

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФГБОУ ВО «КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ И ЗЕМЛЕПОЛЬЗОВАНИЯ

Кафедра Общего земледелия,
защиты растений и селекции

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
(МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ)**

по направлению – 35.04.04 «Агрономия»

на тему:

**«РАЗРАБОТКА ПЕРСПЕКТИВНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ
ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ
МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ НА ОСНОВЕ ЭНДОФИТНЫХ
БАКТЕРИЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР»**

Исполнитель: студентка группы М121-01
Малышкина Полина Андреевна

Научный руководитель:
Зав. кафедрой, доктор с.-х. наук,
Член-корр. АН РТ, профессор



Сафин Р.И.

Работа допущена к защите
Зав. кафедрой, доктор с.-х. наук,
Член-корр. АН РТ, профессор



Сафин Р.И.

Казань – 2024 г

ФГБОУ ВО «КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

ЗАДАНИЕ ПО ПОДГОТОВКЕ
МАГИСТЕРСКОЙ ДИССЕРТАЦИИ

(Направление подготовки 35.04.04 Агрономия)

1. Фамилия, имя и отчество магистра: Малышкина Полина Андреевна
2. Тема диссертации: «Разработка перспективных биопрепаратов для повышения эффективности применения минеральных удобрений на основе эндофитных бактерий сельскохозяйственных культур» (утверждена приказом по КазГАУ № _____ от «__» _____ 20__ г.)
3. Срок сдачи магистром завершённой работы: _____
4. Перечень подлежащих разработке вопросов (краткое содержание отдельных глав) и календарные сроки их выполнения:

1. Изучение научной литературы по теме исследований (март-май 2023 г)

2. Проведение полевых опытов, анализов и наблюдений в Агробиотехнопарке КГАУ (май – сентябрь 2023 г.)

3. Обработка полученных экспериментальных данных полевых опытов и лабораторных исследований (октябрь 2023 – февраль 2024)

4. Подготовка и оформление выпускной квалификационной работы (февраль 2024 – май 2024 г.)

5. Подготовка доклада по выпускной квалификационной работе (май – июнь 2024 г)

5. Дата выдачи задания: 15.02.2024

Утверждаю:

Зав. кафедрой: _____ (Сафин Р.И.)
(дата, подпись)

Научный руководитель: _____ (Сафин Р.И.)
(дата, подпись)

Задание принял к исполнению: _____ (Малышкина П.А.)
(дата, подпись студента)

АННОТАЦИЯ

Выпускная квалификационная работа состоит из введения, 3 глав, выводов и рекомендаций производству, списка литературы и включает 24 рисунка и 26 таблиц.

В главе 1 изложен обзор научной литературы по эндофитным микроорганизмам, рассмотрены их виды и особенности, а также свойства организмов.

В главе 2 представлены условия и методики проведения научных исследований выпускной квалификационной работы магистра.

В главе 3 описаны результаты проведения исследований по лабораторным и полевым опытам, а также оценка экономической эффективности применения штаммов эндофитных микроорганизмов.

В заключении даются предварительные выводы и рекомендации производству.

ANNOTATION

The final qualifying work consists of an introduction, 3 chapters, conclusions and recommendations for production, a list of references and includes 24 figures and 26 tables.

Chapter 1 provides a review of the scientific literature on endophytic microorganisms, examining their types and characteristics, as well as the properties of the organisms.

Chapter 2 presents the conditions and methods for conducting scientific research of the master's final qualifying work.

Chapter 3 describes the results of research in laboratory and field experiments, as well as an assessment of the cost-effectiveness of using strains of endophytic microorganisms.

In conclusion, preliminary conclusions and recommendations for production are given.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
I. Обзор научной литературы	6
1.1. Эндوفитные микроорганизмы как биоагенты.....	6
1.2. Виды эндوفитных микроорганизмов.....	10
1.3. Свойства эндوفитных микроорганизмов.....	15
1.4. Применение эндوفитных микроорганизмов.....	17
II. Условия и методы проведения научных исследований	21
2.1. Методика выделения эндوفитных бактерий из семян.....	21
2.2. Методика выделения эндوفитных бактерий из корней.....	21
2.3. Методика определения КОЕ различных штаммов микроорганизмов в семенах сельскохозяйственных культур.....	22
2.4. Методика окрашивания по Граму.....	22
III. Результаты исследований	24
3.1. Выделение рабочей коллекции штаммов.....	24
3.1.1. Отбор семян ячменя и пшеницы различных сортов.....	24
3.1.2. Выделение эндوفитных микроорганизмов из семян и растений сельскохозяйственных культур.....	24
3.1.3. Определение КОЕ различных штаммов микроорганизмов в семенах сельскохозяйственных культур.....	25
3.1.4. Выявление наличия антагонизма к фитопатогенным грибам у выделенных из семян микроорганизмов.....	25
3.1.5. Выделение микроорганизмов из корней сельскохозяйственных культур, определение их КОЕ.....	26
3.1.6. Выявление наличия антагонизма к фитопатогенным грибам у выделенных из корней микроорганизмов.....	26
3.2. Изучение биохимических и ростостимулирующих свойств штаммов.....	26
3.2.1. Оценка полученных штаммов методом окрашивания по Граму....	26
3.2.2. Оценка биологической активности штаммов бактериальных микроорганизмов.....	27
3.2.3. Анализ зараженности и биометрических данных обработанных штаммами семян рулонным методом.....	28
3.3. Отбор штаммов эндوفитных бактерий для дальнейшей работы....	31
3.4. Изучение устойчивости штаммов к стресс факторам.....	31
3.4.1. Оценка устойчивости штаммов эндوفитных бактерий к разным температурным режимам.....	31
3.4.2. Оценка устойчивости штаммов к солевым растворам NaCl разной концентрации.....	34
3.4.3. Оценка устойчивости штаммов к солевым растворам удобрения разной концентрации.....	36
3.5. Изучение влияния штаммов в вегетационных опытах.....	38

3.5.1.	Оценка влияния экспериментальных штаммов эндофитных бактерий на рост и развитие пшеницы яровой сорта «Ульяновская-105» при опрыскивании в вегетационных опытах	38
3.5.2.	Оценка влияния экспериментальных штаммов эндофитных бактерий на рост и развитие ярового ячменя сорта «Раушан» при опрыскивании в вегетационных опытах.....	41
3.5.3.	Оценка влияния экспериментальных штаммов эндофитных бактерий на рост и развитие гороха сорта «Салават» при опрыскивании в вегетационных опытах.....	44
3.6.	Исследование по оценке эффективности применения удобрений с микроорганизмами в полевых опытах.....	46
3.6.1.	Данные фактической урожайности ярового ячменя сорта «Раушан» с применением удобрений микроорганизмов.....	46
3.6.2.	Данные по фактической урожайности картофеля сорта «Ред Скарлет» с применением удобрений микроорганизмов.....	46
3.7	Экономическая эффективность применения удобрений микроорганизмов	47
3.7.1	Экономическая эффективность применения удобрений микроорганизмов на ячмене яровом сорта «Раушан»	47
3.7.2	Экономическая эффективность применения удобрений микроорганизмов на картофеле сорта «Ред Скарлет»	48
IV	Заключение	49
4.1	Выводы	49
4.2	Рекомендации производству	49
	Список использованной литературы.....	50
	Приложения	56

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы: за последние года ученые, которые занимаются научными исследованиями касаясь микроорганизмов, населяющих живые растения, выяснили, что они могут использоваться как естественные защитники-антагонисты против различных вредителей и заболеваний культурных растений. Взаимодействия, которые связывают растения-хозяина и микроорганизм обычно непростые. Чтобы микроорганизмы могли контролировать своего растения-хозяина они могут вызывать антибиоз, конкуренцию, индукцию устойчивости хозяина и хищничество. Также неоднократные исследования штаммов бактериальных и грибковых изолятов на антагонистические способности показывали нам, что от 1% до 10% штаммов могут замедлять и даже подавлять рост фитопатогенов. Тем самым уже исследованы очень многие микроорганизмы и проведены очень интенсивные исследования, которые показали нам что существует очень много потенциальных кандидатов на производство биопрепаратов и дальнейших коммерческих продаж. Обычно данные кандидаты оказывались бактериями рода *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Streptomyces*, или грибами, принадлежащими к родам *Ampelomyces*, *Candida*, *Coniothyrium* и Триходерма.

Цель выполнения работы – разработать перспективные биопрепараты для повышения эффективности применения минеральных удобрений на основе эндофитных бактерий сельскохозяйственных культур.

В ходе выполнения научной работы были решены следующие **задачи:**

- Выделение не менее 15 штаммов из 3 культур;
- Отбор не менее 3-х перспективных штаммов для дальнейших исследований;
- Изучение свойств (культуральные, биохимические, антагонистические) отобранных штаммов;
- Идентификация штаммов с использованием молекулярно-генетических методов (ПЦР, секвенирование)

- Оценка устойчивости штаммов к действию стрессовых факторов (свет, температура, ионы и др.).

- Оценка ростостимулирующей и антистрессовой активности штаммов и их консорциумов в вегетационных опытах (песчаная, почвенная культура) при опрыскивании растений.

Объем работы. Научная работа написана на 62 страницах компьютерного текста, состоит из введения, 4 глав, выводов, рекомендаций производству и включает 26 таблиц, 24 рисунка, и приложения. Список литературы состоит из 49 наименований, в том числе 30 иностранных авторов.

I ОБЗОР НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эндوفитные микроорганизмы как биоагенты

Среди потенциальных биоагентов особое место занимают эндوفитные микроорганизмы, обитающие в тканях растений. Способность активного колонизирования внутренних тканей хозяина сделала этих эндوفитных микроорганизмов очень ценными для аграриев, в том числе и в качестве инструментов повышения урожайности, продуктивности сельскохозяйственных культур и качества получаемого зерна. Микроорганизмы применяют эндосферу растений как исключительную экологическую нишу, которая снабжает вкуче с непрерывным получением питательных веществ довольно эффективную защиту от влияния внешних экологических аспектов. При этом ряд эндوفитных бактерий часть своего периода развития проходят не только в растениях, но и в почве [29]. Именно поэтому сейчас можно начать постепенно сменять химические и синтетические пестициды на эндوفитные микроорганизмы [25].

Эндوفитными микроорганизмами называются такие микроорганизмы, которые способны заселить внутренние ткани растения и его органы, не нанося никаких повреждений, не вызывая заболеваний и в принципе, не проявляя никакого негативного воздействия на развитие растения [4,5]. Доказано, что эндوفиты как правило распространяются через корневую систему растения и проявляются в дальнейшем в межклеточном пространстве. Очень интересно подметить, что на сегодняшний день на нашей обитаемой планете существует огромное количество растений, которые являются «домом» для эндوفитных бактерий одного или нескольких разных видов [6]. Но при этом очень мало растений на сегодняшний день изучено и продолжает изучаться на наличие и содержание именно в них эндوفитных микроорганизмов [12].

Эндوفитов можно встретить практически в каждом растительном живом объекте на Земле. Взаимовыгодные мутуалистические отношения эндوفитов с растениями – хозяинами носят часто возникающий характер, так

как многие из эндофитов имеют в себе антагонистические возможности по отношению к патогенам растений и могут обеспечить надежную защиту для своего растения – хозяина от инфекционных заболеваний и различных биотических и абиотических стрессов.

Так как эндофиты способны свободно колонизировать внутренние части растения – хозяина это сделало их весьма ценными и полезными для сельского хозяйства и систем растениеводства и АПК в целом. Они могут стать хорошим инструментом для повышения урожайности и продуктивности растений. В современной сельскохозяйственной науке эндофитные бактерии, которые находятся в растении и спокойно существуют совместно на протяжении всей своей жизни, является относительно малоизученной и нераскрытой темой в современной сельскохозяйственной науке, хотя они могли бы быть потенциальными источниками для производства новых биоагентов в растениеводстве. Например, многие современные хозяйства и АПК, работающие по системе органического земледелия, начинают активное внедрение в свое производство эндофитных микроорганизмов в целях защиты своих культур от болезней и оптимизации минерального питания. Поэтому по результатам вышесказанного, поиск и изучение с дальнейшим секвенированием для идентификации штаммов эндофитов или их продуктов жизнедеятельности для того, чтобы в дальнейшем использовать их в качестве контроля и защиты растений от стрессов становится все более и более популярным занятием среди ученых Российской Федерации и всего мира в целом. Для примера наиболее популярного и самого удачного внедрения штаммов эндофитных биоагентов можно привести пример биопрепарата «Фитоспорин-М» (рис.1). Фитоспорин оказывает свое положительное действие благодаря тому, что состоит из бактерии *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 128 (26Д). Уже сегодня «Фитоспорин» активно используется на различных сельскохозяйственных культурах.



Рис. 1 – Фитоспорин М

В том, что одни из самых высоких по ценности эндофитов составляют именно эндофиты семян указывают многие исследования. Именно поэтому процессы выделения эндофитных биоагентов, их исследование и установление видовой идентификации имеет важное значение при проведении данных работ и дальнейшем создании, и производстве препаратов для биологической защиты растений от болезней и стрессовых факторов.

На высокую ценность эндофитов семян с точки зрения поиска перспективных биоагентов указывают многие исследователи. Именно поэтому выделение эндофитных микроорганизмов и оценка их активности имеет важное значение при создании биологических препаратов для защиты сельскохозяйственных культур от различных видов стрессовых факторов.

