

МИКРОБИОМ РИЗОСФЕРЫ СОИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ФУНГИЦИДОВ И КОМПЛЕКСНОЙ ИНОКУЛЯЦИИ

¹С.В. Вознюк, ¹Л.В. Титова, ²А.Г. Пинаев,
²Е.Е. Андронов, ¹Г.А. Иутинская

¹ Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»,
шоссе Подбельского, 3, Санкт-Петербург, 196608, Россия
e-mail: vozsuet@gmail.com

Биоразнообразие ризосферной микробиоты играет ключевую роль в повышении продуктивности культурных растений, однако микробиом ризосферной зоны сои при различной предпосевной обработке семян исследован недостаточно. **Цель.** Исследовать микробиом ризосферы сои при обработке семян фунгицидами с последующей инокуляцией комплексным микробным препаратом Эковитал. **Методы.** Физиологические (вегетационные опыты), микробиологические (подготовка инокулянта), молекулярно-биологические (высокопроизводительное секвенирование). **Результаты.** В микробиоме темно-серой оподзоленной почвы ризосферы сои выявлено 23 филума (2 из них – археи), 63 класса и неидентифицированные последовательности (7,7 – 8,3%). Доминантными, с представленностью от 1% до 26,6%, были 12 филумов: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, TM7, *Verrucomicrobia* и *Crenarchaeota* (археи). Доля доминантных филумов *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes* и *Rhizobiales* при комбинированной обработке семян увеличивалась по сравнению с контролем. Последовательности, отнесённые к родам *Phyllobacterium* и *Methylobacterium*, обнаружены только в вариантах с применением фунгицидов и Эковитала. **Выводы.** Предпосевная комбинированная обработка семян сои не влияла на качественный состав доминантов микробиома ризосферы, однако приводила к изменению представленности отдельных таксонов. Клубеньковые бактерии рода *Bradyrhizobium* не были обнаружены в ризосферной почве контрольного варианта, а при комбинированной обработке семян их представленность не превышала 0,1%, что свидетельствует о необходимости применения высокоэффективных штаммов ризобий при выращивании сои.

Ключевые слова: соя, ризосфера, микробиом, инокуляция, фунгициды, высокопроизводительное секвенирование, биоразнообразие.

Сохранение биоразнообразия – одна из главных экологических проблем современности. Для ее решения на базе ООН и ЮНЕСКО создан ряд программ и конвенций, главной задачей которых является сохранение биологического разнообразия планеты. В этом направлении важным вопросом является исследование микробиома почв агроэкосистем, поскольку микроорганизмы играют ключевую роль в почвообразовании [1], сохранении плодородия почвы и формировании продуктивности культурных растений [2].

Структура микробных сообществ ризосферной почвы достаточно сложная и динамичная, а понимание ее экологии, эволюции и биоразнообразия является важным фактором повышения продуктивности растений и устойчивого функционирования экосистем [3]. Структура микробного сообщества ризосферы растений во многом определяется составом растительных экссудатов [4], выполняющих как роль субстрата, так и регуляторные функции.

Микробиоценоз ризосферной почвы имеет свои особенности видового состава. Исследование амплификатов генов 16S рРНК выявило высокое сходство бактериального микробиома ризосферы и внекорневой зоны. Однако таксономическая структура почвенных сообществ микроорганизмов значительно сложнее ризосферных [5]. Установлено, что типичными представителями ризосферы являются филумы *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Variovorax*, *Acetobacter*, *Bacillus* и *Arthrobacter*, обнаружен также ряд некультивируемых форм микроорганизмов [6].

Бобовые растения формируют мутуалистические взаимоотношения с ризосферными микроорганизмами, что позволяет уменьшить использование удобрений и защитить растения от негативного воздействия биотических и абиотических стрессов [7, 8]. В составе прокариотного микробиома ризосферы сои обнаружено относительно высокое содержание представителей бактериальных родов с ростстимулирующими свойствами, например, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* [9, 10].

Современные молекулярно-биологические, культурально-независимые (culture-independent) методы изучения биоразнообразия почвенных микроорганизмов базируются на исследовании тотальной микробной ДНК – метагенома [11, 12]. Наиболее информативным является метод высокопроизводительного секвенирования, позволяющий определить количественные показатели представленности таксонов микробиома почвы с высокой точностью (97 – 99%) [13].

В исследованиях микробного разнообразия почвы агроэкосистем показано, что неконтролируемое внесение пестицидов может привести к изменениям в составе почвенного микробиома, особенно ризосферного [14]. Информацию о влиянии химических средств защиты растений на биоразнообразие микроорганизмов почвы можно встретить в литературе [15, 16]. В то же время, влияние обработки семян фунгицидами в сочетании с инокуляцией комплексными микробными препаратами на микробиом ризосферы культурных растений исследовано недостаточно.

Целью работы было изучить состав микробиома темно-серой оподзоленной почвы ризосферы сои при применении фунгицидов и комплексной инокуляции в условиях вегетационных опытов.

