

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИКОРНЕВОЙ ЗОНЫ РАСТЕНИЙ

(обзор)

А.А. ШИРОКИХ, О.В. МЕРЗАЕВА, И.Г. ШИРОКИХ

Описаны наиболее распространенные методы и приемы исследования микроорганизмов корней и прикорневой зоны растений. Рассматриваются практические результаты, достигнутые в области методического обеспечения анализа микробиоты, ассоциированной с корнями растений.

Почва как среда обитания микроорганизмов представляет для их развития множество микросред, часто диаметрально противоположных по своим свойствам (1). В разных почвенных микролокусах соответственно количеству лимитирующего субстрата, скорости его поступления, агрегатному состоянию, доступности микроорганизмам и некоторым другим факторам складываются различные по составу сообщества. Учитывая особые условия влажности, питания и микроаэрации в непосредственной близости от корней растений (2), для исследования микроорганизмов необходимы особые методические подходы, которые мы и рассмотрим.

Разработка специальных методов и приемов изучения микроорганизмов корней и прикорневой зоны растений продиктована необходимостью решения как теоретических, так и ряда практических задач, связанных с фиторемедиацией, поиском биотехнологически ценных штаммов-продуцентов физиологически активных веществ, селекцией и конструированием штаммов, перспективных для сельского и лесного хозяйства.

П о н я т и е о р и з о с ф е р е и е е п р о т я ж е н н о с т и. Под ризосферой понимают зону почвы от поверхности последней до той точки, где микрофлора не подвержена влиянию корней (3). Границы ризосферы зависят от вида растения, типа почвы, влажности и ряда других факторов. При хорошей влагообеспеченности на корнях образуется «муфточка» из мелких комочков почвы, налипших на корневые волоски, которая рассматривается большинством авторов как зона ризосферы. Физическая протяженность ризосферы до сих пор не определена количественно вследствие трудности разграничения собственно ризосферной почвы и почвы, свободной от влияния корней растения.

Универсально приемлемого метода для практического определения протяженности ризосферы пока нет, хотя существуют многочисленные приемы для разделения ризосферной и неризосферной почвы (4-6). По данным различных авторов, протяженность ризосферы составляет от 0,1 до 4 мм от поверхности корня (7-10).

Из наиболее интересных экспериментальных подходов к выявлению физических границ ризосферы следует отметить работы шотландских исследователей (11). С помощью оригинального миниатюрного инфильтрометра, разработанного специально для измерения гидравлических свойств почвы в прикорневой зоне, была проведена сравнительная оценка смачивания почвы водой и этиловым спиртом. Это позволило выявить природу органической оболочки на поверхности отдельных почвенных частиц и удачно продемонстрировать различия по гидрофобности между ризосферой и неризосферной зоной. По мнению авторов, причиной этих различий является видовая специфика корневых и микробных экссудатов.

В большинстве практических руководств по почвенной и сельскохозяйственной микробиологии отмечено, что ризосфера — это слой почвы

вокруг корней на расстоянии не более 5 мм (12-14). Считается, что растения еще способны оказывать влияние на качественный и количественный состав обитающих здесь микроорганизмов, хотя и в значительно меньшей степени, чем на микроорганизмы, живущие непосредственно на поверхности корней.

О п е р а ц и о н н о е о п р е д е л е н и е р и з о с ф е р ы. Поскольку экспериментальное определение протяженности ризосферы крайне сложно и дает противоречивые результаты, при отборе образцов для микробиологического анализа пришлось отказаться от измерения протяженности ризосферы *in situ* и ввести операционный показатель посредством методического приема (15). В микробиологических исследованиях наиболее часто ризосферную и неризосферную почву разделяют, используя механическое встряхивание корней растений. Почву, которая свободно отряхивается с поверхности корней в течение 5 мин (с целью устранения вариаций между образцами), большинство авторов считают неризосферной, а почву, прилипшую к сегментам корня после встряхивания, рассматривают как ризосферную.

Д и ф ф е р е н ц и а ц и я з о н в н у т р и р и з о с ф е р ы. При исследовании микроорганизмов прикорневой зоны растений (без разделения на ризосферу и ризоплану) берут смешанную навеску ризосферной почвы с корнями и помещают ее в колбу со стерильной водой для дальнейшего анализа. Значительная часть микробиологических исследований прикорневой зоны выполнена на основе дифференциации ризосферы, ризопланы (поверхность корней) и эндоризосферы (внутренние ткани корня).

Разделение зон ризосферы и ризопланы также носит операционный характер. Например, Жебрак с соавт. слой почвы на расстоянии до 3 мм от корня, смытый с корней в колбе со стерильной водой (200 об/мин, в течение 3 мин), считали ризосферой, а корни после механического удаления ризосферы — ризопланой (16). Наиболее часто пользуются двумя способами разделения ризосферы и ризопланы: отмывание корней от прилегающих почвенных частиц (17-22) и отделение ризосферной почвы без отмывания (23-26). Последний способ используют главным образом с целью изоляции микромицетов.

Последовательное отмывание корней по методу Теппер с соавт. включает следующие операции: корни с почвой помещают в колбу со 100 мл стерильной воды и взбалтывают в течение 2 мин (14). Стерильным крючком или пинцетом корни извлекают из колбы и переносят в другую емкость, содержащую 100 мл стерильной водопроводной воды. Процедуру повторяют, последовательно промывая корни в семи колбах (по 2 мин в каждой). Желательно, чтобы в последней (седьмой) колбе в воду перед стерилизацией было добавлено 5-7 г песка. Суспензию после первого отмывания рассматривают как образец ризосферы. Содержимое остальных шести колб сливают вместе и расценивают как образец ризопланы.