В природе без помощи и вмешательства человека эндофитные микроорганизмы живут совместно с их хозяевами в тесных отношениях. Данные микроорганизмы помогают увеличивать урожай, фиторемедиацировать почву. Также бактерии – эндофиты принимают активное участие в иммунных реакциях растения, могут фиксировать атмосферный азот и производить БАДы. Кроме всего, оказалось, что эндофиты обладают еще и многими другими качествами: регулируют осмос, работу устьиц. В литературных источниках указано, что они также принимают активное участие в дополнительной модификации развития корневой системы растений [9,10]. Науке известно, что определенные из этих бактерий

имеют свойство передаваться вертикально от родителей, то есть появляется возможность получить дополнительный набор генов для своего хозяина при семенном размножении [29]. В нескольких проводимых исследованиях уже была показана высокая эффективность эндофитов именно из семян в качестве основного компонента в биопрепарате. [30,31]. Однако все равно остается сравнительно мало информации об их экологическом значении для растений [32]. На сегодняшний день уже показана высокая значимость бактериальных эндофитов семян при освоении растениями новых территорий с засушливыми условиями [33, 34]. Значительное количество работ и научных публикаций уже продемонстрировали насколько важную роль играют эндофиты семян в защите растений от фитопатогенов [35, 36]. По результатам исследований *Bacillus spp.* производят в процессе своей жизнедеятельности противогрибковые липопептиды, включая итурины, фенгицины, сурфактины и бацилломицин [37,38]. Несмотря на это эндофиты в свою очередь наиболее сильное влияние оказывают именно на проростки растения, помогая им в росте и адаптации растений к первичным стрессам. Установлено, что такой эффект сохраняется и в дальнейшем при росте на более поздних стадиях. Исследовано, что эндофиты способны ускорять процессы прорастания [39] и роста растений путем производства ауксина, этилена, мобилизации различных питательных веществ (N, P, K и др.) и синтеза сидерофоров [40]. Эндофитные бактерии данного типа имеют воздействие на семена, на их жизнеспособность и всхожесть с выживаемостью проростков в целом. Вообще, эндофиты именно из семян обладают большей важностью для АПК, поскольку имеют отличительные от других микробных биоагентов устойчивость, конкурентоспособность, эффективность и вертикальную передачу [41]. К сожалению, на сегодняшний день в литературе очень мало материалов по изучению сортовых качеств и особенностей культурных растений на получение и развитие бактерий – эндофитов. Когда аграрии начнут активно использовать взаимодействия эндофит-растение, это поможет АПК улучшить развитие сельскохозяйственных культур, а также снизить затратность

производства пищевой и технической сельскохозяйственной продукции. Понимание сути работ механизмов, которые заставляют эндофитов взаимодействовать с растениями и оказывать на них положительное влияние позволит аграриям более полно использовать биологический потенциал этих микроорганизмов.

Среди прочих эндофитных бактерий эндофиты бобовых культур выделяются способностью образовывать клубеньки на корнях(рис.2) и стеблях растения-хозяина. Раньше данную группу бактерий называли «ризобии», но сейчас это считается устаревшим названием для данной группы бактерий.

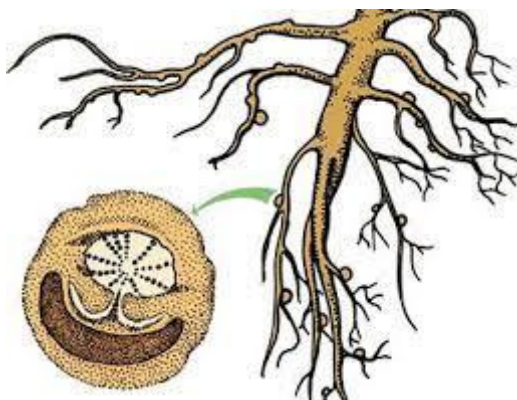


Рис. 2 – Клубеньковые бактерии на корнях.

Сегодня данному термину пришла замена в виде названия «клубеньковые бактерии» и используется оно очень широко. Замена данного термина объясняется тем, что в клубеньках помимо ризобий существует много других эндофитов, которые не участвуют в образовании клубеньков, а лишь заселяют их [13]. Основная доля бактериальных эндофитов клубеньковых корней, как показывают исследования, обладают эффектом стимуляции роста растений [13,14].

Открываются большие перспективы по поиску, выделению и изучению новых видов эндофитных бактерий, положительно влияющих на развитие растений, с целью создания новых микробиологических препаратов для адаптивного растениеводства [7].

1.2 Виды эндофитных микроорганизмов

Самые популярные бактерии из эндофитов – это представители известных всем почвонасеяющих бактерий из родов *Pseudomonas*, *Burkholderia* (рис.3) и *Bacillus*. Известно, что бактерии данных родов служат продуцентами вторичных бактериальных метаболитов (антибиотиков, антираковых веществ, летучих органических соединений, фунгицидных, инсектицидных и иммунодепрессивных веществ). Тем не менее, эндофитные бактерии до сих пор недостаточно используются в качестве источников биологически активных веществ в крупных агрохолдингах или хозяйствах, которые преследуют органическое или ресурсосберегающее земледелие.

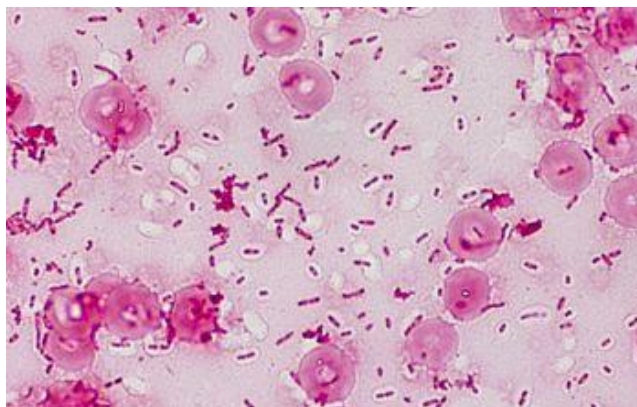


Рис. 3 – бактерии рода *Burkholderia*.

Несмотря на это, аэробные бактерии рода *Bacillus*, (рис.4) образующие эндоспоры (aerobic endospore forming bacteria – AEFB), уже довольно давно применяются и массово используются в различных областях сельского хозяйства. Например, их особенности, связанные с многослойной клеточной стенкой, образованием эндоспор, секрецией антибиотиков, сигнальных молекул и внеклеточных ферментов, способствуют их широкому применению в защите растений от стрессов.

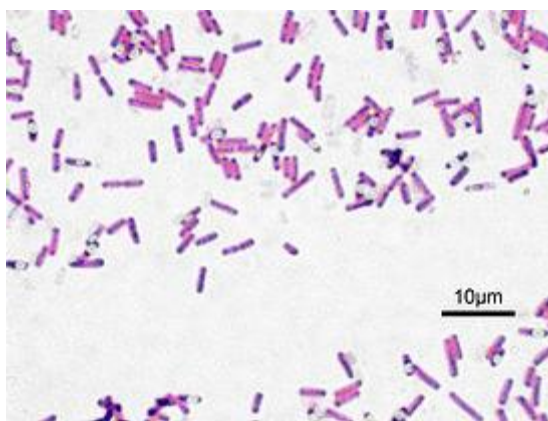


Рис.4 – бактерии рода *Bacillus*.

Базовым механизмом для стимуляции развития и ускорение роста культурных растений под влиянием *Bacillus* являются:

- производство фитогормонов;
- перевод в доступную для растений форму соединений фосфора;
- производство сидерофоров и антибиотиков;
- ингибирование синтеза этилена растений;
- индукции системной устойчивости растений к патогенам.

Наиболее часто для создания биопрепаратов используются различные штаммы бактерий *Bacillus subtilis*. Так, на ее основе были созданы – на основе штамма 26-Д препарат Фитоспорин-М; штамма В-10 ВИЗР препарат Алирин-Б; штамма ИПМ-215 препарат Бактофит; штамма М-22 ВИЗР препарат Гамаир; штамма ВКМ-В-2604D + ВКМ-В-2604D препарат Витаплан; штамма Ч-13 препарат БисолбиСан и д.р.

Помимо вышеназванных известных бактерий *Bacillus subtilis*, в виде возможных биоагентов для биопрепаратов используются такие виды как *B. Mojavensis*, *B. Pumilus*, *B. Atrophaeus* и д.р.

На производстве компании ООО «Органик Парк» был создан и уже довольно давно используется в промышленном производстве биопрепарат на основе штамма бактерий OPS-32 рода *Bacillus amyloliquefaciens* под торговым названием «Оргамика С»

В агрономии особое место выделено для представителей бактерий вида *Bacillus thuringiensis* (Bt) (рис.5). Данные бактерии нашли свое широкое

применение при производстве биологических препаратов против насекомых, т.е биоинсектицидов.



Рис.5 – бактерии *Bacillus thuringiensis*.

Биоинсектициды на основе Bt получили торговые названия «Битоксибацillin», «Лепидоцид», «Биостоп» и д.р. В последние несколько лет были проведены научные исследования, в ходе которых установили, что некоторые штаммы данной бактерии имеют не только инсектицидную, но и фунгицидную активность. В частности, было обнаружено, что данные бактерии могут подавлять развитие рядов фитопатогенных микроорганизмов. Также последние исследования позволили узнать нам, что *Bacillus thuringiensis* могут обладать выраженным ростостимулирующим воздействием на растения, что дает возможность создавать биопрепараты с полифункциональной активностью, т.е с многофункциональными.

Бактерии рода *Pseudomonas* (рис.6) являются обычными обитателями почвы, воды и поверхности различных органов растений. Они принадлежат к грамотрицательным *Proteobacteria*.

Многие Псевдомонады находятся в комменсальных отношениях с растениями, используя их выделения для своего питания и развития, при этом оказывая положительное влияние на ряд процессов в растительном организме.



Рис. 6 – бактерии рода *Pseudomonas*.

Бактерии, которые являются представителями рода *P. Fluorescens*, *P. Aureofaciens*, *P. Chlororaphis* и др. на самом деле одни из самых эффективных и хояйственно значимых антагонистов к фитопатогенам растений. Они способны синтезировать пиолютерин, пирролнитрин и 2,4-диацетилфлороглюцин. У *P. Fluorescens*, *P. Aureofaciens*, *P. Chlororaphis* обнаружили гены, которые могут контролировать выделение таких токсичных веществ для растений как феназин, пирролинитрин и пиолютерин. Также данный тип бактерий может стать и ингибитором для таких патогенов как сидерофора, внеклеточные энзимы хитиназы, целлюлазы, протеазы, шлюканызы и т.д.

В основном, бактерии, которые принадлежат к Псевдомонасам представляют из себя типичных ризосферных бактерий-стимуляторов роста растений. Под влиянием ряда *Pseudomonas* происходит образование индолил-3-уксусной кислоты (рис. 7) (ауксинового гормона), что оказывает сильное ростостимулирующее влияние.

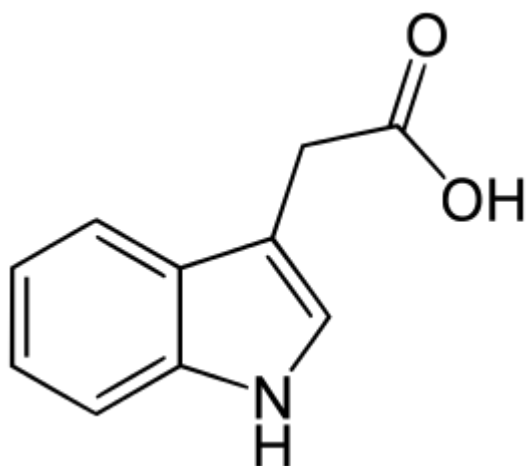


Рис. 7 – Гетероауксин (индолил-3-уксусная кислота)

Говоря о *Pseudomonas* как о представителей данной группы, можно сказать, что они в целом отличаются различными положительными механизмами в защите растений и положительном на них влиянии. В частности, различные штаммы бактерии рода *Pseudomonas* – *P. Fluorescens*, *P. Syringae*, *P. Aureofaciens*, *P. Cepacia* и т.д., сейчас используются для промышленного производства биологических препаратов для защиты растений. Данные виды бактерий показали свою повышенную эффективность в отношении контроля наиболее распространенных патогенов мицелиальных грибов – *Fusarium*, *Alternaria*, *Ascohyta*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, (рис.8) а также оомицетов – *Phytophthora*, *Peronospora* и т. д.

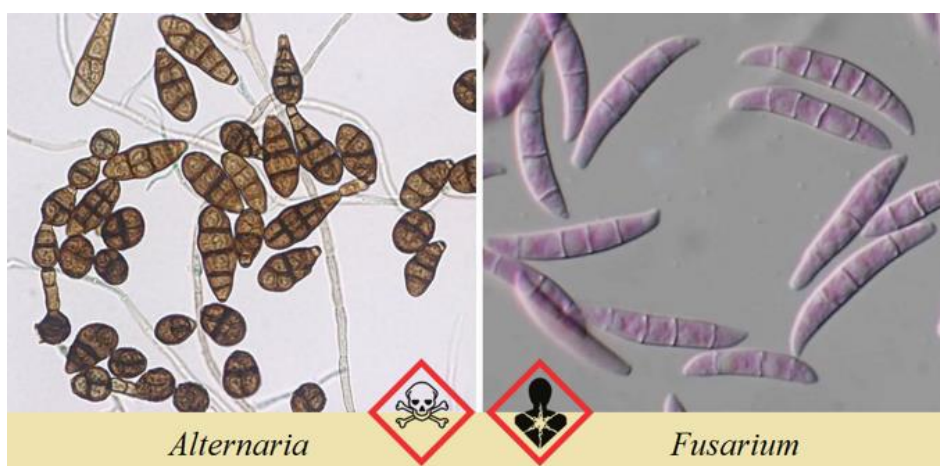


Рис. 8 – споры грибов рода *Fusarium* и *Alternaria*

На основе таких штаммов были разработаны различные биофунгициды:

- 1) «Ризоплан» (Институт генетики и цитологии АН Республики Беларусь);

- 2) «Псевдобактерин-2» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, г. Пушкино, Московская обл.);
- 3) «Агат-25-К» (ТОО «БИО-БИЗ и Ко, г. Москва);
- 4) «Бинорам» (Институт генетики и цитологии СО РАН, г. Новосибирск),
- 5) «БиоВайс» (ООО «Планта-Плюс» г. Томск) и др.

