= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ =

УДК 631.46

ВЛИЯНИЕ МЕХАНИЧЕСКОГО ИЗМЕЛЬЧЕНИЯ СФАГНУМА НА СТРУКТУРУ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ

© 2014 г. Т. Г. Добровольская¹, А. В. Головченко, А. В. Якушев, Н. А. Манучарова, Е. Н. Юрченко

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения

Поступила в редакцию 03.04.2014 г.

Методом микрокосмов экспериментально доказано, что в результате механического измельчения сфагнума происходят увеличение численности бактерий и резкие изменения в таксономической структуре сапротрофного бактериального блока. Эти изменения заключаются в замещении доминирующих в нативном мхе эккрисотрофных агробактерий бактериями гидролитического блока. Использование молекулярно-биологических методов для идентификации доминирующих в сфагнуме таксонов позволило выявить таких специфических бактерий-гидролитиков как Janthinobacterium agaricum и Streptomyces purpurascens. Кинетический метод определения физиологического состояния бактерий *in situ* показал большее функциональное разнообразие бактерий-гидролитиков в сообществе измельченного мха по сравнению с нативным. Значительное уменьшение показателя С/N в измельченных образцах живого сфагнума, инкубируемых методом микрокосмов, свидетельствует о процессах деструкции этого субстрата.

Ключевые слова: сфагнум, механическое измельчение, численность и таксономическая структура бактериальных комплексов, физиологическая активность бактерий, деструкция сфагнума.

DOI: 10.7868/S0026365614060056

Верховые торфяники, обладая высокими запасами жизнеспособной микробной биомассы, характеризуются низкими темпами минерализации торфа. В качестве факторов, тормозящих деструкцию верхового торфа, большинство исследователей называют: низкую концентрацию кислорода, кислую реакцию среды, недостаток питательных элементов, низкие температуры, особый состав полисахаридов сфагнума и наличие фенолов [1-6]. В опубликованной нами в 2013 г. коллективной монографии "Функционирование микробных комплексов верховых торфяников – анализ причин медленной деструкции торфа" [7] рассматриваются все вышеназванные факторы. В результате были сделаны выводы, согласно которым на первых этапах деструкции сфагнума основным ограничивающим фактором является специфическая структура полисахаридов сфагнума, которые с трудом поддающихся разрушению даже грибами. Кроме того, длительному сохранению стеблей сфагнума способствуют низкие численность и

разнообразие почвенных животных, функции которых — измельчать растительные ткани.

Влияние искусственного механического разрушения сфагнового мха на его химический состав было проведено химиками-торфоведами из Томска [8]. Было установлено, что измельчение сфагнового мха в мельницах способствует частичному ферментативному разрушению прочных гликозидных связей в полисахаридах, которые характерны для ненарушенного мха и снижению антиоксидантных свойств. Тем самым, сфагнум должен становиться более доступным для деструкции микроорганизмами гидролитического блока. Однако микробиологами этот факт пока не был проверен.

Целью настоящей работы было оценить в модельных экспериментах влияние механического измельчения сфагнума на эколого-таксономическую структуру и физиологическую активность бактериальных сообществ, населяющих живой мох и очес.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования был верховой торфяник, являющийся одной из постоянных пробных

¹ Автор для корреспонденции (e-mail: dobrtata@mail.ru).

площадей Западнодвинского лесо-болотного стационара ФГБУН Института лесоведения РАН (56°09' с.ш., 32°10' в.д. и 56°09' с.ш., 32°08' в.д.) в Тверской области. Этот торфяник – часть болотного массива, формирование которого по данным радиоуглеродной датировки и споровопыльцевого анализа началось около 9000 лет назад, что соответствует началу бореального периода. По своему облику это классический болотный массив центрально-олиготрофного хода развития, находящийся на стадии резко выпуклого болота с облесенными склонами. Исследуемый торфяник расположен в верхней части одного из таких склонов под сосняком пушицево-сфагновым. Доминантами растительного покрова являются сфагнум магелланский (Sphagnum magellanicum) и сфагнум бурый (S. fuscum). Залежь сложена верховым торфом: до 1.5 м – слаборазложившимся (3–20%); от 1.5 до 4 м – среднеразложившимся (25–35%); от 4 до 4.5 – переходным торфом; от 4.5 до 5 м – низинным торфом и подстилается органо-минеральными отложениями. Значение рН варьирует по профилю от 2.8 до 4.5.

