

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

АССОЦИАТИВНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ
СОРТА «ЯК 401»

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ
Студентки 4 курса 422 группы
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Вахниной Анастасии Сергеевны

Научный руководитель:
доцент, канд. биол. наук


30.05.23

Е. В. Глинская

Зав. кафедрой:
профессор, доктор биол. наук


30.05.23

С. А. Степанов

Саратов 2023

Введение

Актуальность темы. Зерно ячменя широко используют для продовольственных, технических и кормовых целей. В пищевой промышленности ячменную муку добавляют в хлеб и кондитерские изделия, например, в печенье. Ячмень – самый популярный продукт для приготовления солода, из которого делают солодовый хлеб, виски, квас и пиво. Из ячменя изготавливают перловую и ячневую крупы. В России на кормовые цели используют до 80 % ячменя. Его также используют для изготовления спирта. Зерно ячменя содержит крахмал (50 – 60 %) и белок (11 – 15 %). Важно, что в белке имеются все незаменимые аминокислоты (лизин, метионин, триптофан), большое количество солей железа, калия, кальция, магния, фосфора и кремния [1].

Объём посевных площадей ярового ячменя в Саратовской области составляет 252 тыс. га, а озимого ячменя всего лишь 5 тыс. га [2]. Урожайность ярового ячменя может достигать 70 – 80 ц/га [1]. По данным Росстата за последние годы средняя урожайность ярового ячменя в Саратовской области составляет 14,1 ц/га [3]. Безусловно, продуктивность растения зависит от сортовых особенностей и климатических условий. Однако на урожайность растений также большое влияние оказывают фитопатогенные микроорганизмы.

Различные бактерии, вирусы и грибы вызывают заболевания ячменя. Гниль, ржавчина, головня, плесень, мозаика, а также множество других заболеваний отрицательно сказываются на жизнедеятельности ячменя: вызывают увядание листьев, поражают органы, ухудшают рост и развитие тканей и могут даже привести к гибели растения. Из-за фитопатогенов снижается масса зерна и его качество.

К ассоциативным относят виды микроорганизмов, оказывающие положительное влияние на растения, но колонизирующие только поверхности органов и свободные пространства тканей. Механизмы положительного влияния бактерий на жизнедеятельность растений делят на прямые и

опосредованные. К прямым способам воздействия на растения предлагают относить: ассоциативную азотфиксацию, образование ростстимулирующих веществ, обеспечение легкоусвояемыми формами железа, фосфора и/или поглощение их из почвы и доставку в растения, формирование специфических трофических связей, уменьшение уровня этилена. Непрямые способы – предотвращение или уменьшение роста фитопатогенных микроорганизмов за счет выделения бактерицидных и антифунгальных метаболитов. Одной из важнейших проблем современного растениеводства являются фитопатогены. Большинство сортов сельскохозяйственных культур в среднем реализуют только 20 – 25 % генетического потенциала продуктивности. При обеспечении защиты от возбудителей болезней, вредителей и сорняков они способны формировать значительно больший урожай. Среднемировой уровень потерь вследствие поражения сельскохозяйственных растений фитопатогенными микроорганизмами оценивается в 12 %. Это определяет важность защиты растений как одного из факторов интенсивного растениеводства. Установлено, что в борьбе с возбудителями болезней растений возможно использовать бактерии, обладающие антагонистическим действием по отношению к фитопатогенам [4].

Цель и задачи исследования.

Целью работы являлось изучение ассоциативных микроорганизмов растений ячменя сорта «Як 401», собранных на полях ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Восток» (Аркадакский район, Саратовская область, Россия).

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи.

1. Выявить видовой состав микроорганизмов, изолированных с поверхности побега, внутренней среды и ризосферы растений ярового ячменя сорта «Як 401» в различные фазы развития. Определить индекс встречаемости и количественные показатели выделенных штаммов.
2. Изучить адаптационный потенциал ассоциативных микроорганизмов растений ячменя.

3. Определить факторы фитопатогенности выделенных культур бактерий.
4. Установить антагонистические свойства изолированных бактерий по отношению друг к другу и к фитопатогенным грибам.
5. Исследовать влияние выделенных штаммов на ростовые показатели семян однодольных и двудольных растений.