В защите растений от стрессов в России и в Республике Татарстан активно используются:

- 1) *Pseudomonas aureofaciens*, штамм BS1393 (Псевдобактерин-2, Ж, ПС);
- 2) *Pseudomonas aureofaciens*, штамм ИБ-51 (Елена, Ж) и др.

1.3. Свойства эндофитных микроорганизмов

Для большинства представителей ассоциативной микрофлоры эндофитных микроорганизмов была показана возможность способности проникновения во внутренние ткани хозяина без дальнейшего негативного изменения со стороны растения хозяина-эндофита, подобных клубенькам, образуемым при бобово-ризобияльном симбиозе. «Факультативный эндофит» - именно такой термин был предложен для данного типа бактерий [20,21]. Принято считать, что эндофитные diaзотрофы получают преимущество перед ассоциативными эндофитами, ведь они помогают утвердиться в нише, которая обеспечивает растение более подходящими условиями для эффективной фиксации азота и его последующей ассимиляции растением – хозяином.

Эндофитные бактерии имеют в себе свойство совершенствовать фосфорное питание растений, а также успешно продуцировать ИУК и сидерофоры. Доказано, что бактерии-эндофиты способны продуцировать даже витамин и владеют такими свойствами как регуляция осмоса, работа устьиц, а также совершенствование работы корневой системы и регулировка азотного питания растений.

При изучении научной литературы было установлено, что эндофиты способны угнетать фитопатогенные свойства вредоносных микроорганизмов и нематод посредством синтеза БАДов.

Пока эндофиты находятся в эндосфере они занимают значимое превосходство над организмами, которые в данный момент обитают в ризосфере и филлосфере. Это происходит за счет устойчивого рН, влажности, потока питательных веществ и отсутствия конкуренции со стороны наибольшего количества микроорганизмов. Весьма важно понимать, что эндофиты – это не случайные бактерии, занимающие нишу эндосферы. Вероятнее всего, что такие эндофиты самостоятельно отбираются растением по принципу совместимости, чтобы в дальнейшем обезопасить его достаточными микроэлементами для защиты от факторов стресса. Энергия, которую растение может затратить на изготовление массы эндофитных микроорганизмов в дальнейшем восполниться за счет физиологических улучшений растения. Для процесса инокуляции эндофитам не нужно большого количества самого инокулюма, поскольку сами по себе они имеют очень рослую индивидуальность и быстрое накопление биомассы. Данное их свойство может быть очень заманчивым для производителей биопрепаратов, выискивающих подмену классическими химическим пестицидам. Установлено, что, когда происходит процесс эндофитного симбиоза недифференцированные ткани над зоной деления в корне, а также точки из которых в дальнейшем будут закладываться боковые корни являются именно теми местами, в которых и будет происходить первичная колонизация и проникновение в растения [15]. Было высказано предположение, что целлюлолитические и пектинолитические ферменты вызывают такой процесс как инвазия, которая в дальнейшем разрушает клеточные стенки растений, тем самым обеспечивает себе прохождение через эктодерму, а затем уже начинается активная колонизация внутренних тканей растения [15,16,17]. Данная гипотеза была подтверждена при исследовании роли гена эндоглюканазы *eglA* у *Azoarcus* ВН72[15]. Результаты исследования гласят,

что при проведении инокуляции проростков риса контрольным штаммом *Azoarcus* бактерии, находящиеся внутри клеток эпидермиса корня, детектировали через 3 недели, а в эксперименте с мутантным штаммом *Azoarcus* по *eglA* количество клеток, успешно колонизировавших корни растения, было значительно меньше, что коррелировало с низким уровнем мРНК *nifH*. Клетки мутантного штамма *Azoarcus* ВНЕб не детектировались в побегах, что позволило сделать вывод о важной роли целлюлитических ферментов в колонизации корней и системной инфекции растений бактериями *Azoarcus*. Однако гены, кодирующие ферменты, способные разрушать компоненты клеточных стенок растений, не были обнаружены во всех эндофитных PGPR. Следовательно, среди этих бактерий распространено пассивное проникновение в корневую систему через разрушенные слои экто- и эндодермальных клеток, возникающие в точках роста латеральных корней. После проникновения некоторые эндофиты могут колонизировать богатые питательными веществами межклеточные пространства, продвигаться к ксилеме, а затем распространяться по побегу. У некоторых эндофитов пенетрация может осуществляться достаточно быстро, например, *N. seropedicae* выявляются в кортикальных клетках корней кукурузы через 12 ч, а в ксилеме – через 24 часов после инокуляции [18].

1.4. Применение эндофитных микроорганизмов

Единственные в своем роде, уникальные штаммы бактерий эндофитных микроорганизмов могут быть как раз и использованы для того, чтобы инокулировать семена или саженцы растений, или деревьев. Таким образом мы можем снизить влияние биотических или абиотических факторов за счет активной колонизации эндофитами тканей растения и последующего влияния на биохимические и физиологические процессы в растении. Также не стоит списывать эндофитов со счетов, говоря об очистке техногенно-загрязненных территорий.

Было обнаружено, что некоторые микроорганизмы могут быть полезны для растений в культуре *in vitro*, в горшечной культуре *ex vitro*, а также в дальнейшем в естественных условиях выращивания. Некоторые бактерии положительно влияют на продуктивность мини-клубней картофеля при тепличном и аэропонном выращивании. Вероятно, предпочтительным может быть использование консорциумов микроорганизмов, которые будут имитировать, по крайней мере, частично, природный растительный микробиом, который является многочисленным, мультивидовым и многофункциональным.

II УСЛОВИЯ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Методика выделения эндофитных бактерий из семян

Выделение эндофитов из семян проводили по следующей схеме [19]. Проба по 100 семян, помещалась в стерильную колбу, в течение 5 минут проводилась стерилизация 50 мл 70% этанолом. Последующую стерилизацию проводили 4% гипохлоритом натрия (NaClO) с 0,5 мл додецил сульфата натрия (ДСН) и 38 мл дистиллированной воды. Стерилизация проводилась в течение 15 минут при комнатной температуре. Семена промывались не менее 6 раз 100 мл стерильной дистиллированной водой комнатной температуры до исчезновения запаха. Стерильным и остывшим шпателем разложить семена на поверхности чашек Петри со средой LB.

2.2 Методика выделения эндофитных бактерий из корней

Выделение эндофитов из корней проводили по следующей схеме [26]. Корни с почвой или песком аккуратно помещали в колбу со 100 мл стерильной воды и взбалтывают в течение 2 мин. Стерильным пинцетом корни извлекали из колбы и переносили в другую емкость, содержащую 100 мл стерильной водопроводной воды. Процедуру повторяли, последовательно промывая корни до исчезновения следов почвы и песка. Последующую стерилизацию проводили 4% гипохлоритом натрия (NaClO) с 0,5 мл додецил сульфата натрия (ДСН) и 38 мл дистиллированной воды. Стерилизация проводилась в течение 15 минут при комнатной температуре. Корни промывались не менее 6 раз 100 мл стерильной дистиллированной водой комнатной температуры до исчезновения запаха. Стерильные корни измельчались в стерильной ступке до гомогенной массы и одинаковую массу по всем вариантам помещали на поверхности чашек Петри со средой LB.

Для культивирования эндофитов использовали среду LB, которая состояла из триптона – 10 г/л, дрожжевого экстракта – 5 г/л, NaCl – 10 г/л, сульфат магния семиводный – 10 г/л. Для приготовления агаризованной среды добавляли агар в концентрации 18 г/л. Среду стерилизовали 40 минут при

110°C. После охлаждения среды до 50–60 °С добавляли флуконазол для контроля роста грибов.

2.3 Методика определение КОЕ различных штаммов микроорганизмов в семенах сельскохозяйственных культур

Для подсчета КОЕ эндофитных микроорганизмов семена ячменя, пшеницы, растения мятлика отбирались и поверхностно стерилизовались так же, как и в предыдущем опыте. После поверхностной стерилизации семена и части растения перемалывались для приготовления суспензии. 1 г перемолотого материала помещали в стерильную пробирку и заливали 9 мл фосфатного буфера, затем тщательно перемешивали с использованием мешалки типа Вортекс. Далее делали 5 последовательных разведений суспензии в фосфатном буфере, из которых отбирали по 0,1 мл суспензии и высаживали на чашки Петри с питательной средой LB с содержанием флуконазола (Вертекс) 100 мг/л. Посев на питательной среде инкубировали в течение 2 суток при $t=28^{\circ}\text{C}$. Растения мятлика инкубировали в течение 14 суток при $t=4^{\circ}\text{C}$. Через 2, 14 суток определяли общее КОЕ микроорганизмов на каждой чашке, а так же, КОЕ всех разновидностей колоний микроорганизмов.

2.4 Методика окрашивания по Граму

Метод окрашивания бактерий по Граму основан на различной способности микроорганизмов удерживать в клетке красители трифенилметанового ряда – кристаллический фиолетовый или генциановый фиолетовый. Сущность метода основана на различии в химическом составе и строении клеточной стенки бактерий. Бактерии по этому признаку делят на две группы: грамположительные – красящиеся по Граму, и грамотрицательные – не красящиеся по Граму. Мазки окрашивают в течение одной минуты генцианвиолентом. Для этого на предметное стекло кладут полоску фильтровальной бумаги, пропитанной красителем, и смачивают ее водой. Бумажку с красителем удаляют, на препарат наносят раствор Люголя (водой промывать не надо) и выдерживают 60 секунд, до полного почернения

мазка. Не промывая водой, препарат обрабатывают 96% спиртом в течение 15–20 с. При этом предметное стекло покачивают. Важно четко соблюдать указанное время обесцвечивания, поскольку при увеличении его продолжительности наблюдается обесцвечивание и грамположительных бактерий. Препарат промывают водой и накладывают на его поверхность полоску фильтровальной бумаги, пропитанной фуксином Пфейфера, смачивают ее водой и окрашивают в течение 60 секунд. Фильтровальную бумагу с красителем удаляют, препарат промывают водой и осушают чистой фильтровальной бумагой. На препарат наносят кедровое масло и рассматривают с иммерсионным объективом.

III РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Выделение рабочей коллекции штаммов.

3.1.1 Отбор семян ячменя и пшеницы различных сортов.

Для выделения эндофитов отбирались семена различных сортов ячменя, пшеницы и растения мятлика. Семена и растения отбирались визуально, средней величины, исключая поврежденные, больные семена. В ходе работы были отобраны 3 сорта семян ячменя и 3 сорта семян пшеницы:

Ячмень:

1.Я – Тевкеч;

2.Я – Ергень;

3.Я – Раушан.

Мятлик:

М – Мятлик

Пшеница:

1.П – Тулайковская надежда;

2.П – Йолдыз;

3.П – Памяти Коновалова.

