

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

Микроорганизмы ризосферы

Abelmoschus esculentus

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы

Направления 06.04.01 – Биология

Биологического факультета

Альджозари Мустафы Джасим

Научный руководитель

доцент, кандидат биологических наук _____ О.Ю. Ксенофонтова

Зав.кафедрой

доктор биологических наук, профессор _____ С.А. Степанов

Саратов 2017

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Микроорганизмы, ассоциированные с растениями, в последние годы стали объектами активных исследований. К настоящему времени накоплен большой экспериментальный материал, доказывающий значительную роль ризобактерий в жизнедеятельности многих сельскохозяйственных растений [1 - 4]. Активная секреция клетками корня различных веществ обеспечивает питательными субстратами микроорганизмы, образующие с ним прочные ассоциации как внутри корневых тканей, так и на корневой поверхности (ризоплане), а также в почве, непосредственно окружающей корни (ризосфере) [5 - 13]. В связи с этим в ризосфере и ризоплане в значительных количествах концентрируются бактерии, актиномицеты, грибы, водоросли и нематоды, существенно превышая количество этих организмов в обычной почве [13,-15]. В образуемом эктосимбиозе корневые экссудаты растений являются субстратом и факторами роста некоторых групп микробных сообществ, которые выполняют роль антифитопатогенов, утилизаторов нежелательных продуктов метаболизма растений, регуляторов общей концентрации микроорганизмов в почве, регуляторов подвижности и кругооборота минеральных веществ в агроэкосистеме [7, 9, 11]. Это проявляется в улучшении минерального питания растений. В настоящее время изучен микробиоценоз корневой системы у представителей семейств злаковые и бобовые [10, 16, 17], состав ризосферы и ризопланы других растений, имеющих агропромышленное значение остается неизвестным.

В связи с выше изложенным, **целью** данного исследования явилось сравнительная оценка микробных ассоциаций ризосферы и ризопланы *Abelmoschus esculentus*.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Выделить азотфиксирующие, аммонифицирующие, амилитические, целлюлозоразлагающие бактерии и плесневые грибы из ризосферы и ризопланы *Abelmoschus esculentus*.
2. Изучить биологические признаки выделенных микроорганизмов с целью идентификации.
3. Провести сравнительную оценку и определить частоту встречаемости микроорганизмов доминирующих популяций, выделенных из ризосферы и ризопланы *Abelmoschus esculentus*.
4. Определить антагонистическую активность выделенных штаммов ризосферных бактерий в отношении фитопатогенных грибов.

Положения, выносимые на защиту

1. В почве ризосферы *Abelmoschus esculentus* содержится больше микроорганизмов, чем в ризоплане. Доминирующими видами являются штаммы родов *Bacillus sp.*, *Brochotrix sp.*, *Erwinia sp.*, *Caryophanon sp.*, *Kurthia sp.* и *Pseudomonas sp.*
2. Численность плесневых грибов в ризосфере *Abelmoschus esculentus* превосходит таковую в ризоплане и представлена родами *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.* и *Aspergillus sp.*
3. Ризосферные штаммы рода *Bacillus* проявляют фунгистатическое действие по отношению к *Aspergillus sp.* и *Fusarium sp.*

Научная новизна

Впервые проведено сравнительное изучение количественного состава микробоценоза ризосферы и ризопланы *Abelmoschus esculentus*. Впервые изучен качественный состав микробного сообщества ризосферы и ризопланы. Получен ризосферный штамм рода *Bacillus*, проявляющий фунгистатическую активность в отношении *Aspergillus sp.* и *Fusarium sp.*

Апробация работы

Материалы данного исследования доложены на X Международной научно-практической конференции «WORLD SCIENCE: PROBLEMS AND INNOVATIONS», состоявшейся 30 мая 2017 г. в г. Пенза.

По данной работе имеется публикация:

Ксенофонтова О.Ю., Альджозари М.Д., Храмова Д.Д. Сравнительная оценка микроорганизмов ризосферы и ризопланы *Abelmoschus esculentus* // Сборник статей победителей X Международной научно-практической конференции "World science problems and innovations» в 3 ч., 30 мая 2017 г. Издательство: "Наука и Просвещение" (Пенза) С. 39-42.

