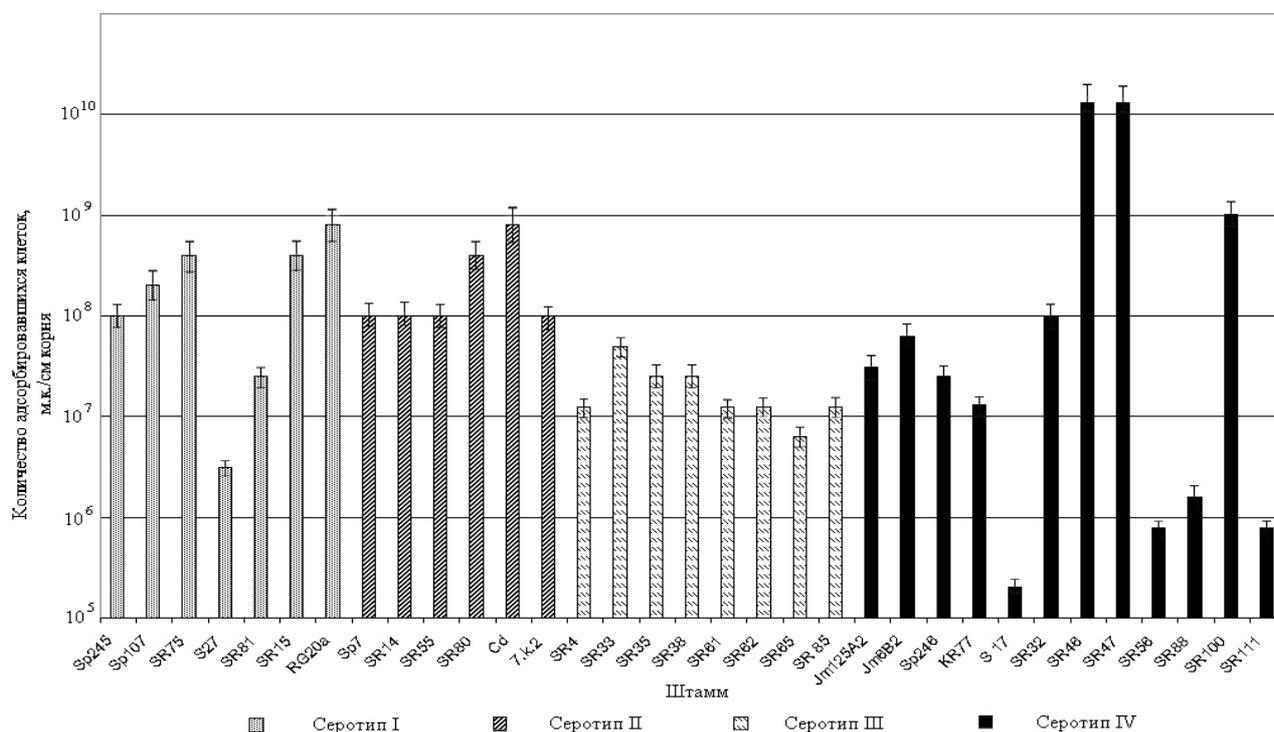


Рис. 1. Количество бактерий рода *Azospirillum*, отнесенных к серотипам I – IV, адсорбированных на корнях проростков пшеницы

Из азоспирилл, выделенных из ризосферы пшеницы и отнесенных к разным серотипам, на корнях проростков *T. aestivum* L cv. Саратовская 29 лучше адсорбировались бактерии, которые имели в составе клеточной поверхности антигенные детерминанты, связывающие At/Sp245 (серотип I). Из бактерий, выделенных с дикорастущих злаков, на корнях проростков пшеницы адсорбировалось больше клеток азоспирилл, изолированных из ризосферы растений, относящихся к трибам мятликовые и пшеницевые подсемейства настоящие злаки.