3.1.2 Выделение эндофитных микроорганизмов из семян и растений сельскохозяйственных культур

Таблица 1 – Выделенные эндофиты из семян сельскохозяйственных культур

№	Название колонии	Место выделения	Описание	Кол-во колоний
1	Я2	Ергень	Светлая, неровная, блестящая	1
2	Я3.1	Раушан	Светло-желтая, блестящая, неровная	3
3	Я3.2	Раушан	Белая, неровная, матовая	1
4	П2	Йолдыз	Белая, неровная, блестящая	1
5	П3	Памяти Коновалова	Светлые, блестящие, неровные	2
6	М1.1	Мятлик	Ярко-оранжевые, блестящие	2
7	М1.2	Мятлик	Желтые, блестящие	6
8	М1.3	Мятлик	Розовая, маленькая, блестящая	1
9	М2.1	Мятлик	Ярко-оранжевые, блестящие	2
10	М2.2	Мятлик	Светло-желтая, блестящая	1
11	М2.3	Мятлик	Светло-розовая, блестящая	1
12	М2.4	Мятлик	Маленькие, розовые	3
13	М2.5	Мятлик	Маленькая, желтая	1

3.1.3 Определение КОЕ различных штаммов микроорганизмов в семенах сельскохозяйственных культур

Таблица 2 – Результаты определения КОЕ штаммов из сельскохозяйственных культур

№	Название колонии	Место выделения	Описание	КОЕ на 1г семян
1	Я2	Ергень	Белая, маленькая	$2 \cdot 10^4$
2	Я3	Раушан	Светло желтая, маленькая	$2 \cdot 10^4$
3	П2.1	Йолдыз	Светло-желтые, блестящие	$4 \cdot 10^4$
4	П.2.1 (р)	Йолдыз	Молочные, блестящие	$4 \cdot 10^4$
5	П2.2	Йолдыз	Белая, блестящая	$2 \cdot 10^4$
6	П2.3	Йолдыз	Оранжевая, блестящая	$2 \cdot 10^4$
7	П3.1	Памяти Коновалова	Белые, блестящие	$1,4 \cdot 10^5$
8	П3.2	Памяти Коновалова	Желтоватые, блестящие	$6 \cdot 10^4$
9	М1.1	Мятлик	Ярко оранжевые, блестящие	$4 \cdot 10^4$
10	М1.2	Мятлик	Желтоватые, блестящие	$6 \cdot 10^4$
11	М1.3	Мятлик	Розовая мелкая, блестящая	$2 \cdot 10^4$
12	М2.1	Мятлик	Ярко-оранжевая, блестящая	$4 \cdot 10^4$
13	М2.2	Мятлик	Светло-желтая, блестящая	$2 \cdot 10^4$
14	М2.3	Мятлик	Светло-розовая, блестящая	$2 \cdot 10^4$
15	М2.4	Мятлик	Маленькая, розовая	$6 \cdot 10^4$
16	М2.5	Мятлик	Маленькая, желтая	$2 \cdot 10^4$

3.1.4 Выявление наличия антагонизма к фитопатогенным грибам у выделенных из семян микроорганизмов

При визуальном осмотре антагонизм выявлен у следующих разновидностей микроорганизмов, выделенных из семян:

Ячменя: Я3.2; Я2; – к *Fusarium sp.*;

Я3.2; – к *Alternaria sp.*;

Пшеницы: П2.3; П2.1(р); П2.1; – к *Fusarium sp.*;

П2.1; - к *Alternaria sp.*;

Растений мятлика: М2.5; М2.4 – к *Fusarium sp.*;

3.1.5 Выделение микроорганизмов из корней сельскохозяйственных культур, определение их КОЕ

Таблица 3 – Выделение микроорганизмов из корней сельскохозяйственных культур и определение их КОЕ

№	Название колонии	Место выделения	Описание	КОЕ на 1г семян
1	ЯК1	Тевкеч	Маленькая, молочная, блестящая	$2 \cdot 10^4$
2	ПК3.1	Памяти Коновалова	Светло-желтые, матовые	$6 \cdot 10^4$
3	ПК3.2	Памяти Коновалова	Светло-желтые, блестящие	$8 \cdot 10^4$
4	ПК3.3	Памяти Коновалова	Прозрачно-белые, блестящие	$6 \cdot 10^4$

3.1.6 Выявление наличия антагонизма к фитопатогенным грибам у выделенных из корней микроорганизмов

При визуальном осмотре антагонизм выявлен у следующих разновидностей микроорганизмов, выделенных из корней:

Ячменя: ЯК1; – к *Fusarium sp.*;

ЯК1 – к *Alternaria sp.*;

Пшеницы: ПК3.2 – к *Fusarium sp.*;

3.2 Изучение биохимических и ростостимулирующих свойств штаммов

Мной было изучено около 10 различных сортов ячменя и пшеницы, и получено более 30 разных штаммов бактерий. На основе проведенных наблюдений было отобрано 9 штаммов бактерий. Все они морфологически отличны друг от друга.

3.2.1 Оценка полученных штаммов методом окрашивания по Граму

Результаты микрокопирования:

Таблица 4 – Грамм принадлежность исследуемых штаммов

№	Название штамма	Результат окрашивания по Граму
1	Я.3.2	Грам +
2	П.2.1	Грам -

3	П.2.3	Грам -
4	Я.2	Грам +
5	П.2.1 (р)	Грам +
6	М.2.4	Грам -
7	М.2.5	Грам +
8	ЯК.1	Грам +
9	ПК.3.2	Грам +

3.2.2 Оценка биологической активности штаммов бактериальных микроорганизмов

Амилазная активность. Способность к гидролизу крахмала определяли с использованием среды следующего состава: пептон - 0,05%, хлорид калия - 0,01 %, сульфат магния семиводный - 0,05%, сульфат аммония - 0,01%, крахмал - 2%, агар - 1,6%. Гидролиз крахмала в среде детектировали по образованию зон просветления при окраске среды раствором Люголя.

Целлюлазная активность. Изоляты высаживали на среду VM с добавлением 1% карбоксиметилцеллюлозы. Целлюлолитическую активность идентифицировали методом детекции зон желтого цвета вокруг колонии после окрашивания конго красным.

Липазная активность. Для определения наличия внеклеточных липаз выделенные изоляты пересеивали на среду с добавлением Tween 80 (полиоксиэтилен сорбитан моноолеат) как аналога высокомолекулярных жирных кислот. Состав среды: Пептон - 10 г/л, хлорид натрия - 5 г/л, хлорид кальция двуводный - 1 г/л, агар 2%, Twin 80 - 1%. Способность бактерий к липазной активности детектировали по формированию вокруг колоний непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот, освобожденных из Tween 80.

Определение способности к фиксации атмосферного азота в аэробных условиях у выделенных изолятов бактерий.

Для идентификации изолятов бактерий обладающие способностью фиксировать атмосферный азот в аэробных условиях, бактериальные изоляты высевали в чашки Петри на среду Йенсена (сахароза – 20 г/л, фосфат калия

двузамещенный – 1 г/л, сульфат магния – 0.5 г/л, хлорид натрия – 0.5 г/л, сульфат железа – 0.1 г/л, молибдат натрия – 0.005 г/л, карбонат кальция – 2 г/л, 1.5% агар) и инкубировали в течение 2-5 суток при температуре 30 °С. Штаммы, растущие на данной среде, способны фиксировать атмосферный азот.

Результаты исследований:

Таблица 5 – Проверка активностей ферментов штаммов

Штаммы	Активность фермента			
	Липаза	Амилаза	Фиксация азота	Целлюлаза
ЯК.1	+	+	+	+
Я.2	+	+	-	+
М.2.4	+	-	-	-
П.2.1	-	-	-	-
Я.3.2	-	-	-	+
П.2.1(р)	+	+	-	+
ПК.3.2	-	+	-	-
П.2.3	-	-	-	+
М.2.5	-	-	-	-

3.2.3 Анализ зараженности и биометрических данных обработанных штаммами семян рулонным методом.

Таблица 6 – Анализ биометрических данных при применении исследуемых штаммов на семенах ярового ячменя сорта «Раушан» методом рулонов

№ Образца	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Длина корня, мм	Длина ростка, мм	Длина coleoptilya, мм
Контроль	32	38	117±10	105±32	34±3
П.2.1. (р)	20	33	135±11	124±20	38±4
М.2.5	24	42	133±14	147±12	39±0,5
М.2.4	28	48	147±9	146±23	41±3
П.2.3	23	33	132±11	137±22	36±5
Я.3.2	32	45	144±12	145±15	40±3
Я.2	16	28	144±11	132±26	41±5
П.2.1	27	41	141±13	146±24	41±3
Я.К.1	20	33	131±16	127±14	39±5
ПК.3.2	33	44	137±11	140±22	40±4

Наилучшие результаты по увеличению длины корня и ростка наблюдались у вариантов обработок штаммами М.2.5, М.2.4, Я.3.2, П.2.1, ПК.3.2.

Таблица 7 – Анализ зараженности семян ярового ячменя сорта «Раушан» рулонном методом при применении исследуемых штаммов

№ Образца	<i>Alternaria sp.</i> , %	<i>Fusarium sp.</i> , %	Корневые гнили, %	Плесневения, %
Контроль	0	2	8	50
П.2.1. (р)	0	0	0	7
М.2.5	0	0	1	9
М.2.4	0	0	0	1
П.2.3	0	1	1	2
Я.3.2	0	0	0	4
Я.2	0	0	0	1
П.2.1	0	0	0	3
Я.К.1	0	0	3	9
ПК.3.2	0	0	0	0

По результатам зараженности обработанных штаммами семян наилучшие показатели были у штаммов М.2.5, М.2.4, Я.3.2, П.2.1, ПК.3.2

Таблица 8 – Анализ биометрических данных при применении исследуемых штаммов на семенах яровой пшеницы сорта «Ульяновская – 105» рулонным методом.

№ Образца	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Длина корня, мм	Длина ростка, мм	Длина coleoptilya, мм
Контроль	100	100	116±23	133±32	47±13
П.2.1. (р)	82	90	132±12	189±11	50±3
М.2.5	88	90	107±23	154±28	46±7
М.2.4	83	84	127±13	192±25	51±5
П.2.3	93	95	122±15	173±27	50±5
Я.3.2	78	87	127±18	180±31	49±3
Я.2	89	97	111±25	178±20	53±3
П.2.1	93	94	129±17	180±17	51±7
Я.К.1	85	91	144±8	186±27	52±5
ПК.3.2	87	94	152±30	185±30	53±4

Наилучшие результаты по увеличению длины корня и ростка наблюдались у вариантов обработок штаммами П.2.1 (р), М.2.4, П.2.3, Я.3.2, П.2.1, Я.К.1, ПК.3.2.

Таблица 9 – Анализ зараженности семян яровой пшеницы сорта «Ульяновская – 105» при применении исследуемых штаммов рулонным методом.

№ Образца	<i>Alternaria sp.</i> , %	<i>Fusarium sp.</i> , %	Корневые гнили, %	Плесневения, %
Контроль	24	0	14	100
П.2.1. (р)	10	1	5	45
М.2.5	16	0	10	73
М.2.4	17	0	6	45
П.2.3	2	4	0	0
Я.3.2	6	0	6	24
Я.2	14	3	9	10
П.2.1	10	24	3	12
Я.К.1	10	0	3	9
ПК.3.2	5	0	4	63

По результатам зараженности обработанных штаммами семян наилучшие показатели проявились почти у всех штаммов. Штаммы способны ингибировать развитие фитопатогенных грибов.

Таблица 10 - Анализ биометрических данных при применении исследуемых штаммов на семенах гороха сорта «Салават» методом влажных камер.

№ Образца	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Длина корня, мм	Длина ростка, мм
Контроль	82	88	87±18	38±9
П.2.1. (р)	82	82	120±48	90±9
М.2.5	82	82	96±37	78±20
М.2.4	64	70	91±19	80±9
П.2.3	82	82	110±32	66±15
Я.3.2	34	34	103±43	87±12
Я.2	72	64	117±46	81±15
П.2.1	82	84	113±33	78±19
Я.К.1	80	82	86±34	65±17
ПК.3.2	70	72	58±25	51±13

Наилучшие результаты по увеличению длины корня и ростка наблюдались у вариантов обработок штаммами П.2.1 (р), М.2.5, М.2.4, П.2.3, Я.3.2, Я.2, П.2.1, Я.К.1.

Таблица 11 – Анализ зараженности семян гороха сорта «Салават» при применении исследуемых штаммов методом влажных камер.

№ Образца	<i>Alternaria sp.</i> , %	<i>Fusarium sp.</i> , %	Корневые гнили, %	Плесневения, %
Контроль	0	4	14	52
П.2.1. (р)	0	12	10	46
М.2.5	0	14	41	4
М.2.4	0	8	34	34
П.2.3	0	14	18	20
Я.3.2	0	0	22	64
Я.2	0	8	14	56
П.2.1	0	24	16	14
Я.К.1	0	14	38	32
ПК.3.2	0	10	18	20

По результатам зараженности обработанных штаммами семян наилучшие показатели были у штамма Я.3.2.

3.3 Отбор штаммов эндофитных бактерий для дальнейшей работы

Исходя из выше полученных результатов нами были отобраны опытные штаммы для продолжения работы:

Таблица 12 – Отобранные штаммы для дальнейшей работы

№	Название штамма	Вид бактерий	Референсный штамм в GenBank	Accession number	% сходства
1	П.2.1.(р)	<i>Bacillus licheniformis</i>	LZBL-3	JX847111.1	94
2	П.К.3.2.	<i>Priestia aryabhatai</i>	RW109	MH010160.1	99
3	М.2.5	<i>Micrococcus endophyticus</i>	190306Y24141	VN225701.1	91

3.4 Изучение устойчивости штаммов к стресс факторам.

3.4.1 Оценка устойчивости штаммов к разным температурным режимам.

Для проведения опыта будут использованы опытные штаммов эндофитных бактерий, доведенные до рабочей концентрации OD = 0,5. Объем суспензии = 15 мл. Пробирки с жидкими опытными образцами будут

помещены в термостаты с разными температурными режимами: 0°C, +5°C, +15°C, +25°C, +30°C.

Определения устойчивости к температурным режимам будет проводиться путем измерения плотности препарата на спектрофотометре, длина волны при измерении – 595 нм. Измерения будут проводиться каждую неделю в течение трех месяцев. Контрольным вариантом будет считаться начальная плотность OD = 0,5. За раствор для пробы сравнения (Blank) принят фосфатно солевой буфер.

