
ҐРУНТОВА МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 579.262

В. А. Кордюм, Е. В. Мошинец, М. В. Цапенко, Н. И. Адамчук-Чалая, Д. М. Иродов,
В. И. Андриенко

МИКРООРГАНИЗМЫ РИЗОСФЕРЫ – ПОЛНЫЙ МОНИТОРИНГ

В. А. Кордюм¹, О. В. Мошинец¹, М. В. Цапенко¹, Н. И. Адамчук-Чалая², Д. М. Иродов¹,
В. И. Андриенко¹

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАНУ

² Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАНУ

МИКРООРГАНИЗМЫ РИЗОСФЕРЫ – ПОВНИЙ МОНИТОРИНГ

Мікроценози – один з найрізноманітніших та розповсюджених типів просторово-функціональної організації живих угруповань на Землі. Такі ценози існують як у природному середовищі, так і в штучних субстратах. Роботи щодо їх вивчення вже йдуть протягом більш ніж 100 років. Але внаслідок особливостей мікроценозів їх вивчення в переважній більшості випадків здійснюється тільки після руйнування їх природної архітектури. Гнучкого підходу для вивчення просторової архітектури мікроценозів в їх нативному стані досі не було запропоновано. У цій роботі проаналізовано основні проблеми, що супроводжують дослідження субстрату них мікроценозів. Запропоновано принципово новий підхід до вивчення субстратних мікроценозів в їх нативній архітектурі, що дозволяє здійснювати просторовий аналіз мікробних угруповань.

Ключові слова: ризосфера, мікроценоз, просторова структура, субстрат, некультурабельні форми.

V. A. Kordyum¹, E. V. Moshynets¹, M. V. Tsapenko¹, N. I. Adamchuk-Chalaia², D. M. Irodov¹,
V. I. Andrienko¹

¹ *Molecular biology and genetics institute of NAS of Ukraine*

² *M. G. Kholodny Botany Institute, NAS of Ukraine*

RHIZOSPHERE MICROORGANISMS – COMPLETE MONITORING

Microcenosis is one of the most variegated and common type of the space-structure live consortium on Earth. These cenoses exist in both natural environment and artificial substrates. Investigation of such consortiums has been conducting for more than a hundred years. This studying generally results from the destroying of natural space architecture of cenosis. Unfortunately there is no universal approach to analysis of native microcenoses space structure. In the present article a completely new method of an investigation of the microcenosis in their natural architecture is proposed.

Keywords: rhizosphere, microcenosis, spatial structure, substrate, unculturable forms.

Несмотря на неоспоримую важность изучения природных субстратных микробных сообществ, наше понимание их организации и функционирования остаётся всё ещё чрезвычайно недостаточным (Copley, 2000; Buckley, Schmidt, 2003). Нехватка информации о почвенных микробных сообществах является следствием их чрезвычайной сложности и генетического разнообразия (Torsvik et al., 1990). Микробные сообщества – живые системы, которые подвергаются влиянию внешних факторов, что ведёт к адекватным изменениям в сообществе – как качественным, так и количе-

ственным. Поэтому изучение функционирования такой динамичной системы, как субстратные микробные сообщества, влияния различных внешних факторов на них, в том числе и антропогенного характера, имеет большое значение (*Buckley, Schmidt, 2003*). Мониторинг микроорганизмов в их естественной среде обитания необходим для лучшего понимания микробных экосистем и стратегий их выживания, что важно, в том числе, и для оценки риска введения генетически модифицированных микроорганизмов в естественные сообщества (*Roszak, Colwell, 1987; Akkermans at al., 1994*).

Для изучения микробных сообществ долгое время использовались классические микробиологические методы. А именно: методы изготовления субстратных (почвенных) смывов, высев этих смывов на питательные среды, изоляция полученных колоний по морфотипам в чистые культуры с дальнейшим их изучением. Однако вскоре стало известно, что далеко не все микроорганизмы способны к росту на искусственных питательных средах. В связи с этим хочется особо отметить акцент, сделанный *Akkermans at al.* (1994) на том, что понятие «*unculturable*» в отношении микроорганизмов не корректно до тех пор, пока их неспособность к культивированию на искусственных питательных средах действительно будет доказана. В целом автор считает целесообразным использовать термин «*uncultured*», подразумевая под ним, что данный микроорганизм не может быть культивирован на данный момент в силу отсутствия технологии его культивирования, но гипотетически он может быть получен в искусственных условиях. И действительно, ряд работ показывает, что некоторые некультурабельные микроорганизмы в конкретных экспериментальных условиях становятся культурабельными (*Kaeberlein at al., 2002; Joseph at al., 2003*).