Ранее было показано положительное влияние азоспирилл в концентрации 10^5 – 10^7 м.к./мл на рост растений (Bashan et al., 1997), но лишь на ограниченном количестве штаммов. Кроме того, сообщалось об увеличении митотического индекса в клетках корня пшеницы, инокулированной взвесью азоспирилл в концентрации 10^8 м.к./мл (Evseeva et al., 2010). Нами было выявлено варьирование количества адсорбированных клеток азоспирилл

от 10^5 до 10^{10} м.к./см корня, но у большинства штаммов оно составляло 10^8 м.к./см. На основании вышеперечисленных фактов, для изучения эколого-физиологической активности популяций разных штаммов азоспирилл в отношении проростков пшеницы *in vitro*, была выбрана бактериальная концентрация 10^8 м.к./мл.

Морфометрические параметры (длина корней и побегов) растений, инокулированных азоспириллами серотипов I и II не отличались от таковых контрольных растений. Однако инокуляция азоспириллами серотипа I приводила к увеличению сухой массы корней на 30–50%.

Более выраженный эффект как на морфометрические, так и на морфофизиологические параметры пшеницы наблюдался от инокуляции азоспириллами серотипов III и IV. Бактерии рода *Azospirillum*, отнесенные к серотипу III, положительно влияли на рост побегов пшеницы, что сопровождалось увеличением их сухой массы более чем на 40%. Инокуляция пшеницы бактериями *A. lipoferum* SR38 и SR61 способствовала увеличению длины побега относительно контрольных растений на 167 и 122% соответственно. На рост корней пшеницы в длину наибольший эффект наблюдался от инокуляции бактериями *A. lipoferum* SR61 (72%). При инокуляции проростков пшеницы большей частью культур серотипа IV наблюдалось увеличение сухой массы побегов. Увеличению данного параметра более чем на 80% относительно контрольных растений способствовали популяции штаммов *A. brasilense*: SR8, SR41, SR64 и SR87 (табл. 4).

Таблица 4

Морфометрические и морфофизиологические параметры проростков пшеницы, инокулированных бактериями рода *Azospirillum*

Вид бактерий	Параметр	Длина побега	Длина корней	Сухая масса побегов	Сухая масса корней
	Штамм	M±m, %*			
<i>A. lipoferum</i>	SR38	167.3±18.3	51.6±5.6	102.1±10.1	78.9±7.9
	SR46	31.3±2.9	2.1±0.2	35.2±3.5	33.2±3.2
	SR47	26.6±2.8	7.8±0.8	37.5±3.8	22.3±2.4
	SR61	122.1±13.1	72.9±8.1	75.6±8.1	19.8±2.0
<i>A. brasilense</i>	SR8	70.1±8.5	96.7±9.5	101.7±10.1	80.1±7.9
	SR41	57.7±5.3	73.2±7.1	84.3±8.3	89.3±9.0
	SR64	5.8±0.8	-1.8±0.2	84.1±8.4	89.1±9.1
	SR87	47.8±4.9	63.9±6.3	84.2±8.5	71.2±7.1

Примечание: * Данные выражены в процентах от контроля. Контроль – среднее арифметическое значений исследованных параметров растений, выращенных без инокуляции азоспириллами

Инокуляция бактериями серотипа IV, за исключением популяций штаммов *A. brasilense* SR8, SR41 и SR87 (табл. 4), оказывала незначительное влияние (до 20%) на морфометрические параметры пшеницы. Бактерии *A. brasilense* SR64 не влияли на морфометрические параметры пшеницы, но

способствовали увеличению морфофизиологических параметров (сухой массы побегов – на 84, а корней – на 89%).

Установлено, что из бактерий, изолированных из ризосферы пшеницы, популяции шести штаммов проявили наибольшую эколого-физиологическую активность в отношении проростков пшеницы (табл. 4), из них пять отнесены нами к серотипу IV, а один (*A. lipoferum* SR61) – к серотипу III. Более высокая степень адсорбции (до 10^{10} м.к./см корня) не приводила к большей стимуляции ростовых параметров проростков пшеницы. При инокуляции азоспириллами, для которых в наших экспериментах была выявлена наибольшая степень адсорбции (*A. lipoferum* SR46 и SR47), наблюдалось увеличение длины и сухой массы побегов, а также сухой массы корней проростков пшеницы, но лишь на 20–30% (табл. 4).