Материалы и методы. Объектом исследований был прокариотный микробиом ризосферы сои сорта Аннушка (ультраскороспелый с вегетационным периодом 75 – 85 суток) селекции Научной селекционно-семеноводческой фирмы «Соевый век». Исследования проводили в вегетационном домике в керамических сосудах объемом 3 л в 4-х кратной повторности при природном освещении. Влажность почвы поддерживали поливами на уровне 60% полной влагоемкости. Опытная почва – темно-серая оподзоленная с такими характеристиками: содержание

гумуса (по Тюрину) – 0,72%; органического углерода – 0,35%; актуальная кислотность ($pH_{\text{водн.}}$) – 5,5; обменная кислотность (pH_{KCl}) – 4,6; гидролитическая кислотность (по Капперу) – 1,33 мг-экв/100 г почвы; содержание других элементов (мг/100 г почвы): подвижного алюминия – 0,081; подвижного фосфора (P_2O_5) – 40,0; обменного калия (K_2O) – 12,7 (по Кирсанову); общее содержание азота – 0,21 мг/100 г почвы. За сутки до посева семена обрабатывали в соответствии с рекомендациями производителей одним из фунгицидов системного и контактного действия: Максим Стар 025 FS (действующие вещества – флудиоксонил, 18,7 г/л и ципроконазол, 6,25 г/л, Syngenta, Швейцария; доза – 1 л/т семян), Кинто дуо (действующие вещества – триконазол, 20 г/л и прохлораз, 60 г/л, BASF, Швейцария; доза – 1 л/т семян). В день посева семена инокулировали комплексным микробным препаратом Эковитал, в состав которого входят клубеньковые бактерии сои *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035, УКМ В-6018 и фосфатмобилизирующие бактерии *Bacillus megaterium* УКМ В-5724 (10^7 клеток/семян). Для получения биопрепарата бактерии культивировали в колбах объемом 750 мл при температуре 28 – 30°C [17].

Семена контрольного варианта обрабатывали стерильной водопроводной водой. Образцы ризосферной почвы для анализа отбирали в фазу цветения сои в пяти повторностях, из которых составляли средний образец.

Для изучения состава прокариотного микробиома ризосферной почвы выделяли тотальную микробную ДНК, очищенный препарат которой использовали для конструирования и секвенирования ампликонных библиотек [18]. Подготовку проб, создание ампликонных библиотек 16S рРНК и высокопроизводительное секвенирование проводили на приборе Illumina MiSeq. ДНК из образцов выделяли с применением коммерческого набора PowerSoil DNA Isolation Kit (Mo Bio, США). Для приготовления ампликонных библиотек методом ПЦР проводили амплификацию с универсальными праймерами на вариабельный участок гена 16S рРНК v3-v4, специфичными для широкого круга микроорганизмов, включая бактерии и археи (F515; GTGCCAGCMGCCGCGGTAA и R806; GGACTACVSGGGTATCTAAT [19]), с добавлением служебных последовательностей, содержащих линкеры и баркоды. ПЦР осуществляли в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 0,5 – 1 единицу активности полимеразы Phusion Hot Start II High-Fidelity polymerase и 1X Phusion buffer (Thermo Fisher Scientific), по 5 пкМ прямого и обратного праймеров, 10 нг ДНК-матрицы и 2 нМ каждого dNTP (Life Technologies). Смесь денатурировали при 94°C 1 мин, после чего следовало 35 циклов: 94°C – 30 с, 50°C – 30 с, 72°C – 30 с. Финальную элонгацию проводили при 72°C 3 мин. ПЦР продукты очищали с использованием AM Pure XP (Beckman Coulter), дальнейшую подготовку библиотек проводили в соответствии с инструкцией производителя MiSeq Reagent Kit Preparation Guide. Библиотеки секвенировали в соответствии с инструкцией изготовителя на приборе Illumina MiSeq с использованием набора реактивов MiSeq® Reagent Kit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (2*300 н). Таксономический анализ нуклеотидных последовательностей ампликонных библиотек

осуществляли с помощью компьютерного программного модуля QIIME (версия 1.7.0) [20]. При анализе проводили распределение библиотек по идентификаторам, проверку секвенирования и фильтрацию нуклеотидных последовательностей, объединение последовательностей в операционные таксономические единицы (ОТЕ) с использованием 97% порога сходства, выравнивание нуклеотидных последовательностей методом Unclust. При таксономической идентификации ОТЕ использовали банк данных RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). К доминантным относили таксоны, представленность которых в микробиоме была 1% и выше. Таксоны с низкой представленностью в метагеномной ДНК (ниже порога чувствительности прибора) обозначали «0».

Результаты. В микробиоме ризосферной почвы сои выявлены 21 филум бактерий и 2 филума архей, а также часть неидентифицированных последовательностей – 7,1 – 7,9% (табл. 1).

Таблица 1

Представленность филумов в ризосфере сои сорта Аннушка, % в микробиоме

№ п/п	Филотипы	Конт- роль	Экови- тал	Кинто дуо	Максим Стар	Кинто дуо+ Эковитал	Максим Стар + Эковитал
<i>Bacteria</i>							
1	<i>Acidobacteria</i>	9,5	9,6	8,5	9,8	9,9	10,7
2	<i>Actinobacteria</i>	21,0	22,4	20,1	21,5	18,2	18,3
3	<i>Armatimonadetes</i>	0,6	0,6	0,5	0,5	0,6	0,5
4	<i>BRC1</i>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
5	<i>Bacteroidetes</i>	6,1	5,4	9,7	5,8	7,6	7,5
6	<i>Chlamydiae</i>	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2
7	<i>Chlorobi</i>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
8	<i>Chloroflexi</i>	5,8	5,4	4,8	5,2	4,9	4,6
9	<i>Cyanobacteria</i>	0,7	0,6	0,9	0,6	1,1	0,6
10	<i>Elusimicrobia</i>	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2
11	<i>FBP</i>	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2
12	<i>Firmicutes</i>	5,6	6,2	5,6	6,3	7,0	7,0
13	<i>GN02</i>	0	0	0	0	0,1	0,2
14	<i>Gemmatimonadetes</i>	4,3	5,1	4,4	5,5	5,1	5,1
15	<i>Nitrospirae</i>	0,7	0,6	0,4	0,7	0,7	0,7
16	<i>OD1</i>	0,3	0,1	0,3	0,2	0,4	0,4
17	<i>Planctomycetes</i>	4,4	4,1	2,5	3,3	3,7	4,3
18	<i>Proteobacteria</i>	24,3	23,4	26,6	23,2	23,3	23,9
19	<i>TM7</i>	1,1	1,2	0,7	1,1	1,1	0,5
20	<i>Verrucomicrobia</i>	3,1	2,9	2,5	3,1	3,2	3,2
21	<i>WS3</i>	0	0,1	0	0	0	0,1
<i>Archaea</i>							
22	<i>Crenarchaeota</i>	4,6	4,5	4,0	4,5	4,1	4,2
23	<i>Parvarchaeota</i>	0	0	0	0,1	0	0,1
	Неидентифицированные последовательности	7,1	7,2	7,7	7,9	7,9	7,3