Материал исследований

Объектом исследования явились:

1) Корни однолетнего травянистого растения *Abelmoschus esculentus*, которое относят к овощным культурам (рисунок 1). Родина этого овоща – Африка. В России бамию удается выращивать в теплых регионах, преимущественно в Краснодарском крае. Другие названия этого растения: дамские пальчики, окра, абельмош, гомбо.



Рисунок 1 – Цветки и плоды растения *Abelmoschus esculentus*

2) Микроорганизмы почвы, выделенные из ризосферы и ризопланы *Abelmoschus esculentus*.

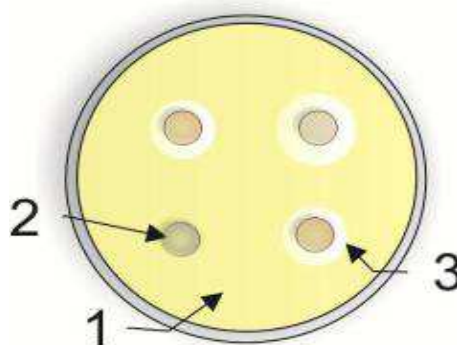
Для выделения микроорганизмов ризосферы и ризопланы использовали метод последовательных отмываний корней по Теппер [79,80]. Из почвенных монолитов с растениями стерильным пинцетом и ножницами отобрали 1,0 г молодых корней (примерно одного диаметра) с приставшими к ним частицами почвы. Корни помещали в колбу со 100,0 мл стерильной водопроводной воды и взбалтывали в течение 2,0 мин. Стерильным крючком или пинцетом корни извлекали из колбы и переносили последовательно во вторую, третью, четвертую, пятую, шестую и седьмую колбы, также содержащие по 100,0 мл стерильной водопроводной воды. В каждой колбе корни отмывали по 2 мин. В последней (седьмой) колбе в воду перед стерилизацией добавляли 5,0-7,0 г песка. Из каждой колбы отдельно стерильной пипеткой брали по капле суспензии и делали посев на поверхность питательной среды на чашки Петри.

Для определения количественного состава аммонификаторов использовали ГРМ-агар, для амилотических бактерий – крахмало-аммиачный агар, для азотфиксирующих бактерий – среду Эшби, для целлюлозоразлагающих бактерий – среду Гетчинсона, для плесневых грибов – среду Сабуро. Посевы инкубировали при температуре 28°C в течение 48 - 56 ч. [81].

Частоту встречаемости отдельных штаммов рассчитывали как отношение количества проб, содержащих исследуемый штамм, к общему количеству проб с наличием роста [82].

Определение антагонистической активности проводили методом агаровых блоков. Метод агаровых блоков удобен тем, что выращивание штаммов-антагонистов и тест-культур производится на разных питательных средах. Изучаемый на антагонистическую активность микроорганизм засеивали на поверхность агаризованной среды в чашке Петри таким образом, чтобы в процессе его роста сформировался «сплошной газон». В нашем

случае - тестовым организмов выступали плесневые грибы. После того, как клетки микроорганизма хорошо выросли, стерильным пробочным сверлом (или пробиркой) вырезали агаровые блоки, которые переносили на предварительно засеянную тест-культурой поверхность среды в другой чашке Петри. Тест-культуру засеивали шпателем, а агаровые блоки накладывали ростом вверх на равном расстоянии один от другого и от краев чашки, плотно прижимали к агаровой пластинке. На одной чашке Петри можно разместить 4 – 5 агаровых блоков с различными продуцентами антибиотических веществ (рисунок 2).