Результаты представлены в виде графиков, где ось OX – количество недель, OY – плотность штаммов (OD)

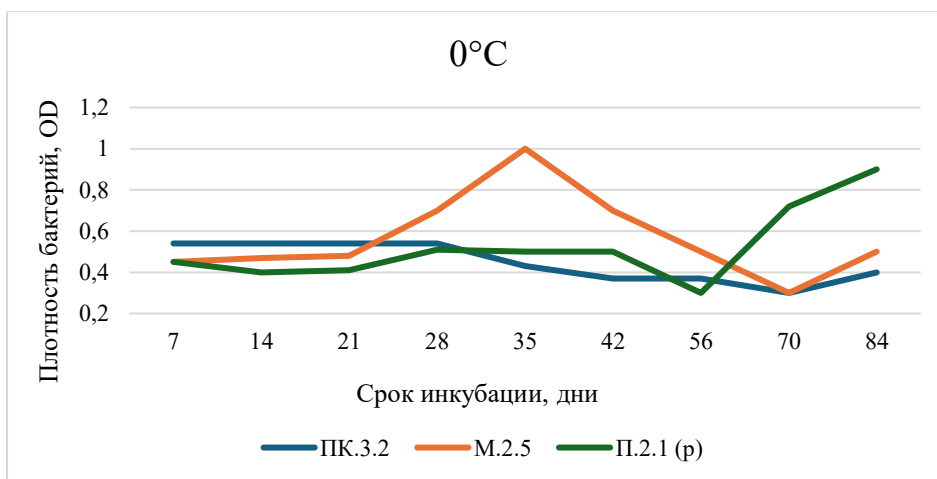


Рисунок 9 – устойчивость исследуемых штаммов к температуре 0 °C

С

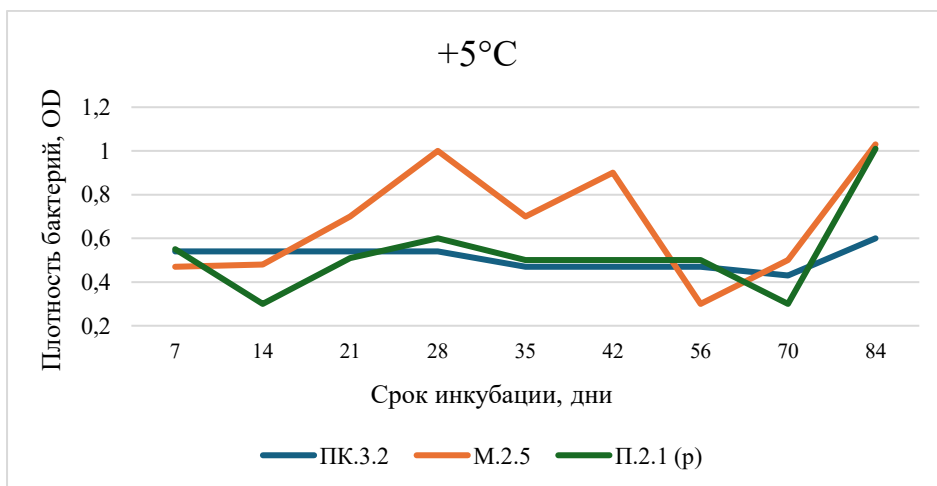


Рисунок 10 – устойчивость исследуемых штаммов к температуре +5 °C

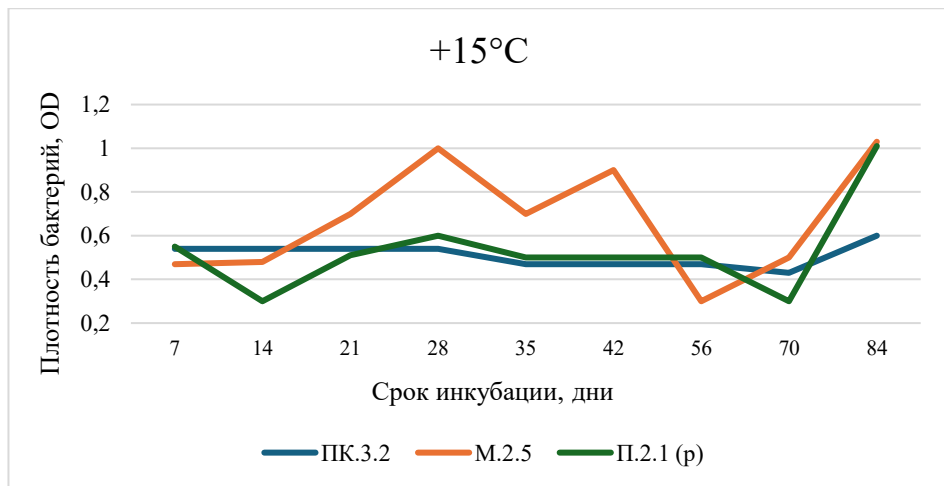


Рисунок 11 – устойчивость исследуемых штаммов к температуре +15 °С

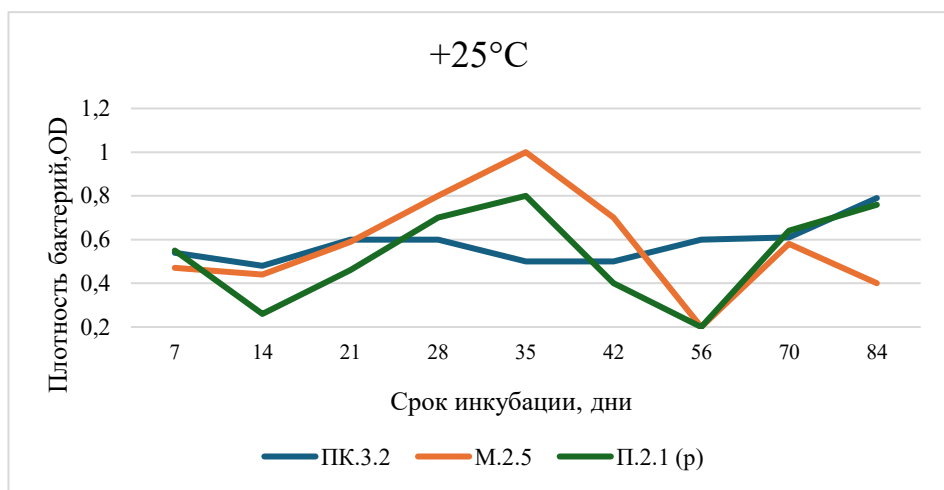


Рисунок 12 – устойчивость исследуемых штаммов к температуре +25 °С

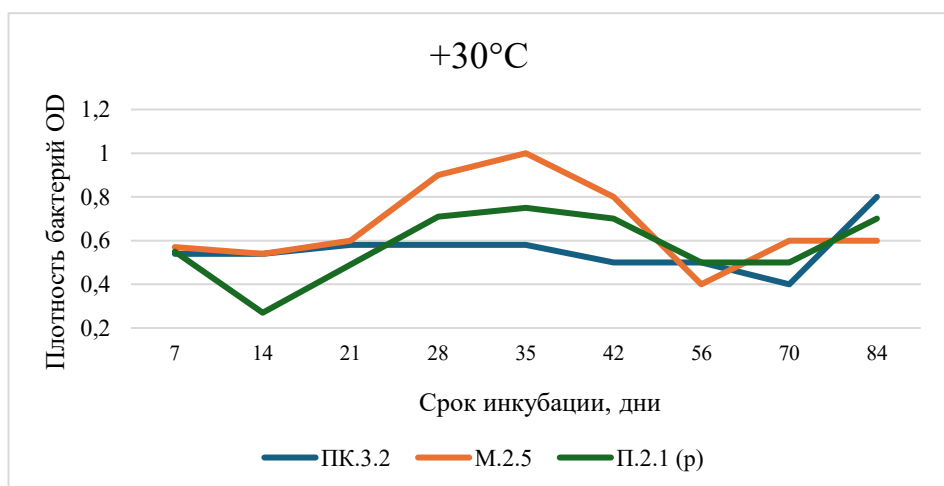


Рисунок 13 – устойчивость исследуемых штаммов к температуре +30 °С

На основе данных графиков можно утверждать, что исследуемые штаммы могут выдерживать температурный диапазон от 0 °С до +30 °С. Наиболее стабильное состояние плотности штаммов наблюдалось при температуре 0 °С.

3.4.2 Оценка устойчивости штаммов к солевым растворам NaCl разной концентрации

Галотолерантность проводили путем инокуляции 1 мл культуры штаммов П.К.3.2., М.2.5, П.2.1.(р) в 50 мл свежей среды LB с добавлением 1%, 3%, 5%, 7%, 9% и 11% NaCl. Затем культуру инкубировали в трех повторностях на 96-луночных планшетах Cell Culture Cluster (costar, США) при $28,0 \pm 1$ °С. Кривую роста регистрировали каждый час в течение 20 часов на спектрофотометре (spectrostarNano BMG Labtech, Германия) при (λ) 596 нм. Незасеянную среду LB с указанными выше концентрациями соли использовали в качестве контроля.

В ходе работы были получены следующие результаты:

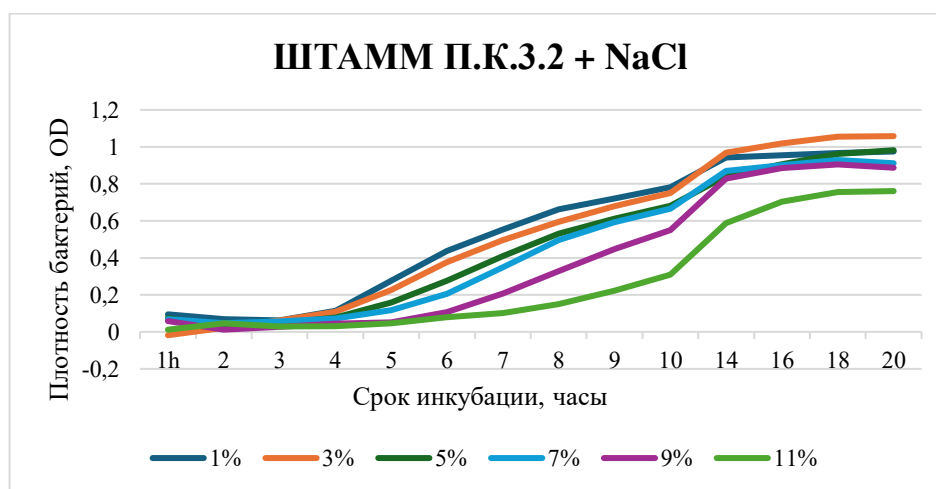


Рисунок 14 – Влияние солевого раствора разной концентрации на штамм П.К.3.2.

При анализе графика с исследованием влияния солевого раствора различной концентрации на штамм П.К.3.2 можно сделать выводы, о том, что данный штамм успешно выдерживает концентрации солей от 1% до 11% и

продолжает свой рост. Однако, при концентрации соли 11% рост бактерий замедляется.

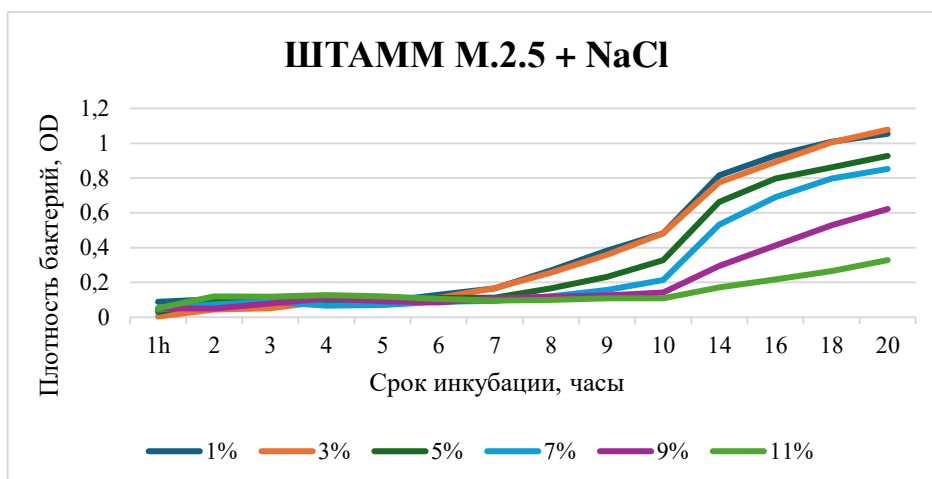


Рисунок 15 – Влияние солевого раствора разной концентрации на штамм М.2.5

Анализируя данный график, можно сказать о том, что при помещении бактерий в солевой раствор они начинают испытывать стресс, и при прохождении 4–6 часов начинают медленный рост. На 10 час проведения исследований отмечается резкий рост колоний штаммов. На графике видно, что при увеличении концентрации соли рост бактерий уменьшается.

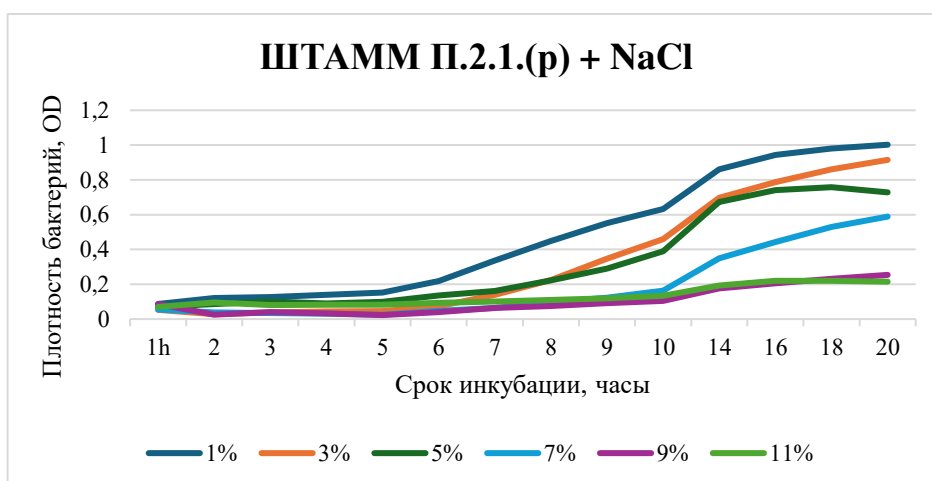


Рис. 16 – Влияние солевого раствора разной концентрации на штамм П.2.1.(p)

При анализе данного графика становится видно, что бактерии штамма П.2.1.(p) хорошо развиваются при концентрации солей 1%, 3%, 5% и 7% испытывая при этом начальный стресс, но на 5 и 10 час отмечается резкий рост

колоний. При концентрации 9% и 11% замечается ухудшение роста колоний бактерий.

