

## БАКТЕРИАЛЬНЫЕ И ДРОЖЖЕВЫЕ СООБЩЕСТВА ВИНОГРАДНОЙ ЛОЗЫ СОРТОВ МОЛДОВА И МЕРЛО

Белкина Д.Д.<sup>1</sup>, Юрченко Е.Г.<sup>1</sup>, канд. с.-х. наук, Карпова Д.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»  
(Краснодар, Россия)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный университет»  
(Краснодар, Россия)

[daria.microbiology@yandex.ru](mailto:daria.microbiology@yandex.ru)

**Реферат.** Установлены численность, структура и различия бактериальных и дрожжевых сообществ в образцах однолетней лозы и многолетней древесины рукавов винограда сортов Молдова и Мерло. Выделенные штаммы разделены по шести фенотипическим категориям, методом MALDI-TOF идентифицированы бактерии четырех родов.

**Ключевые слова:** виноград, микрофлора, микробиота, бактерии, дрожжи, бактериальные сообщества, виноградная лоза.

**Summary.** The numbers, structure and differences of bacterial and yeast communities in the samples of annual vines and perennial wood from the Moldova and Merlot grape varieties were determined. The isolated strains were divided into six phenotypic categories; four genera of bacteria were identified by the MALDI-TOF method.

**Key words:** grape, microflora, microbiota, bacteria, yeast, bacterial communities, grapevine.

**Введение.** Любое растение существует в тесном взаимодействии с микроорганизмами, населяющими его внутреннюю среду и окружающее пространство. Самая многочисленная группа ассоциированных с растениями микроорганизмов – это бактерии, известна их роль в регуляции роста, повышении сопротивления к абиотическим стрессам, обмене веществ, защите растения от фитопатогенов. От устойчивости и разнообразия микробных сообществ зависит возможность заражения растения патогеном: чем более богаты эти сообщества, тем сложнее патогену в них закрепиться.

В последние годы за рубежом растет интерес научного сообщества к непатогенной микробиоте сельскохозяйственных растений, в том числе к микробиоте винограда. Например, по совокупности микроорганизмов, обитающих на виноградной лозе и ягодах, ученые из Италии делают успешные попытки определения происхождения винограда [1]. Во Франции исследователи выявили сходство между составом микробиоты листьев и ягод винограда, с одной стороны корой, и почвой – с другой. [2]. Другая группа европейских ученых проводила исследования с целью установить зависимость бактериальных сообществ филлосферы от сорта винограда. Они пришли к выводу, что такая зависимость есть, но не всегда является прозрачной [3].

В нашей стране вопрос влияния микробных сообществ на жизнедеятельность винограда изучен недостаточно, также мало сведений имеется о составе и разнообразии этих сообществ, поэтому целью данного исследования было выявить основные черты бактериальной и дрожжевой микробиоты виноградной лозы.

**Объекты и методы исследований.** Объекты исследования – растения винограда различных по генотипу сортов: Молдова (сложный межвидовой гибрид *V. vinifera* × (*V. vinifera* + *V. labrusca* + *V. riparia* + *V. rupestris* + *V. berlandieri* + *V. aestivalis* + *V. cinerea*),

Мерло (европейский сорт *Vitis vinifera* L.) и комплекс бактерий и дрожжей, ассоциированных с различными органами растений этих сортов.

Использовали лабораторные методы. Биологические образцы однолетних лоз и многолетней древесины рукавов отбирали в марте 2021 г. в 3-х повторностях (в одной повторности – 1 куст). Место отбора – АО "Южное", отделение №11, ст. Фонталовская, Темрюкский район, Краснодарский край. С каждого куста отбирали образцы проводящих органов: однолетних лоз и многолетних рукавов, кардинально отличающихся субстратов. После доставки в лабораторию на следующий день из них вырезали фрагменты весом по 1-3 г, которые подвергали поверхностной стерилизации в этиловом спирте (1 мин) с целью устранения посторонних микроорганизмов, попавших на образец в процессе транспортировки и взвешивания. После этого фрагменты лозы трижды промывали в стерильной дистиллированной воде и тщательно измельчали в стерильной ступке с физиологическим раствором (10 мл) с добавлением измельчённого стекла для лучшего перетирания.