Анализ таксономической структуры на уровне филумов прокариотного микробиома темно-серой оподзоленной почвы ризосферы сои показал, что абсолютными доминантами были бактерии (87,5% – 88,4% от общего количества идентифицированных последовательностей). Археи составляли 4,1 – 4,6%.

Среди обнаруженных филумов наиболее представленными были три – *Acidobacteria*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria* (от 8,5% до 26,6%). Субдоминантами с относительной долей в общем микробиоме от 2,5% до 9,7% были 7 филумов, один из которых принадлежал археям: *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* и *Crenarchaeota* (археи).

Среди доминантов и субдоминантов представленность филумов *Acidobacteria*, *Firmicutes* и *Gemmatimonadetes* увеличивалась с 9,5%, 5,6% и 4,3% в контрольном варианте до 9,6 – 10,7%, 6,2 – 7% и 4,4 – 5,5%, соответственно, во всех опытных вариантах, но при химическом протравливании фунгицидом Кинто дуо наблюдали уменьшение представленности филума *Acidobacteria* по сравнению с контролем. Относительное количество филумов *Crenarchaeota* (археи), *Chloroflexi*, *Planctomycetes* и *Proteobacteria*, – наоборот, снижалось с 4,6%, 5,8%, 4,4% и 24,3% в контрольном варианте до 4,0 – 4,5%, 4,6 – 5,4%, 2,5 – 4,3% и 23,2 – 23,9%, соответственно, в опытных вариантах, за исключением относительного количества представителей филума *Proteobacteria* в варианте с использованием фунгицида Кинто дуо, которое увеличивалось по сравнению с контрольным вариантом до 26,6%.

Кроме указанных выше изменений при инокуляции семян сои комплексным микробным препаратом Эковитал наблюдали увеличение представленности в микробиоме филумов *Actinobacteria* и *TM7*. Обработка семян фунгицидами с последующей бактеризацией способствовала повышению относительного количества представителей филумов *Bacteroidetes* и *Verrucomicrobia* по сравнению с ризосферным микробиомом контрольного варианта. При применении фунгицида Кинто дуо отмечено возрастание представленности филумов *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria* и *Proteobacteria*, а также уменьшение доли представителей таких филумов, как *Actinobacteria*, *Armatimonadetes*, *Elusimicrobia*, *Nitrospirae*, *TM7* и *Verrucomicrobia*. При обработке семян фунгицидом Максим Стар возросла представленность филумов *Actinobacteria*, *Firmicutes*, но уменьшалась доля филумов *Bacteroidetes* и *Cyanobacteria*.

В исследованном микробиоме ризосферы сои идентифицировано 63 класса прокариот, 2 из которых принадлежали археям. Наиболее представленными были 2 класса: *Actinobacteria* (11,4 – 14,9%) и *Alphaproteobacteria* (10,3 – 12,1%), а субдоминантными, доля которых в микробиоме составляла 1,0 – 10,0%, – 21 класс, включая один класс архей (табл. 2). Во всех опытных вариантах доля представителей классов *Acidobacteria-6*, *Ellin6529*, *Phycisphaerae*, *Alphaproteobacteria*, *Spartobacteria*, *Thaumarchaeota* (археи) и *Planctomycetia* (кроме варианта с использованием Эковитала и Максим Стар) снижалась.

Таблица 2

**Представленность (%) доминантных и субдоминантных классов
прокариот в микробиоме ризосферы сои**

№ п/п	Классы	Конт-роль	Экови-тал	Кинто дуо	Максим Стар	Кинто дуо+ Эковитал	Максим Стар + Эковитал
<i>Bacteria</i>							
1	<i>Acidobacteria-6</i>	2,3	1,2	1,0	1,3	1,4	1,7
2	<i>Acidobacteria</i>	1,2	1,3	1,0	1,7	1,1	1,1
3	<i>Solibacteres</i>	2,4	2,4	1,9	2,7	2,5	2,4
4	<i>Chloracidobacteria</i>	4,1	4,2	4,3	3,6	4,3	4,9
5	<i>Acidimicrobiia</i>	1,1	1,1	0,8	1,1	1,1	1,2
6	<i>Actinobacteria</i>	14,3	14,9	14,9	13,7	11,5	11,4
7	<i>Thermoleophilia</i>	5,3	6,3	4,8	6,4	5,5	5,5
8	<i>Sphingobacteriia</i>	0,6	0,5	0,8	0,9	1,2	1,0
9	<i>Saprospirae</i>	5,2	4,7	7,0	4,5	5,8	5,9
10	<i>C0119</i>	0,9	1,0	0,9	1,1	1,0	0,8
11	<i>Chloroflexi</i>	1,4	1,4	1,5	1,4	1,3	1,2
12	<i>Ellin6529</i>	1,25	1,1	0,8	0,9	0,9	0,9
13	<i>Bacilli</i>	5,1	5,2	5,1	5,9	6,6	6,4
14	<i>Gemmatimonadetes</i>	2,7	3,1	2,8	3,2	3,4	3,4
15	<i>Phycisphaerae</i>	1,7	1,6	1,1	1,4	1,3	1,3
16	<i>Planctomycetia</i>	2,7	2,4	1,4	1,9	2,4	3,0
17	<i>Alphaproteobacteria</i>	12,1	11,7	11,8	10,8	10,6	10,3
18	<i>Betaproteobacteria</i>	6,3	6,3	8,1	6,4	6,1	6,4
19	<i>Gammaproteobacteria</i>	2,6	2,3	3,2	2,2	2,2	2,6
20	<i>Deltaproteobacteria</i>	3,1	3,2	3,4	3,9	4,3	4,5
20	<i>TM7-1</i>	0,9	1,1	0,5	1,0	1,0	0,4
21	<i>Spartobacteria</i>	2,3	2,1	1,9	2,0	2,1	1,9
<i>Archaea</i>							
22	<i>Thaumarchaeota</i>	4,7	4,5	4,0	4,5	4,1	4,2