Материал и методы исследования

Объектом исследования являлись растения ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта «Як 401», собранные на полях ФГБНУ «ФАНЦ Юго – Востока» в селе Росташа, Аркадакский район, Саратовская область. Растения ячменя были отобраны в мае – августе во время фенологических фаз: кущение, выход в трубку, колошение спелость.

Для выделения микроорганизмов с поверхности растений осуществляли посев методом «отпечатка». Для посева микроорганизмов из внутренней среды растений случайным образом отбирали листья, обрабатывали мылом и помещали в 75 %-ный этиловый спирт на 5 минут, затем промывали физиологическим раствором. Навески побегов растирали в ступке с физиологическим раствором, а полученный гомогенизат (по 0,1 мл) вносили на поверхность питательных среда и растирали микробиологическим шпателем. Для бактериологического посева ризосферы использовали метод последовательных разведений. 10 проб прикорневой почвы разводили до показателей 10^{-6} и 10^{-4} . Выделение микроорганизмов осуществляли на таких средах, как ГРМ–агар, КС, PDA.

Для идентификации бактерий были изучены фенотипические признаки: морфологические, культуральные и биохимические. Микробиологические исследования изучались стандартными методами [5–7].

Для изучения способности к расщеплению моно-, олиго- и полисахаридов, а также гликозидов, спиртов, производных глюконовой кислоты использовались среды Гисса и система API 50 CH. Активность амилаз проверяли на среде, содержащей крахмал (рН 6,0) (г/л): крахмал – 2,0; пептон –

0,5; K_2HPO_4 – 0,3; $MgSO_4$ – 0,1; агар – агар – 15,0. Для визуализации зон просветления использовали раствора Люголя. Липолитическую активность устанавливали на средах, содержащих растительные масла. Среда с растительными маслами (г/л): NH_4Cl – 20,0; NH_4NO_3 – 4,0; $Na_2SO_4 \times 10H_2O$ – 8,0; $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 15,7; $KH_2PO_4 \times 3H_2O$ – 5,6; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,4; агар – агар – 10,0; растительное масло – 1,0.

Способность к использованию неорганических источников азота была изучена на синтетических средах для ассимиляции азота минеральных солей, содержащих азот в форме хлорида аммония в первом варианте, а нитрата калия во втором. Использование органического источника азота в виде желатина изучалось на среде МПЖ. Способность расщеплять пептоны с образованием аммиака и сероводорода была изучена на среде МПБ с помощью лакмусовой полоски и бумаги, пропитанной ацетатом свинца, соответственно. Изучение азотфиксации было проведено на безазотистой среде Эшби.

У исследуемых культур изучали устойчивость к физико – химическим факторам при различных температурах (+10 и +50 °С), а также при показателях рН среды (5, 9, 11) и концентрациях $NaCl$ в среде (2, 5, 7, 10 %).

Определение факторов фитопатогенности было изучено на среде с целлюлозой [8]. Состав среды (г/л): порошковая целлюлоза – 2,0; $NaNO_3$ – 2,0; K_2HPO_4 – 1,0; $MgSO_4$ – 0,5; KCl – 0,5; дрожжевой экстракт – 0,1; агар – агар – 17,0. Бактерии культивировали в термостате при температуре 28 °С в течение 7 суток. На 3 и 7 сутки оценивали рост культур.

Для исследования способности к мацерации в качестве тест-объектов использовали редис, морковь, свеклу, капусту, картофель. Клубни картофеля, корнеплоды моркови, редиса и свеклы, листья капусты промывали и высушивали. Затем стерилизовали поверхность 96 % этанолом и нарезали диски растительных тканей, которые помещали в чашки Петри на увлажненные фильтры. На каждый диск наносили суточные культуры исследуемых штаммов бактерий. Чашки помещали в термостат для культивирования на 3 дня при

температуре 28 °С. Наличие или отсутствие мацерации определяли визуально при прикосновении к дискам бактериологической петлём [8].

Антагонизм выделенных бактерий по отношению друг к другу и к фитопатогенным грибам был изучен диско-диффузным методом.

Изучение влияния выделенных микроорганизмов на ростовые показатели однодольных (ячмень) и двудольных (редис) растений проводили путем обработки семян суспензией микроорганизмов.