Таким образом, ученые пришли к пониманию, что микроорганизмы, которые могут быть изолированы из микробного сообщества на отдельных питательных средах, являются только ничтожной частью сообщества в целом (*Kaeberlein at al., 2002; Torge at al., 2003*). Микробные ценозы являются очень гетерогенными и состоят из клеток с самыми разнообразными метаболическими способностями. Для того чтобы описать такое биоразнообразие, необходимы реалистичные, надёжные и точные методы, позволяющие как детекцию, так и идентификацию микробных групп. И такие методы появились. Это методы молекулярного анализа, изучающие микроценозы на молекулярном уровне и позволяющие работать с некультурабельными формами (*Akkermans at al., 1994; Buckley, 2003*). Такие методы действительно открыли принципиально новые возможности в изучении ценозов. Однако, как и используемые ранее классические культивационные методы, они являлись деструктивными. То есть применение таких подходов включает полную деструкцию микроценоза и экстракцию его компонентов (клетки в случае культурабельных методов, нуклеиновые кислоты в случае генетического молекулярного анализа, липиды и ферменты – в случае биохимических тестов). Тем не менее в литературе изучение и идентификация отдельных структурных компонентов называется «изучением структуры микробных сообществ» (*Buckley, 2003*). И это только потому, что на сегодняшний день не существует подходов к работе с микробными сообществами в их естественной уникальной структуре без её нарушения.

Таким образом, сам механизм функционирования субстратных (как естественных, так и искусственных) ценозов на сегодняшний день представляет собой нерешенную, хотя и довольно актуальную, проблему. Сегодня субстраты, в которых растут растения, можно разделить на две большие (и не равные по распространению) группы – природные и искусственные. Такое деление достаточно условно, так как искусственные субстраты в основном изготавливают из естественных. Тем не менее в общепринятом понимании такое деление оправдано, так как «линия разделения» проходит между «тем, что в природе», и тем, что совмещено с технологиями приготовления, а затем и использования искусственных субстратов. С подготовкой субстрата (будь он естественным или искусственным) начинается выращивание растений (Методы ..., 1966). И с этого момента возникает проблема микроорганизмов, а именно стабильное функционирование субстратных микроценозов. В подавляющем большинстве случаев процесс формирования субстратных микроценозов пускается на самотек и протекает вне контроля, по своим законам.

Для природных субстратов при обычных природных условиях такие самоорганизующиеся микробные ценозы функционируют успешно (хотя познанию их и попыткам управления ими уделяют очень большое внимание) (*El-Shatnawi at al.*, 2001; *Daniel at al.*, 2003; *Gregory*, 2006). Для искусственных субстратов, которые на момент использования не имеют стабильных сформированных микроценозов, проблема микроценозной организации (направленной или самопроизвольной) часто требует специальных решений (*McGilloway at al.*, 2002). Поэтому в случае формирования микроценоза в искусственном субстрате контроль, мониторинг такого ризосферного ценоза на стадиях его формирования и функционирования является просто необходимым.

Однако возможности мониторинга микроорганизмов имеют ряд принципиальных ограничений. Первый из них связан с природой субстратов, их структурой (*Ming*, 1989; *McGilloway at al.*, 2003). За исключением чисто «водной» технологии выращивания растений (при которой корни находятся полностью в питательном растворе), все остальные используют гранулярно-структурированные субстраты (*McGilloway at al.*, 2002; *Ming*, 1989). Это относится как к естественным, так и к искусственным (вермикулит, цеолит) субстратам. В них имеются развитые поверхности, состоящие из пор, щелей, полостей, в которых могут располагаться (и действительно располагаются) микроорганизмы в количестве и качестве, практически недоступном исследованию (*Kaeblerlein at al.*, 2002). И даже предельно «открытый» в этом отношении субстрат – песок обладает неровной, сложной поверхностью песчинок. В результате по фундаментальным особенностям субстрата он принципиально не позволяет осуществлять полный мониторинг микроорганизмов (Методы ..., 1966; *Shayne at al.*, 2003).