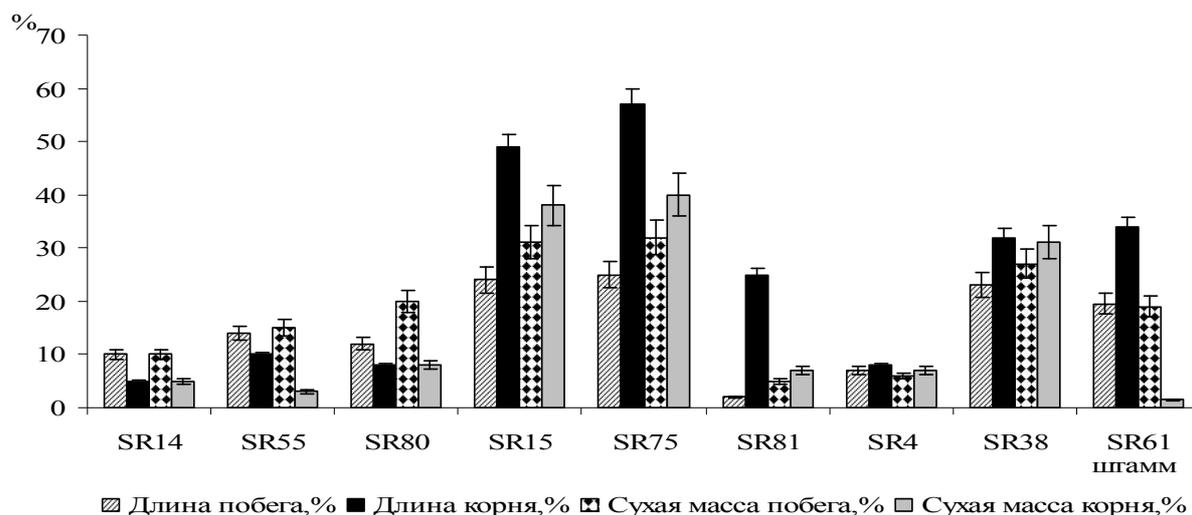
При инокуляции азоспириллами серотипов I и II в концентрации 10^8 м.к./мл наблюдалась высокая степень адсорбции (10^8 м.к./см корня), вероятно, поэтому мы наблюдали нивелирование их ростстимулирующего потенциала. Бактерии *A. lipoferum* SR38 и SR61, не отличаясь от других штаммов серотипа III по способности к адсорбции (10^7 м.к./см) на корнях проростков пшеницы, проявляли выраженный стимулирующий эффект. Таким образом, результаты проведенных нами экспериментов показывают актуальность использования комплексного эколого-иммунологического подхода в оценке перспективности отдельных штаммов азоспирилл, так как для многих исследованных культур не выявлено прямой корреляции адсорбционной активности с фитостимулирующей.

Глава 5. ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM* НА РОСТ ОДНОДОЛЬНЫХ И ДВУДОЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ НА ОБРАЗЦАХ ПОЧВ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ *IN SITU*

Известно, что при внесении в почву бактерий в концентрации 10^8 м.к./мл, только 10^6 м.к./мл окажутся доступными для взаимодействия с растительными объектами (Красов, 2009). При исследовании влияния азоспирилл на растения *in situ* было предварительно изучено действие на рост пшеницы *in vitro* популяций местных штаммов азоспирилл, отнесенных нами к серотипу I (*A. brasilense* SR15, SR75 и *Azospirillum* sp. SR81), серотипу II (*A. brasilense* SR14, SR55, SR80), серотипу III (*A. lipoferum* SR4, SR38, SR61) в концентрации 10^6 м.к./мл. Азоспириллы серотипа IV взяты в эксперимент не были из-за сложности выявления их иммунохимическими методами в почвенной суспензии.

Установлено, что в концентрации 10^6 м.к./мл наибольшей эколого-физиологической активностью в отношении проростков пшеницы обладают азоспириллы серотипа I (*A. brasilense* SR15 и SR75). Увеличение сухой массы побегов составило 31% (*A. brasilense* SR15) и 32% (*A. brasilense* SR75), а сухой массы корней – 39% (*A. brasilense* SR15) и 40% (*A. brasilense* SR75). Популяции штаммов серотипов II и III оказывали стимулирующее действие на рост проростков пшеницы, но значительно менее выраженное (рис. 2).