1 – тест культура, 2- агаровый блок, 3 – зона задержки роста
тест-культуры

Рисунок 2- Определение антагонистической активности методом
агаровых блоков

Чашки инкубировали в термостате при температуре, оптимальной для роста тест-культуры. В случае чувствительности последних к антибактериальному веществу продуцента вокруг агаровых блоков должны образовываться зоны отсутствия роста. Чем больше выделяется антибактериального вещества, чем оно активнее и лучше диффундирует в среду, тем больше диаметр зоны задержки роста тест-культуры. Нечувствительные к антибиотическому веществу данного продуцента клетки растут на всей поверхности среды.

Идентификацию микроорганизмов осуществляли на основе изучения морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических

свойств выделенных микроорганизмов. В процессе идентификации у неферментирующих бактерий определяли подвижность, наличие оксидазы, окисление глюкозы, желатина, мочевины, лизиндекарбоксилазы, лактозы, чувствительность к пенициллину, образованию индола и сероводорода, рост на среде Симмонса. Для идентификации бацилл определяли подвижность, наличие спор, наличие каталазы, маннита, крахмала, мочевины, способность к гемолизу и реакцию Фогес-Проскауэра. Для идентификации пользовались определителями Берджи и Саттона [82,83].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием пакетов прикладных программ «Statistica 8.0 for Windows». Количественные показатели в работе представлены в виде « $M \pm m$ », где « M » – среднеарифметическое значение, а « m » – стандартная ошибка среднего значения. Оценку различий между выборками проводили с использованием t -критерия Стьюдента. Критический уровень значимости был принят $p \leq 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Выделение микроорганизмов ризосферы и ризопланы *Abelmoschus esculentus*

Проведенные исследования показали, что в состав микробиоценоза корней абельмоша входили аммонифицирующие, амилолитические, азотфиксирующие бактерии и плесневые грибы (таблица 1). Целлюлозоразрушающие бактерии не были выделены.

В результате проведенных экспериментов нами определен количественный состав микроорганизмов различных физиологических групп в ризосфере и ризоплане *Abelmoschus esculentus* и идентифицированы представители доминантных популяций.

Сравнительное исследование состава микроорганизмов ризосферы и ризопланы показало, что количественные показатели аммонифицирующих и амилолитических бактерий в ризоплане были выше, чем таковые в

ризосфере. В ризосфере преобладали азотфиксирующие бактерии и плесневые грибы. Целлюлозоразлагающие бактерии выделены не были.

Таблица 1 - Численность микроорганизмов ризосферы и ризопланы *Abelmoschus esculentus* (*P≤0,05)

Физиологическая группа микроорганизмов	Численность микроорганизмов в ризосфере, КОЕ/г (M±m)	Численность микроорганизмов в ризоплане, КОЕ/г (M±m)
Аммонифицирующие бактерии	$4,0^{*} \pm 0,2 \times 10^8$	$6,7^{*} \pm 0,3 \times 10^8$
Азотфиксирующие бактерии	$3,8 \pm 0,1 \times 10^4$	$1,8 \pm 0,3 \times 10^4$
Плесневые грибы	$9,6^{*} \pm 0,7 \times 10^3$	$5,6^{*} \pm 0,2 \times 10^3$
Амилолитические бактерии	$2,7 \pm 0,2 \times 10^3$	$6,7 \pm 0,2 \times 10^3$

Такое повышенное содержание микроорганизмов связано с выделением на поверхности корней аминокислот и углеводов (сахаров, крахмала), которые являются субстратами для данных микроорганизмов. Это еще раз подтверждает известный факт о ризосферном эффекте.

Идентификация доминантных штаммов микроорганизмов позволила определить частоту встречаемости отдельных представителей в ризоплане и ризосфере растения *Abelmoschus esculentus*.

Частота встречаемости отдельных штаммов в ризосфере и ризоплане *Abelmoschus esculentus*

Для определения качественного состава микроорганизмов ризосферы и ризопланы были выделены доминантные штаммы бактерий и грибов и идентифицированы до рода.

В результате сравнительного изучения микробиоценоза корней установлено, что качественный состав доминантных популяций микроорганизмов ризосферы и ризопланы одинаков, но имеются небольшие различия микробного населения (таблица 2).

