

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

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АССОЦИАТИВНЫХ БАКТЕРИЙ
РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 242 группы

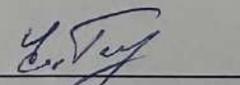
Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Вахниной Анастасии Сергеевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук


19.06.25

Е. В. Глинская

Зав. кафедрой:

профессор, доктор биол. наук


19.06.25

С. А. Степанов

Саратов 2025

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 в среднем за последние 5 лет составляет 260 тыс. га, а озимого ячменя всего лишь 5 тыс. га [2]. Урожайность ярового ячменя может достигать 70 – 80 ц/га [1]. По данным Федеральной службы государственной статистики, 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.

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].

На основе метода колонизации возможно создание экологически безопасных биопрепаратов для стимуляции роста сельскохозяйственных растений и защиты их от болезней [5].

Цель и задачи исследования.

Целью работы являлся анализ видового разнообразия и биологических свойств ассоциативных микроорганизмов растений ячменя, собранных на полях Аркадакского района Саратовской области.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить видовой состав микроорганизмов поверхности побега, внутренней среды и ризосферы растений ярового ячменя сорта «Як 401» в различные фазы развития.
2. Определить сортовые различия видового состава ассоциативных микроорганизмов растений ячменя в фенофазу выход в трубку.
3. Изучить адаптационный потенциал ассоциативных микроорганизмов растений ячменя.
4. Определить факторы патогенности выделенных культур бактерий.

5. Установить антагонистические свойства изолированных бактерий по отношению к фитопатогенным грибам.

Материал и методы исследования

Объектом исследования являлись растения ярового ячменя *Hordeum vulgare* Linnaeus (1753). Растения сорта «Як 401» были собраны на полях Федерального аграрного научного центра Юго-Востока в селе Росташа Аркадакского района Саратовской области в мае – августе 2022 г. во время фенологических фаз: кущение, выход в трубку, колошение, спелость. Образцы растений сорта «Федос» были отобраны в селе Алексеевка Аркадакского района Саратовской области в период выхода в трубку в 2022 г.

Для выделения микроорганизмов с поверхности растений осуществляли посев методом «отпечатка». Для бактериологического посева ризосферы использовали метод последовательных разведений. Пробы прикорневой почвы разводили до показателя 10^{-5} . Почвенную суспензию высевали на ГРМ-агар. Для посева микроорганизмов из внутренней среды обработанные спиртом навески побегов растирали в ступке с физиологическим раствором, а полученный гомогенизат вносили на поверхность питательной среды и растирали микробиологическим шпателем.

Для идентификации бактерий были изучены фенотипические признаки: морфологические, культуральные и биохимические. Данные исследования были проведены по общепринятым методам [6 – 8]. С помощью определителя Берджи, программы ABIS и метода MALDI-TOF MS была установлена видовая принадлежность выделенных микроорганизмов. Плесневые грибы были определены по строению органов спороношения, а также культуральным свойствам.

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. Липолитическую активность устанавливали на среде М9, в которой был вырезан блок, заполненный растительным маслом. Использовали подсолнечное, рыжиковое, льняное, горчичное, оливковое масла.

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 и нитрата калия (нитратный бульон) 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.

Для определения факторов патогенности была изучена гемолитическая активность с использованием колумбийского агара, содержащего дефибринированную кровь. Продуцирование плазмакоагулазы было определено по образованию сгустка в плазме кролика. Лецитиназную активность исследовали на желточном агаре. Расщепление хитина было изучено на синтетической среде, содержащей коллоидный хитин.

Определение факторов фитопатогенности было изучено на среде с целлюлозой [8]. Для исследования способности к мацерации в качестве тест-объектов использовали редис, морковь, свеклу, капусту, картофель. Наличие или отсутствие мацерации определяли визуально при прикосновении к дискам бактериологической петлёй [9].

Антагонистическая активность была определена модифицированным методом перпендикулярных штрихов А. М. Петерсон.

Структура и объем работы. Работа, изложенная на 85 страницах, включает в себя введение, 4 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Исследование проиллюстрировано 11 рисунками

и содержит 21 таблицу. Список использованных источников включает 61 наименование.

Научная новизна. Впервые изучены ассоциативные микроорганизмы растений ячменя, выращиваемые на полях Аркадакского района Саратовской области, сортов «Як 401» и «Федос». Выделено 4 рода бактерий: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Virgibacillus*. Показано влияние сортоспецифичности на видовой состав ассоциантов растений.

Научная значимость. Проведенное комплексное исследование биологических свойств микроорганизмов, ассоциированных с растениями ячменя, открывает перспективы использования изолированных видов бактерий в качестве биологических методов борьбы с фитопатогенными грибами и повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Широкий спектр ферментов позволяет внедрять исследованные штаммы в биотехнологические процессы.

Положения, выносимые на защиту.

1. Микробные ассоциации растений ярового ячменя представлены сапрофитными бактериями.
2. Видовой состав и количественные показатели ассоциативных микроорганизмов ярового ячменя зависят от сорта и фенофазы развития растений.
3. Ассоциативные микроорганизмы способны использовать различные источники углерода и азота, обладают рядом фактором патогенности и проявляют антагонистическую активность по отношению к фитопатогенным грибам.

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 исследованных

сортах ячменя «Як 401» и «Федос». 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. Рассмотрены молекулярно–генетические исследования бактерий, ассоциированных с растениями, методом RAPD–PCR.

В главе «Результаты исследования» представлены результаты работы, в ходе которой из растений ячменя сорта «Як 401» на 4 фенологических фазах развития (кущение, выход в трубку, колошение, спелость) было выделено 8 видов бактерий, отнесенные к 3 родам: *Bacillus* и *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.