Также проблема возникает при изучении самой биологии сосуществования микроорганизмов с растением. Термин «ризосфера» несёт совершенно чётко определённую смысловую нагрузку, неразрывно связанную с экологией растений (*Hinsinger at al.*, 2005; *Whalley at al.* 2005). В природе растения обитают в естественных субстратах, которые формируются на протяжении длительного времени и приобретают определённую структуру (*Young at al.*, 1998; *Bartoli at al.*, 2005). Как пример (и самый распространённый для растений субстрат) – почва. Почвообразовательный процесс протекает столетиями. В результате образуется масса, обладающая уникальной реологией. Корни в почве окружены плотно прилегающими крупницами и аморфным материалом (*Watteau at al.*, 2006). В таком субстрате микрофлора организована пространственно-градиентно (*Buckley at al.*, 2003; *Hinsinger at al.*, 2005; *Watt at al.*, 2006). А непосредственно на корнях обитают микроорганизмы, которые существуют в градиенте корневых выделений. Концентрированный максимум такого градиента приходится на поверхность корней и резко падает по мере удаления от корня. Падение градиента вызвано диффузией корневых выделений в рыхло-непрерывный субстрат, которым и является почва, а также непрерывным поглощением доступных органических веществ всей почвенной микрофлорой. Следствием такой пространственной организации растения в субстрате является организация субстратной микрофлоры (*Buckley at al.*, 2003; *Whalley at al.*, 2005). Корневые микроорганизмы – непосредственно на корнях, прикорневые – в первых миллиметрах от корней, несколько далее – ризосферная микрофлора. В свою очередь, корневая микрофлора тоже располагается по градиенту концентраций питательных веществ и фитонцидов. Принципиально такая же организация растения – субстрат имеет место и в других ареалах обитания (иле водоёмов, прибрежном песке и т. д.) (*Young at al.*, 1998; *Greaver at al.*, 2007).

Качественно иная пространственная организация микрофлоры имеет место в искусственных субстратах – цеолит, вермикулит и т. д. В них нет рыхло-непрерывной среды. В них – крупитчато-прерывистая среда. Корни растений, прилегая к крупинкам, не имеют вокруг себя такого градиента, как в почве. И микроорганизмы в таком субстрате будут располагаться не по непрерывному градиенту выделений корней, а прерывисто-локально (Звягинцев, 1973; *Torre at al.*, 2003). Поэтому микрофлора на поверхности корней будет в основном (а на многих участках – целиком) находиться в условиях повышенной до максимума концентрации корневых выделений (им некуда диффундировать вообще или такая диффузия ограничена). Аналогичная ситуация будет и с выделениями бактерий, находящихся на поверхности корней.

Такая пространственная организация сообщества неизбежно приведёт к изменению микробного состава. А поскольку такой ситуации в природных сообществах нет, то и готового микробного состава для таких искусственных субстратов тоже нет. Сам по себе он будет формироваться неопределённо долго. Его следует сформировать заранее серией пассажей через один и тот же субстрат требуемого растения, да ещё и не допустить при этом такой эффект, хорошо известный для ряда монокультур, как «почвенное утомление» (Roy *at al.*, 2003).

Второе ограничение обусловлено природой, биологией обитателей микроценозов, подавляющее большинство которых не умеют выращивать на искусственных питательных средах в лабораториях.

До сих пор, несмотря на все усилия и совершенство методов исследования, не более 0,1 % (что является предельной величиной, так как обычно приводят цифру 0,01 %) всех микроорганизмов, определяемых в субстратах прямыми методами подсчета общей численности, могут расти на совокупности всех тех питательных сред, которые используют в лабораториях (Amann *at al.*, 1995; Kaerberlein *at al.*, 2002). В какой-то мере это восполняется методами молекулярной диагностики – ПЦР в реальном масштабе времени, флуоресцентными зондами и т. д. (Buckley *at al.*, 2001). Но только в «какой-то мере».

Третье ограничение определяется тем, что относят к понятию «экология». Для микроценозов их экологию почти никогда не определяют в виде реальности. В природе, в экосистемах, живое существует, взаимодействует не «вообще», а строго пространственно организовано. Вне такой пространственной организации, архитектуры микроценозов, экология превращается в абстракцию формулировки, существующую только в нашем воображении. В природе же экология – это обязательно пространственно-организованное построение её составляющих. И оценка микроценозов путем суспензирования с интенсивным встряхиванием (чтобы снять микроорганизмы с поверхности субстрата и сделать их доступными для лабораторного изучения) фактически идентична изучению жизни города путем его максимального разрушения (например, предельным землетрясением), затем «перемешивания» и последующего рассмотрения по кирпичикам, болтам, осколкам стекла, кускам пластика и т. д. (Виноградский, 1952; Perfil'ev, Gabe, 1969; Buckley, Schmidt, 2001). И по таким отдельным элементам далее составлять картину жизни города, его архитектуру, расположение, транспорт.