Таблица 2 - Частота встречаемости доминирующих видов микроорганизмов в ризосфере и ризоплане *Abelmoschus esculentus*

Виды микроорганизмов	В ризосфере, %	В ризоплане, %
<i>Azotobacter niger</i>	68	56
<i>Clostridium pasteurianum</i>	49	25
<i>Bacillus sp Rs4</i>	72	48
<i>Brochotrix sp.</i>	64	36
<i>Erwinia sp.</i>	59	72
<i>Caryophanon sp.</i>	46	38
<i>Kurthia sp.</i>	40	27
<i>Pseudomonas sp.</i>	57	65
<i>Enterobacter sp.</i>	42	58
<i>Saccharococcus sp.</i>	59	79
<i>Azomonas sp.</i>	47	26
<i>Micrococcus sp.</i>	26	54
<i>Leuconostoc sp.</i>	43	89
<i>Acinetobacter sp.</i>	52	68
<i>Alcaligenes sp.</i>	37	74
<i>Penicillium sp.</i>	35	58
<i>Fusarium sp.</i>	40	35
<i>Aspergillus sp.</i>	50	39
<i>Trichoderma sp.</i>	43	24

Такие микроорганизмы как *Azotobacter niger*, *Clostridium pasteurianum*, *Bacillus sp.Rs4*, *Brochotrix sp.*, *Caryophanon sp.*, *Kurthia sp.*, *Azomonas sp.*, *Fusarium sp.* и *Aspergillus sp.* в пробах, полученных из ризосферы встречались чаще, чем в ризоплане. В ризоплане, наоборот чаще встречались грамотрицательные бактерии. В ходе исследования количественного состава микроорганизмов ризосферы было отмечено большое разнообразие плесневых грибов (рисунок 2).

Микрофлора ризосферной почвы растений с одной стороны выполняет важные экологические функции деструктора органических соединений, а с другой – является антагонистом для патогенных организмов, обеспечивая естественный барьер.



Рисунок 2- Фотографии плесневых грибов ризосферы *Abelmoschus esculentus*, выделенных на среде Сабуро

Анализируя полученные результаты, было отмечено, что среди ризосферных микроорганизмов встречаются штаммы, способные стимулировать рост растений [19,38]. Ассоциативные микроорганизмы, выделяющие в процессе роста антибиотические гетерогенные низкомолекулярные вещества, способны при низких концентрациях подавлять активность других микроорганизмов и тем самым влиять на жизнедеятельность растений. Учеными установлено, что в борьбе с

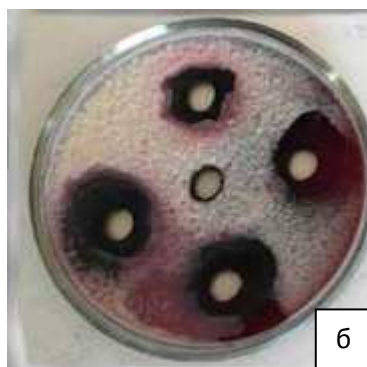
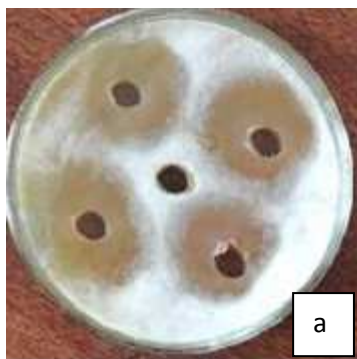
возбудителями болезней растений используют бактерии, обладающие антагонистическим действием по отношению к фитопатогенам [57, 83]. В связи с выше изложенным, нам было интересно посмотреть антагонистическую активность выделенных штаммов по отношению к фитопатогенным грибам.

Определение антагонистической активности методом агаровых блоков

Доказано, что многие ризосферные бактерии, наряду со стимуляцией роста растений, оказывают антагонистическое действие на фитопатогены [57, 58]. Поэтому на следующем этапе нашей работы нами была изучена антагонистическая активность доминантных штаммов бактерий по отношению к фитопатогенным грибам выделенные из ризосферы и ризопланы *Abelmoschus esculentus*.