Во время фенологической фазы выход в трубку на поверхности, во внутренней среде и ризосфере на растениях ячменя сорта «Федос» было обнаружено 6 видов бактерий, отнесенных к 2 родам: *Bacillus* и *Virgibacillus*, а также 2 вида плесневых грибов *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer*.

Индекс общности видового состава поверхности растений ячменя сортов «Як 401» и «Федос» в фенофазу выход в трубку равен 0 %. Для внутренней среды индекс общности также равен 0 %, однако для ризосферы достигает 17 %.

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. 89% изолированных штаммов имеют ферменты для расщепления сахарозы, крахмала и желатина. Арабинозу, калия 5–кетоглюконат и D–сорбит способны расщеплять 55, 33 и 44 % ассоциантов, соответственно.

Органический белок в виде желатина способны использовать 94% штаммов. Пептон способны расщеплять 44 %, при этом в 19 % это сопровождается выделением сероводорода, а в 31 % - аммиака. Азот из соединения хлорида аммония могут получать 100 % ассоциантов. А более труднодоступный источник азота – нитрат калия – 75 %. Способностью к азотфиксации обладает огромный процент штаммов – 88. Все ассоциативные бактерии способны расщеплять подсолнечное, рыжиковое, льняное, оливковое, горчичное масла, а также твин 80.

Изложена информация об устойчивости бактерий к физико-химическим факторам. 62 % штаммов не адаптированы к температуре 10 °С, 38 % способны расти при температуре 43 °С. В отсутствие кислорода могут существовать 81 % бактерий. При pH=5 могут расти 50 % бактерий, а при pH=10 способны существовать все бактерии. 50 % ассоциантов адаптированы к содержанию NaCl в среде 10%.

При изучении факторов патогенности было выяснено, что 2 штамма осуществляли неполный β-гемолиз, что составляет 12,5% от общего числа бактерий. Плазмакоагулазой и хитиназой не обладал ни один микроорганизм. 75% бактерий расщепляли лецитин. Целлюлаза была обнаружена у 1 штамма. 69% микроорганизмов обладали мацерирующей активностью в отношении того или иного предложенного субстрата. Целлюлолитическая активность и способность к мацерации может служить фактором фитопатогенности [9]. В процессе мацерации бактерии расщепляют клеточную стенку, т. е. используют такие деполимеризующие ферменты, как целлюлаза, гемицеллюлаза, пектиназа [10].

Выделенные микроорганизмы наиболее активны по отношению к *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*. Антагонистическую активность к *A. alternata* и *F. oxysporum* проявляют по 94 % штамма. Подавлять рост *A. niger* способны 81 % штаммов. 75 % ассоциантов

ингибируют жизнедеятельность *A. flavus*. По отношению к *P. citrinum* исследуемые бактерии не проявляли антагонистических свойств.

Грамотрицательная палочка *Pantoea agglomerans* проявляет антагонистическую активность по отношению к 83 % исследуемых плесневых грибов. *Bacillus amyloliquefaciens* D1, *B. amyloliquefaciens* S, *B. luciferensis* D, *B. mycoides* D, *B. pseudomycoides* P, *B. subtilis* R, *Paenibacillus polymyxa* P и *Virgibacillus pantothenicus* D способны подавлять 67 % микроскопических грибов, используемых в работе.

Выводы

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

2. Индексы общности видового состава микроорганизмов, изолированных с поверхности и из внутренней среды растений ячменя сортов «Як 401» и «Федос» во время фенофазы выход в трубку составляют 0 %, индекс общности бактерий, выделенных из ризосферы, равен 17 %.

3. Ассоциативные бактерии способны расщеплять арабинозу, глюкозу, калия-2-кетоглюконат, крахмал, лактозу, мальтозу, маннит, рибозу, сахарозу, сорбит, эскулин железа и цитрат. Микроорганизмы ферментируют горчичное, льняное, оливковое, подсолнечное, рыжиковое масла. 88 % штаммов обладают способностью фиксировать молекулярный азот. 38 % ассоциантов адаптированы к температуре +43 °С. При pH=5 и 10 существуют 50 и 100 % штаммов соответственно. Расти в анаэробных условиях способны 81 % штаммов. При концентрации NaCl в среде 10 % существуют 50 % микроорганизмов.

4. Ассоциативные микроорганизмы обладают целлюлолитической (6 % штаммов), гемолитической (12,5 % штаммов), мацерирующей (69 % штаммов) и лецитиназной (75 % штаммов) активностями. Бактерии не способны расщеплять хитин и свертывать плазму крови.

5. Выделенные из ярового ячменя бактерии проявляют антагонистические свойства по отношению к таким фитопатогенным грибам, как *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*.

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 2025 года) // Федеральная служба государственной статистики [Электронный ресурс]: [сайт]. – URL: <https://rosstat.gov.ru/compendium/document/13277> (дата обращения: 15.05.2025). – 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 Пиголева, С. В. Влияние ассоциативных микроорганизмов на рост и устойчивость растений к ксенобиотикам и фитопатогенам / С. В. Пиголева, Н. С. Захарченко, О. В. Фурс // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56, № 4. – С. 390–400.

6 Петерсон, А. М. Практические рекомендации для идентификации сапрофитных и условно-патогенных бактерий по фенотипическим признакам / А. М. Петерсон, П. А. Чиров. – Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2005. – 24 с.

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

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

9 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.

10 Агабозорги, С. Мацерация тканей клубней картофеля и корнеплодов моркови мутантами бактерий *Erwinia atroseptica* / С. Агабозорги, А. Н. Евтушенков // Вестник БГУ. – 2008. – № 2 (2). С. – 62–64.

Вахит