Структура и объем работы. Работа, изложенная на 65 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Исследование проиллюстрировано 13 рисунками и содержит 15 таблиц. Список использованных источников включает в себя 45 наименований.

Основное содержание работы

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных о зерновых растениях, их биологических и экологических особенностях, фенотипических фазах развития, а также проанализирована урожайность ячменя в Саратовской области. Изложена информация об исследованном сорте ячменя «Як 401». В этом разделе также рассказано об ассоциативных микроорганизмах, обитающих на поверхности побегов, во внутренней среде и ризосфере растений в различных регионах, как на территории России, так и за рубежом.

В главе «Результаты исследования» представлены результаты исследований, в ходе которых из растений ячменя на 4 фенологических фазах развития (кущение, выход в трубку, колошение, спелость) было выделено 9 видов бактерий, отнесенные к 3 родам: *Bacillus*, *Paenibacillus* и *Pantoea*. На поверхности побегов растений ячменя были найдены плесневые грибы: *Alternaria alternata*, *Rhizopus arrhizus* и *Rhizopus niveus*. Рассчитаны индексы встречаемости и количественные показатели культур, изолированных из растений ячменя.

Представлены данные об адаптационном потенциале, выделенных бактерий: способность к расщеплению углеводов, гликозидов, спиртов, растительных масел, органических и неорганических источников азота.

Все выделенные бактерии способны расщеплять глюкозу, D-ксилозу, D-рибозу, мальтозу, калия 2-кетоглюконат, эскулин железа с цитратом. L-ксилозу, D-лактозу и D-маннит могут ферментировать 22 % ассоциантов. 89% изолированных штаммов имеют ферменты для расщепления сахарозы и крахмала. Арабинозу, калия 5-кетоглюконат и D-сорбит способны расщеплять 55, 33 и 44 % ассоциантов, соответственно.

Исследованные бактерии не способны расщеплять D-галактозу, D-ликсозу, D-маннозу, L-рамнозу, L-сорбозу, D-тагатозу, D-фруктозу, D-фукозу, L-фукозу, гентиобиозу, D-мелецитозу, D-мелибиозу, D-раффинозу, D-трегалозу, D-туранозу, D-целлобиозу, амигдалин, арбутин, гликоген, глицерин, дульцитол, инозит, инулин, калия глюконат, ксилит, метил- α D-глюкопиранозид, метил- α D-маннопиранозид, метил- β D-ксилопиранозид, салицин, эритритол, D-адонитол, D-арабит, L-арабит, N-ацетилглюкозамин.

Использовать в качестве источника азота желатин могут 89 % бактерий. Расщеплять пептон способны 44 % бактерий. Азот из соединения хлорида аммония могут получать 88 % ассоциантов, а более труднодоступный источник азота – нитрат калия – 55 %. Способностью к азотфиксации обладают 89 % изолированных микроорганизмов. Расщеплять льняное масло могут 44 % штаммов, а рыжиковое – 11 %. Однако бактерии не способны использовать в качестве источника питания горчичное, оливковое и подсолнечное масла.

Изложена информация об устойчивости бактерий к физико-химическим факторам. 89 % штаммов не адаптированы к низким температурам, 55 % способны расти при температуре 50 °С. В отсутствии кислорода могут существовать 89 % бактерий. При pH 5 могут расти 89 % бактерий. В слабощелочной среде способны существовать большинство бактерий – 89 %.

Однако к рН 11 способны адаптироваться только 11 %. При концентрации NaCl в среде 10 % могут существовать 67 % бактерий.

При изучении факторов фитопатогенности было выяснено, что *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus polymyxa* способны расщеплять целлюлозу. Исследования способности к мацерации показали, что все выделенные культуры оказались способны расщеплять хоть один объект. *B. luciferensis*, *B. mycoides* и *B. subtilis* расщепляли все тест-объекты.