Посев полученных суспензий осуществляли на 2 среды: МПА с высоким содержанием питательных веществ для выявления копиотрофов и R2A – для олиготрофов [4]. Микроорганизмы культивировали при температуре 25°C в течение 5 дней, после чего колонии подсчитывали и отсеивали морфологически отличающиеся в пределах каждого образца.

Грампринадлежность штаммов определяли с помощью КОН-теста, изучали морфологию клеток с помощью метода световой микроскопии [5]; штаммы группировали по основным фенотипическим категориям: крупные почкующиеся клетки дрожжей, грамотрицательные палочки, коринеформные бактерии (неподвижные неспорообразующие грамположительные палочки неправильной формы), грамположительные кокки, спорообразующие грамположительные палочки, неспорообразующие грамположительные палочки правильной формы. Идентификацию проводили методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) по белковым профилям.

**Обсуждение результатов.** Выросшие на обеих питательных средах колонии были подсчитаны и представлены в виде средних значений. Количество бактериальных и дрожжевых клеток в пересчете на 1 г влажного субстрата показано на рис.

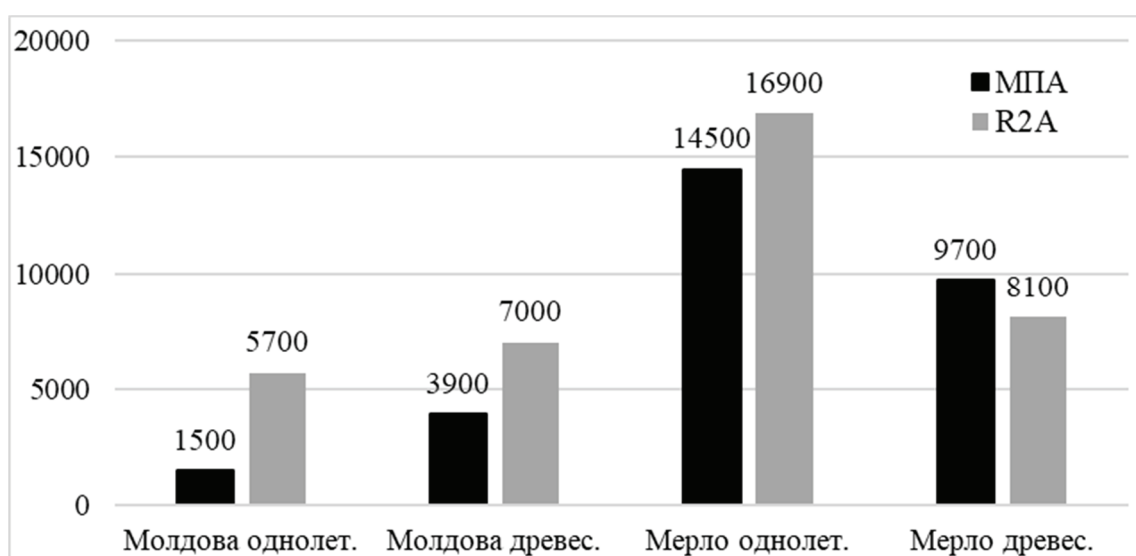


Рис. Число дрожжей и бактерий в образцах виноградной лозы (КОЕ/г), Темрюкский район, Краснодарский край, 2021 г.

Обнаружено, что анализируемые участки лозы и древесины сорта Мерло более богаты микроорганизмами, чем образцы сорта Молдова. Из общего числа на основе макроскопического исследования колоний было отобрано 93 изолята, из которых после микроскопического анализа выделено 63 штамма микроорганизмов: 10 из однолетней лозы и 24 из многолетней древесины сорта Мерло, 14 из однолетней лозы и 15 из многолетней древесины сорта Молдова. По фенотипическим свойствам они были разделены на 6 категорий, которые представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Общее количество штаммов выделенных микроорганизмов по фенотипическим категориям, Темрюкский район, Краснодарский край, 2021 г.

