

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 РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ
СОРТА «КАЛАЧ 60»**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Белей Елены Витальевны

Научный руководитель:

доцент кафедры микробиологии

и физиологии растений, к.б.н., доцент _____ Е.В. Глинская

Зав. кафедрой микробиологии

и физиологии растений, д.б.н., профессор _____ С.А. Степанов

Саратов 2018

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Озимая пшеница – одна из ведущих продуктивных зерновых культур сельского хозяйства. Её зерно богато клейковинными белками и другими ценными веществами, поэтому оно широко используется для продовольственных целей, в особенности в хлебопечении и кондитерской промышленности [1].

Повышение уровня урожайности зерновых напрямую зависит от факторов окружающей среды и технологий возделывания, но не менее значимым является санитарный контроль за микробоценозами возделываемых растений и почвы [2].

Взаимодействие растений с микроорганизмами играет важную роль в их развитии. Микроорганизмы могут благоприятно влиять на рост и развитие, способствуя снабжению растений не только элементами минерального питания, но и физиологически активными веществами, защищающими их от патогенных микроорганизмов, а также адаптируя к стрессам. Вполне ожидаемо, что бактерии-продуценты биологически активных веществ могут оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на жизнедеятельность злаковых культур.

Поражение вирусными, грибными и бактериальными патогенами вызывает у растений заболевания, которые по типу системной инфекции проявляются увяданием листьев, стеблей и приводят к гибели растения. Такие вспышки заболеваний выражаются в резком снижении качества и урожайности культуры [3].

Цель и задачи исследования. В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы являлось изучение микробных ассоциаций растений озимой пшеницы сорта «Калач 60», собранных на полях ФГБНУ НИИСХ «Юго-Восток» (Саратов, Россия).

Для достижения указанной цели были определены следующие задачи.

1. Определить видовой состав ассоциативных микроорганизмов поверхности, внутренней среды и ризосферы растений озимой пшеницы сорта «Калач 60» в различные фазы развития.

2. Установить индекс встречаемости и количественные показатели ассоциативных микроорганизмов растений пшеницы сорта «Калач 60».

3. Изучить биологические свойства выделенных культур микроорганизмов.

4. Выявить наличие фитопатогенных бактерий в исследуемых пробах растений и почвы.

Материалы и методы исследования. Работа проводилась на кафедре микробиологии и физиологии растений биологического факультета Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского в 2017-2018 гг.

Объектом исследования явились растения озимой пшеницы сорта «Калач 60», собранные на полях ФГБНУ НИИСХ «Юго-Восток» (Саратов, Россия) в разные периоды вегетации (колошение, созревание, молочная спелость).

Для микробиологического исследования нами были отобраны 90 образцов листьев, стеблей и почвы растений.

Для выделения микроорганизмов с поверхности растений проводился посев методом «отпечатка» на питательные среды ГРМ-агар, КС.

Для посева микроорганизмов из внутренней среды растения в случайном порядке брали листья и стебли, обрабатывали их мылом, и замачивали в 70% этиловом спирте и промывали физиологическим раствором. После, гомогенизат вносили в чашки Петри с питательными средами (ГРМ, КС) и растирали микробиологическим шпателем.

Для бактериологического посева прикорневой почвы осуществляли разведение 10 образцов почвы растений до показателя 10^{-6} . По 0,1 мл почвенной суспензии высевали на ГРМ-агар из разведения 10^{-6} , на питательную среду КС высевали из разведения 10^{-3} .

Все посеы инкубировались при температуре 28 °С в течение 48 – 96 часов. Затем проводили количественный учет выделенных штаммов микроорганизмов и отсев выделенных штаммов на скошенную питательную среду ГРМ с целью дальнейшего изучения биохимических свойств, а так же идентификации полученных штаммов.

При определении устойчивости выделенных штаммов к абиотическим факторам изучали способность к росту при различных показателях рН среды (5, 6, 9, 10), концентрациях NaCl в среде (7, 10, 15 %), действию температурного фактора (+10 и +43°С).

Постановку всех тестов проводили по общепринятым методикам [4].

Идентификацию осуществляли по Определителю бактерий Берджи путем анализа 30 фенотипических признаков [5, 6]. Видовая принадлежность подтверждалась секвенированием штаммов по 16S рРНК (ЗАО «Синтол», г. Москва).