Метод исследования ризопланы Бер зовой предусматривает следующие операции: небольшой почвенный монолит с растениями помещали в ванну с водой. После того, как почва хорошо намокала, растение с корнями осторожно вынимали, еще 2-3 раза переносили в сосуды с чистой водопроводной водой, а затем несколько раз промывали в стерильной воде. Очищенные таким образом корни использовали для анализа микрофлоры ризопланы (27).

В более поздних работах применяли, как правило, менее трудоемкие приемы разделения зон ризопланы и ризосферы. Корни с прилипшей

к ним почвой помещали в 50-100 мл стерильной водопроводной воды и встряхивали на качалке (180 об/мин) в течение 3 мин. Почву, смытую с корней в колбе со стерильной водой, считали ризосферой, а корни после механического удаления ризосферы — ризопланой. Описанную процедуру разграничения зон использовали в исследованиях прикорневой микрофлоры гороха и ячменя (17-22).

Не умаляя значимости результатов, полученных с помощью перечисленных или аналогичных приемов отмывания, нужно отметить их относительность. Например, в ходе отделения корней от ризосферной почвы вполне вероятен занос в нее обитателей ризопланы, что может привести к преувеличениям в оценке ризосферы.

При использовании методов разделения зон в области корней без отмывания ризосферную почву осторожно с соблюдением условий стерильности удаляют с поверхности корней скальпелем, иглой и кисточкой, после чего образцы ризопланы (тщательно очищенные корни) и ризосферы помещают в колбы со стерильной водой для проведения дальнейших анализов. При такой технике разделения ризоплановая микрофлора не примешивается к ризосферной, однако в этом случае при учете микроорганизмов ризопланы не удается полностью очистить корни от почвы, что особенно заметно при работе с молодыми проростками (24).

Корень растения гетерогенен по своему строению и функциональным особенностям. Для более зрелых участков корня характерно отделение большей массы корневого опада; особенностью молодых верхушечных корней является развитие корневых волосков и усиленная экссудация слизистых веществ. Отсюда и гетерогенность корня как местообитания микроорганизмов. В связи с неоднородностью корня некоторые авторы делят его на следующие участки: кончик (1-2 мм), апикальный (прилегающий к кончику), базальный (прилегающий к семени) и средний (промежуточный между базальным и апикальным) (28). Соответствующие сегменты корней нескольких растений объединяют и анализируют по отдельности, что позволяет выявить специфику заселения микроорганизмами участков корня разного возраста.

Подготовка образцов ризосферы и ризопланы к анализу. Необходимым этапом подготовительных работ к микробиологическому анализу образцов является десорбция микроорганизмов с почвенных частиц и поверхности корней. Используемые с этой целью различными авторами приемы так же, как и собственно способы разделения прикорневой зоны, не являются унифицированными, в связи с чем имеется множество различных вариантов от ручного взбалтывания до обработки тканей на ультразвуковом диспергаторе.

Десорбировать микроорганизмы с поверхности корней можно посредством энергичного встряхивания в стерильной воде навески растительного материала (1-5 г в 100 мл воды) (29). Некоторые исследователи проводят взбалтывание не в воде, а в физиологических растворах, растворе Рингера или буферных растворах. После экстракции микроорганизмов из ризосферной почвы растворы обычно используют для дальнейшего анализа методом мультисубстратного тестирования (30) или генного анализа (31, 32). В работах различных исследователей варьирует как соотношение используемой навески (от 0,1 до 10 г), так и объем отмывочной жидкости (от 50 до 100 мл).

Из других простых и доступных способов предобработки образцов ризопланы, ризосферы и собственно почвы (эдафосферы) можно применять такой прием, как растирание корней или почвы в предварительно

простерилизованной фарфоровой ступке с небольшим объемом стерильной воды (12, 13). По методу Теппер суспензию с ризосферной почвой перед посевом рекомендуется взбалтывать в течение 5 мин (14).

В случае необходимости наиболее полной десорбции микробных клеток с поверхности растительной ткани и частиц почвы используют различные автоматические встряхивающие устройства и гомогенизаторы. В работе Garcí'a с соавт. перед посевом суспензию корней обрабатывали на шейкере с 4-миллиметровыми стеклянными бусами в течение 10 мин (31). В исследованиях других авторов микроорганизмы десорбировали обработкой корней в тканевом размельчителе типа MWP (7000 об/мин) в течение 3 мин (23, 33).

Для десорбции микромицетов с корней и почвенных частиц успешно применяют также встряхивание на качалке (150 об/мин) колб с образцами в течение 25-30 мин (25). Для десорбции микроскопических грибов с корней можно проводить 1-3-кратную обработку в стерильной воде на микроизмельчителе тканей РТ-2 (5000 об/мин) в течение 5 мин. Однако для полного учета бактерий такое диспергирование часто оказывается недостаточным (12).

Многие авторы при подготовке образцов растительного материала к анализу применяют обработку суспензии ультразвуком в течение 2 мин на низкочастотном дезинтеграторе типа УЗДН-1 (17-22). Ультразвуковая обработка дает очень хорошее диспергирование, однако при этом часть клеток может погибнуть.