Для определения влияния механического измельчения сфагнума на численность, структуру и физиологическую активность бактериальных комплексов из исследуемого торфяника был взят монолит, объемом 50 см × 50 см × 30 см. Из монолита были аккуратно извлечены стебли сфагнума и разделены на две части: верхняя зеленая часть растения длиной около 5 см (живой сфагнум) и нижняя часть растения желтовато-бурого цвета длиной около 10 см (очес сфагнума). Живой сфагнум и его очес были помещены в отдельные вегетационные сосуды и получили статус контрольных образцов. Следующими вариантами для изучения были образцы живого сфагнума и его очеса, подвергшиеся механическому измельчению ножницами до крупнодисперсных частиц длиной 5-7 мм (крупнодисперсные образцы), и образцы живого сфагнума и его очеса, подвергшиеся механической обработке на пропеллерной мешалке-миксере (микроизмельчитель тканей РТ-2, 5000 об./мин) до мелкодисперсных частиц длиной 0.5-0.7 мм (мелкодисперсные образцы). Средний вес образцов в вегетационных сосудах составлял около 1 кг. Отбор и анализ образцов для проведения микробиологического анализа производили на 0, 3, 7, 14, 30, 60, 90, 120, 150, 180-е сут. На всех стадиях сукцессии модельных опытов осуществляли контроль влажности.

Численность бактерий определяли прямым методом с использованием люминесцентной микроскопии [9]. Для исследования отбирали 1 г образца и помещали в колбу со 100 мл стерильной воды. Для десорбции клеток полученную суспензию обрабатывали на ультразвуковом диспергаторе Bandelin Sonopuls HD 2070 (Германия) в те-

МИКРОБИОЛОГИЯ том 83 № 6 2014

чение 2 мин при мощности 50%. Суспензию (0.01 мл) наносили микропипеткой на предметное стекло и равномерно распределяли петлей на площади 4 см². Для одного образца готовили 6 препаратов. На каждом препарате просматривали по 20 полей зрения. Окрашенные акридином оранжевым препараты просматривали на люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ-ИЗ (Россия) (светофильтры ЖС-19, ЖС-18, объектив ×90 Л, окуляры ×4 или ×5).

Количество клеток бактерий, содержащихся в 1 г свежего образца, вычисляли по формуле: $N = S_1 an/vS_2 c$, где: N – число клеток бактерий в 1 г свежего образца; S_1 - площадь препарата (мкм²); a – среднее число бактерий в поле зрения; n – показатель разведения суспензии (мл); v – объем капли, наносимой на стекло (мл); S_2 – площадь поля зрения микроскопа (мкм²); c – навеска образца (г). Удельную массу микроорганизмов принимали равной 1 г/см³; содержание воды в клетках – 80%.

Осуществляли пересчет количества бактериальных клеток на 1 г сухого образца. Влажность определяли, высушивая образцы при 105°С в течение 6 ч.

Численность и таксономический состав бактерий сапротрофного блока определяли методом посева на агаризованную глюкозо-пептонно-дрожжевую среду (ГПД). Для ингибирования роста грибов в среду добавляли 50 мг нистатина на 0.5 л среды. Для посева использовали суспензию, оставшуюся после приготовления препаратов для люминесцентной микроскопии. Посев проводили в 5-кратной повторности из экспериментально подбираемых 10-кратных разведений. Посевы инкубировали при комнатной температуре в течение 2-3 недель. Общую численность бактерий выражали в колониеобразующих единицах (КОЕ) на 1 г образца. Проводили дифференцированный учет колоний бактерий разных таксономических групп. Основных представителей бактерий выделяли в чистую культуру. Идентификацию выделенных штаммов до рода проводили на основании морфологических, культуральных и хемотаксономических признаков [10, 11]. Идентификацию доминирующих таксонов бактерий проводили по результатам секвенирования нуклеотидных последовательностей гена 16S рДНК с использованием программы BLAST [12].