Статистическая обработка проводилась с использованием программы Statistica 6.0. При статистической обработке полученных данных проводился расчет основных вероятностных характеристик случайных величин: первого или нижнего квартиля (25%), медианы (второго квартиля) для центрирования распределения и третьего или верхнего (75%) квартиля. При проверке статистических гипотез критический уровень показателя достоверности p принимали равным 0,05. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Структура и объем работы. Бакалаврская работа изложена на 45 страницах и включает в себя пять частей: введение, основную часть, заключение, выводы и список использованных источников. Основная часть включает в себя три раздела: обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований. Раздел обзор литературы включает в себя пять разделов: общие сведения о пшенице как основной хлебной культуре мира, описание микроорганизмов злаковых культур, типы взаимодействий микроорганизмов и злаков, иммунитеты, фитопатогены злаков. Работа

включает в себя 4 рисунка, 7 таблиц. Список использованных источников включает в себя 42 наименование.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В результате проведенных исследований из 90 образцов листьев, стеблей и почвы растений озимой пшеницы сорта «Калач 60» в разные периоды развития (колошение, созревание, молочная спелость), собранной на полях ФГБНУ НИИСХ «Юго-Восток» (Саратов, Россия) в период с июля по август 2017 гг., было выделено 22 штамма бактерий, которые были отнесены к 8 родам и 18 видам (рисунок 3), из которых 1 – грамотрицательная палочка, 4 – грамположительные палочки, 7 – грамположительные споровые палочки и 6 – грамположительные кокки.

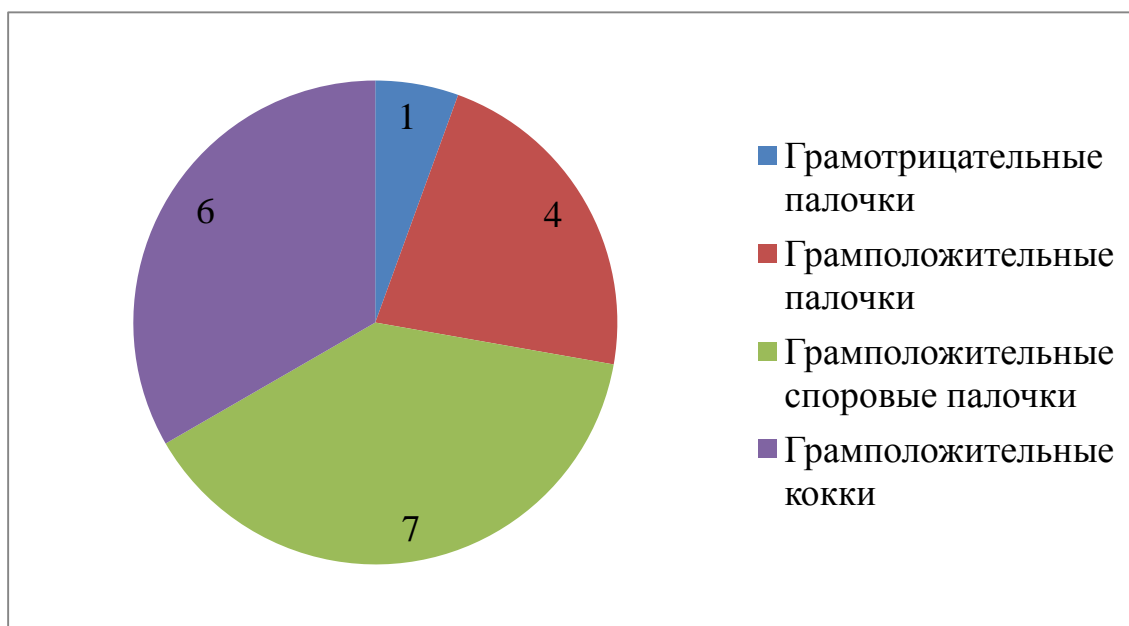


Рисунок 3 – Количество видов бактерий, ассоциированных с растениями озимой пшеницы сорта «Калач 60»

В зависимости от времени сбора в разные фазы развития растений пшеницы (колошение, созревание, молочная спелость), количественный и качественный состав микроорганизмов изменялся. Результаты приведены в таблицах 1, 2, 3.

С поверхности растений пшеницы было выделено 5 видов микроорганизмов, которые относились к 4 родам (таблица 1) *Staphylococcus*,

Micrococcus, *Exiguobacterium* и *Bacillus*. Индекс встречаемости изолированных бактерий варьировал от 60 до 70 %. Численность бактерий составляла от 1,1 до 3,3 КОЕ в пробе.