В течение последних 100 лет ведутся поиски преодоления этих ограничений. К ним относятся стекла обрастания, предложенные С. Н. Виноградским (1952), плоскопараллельные капилляры Б. В. Перфильева (Perfil'ev, Gabe, 1969) и т. д. При решении ряда вопросов эти методы не получили широкого распространения, так как их невозможно было совместить с возникшими во второй половине прошлого века высокоинформативными технологиями исследований (электронная микроскопия, молекулярная диагностика и т. д.). Кроме того, чисто процессуально с жестким, ломким материалом было неудобно работать. Блестящие идеи не нашли широкого применения вследствие ограниченного технологического уровня их воплощения.

Мы попытались, исходя из современных возможностей, создать необходимую технологию, совмещающую возможность работы с микробным ценозом в его естественной архитектуре с использованием при этом всех современных техник с разными уровнями разрешения. Главной целью было разработать неразрушительную технологию, позволяющую работать с ценозом в его нативной архитектуре.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для формирования устойчивого микробного ценоза в искусственном субстрате использовалась почва. Почва бралась в Голосеевском лесу (г. Киев, Украина). В ёмкость с почвой (10 литров) помещался субстрат. Время пребывания субстрата в почве – три недели при температуре +23 +25 °С и комнатной влажности воздуха. Почва при этом увлажнялась один раз в три дня. В результате на поверхности волокон по прошествии трех недель адгезировались органические вещества и сформировались микробные ассоциации.

Для работы было выбрано растение *Arabidopsis thaliana*, сорт *Columbia*.

Для выращивания растений была сконструирована мини-оранжерея. Она представляла собой стеллаж с микрокультиваторами растений. Полив водопроводной водой осуществлялся раз в два дня. Оптимальный уровень влажности атмосферы внутри камеры составил 75–80 %. Для поддержания такого уровня камеры накрывали прозрачными пластиковыми крышками. Лампы, размещённые над растениями, создавали освещённость в диапазоне 9–12 тыс. лк. (на уровне поверхности субстрата). В системе имелись термодатчики для контроля за температурой воздуха как в отдельных камерах, так и во всей системе. Температурный режим находился в границах +22 +24 °С.

Регуляция температуры осуществлялась с помощью кондиционера.

Посев семян растений *Arabidopsis thaliana* проводили на глубину 1–3 мм.

Для изучения пространственной структуры ризосферного микробного ценоза на разных стадиях выращивания растений отдельные волокна вынимали из субстрата. Благодаря тому что они размещены параллельно, они легко отделялись друг от друга, при этом сохранялась целостность сформированной на поверхности волокон микробной ассоциации.

Каждое отдельное волокно фиксировали в парах 37 % формалина в течение одного часа.

Волокно окрашивалось красителем акридиновый оранжевый (Standard Fluka) в концентрации 0,2 % в течение 5 минут, отмывалось в водопроводной воде. После этого волокно помещалось на предметное стекло, покрывалось покровным стеклом и исследовалось по средством люминесцентной микроскопии. Сканирование проводилось на всю длину волокна, т.е. на всю глубину субстрата. Использовался люминесцентный микроскоп МЛ-2, ЛОМО со светофильтром с пиком 380 нм. Поля зрения фотографировались последовательно, с перекрыванием. В дальнейшем фотографии совмещались в целую панораму (Adobe Photoshop CS, version 8.0).

То же волокно после исследования его методами люминесцентной световой микроскопии было проанализировано сканирующей электронной микроскопией. Для этого волокно высушили в эксикаторе с притёртой крышкой, содержащем 80 шариков силикагеля (3–4 мм в диаметре каждый) на протяжении 48 часов. Затем волокно приклеили к металлическому столику силикатным клеем с алюминиевой стружкой. После фиксации волокна на столике происходит напыление золота, толщина напылённого слоя 15–20 мкм. Работы проводили Jeol JSM 35C и Jeol JSM 6060LA.