Физиологическую активность бактерий определяли кинетическим методом [13, 14]. Бактерии десорбировали из образца вортэксированием суспензии 1 : 5 (2000 об./мин, 20 мин) и центрифугированием (3075 g, 5 мин). Используемый в качестве инокулята супернатант раскапывали по 100 мкл в ячейки 96-луночных планшет. В ячейки предварительно были внесены минеральная основа среды Чапека (100 мкл), нистатин (2 мг/л) (для ингибирования роста грибов) и различные биопо-

лимеры (карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), крахмал, пектин, ксилан, хитин, казеин, декстран-500) из расчета 10 г/л. Далее планшету инкубировали при 25°С в иммунно-ферментном анализаторе "Sunrise" (Швейцария) в режиме автоматического встряхивания в течение 150–170 ч, и определяли рост бактерий по оптической плотности суспензии ($\lambda = 620$ нм).

Параллельно проводили высев на ГПД среду из инокулята (для определения начальной концентрации бактерий), а также из содержимого ячеек по окончании инкубирования для: 1) подтверждения корреляции между оптической плотностью и концентрацией клеток в ячейках, а также 2) выявления физиологических групп бактерий, которые росли на определенных полимерах.

На основании уравнения корреляции между оптической плотностью популяций, выросших в ячейках, и концентрацией в них клеток были получены кинетические параметры, описывающие рост бактерий согласно уравнению: $x(t) = x_0(1 - r_0 + r_0e^{\mu_m t})$, где x(t) – концентрация клеток (КОЕ/мл) в момент времени t, x_0 – начальная концентрация клеток, r_0 – начальное значение переменной физиологического состояния микроорганизмов, μ_m – максимальная удельная скорость роста микроорганизмов. В работе активность определяли как –ln(r_0): чем она больше, тем активность меньше.

Эффективность ассимиляции субстрата определяли по отношению прироста бактерий в жидких средах (КОЕ) к исходной концентрации полимера.

Процентное содержание углерода и азота в различных вариантах опыта определяли на приборе Vario EL III ("Elementar", Германия) в токе кислорода при 1150°С. Образцы анализировали в трехкратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Численность бактерий, установленная прямым счетом, варьировала от 2×10^{10} до 1×10^{11} кл./г сфагнума в зависимости от степени измельчения образца, стадии сукцессии и природы анализируемого субстрата. Число бактерий было, в среднем, в 2 раза выше в механически измельченных образцах на протяжении всего опыта (рис. 1). Максимальные показатели численности бактерий для мелкодисперсных образцов опережали показатели для крупнодисперсных образцов и были выявлены для живого сфагнума на 60 сут, очеса – на 90 сут. Имела место также тенденция увеличения численности бактерий к концу эксперимента, существенно более выраженная для живого сфагнума, чем для очеса (рис. 1). Отметим, что дополнительным источником питания для бактерий на этих этапах могут быть продукты лизиса грибного мицелия.

Равным образом, измельчение сфагнума до мелкодисперсных частиц обусловливало увеличение численности бактерий сапротрофного блока на 1–2 порядка по показателям КОЕ (от 10⁶ до 10⁸ КОЕ/г) по сравнению с контрольными и крупнодисперсными образцами, которые характеризовались незначительными временными колебаниями численности.

Рассмотрим динамику таксономической структуры бактериальных сообществ, формирующихся в разных вариантах опыта в живом сфагнуме и его очесе.

В образцах живого мха во всех вариантах опыта на начальных этапах в качестве монодоминанта выявлялись представители вида Agrobacterium radiobacter (рис. 2). Бактерии этого вида – типичные эпифитные микроорганизмы, питающиеся продуктами экзоосмоса растений. Через 14 сут сукцессии в крупнодисперсных образцах наряду с бактериями Agr. radiobacter доминантами становились хитинолитические бактерии вида Janthinobacterium agaricum, которые первоначально были обнаружены на агариковых грибах, а затем в гидроморфных почвах северных регионов [15]. В качестве субдоминанта (24%) на этой стадии сукцессии были выявлены бациллы. В мелкодисперсных образцах в эти же сроки было отмечено монодоминирование хитинолитических бактерий выше названного вида, их доля в бактериальном сообществе увеличилась до 79%. Доля агробактерий, напротив снизилась до 16%. Через 90 сут в измельченных образцах живого мха доля бактерий Jant. agaricum продолжала расти и достигла 87%. Представителей других родов бактерий выделяли в качестве минорных компонентов (рис. 2). На 120 сут опыта в измельченном сфагнуме наряду с хитинолитиками в доминанты выходили стрептомицеты (26%), отнесенные на основании идентификации с помощью молекулярно-биологических методов к виду Streptomyces purpurascens. Следует так же отметить смену доминирующих в контрольных образцах живого сфагнума видов агробактерий: вместо бактерий вида Agr. radiobacter были обнаружены представители вида Agr. rhizogenes (94%).