Наилучшим образом себя показали штаммы П.К.3.2 и М.2.5, проявив наибольшую устойчивость к солевым растворам.

3.4.3 Оценка устойчивости штаммов к солевым растворам удобрения разной концентрации

Галотолерантность проводили путем инокуляции 1 мл культуры штаммов П.К.3.2., М.2.5, П.2.1.(р) в 50 мл свежей среды LB с добавлением соответственно, 1%, 3%, 5%, 7%, 9% и 11% минерального удобрения (Solar). Затем культуру инкубировали в трех повторностях на 96-луночных планшетах Cell Culture Cluster (costar, США) при $28,0 \pm 1$ °С. Кривую роста регистрировали каждый час в течение 20 часов на спектрофотометре (spectrostarNano BMG Labtech, Германия) при (λ) 596 нм. Незасеянную среду LB с указанными выше концентрациями соли использовали в качестве контроля.

В ходе работы были получены следующие результаты:

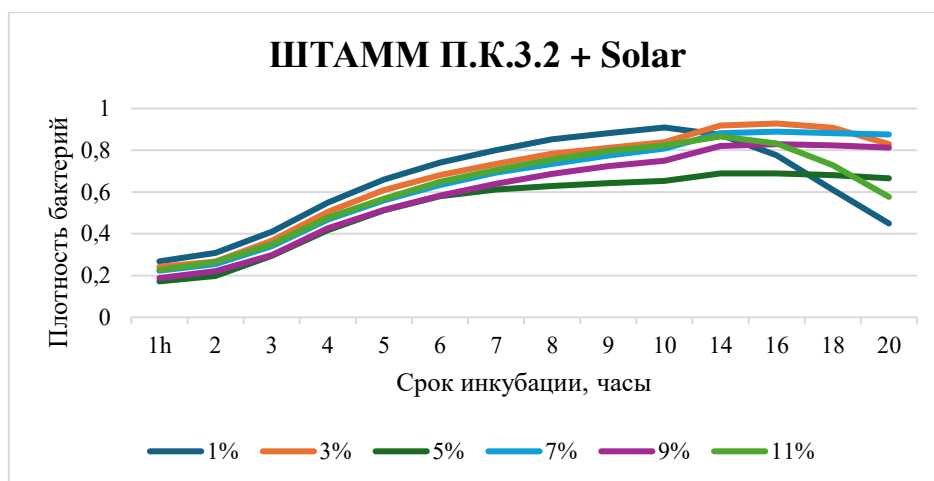


Рис. 17 – Влияние раствора минерального удобрения разной концентрации на штамм П.К.3.2.

При анализе графика с исследованием влияния на штамм П.К.3.2 можно сделать выводы о том, что данный штамм успешно выдерживает концентрации минерального удобрения от 1% до 11% в течение 10-12 часов и продолжает свой рост, затем рост бактерий резко начинает снижаться. Однако,

при концентрации 3%, 5%, 7% и 9% снижение роста бактерий происходит медленно.

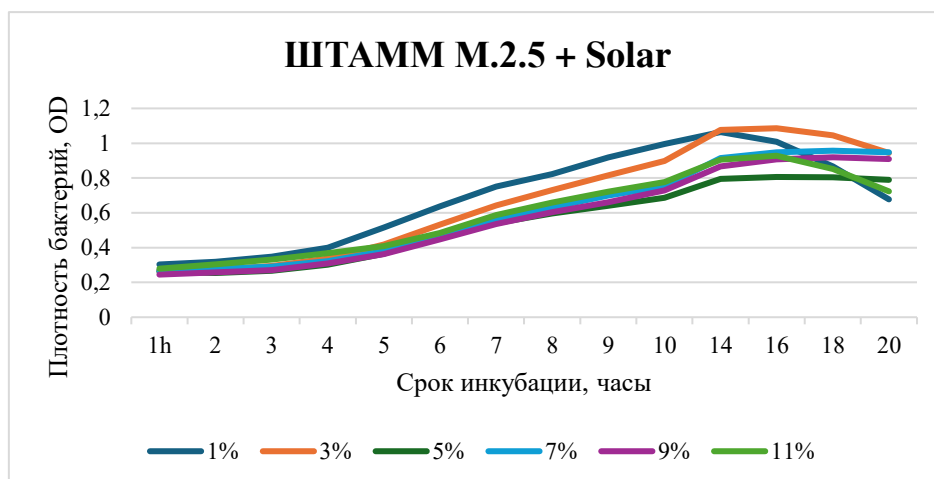


Рис. 18 – Влияние раствора минерального удобрения разной концентрации на штамм M.2.5

Анализируя данный график, можно сказать о том, что при помещении бактерий в раствор они продолжают свой рост, и при прохождении 13–14 часов начинается медленный спад роста. При максимальной (11%) и минимальной (1%) концентрации спад роста происходит быстро.

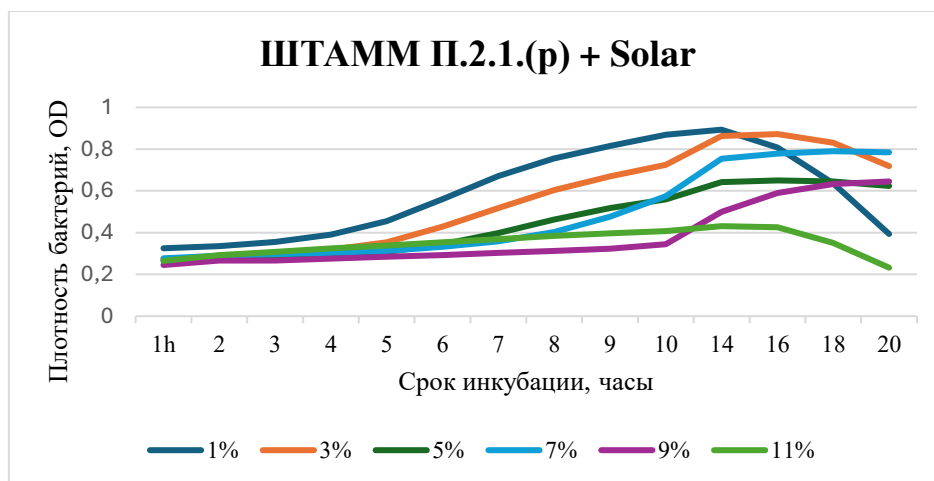


Рис. 19 – Влияние раствора минерального удобрения разной концентрации на штамм П.2.1.(р)

При анализе данного графика становится видно, что бактерии штамма П.2.1.(р) хорошо развиваются при различной концентрации солей, но

выдерживают не более 14 часов. При концентрации 1% и 11% замечается резкое ухудшение роста колоний бактерий на 13–16 час.

Наилучшим образом себя показали штаммы П.К.3.2 и М.2.5, проявив наибольшую устойчивость к различным концентрациям. По всем штаммам отмечается резкое ухудшение роста колоний при концентрации 1% и 11%. Общий рост колоний трех штаммов прекращается на 10–16 час нахождения в растворе минерального удобрения.

3.5 Изучение влияния штаммов в вегетационных опытах.

3.5.1 Оценка влияния экспериментальных штаммов эндофитных бактерий на рост и развитие пшеницы яровой сорта Ульяновская-105 при опрыскивании в вегетационных опытах.

Схема вегетационного опыта: 1 контроль и 3 вариантов опытов с нормой опрыскивания 1 л/га (2 повторности). Опрыскивание проводится при достижении фазы кущения. Расход рабочей жидкости – 200 л/га. Расход на 1 сосуд – 10 мл H₂O и 18 мкл биомассы штамма.

Учеты и наблюдения: Раз в неделю будут производиться биометрические исследования по динамике нарастания листьев. На фазе цветения будет измеряться содержания хлорофилла в листьях по методике, Lichrenthaler Н. К. (1987) и измерение сухой биомассы надземных и подземных органов. Растения будут выращиваться до фазы цветения (7-8 недель). Возможно завершение на стадии выход трубку.

Результаты:

Таблица 13 – Биометрические показатели вегетационных опытов пшеницы яровой сорта «Ульяновская – 105» (первый посев)

№ Образца	Длина надземной части, мм	Длина подземной части, мм	Количество листьев, шт	Сухая масса надземная, гр	Сухая масса подземная, гр
Контроль	465±49	147±54	4±0,4	1,82	0,2
П.2.1 (р)	465±89	152±37	5±0,5	2,13	0,24

М.2.5	460±46	172±49	4±0,5	2,57	0,27
ПК.3.2	449±34	144±28	4±0,6	2,4	0,28

Таблица 14 – Биометрические показатели вегетационных опытов пшеницы яровой сорта «Ульяновская – 105» (второй посев)

№ Образца	Длина надземной части, мм	Длина подземной части, мм	Количество листьев, шт	Сухая масса надземная, гр	Сухая масса подземная, гр
Контроль	598±89	232±46	8±1,9	3,17	0,46
П.2.1 (р)	575,5±43,5	291±71,5	12±1,4	3,12	0,5
М.2.5	548±55	284±43	10±2,3	2,7	0,5
ПК.3.2	507±81	254±76	11±2,6	2,8	0,4

По результатам двух посевов выделен лидер по стимуляции корневой системы, а также надземной части и количеству листьев – штамм П.2.1 (р), а также М.2.5

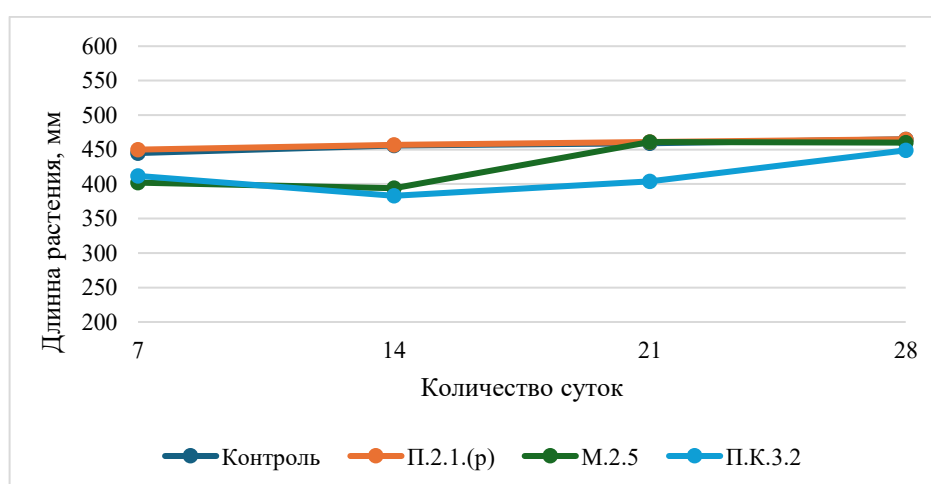


Рисунок 20 - Динамика нарастания листьев пшеницы яровой сорта "Ульяновская - 105" (первый посев)

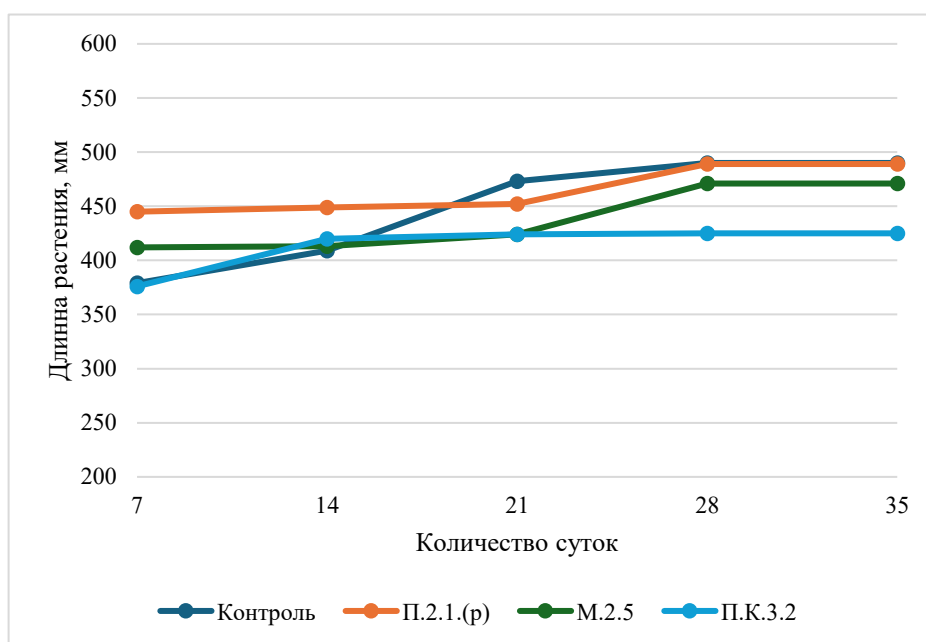


Рисунок 21 - Динамика нарастания листьев пшеницы яровой сорта "Ульяновская - 105" (второй посев)

Данные по содержанию хлорофилла представлены в форме таблицы

Таблица 15 – Содержание хлорофилла в листьях пшеницы яровой сорта "Ульяновская - 105" (первый посев), мг на 1 сырого веса

Вариант	Хлорофилл А	Хлорофилл Б	Каротиноиды
Контроль	0,119±0,000	0,123±0,007	0,009±0,003
М.2.5	0,171±0,013	0,131±0,013	0,029±0,001
П.К.3.2	0,187±0,017	0,168±0,008	0,023±0,003
П.2.1(р)	0,244±0,030	0,213±,072	0,026±0,014

При применении штаммов на яровой пшенице сорта «Ульяновская – 105» на всех вариантах наблюдалось увеличение содержания хлорофилла.

