

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**МИКРОБНЫЕ АССОЦИАЦИИ ПОБЕГОВ  
ОГУРЦА ОБЫКНОВЕННОГО (*CUCUMIS SATIVUS* L., 1753)  
В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Кузиной Марины Сергеевны

Научный руководитель

доцент кафедры микробиологии

и физиологии растений, к.б.н., доцент

\_\_\_\_\_ А.М. Петерсон

Зав. кафедрой микробиологии

и физиологии растений, д.б.н., профессор

\_\_\_\_\_ С.А. Степанов

Саратов 2017

## Введение

**Актуальность темы.** Огурец обыкновенный (*Cucumis sativus* L., 1753) является одной из самых распространенных овощных культур на территории Российской Федерации. Растения огурца подвержены различным вирусным, бактериальным, грибковым заболеваниям [1]. Потери урожая при этом достигают 23,8% [2]. В настоящее время большую распространенность имеют такие заболевания, как мучнистая роса (возбудитель гриб *Erysiphe cichoracearum*), аскохитоз (гриб *Ascochyta cucumis*), белая гниль (гриб *Sclerotinia sclerotiorum*), антракноз (гриб *Colletotrichum lagenarium*), обыкновенная мозаика (вирус *Cucumber mosaicvirus*), угловатая пятнистость листьев (бактерия *Pseudomonas syringae*) и другие [3]. В последнее время считается, что возбудителем заболевания может быть не один микроорганизм, а ассоциация видов микроорганизмов, обитающих на растении [4].

На поверхности растения фитопатогены сталкиваются с компонентами нормальной микрофлоры растения, многие из которых обладают антагонистической активностью по отношению к возбудителям болезней растений. Знания о микробных ассоциациях растений огурца позволят в дальнейшем разработать новые биологические методы борьбы с патогенами, поражающими данную культуру. Это делает актуальным изучение микробоценозов *Cucumis sativus* в Саратовской области.

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы являлось выявление микробных ассоциаций растений огурца обыкновенного, произрастающих на территории Саратовской области.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить качественный и количественный состав микробных ассоциаций растений огурца;
2. Сравнить микробные ассоциации поверхности и внутренних тканей растений;

3. Сравнить микробные ассоциации *Cucumis sativus*, произрастающих в разных районах Саратовской области;

4. Изучить сезонную динамику качественных и количественных характеристик микробоценоза растений огурца в течение вегетационного периода.

5. Изучить биологические свойства бактерий-ассоциантов.

**Материал и методы исследования.** Материалом для исследования послужили листья растений огурца сорта «Конкурент», произрастающие в приусадебных хозяйствах Энгельсского, Ершовского, Краснопартизанского, Красноармейского, Базарно-Карабулакского районов. Из Энгельсского района было исследовано 30 растений, из остальных районов по 10 растений. Выбор данного сорта обусловлен его широким культивированием на территории Саратовской области. Всего в ходе экспериментальной работы было исследовано 70 листьев растений огурца не имеющих выраженных патологий.

Микробиологические исследования листовых пластинок растений огурца проводили в трёх направлениях: посев отпечатком верхней части листа, посев отпечатком нижней части листа и посев внутренних тканей листовой пластинки.

Для всех посевов использовали питательные среды PDA и картофельную среду. Среда PDA использовалась для выделения грибов, картофельная среда – для выделения бактерий, ассоциированных с растениями.

Постановку всех тестов проводили по общепринятым методикам [5].

Индекс встречаемости рассчитывали как число проб, в которых обнаружены бактерии данного вида, к общему числу исследованных проб, выраженное в процентах [6].

Индексы общности видового состава микробоценозов растений огурца рассчитывали как отношение видов, общих для двух сравниваемых групп, к

общему количеству выделенных из них видов, выраженное в процентах (коэффициент Жаккара).

Идентификацию выделенных штаммов проводили по определителям бактерий Берджи [7, 8] и определителям грибов [9, 10].

**Структура и объем работы.** Работа изложена на 48 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 8 таблицами и 7 рисунками. Список использованных источников включает в себя 50 наименований.

### **Основное содержание работы**

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных об особенностях строения растения огурца, о нормальной микрофлоре органов растения, о фитопатогенных микроорганизмах, поражающих *Cucumis sativus*, о биологических способах борьбы с фитопатогенными микроорганизмами.