	Дрожжи	Г(-) палочки	Корине- формные бактерии	Г(+) кокки	Спорооб- разующие Г(+) палочки	Неспорооб- разующие Г(+) палочки
Количество штаммов	5	10	12	9	24	3
Отношение к общему числу	7,9 %	15,9 %	19 %	14,3 %	38,1 %	4,8 %

Разнообразие обнаруженных спорообразующих палочек превосходило все прочие фенотипические категории, что согласуется с данными, полученными другими исследователями [6]. Особенностью этих бактерий является образование покоящихся форм – эндоспор, которые позволяют выдерживать неблагоприятные условия окружающей среды. Следует учитывать, что посев проводился в марте, до начала сокодвижения винограда, когда все жизненные процессы растения были замедлены, что, возможно, стало причиной преобладания среди выделенных изолятов спорообразующих палочек.

Обнаружено неодинаковое фенотипическое разнообразие бактериальных (микробиотических) сообществ образцов субстратов, эта разница показана в таблице 2.

Таблица 2 – Соотношение фенотипических категорий выделенных штаммов бактерий и дрожжей, ассоциированных с виноградными растениями (в % для каждого образца), Темрюкский район, Краснодарский край, 2021 г.

Группа	Мерло, многолетняя древесина	Молдова, многолетняя древесина	Мерло, однолетняя лоза	Молдова, однолетняя лоза
Дрожжи	0	0	30	14,3
Г(-) палочки	12,5	13,3	20	21,4
Коринеформные бактерии	16,7	13,3	30	21,4
Г(+) кокки	12,5	20	10	14,3
Спорообразующие Г(+) палочки	58,3	46,7	10	14,3
Неспорообразующие Г(+) палочки	0	6,7	0	14,3

Полученные результаты указывают на то, что тип субстрата в большей степени влиял на разнообразие фенотипических категорий, чем сорт винограда. В обоих образцах многолетней древесины около половины изолятов составили спорообразующие палочки, в

то время как в однолетней лозе выявлено в 4 раза меньшее их разнообразие. Известно, что спорообразующие палочки рода *Bacillus* обладают ферментными системами для расщепления целлюлозы и гемицеллюлоз, которые имеют весомую долю в составе древесной части виноградной лозы.

Обнаружение дрожжей исключительно в молодой лозе, по-видимому, связано с тем, что этот субстрат более богат сахаром и другими органическими веществами, участвующими в ростовых процессах. Литературные данные подтверждают, что дрожжи не только являются активными колонизаторами филлопланы [7], но и выделяются из сока ксилемы/флоэмы виноградной лозы [8].

Разнообразие обнаруженных грамотрицательных палочек и коринеформных бактерий шире представлено в однолетней лозе, чем многолетней, что, судя по всему, имеет те же причины, которые оказали влияние на распределение дрожжей.

Среди выделенных микроорганизмов методом MALDI-TOF были идентифицированы бактерии родов *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. pseudomycooides*, *B. atrophaeus*, *B. simplex*, *B. megaterium*, *B. marisflavi*, *B. muralis*), *Sphingomonas* (*S. aerolata*), *Staphylococcus*, *Curtobacterium*.

Представителей спорообразующих палочек рода *Bacillus* считают одними из самых распространенных эпи- и эндофитов виноградной лозы. Их присутствие неоднократно отмечали на ягодах, листьях и коре [2], а также внутри цветов, мякоти ягод, в ксилемных сосудах [4]. Известна положительная роль рода *Bacillus* в обеспечении неспецифического иммунитета винограда, многие штаммы нашли широкое применение в качестве продуцентов биопрепаратов с фунгицидным и ростостимулирующим действием. В частности, некоторые из выделенных и идентифицированных нами видов (*B. atrophaeus*, *B. subtilis*) являются продуцентами биопрепаратов, регулярно применяющихся на исследуемых виноградниках.

Виды рода *Sphingomonas* также часто встречаются в ассоциации с растениями, их изолировали из ризо- и филлосферы, они были одними из самых распространенных в нескольких исследованиях филлопланы винограда [9]. Распространение рода *Sphingomonas* имеет важное значение для растений из-за широкого спектра выполняемых ими функций, включая деградацию некоторых загрязняющих веществ и облегчение круговорота питательных веществ в почве для роста растений [10]. Виды этого рода могут представлять интерес в качестве агентов биоконтроля, так, например, установлено, что *Sphingomonas paucirnobilis* проявляет антагонизм против фитопатогенного гриба *Verticillium dahliae*, возбудителя вертициллезного вилта 700 видов растений [11].

Бактерии рода *Staphylococcus* были обнаружены зарубежными исследователями внутри виноградных лоз [12], а также на поверхности коры [2], но их роль в ассоциации с виноградом пока не выяснена.