Несмотря на большое разнообразие используемых методов, целесообразность применения тех или иных режимов предварительной подготовки образцов к дальнейшему анализу в большинстве случаев никак не обосновывается. Лишь в отдельных работах рассматривается, каким образом изменяются результаты в зависимости от продолжительности или способа десорбции микробных клеток перед анализом. Так, в работе Гузева показано, что преобладающая часть микроорганизмов удаляется с поверхности корня пшеницы при обработке на механическом гомогенизаторе (5000 об/мин) в течение 5 мин (33). Notz с соавт. показали, что встряхивание образцов корней на качалке (300 об/мин) в течение 5 мин позволило учесть до 97 % бактерий на корнях растений пшеницы (34). Увеличение продолжительности отмычки до 30 мин или же замена обработки на качалке встряхиванием в течение 15-60 с на вортексе не способствовали увеличению численности десорбированных микроорганизмов.

За рубежом для исследования микробных сообществ ризосферы в последнее десятилетие широко используют методы ПЦР-анализа, позволяющие определять видовое разнообразие и относительное содержание видов в комплексе (31, 32, 35). Если начальные этапы подготовки образцов ризосферы к анализу принципиально не изменились в связи с использованием генно-молекулярных методов, то этап предобработки дополнительно включает операцию по лизису бактериальных клеток для извлечения ДНК и удаления из раствора ингибиторов ПЦР. Как правило, эту процедуру проводят в соответствии с протоколами фирмы-производителя соответствующих систем ФАСТ-ПРЕП (наборы быстрой подготовки материала для ПЦР).

В ы д е л е н и е э н д о с ф е р н ы х м и к р о о р г а н и з м о в. Микроорганизмы, развивающиеся во внутренних тканях корня, но неспособные к симбиозу, объединены понятием «гистосфера» или «эндоризосфера». Для их исследования применяют дополнительные приемы изоляции, обязательным из которых является поверхностная стерилизация

отмытых от почвы корней различными стерилизующими агентами. Наиболее часто с этой целью проводят обработку 4-5 % раствором гипохлорита кальция в течение 15-20 мин с последующей 3-кратной отмывкой материала стерильной водой. Для стерилизации можно также применять различные реагенты: 0,1 % раствор сулемы; 0,1 % раствор азотнокислого серебра; пары или раствор формалина; 0,1-1 % раствор бромной воды; 10-33 % раствор перекиси водорода; 1-2 % раствор гипохлорита натрия.

Некоторые авторы рекомендуют проводить стерилизацию с одновременным или последовательным использованием ряда стерилизующих растворов. Хорошие результаты дает стерилизация смесью перекиси водорода и этанола (1:1) или 70 % этанолом с последующей обработкой 3-5 % раствором гипохлорита натрия. При этом большинство эпифитных микроорганизмов устраняется. Оптимальный для конкретного растительного объекта реагент, его концентрацию и время обработки подбирают экспериментально. В любом случае после стерилизации материал многократно промывают стерильной водой.

Для выделения микроорганизмов эндоризосферы используют один из трех основных способов: высев механически разрушенных корней на питательные среды; инкубация фрагментов корня на питательных средах; инкубация растительного материала во влажных камерах.

Состав питательной среды выбирают в каждом случае в зависимости от конкретной задачи. Например, *Dobereiner* с соавт., помещая отмытые водой корни на питательную среду с малатом в качестве источника углерода, предложила выделять внутрикорневые формы азотфиксирующих бактерий (36). Аналогичный способ применяли для выделения из корней и листьев кукурузы эндофитных актиномицетов на крахмало-казеиновой среде (37).

Экспериментальные модели для выделения бактерий из ризосферы. В исследованиях микроорганизмов прикорневой зоны первоначальный интерес был направлен на диазотрофные бактерии в связи с перспективой их практического использования. Для выделения ассоциированных с корневой зоной диазотрофных бактерий была предложена методика, получившая название «модель сперматосферы» (38). Авторы исходили из того, что растение осуществляет своеобразную селекцию бактерий на своих корнях. Следовательно, проблема сводится к тому, чтобы правильно выделить отселектированные растением популяции, которые находятся вблизи корней или на/в корнях растений. С этой целью был предложен ряд предварительных процедур обработки корней, включая поверхностную стерилизацию с последующим высевом смывов или гомогенатов на ряд селективных питательных сред. Нитрогеназную активность чистых культур бактерий регистрировали ацетиленовым методом в тех же пробирках, где производили учет количества бактерий.

Физиологическую активность изолятов многие авторы связывают с зоной корня, из которой они выделены. В зависимости от способности использовать выделения растений, продуцировать вещества, подавляющие рост других микроорганизмов, отношения к кислороду, интенсивности роста микроорганизмы локализуются на различном расстоянии от корня. Для последовательного выделения диазотрофных ассоциативных бактерий из ризосферы, ризопланы и гистосферы была разработана оригинальная методика, основанная на выделении бактерий по определенной схеме на различных селективных средах из смывов с поверхности и внутренних тканей органов растений (39). На основе этой схемы можно последова-

тельно выделять микроорганизмы, начиная от относительно слабо связанных с корнем (удаленных на 1-2 мм), и кончая формами, развивающимися непосредственно на поверхности или в тканях корней (рис.).

Большое значение при использовании этой схемы автор придает стандартизации условий выделения, в частности, технологии выращивания растений и времени проведения анализа при выделении бактерий. Например, поскольку у проростков пшеницы переход на фототрофное питание и изменение состава корневых выделений происходит на 10-12-е сут, приступать к выделению ассоциативных бактерий рекомендуется не ранее, чем через 2 нед после прорастания зерновки.