В главе «Результаты исследования» представлены экспериментально полученные данные об обсемененности листьев растений огурца. Всего в ходе проведения исследований с поверхности листьев растений огурца было выделено 13 видов бактерий и 10 видов грибов. Выделенные виды бактерий являлись представителями семейств *Bacillaceae*, *Microbacteriaceae*, *Propionibacterinea*, *Acetobacteraceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Rhizobiaceae*, *Xanthobacteraceae*, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, грибы – *Pleosporaceae*, *Nectriaceae*, *Stachybotryaceae*, *Trichocomaceae*, *Mucoraceae*.

Основным отличием микробоценозов поверхности и внутренних тканей явилось большее видовое разнообразие грибов на поверхности.

Индекс общности видового состава микробоценозов поверхности и внутренних тканей листовой пластинки растений огурца составил 69,5%. Однако индексы общности для бактериальной и грибной составляющей микробной ассоциации существенно различались. Так, для бактериального компонента микробоценоза этот показатель составил 92,3% для грибного – 40,0%.

Наибольшей частотой встречаемости на верхней части поверхности листовой пластинки обладали бактерии *Rhizomonas suberifacien* (63,9%) и грибы *Fusarium sp.* (95,1%), на нижней части – *Rhizobacter doucus* (31,8%) и *Bacillus psychrotolerans* (30,1%), *Fusarium sp.* (84,3%). При этом количественные показатели этих видов варьировали в пределах  $10-10^3$  КОЕ/см<sup>2</sup>. Внутренние ткани листа, в отличие от его поверхности, обладали меньшим разнообразием микроорганизмов. Частота встречаемости бактерий здесь лежала в пределах от 12,3% (*Agrobacterium radiobacter*) до 56,4% (*Rhizomonas suberifaciens*). Количественные показатели варьировали в пределах  $10^2-10^4$  КОЕ/г.

Для выяснения стабильности микробной ассоциации растений огурца на территории Саратовской области в течение июля 2016 г. было исследовано по 10 растений одного сорта, произрастающих в разных районах Саратовской области.

Для Саратовской области характерны засушливая весна и сухое лето, что неблагоприятно сказывается на выживаемости микроорганизмов на поверхности растений [11]. По мере увеличения засушливости климата заметна тенденция уменьшения доли неспорных бактерий. В более влажных районах Правобережья доля неспорных бактерий составляет 31-46%, в более засушливых районах Левобережья — 8-15%. В Энгельском районе эта цифра составила 31%.

Наибольший индекс общности видового состава микробных ассоциаций растений огурца, произрастающих в Краснопартизанском и Красноармейском районах (62,5%), наименьший индекс общности — в Ершовском и Базарно-Карабулакском районах (26,3%).

Наибольшее количество видов микроорганизмов выделено с поверхности растений огурца в Энгельском районе (16 видов). В разных районах Саратовской области наибольшая частота встречаемости была характерна для разных видов. В Ершовском районе наиболее высокие показатели встречаемости имели бактерии *Bacillus flexus*, *B. simplex*, грибы

*Aspergillus flavus* и *Fusarium sp.*, в Энгельсском районе – бактерии *Agromonas oligotrophica*, грибы *Alternaria sp.*, *Stachybotrys sp.*, в Краснопартизанском районе – бактерии *Azomonas agilis* и *Xanthobacter autotrophicus*, грибы *Aspergillus flavus* и *Fusarium sp.*, в Базарно-Карабулакском – бактерии *Azomonas agilis*, *Rhizomonas suberifaciens* и *Xanthomonas arboricola*, грибы *Phoma sp.*, в Красноармейском – бактерии *Rhizomonas suberifaciens*, *Xanthobacter autotrophicus*, *Xanthomonas arboricola* и грибы *Aspergillus flavus* и *Fusarium sp.*.

Ни один вид бактерий-ассоциантов не выделялся из всех исследованных районов. Из грибов наиболее широкое распространение на растениях огурца имели грибы рода *Aspergillus niger* и *Fusarium sp.*, которые изолировались с поверхности растений во всех исследованных районах. Наиболее стабильными ассоциантами поверхности листьев огурца оказались бактерии *Bacillus batuviensis*, *B. simplex*, *Rhizomonas suberifaciens*, *Xanthobacter autotrophicus*. Данные виды встречались практически во всех исследуемых районах. Некоторые виды микроорганизмов-ассоциантов (*Agromonas oligotrophica*, *Xanthomonas arboricola*, *Alternaria sp.*) изолировались лишь в отдельных районах, но там имели высокие показатели встречаемости.