В образцах очеса сфагнума, в отличие от живого мха, таксономическая структура исследуемого сообщества в начале опыта не была монодоминантной. В ее составе обнаруживались бактерии гидролитического комплекса: Janthinobacterium, Bacillus, Cytophaga. В крупнодисперсных образцах в доминирующую группу кроме бактерий-гидролитиков родов Janthinobacterium и Streptomyces входили агробактерии, которые становились монодоминантами в мелкодисперсных образцах, так же как в контрольных образцах живого сфаг-



Время, сут

Рис. 1. Динамика численности бактерий (прямой счет) на разных этапах сукцессии в контрольных образцах и при механическом измельчении живого сфагнума (а) и его очеса (б). Образцы: (*1*) – контрольные; (*2*) – крупнодисперсные; (*3*) – мелкодисперсные.

нума (рис. 2). На 90-е сут в разных вариантах опыта менялось соотношение выше названных представителей бактерий-гидролитиков. Так, в контрольных образцах доминирующими стали спорообразующие бактерии рода *Bacillus* (87%), в крупнодисперсных образцах – стрептомицеты *S. purpurascens* (53%), в мелкодисперсных образцах – хитинолитческие бактерии *Jant. agaricum* (52%) (рис. 2).

Таким образом, механическое измельчение сфагнума привело к резкой перестройке в структуре бактериальных сообществ как живой части мха, так и его очеса. Оно заключается в замещении агробактерий, являющихся эккрисотрофами, бактериями гидролитического комплекса: хитинолитическими бактериями Jant. agaricum и стрептомицетами S. purpurascens. Возможно, что при измельчении сфагнума, происходит также разрушение гиф грибов, в результате чего становится доступным хитин, а также и другие биополимеры грибов, используемые в качестве субстрата бактериями-гидролитиками. стику тем доминирующим таксонам, которые были определены с помощью молекулярно-биологических методов. Род Agrobacterium входит в класс Альфа-протеобактерий, порядок Rhizobiales, семейство Rhizobiaceae. Представители рода Agrobacterium - характерные обитатели ризосферы и филлосферы различных видов растений. Многие из них являются фитопатогенами. Однако бактерии тех двух видов, которые были выделены в модельном опыте, не относятся к фитопатогенам. Более того, бактерии вида Agr. radiobacter обладают ростстимулирующими свойствами. На основе штаммов Agr. radiobacter 204 созданы торфяные биопрепараты (ризоагрин) [16]. Интересным представляется так же факт обнаружения бактерий этого вида в качестве эндофита в микоризе гриба Piriformospora indica. Этот симбиоз обеспечивает стимуляцию роста растений [17].

Теперь хотелось бы дать краткую характери-

Другой представитель агробактерий – *Agr. rhizogenes*, часто обнаруживается в качестве характерного обитателя ризосферы растений и почвы. Бактерии этого вида были выделены так-



Рис. 2. Таксономическая структура сапротрофного бактериального комплекса на разных этапах сукцессии в контрольных и опытных образцах при механическом измельчении живого сфагнума (а) и его очеса (б). Образцы: k – контрольные; d1 – крупнодисперсные; d2 – мелкодисперсные. По оси ординат % представителей таксономических групп (1 – *Agrobacterium, 2 – Janthinobacterium agaricum, 3 – Bacillus, 4 – Streptomyces purpurascens, 5 – Cytophaga*) от общей численности бактерий, выраженной в КОЕ/г образца.