По сравнению с контрольным вариантом относительное количество представителей класса *Bacilli* возросло во всех опытных вариантах с 5,1% до 5,2 – 6,6%. Представленность класса *Actinobacteria* в вариантах с применением фунгицида Максим Стар, а также фунгицидов с бактериризацией уменьшалась в 1,1 – 1,3 раза относительно варианта с инокуляцией Эковиталом. Доля представителей класса *Solibacteres* оставалась на уровне контроля во всех вариантах комплексной обработки, в то время как при использовании фунгицида Кинто дуо она уменьшалась в 1,3 раза, а в варианте с Максим Стар – увеличивалась в 1,2 раза.

Последовательности, обнаруженные нами среди наиболее представленного в микробиоме ризосферы сои филума *Proteobacteria*, были отнесены к 4 классам: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* и *Deltaproteobacteria*. Относительное содержание класса *Alphaproteobacteria* уменьшалось во всех опытных вариантах менее, чем в 1,2 раза, а класса *Gammaproteobacteria* – аналогично в вариантах применения Эковитала, фунгицида Максим Стар, а также Кинто дуо с био-

препаратом. Представленность класса *Betaproteobacteria* в варианте с Эковиталом оставалась на уровне контроля, а в вариантах с использованием только Кинто дуо и Максим Стар в комбинации с Эковиталом она возрастала с 6,3% в контрольном варианте до 6,4 – 8,1%. Относительное количество представителей класса *Deltaproteobacteria* повышалось с 3,1% в контрольном варианте до 3,2 – 3,9% в вариантах с применением Эковитала и фунгицидов, а в вариантах их комбинированного использования с Эковиталом – в 1,4 – 1,5 раза относительно необработанного контроля.

К классу *Alphaproteobacteria* принадлежат метаболически различные гетеротрофные и автотрофные бактерии. Среди гетеротрофов известны микроорганизмы, разлагающие широкий спектр токсических соединений, включая пентахлорфенол и полиароматические углеводороды, которые часто входят в состав пестицидов. К этому классу также относят азотфиксирующие бактерии родов *Rhizobium*, *Mesorhizobium* и *Bradyrhizobium*, образующие симбиоз с бобовыми растениями, и почвенные метаноокисляющие бактерии, такие как *Methylobacter* и *Methylophilus*. Среди автотрофных микроорганизмов есть представители родов *Nitrospira* и *Nitrobacter*, которые активно участвуют в процессах нитрификации, а также фототрофные бактерии родов *Rhodospirillum* и *Rhodobacter* [21]. Класс *Betaproteobacteria* включает гетеротрофные, автотрофные и метанотрофные бактерии. Наиболее известны почвенные гетеротрофы, принадлежащие к роду *Burkholderia* (среди них встречаются штаммы, устойчивые к тяжелым металлам, применяемые для ремедиации почвы [22] и являющиеся стимуляторами роста растений [23]). Представителей рода *Alcaligenes* используют в биотехнологии в качестве продуцентов аминокислот [24]. Для них характерны различные метаболические пути синтеза ароматических и фенольных соединений, применяющихся для защиты растений [21, 25]. Бактерии рода *Collimonas* способны подавлять рост гифов некоторых грибов [26]. К наиболее известным представителям класса *Gammaproteobacteria* принадлежат бактерии родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas*, среди которых встречаются фитопатогены растений. Этот класс также включает фотолитотрофные бактерии родов *Thiocapsa* и *Chromatium*, которые в анаэробных условиях на свету используют сульфидную или элементарную серу в качестве донора электронов. К представителям класса *Deltaproteobacteria*, в основном, относятся сульфат- и железоредуцирующие бактерии, а также бактериальный паразит *Bdellovibrio*. Среди микроорганизмов класса *Actinobacteria* встречаются метаболически различные аэробные гетеротрофы, которые известны своей способностью продуцировать антимикробные и другие биологически активные соединения, например, род *Streptomyces* [27]. Относительное содержание представителей этого класса в почве возрастает после добавления лабильных источников углерода [28].

В наших исследованиях особое внимание было обращено на представленность порядков *Rhizobiales* и *Bacillales*, поскольку в состав комплексного микробного инокулянта Эковитал входят клубеньковые бактерии *B. japonicum* (порядок *Rhizobiales* класс *Alphaproteobacteria*) и *B. megaterium* (порядок *Bacillales* класс *Bacilli*). В ризосферном микробиоме представленность порядка *Rhizobiales* увеличивалась с 5,7% в контроль-

ном варианте до 5,9% в варианте с применением Эковитала и фунгицида Максим Стар и до 6,3% в варианте с использованием фунгицида Кинто дуо. Инокуляция и комплексная обработка биопрепаратом в сочетании с фунгицидами способствовали возрастанию представленности порядка *Bacillales* с 5,1% в варианте без обработки до 5,8 – 6,6% (табл. 3).