Количество видов, встречающееся во внутренних тканях листьев огурца, во всех исследованных районах было значительно меньше, чем количество видов, выделенное с поверхности. Наибольшее количество видов микроорганизмов выделено с поверхности растений огурца в Энгельсском (8 видов) и Красноармейском (7 видов) районах. В Ершовском районе наиболее высокие показатели встречаемости имели бактерии *Bacillus flexus* и *B. psychrotolerans*, выделены грибы *Aspergillus flavus*, в Энгельсском районе — бактерии *Agromonas oligotrophica* и грибы *Aspergillus niger*, в Краснопартизанском районе — бактерии *Azomonas agilis* и грибы *Fusarium sp.*, в Базарно-Карабулакском — бактерии *Rhizomonas suberifaciens*, в Красноармейском – бактерии *Rhizomonas suberifaciens*, *Xanthobacter*

*autotrophicus*, *Xanthomonas arboricola* и грибы *Fusarium sp.*. Таким образом микробные ассоциации растений огурцов, произрастающих в разных районах Саратовской области, существенно различаются. Тем не менее, выявлены виды, которые являются ассоциантами растений огурца на территории большинства районов Саратовской области. К числу таких видов можно отнести бактерии *Bacillus batuviensis*, *B. simplex*, *Rhizomonas suberifaciens*, *Xanthobacter autotrophicus*. Среди грибов наиболее широкое распространение на растениях огурца имели грибы рода *Aspergillus niger* и *Fusarium sp.*, которые изолировались с поверхности растений во всех исследованных районах.

Для выяснения стабильности микробной ассоциации растений огурца в течение вегетационного сезона в Энгельском районе было исследовано по 10 растений из одного агроценоза в июне, июле и августе 2016 г.

Самым благоприятным периодом для микроорганизмов оказался июль. За это время с поверхности листовой пластинки было выделено 17 видов микроорганизмов. Причем наблюдалось увеличение видов бактерий и грибов.

Индекс общности микробоценозов растений в июне и июле составил 33,3%, июле и августе — 50,0%, июне и августе – 41,6%.

Наибольшей стабильностью обладали *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus simplex*, *Aspergillus niger*, *Fusarium sp.*. Данные микроорганизмы встречались на поверхности листьев огурца в течение всего летнего периода. Количественные показатели содержания микроорганизмов на поверхности растений в течение лета существенных изменений не имели.

Мы проанализировали способность выделенных изолятов использовать различные источники углерода и азота и их устойчивость к физико-химическим факторам.

Для эндофитных и эпифитных бактерий была характерна высокая протеолитическая активность. На поверхность растений белки могут попадать из окружающей среды (например, с пылью). Источниками белка

также могут быть отмирающие покровные ткани растения-хозяина, а также погибшие клетки других бактерий и грибов.

Эффективность использования углеводов была различна. Наиболее востребованным углеводом для выделенных изолятов оказалась глюкоза, которую использовали 89,5% штаммов эпифитов и 78,6% штаммов эндофитов. Другие сахара использовали от 10,5 до 63,2% эпифитных и от 21,4 до 71,4% эндофитных штаммов.

Кроме белков доступным источником азота могут быть нитраты, широко распространённые во внешней среде. В наших исследованиях 78,9% эпифитных и 42,8% эндофитных штаммов были способны использовать нитрат.

Мы также исследовали способность бактериальных изолятов к фиксации  $N_2$ . Выяснилось, что 68,4% бактерий-ассоциантов поверхности растений огурца являются азотфиксаторами. Среди эндофитных бактерий этой способностью обладали 45,0% изолятов.

Важную роль в выживании на поверхности и во внутренней среде растения играет устойчивость бактерий к физико-химическим факторам среды. Показано, что исследуемые бактерии могут успешно размножаться как при пониженных ( $+8^\circ C$ ), так и при повышенных ( $+43^\circ C$ ) температурах. Это позволяет сохранять относительную стабильность видового состава микробных ассоциаций в течение всего вегетационного сезона.