же из клубеньков бобовых растений [18]. При этом наиболее интересно, что бактерии этого вида, могут расти при pH 4, т.е. при той кислой реакции среды, которая характерна для верховых болот. Следует отметить, что бактерии другого вида *Agr. radiobacter*, обнаруженного в сфагнуме в каче-

ВЛИЯНИЕ МЕХАНИЧЕСКОГО ИЗМЕЛЬЧЕНИЯ СФАГНУМА



Рис. 3. Филогенетическое положение доминирующих штаммов среди представителей филогенетической группы: а – *Proteobacteria (Alphaproteobacteria) Rhizobiales; Rhizobiaceae; Rhizobium/Agrobacterium* group; *Rhizobium;* 6 – *Actinobacteria,* мицелиальные актинобактерии – *Streptomyces purpurascens.* Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 1 нуклеотидной замене на каждые 10 нуклеотидов. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью "bootstrap" – анализа 100 альтернативных деревьев.

стве доминирующего, могут расти в широком интервале значений pH от 5 до 9.

Род Agrobacterium, а так же виды Agr. radiobacter и Agr. rhizogenes были подвергнуты ревизии в 1993 г. [19], а затем в 2001 г. [20]. В последней публикации предложено перевести эти и многие другие виды рода Agrobacterium в род Rhizobium.

В образцах очеса сфагнума, измельченных до крупнодисперсной фракции, начали выделяться изначально в качестве минорных компонентов, а затем и в качестве доминантов актиномицеты, представленные видом *S. purpurascens*. Известно, что стрептомицеты этого вида выделяются из разных видов растений и мхов [12]. Из приведенных ниже дендрограмм филогенетического родства следует, что точность определения бактериальных культур до вида не вызывает сомнения, так

МИКРОБИОЛОГИЯ том 83 № 6 2014

как процент сходства с имеющимися в банках данными видов составляет 99% (рис. 3).

О физиологической активности бактерий в микробных сообществах живого сфагнума (контрольные и крупнодисперсные образцы) судили по их росту в жидких средах с определенным полимером. Считали, что между оптической плотностью (OD_{620}) и концентрацией клеток бактерий в суспензии ($C_{KOE/MЛ} = 2 \times 10^9 \times OD$) существует линейная зависимость.

Для бактериальных сообществ исследуемых образцов был продемонстрирован рост на крахмале, КМЦ, пектине, ксилане, казеине и декстране-500. Рост на хитине был отмечен только для образцов, подвергшихся измельчению (рис. 4), что согласуется с данными, полученными методом посева на чашках Петри: были выделены разные штаммы хитинолитических бактерий.



Рис. 4. Кривые периодического роста смешанных бактериальных популяций на ксилане (а), пектине (б), хитине (в), при инокуляции питательных сред суспензиями бактерий из контрольного (*1*) и крупнодисперсного (*2*) образцов живого сфагнума, (*3*) – контроль на стерильность. *N* – 106 КОЕ/мл

Ростовые показатели в исследуемых образцах на момент измерения (90-е сут после измельчения) были довольно близки. Доля быстрорастущих популяций (с $\mu_m > 0.4$), развивающихся на средах с разными биополимерами, для контрольного образца составила 32%, для крупнодисперс-

ного — 46%, что указывает на большую долю быстрорастущих *r*-стратегов, получающих преимущества в росте при механическом измельчении образцов мха. Если рассмотреть параметры роста для нативного субстрата, то по активности $(-\ln(r_0))$ и экологической стратегии роста (μ_m) раз-



Рис. 5. а – Значения максимальной удельной скорости роста (μ_m) и б – метаболической готовности бактерий к росту $\ln(r_0)$ смешанных бактериальных популяций, возникающих при инокуляции питательных сред с ксиланом суспензиями из контрольного (*1*) и крупнодисперсного (*2*) образцов живого сфагнума.

личаются бактериальные популяции, развивающиеся на ксилане. Так, из образцов измельченного мха выделяются быстрорастущие, но не активные бактерии, а из образцов нативного мха (контрольные образцы) — медленнорастущие, но более активные бактерии (рис. 5). Для бактерий, выделенных из измельченных образцов мха, наблюдалась большая эффективность ассимиляции пектина, оцененная по урожаю бактерий в среде в пересчете на грамм пектина (рис. 6). Это свидетельствует о различном составе бактерий, входящих в комплекс разрушения пектина в исследуемых образцах.