Бактерии *A. brasilense* SR15 и SR75 относятся к серотипу, наиболее распространенному в почвах Саратовской области (Красов, 2009), оказывают ростстимулирующий эффект на проростки пшеницы *in vitro*, но *A. brasilense* SR75, в отличие от *A. brasilense* SR15, лучше детектируется иммунохимическими методами, что связано с различиями в химической структуре О-антигенов данных штаммов (Коннова и др., 2008), все это определило использование в следующем этапе эксперимента популяции бактерий *A. brasilense* SR75.



Примечание: * Данные выражены в процентах от контроля. Контроль – среднее арифметическое значений исследованных параметров растений, выращенных без инокуляции азоспириллами

Рис. 2. Морфометрические и морфофизиологические параметры проростков пшеницы, инокулированных местными штаммами бактерий рода *Azospirillum*

Азоспириллы вместе с другими почвенными и ассоциативными бактериями способны в значительной степени влиять на рост и развитие растений, поэтому важным аспектом является конкурентоспособность бактерий рода *Azospirillum* в различных почвенных микробиоценозах. Особенно это важно учитывать для бактерий, вносимых в почву при выполнении агроботехнологических работ. При инокуляции в почву бактерии часто быстро удаляются из ценоза под действием конкурентного давления аутохтонных микроорганизмов. Для *A. brasilense* Sp245 А.И. Красовым (2009) было показано возрастание численности популяции бактерий в первую неделю после внесения их в образец почвы (чернозём южный) с последующим уменьшением количества микробных клеток практически до нуля к 30-му дню эксперимента. В связи с вышесказанным бактерии *A. brasilense* SR75 вносились в почву за один день до посадки проростков растений.

Поскольку эколого-физиологическая активность азоспирилл в значительной степени определяется плодородием почвы, т.е. прямо пропорциональна уровню стресса у растений, вызываемого недостатком

количества питательных веществ (Kapulnik et al., 1981), в эксперименте в качестве модели «неплодородной почвы» был использован речной песок.

Показано, что длина побегов и корней контрольных и инокулированных *A. brasilense* SR75 растений, выращенных в речном песке, отличалась незначительно, тогда как сухая масса у инокулированных растений была больше. Увеличение сухой массы побегов инокулированных растений пшеницы и подсолнечника составило 57, кукурузы – 41, рапса – 36%. Инокулированные *A. brasilense* SR75 растения имели более развитую корневую систему и большую площадь листьев по сравнению с контрольными.

Для сравнения эколого-физиологической активности популяций бактерий *A. brasilense* SR75 на разных (черноземе обыкновенном, каштановой типичной, солонце лугово-каштановом) почвах Саратовской области были использованы проростки однодольных (пшеница и кукуруза) и двудольных (подсолнечник) сельскохозяйственных растений. Исключение из эксперимента рапса было связано с медленным ростом данного растения, что при анализе результатов приводило бы к большой инструментальной погрешности.

На каштановой типичной почве длина побегов растений, инокулированных *A. brasilense* SR75, практически не отличалась от контрольных (табл. 5). Увеличение длины корней было более существенным: у подсолнечника – на 30, пшеницы – на 38, кукурузы – на 41%. У однодольных растений (пшеница и кукуруза), инокулированных *A. brasilense* SR75, выявлено увеличение сухой массы растений: побега – на 52 и 28%, а корней – на 45 и 57% соответственно. У инокулированных растений подсолнечника наблюдалось увеличение только сухой массы корней (66%).

Таблица 5

Морфометрические параметры (длина побега и корня) растений, выращенных на образцах разных почв Саратовской области

Вариант		Каштановая типичная		Чернозем обыкновенный		Солонец лугово-каштановый	
		длина побега	длина корня	длина побега	длина корня	длина побега	длина корня
		M±m, см					
кукуруза	опыт	20.7±1.8	21.9± 0.9*	28.4±2.7	33.8±3.9*	29.6±2.7*	20.4±2.1
	контроль	21.7±2.2	15.5±1.5	27.0±2.4	24.4±2.4	18.2±1.5	18.1±1.6
подсолнечник	опыт	12.1±1.9	9.0±0.7*	13.5±1.2	8.5±0.8*	18.8±1.5*	6.2±0.5
	контроль	11.1±0.9	6.9±0.6	13.5±1.0	6.0±0.5	12.7±1.1	6.2±0.6
пшеница	опыт	27.5±2.6	22.9±2.0*	31.4±3.0	24.6±2.3*	34.2±3.2*	17.0±1.7
	контроль	25.5±2.5	16.6±1.5	28.7±2.7	18.1±1.7	22.3±2.1	16.3±1.6