Таблица 3

Представленность порядков *Rhizobiales* и *Bacillales* (%) в микробиоме ризосферы сои при применении комплексной инокуляции и обработки фунгицидами

Порядки	Конт-роль	Экови-тал	Кинто дуо	Максим Стар	Кинто дуо + Эковитал	Максим Стар + Эковитал
<i>Rhizobiales</i>	5,7	5,9	6,3	5,7	5,6	5,9
<i>Bacillales</i>	5,1	5,8	5,1	5,7	6,6	6,4

Среди последовательностей, принадлежащих к порядку *Bacillales*, доминирующим был род *Bacillus* (табл. 4). Относительное количество представителей родов *Bacillus*, *Paenibacillus* и *Alicyclobacillus* увеличилось в варианте с применением Эковитала по сравнению с контролем. Обработка семян фунгицидом Кинто дуо с последующей бактеризацией комплексным биопрепаратом способствовала увеличению относительной доли рода *Bacillus* с 2,6% в контрольном варианте до 3,1% в опытном и уменьшению представленности рода *Paenibacillus* с 1,0% (в контрольном варианте) до 0,8%. Представители рода *Shimazuella* были идентифицированы только в вариантах с обработкой семян. Известно, что к классу *Bacilli* принадлежат грамположительные спорообразующие бактерии, большинство из которых способны к трансформации нерастворимых фосфатов почвы в формы, доступные для растений [29]. Они могут стимулировать всхожесть семян и накопление фитомассы за счет синтеза фитогормонов-стимуляторов [30]. Некоторые виды способны существовать эндофитно в различных тканях растений [31]. Отдельные представители рода *Bacillus* могут разлагать углеродсодержащие токсические органические соединения, например, гексахлорциклопексан, являющийся компонентом хлорорганических пестицидов [32].

Среди представителей порядка *Rhizobiales* идентифицировано 13 родов (табл. 4). Самой высокой оказалась представленность рода *Rhodoplanes* (1,8 – 1,9%). Последовательности, относящиеся к роду *Phyllobacterium*, были идентифицированы только в варианте с использованием фунгицида Максим Стар совместно с биопрепаратом. Представители рода *Bradyrhizobium* обнаружены только в вариантах с Эковиталом и в вариантах его совместного применения с фунгицидами. Представленность симбиотрофных азотфиксаторов родов *Mesorhizobium* и *Rhizobium* была 0,1 – 0,2%. Низкое относительное содержание представителей клубеньковых бактерий в микробиоме ризосферы сои указывает на необходимость проведения инокуляции семян селекционированными штаммами комбинированных симбиотических бактерий не только сои, но и других бобовых культур.

Таблица 4

Представленность родов (в %) порядков *Bacillales* и *Rhizobiales* в микробиоме ризосферы сои при обработке фунгицидами и инокуляции Эковиталом

Роды	Конт- роль	Экови- тал	Кинто дуо	Максим Стар	Кинто дуо + Эковитал	Максим Стар + Эковитал
Порядок <i>Bacillales</i>						
<i>Alicyclobacillus</i>	0.5	0.6	0,3	0,5	0.7	0.9
<i>Bacillus</i>	2.6	3.3	2,6	2,6	3.1	2.7
<i>Cohnella</i>	0.1	0.1	0,1	0,2	0.1	0.1
<i>Paenibacillus</i>	1.0	1.1	0,9	0,8	0,8	1.1
<i>Shimazuella</i>	0	0.2	0,1	0,1	0.1	0.0
Порядок <i>Rhizobiales</i>						
<i>Balneimonas</i>	0,4	0,4	0,6	0,4	0,5	0,3
<i>Bradyrhizobium</i>	0	0,1	0	0	0,1	0,1
<i>Devosia</i>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<i>Hyphomicrobium</i>	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3
<i>Pedomicrobium</i>	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2
<i>Rhodoplanes</i>	1,8	1,9	1,8	1,9	1,8	1,9
<i>Methylobacterium</i>	0	0,1	0	0,1	0,1	0
<i>Mesorhizobium</i>	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
<i>Phyllobacterium</i>	0	0	0	0	0	0,1
<i>Agrobacterium</i>	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
<i>Rhizobium</i>	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2
<i>Affifella</i>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Labrys</i>	0,1	0,1	0	0	0,1	0,1

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что при различных вариантах обработки семян в прокариотном микробиоме ризосферной зоны сои обнаружены как количественные различия в представленности отдельных таксонов, так и качественные.

Обсуждение. По данным литературы, с применением современных методов молекулярной экологии в почве и ризосфере выявлено около 100 филумов прокариот, среди них доминируют около 10. Их относительное количество зависит от типа почв и вида культурных растений, которые на них выращиваются [33]. Чаще всего наиболее широко представлены филумы *Proteobacteria*, *Acidobacteria* и *Actinobacteria*, тогда как относительная доля филумов *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* и *Gemmatimonadetes*, как правило, меньше [21].

Как в исследованиях других авторов [5, 9, 34], так и в наших в ризосферном микробиоме сои идентифицированы последовательности бактерий 7 филумов: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*. Эти прокариоты встречались независимо от типа почвы и условий выращивания. Вероятно, их можно считать характерными представителями микробиома ризосферы сои.