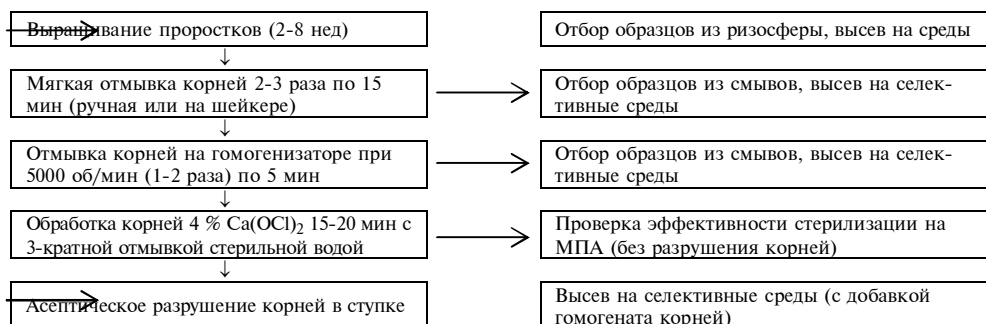


Схема выделения бактерий, ассоциированных с корнями растений (цит. по 39).

При всей простоте и привлекательности этот подход не лишен недостатков. В частности, выращивать растения целесообразнее, видимо, в природной обстановке (или приближенной к ней) и выделять бактерии, заселившие корень в результате естественной конкуренции. А в описанных моделях конкуренция ослаблена или исключена полностью благодаря тому, что семена перед проращиванием стерилизовали.

При селекции штаммов по признакам, связанным со стимуляцией развития растений, большое значение имеет наличие у бактерий способности активно колонизировать корни. Разработке и применению эффективных методик выделения ризобактерий, у которых сочетаются высокая активность колонизации корней и ингибирование роста фитопатогенных грибов, посвящены работы, выполненные во ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (40). Авторами предложен метод активной селекции, обеспечивающий высокую комплементарность бактерий к корням растения-хозяина. Суть метода заключается в следующем: стерильные проростки (пшеница, редис, томат и др.) с длиной корня около 1 см помещают в чашки Петри на поверхность 0,6 % водного раствора агара «Difco» и инкубируют в темноте 16 ч при температуре 24 °С (за это время корневые экссудаты успевают диффундировать в слой агара); затем узкие полоски почвы наносят с двух сторон параллельно корню на расстоянии 1-2 см (почвенные микроорганизмы мигрируют по поверхности агара по направлению к источнику питания — корневым выделениям); всю систему инкубируют в течение 24 ч при 28 °С, после чего почву с частью агара удаляют из чашки, а корень продолжает расти в течение 3-4 сут. Для изоляции бактерий с корней авторы рекомендуют использовать жидкую картофельную среду и картофельный агар. Метод активной селекции ризобактерий существенно повышает выход популяции штаммов с высокой колонизирующей способностью. Так, авторы выделили из почвы и минерального тепличного субстрата ризобактерии, обладающие активным хемотаксисом по отношению к корневым выделениям растений огурца и

томата (41). При этом в ризосфере снижалась степень поражения растений фитопатогенными грибами.

Вышеописанные и аналогичные методы обычно применяют для решения задач, связанных с выявлением таксономической структуры ризосферных комплексов микроорганизмов, так как при этом появляется возможность выделять микрофлору прикорневой зоны в чистую культуру для последующего изучения, а также оценивать численность бактерий. Однако эти приемы не позволяют анализировать микроорганизмы непосредственно на корнях растений.

П р я м ы е м е т о д ы и с с л е д о в а н и я р и з о с ф е р ы. Решение некоторых специфических задач (например, оценка динамики численности бактерий в непосредственной близости от корня, локализация микроорганизмов на поверхности корней *in situ*) возможно при помощи прямых методов, которые хронологически первыми применяли для исследования микроорганизмов прикорневой зоны растений. Первое сообщение о присутствии микроорганизмов на поверхности корневых волосков появилось в 1932 году (42). В дальнейшем были предложены различные способы изучения микроорганизмов ризосферы с помощью окрашивания препаратов корней, либо стекол обрастания Холодного-Росси (43). В случае использования стекол обрастания при высеве семян в почву помещают стеклянные пластинки так, чтобы корешки росли вдоль их поверхности. Спустя некоторое время пластинки извлекают, окрашивают и микроскопируют.

Для более продолжительного изучения характера локализации микроорганизмов на корнях и возле корней вегетирующих растений используют прямой метод обрастания стекол, заложенных в специальных вегетационных садках, получивших название садков Красильникова: это плоские ящики с прозрачной съемной стенкой из стекла (44). Садки устанавливают наклонно под углом 45° так, чтобы корни, сохраняя вертикальный рост, касались стекол и плотно прилипали к их поверхности. Через определенные промежутки времени крышку садка снимают, стекла извлекают и переносят в кювету с водой, где посредством легкого покачивания удаляют крупные почвенные частицы. После высушивания и фиксации проводят микроскопирование с предварительной окраской или без нее.

Новые аспекты в изучении структуры микробных сообществ ризосферы открыло использование люминофоров для окраски клеток, находящихся на поверхности субстратов. Разработанный Звягинцевым метод освещения отраженным светом в люминесцентном микроскопе позволил изучать поверхность не только окрашенной почвы, но и корней (45). Микроорганизмы на поверхности корня окрашиваются в зеленый цвет и легко отличимы от клеток растений, имеющих другой оттенок.