Таблица 16 – Содержание хлорофилла в листьях пшеницы яровой сорта "Ульяновская - 105" (второй посев), мг на 1 сырого веса

Вариант	Хлорофилл А	Хлорофилл Б	Каротиноиды
Контроль	1,058±0,009	0,563±0,008	0,169±0,001

М.2.5	0,764±0,057	0,417±0,035	0,108±0,007
П.К.3.2	0,796±0,341	0,410±0,175	0,115±0,052
П.2.1(р)	0,404±0,009	0,238±0,008	0,078±0,002

Во втором посеве при применении штаммов на яровой пшенице увеличение количества хлорофилла не наблюдалось.

3.5.2 Оценка влияния экспериментальных штаммов эндофитных бактерий на рост и развитие ярового ячменя сорта «Раушан» при опрыскивании в вегетационных опытах

Схема вегетационного опыта: 1 контроль и 3 вариантов опытов с нормой опрыскивания 1 л/га (2 повторности). Опрыскивание проводится при достижении фазы кущения. Расход рабочей жидкости – 200 л/га. Расход на 1 сосуд – 10 мл H₂O и 18 мкл биомассы штамма.

Учеты и наблюдения: Раз в неделю будут производиться биометрические исследования по динамике нарастания листьев. На фазе цветения будет измеряться содержания хлорофилла в листьях по методике, Lichrenthaler Н. К. (1987) и измерение сухой биомассы надземных и подземных органов. Растения будут выращиваться до фазы цветения (7-8 недель). Возможно завершение на стадии выход трубку.

Результаты:

Таблица 17 – Биометрические показатели вегетационных опытов ячменя ярового сорта «Раушан» (первый посев)

№ Образца	Длина надземной части, мм	Длина подземной части, мм	Количество листьев, шт	Сухая масса надземная, гр	Сухая масса подземная, гр
Контроль	419±91	115±32	8±2	1,88	0,19
П.2.1 (р)	496±70	197±54	7±1	3	0,27
М.2.5	525±88	168±41	7±1	2,6	0,26
ПК.3.2	492±115	118±47	7±1	2,8	0,27

Таблица 18 – Биометрические показатели вегетационных опытов
ячменя ярового сорта «Раушан» (второй посев)

№ Образца	Длина надземной части, мм	Длина подземной части, мм	Количество листьев, шт	Сухая масса надземная, гр	Сухая масса подземная, гр
Контроль	680±46	170±72	6±1,3	4,07	0,28
П.2.1 (р)	607±91	248±87	7±2	3,5	0,37
М.2.5	599±60	283±101,5	9±2	3,23	0,36
ПК.3.2	644±62	234±65,5	7±1,3	2,5	0,14

По результатам двух посевов наилучшее влияние на стимуляцию корневой системы ярового ячменя сорта «Раушан» оказали штаммы П.2.1 (р) и М.2.5

Динамика нарастания листьев представлена в виде рисунка 22.

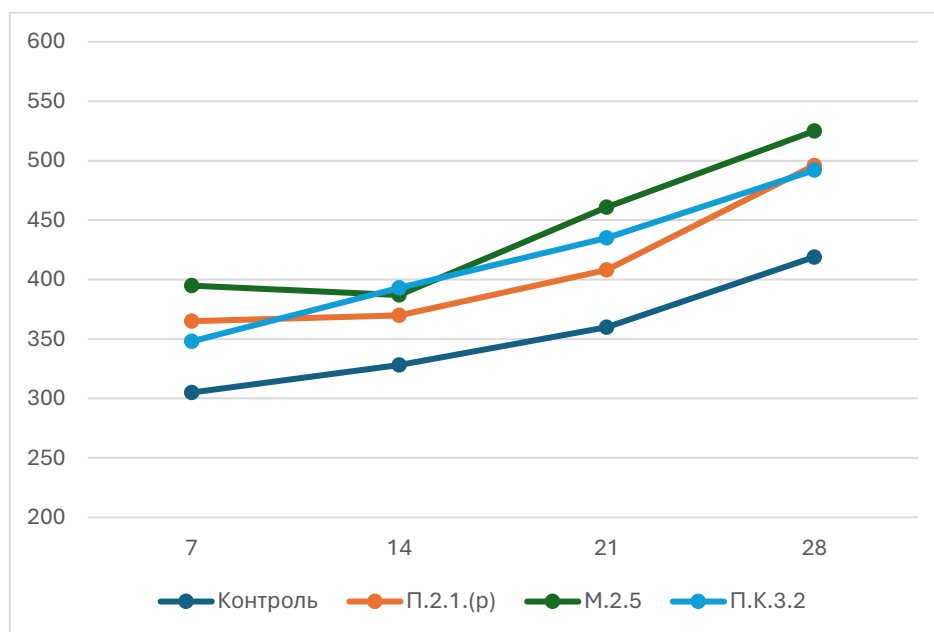


Рисунок 22 - Динамика нарастания листьев ячменя ярового сорта
"Раушан" (первый посев)

Динамика нарастания листьев представлена в виде рисунка 23.

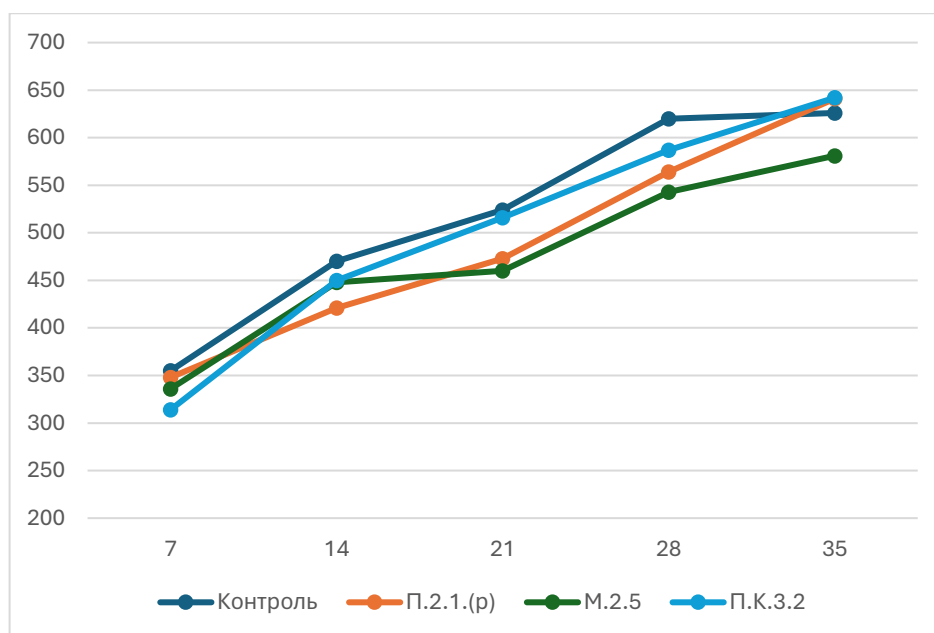


Рисунок 23 - Динамика нарастания листьев ячменя ярового сорта "Раушан" (второй посев)

Данные по содержанию хлорофилла представлены в форме таблицы 19-20.

Таблица 19 – Содержание хлорофилла в листьях ячменя ярового сорта «Раушан» (первый посев), мг на г сырого веса

Вариант	Хлорофилл А	Хлорофилл Б	Каротиноиды
Контроль	0,338±0,016	0,234±0,017	0,053±0,001
М.2.5	0,601±0,023	0,371±0,005	0,098±0,006
П.К.3.2	0,461±0,009	0,270±0,004	0,074±0,002
П.2.1.(p)	0,438±0,011	0,251±0,011	0,076±0,001

Таблица 20 – Содержание хлорофилла в листьях ячменя ярового сорта «Раушан» (второй посев), мг на г сырого веса

Вариант	Хлорофилл А	Хлорофилл Б	Каротиноиды
Контроль	0,515±0,127	0,277±0,066	0,071±0,018
М.2.5	0,786±0,148	0,373±0,072	0,158±0,030
П.К.3.2	0,729±0,178	0,407±0,092	0,096±0,027
П.2.1.(p)	0,936±0,137	0,503±0,080	0,121±0,018

По результатам двух посевов все варианты опытных штаммов оказали положительное влияние на увеличение концентрации хлорофилла в растениях.

3.5.3 Оценка влияния экспериментальных штаммов эндофитных бактерий на рост и развитие гороха сорта «Салават» при опрыскивании в вегетационных опытах.

Схема вегетационного опыта: 1 контроль и 3 вариантов опытов с нормой опрыскивания 1 л/га (2 повторности). Опрыскивание проводится при достижении фазы кущения. Расход рабочей жидкости – 200 л/га. Расход на 1 сосуд – 10 мл H₂O и 18 мкл биомассы штамма.

Учеты и наблюдения: Раз в неделю будут производиться биометрические исследования по динамике нарастания листьев. На фазе цветения будет измеряться содержания хлорофилла в листьях по методике, Lichrenthaler Н. К. (1987) и измерение сухой биомассы надземных и подземных органов. Растения будут выращиваться до фазы цветения (7–8 недель). Возможно завершение на стадии выход трубку.

Результаты:

Таблица 21 – Биометрические показатели вегетационных опытов гороха сорта «Салават».

№ Образца	Длина надземной части, мм	Длина подземной части, мм	Количество цветков, шт	Сухая масса надземная, гр	Сухая масса подземная, гр
Контроль	325±73	246±49	0,2±0,4	0,4	3,26
П.2.1 (р)	268±44,5	216±47	0,3±0,2	0,58	3,62
М.2.5	288±59	205±41	0,7±0,5	0,53	2,19
ПК.3.2	318±51	218±48	0,2±0,4	0,47	3,53

По результатам опрыскивания гороха положительное влияние на стимулирование роста подземной или надземной части не наблюдалось.

Динамика нарастания листьев представлена в виде рисунка 24.

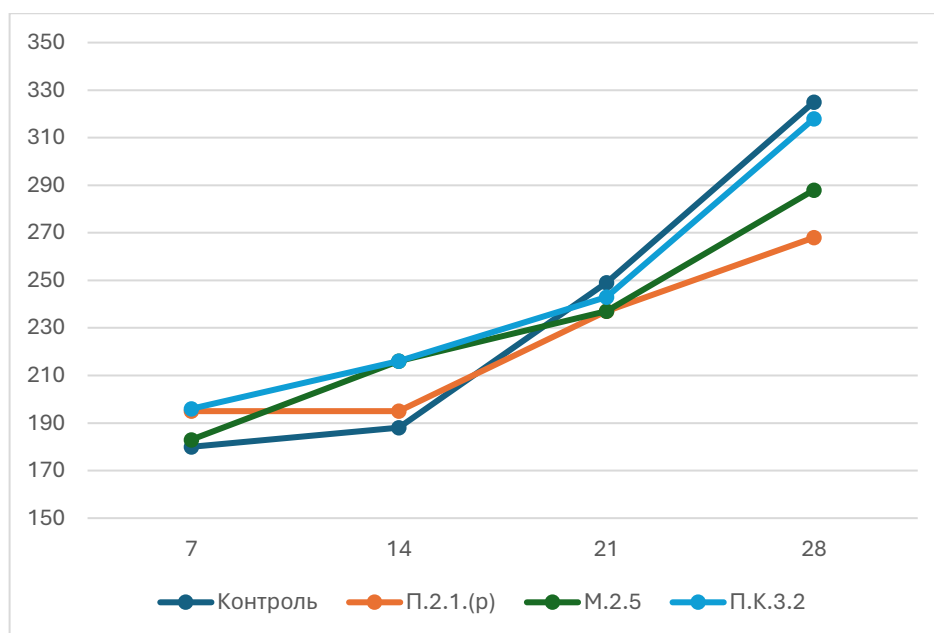


Рисунок 24 - Динамика нарастания листьев гороха сорта "Салават"

Данные по содержанию хлорофилла представлены в форме таблицы 22.

Таблица 22 – Содержание хлорофилла в листьях ячменя ярового сорта «Салават».

Вариант	Хлорофилл А, мг/г. сырого веса	Хлорофилл Б мг/г. сырого веса	Каротиноиды мг/г. сырого веса
Контроль	0,515± 0,013	0,470± 0,011	0,079 ± 0,003
М.2.5	0,385±0,009	0,307±0,005	0,078±0,002
П.К.3.2.	0,488±0,038	0,396±0,016	0,087±0,012
П.2.1.(p)	0,363±0,007	0,297±0,007	0,070±0,001

По результатам опрыскивания гороха сорта «Салават» положительного влияния на увеличение содержания хлорофилла не наблюдалось.

3.6 Исследование по оценке эффективности применения удобрений с микроорганизмами в полевых опытах

3.6.1 Данные урожайности ярового ячменя сорта «Раушан» с применением удобрений микроорганизмов

Таблица 23 – Урожайность ячменя ярового сорта «Раушан», 2023 г.

Вариант	Урожайность, т/га
Контроль	1
SOLAR	0,8
П.К.3.2 + SOLAR	1,5
М.2.5 + SOLAR	1,4
П.2.1 p + SOLAR	1,3
НСР₀₅	0,06 т/га

При оценке исследования эффективности применения удобрений на урожайность было незначительное увеличение урожайности на всех испытываемых вариантах. Наибольшим увеличением обладает вариант П.К.3.2 + SOLAR.