В ризосферном микробиоме сои, выращиваемой в Японии на богатой органикой почве, кроме этих филумов, выявлены еще 10: *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Spirochaetes*, BRC1, OD1,

OP10, WS3 и TM7 [9]. Филумы *Firmicutes* и *Cyanobacteria* также были обнаружены как в наших исследованиях, так и в исследованиях ризосферного микробиома сои, культивируемой в Юго-Восточном регионе Бразилии [5]. В микробиоме ризосферы сои, произрастающей на солонцевато-щелочной почве [34], и в наших исследованиях идентифицированы филумы *Armatimonadetes*, *Nitrospirae* и TM7.

Таким образом, анализ существующих в литературе данных свидетельствует о том, что в ризосфере сои обнаруживается от 17 до 19 филумов. В исследованной темно-серой подзолистой почве нами обнаружено большее количество филумов – 23. Следует отметить, что присутствие в ризосфере сои филумов *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Elusimicrobia*, *FBP* и *GN02* нами описано впервые. Кроме того, другие исследователи не акцентировали внимание на наличии в ризосфере сои архей. В наших исследованиях обнаружено 2 филума архей, из которых *Crenarchaeota* принадлежал к доминантам.

По полученным нами данным, доминантными в ризосфере сои были 12 филумов, один из которых принадлежал археям: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *TM7*, *Verrucomicrobia* и *Crenarchaeota* (археи). В исследованиях других авторов [9, 34, 35] доминантными, при аналогичном выбранном уровне доминирования (с представленностью в микробиоме от 1% и выше), в ризосфере этих растений были только 3 филума – *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Acidobacteria*. Вероятно, эти филумы могут доминировать в микробиоме ризосферы сои независимо от типа почвы и условий выращивания растений.

Следует также подчеркнуть, что по результатам наших исследований, спектр доминантов был значительно шире, чем описанный в литературе, в частности, более представленными были филумы *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*.

Анализ представленности прокариот на уровне классов обнаружил в составе исследуемого микробиома 63 класса, из которых 22 были доминантными (табл. 2). Как в наших исследованиях, так и в исследованиях других авторов [9, 34, 35] наиболее представленными были *Acidobacteria*, *Thermoleophilia*, *Sphingobacteria*, *Chloroflexi*, *Phycisphaerae*, *Planctomycetia*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*. В отличие от указанных в литературе, в исследованной нами почве, как абсолютный доминант, обнаружен класс *Actinobacteria* с представленностью 11,4 – 14,9 %. Также в спектре доминантов были представители класса *Chloracidobacteria*, которые в литературе не отнесены к доминантам (представленность ниже 1%).

Среди порядков *Rhizobiales* и *Bacillales* ризосферной микробиоты сои в наших исследованиях наиболее представленным был род *Bacillus* (2,6 – 3,3%), что совпадает с результатами, полученными в работах других авторов [8, 35]. Можно предположить, что бактерии рода *Bacillus* являются типичными представителями ризосферного микробиома сои, учитывая важную роль бацилл в ассоциациях с растениями. Относительная доля рода *Bradyrhizobium* в исследованном микробиоме была очень низкой (0,1% в опытных вариантах). В отличие от полученных нами данных, в работе [35] было показано, что содержание представителей этого рода в

ризосферної ґрунті сої було значно вище (2,6 – 18,4%). Вероятно, це пов'язано з тим, що автори досліджували ґрунті, де соя була введена в культуру в доісторическі часи, а в Україні, в частності в Київській області, цю культуру почали вирощувати відносно недавно.

Більшість відомих в літературі даних присвячено вопросу впливу фунгіцидів на численність мікроорганізмів різних еколого-трофічних груп [36] или окремих видів [37]. Інформація о впливі фунгіцидів на якісний склад ризосферного мікробіома обмежена [38] и не стосується ризосферної зони сої.

Таким образом, при дослідженні мікробіома ризосфери сої методом високопродуктивного секвенування ідентифіковано 23 філумів (серед них два – археї), 63 класу (два з них – археї). Домінантними були філуми *Crenarchaeota* (археї), *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, *TM7*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*, серед яких найбільш представленими були *Actinobacteria* (18,2 – 22,4%) и *Proteobacteria* (23,3 – 24,3%). Передпосівна комбінована обробка насіння сої фунгіцидами и мікробним препаратом Ековітал не змінювала якісний склад доміантних філумів. Рід *Bacillus* домінував серед представителів порядку *Bacillales* (2,6 – 3,3%). Комплексна інокуляція и комбінована обробка насіння сої біопрепаратом Ековітал з фунгіцидами сприяла збільшенню представленості філумів *Acidobacteria*, *Firmicutes* и *Gemmatimonadetes* в складі мікробіома ризосферної ґрунті сої по порівнянню з контрольним варіантом без обробки насіння. Відносно низька частота клубенькових бактерій роду *Bradyrhizobium* в дослідженні мікробіомі свідчить о необхідності інокуляції насіння сої високопродуктивними штамми ризобій.

Високопродуктивне секвенування зразків виконано при підтримці проекту РНФ 18-16-00073.

МІКРОБІОМ РИЗОСФЕРИ СОЇ ЗА ЗАСТОСУВАННЯ ФУНГІЦИДІВ ТА КОМПЛЕКСНОЇ ІНОКУЛЯЦІЇ

¹С.В. Вознюк, ¹Л.В. Титова, ²О.Г. Пінаєв,
²Є.Є. Андронов, ¹Г.О. Іутинська

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

²Федеральна державна бюджетна наукова установа
«Всеросійський науково-дослідний інститут сільськогосподарської мікробіології»,
шосе Подбельського, 3, Санкт-Петербург, 196608, Росія