На основе использования люминесцентной микроскопии выполнен цикл работ по определению общей численности и биомассы микроорганизмов в ризосфере растений (20-22, 46). Препараты для подсчета бактерий и мицелия актиномицетов окрашивали водным раствором акридина оранжевого, а для окраски мицелия и спор грибов применяли калькофлуор белый. С помощью люминесцентной микроскопии расчетным методом установлено, что биомасса грибов как в ризосфере, так и в почве доминирует над таковой бактерий и мицелия актиномицетов; в ризоплане биомасса мицелия грибов сопоставима с таковой прокариот (бактерии и мицелий актиномицетов). Гетерогенность корня как среды обитания микроорганизмов в значительно большей степени отражается на ризоплане и в меньшей степени — на ризосфере (28).

В тех случаях, когда необходимо проследить за динамикой колонизации корней искусственно внесенными в ризосферу популяциями микроорганизмов, успешно используют метод мембранных фильтров (47, 48). Перед погружением в почву на поверхность стерильного нитроцеллюлозного мембранного фильтра наносят суспензию микроорганизмов определенной плотности. Фильтры оборачивают стеклотканью и размещают вертикально в почве одновременно с высевом семян, или же семена после стерилизации помещают непосредственно на фильтр. В ходе инкубации в намеченные сроки часть мембранных фильтров с корнями растений извлекают и подвергают анализу методом иммунофлуоресцентной микроскопии (15, 49). Для количественного учета малочисленных популяций в этом случае применяют концентрирование клеток на мембранном фильтре.

Экспериментальное моделирование микробно-растительных взаимодействий в ризосфере. В экспериментальных работах для получения сведений о влиянии микроорганизмов на растения или, наоборот, растений на микроорганизмы часто применяют искусственные гнотобиотические системы, в которых растения выращивают стерильно или в присутствии определенных микроорганизмов (50).

Все разнообразие методов по выращиванию растений в стерильных условиях Сэги разделил на две группы — стерильное и полустерильное культивирование (13). В первом случае растение выращивают с использованием специальных культивационных пробирок, обеспечивающих абсолютную стерильность, во втором — корневая система растения развивается в стерильных условиях, а его надземная часть не изолирована. В том и другом случае стерилизация семян является основным условием успешного эксперимента. В качестве субстрата гнотобиотическая система может содержать стерильный кварцевый песок или вермикулит, который хорошо имитирует гетерогенный механический состав почвы. В субстрат добавляют питательный раствор и асептически погружают стерильные или инокулированные семена. Инкубацию растений проводят в контролируемых условиях температуры и освещенности. При всей простоте этот подход имеет ряд недостатков, главный из которых заключается в невозможности (даже при использовании культивационных сосудов большого размера) довести растения до полного созревания.

Как пример более сложной техникой, но лишенной этого недостатка модели приведем сконструированную в Агрофизическом институте РАСХН вегетационную облучательную установку — ризотрон РОСТ-4М (51). В качестве корнеобитаемой среды использован вертикально расположенный тонкослойный пористый материал из сверхплотной лавсановой ткани, по капиллярам которого сверху вниз непрерывно протекает питательный раствор. Материал обладает биостойкостью и химически инертен по отношению к компонентам питательного раствора. Проникновение через ткань корней предотвращается благодаря малым размерам пор. Оптимизация условий выращивания растений в ризотроне обеспечивается благодаря неограниченному снабжению корней водой, элементами минерального питания и кислородом воздуха. Заданная температура воздуха в зоне размещения корней и рациональное освещение их надземной части поддерживаются автоматически.

Длительное интенсивное культивирование растений в этой вегетационной установке привело к изменениям в микробном сообществе, которые рассматривались авторами как элементы процесса, аналогичного почвоутомлению. В частности, происходило увеличение относительной

доли грибов в числе учитываемых микроорганизмов, обеднялся видовой состав последних, возрастало количество зачатков фитопатогенных видов, за счет чего повышалась инфекционная нагрузка на растения.

Для экспериментального изучения колебательного развития микробных популяций и сообществ в ризосфере и выяснения его причин и механизмов Сем новым была предложена система «искусственный корень», физически копирующая функционирование естественного корня растений (52). Тонкую тефлоновую трубку с закрытым концом («кончик корня»), но несколькими отверстиями вблизи кончика, помещали в синтетическую диализную трубку, один конец которой также герметично закрывали. Искусственные экссудаты равномерно выдавливали насосом из шприца в тефлоновую, а затем диализную трубку, из которой они попадали в почву. Тефлоновую трубку равномерно вытягивали из диализной с помощью часового механизма. Через установленное время диализную трубку разрезали на сегменты и ризосферную почву высевали для определения численности бактерий. Как и в случае естественных корней, вокруг искусственного корня был обнаружен достоверный ризосферный эффект, а также существенные циклические колебания численности микроорганизмов. Заметим, что закономерное варьирование численности в виде «бегущей волны» в диапазоне от 0 до 1-2 мм от поверхности корня было ранее описано как форма пространственной структуры популяции клубеньковых бактерий в ризосфере растений сои (15). Феномен волнообразного развития микроорганизмов важен для понимания процесса инфицирования корней фитопатогенами и применения биоконтролирующих препаратов.

Математическое моделирование динамики численности популяций ризосферных микроорганизмов. Если физические модели ризосферы воспроизводят и сохраняют в основном природу явлений (хотя количественно иначе), то при математическом моделировании физика исследуемого процесса не сохраняется. Моделирование не предусматривает в какой-либо мере физического сходства и основывается на изоморфизме уравнений, то есть способности последних описывать различные функциональные связи, используя изофункционализм уравнений (способность оценивать отдельные стороны функционирования системы при отсутствии полного описания ее поведения).