Препараты для исследования в сканирующих электронных микроскопах Jeol JSM 35C и Jeol JSM 6060LA крепились эпоксидным клеем с алюминиевой крошкой на предметный столик, выдерживались трое суток в герметическом сосуде с кубиками силикагеля и напыляли золотом толщиной 15–20 А.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Субстрат для выращивания растений и исследования микроорганизмов был изготовлен из гибких термостойких полиэтиленовых волокон, расположенных параллельно друг к другу. Изготовление субстрата осуществлялось следующим образом: из волокон нетоксичного для живых объектов полимера диаметром 0,5 мм формировали пучки диаметром 40 мм и высотой 30 мм. Пучки фиксировались металлическим кольцом и проводили запаивание на одном из поперечных срезов путем нагревания металлической формы, в который помещали торец пучка, до температуры плавления полиэтилена.

После изготовления субстрата проводили его обработку для устранения возможных токсичных примесей и механических частиц. Для этого изделия промывали в проточной воде, затем кипятили 10 минут в 2%-ном растворе CaCO₃, после чего промывали и кипятили 3–4 раза по 10 минут в дистиллированной воде.

Была отработана технология культивирования растений арабидопсиса на искусственном субстрате. На новом субстрате был получен полный жизненный цикл растений арабидопсиса, получены жизнеспособные семена. Жизненный цикл составил в среднем 60 дней.

Полученные изображения микробных пейзажей, выполненных методами как световой, так и электронной микроскопии, показали принципиальную возможность

отслеживания архитектуры микробного субстратного ценоза непосредственно, без каких-либо дополнительных изменений со стороны исследователя. Таким образом, была получена панорама микробного субстратного ценоза, проходящего через ризосферную область корней арабидопсиса, методами люминесцентной микроскопии (рис. 1).

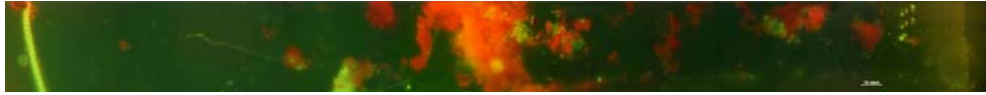


Рис. 1. Микробный пейзаж ризосферной зоны арабидопсиса. Люминесцентная микроскопия

Также была отслежена динамика формирования субстратного микроценоза. Было замечено, что на ранних стадиях формирования ценоза в искусственном субстрате наблюдается большое количество водорослей, особенно у верхнего края субстрата (рис. 2). Однако по мере роста растения количество водорослей снижается и доминирующими становятся бактериально-грибные ассоциации (рис. 3, 4).

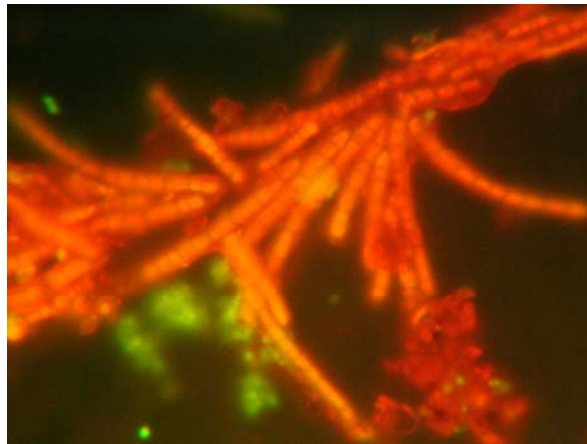


Рис. 2. Септированные водоросли ризосферной зоны арабидопсиса. Ранняя стадия формирования. Люминесцентная микроскопия

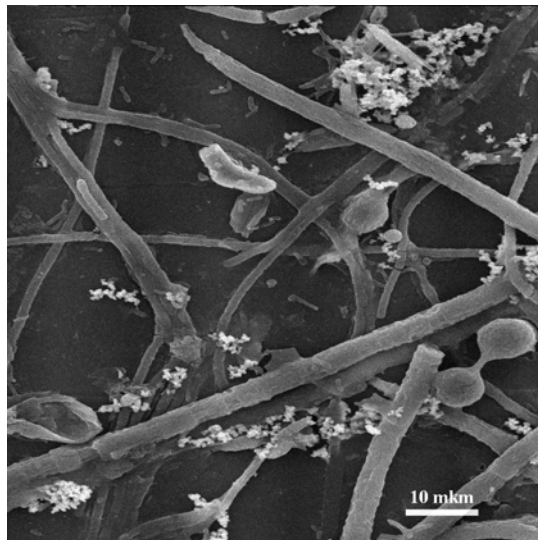


Рис. 3. Микробно-грибная ассоциация ризосферной зоны арабидопсиса. Поздняя стадия формирования. Сканирующая электронная микроскопия

