

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

**ОСОБЕННОСТИ МИКРОБНЫХ АССОЦИАЦИЙ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА
ОБЫКНОВЕННОГО (*CUCUMIS SATIVUS* L., 1753),
КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В ЗАЩИЩЕННОМ ГРУНТЕ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы
направления подготовки магистратуры 060401 Биология
биологического факультета
Загнухиной Натальи Андреевны

Научный руководитель

к.б.н., доцент

А. М. Петерсон

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

С. А. Степанов

Саратов 2020

Введение

Актуальность темы. Огурец обыкновенный (*Cucumis sativus* L., 1753) – однолетнее травянистое растение, относящееся к семейству Тыквенные (*Cucurbitaceae*). В условиях средней полосы России культивирование растений огурца осуществляется как в открытом, так и в защищённом грунте. При массовом выращивании одного вида растений всегда повышается вероятность вспышек инфекционных заболеваний. Существенную роль в защите растений от фитопатогенов играют микроорганизмы их нормальной микрофлоры. Микрофлора не только ризосферы, но и филлосферы в значительной степени формируется за счёт почвенных микроорганизмов. Характерной особенностью тепличного овощеводства является то, что в них отсутствует почва – растения выращиваются на минеральной вате. Соответственно микроорганизмы привносятся не из почвы, как в открытом грунте, а из других источников [1]. Однако данные о формировании микрофлоры растений в условиях теплиц в литературе практически отсутствуют.

В связи с этим, целью моей работы стало изучение особенностей формирования микробных ассоциаций растений огурца, культивируемых в защищенном грунте. Для реализации указанной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Изучить микрофлору различных объектов теплицы (воздуха, синтетического субстрата, минерального раствора, системы орошения, кожи рук обслуживающего персонала), которые могли бы послужить источниками микроорганизмов, заселяющих растения огурца в условиях защищённого грунта.

2. Изучить микробную ассоциацию растений огурца обыкновенного, культивируемых в защищенном грунте, на разных фазах развития.

3. Выявить взаимосвязь микробной ассоциации растений и микрофлоры объектов окружающей среды.

Материал и методы исследования. Исследования проводились на базе ОАО Совхоз «Весна» в 2018-2019 годах. В данных теплицах растения культивируются на минеральной вате без какого-либо контакта с почвой.

Объектом настоящего исследования послужили растения огурца сорта Атлет F1 фирмы Гавриш на 3-х фазах развития: фазе первого настоящего листа, фазе цветения и фазе плодоношения.

Микробиологически были исследованы семена, листья, корни и плоды растений, а также различные объекты окружающей среды: минеральная вата Grodan delta (Польша), минеральный раствор, используемый для полива, воздух, объекты системы орошения (трубы, элементы капельного полива и т.д.), кожа рук обслуживающего персонала, покровная плёнка пола. Было исследовано по 30 проб каждого объекта.

При микробиологических исследованиях растений для всех посевов использовали питательные среды PDA, картофельную среду, ГРМ-агар.

Микробиологические исследования растений проводились по стандартным методикам (метод разведения, метод седиментации, метод отпечатка, метод смыва и др.).

Идентификацию бактерий проводили по фенотипическим признакам. Постановку всех тестов проводили по общепринятым методикам [2].

Видовую принадлежность бактериальных изолятов устанавливали с помощью определителя Берджи [3]. Видовую принадлежность грибов устанавливали с помощью определителей по морфологическим и культуральным признакам [4, 5].

Индексы общности видового состава микробоценозов рассчитывали как отношение видов, общих для двух сравниваемых групп, к общему количеству выделенных из них видов, выраженное в процентах.

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

Структура и объём работы. Работа изложена на 71 странице, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список

использованных источников. Работа проиллюстрирована 18 таблицами и 20 рисунками. Список использованных источников включает 58 наименований.

Научная новизна. Впервые прослежено формирование микробных ассоциаций растений огурца обыкновенного в условиях защищенного грунта. Впервые выявлены виды, доминирующие в разных биотопах растений на разных фазах их развития. Впервые показано влияние микробной обсеменённости различных объектов теплицы на видовой состав микробной ассоциации культивируемых там растений огурца.

Научная значимость. Проведённые исследования существенно расширили представления о механизмах формирования микробных ассоциаций растений в условиях защищённого грунта. Полученные данные послужат научной основой для дальнейшего совершенствования биологических методов защиты растений огурца от фитопатогенов в условиях теплиц.

Положения, выносимые на защиту:

1. Виды микроорганизмов, наиболее активно циркулирующие в помещении теплицы, одновременно являются доминантами различных биотопов культивируемых там растений огурца. Смена доминантов в окружающей среде приводит к смене доминантов на поверхности и во внутренних тканях растений.