В литературе широко представлены математические модели, имитирующие динамику численности популяций микроорганизмов в прикорневой зоне растений (53-55). Как правило, в этих моделях отражено поведение недифференцированного микробного сообщества под влиянием только одного внешнего фактора — концентрации в ризосфере растворимых органических соединений. Модель, разработанная Кравченко с соавт., позволяет охарактеризовать динамику численности отдельных групп микроорганизмов в ризосфере с учетом достаточно большого количества факторов различной природы: внешние факторы, потребляемые ресурсы (концентрация растворимых органических соединений, кислорода, минеральных соединений азота); биотические факторы (интенсивность корневой экссудации, конкуренция между микроорганизмами) (56). Модель сводится к построению и анализу системы дифференциальных уравнений, каждое из которых соответствует описанию отдельных сторон явления. Варьируя значениями базовых параметров, входящих в уравнения модели, можно, по мнению авторов, выявить степень влияния различных факторов на поведение двух конкурирующих популяций микроорганизмов ризосферы.

Для выяснения причин и механизмов колебательного развития микробных популяций и сообществ в ризосфере Сем новым была построена математическая модель, названная «BACWAVE» (бактериальные волны), представляющая собой систему двух дифференциальных уравнений, которая позволила описать циклическую динамику увеличения биомассы и снижения численности бактерий в ризосфере (52). В отличие от ранее известных представлений, согласно которым распределение бактерий вдоль корня зависит от зоны экссудирования последнего, интенсивности развития боковых корней или возрастных изменений корня, автор на основании полученных с помощью математической модели результатов делает вывод о том, что основным механизмом колебательного развития микроорганизмов в ризосфере и почве является чередование роста и отмирания части микробного сообщества вследствие временного локального истощения субстрата.

Как следует из приведенных выше примеров, математическое моделирование часто имеет своей целью развитие теоретических представлений о способах и движущих силах пространственного и временного развития микробных популяций и сообществ в почве и ризосфере. Вместе с тем, этот метод все чаще находит применение и при решении практических вопросов. Так, математическое моделирование было использовано для оценки динамики численности бактерий в прикорневой зоне растений ячменя при загрязнении почвы кадмием (48). С помощью специально разработанной математической модели динамика численности бактерий родов *Arthrobacter*, *Flavobacterium* и *Klebsiella*, измеренной прямым методом, была разложена на три составляющие, характеризующие процессы размножения, миграции и отмирания бактерий. Это позволило авторам выделить популяцию бактерий *K. mobilis* 880 в связи с ее наибольшей миграционно-иммобилизационной активностью, более высокой способностью связывать кадмий (в пересчете на одну клетку) по сравнению с популяциями других бактерий, и рекомендовать *K. mobilis* 880 для применения в биопрепаратах для защиты растений от проникновения в них ионов тяжелых металлов.

Заключение

Как видно из приведенных в обзоре материалов интерес к ризосфере как зоне максимального сосредоточения и функциональной активности почвенных микроорганизмов возрастает. Прежде всего это выразилось в разработке многообразных методических подходов к изучению микробных сообществ прикорневой зоны растений. Благодаря развитию методического обеспечения исследования приобретают новые аспекты, связанные как с расширением наших общих представлений о закономерностях организации почвенных микробных сообществ, так и с решением ряда практических задач сельского хозяйства и охраны окружающей среды. В результате предложено несколько десятков приемов и методов, позволяющих проводить количественную и качественную оценку микроорганизмов прикорневой зоны растений. Однако ни один из этих методов не получил всеобщего признания и распространения. В настоящее время не существует стандартной методики выделения бактерий, ассоциированных с корневой зоной растений. Не стандартизированы методы сравнения микробной биомассы в ризоплане, ризосфере и эдафосфере. Неизвестной остается скорость роста микробов в ризоплане, ризосфере и контрольной почве, а также скорость их миграции и отмирания.