Результаты изучения антагонистической активности по отношению к фитопатогенным грибам показали, что выделенные микроорганизмы наиболее активны к *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbanum*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. 89 % исследуемых бактерий способны подавлять развитие вышеперечисленных плесневых грибов. Антагонистическую активность к *Bipolaris spicifera* и *Penicillium meleagrinum* проявляют по 11 % штаммов. По отношению к *Aspergillus flavus* исследуемые бактерии не проявляли антагонистических свойств. Основным механизмом антагонистической активности изучаемых бактерий является высокая скорость роста. Ассоцианты способны быстро колонизировать субстрат, не давая возможности закрепиться спорам фитопатогенных грибов. Лишь немногие штаммы способны выделять метаболиты, подавляющие активность грибов. 55% бактерий способны выделять антибиотические вещества, направленные на подавление роста *Aspergillus niger*. В отношении других исследуемых грибов данный механизм не наблюдался.

Изучение влияния изолированных бактерий на ростовые показатели семян растений ячменя показало, что 33 % ассоциантов стимулируют рост зародышевого стебля, однако все штаммы угнетают рост корневой системы. Все штаммы подавляют рост стебля и корня семян двудольного растения редиса.

Выводы

1 На растениях ярового ячменя сорта «Як 401», произрастающих на территории Саратовской области, обнаружены представители 3-х родов бактерий (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*) и 2 родов плесневых грибов (*Alternaria*, *Rhizopus*). Индексы встречаемости микроорганизмов на разных фенологических фазах варьировали от 10 до 100 %. Количественные показатели находились в диапазоне $10^2 - 10^7$ КОЕ / г.

2 Из 48 источников углерода (углеводы, гликозиды, спирты, соли глюконовой кислоты) ассоциативные микроорганизмы способны ферментировать только 14. Из 5 исследуемых растительных масел бактерии расщепляли только рыжиковое и льняное. 89 % бактерий способны использовать хлорид аммония и фиксировать молекулярный азот. Ассоцианты способны адаптироваться к температуре до +50 °С, рН среды 5 и 9. При содержании NaCl в среде в концентрации 10 % наблюдается рост 67 % бактерий. Растить в анаэробных условиях способны 89 % штаммов.

3 Ассоциативные микроорганизмы обладают целлюлолитической (22 % штаммов) и мацерирующей (100 % штаммов) активностями.

4 Выделенные из ярового ячменя бактерии проявляют антагонистические свойства по отношению к таким фитопатогенным грибам, как *Aspergillus niger*, *Bipolaris spicifera*, *Cladosporium herbanum*, *Fusarium* sp., *Penicillium meleagrinum*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp.

5 *Bacillus cereus*, *B. mycoides*, *B. subtilis* стимулируют развитие зародышевого стебля растений ячменя. Все бактерии оказывают негативное влияние на рост корневой системы растений ячменя, а также на стебель и корневую систему редьки посевной.

Список использованных источников

1. Перспективная ресурсосберегающая технология производства ярового ячменя / А. В. Алабушев [и др.]. – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2009. – 60 с.

2. Сельхозпортал.рф [Электронный ресурс]: информационная площадка. – URL: <https://сельхозпортал.рф/analiz-posevnyh-ploshhadej/?area=7> (дата обращения: 15.05.2023). – Посевная площадь ярового ячменя в Саратовской области. – Яз. рус.

3. Росстат [Электронный ресурс]: (на 15 мая 2023 года) // Федеральная служба государственной статистики [Электронный ресурс]: [сайт]. – URL: https://rosstat.gov.ru/compendium/document_13277 (дата обращения: 15.05.2023). – Бюллетени о состоянии сельского хозяйства (электронные версии). – Яз. рус.

4. Алексеева, А. С. Антагонистическая активность растительно-бактериальных ассоциантов / А. С. Алексеева, М. Н. Артамонова, Н. И. Потатуркина – Нестерова // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 11, Ч. 5. – С. 929 – 932.

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. Методы исследования в микробиологии: учеб. – метод. пособие / Ж. Г. Шабан [и др.]. – Минск: БГМУ, 2010. – 124 с.

7. Плотников, А. О. Частная микробиология и систематика микроорганизмов: методические указания к лабораторному практикуму / А. О. Плотников. – Оренбург: ГОУ ОГУ, 2007. – 72 с.

8. Малышина, М. С. Выявление факторов фитопатогенности у бактерий-ассоциантов некоторых видов тли в Саратовской области / М. С. Малышина, А. М. Петерсон, С. Ю. Балтаева // *Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология*. – 2013. – Т. 13, Вып. 2. – С. 72 – 79.

Ваша