В качестве тест организмов были выбраны 2 штамма плесневых грибов *Fusarium sp.*, и *Aspergillus sp.* На каждую чашку с тест организмом наносили по 5 блоков с ризосферными бактериями. Степень антагонистической активности бактерий учитывали по величине зоны фунгистатического или фунгицидного действия (рисунок 3).

Исследуя полученные данные, наиболее эффективное антагонистическое действие проявил штамм рода *Bacillus*.



а - тест организм *Aspergillus sp.*, б - тест организм *Fusarium sp.*

Рисунок 3 – Определение антагонистической активности бактерий к плесневым грибам методом агаровых блоков

Таким образом, установлено, что выделенные изоляты бактерий рода *Bacillus* проявляют фунгистатическое действие по отношению к *Aspergillus sp.* и *Fusarium sp.* Данный штамм может быть рекомендован для дополнительного внесения в почву возделывания *Abelmoschus esculentus* как альтернатива химическим средствам защиты растений, к которым наблюдается резистентность фитопатогенов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом перпендикулярных штрихов определены антагонистические взаимоотношения между штаммами *Amphibacillus xylanus* и *Jonesia denitrificans* 151, которое проявлялось в ингибировании роста жонезий. В связи с этим для создания биопрепарата были отобраны штаммы *Amphibacillus xylanus* 152, *A. xylanus* 165, *Pseudomonas putida* П2, *P. putida* П6.

Сравнительная оценка роста культур на различных питательных средах (МПБ, глюкозо-пептонная среда (среда Голубева) и среда М9 с 1 % глюкозы в качестве источника углерода) определила время выхода культур в стационарную фазу. При росте на среде ГРМ-бульоне у штаммов *Pseudomonas* и *Amphibacillus* наибольший титр клеток (10^8) отмечен на 10-12 часу культивирования, на глюкозо-пептонной среде через 12 часов культивирования максимальная численность составила 10^7 кл/мл. Рост культур в среде М9 с 1% глюкозы пик максимальной численности отмечен на 24-26 часу культивирования и достигал значений $10^7 - 10^8$ кл/мл.

Таким образом, выход концентрата препарата с численностью клеток в $4,6 \pm 0,2 \times 10^9$ в мл составил 60 мл за 24 часа ферментации. Для приготовления рабочего раствора данного биопрепарата из концентрата необходимо разбавлять в 100 раз для получения раствора с рекомендуемой для ремедиации земель концентрацией клеток деструкторов, равной $4,6 \pm 0,2 \times 10^7$

в 1 мл. Полученный объем биопрепарата составит 6 л, что достаточно для обработки 60 кг земли.

ВЫВОДЫ

1. В почве ризосферы и ризопланы *Abelmoschus esculentus* доминируют аммонифицирующие микроорганизмы, численность которых составила $4,0 \pm 0,2 \times 10^8$ КОЕ/г и $6,7 \pm 0,3 \times 10^8$ КОЕ/г соответственно. Среди аммонифицирующих бактерий доминируют бактерии родов *Bacillus sp.*, *Brochotrix sp.*, *Erwinia sp.*, *Caryophanon sp.*, *Kurthia sp.* и *Pseudomonas sp.*
2. Амилолитические бактерии в ризоплане содержатся в большем количестве, чем в ризосфере и представлены родами *Saccharococcus*, *Azomonas*, *Micrococcus* и *Leuconostoc*.
3. Азотфиксирующие микроорганизмы ризосферы *Abelmoschus esculentus* в 2 раза превышают содержание таковых в ризоплане и представлены бактериями родов *Azotobacter*, *Azomonas* и *Clostridium pasteurianum*.
4. Численность плесневых грибов в ризосфере *Abelmoschus esculentus* составила $5,6 \pm 0,2 \times 10^3$ КОЕ/г. Доминирующее положение занимают виды родов *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.* и *Aspergillus sp.*
5. Выделенные изоляты бактерий рода *Bacillus* проявляют фунгистатическое действие по отношению к *Aspergillus sp.* и *Fusarium sp.*