Род *Curtobacterium* считается одним из самых естественных для микробиоты растений, включая виноград. Представителей этого рода обнаруживали на всех исследуемых органах винограда, а также внутри лозы. Интересно, что в citrusовых растениях *Curtobacterium sp.* описан как эндофит, взаимодействующий с *Xylella fastidiosa* (возбудитель пестрого хлороза citrusовых и болезни Пирса винограда) и уменьшающий тяжесть симптомов заболевания [13].

**Выводы.** Численность бактериального и дрожжевого населения в образцах виноградной лозы колебалась в пределах  $10^3$ - $10^4$  КОЕ/г, при этом анализируемые участки сорта Мерло характеризовались большим богатством микроорганизмов, чем образцы сорта Молдова. Суммарно из виноградных лоз было выделено 63 штамма бактерий и дрожжей. Обнаруженные микроорганизмы были разделены на шесть фенотипических категорий, доминирующей из них являлась группа спорообразующих палочек. Тип субстрата оказал

большее влияние на фенотипическое разнообразие, чем сорт винограда. В образцах многолетней древесины рукавов выявлено существенное преобладание спорообразующих палочек над другими группами. В образцах однолетней лозы доминировали грамотрицательные палочки, коринеформные бактерии и дрожжи. Методом MALDI-TOF идентифицированы бактерии родов *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. pseudomycoides*, *B. atrophaeus*, *B. simplex*, *B. megaterium*, *B. marisflavi*, *B. muralis*), *Sphingomonas* (*S. aerolata*), *Staphylococcus*, *Curtobacterium*. В качестве главных факторов, оказавших влияние на формирование рассмотренных микробных сообществ, предполагаются низкая метаболическая активность растения в связи с пребыванием в периоде покоя, природно-климатические условия и особенности биохимического состава двух субстратов.

### Литература

1. Geographical and Cultivar Features Differentiate Grape Microbiota in Northern Italy and Spain Vineyards / V. Mezzasalma [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9.
2. Characterization of epiphytic bacterial communities from grapes, leaves, bark and soil of grapevine plants grown, and their relations / G. Martins [et al.] // *PLOS ONE*. 2013. Vol. 8, Is. 8. P. 1–9.
3. Assessing the impact of plant genetic diversity in shaping the microbial community structure of *Vitis vinifera* phyllosphere in the Mediterranean / P. Singh [et al.] // *Frontiers in Life Science*. 2018. Vol. 11. P. 1–12.
4. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization / S. Compant [et al.] // *Microbial Ecology*. 2011. Vol. 62. P. 188–197.
5. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов [и др.]. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.
6. Bacterial diversity of Grenache and Carignan grape surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain) / M. del C. Portillo [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. 2016. Vol. 219. P. 56–63.
7. Andrews J. H., Harris R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces // *Annual Review of Phytopathology*. 2000. Vol.38. P. 145–180.
8. The fungal microbiome is an important component of vineyard ecosystems and correlates with regional distinctiveness of wine / D. Liu [et al.] // *mSphere*. 2020. Vol. 5, Is. 4. P. 3420.
9. Leveau J. H. J., Tech J. J. Grapevine microbiomics: bacterial diversity on grape leaves revealed by high-throughput sequence analysis of 16S rRNA amplicons *Acta Horticulturae* // *International Society for Horticultural Science*. 2011. Vol. 905. P. 31–42.
10. Culture-Dependent and Culture-Independent Characterization of the Olive Xylem Microbiota: Effect of Sap Extraction Methods / M. Anguita-Maeso [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. 2020. Vol. 10. P. 1–14.
11. White D. C., Sutton S. D., Ringelberg D. B. The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology // *Current Opinion in Biotechnology*. 1996. Vol. 7, Is. 3. P. 301–306.
12. Bacterial Endophytic Communities in the Grapevine Depend on Pest Management / A. Campisano [et al.] // *PLOS ONE*. 2014. Vol. 9, Is. 11. P. 1–10.
13. The Endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* Reduces Symptoms Caused by *Xylella fastidiosa* in *Catharanthus roseus* / P. T. Lacava [et al.] // *Journal of Microbiology*. 2007. Vo. 45, Is. 5. P. 388–393.