Идея о необходимости полной унификации приемов исследования как основного условия сравнимости результатов различных авторов высказывалась в литературе неоднократно (20, 57). При всей своей очевидной необходимости такая стандартизация наряду с положительными моментами может отрицательным образом повлиять на качество полученной информации. Поэтому, на наш взгляд, следует согласиться с мнением Кожевина, что в ряде случаев наиболее важным является не воспроизведение зафиксированной (до мелочей) последовательности манипуляций, а умение специалиста модифицировать метод в зависимости от цели исследования и имеющихся возможностей (15). Только на основе комплексного использования различных методов для получения всесторонней и многоплановой характеристики микробных сообществ прикорневой зоны можно будет судить о влиянии микрофлоры ризосферы на питание и рост растений, а также качество продукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. М., 1987.
2. Lynch J.D. The rhizosphere. N.Y., 1990.
3. Rovira A.D., Bowen G.D., Foster R.C. The significance of rhizosphere microflora and mycorrhizal in plant nutrition. In: Encyclopedia of plant physiology /Eds. A. Lauchli, R.L. Bielski. Berlin, 1983.
4. Ortas I. Determination of the extent of rhizosphere soil. Com. Soil. Sci. Plant Ann., 1997, 28, 19-20: 1767-1776.
5. Riley D., Barber S.A. Bicarbonate accumulation and pH changes at the soybean [*Glycine max* (L.)] root-soil interface. Soil. Sci. Soc. Am. Proc., 1969, 33: 905-908.
6. Rollwagen B.A., Zososki R.J. Nitrogen source effects on rhizosphere pH and nutrient accumulation by Pacific Northwest conifers. Plant Soil., 1988, 105: 79-86.
7. Marshner H., Romheld V. In vivo measurement of root-induced pH changes at the soil-root interface: effect of plant species and nitrogen source. Zeitschrift fur Pflanzenphysiol., 1983, 111: 241-251.
8. Romheld V. The soil-root interface in relation to mineral nutrition. Symbiosis, 1990, 9: 19-27.
9. Shengwu Q., Zhiyu L. The nutrient status of soil-root interface. VI. Distribution of different fertilizer N in rhizosphere soil. Acta Pedologica Sinica, 1989, 26(2): 117-123.
10. Steer J., Harris J.A. Shifts in the microbial community in rhizosphere and non-rhizosphere soils during growth of *Agrostis stolonifera*. Soil Biol. and Biochem., 2000, 32, 6: 869-878.
11. Wheatley R., Bengough G., Hallett P. e.a. Probing the soil-plant system? Ann. Report, 2001/2002: 168-171.
12. Методы почвенной микробиологии и биохимии /Под ред. Д.Г. Звягинцева. М., 1991.
13. Эги Й. Методы почвенной микробиологии. М., 1983.
14. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. М., 1987.
15. Кожевин П.А. Микробные популяции в природе. М., 1989.
16. Жебрак И.С., Скоробогатова Р.А., Кожевин П.А. Динамика популяции *Corynebacterium glutamicum* в почве и корневой зоне растений. Вест. МГУ им. М.В. Ломоносова. Сер 17. Почвоведение, 1998, 1: 48-51.
17. Кириллова Н.П., Кожевин П.А., Звягинцев Д.Г. Динамика *Rhizobium leguminosarum* на корнях проростков гороха. Микробиол., 1984, 53, 1: 117-122.
18. Лисичкина Г.А., Кожевин П.А., Звягинцев Д.Г. Динамика численности *Rhizobium japonicum* в ризоплане и ризосфере различных растений. Микробиол., 1983, 52, 4: 646-650.
19. Оrazова М.Х., Бурканова О.А., Полянская Л.М. и др. Влияние фосфора на колонизацию микроорганизмами прикорневой зоны ячменя. Микробиол., 2000, 69, 3: 420-425.
20. Оrazова М.Х., Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г. Структура микробного комплекса в прикорневой зоне ячменя. Микробиол., 1999, 68, 1: 127-133.
21. Полянская Л.М., Оrazова М.Х., Свешникова А.А. и др. Влияние азота на колонизацию микроорганизмами корневой зоны ячменя. Микробиол., 1994, 63, 2: 308-313.

22. Полянская Л.М., Оразова М.Х., Свешникова А.А. и др. Динамика численности и структура микробного комплекса в прикорневой зоне гороха. Микробиол., 1994, 63, 2: 314-325.
23. Емнова Е.Е., Меренюк Г.В., Сланина В.А. и др. Видовой состав сапротрофных флуоресцирующих псевдомонад в ризоплане различных видов сельскохозяйственных растений. Микробиол., 1995, 64, 6: 820-826.
24. Кириллова Н.П., Стасевич Г.А., Кожевин П.А. и др. Динамика популяций бактерий в системе почва—растение. Микробиол., 1981, 50, 1: 128-133.
25. Кураков А.В., Костина Н.В. Сапротрофные микромицеты ризопланы томатов, огурцов, дерново-подзолистой почвы и их способность подавлять фузариозную инфекцию корней. Почвоведение, 1998, 2: 193-199.
26. Кураков А.В., Хатхи ХонгТхань, Белюченко И.С. Микроскопические грибы почвы, ризосферы и ризопланы хлопчатника и тропических злаков, интродуцированных на юге Таджикистана. Микробиол., 1994, 63, 6: 1101-1110.
27. Берзова Е.Ф. Микрофлора корневой системы растений и методика ее изучения. Тр. Ин-та с.-х. микробиол. Л., 1951, 12: 39-48.
28. Оразова М.Х., Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г. Гетерогенность корня как местообитания микроорганизмов. Микробиол., 1994, 63, 4: 706-714.
29. Возняковская Ю.М. Микрофлора растений и урожай. Л., 1969.
30. Grauston S.J., Shenquiang Wang, Colin D. e.a. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. Soil. Biol. Biochem., 1998, 30, 3: 369-378.
31. Garcia J.A.L., Probanza A., Ramos B. e.a. Genetic variability of rhizobacteria from wild populations of four *Lupinus* species based on PCR-RAPDs. Plant Nutrit. Soil. Sci., 2001, 164, 1: 1-7.
32. Griffiths B.S., Ritz K., Ebbelwhite N. e.a. Ryegrass rhizosphere microbial community structure under elevated carbon dioxide concentrations, with observations on wheat rhizosphere. Soil. Boil. Biochem., 1998, 30, 3: 315-321.
33. Гузева И.С. Развитие микроорганизмов на поверхности корня. Автореф. канд. дис. М., 1978.
34. Notz R., Maurhofer M., Schneider-Keel U. e.a. Biotic factors affecting expression of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis gene *phlA* in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHAO in the rhizosphere. Phytopathology, 2001, 91, 9: 873-881.
35. Marschner P., Yang C.-H., Crowley D.E. e.a. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. Soil. Boil. Biochem., 2001, 33, 11: 1437-1445.
36. Dobreiner J., Day J.M. Associated symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: Proc. Intern. symp. on nitrogen fixation /Eds. W.E. Newton, C.J. Nyman. Washington, 1976: 518-538.
37. De Araujo J.M., Da Silva A.C., Azevedo J.L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). Brazilian Archives of Biol. and Technol., 2000, 43, 4: 447-451.
38. Thomas-Bauzon D., Weinhard P., Villecourt P. e.a. The spermosphere model I: its use in growing, counting and isolating N₂-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. Canad. J. Microbiol., 1982, 28, 8: 922-928.
39. Чумаков М.И. Оценка эффективности ассоциативного взаимодействия *Agrobacterium radiobacter* 5Д-1 с пшеницей. В кн.: Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями /Под ред. В.В. Игнатова. М., 2005: 160-179.
40. Кравченко Л.В., Макарова Н.М., Азарова Т.С. и др. Выделение и фенотипическая характеристика ростстимулирующих ризобактерий (PGPR), сочетающих высокую активность колонизации корней и ингибирования фитопатогенных грибов. Микробиол., 2002, 71, 4: 521-525.
41. Кравченко Л.В., Азарова Т.С., Леонова-Ерکو Е.И. и др. Корневые выделения томатов и их влияние на рост и антифунгальную активность штаммов *Pseudomonas*. Микробиол., 2003, 72, 1: 48-53.
42. Thom C., Humfield H. Notes on the association of microorganisms on root. Soil. Sci., 1932, 34: 29.
43. Cholodny N.G. Uber eine neue Methode zur Untersuchung der Bodenmicroflora. Arch. J. Mikrobiol., 1930, 1, 4.
44. Красильников Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения. М., 1958.
45. Звягинцев Д.Г. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями. М., 1973.
46. Широких И.Г., Широких А.А., Родина Н.А. и др. Влияние кислотности почвы и токсичности алюминия на структуру микробной биомассы в ризосфере ячменя. Почвоведение, 2004, 8: 961-966.