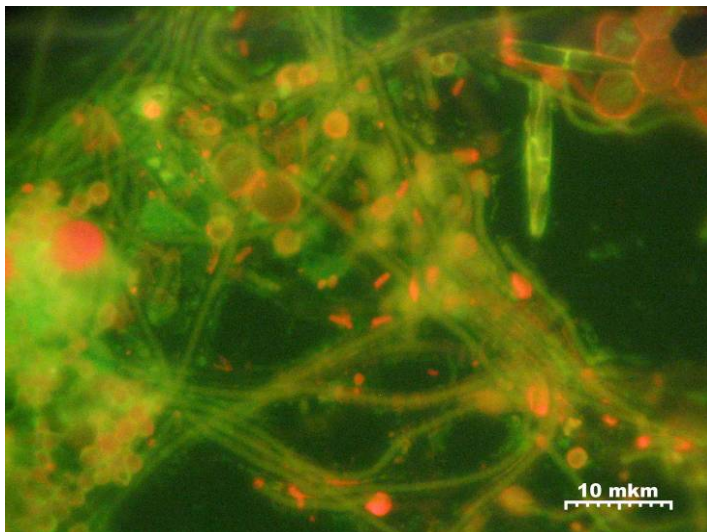


Рис. 4. Микробно-грибная ассоциация ризосферной зоны арабидопсиса. Поздняя стадия формирования. Люминесцентная микроскопия

Новая технология также позволила зафиксировать межклеточные контакты участников ценоза с использованием электронной сканирующей и трансмиссионной микроскопии (рис. 5).



Рис. 5. Контакты между представителями разных таксонов микроорганизмов. Ризосферная зона арабидопсиса. Сканирующая электронная микроскопия

Мы попытались, исходя из современных возможностей, создать необходимую для изучения пространственной архитектуры микробного субстрата технологию. И начали составление перечня тех свойств, которыми должна обладать такая технология (некий аналог «технического задания на проектирование»). Этот перечень сводился к следующему:

- основой технологии должен быть особый субстрат для выращивания растений и установления в нем соответствующего ризосферного микроценоза;
- субстрат не должен иметь щелей, полостей, а его поверхность должна быть вся доступна для изучения;
- субстрат, являясь материальной основой как для роста растений, так и для формирования микроценозов, должен обеспечивать во всех диапазонах пространства возможность проведения всех существующих для изучения микроорганизмов информативных методов исследования.

В соответствии со сформулированными свойствами, которыми должен обладать такой субстрат, он и был создан.

В общей форме наиболее широкими возможностями для любых манипуляций обладают пластмассы. Они и были приняты за основу выбора материала субстрата. Организация субстрата так, чтобы он весь был доступен для анализа и, к тому же, обеспечивал сохранность архитектуры микроценоза во всем ее диапазоне, возможна только в виде ориентированных в пространстве элементов. А для обеспечения водного питания растений они должны обеспечивать еще и необходимую капиллярность. При этом должна быть обеспечена биологическая нейтральность субстрата и его стойкость к деградирующим воздействиям как растений, так и микроорганизмов.

Конструктивно это было решено в виде ориентированного пучка волокон полиэтилена (в одном из вариантов), вплавленного с торца в полиэтиленовую пластинку (рис. 6). В пучке создавалась капиллярность, обеспечивавшая как водный, так и газовый режим, которыми можно было управлять по желанию. Гладкая поверхность волокон и их сплошная (без пор, щелей и т. д.) литая структура обеспечивала полную доступность ко всем участкам субстрата (рис. 7). Ни микрофлора, ни корни, обрастая волокна при такой поверхности, не могут уйти от непосредственно контроля. А состав – пластик (в данном случае полиэтилен, хотя может быть и любой иной) позволял совмещать все методы исследования, так как в отличие от стекла, вермикулита, силикатов почвы и т. д. мог быть порезан на микротоме и исследован в электронном микроскопе. Наконец, непрерывность нитей пучка на всю высоту субстрата обеспечивала возможность изучения архитектуры микроценозов по всему их объему – как в поперечной, так и в продольной организации (патент №11489; МПК 7 А01G31/02; опубл. бюл. №12, 15.12.2005). Дальнейшая работа проводилась в плане изучения особенностей и возможностей созданного субстрата.