Примечание: * – наличие достоверных различий по отношению к контролю при уровне значимости $p < 0.05$

При выращивании растений на образце чернозема обыкновенного получены похожие результаты. У всех инокулированных растений наблюдалось увеличение длины корней на 35–40% (табл. 5). Однако увеличение сухой массы растений происходило только у подсолнечника (табл. 6).

Растения, инокулированные бактериями *A. brasilense* SR75, и выращенные на солонце лугово-каштановом, значительно отличались от контрольных растений развитием надземной части. Так, у кукурузы увеличение длины побега составляло 62%, а сухой массы – 84%. Длина побегов пшеницы и их сухая масса увеличились на 53%. Менее выраженная стимуляция роста наблюдалась у инокулированных азоспириллами растений подсолнечника (длина побега – на 48%, сухая масса побегов – на 45%). Инокуляция *A. brasilense* SR75 при выращивании на образце солонца лугово-каштанового только у подсолнечника стимулировала рост корней (табл. 5, 6).

Таблица 6

Морфофизиологические параметры (сухая масса побега и корней) растений, выращенных на образцах разных почв Саратовской области

Вариант		Каштановая типичная		Чернозем обыкновенный		Солонец лугово-каштановый	
		масса побега	масса корня	масса побега	масса корня	масса побега	масса корня
		M±m, мг					
кукуруза	опыт	3.2±0.2*	6.3±0.5*	5.5±0.5	7.2±0.7*	5.9±0.5*	6.5±0.6
	контроль	2.5±0.2	4.0±0.4	6.0±0.6	9.0±0.8	3.2 ± 0.3	6.0±0.5
подсолнечник	опыт	6.0±0.5	0.5*	5.6±0.5*	1.1±0.1*	9.3±0.8*	0.4*
	контроль	6.5±0.4	0.4	4.1±0.3	0.4±0.1	6.4±0.6	0.2
пшеница	опыт	3.8±0.4*	3.5±0.2*	4.2±0.4	3.3±0.3	4.3±0.4*	2.7±0.3
	контроль	2.5±0.3	2.4±0.2	3.8±0.4	3.2±0.3	2.8±0.3	2.5±0.2

Примечание: * – наличие достоверных различий по отношению к контролю при уровне значимости $p < 0.05$

Штамм *A. brasilense* SR75 изначально был выделен с корней проростков *T. aestivum* L. cv. Саратовская 29, поэтому образование системы «пшеница – *A. brasilense* SR75», вероятно, сопровождалось специфическими реакциями между микробной клеткой и растением-хозяином, и полученный результат можно считать положительным контролем.

Эколого-физиологическая активность бактерий *A. brasilense* SR75 как в отношении однодольных (кукурузы и пшеницы), так и двудольных (подсолнечника) растений проявлялась лучше на менее плодородных почвах. При выращивании на черноземе обыкновенном происходило увеличение длины корней, не сопровождавшееся изменением массы растений, на каштановой типичной почве – влияние азоспирилл проявлялось в увеличении сухой массы, но преимущественно корней растений, а на солонце лугово-каштановом,

напротив, выявлено значительное стимулирующее действие на надземную часть растений. Установленный ростстимулирующий эффект от инокуляции почвы бактериями *A. brasilense* SR75 перед посадкой растений свидетельствует о конкурентоспособности популяции данного штамма при колонизации корней растений на разных почвах Саратовской области.

ВЫВОДЫ

1. Построена система серотипирования популяций чистых культур 70-ти штаммов бактерий рода *Azospirillum* различных растительно-бактериальных сообществ, включающая четыре серотипа и 37 серовариантов.

2. Эколого-иммунологический подход позволил установить, что к серотипам I и III отнесены бактерии, выделенные с растений триб пшеницевые (13 штаммов) и мятликовые (4 штамма). Азоспириллы серотипов II и IV изолированы с более широкого круга растений подсемейства настоящие злаки (трибы пшеницевые (30 штаммов), мятликовые (3 штамма), просовые (3 штамма), свинороевые (2 штамма), рисовые (2 штамма)). Бактерии рода *Azospirillum*, выделенные из ризосферы растений трибы бородачевниковые (6 штаммов), отнесены только к серотипу IV.