2. На микробную ассоциацию растений огурца наибольшее влияние оказывает микрофлора минерального раствора, плёнки пола и элементов системы орошения.

Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлен анализ литературных данных о биологических особенностях *Cucumis sativus*, нормальной микрофлоре этих растений при культивировании в открытом грунте и её влиянии на рост и развитие растений, проведён обзор фитопатогенных микроорганизмов, вызывающих заболевания растений огурца, проанализированы достоинства и

недостатки биопрепаратов на основе микроорганизмов-антагонистов, применяемых для борьбы с болезнями растений огурца.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о формировании микробной ассоциации различных биотопов растений огурца на разных фазах развития растений в условиях защищённого грунта.

Всего в ходе исследования было выделено и идентифицировано 90 штаммов бактерий и 11 штаммов грибов.

На первом этапе работы исследовали микрофлору семян, использующихся для посева.

В ходе исследования было выявлено, что на семенах полностью отсутствовали плесневые грибы, а бактериальная микрофлора была представлена преимущественно бактериями рода *Bacillus*.

Следующий этап исследования проводили на фазе первого настоящего листа. На всех исследованных объектах преимущественно выделялись бактерии рода *Bacillus*, в воздухе обнаруживались плесневые грибы – *Lichtheimia corymbifera*, *Penicillium janthinellum*.

По сравнению с микробной обсеменённостью объектов окружающей среды, видовой состав бактерий и грибов, выделяемых с молодых растений, был значительно беднее. Это говорит о том, что лишь часть микроорганизмов, попадающих на растения, может адаптироваться к этой экологической нише.

Поскольку минеральный субстрат был обработан биопрепаратом на основе триходермы, данный гриб доминировал на поверхности растений, но не проникал во внутренние ткани. Также на поверхности и во внутренних тканях преобладали бациллы и представители рода *Curtobacterium*

Следующий этап исследований проводили в начале стадии цветения. В этот период растения переносят в основную теплицу, однако культивирование по-прежнему происходит на минеральной вате без контакта с почвой.

Наибольшей экологической пластичностью обладали виды бактерий *Listeria seeligeri* и *Staphylococcus warneri*, которые изолировались практически из всех исследованных объектов. Интересен тот факт, что в теплице произошла смена доминирующих видов бактерий: если на предыдущем этапе наиболее массовыми видами были представители рода *Bacillus*, то теперь им на смену пришли неспоровые виды, хотя на некоторых объектах бациллы по-прежнему встречались в значительном количестве.

Из грибной микрофлоры на объектах окружающей среды доминировал интродуцированный *T. harzianum*. Помимо этого вида, сапрофитические грибы изолировались в небольшом количестве из воздуха, но их видовой состав был иной по сравнению с рассадным отсеком.

Интересно, что микрофлора листьев и корней оказалась очень схожа.

Третий этап исследований был проведён на стадии плодоношения. Наиболее значимым отличием микробной обсеменённости теплицы по сравнению с предыдущим этапом исследований было резкое уменьшение грибов *T. harzianum*. Триходерма теперь выделялась исключительно из грунта, в то время как на первых этапах её изолировали практически из всех объектов окружающей среды. Вместе с тем, в теплице стали интенсивнее циркулировать другие виды плесневых грибов – *Cladosporium herbarum*, *Penicillium sp.*, *P. chrysogenum*, *P. janthinellum*, *Purpureocillium lilacinum*. Из бактерий наиболее широко в теплице на данном этапе циркулировали *B. drentensis*, *C. flavigena*, *Microbacterium barkeri*.

На листовых пластинках растений огурца на этом этапе наибольшую встречаемость имели споровый *B. drentensis* и неспоровый вид *M. barkeri*.

В этот период в теплице стало распространяться патологическое разрастание корневой системы растений. На корнях и даже на основании стебля образовывались наросты по типу корневого рака (корончатый галл), которые затрудняли движение воды по сосудам и, как любая опухоль, ослабляли растение. На поздней стадии болезни растения увядали и отмирали. Согласно литературным данным, возбудителем таких патологий

являются бактерии *Agrobacterium tumefaciens* [7], однако исследования не выявили данного возбудителя. В клубеньках была выделена фитопатогенная бактерия *Pectobacterium carotovorum*, которая, возможно, является вторичным патогеном.

Наши исследования показали, что в различные фазы развития растения огурца отмечаются изменения его микробной ассоциации.

Как показали наши исследования, микробные ассоциации растений огурца, культивируемых в условиях защищённого грунта, формируются за счёт микроорганизмов, попадающих на растения из объектов окружающей среды. Причём в каждый период имеются виды, которые наиболее интенсивно циркулируют во всей теплице, массово выделяются из объектов окружающей среды и одновременно доминируют в различных биотопах культивируемых растений. Смена доминантов в окружающей среде приводит и к смене доминантов на поверхности и во внутренних тканях растений.