47. Тимофеева С.В., Лагутина Т.М., Кожемяков А.П. Моделирование воздействия агроэкологических факторов на приживаемость интродуцируемых бактерий в почве и зоне корней растений. Докл. РАСХН, 1999, 6: 19-21.
48. Пищик В.Н., Воробьев Н.И., Проворов Н.А. Экспериментальное и математическое моделирование популяционной динамики ризосферных бактерий в условиях кадмиевого стресса. Микробиол., 2005, 74, 6: 845-851.
49. Струнникова О.К., Вишневская Н.А., Тихонович И.А. Развитие *Verticillium dahliae* в ризосфере и колонизация им корней хлопчатника при разной интенсивности проявления вилта. Микол. и фитопатол., 2005, 39, 6: 82-91.
50. Simons M., Vander Biy A.J., Grand J. e.a. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. Mol. Plant-Microbe Interact., 1996, 9: 600-607.
51. Ермаков Е.И., Степанова О.А. Изучение микроорганизмов ризосферы растений в ризотроне. Микробиол., 1992, 61, 5: 916-923.
52. Семнов А.М. Трофическое группирование и динамика развития микробных сообществ в почве и ризосфере. Автореф. докт. дис. М., 2005.
53. Newman E.I., Watson A. Microbial abundance in the rhizosphere: a computer model. Plant and Soil., 1977, 48: 17-56.
54. Берестецкий О.А., Швытов И.А., Кравченко Л.В. Имитационная модель ассоциативной азотфиксации в ризосфере небобовых культур. Докл. ВАСХНИЛ, 1986, 7: 6-8.
55. Scott E.M., Rattray E.A.A., Prosser J.I. e.a. A mathematical model for dispersal of bacterial inoculants colonizing the wheat rhizosphere. Soil. Boil. Biochem., 1995, 27: 1307-1318.
56. Кравченко Л.В., Стригуль Н.С., Швытов И.А. Математическое моделирование динамики взаимодействующих популяций ризосферных микроорганизмов. Микробиол., 2004, 73, 2: 233-240.
57. Curl E.A., Truelove V. The rhizosphere. Berlin, 1986.

*Зональный НИИ сельского хозяйства
Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого,
610007, Киров, ул. Ленина, 166а;
e-mail: shirokikh@ptlan.com*

*Поступила в редакцию
13 июня 2006 года*

METHODICAL APPROACHES TO STUDY OF MICROBIAL COMMUNITIES IN THE PLANT RHIZOSPHERE

(review)

A.A. Shirokikh, O.V. Mersaeva, I.G. Shirokikh

S u m m a r y

The most widespread methods for studying microbial communities in the plant rhizosphere are reviewed. The gradual development and state of the art of exploratory thought, bound with of this methodical problem in soil microbiology are summarized. The authors suppose that the prospects for further development of study of microbial-plant systems in the simultaneous using of different methods to obtain a comprehensive characteristic of the microbial communities in the rhizosphere.

Новые книги

Зерновые культуры в системе адаптивно-ландшафтного земледелия Якутии (на примере Лено-Амгинского междуречья). Метод. реком. Якутск: РАСХН, Сиб. отд. Якутского НИИСХ. 2005, 60 с.

В методических рекомендациях приведены технологии возделывания зерновых культур по агроэкологическим группам земель в агроландшафтных районах Лено-Амгинского междуречья. Описаны агроэкологические требования зерновых культур (отношение к условиям

увлажнения, температуре воздуха и почвы, устойчивости к различным типам засоления и кислотности почвы и т.д.). Перечислены и охарактеризованы районированные сорта зерновых культур. Уделено внимание адаптивно-ландшафтным системам земледелия для основных агроэкологических групп земель (обилие повторно-жильных льдов, слабодренированные, слабогидристые долины рек, плакорные плоские поверхности гряд и их склоны) и долины реки Амги.