В образцах живого сфагнума через 12 мес. эксперимента показатель, по которому можно судить о степени разложения торфа — отношение углерода к азоту в составе органического вещества, существенным образом не изменился, тогда как в измельченных образцах он уменьшился, что свидетельствует о деструкции биополимеров анализируемого субстрата (таблица).

Таким образом, на основании проделанной работы можно сделать следующее заключение. Установлено, что в результате механического измельчения сфагнума происходит увеличение общей численности бактерий и численности бактерий сапротрофного блока. В этом блоке происходят резкие изменения в таксономической структуре бактериального комплекса, что выражается в замещении доминирующих в нативном мхе эккрисотрофных агробактерий бактериями гидролитического блока. Использование молекулярно-биологических методов позволило идентифицировать в качестве доминирующих в сфагнуме таксонов таких специфических бактерий-гидролитиков как



Рис. 6. Эффективность ассимиляции субстрата (урожай бактерий, 10⁹ КОЕ/г пектина) бактериальными ассоциациями, возникающими при инокуляции питательных сред с пектином суспензиями из контрольного (*1*) и крупнодисперсного (*2*) образцов живого сфагнума.

Jant. agaricum и S. purpurascens. Представители видов Agr. radiobacter и Agr. rhizogenes были впервые выделены из торфяных почв. Кинетический метод показал большее функциональное разнообразие бактерий-гидролитиков и долю *r*-стратегов в сообществе измельченного мха. Наибольшие различия бактериального сообщества мха по параметрам роста были получены на среде с хитином,

Отношение C/N на разных этапах сукцессии в контрольных образцах и при механической обработке живого сфагнума

Вариант опыта	Этапы сукцессии		
	Начало опыта C/N	Через 6 месяцев С/N	Через год С/N
1	62	61	59
2	61	75	50
3	71	74	42

Примечание. 1 – контрольные образцы; 2 – крупнодисперсные образцы; 3 – мелкодисперсные образцы.

ксиланом и пектином. Хитин входит в состав измельченных оболочек грибов, повышение численности которых наблюдается при измельчении мха. Ксилан и пектин – полимеры, входящие в состав клеточных стенок мха. Эти факты можно интерпретировать в пользу создания условий, способствующих ускорению разложения мха при его механическом измельчении, подтверждением чего являются показатели деструкции органического вещества, которые значительно снизились через 12 мес. эксперимента в образцах сфагнума, измельченного до мелкодисперсного состояния. Отсутствие механического измельчения сфагнума в естественных условиях, связанное с низкой численностью и разнообразием почвенных сапрофагов в олиготрофных болотах, способствует сохранению интактности тканей сфагнума. Тем самым опосредовано доказано, что механико-химическая целостность тканей сфагнума является одним из определяющих факторов, ограничивающих деструкцию этого мха.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 13-04-00536-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Moore O*. The ecology of peat-forming processes: a review // Int. J. Coal Geology. 1989. V. 12. P. 89–103.
- 2. Aerts R., Verhoeven J.T.A., Whigham D.F. Plant-mediated controls on nutrient cycling in temperate fens and bogs // Ecology. 1999. V. 80. P. 2170–2181.
- Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. М.: Наука, 2003. С. 234–243.
- Thormann M.N., Bayley S.E., Currah R.S. Microcosm tests of the effects of temperature, microbial species number on the decomposition of *Carex aquatilis* and *Sphagnum fuscum* litter from southern boreal peatlands // Can. J. Microbiol. 2004. V. 50. P. 793–802.
- Бамбалов Н.Н. Анализ гидротермической гипотезы разложения органического вещества // Матер. IV научной школы "Болота и биосфера". Томск: Изд-во ЦНТИ, 2005. С. 61–68.
- Бамбалов Н.Н. Анализ биологических факторов разложения органического вещества в болотной среде // Матер. V научной школы "Болота и биосфера". Томск: Изд-во ЦНТИ, 2006. С. 18–27.
- Функционирование микробных комплексов верховых торфяников – анализ причин медленной деструкции торфа. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2013. 128 с.
- 8. Иванов А.А., Юдина Н.В., Ломовский О.И. Механохимическая обработка верхового торфа // Химия растительного сырья. 2004. № 2. С. 55–60.
- Методы почвенной биохимии и микробиологии. М.: Изд-во Московского ун-та, 1991. 304 с.
- Определитель бактерий Берджи. М.: Мир, 1997. Т. 1, 2. 800 с.