3. Полученные данные о серологических свойствах O-антигена бактерий рода *Azospirillum* позволяют дополнить известные ранее серотип I – бактериями *Azospirillum* sp. SR81, серотип II – *A. brasilense* SR14, а *A. lipoferum* Sp59b и *A. brasilense* S17 выделить из серотипа II и отнести к разным серотипам (*A. lipoferum* Sp59b вместе с другими одиннадцатью штаммами *A. lipoferum*, объединить в серотип III, а *A. brasilense* S 17 отнести к серотипу IV).

4. На адаптивные возможности азоспирилл при взаимодействии с пшеницей оказывает влияние комплекс факторов, включающий серологические свойства бактериальной поверхности и растительно-микробное сообщество, из которого изолирована популяция штамма. Количество адсорбированных клеток популяций большинства азоспирилл серотипов I и II составило 10^8 м.к./см корня, а серотипа III – 10^7 м.к./см корня. Из популяций бактерий рода *Azospirillum*, выделенных из ризосферы пшеницы и отнесенных к разным серотипам, наибольшая способность к колонизации проростков *Triticum aestivum* L. cv. Саратовская 29 *in vitro* выявлена у микроорганизмов, которые имели в составе клеточной поверхности антигенные детерминанты, связывающие Ат/Sp245 (серотип I) и двух штаммов серотипа IV.

5. Показано, что в концентрации 10^8 м.к./мл наибольшей эколого-физиологической активностью в отношении проростков пшеницы *in vitro* обладали популяции бактерий *A. lipoferum* SR38 и SR61 (серотип III) и *A. brasilense* SR8, SR41, SR64 и SR87 (серотип IV). У растений, инокулированных перечисленными культурами, наблюдалось увеличение

сухой массы на 80–100%, хотя рост побегов в длину стимулировали только бактерии *A. brasilense* SR8 (+70%) и *A. lipoferum* SR38(+167%), SR61 (+122%).

6. Выявлен высокий адаптационный потенциал у популяции штамма *A. brasilense* SR75, позволяющий формировать эффективный ассоциативный симбиоз как с однодольными (*Triticum aestivum* L. cv. Саратовская 29 и *Zea mays* L. cv. Диана), так и с двудольными (*Helianthus annuus* L. cv. Саратовский 20) растениями на образцах почв (чернозема обыкновенного, каштановой типичной, солонца лугово-каштанового) Саратовской области *in situ*. Положительный эффект от инокуляции азоспириллами возрастал при увеличении уровня стресса у растений в ряду чернозем обыкновенный – каштановая типичная – солонец лугово-каштановый.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

(* - публикации в печатных изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ)

1. Бурыгин Г.Л., Чернова (Филипьевичева) Ю.А., Крючкова Е.В., Матора Л.Ю., Щёголев С.Ю. Воздействие загрязнения среды на состав и свойства биомакромолекул почвенных бактерий-деструкторов // Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды: Матер. междунар. конф. – Саратов: Научная книга, 2005. – С. 126.

2. Чернова (Филипьевичева) Ю.А., Крючкова Е.В. Влияние глифосата на рост культур почвенных бактерий рода *Azospirillum* // Студенческие исследования в биологии: Сб. научных трудов. – Саратов, 2005. – Вып. 3. – С. 114 – 117.

3. Chernova (Filipecheva) Yu.A., Krasov A.I., Burygin G.L., Matora L.Yu. Serological screening of N₂-fixing rhizobacterial strains of the genus *Azospirillum* // Modern problems of Microbiology and biotechnology: The young scientists' and students' international scientific conference. – Odesa, 2007. – P. 63.

4. Чернова (Филипьевичева) Ю.А., Бурыгин Г.Л. Исследование антигенных свойств почвенных рост-стимулирующих бактерий рода *Azospirillum* // Известия Саратовского университета. Сер. Химия. Биология. Экология. – Т.8, Вып. 2. – 2008. – С. 76 – 78.