Таблица 1 – Индексы встречаемости (ИВ) и количественные показатели микроорганизмов (КОЕ/см²), выделенных с поверхности растений.

№	Виды бактерий	Колошение		Созревание		Молочная спелость	
		КОЕ/см ²	ИВ,%	КОЕ/см ²	ИВ,%	КОЕ/см ²	ИВ,%
1	<i>Staphylococcus kloosii</i>	<u>0,2</u> [*] 0,1-0,4 ^{**}	70	-	-	-	-
2	<i>Staphylococcus chromogenos</i>	-	-	<u>0,5</u> 0,1-1,4	60	-	-
3	<i>Micrococcus varians</i>	-	-	<u>0,2</u> 0,1-0,4	60	-	-
4	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	-	-	<u>0,3</u> 0,1-0,7	60	-	-
5	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	<u>0,5</u> 0,1-0,9	70

Примечание: «-» - отсутствие вида в пробе, * – медиана, ** – межквартильный размах.

Максимальная численность бактерий (3,3 КОЕ в пробе) наблюдалась для *Bacillus cereus* в период фазы развития растения молочная спелость, бактерии вида *Micrococcus varians* (2,2 КОЕ в пробе) и *Exiguobacterium aurantiacum* (2,8 КОЕ в пробе) так же обладали высокими показателями численности в период созревания. Максимальный индекс встречаемости (70 %) отмечался для *Staphylococcus kloosii* в фазе колошения и *Bacillus cereus* в период молочной спелости.

В период колошения, созревания и молочной спелости из внутренней среды растений было выделено 6 видов бактерий, родов *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Microbacterium*. Индекс встречаемости бактерий-эпифитов составлял от 30 до 80 %. Показатели численности варьировали от 10³ до 10⁵ КОЕ в пробе.

Таблица 2 – Индексы встречаемости (ИВ) и количественные показатели микроорганизмов (КОЕ/г), выделенных из внутренней среды растений.

№	Виды бактерий	Колошение		Созревание		Молочная спелость	
		КОЕ/г	ИВ,%	КОЕ/г	ИВ,%	КОЕ/г	ИВ,%
1	<i>Staphylococcus hominis</i>	<u>4,5</u> [*] 3-6 ^{**}	80	-	-	-	-
2	<i>Staphylococcus cohnii</i>	<u>3,2</u> 3-4	50	-	-	-	-
3	<i>Staphylococcus arlettae</i>	-	-	<u>4,8</u> 4-5	40	-	-
4	<i>Bacillus halmapalus</i>	-	-	<u>3,6</u> 3-4	30	-	-
5	<i>Bacillus asahii</i>	-	-	-	-	<u>5,6</u> 5-7	30
6	<i>Microbacterium arborescens</i>	-	-	-	-	<u>3,4</u> 3-4	80

Примечание: «-» - отсутствие вида в пробе, * – медиана, ** – межквартильный размах.

Максимальный показатель численности (10^5 КОЕ в пробе) наблюдался у бактерий вида *Staphylococcus hominis* в период колошения, с индексом встречаемости равным 80 %. Микроорганизмы *Staphylococcus arlettae* и *Bacillus halmapalus* в фазе созревания достигали количественных показателей равных 10^4 КОЕ в пробе (таблица 2), на стадии молочной спелости микроорганизмы вида *Microbacterium arborescens* доминировали с индексом встречаемости равным 80%.

На основании полученных данных (таблица 3) ризосфера пшеницы представлена 7 видами микроорганизмов, которые относятся к родам *Cellulomonas*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Bacillus* (4 вида). Показатели индекса встречаемости микроорганизмов, выделенных из образцов почвы варьируют от 30 до 100%. В период колошения *Cellulomonas fimi* обнаружены в количестве 10^8 КОЕ в пробе, ИВ равен 90 %. Так же высокими показателями численности (10^8 КОЕ в пробе) обладали микроорганизмы вида *Bacillus clausii*.

В фазу созревания количественные показатели *Listeria grayi* достигали 10^7 КОЕ в пробе. Доминирующим видом в период молочной спелости выделен *Bacillus factidiosus* с индексом встречаемости равным 100%, количественные показатели которого достигали 10^8 КОЕ в пробе.

Таблица 3 – Индексы встречаемости (ИВ) и количественные показатели микроорганизмов (КОЕ/г), выделенных из ризосферы растений.