Резюме

Біорізноманітність ризосферної мікробіоти відіграє ключову роль у підвищенні продуктивності культурних рослин, проте мікробіом ризосферної зони сої за різної передпосівної обробки насіння досліджений недостатньо. **Мета.** Дослідити мікробіом ризосфери сої за обробки насіння фунгіцидами з наступною інокуляцією комплексним мікробним препаратом Ековітал. **Методи.** Фізіологічні (вегетаційні досліді), мікробіологічні (підготовка інокулянта), молекулярно-біологічні (високо-

продуктивне секвенування). **Результати.** У мікробіомі темно-сірого опідзоленого ґрунту ризосфери сої виявлено 23 філума (з них – 2 археї), 63 класи і неідентифіковані послідовності (7,1 – 7,3%). Домінантними, з представленістю від 1% до 26,6%, були 12 філумів: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanjbacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *TM7*, *Verrucomicrobia* та *Crenarchaeota* (археї). Доля доміантних філумів *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes* і *Rhizobiales* за комплексної обробки насіння підвищувалась порівняно з контролем. Послідовності, що віднесені до родів *Phyllobacterium* і *Methylobacterium*, виявлено тільки у варіантах із застосуванням фунгіцидів та Ековіталу. **Висновки.** Передпосівна комбінована обробка насіння сої не впливала на якісний склад доміантів мікробіому ризосфери, проте змінювала представленість окремих таксонів. Бульбочкові бактерії роду *Bradyrhizobium* не було виявлено у ризосферному ґрунті контрольного варіанту, а за комбінованої обробки насіння їх представленість не перевищувала 0,1%, що свідчить про необхідність застосування високоєфективних штамів ризобій за вирощування сої.

Ключові слова: соя, ризосфера, мікробіом, інокуляція, фунгіциди, високопродуктивне секвенування, біорізноманітність.

MICROBIOME OF SOYBEAN RHIZOSPHERE UNDER FUNGICIDES AND COMPLEX INOCULATION APPLICATION

*S.V. Vozniuk¹, L.V. Tytova¹, A.G. Pinaev²,
E.E. Andronov², G.O. Iutynska¹*

¹*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine*

²*All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology,
Federal Agency of Scientific Organizations,
3Podbel'skogo Str., St. Petersburg, 196608, Russia*

Summary

The biodiversity of the rhizosphere microbiota plays a key role for improving the productivity of cultural plants, but the soybean rhizosphere microbiome has not been studied sufficiently under various pre-sowing seed treatments. **Aim.** To investigate soybean rhizosphere microbiome under the pre-sowing treatment of seeds with the fungicides followed by inoculation with the complex microbial bioformulation Ecovital. **Methods.** Physiological (vegetation experiments), microbiological (inoculant production), molecular biological (high-performance sequencing). **Results.** In the microbiome of the soybean rhizosphere in dark gray podzolic soil, 23 phyla (including 2 archaea), 63 classes and unidentified sequences (7,1 – 8,3%) were found. The dominants, with a representation from 1% to 26,6%, were 12 phyla: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanjbacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *TM7*, *Verrucomicrobia* and *Crenarchaeota*. The representation of dominant phyla *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes* and *Rhizobiales* increased under complex treatment of seeds compared to the control variant. The sequences related to the *Phyllobacterium* and *Methylobacterium* genera, were found only in the variants with using of fungicides and Ecovital. **Conclusions.** The combined pre-sowing treatment of soybean seeds did not affect the qualitative composition of the dominants, but change the representation of

individual taxa. The nodule bacteria of the *Bradyrhizobium* genus were not detected in the rhizosphere soil of the control variant but under combined treatment of seeds their relative representation did not exceed 0,1%. It indicates the need of highly effective rhizobia strains application for soybean cultivation.

Keywords: soybean, rhizosphere, microbiome, inoculation, fungicides, high performance sequencing, biodiversity.

1. Usman S, Muhammad Y, Chiroman AM. Roles of soil biota and biodiversity in soil environment – a concise communication. *Eurasian J Soil Sci.* 2016; 5(4):55–65.
2. Tkacz A, Poole PS. Role of root microbiota in plant productivity. *Journal of Experimental Botany.* 2015; 66(8):67–75 doi:10.1093/jxb/erv157.
3. Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013; 11(11): 89–99 (doi:10.1038/nrmicro3109).
4. Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006; 57:33–66 (doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159).
5. Tkacz A, Cheema J, Chandra G, Grant A, Poole PS. Stability and succession of the rhizosphere microbiota depends upon plant type and soil composition. *ISME J.* 2015; 9:49–59.
6. Elliott ML, McInroy JA, Xiong K, Kim JH, Skipper HD, Guertal EA. Taxonomic Diversity of Rhizosphere Bacteria in Golf Course Putting Greens at Representative Sites in the Southeastern United States. *HortScience.* 2008; 43 (2):14–18.
7. Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2007; 34(10):35–48. doi:10.1007/s10295-007-0240-6.
8. Tytova LV, Leonova NO, Antipchuk AF. [Nitrogen fixing microorganisms in microbial-plant systems. *Bioregulation of Microbial-Plant Systems*]: Monograph / Iutynska GO, Ponomarenko SP, Andreyuk KI, et al.; Iutynska GO, Ponomarenko SP, editors, K.: Nichlava. – 2010:99–195. Russian.
9. Sugiyama A, Ueda Y, Zushi T, Takase H, Yazaki K. Changes in the bacterial community of soybean rhizospheres during growth in the field. *PLOS ONE.* 2014; 9(6):1–9. (www.plosone.org).
10. Sugiyama A, Ueda Y, Takase H, Yazaki K. Do soybeans select specific species of *Bradyrhizobium* during growth? *Commun Integr Biol.* 2015; 8(1): e992734 (doi:10.4161/19420889.2014.992734).
11. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2004; 68(4):69–85.
12. Rincon-Florez VA, Carvalhais LC, Schenk PM. Culture-Independent Molecular Tools for Soil and Rhizosphere Microbiology. *Diversity.* 2013; (5):581–612.
13. Fakruddin MD, Chowdhury A, Nur Hossain MD, Bin Mannan KS, Mazumdar RM. Pyrosequencing – principles and applications. *International Journal of Life Science and Pharma Research.* 2012; 2 (2):65–76.
14. Kropf S, Smalla K. Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce. *Front Microbiol.* 2014, 5(article 144):1–13 (doi:10.3389/