5. Красов А.И., Попова И.А., Филипьевичева Ю.А., Бурыгин Г.Л., Матора Л.Ю. Выявление азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum* в почвенных суспензиях с помощью иммуноферментного анализа // Вавиловские чтения: Материалы междунар. науч.- практ. конф. – Саратов: Наука, 2008. – Т. 1. – С. 27 – 28.

6. Красов А.И., Попова И. А., Чернова (Филипьевичева) Ю.А., Бурыгин Г.Л., Матора Л.Ю. Выявление бактерий рода *Azospirillum* в почве методом иммуноферментного анализа с использованием антител на липополисахариды // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: Матер. четвертой межрегион. конф. молодых ученых. – Саратов: Научная книга, 2008. – С. 15.

7. Филипьева Ю.А., Бурьгин Г.Л., Матора Л.Ю. Серологическое разнообразие О-антигенов ассоциативных ризобактерий рода *Azospirillum* // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: Матер. четвертой межрегион. конф. молодых ученых. – Саратов: Научная книга, 2008. – С. 18.

8. Бурьгин Г.Л., Филипьева Ю.А., Беляков А.Е., Матора Л.Ю. Разнообразие поверхностных антигенов рост-стимулирующих ризобактерий рода *Azospirillum* // Биология – наука XXI века: Сб. тезисов 12-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых. – Пущино, 2008. – С. 253 – 254.

*9. Красов А.И., Попова И.А., Филипьева Ю.А., Бурьгин Г.Л., Матора Л.Ю. Применение иммуноферментного анализа для выявления азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum* в почвенных суспензиях // Микробиология. – 2009. – Т. 78, № 5. – С. 662 – 666.

10. Попова И. А., Шувалова Э.В., Филипьева Ю.А., Бурьгин Г.Л., Матора Л.Ю. Изучение потенциала стимулирования роста растений бактериями рода *Azospirillum* в почвах Саратовской области // Вавиловские чтения: Матер. междунар. науч.-практ. конф. – Саратов: КУБиК, 2009. – Т. 1. – С. 81 – 83.

11. Бурьгин Г.Л., Филипьева Ю.А., Беляков А.Е., Попова И.А., Шувалова Э.В., Матора Л.Ю. Серологическое разнообразие почвенных ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* // Актуальные аспекты современной микробиологии: Сб. тезисов пятой молодежной школы-конференции с междунар. участием. – Москва, 2009. – С. 15 – 16.

*12. Филипьева Ю.А., Беляков А.Е., Бурьгин Г.Л., Коннова С.А. Иммунохимическое исследование антигенных свойств почвенных рост-стимулирующих бактерий рода *Azospirillum* // Известия Саратовского университета. Сер. Химия. Биология. Экология. – Т.10, Вып. 1. – 2010. – С. 62 – 65.

13. Филипьева Ю.А., Попова И.А., Бурьгин Г.Л. Антигенная характеристика бактерий *Azospirillum brasilense* и их выявление в почвах Нижнего Поволжья // Первые международные Беккеровские чтения: Сб. научных трудов. – Волгоград, 2010. – Ч. 2. – С. 175 – 177.

14. Филипьева Ю.А., Бурьгин Г.Л., Матора Л.Ю. Стимуляция роста пшеницы при инокуляции штаммами азоспирилл различных серотипов // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: Матер. пятой межрегион. конф. молодых ученых. – Саратов: Наука, 2010. – С. 30.

15. Филипьева Ю.А., Бурьгин Г.Л., Матора Л.Ю. Корреляция антигенных свойств штаммов азоспирилл с их влиянием на развитие проростков пшеницы // Вавиловские чтения: Матер. междунар. науч.-практ. конф. – Саратов: КУБиК, 2010. – Т. 1. – С. 268 – 269.

Филиппечева Юлия Анатольевна

ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM*
РАЗЛИЧНЫХ РАСТИТЕЛЬНО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ

03.02.08 – экология (биологические науки)
03.02.03 – микробиология

Автореферат диссертации на соискание
ученой степени кандидата биологических наук

Подписано в печать 27.12.2010 г.
Формат 60×84 ¹/₁₆. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная.
Объем 1 п. л. Тираж 100 экз.

410012, Саратов, Астраханская, 83.