- Добровольская Т.Г., Головченко А.В., Лысак Л.В., Зенова Г.М. Физикохимия и биология торфа. Методы оценки численности и разнообразия бактериальных и актиномицетных комплексов торфяных почв: учебное пособие. Томск: Изд-во ТГПУ, 2010. 100 с.
- Manucharova N.A., Vlasenko A.N., Tourova T.P., Panteleeva A.N., Stepanov A.L., Zenova G.M. Thermophilic chitinolytic microorganisms of brown semidesert soil // Microbiology. 2008. V. 77. № 5. P. 610-615.
- Якушев А.В. Микробиологическая характеристика вермикомпостов. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 01.12.2009. Москва: МГУ имени М.В. Ломоносова, 2009. 24 с.
- Dobrovol'skaya T.G., Golovchenko A.V., Kukharenko O.S., Yakushev A.V., Semenova T.A., Inisheva L.I. The structure of the microbial communities in low-moor and high-moor peat bogs of Tomsk oblast // Eurasian Soil Sci. 2012. V. 45. № 3. P. 273–281.
- Kukharenko O.S., Pavlova N.S., Dobrovol'skaya T.G., Golovchenko A.V., Pochatkova T.N., Zenova G.M., Zvyagintsev D.G. The influence of aeration and temperature on the structure of bacterial complexes in highmoor peat soils // Eurasian Soil Sci. 2010. V. 43. № 5. P. 573–579.
- 16. Кожемяков А.П., Тихонович И.А. Использование инокулянтов бобовых и биопрепаратов комплексного действия в сельском хозяйстве // Докл. РАСХН. 1998. № 6. С. 7–10.
- Varma A., Sherameti I., Tripathi S., Prasad R., Das A., Sharma M. et al. The symbiotic fungus Piriformospora indica: Review. // Ed. Hock B. The Mycota. V. 9. Fungal Associations. Springer, 2012. P. 231–254.
- Murugesan S., Manoharan C., Vijayakumar I.R., Panneerselvam A. Isolation and characterization of Agrobacterium rhizogenes from the root nodules of some leguminous plants // Int. J. Microbiol. Res. 2010. V. 1. P. 92–96.
- Sawada H., Ieki H., Ovaiz H., Matsumoto S. Proposal for rejection of Agrobacterium tumefaciens and revised descriptions for the genus Agrobacterium and for Agrobacterium radiobacter and Agrobacterium rhizogenes // Int. J. System. Bacteriol. 1993. V. 43. P. 694–702.
- Young J.M., Kuykendal L.D., Martinez-Romero E., Kerr A., Sawada H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, the inclusion of all species of Agrobacterium Conn 1942 and Allorhizobium undicola de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter, R. rhizogenes, R. rubi, R. undicola* and *R. vitis* // Int. J. System. Bacteriol. 2001. V. 51. P. 89–103.

Effect of Mechanical Grinding of *Sphagnum* on the Structure and Physiological State of Bacterial Communities

T. G. Dobrovol'skaya¹, A. V. Golovchenko, A. V. Yakushev, N. A. Manucharova, and E. N. Yurchenko

Faculty of Soil Sciences, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Received April 3, 2014

Abstract—The microcosm method was used to demonstrate an increase in bacterial numbers and drastic changes in the taxonomic structure of saprotrophic bacteria as a result of mechanical grinding of *Sphagnum* moss. Ekkrisotrophic agrobacteria predominant in untreated moss were replaced by hydrolytic bacteria. Molecular biological approaches revealed such specific hydrolytic bacteria as *Janthinobacterium agaricum* and *Streptomyces purpurascens* among the dominant taxa. The application of kinetic technique for determination of the physiological state of bacteria in situ revealed higher functional diversity of hydrolytic bacteria in ground moss than in untreated samples. A considerable decrease of the C/N ratio in ground samples of living *Sphagnum* incubated using the microcosm technique indicated decomposition of this substrate.

Keywords: *Sphagnum*, mechanical grinding, abundance and taxonomic structure of bacterial complexes, physiological activity of bacteria, *Sphagnum* decomposition

¹ Corresponding author; e-mail: dobrtata@mail.ru