Рис. 6. Искусственный субстрат для выращивания растений

В качестве модельного растения был выбран арабидопсис, выращиваемый в условиях лабораторного аналога оранжереи.

Природные субстраты (почвы) имеют свою равновесно-устойчивую микрофлору (сформировавшиеся ценозы) (Buckley *at al.*, 2003, Gregory, 2006). Искусственные, да еще такие, в которых ничего подобного нет, имеют случайный (и крайне бедный) состав микроорганизмов. Поэтому если начинать «с нуля», т. е. с чистого пучка волокон, то начинается сукцессия с некоторой нулевой отметки. И первые выращива-

ния таких растений, как арабидопсис, обычно «не идут». Хороший рост (рис. 8) наступает только через несколько генераций растения (да и то неполных – сначала они до конца не доходят). Но можно использовать, воссоздать в предлагаемом субстрате уже готовые ценозы (да к тому же любые). Для этого волокна помещаются в тот природный (или искусственный) субстрат со сформированной микрофлорой, которую, как исходную, хотят воспроизвести. Она (микрофлора) обрастает субстрат, а затем в уже сформированной системе происходит выращивание растений. При этом сукцессия все равно будет иметь место, так как основа субстрата иная. Но начнется она с уже имеющейся, которая и станет основой.

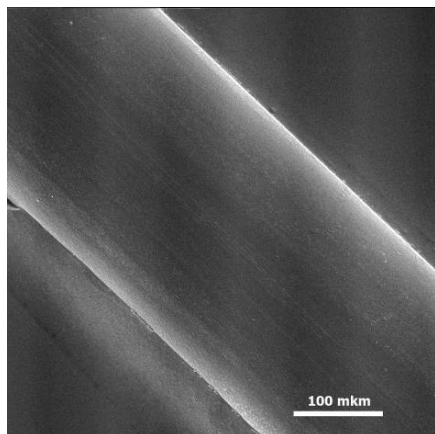


Рис. 7. Волокно – составляющий элемент искусственного субстрата для выращивания растений



Рис. 8. Рост растения *Arabidopsis thaliana* в субстрате для выращивания растений

Полная доступность субстрата и всех компонентов ценоза во всем объеме возможностей – от «болтушки» до нетронутой архитектуры, что позволяет проводить изучение и контроль с исчерпывающей полнотой на всю глубину субстрата (от поверхности, контактирующей с атмосферой, до дна) и на всю теоретически возможную шкалу увеличений, т. е. с использованием электронной оптики.

ВЫВОДЫ

Субстраты такого типа могут стать перспективной основой для искусственных систем, так как обеспечивают полное разрешение – оценку, изучение и контроль всеми имеющимися методами анализа. Кроме полностью искусственного субстрата данная технология принципиально позволяет изучать структуру ценозов и в естественных условиях. Из волокон может быть изготовлен пучок любого размера и длины, в том числе и для одного («одной штуки») растения. Посеянное в него семя, с предварительным или одновременным размещением пучка в природном субстрате, обеспечит полное проникновение между волокнами всех компонентов такого субстрата (от растворов и коллоидов до микрофлоры). Растение будет расти практически в условиях природных, а изучение можно будет проводить на всю глубину в условиях полного разрешения, которые обеспечивает искусственный субстрат.

Благодаря тому что такой искусственный субстрат – «квазисубстрат» может располагаться, облегать, проникать в природный субстрат, он становится его составной частью. И образующийся на нём фрагмент микроценоза полноразмерен, а после изъятия «квазисубстрата-объекта» изучения того, что на нём образовалось, весь микроценоз в его неразрушенной архитектуре, становится полностью доступен на всю желаемую глубину (толщину) субстрата с градиентом условий. А сама организация размещения «квазисубстрата-объекта» обеспечивает полную доступность для любого исследования в любом размере по площади и объёму субстрата.