- fmicb.2014.00144).
15. Loa CC. Effect of pesticides on soil microbial community. *Journal of Environmental Science and Health (Part B)*. 2010; (45):348–359.
 16. Hussain S, Siddique T, Saleem M, Arshad M, Khalid A. Impact of Pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. *Advances in Agronomy*. 2009; 102(1):159–200.
 17. Patent UA 101388 C2 (Ukraine), IPS (2013.01) C 05 F 11/100, C 12 P 39/00. Complex microbial bioformulation Ecovital for leguminous crops seeds inoculation. Tytova LV, Leonova NO, Brovko IS, Iutynska GO. Pub. 25.03.2013, Bull. №6.
 18. Iutynska GA, Tytova LV, Pinaev AG, Andronow EE, Vozniuk SV. [Microbiome biodiversity of soybean rhizosphere under application of fungicides and inoculation by microbial bioformulation Ecovital]. *Microbiology and biotechnology*. 2017; 1:23–35. Russian.
 19. Bates ST, Berg-Lyons JG, Caporaso WA, et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J*. 2010; 5(5):8–17. doi:10.1038/ismej.2010.171
 20. Kuczynski J, Stombaugh J, Walters WA, Gonzalez A, Caporaso JG, Knight R. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from Microbial Communities. *Curr Protoc In Bioinformatics*. 2012. 28 p.
 21. Aislabie J, Deslippe JR. Soil microbes and their contribution to soil services. In: Dymond JR, editor. *Ecosystem services in New Zealand – conditions and trends*. Manaaki Whenua Press, Lincoln, New Zealand. 2013:43–61.
 22. Jiang C, Sheng X, Qian M, Wang Q. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*. 2008; 72 (2):57–64.
 23. Tripti K, Kumar A, Usmani Z, Kumar V, Anshumali. Biochar and flyash inoculated with plant growth promoting rhizobacteria act as potential biofertilizer for luxuriant growth and yield of tomato plant. *Journal of Environmental Management*. 2017; 190:20–27.
 24. Patent US 2007/0009995 A1 (USA). Prevention of incorporation of non-standard amino acids into protein. Bogosian G, Valley C, O’Neil JP, Glendale, Smit HO, St. Louis. Pub. 11.01.2007.
 25. Uroz S, Calvaruso C, Turpault MP, Pierrat JC, Mustin C, Frey-Klett P. Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73:19–27.
 26. De Boer W, Leveau JHJ, Kowalchuk GA, Klein Gunnewiek PJA, Abeln ECA, Figge MJ, et al. *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004; 54: 57–64.
 27. Iutynska GO, Biliavska LO, Kozyriska VE. Development strategy for the new environmentally friendly multifunctional bioformulations based on soil streptomyces. *Mikrobiol Z*. 2017; 79(2):22–33.
 28. Goldfarb KC, Karaoz U, Hanson CA, Santee CA, Bradford MA, Treseder KK, et al. Differential growth responses of soil bacterial taxa to carbon substrates of varying

- chemical recalcitrance. *Frontiers in Microbiology*. 2011; 2: Article 94.
29. Tserkovniak LS, Kurdish IK. Phosphate-mobilizing bacteria *Bacillus subtilis* as phenolic producers. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2009; 45(3):79–84.
 30. Grabova AYu, Dragovoz IV, Leonova NO, Ostapchuk AN, Avdeeva LV. [Exometabolites of *Bacillus amiloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMV B-7524 strain with growth-stimulating activity]. *Mikrobiol Z*. 2017; 79(2):67–77. Ukrainian.
 31. Faegheh E. and Behrouz H. Isolation and Identification of Endophytic Bacteria with Plant Growth Promoting Activity and Biocontrol Potential from Wild Pistachio Trees. *Plant Pathol J*. 2018; 34(3):8–17.
 32. Yamborko NA. Biorem as promising microbial preparation for degradation persistence organic hexachlorocyclohexane (HCH) pollution in soil. In: Technological aspects of modern agricultural production and environmental protection; 2017 Nov. 8 11; Almyty, Kazakhstan. Almyty: AlFaraby Kazakh National University Press, 2017:14–17. <http://darostim-conference.info>
 33. Janssen PH. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72:19–28.
 34. Li X, Sun M, Zhang H, Xu N, Sun G. Use of mulberry-soybean intercropping in salt-alkali soil impacts the diversity of the soil bacterial community. *Microbial Biotechnology*. 2016; 9(3):293–304.
 35. Sugiyama A, Unno Y, Ono U, Yoshikawa E, Suzuki H, Minamisawa K, and Yazaki K. Assessment of bacterial communities of black soybean grown in fields. *Communicative and integrative biology*. 2017; e1378290 (8 pages).
 36. Ullah MR, Dijkstra FA. Fungicide and Bactericide Effects on Carbon and Nitrogen Cycling in Soils: A Meta-Analysis. *Soil Syst*. 2019; 3 (23); doi:10.3390.
 37. Lo C-C. Effect of pesticides on soil microbial community. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 2010; 45:48–59.
 38. Chaparro JM, Badri DV, Vivanco JM. Rhizosphere microbiome assemblage affected by plant development. *ISME J*. 2014; 8:790–803.

Отримано 03.07.2019