№	Виды бактерий	Колошение		Созревание		Молочная спелость	
		КОЕ/г	ИВ,%	КОЕ/г	ИВ,%	КОЕ/г	ИВ,%
1	<i>Cellulomonas fimi</i>	$\frac{4,3}{4-5}^*$ **	90	-	-	-	-
2	<i>Listeria grayi</i>	$\frac{4,2}{4-5}$	50	-	-	-	-
3	<i>Pseudomonas syringae</i>	$\frac{4,3}{4-5}$	30	-	-	-	-
4	<i>Bacillus clausii</i>	-	-	$\frac{7,5}{7-8}$	40	-	-
5	<i>Bacillus horikoshii</i>	-	-	-	-	$\frac{7,3}{7-8}$	40
6	<i>Bacillus circulons</i>	-	-	-	-	$\frac{4,3}{3-6}$	100
7	<i>Bacillus factidiosus</i>	-	-	-	-	$\frac{7,2}{7-8}$	50

Примечание: «-» - отсутствие вида в пробе, * – медиана, ** – межквартильный размах.

По ходу постановки биохимических тестов нами были исследованы сахаралитические свойства микроорганизмов-ассоциантов растений пшеницы.

Также нами был изучен диапазон устойчивости выделенных из растений пшеницы бактерий к некоторым физико-химическим факторам: температура, рН, концентрация NaCl в среде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени пшеница является одной из востребованных злаковых культур мира. Поражение растений вредоносными микроорганизмами приводит к увяданию, а затем и к гибели достаточного количества культур. Основываясь на вышеизложенных фактах необходимость санитарного контроля, возрастает как с теоретической, так и с практической точек зрения.

Изученный нами микробоценоз растений озимой пшеницы сорта «Калач 60» является активной динамической структурой. Выделенные бактерии-ассоцианты представлены в основном грамположительными споровыми палочками и грамположительными кокками. В результате исследования с поверхности, внутренней среды и образцов почвы растений были выделены 8 родов и 18 видов.

Бактерии-ассоцианты способны к улучшению уровня жизнедеятельности растений за счет метаболитов, выделяемых вследствие питания сахарами, содержащихся в растительном соке злаковых растений. Так же ассоциативные организмы могут являться дополнительными источниками азота, в результате способности к азотфиксации 30 % выделенных бактерий.

ВЫВОДЫ

1. Из побегов и ризосферы озимой пшеницы сорта «Калач 60» выделено 22 штамма бактерий, которые отнесены к 8 родам (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Exiguobacterium*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Cellulomonas*, *Listeria*, *Pseudomonas*) и 18 видам.

2. Количественные показатели и индекс встречаемости ассоциативных микроорганизмов, выделенных из побегов и ризосферы растений, различны: на поверхности растений численность бактерий варьирует от 1,1 до 3,3 КОЕ/см², индекс встречаемости – от 60 до 70 %; во внутренней среде количественные показатели микроорганизмов находятся в диапазоне от 10³ до 10⁵ КОЕ/г, индекс встречаемости – от 30 – до 80 %; в ризосфере растений численность бактерий составляет от 10⁷ до 10⁸ КОЕ/г, индекс встречаемости - 30 - 100 %.

3. Среди выделенных культур 40 % микроорганизмов образуют газообразные продукты из пептона (сероводород). 100 % штаммов обладают протеолитическими и сахаролитическими свойствами, чувствительны к резким колебаниям температуры, устойчивы к рН в среде (5, 9, 10).

4. Из ризосферы растений изолированы фитопатогенные микроорганизмы вида *Listeria grayi* и *Pseudomonas syringae*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Крючков, В. Г. Зерновое хозяйство: территориальная организация и эффективность производства / В. Г. Крючков, В. Л. Раковецкая. М.: Издательство Московского Университета, 1990. 136 с.
2. Деева, В. П. Резервы увеличения ресурсов зерна и маслосемян / В. П. Деева, А. И. Деев // Экономист. 1993. Т. 6, № 4. С. 76 - 79.
3. Рыбалкин, П. Н. Повышение эффективности производства зерна / П. Н. Рыбалкин. М.: Агропромиздат, 2007. 224 с.
4. 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.
5. Хаулта, Дж. Определитель бактерий Берджи. В 2 т. Т. 1 / Дж. Хаулта, Н. Крига, П. Снита ; пер. с англ. под общ. ред. Г. А. Заварзина. М.: Мир, 1997. 800 с.
6. Хаулта, Дж. Определитель бактерий Берджи. В 2 т. Т. 2 / Дж. Хаулта, Н. Крига, П. Снита ; пер. с англ. под общ. ред. Г. А. Заварзина. М.: Мир, 1997. 800 с.