Ценозом в искусственных субстратах надо управлять. И только в субстратах полного разрешения это принципиально возможно вследствие исчерпывающего контроля за состоянием ценозов и их динамикой. Такое становится возможным путём изменения условий (а если потребуются, то и вообще внося какие-то дополнительные, заранее приготовленные биологические компоненты) в соответствии с информацией, получаемой за счёт контроля состояния ценоза, а при отклонении в них от желаемого – внесения в режим культивирования изменений и отслеживания происходящего под их влиянием изменения ценоза.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Виноградский С. Н.** Микробиология почвы. – М.:Изд-во АН СССР, 1952. – 792 с.
- Методы** изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов / Под ред. Н. А. Красильникова. – М.: МГУ, 1966. – 216 с.
- Akkermans A. D. L., Mirza M. S., Hermie, Harmsen H. J. M., Blok H. J., Herron P. R., Sessitsch A., Akkermans W. M.,** 1994: Molecular ecology of microbes: A review of promises, pitfalls and true progress. *FEMS Microbiology Reviews* 15: 185-194.
- Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K.-H.,** 1995: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, Vol. 59, No. 1: 143-169.
- Bartoli F., Genevois-Gomendy V., Royer J. J., OYER, Niquet S., Vivier H., Grayson R.,** 2005: A multiscale study of silty soil structure. *European Journal of Soil Science*, 56: 207-223.
- Buckley D. H. & Schmidt T. M.,** 2003: Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology*, 5(6), 441-452.
- Buckley D.H. & Schmidt T. M.,** 2001: The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial Ecology* Vol. 42, No. 1: 11-21.
- Copley J.,** 2000: Ecology goes underground. *Nature*, 406: 452-454.
- El-Shatnawi M. K. J & Makhadmeh. I. M.,** 2001: Ecology of the plant-rhizosphere system. *Review. J. Agronomy & Crop Science*, 187: 1-9.
- Greaver T. L. & Sternberg L. S. L.,** 2007: Fluctuating deposition of ocean water drives plant function on coastal sand dunes. *Global Change Biology* 13: 216-223.
- Gregory P. J.,** 2006: Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science? *European Journal of Soil Science*, 57: 2-12.
- Hinsinger P., Gobran G. R., Gregory P. J., Wenzel W. W.,** 2005: Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist* , 168: 293-303.
- Joseph S. J., Hugenholtz P., Sangwan P., Osborne C. A., Janssen P. H.,** 2003: Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7210-7215.

- Kaerberlein T., Lewis K., Epstein S. S.**, 2002: Isolating «uncultivable» microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 296: 1127-1129.
- McGilloway R. L. & Weaver R. W.**, 2002: A PCR-MPN based quantitative approach to enumerate nitrifying bacteria in zeponic substrates. *Journal of Rapid methods and automation in Microbiology*, 10: 49-58.
- McGilloway R. L. Weaver R. W., Ming D. W., Gruener J. E.**, 2003: Nitrification in a zeponic substrate. *Plant and Soil* 256: 371-378.
- Ming D. W.**, 1989: Manufactured soils for plants growth at a Lunar Base. *Lunar Base Agriculture*: 93-105.
- Perfil'ev B. V. & Gabe D. R.**, translated [from the Russian] by J. M. Shewan. *Capillary methods of investigating micro-organisms*. Publisher: Edinburgh, Oliver & Boyd, 1969.
- Roszak D. B., Colwell R. R.**, 1987: Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment. *Microbiological Reviews* 51: 365-379.
- Roy R. N. & Misra R. V.**, 2003: Review on assessment of soil nutrient depletion and requirements-approach and methodology. <http://www.fao.org>. 2003.
- Torre J. R., Brett M. Goebel, E., Friedmann I., Pace N. R.**, 2003: Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3858-3867.
- Torsvik V., Goksoyr J., Daae F. L.**, 1990: High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 56: 782-787.
- Watt M., Hugenholtz P., White R., Vinall K.**, 2006: Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Environmental Microbiology* 8 (5): 871-884.
- Watteau F., Villemain G., Burtin G., Jocteur-Monrozier L., Lse-Ensaia**, 2006: Root impact on the stability and types of microaggregates in silty soil under maize. *European Journal of Soil Science*, 57: 247-257.
- Whalley W. R., Riseley B., Leeds-Harrison P. B., Bird N. R. A., Leech P. K., Adderley W. P.**, 2005: Structural differences between bulk and rhizosphere soil. *European Journal of Soil Science*, 56: 353-360.
- Young I. M., Blanchart E., Chenu C., Dangerfield M., Fragoso C., Grimaldi M., Ingram J., Monrozier L. J.**, 1998: The interaction of soil biota and soil structure under global change. *Global Change Biology*, 4: 703-712.

Надійшла до редколегії 20.12.07