Представляло интерес выявить устойчивость выделенных штаммов к различным показателям pH среды. Поверхность большинства растений имеет нейтральный pH. Кислотность ксилемного сока колеблется в диапазоне 5,5-6,5, а значения pH флоэмного сока составляет 7-9. Можно сделать вывод, что бактерии могут столкнуться с pH от 5,5 до 9. Наши исследования показали, что бактерии-ассоцианты растений огурца могут адаптироваться к разным показателям кислотности среды обитания. Большая часть и эпифитных, и эндофитных микроорганизмов была способна размножаться в диапазоне pH от 5 до 10.



Таким образом для бактерий-ассоциантов растений огурца характерен широкий круг пищевых субстратов, которые они способны использовать, и широкий диапазон значений физико-химических факторов, при которых они могут сохранять свою физиологическую активность.

### Выводы

1. Микробные ассоциации побегов огурца обыкновенного (*Cucumis sativus* L., 1753) включали 13 видов бактерий и 10 видов грибов.
2. Количественное содержание отдельных видов микроорганизмов на поверхности растений огурца варьировало от 10 до  $10^3$  КОЕ/см<sup>2</sup>, во внутренних тканях – от  $10^2$  до  $10^4$  КОЕ/г.
3. Индекс общности видового состава микробоценозов поверхности и внутренних тканей листовой пластинки растений огурца составил 69,5%. Основным отличием явилось большее видовое разнообразие грибов на поверхности листовой пластинки (10 и 4 видов соответственно).
4. Микробоценозы растений огурца, произрастающих в разных районах Саратовской области, существенно различались. Индексы общности их видового состава варьировали от 26,3% до 58,8%. Наиболее стабильными ассоциантами оказались бактерии *Bacillus batuviensis*, *B. simplex*, *Rhizomonas suberifaciens*, *Xanthobacter autotrophicus* и грибы *Aspergillus niger*, *Fusarium sp.*
5. В течение вегетационного сезона наибольшее видовое разнообразие микробоценозов растений огурца отмечено в июле (8 видов бактерий и 9 видов грибов).
6. Для бактерий-ассоциантов растений огурца характерен широкий круг пищевых субстратов, которые они способны использовать, и широкий диапазон значений физико-химических факторов (+10-45° С; pH 5-10), при которых они могут сохранять свою физиологическую активность.

### Список использованных источников

1. Круг, Г. Овощеводство / Г. Круг. Пер. с нем. В. И. Леунова. М.: КолосС, 2000. 576 с.
2. Бухонова, Ю. В. Определение возможных потерь урожая тепличных культур от галловых нематод / Ю. В. Бухонова, В. Р. Сергеев, К. А. Переверткин // Защита и карантин растений. 2010. № 11. С. 40 – 41.
3. Вянгеляускайте, А. П. Вредители и болезни овощных культур: Справочник / Вянгеляускайте А. П., Жуклене Р. М., Жуклис Л. П. и др. Пер. с лит. С. А. Пилецкис. М.: Агропромиздат, 1989. 462 с.
4. Защита растений от болезней: учебник / В. А. Шкалик, О. О. Белошапкина, Д. Д. Букреев [и др.]; Под ред. В. А. Шкалика. 3-е изд., перераб. и доп. М.: КолосС, 2010. 404 с.
5. Петерсон, А. М. Практические рекомендации для идентификации сапрофитных и условно-патогенных бактерий по фенотипическим признакам / А. М. Петерсон, П. А. Чиров. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2005. 24 с.
6. Беклемишев, В. Н. Биоценологические основы сравнительной паразитологии / В. Н. Беклемишев. М.: Наука, 1970. 502 с.
7. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New-York: Springer, 2001. Vol. 3. 1450 p.
8. Хоулт, Дж. Определитель бактерий Берджи / Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит. Пер. с англ. Г. А. Заварзина. Том 1. М.: Мир, 1997. 432 с.
9. Miller, Jr. Guide to Edible and Inedible Fungi / Jr. Miller, K. Orson, Jr. Miller // Pequot Press, Guilford, CT, 2006. 592 p.
10. Simmons, E. G. *Alternaria* – an identification manual / E. G. Simmons // CBS Biodiversity Series. 2007. Vol. 6. 775 p.
11. Васильева, М. Ю. Мониторинг климата Саратовской области / М. Ю. Васильева, С. И. Пряхина, Ю. Н. Фридман // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Науки о Земле. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2006. Вып. 1, С. 15 – 18.