На микробную ассоциацию растений огурца наибольшее влияние оказывает микрофлора минерального раствора (индекс общности видового состава 20-80%), плёнки пола (20-67%) и элементов системы орошения (25-50%). На первых этапах формирования микрофлоры растений существенное влияние на микрофлору поверхности листовых пластинок оказывает микрофлора рук обслуживающего персонала (индекс общности до 50%). На микрофлору листовых пластинок растений в стадии плодоношения микрофлора рук персонала оказывает уже меньшее влияние (индекс общности 23%).

Большая часть изолированных видов являются широко распространёнными обитателями окружающей среды [8].

Несмотря на повышенный режим стерильности, выделялись и фитопатогенные виды: *C. flaccumfaciens*, *P. carotovorum* а также грибы, способные у людей с ослабленным иммунитетом вызывать различные микозы: *L. corymbifera*, *A. flavus*, *Stachybotrys sp.* [8].

Часть выделенных нами бактерий (*B. subtilis*, *M. barkeri*) судя по литературным данным [9,10] могут влиять на формирование колонизационной резистентности растений к патогенным микроорганизмам.

Выводы

1. В условиях теплиц ОАО Совхоз «Весна» с разных объектов окружающей среды выделялись одни и те же виды микроорганизмов, среди которых в разные периоды доминировали бактерии *A. erytheum*, *B. drentensis*, *B. halodurans*, *B. simplex*, *B. subtilis*, *C. flavigena*, *M. barkeri*, *L. seeligeri*, *S. warneri* и грибы *Penicillium sp.*, *T. harzianum*.

2. В условиях защищённого грунта основными доминантами растений огурца на фазе первого настоящего листа являлись виды *B. subtilis*, *B. halodurans*, *B. simplex*, *B. halodurans*, *L. seeligeri*, *T. harzianum*, на фазе цветения - *A. erytheum*, *B. halodurans*, *L. seeligeri*, *S. warneri*, *T. harzianum*, на фазе плодоношения - *B. drentensis*, *M. barkeri*, *Penicillium sp.*, *T. harzianum*.

3. Внесение в минеральный субстрат перед посадкой семян культуры гриба-антагониста *T. harzianum* эффективно защищало корневую систему и надземную часть растений от плесневых грибов до фазы плодоношения. После этого численность триходермы резко снижалась, и в результате поверхность и внутренние ткани растений заселялись другими видами плесневых грибов, которые ранее с растений не изолировались.

4. Виды микроорганизмов, наиболее активно циркулирующие в помещении теплицы, одновременно являлись доминантами различных биотопов культивируемых там растений огурца. Смена доминантов в окружающей среде приводила к смене доминантов на поверхности и во внутренних тканях растений.

5. На микробную ассоциацию растений огурца наибольшее влияние оказывает микрофлора минерального раствора (индекс общности видового состава 20-80%), плёнки пола (20-67%) и элементов системы орошения (25-50%).

Список использованных источников

1. Баранов, В.Д. Мир культурных растений / В.Д. Баранов, Г.В. Устименко - М: Мысль, 1994. - С. 225.
2. Петерсон, А.М., Чиров, П.А. 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.
3. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта [и др.]. - М.: Мир, 1997. - Т.2. - 368 с.
4. Miller, J., Orson K. Guide to Edible and Inedible Fungi / J. Miller, K. Orson // Pequot Press, Guilford. - 2006.- V. 13, №3. - 592 p.
5. Simmons, E. G. *Alternaria* – an identification manual / E.G. Simmons // CBS Biodiversity Series. - 2007. - V. 3, №2. - 775 p.
6. Глинская, Е.В. Бактериообрастания в системе технического водоснабжения Нововоронежской атомной электростанции / Е.В. Глинская, А.С. Савельева, М.Ю. Воронин // Изв. Саратов. ун-та. Серия: Химия. Биология. Экология. - 2019. - Т. 19, №4. - С. 481-484.
7. Weller, S.A. Acquisition of an Agrobacterium Ri plasmid, and pathogenicity, by other alfa-Proteobacteria in cucumber and tomato crops affected by root mat / S.A. Weller, D.E. Stead, J.P.W. Young // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – V.1, №70. – P. 2779–2785.
8. Кожевин, П.А. Микробные популяции в природе / П.А. Кожевин. - М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989.-175 с.
9. Сидорова, Т.М. Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов / Т.М. Сидорова, А.М. Асатурова, А.И. Хомяк // С.-х. биол. - 2018. – Т.3, №1.- С. 10.
10. Genome Sequence of the Biocontrol Agent *Microbacterium barkeri* Strain 2011-R4 / J. Liu [et al.] // J. Bacteriol. – 2012. – V. 194, №23. – P. 66–67.