3.6.2 Данные по урожайности картофеля сорта «Ред Скарлет» с применением удобрений микроорганизмов.

Таблица 24 – Урожайность картофеля сорта «Ред Скарлет», 2023 г.

Вариант	Урожайность, т/га
Контроль	11,8
SOLAR	9,4
П.К.3.2 + SOLAR	14,7
М.2.5 + SOLAR	11,4
П.2.1p + SOLAR	10,6
НСР₀₅	0,176 т/га

При анализе результатов по урожайности картофеля с применением опытных вариантов удобрений микроорганизмов наблюдается увеличение урожайности на 3 тонны при применении удобрения П.К.3.2. + SOLAR.

3.7 Экономическая эффективность применения удобрений микроорганизмов

Экономическая эффективность играет очень важную роль при подсчете уровня рентабельности и значения чистого дохода. При подсчете экономической эффективности важно учитывать стоимость затрат как на производство удобрений микроорганизмов, так и различные дополнительные затраты, включающие в себя как затраты на обработку, так и на уборку дополнительной продукции.

Необходимо знать какой из вариантов применения удобрений наиболее выгоден и рентабелен, чтобы в дальнейшем можно было проводить рекомендации для производства.

3.7.1 Экономическая эффективность применения удобрений микроорганизмов на ячмене яровом сорта «Раушан»

Расчеты уровня рентабельности, чистого дохода, а также затрат на применения удобрений представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Экономическая эффективность применения удобрений на ячмене яровом сорта «Раушан», 2023 г.

Вариант	ПУ, т(ц)	СПУ, руб/га	Дополнительные затраты, руб/га				ЧД, руб/га	УР, %
			На закупку препарата	На обработку	На уборку дополнительно продукции	Всего (ДЗ)		
0	1	2	3	4	5	6	7	8
SOLAR	0,24	2400	800	400	240	1440	960	66
П.К.3.2 + SOLAR	0,45	4500	721	400	450	1571	2929	186
М.2.5 + SOLAR	0,42	4200	721	400	420	1541	2659	173
П.2.1 p + SOLAR	0,39	3900	721	400	390	1511	2389	158

Анализируя результаты экономической эффективности, можно сделать вывод, что наиболее рентабельным на ячмене сорта «Раушан» оказалось применение удобрений П.К.3.2 + SOLAR. Рентабельность в данном варианте составила 186%.

3.7.2 Экономическая эффективность применения удобрений микроорганизмов на картофеле сорта «Ред Скарлет»

Расчеты по культуре картофеля сорта «Ред Скарлет» представлены в таблице 26

Таблица 26 – Экономическая эффективность применения удобрений на картофеле сорта «Ред Скарлет», 2023 г.

Вариант	ПУ, т(ц)	СПУ, руб/га	Дополнительные затраты, руб/га				ЧД, руб/га	УР, %
			На закупку препаратов	На обработку	На уборку дополнительной продукции	Всего (ДЗ)		
0	1	2	3	4	5	6	7	8
SOLAR	2,82	36660	800	400	3666	4866	31794	653
П.К.3.2 + SOLAR	4,41	57330	721	400	5733	6854	50476	736
М.2.5 + SOLAR	3,42	44460	721	400	4446	5567	38893	698
П.2.1 p + SOLAR	3,18	41340	721	400	4134	5255	36085	686

Анализируя табличные данные по экономической эффективности применения опытных удобрений микроорганизмов на картофеле сорта «Ред Скарлет» можно сделать вывод, что, применяя удобрение П.К.3.2 + SOLAR можно получить наибольшую выгоду. Уровень рентабельности в данном случае составил 736%.

IV ЗАКЛЮЧЕНИЕ

4.1 Выводы

Анализ данных показывает нам, что лучше всех по трем культурам (пшеница, ячмень, горох) работает штамм П.2.1 (р) на основе бактерии *Bacillus licheniformis*.

На втором месте по положительным свойствам находится штамм М.2.5 на основе бактерии *Micrococcus endophyticus*, и наименьшее положительное влияние на стимуляцию роста корневой и надземной части растений оказывает штамм П.К.3.2 на основе бактерии вида *Priestia aryabhatai*.

Оценивая устойчивость штаммов к стрессовым факторам лучше всех, демонстрируют себя штаммы М.2.5 и П.К.3.2 на основе бактерий *Micrococcus endophyticus* и *Priestia aryabhatai*, и немного уступает им штамм П.2.1.(р) на основе бактерии вида *Bacillus licheniformis*.

При оценке исследования эффективности применения удобрений на урожайность ячменя ярового было получено незначительное увеличение урожайности на всех испытываемых вариантах. Наибольшим увеличением обладает вариант П.К.3.2 + SOLAR.

При анализе результатов по урожайности картофеля с применением опытных вариантов удобрений микроорганизмов наблюдается увеличение урожайности на 3 тонны при применении удобрения П.К.3.2. + SOLAR.

Анализируя результаты экономической эффективности, можно сделать вывод, что наиболее рентабельным как на ячмене сорта «Раушан», так и на картофеле сорта «Ред Скарлет» оказалось применение удобрений П.К.3.2 + SOLAR.

4.2 Рекомендации производству

На основе проведенной мной работы можно рекомендовать производству опрыскивание удобрением П.К.3.2 + SOLAR на основе бактерии *Priestia aryabhatai*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindow S.E., Brand I M.T. Microbiology of the phyllosphere. Appl. Environ. Microbiol., 2003, с. 69
2. Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J. Rhizoremediation: a beneficial plant—microbe interaction. Mol. Plant Microbe Interact., 2004, с. 6-15.
3. Berg G., Eberl L., Hartmann A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. Environ. Microbiol., 2005, с.7
4. Holliday P. A dictionary of plant pathology. Cambridge University Press, Cambridge, 1989
5. Schulz B., Boyle C. What are endophytes? In: Microbial root endophytes /B.J.E. Schulz, C.J.C. Boyle, T.N. Sieber (eds.). Springer-Verlag, Berlin, 2006, с. 1-13
6. Strobel G., Daisy B., Castillo U., Harper J. Natural products from endophytic microorganisms. J. Nat. Prod., 2004, с. 257-268
7. Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D.J., Dowling D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiol. Lett., 2008, с. 278
8. Каримова, Л. З. Биологическая защита растений от стрессов / Л. З. Каримова, В. А. Колесар. — 2-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2022. — ISBN 978-5-8114-9830-7. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/199505> (дата обращения: 09.01.2023). — Режим доступа: для авториз. пользователей. — С. 35.).
9. Гарипова, С.Р. Изучение бактериальных ассоциаций эндофитов клубеньков, способствующих увеличению продуктивности бобовых растений [Текст] / С.Р. Гарипова, Д.В. Гарифуллина, О.В. Маркова, Н.В. Иванчина, Р.М. Хайруллин // Агрехимия.2010. No 11. С. 50–58»
10. Злотников А.К., Новый бактериальный эндофит сельскохозяйственных культур [Текст] / А.К. Злотников, М.Л. Казакова, К.М.

Злотников, А.В. Казаков // С.х.биология. Сер. биология растений. 2006. No 3. С.62–66.

11. Ломоносовские научные чтения студентов, аспирантов и молодых учёных Высшей школы естественных наук и технологий САФУ – 2019: сборник материалов конференции : материалы конференции / составитель А. С. Волков. — Архангельск : САФУ, 2019. — 147 с. — ISBN 978-5-261-01441-6. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/161900> (дата обращения: 10.01.2023). — Режим доступа: для авториз. пользователей.

12. Максимов, И.В. Стимулирующие рост растений микроорганизмы как альтернатива химическим средствам защиты от патогенов (обзор) [Текст] / И.В. Макси-мов, Р.Р. Абизгильдина, Л.И. Пусенкова // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47., No 4. С. 373–385.

13. Гарипова, С.Р. Экологическая роль эндофитных бактерий в симбиозе с бобовыми растениями и их применение в растениеводстве [Текст] / С.Р. Гарипова // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132., No 5. С. 493–505

14. Квиспел А. Эволюционные аспекты симбиотических адаптаций: вклад *Rhizobium* в эволюцию ассоциации [Текст] / А. Квиспел // *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. Г. Спайнк, А.Кондороши, П. Хукас. СПб.: Бионт. 2002. С. 519–539

15. Reinhold-Hurek B., Hurek T. Living inside plants : bacterial endophytes // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2011. Vol. 14. P. 435–443.

16. Kovtunovych G., Lar O., Kamalova S., Kordyum V., Kleiner D., Koz-yrovska N. Correlation between pectate lyase activity and ability of diazotrophic *Klebsiella oxytoca* VN13 to penetrate plant tissues // *Plant Soil*. 1999. Vol. 215. P. 1–6.

17. Adriano-Anaya M., Salvador-Figueroa M., Ocampo J. A., Garcia-Romera I. Plant cell-wall degrading hydrolytic enzymes of *Gluconacetobacter diazotrophicus* // *Symbiosis*. 2005. Vol. 40. P. 151–156.

18. Monteiro R. A., Schmidt M. A., Baura V. A., Balsanelli E., Wassem R., Yates M. G., Randi M. A. F., Pedrosa F. O., De Souza E. M. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae) // *Gen. Mol. Biol.* 2008. Vol. 31. P. 932–937.
19. Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. F., Kleopfer J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops // *Can. J. Microbiol.* 1997. Vol. 43. P. 895–914.
20. Baldani J. I., Baldani V. L. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants : special emphasis on the Brazilian experience // *An.Acad. Bras. Cienc.* 2005. Vol. 77, No 3. P. 549–579
21. Elmerich C. Historical perspective : from bacterization to endophytes // *Asso-ciative and endophytic nitrogen- fixing bacteria and cyanobacterial associations* /eds. C. Elmerich, W. E. Newton. Dordrecht : Kluwer, 2007. P. 1–20
22. Федоненко, Ю. П. Гликополимеры ассоциативных микроорганизмов: фундаментальные и прикладные аспекты : монография / Ю. П. Федоненко, С. А. Коннова, Е. Н. Сигида ; под редакцией В. В. Игнатова. — Саратов : СГУ, 2018. — 128 с. — ISBN 978-5-292-04457-4. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/148844> (дата обращения: 10.01.2023). — Режим доступа: для авториз. пользователей.
23. Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Voikova N.V., Matora L.Y., Burygin G.L., Lobachev Y.V., Shchyogolev S.Y. Improved potato microclonal reproduction with the plant-growth promoting rhi-zobacteria *Azospirillum*. *Agron. Sustain. Develop.* 2015. 35. P. 1167–1174. DOI 10.1007/s13593-015-0304-3.
24. Применение ризосферных бактерий при микрклональном размножении картофеля : методические рекомендации / составители О. В. Ткаченко [и др.]. — Саратов : Саратовский ГАУ, 2021. — 44 с. — ISBN 978-5-00140-925-0. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/213677> (дата обращения: 10.01.2023). — Режим доступа: для авториз. пользователей.

25. Haggag, W. M. Role of entophytic microorganisms in biocontrol of plant diseases / Wafaa M. Haggag // *Life Science Journal*. – 2010. – Vol. 7(2). – P. 57-62
26. Köhl, J. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria / J. Köhl, J. Postma, P. Nicot, M. Ruocco, B. Blum // *Biological Control*. – 2011. – Vol.57. – P. 1–12.
27. Черемисин, А.И. Влияние стимуляторов роста и биофунгицидов на продуктивность микрорастений картофеля / А.И. Черемисин, И.А. Якимова // *Достижения науки и техники АПК*. – 2011. – №3. – С.26-29.
28. Afzal I., Shinwari Z. K., Sikandar S., Shahzad S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, hostrange and genetic determinants // *Microbiological Research*. 2019. Vol.221. P. 36–49.
29. Vandenkoornhuysen P., Quaiser A., Duhamel M., Le Van A. & Dufresne A. The importance of the microbiome of the plant holobiont // *New Phytol*. 2015. Vol. 206. P. 1196–1206.
30. Card S. D. et al. Beneficial endophytic microorganisms of Brassica—A review // *Biol. Control*. 2015. Vol. 90. P. 102–112
31. Shahzad R. A. et al. What Is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth // *Front. Plant Sci*. 2018. Vol. 9. P.24
32. Truyens S., Weyens N., Cuypers A. & Vangronsveld J. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants // *Environ. Microbiol. Rep*. 2015. Vol.7. P. 40–50.
33. Jeong S., Kim T. M., Choi B., Kim Y. and Kim E. Invasive *Lactuca serriola* seeds contain endophytic bacteria that contribute to drought tolerance // *Sci. Rep*. 2021. Vol.11. P. 1–12.
34. Hone H. et al. Profiling, isolation and characterisation of beneficial microbes from the seed microbiomes of drought tolerant wheat // *Sci Rep*. 2021. Vol.11. 11916.

35. Kanchan K. et al. Seed Endophytic Bacteria of Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* L.) Promote Seedling Development and Defend Against a Fungal Phytopathogen//*Frontiers in Microbiology*. 2021. Vol.11. 11916.
36. Akimoto-Tomiyama, C. Multiple endogenous seed-born bacteria recovered rice growth disruption caused by *Burkholderia glumae* // *Sci Rep*. 2021. Vol.11. P. 4177.
37. Gond S. K., Bergen M. S., Torres M. S. and White J. F. Jr. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize // *Microbiol. Res*. 2015. Vol.172. P.79–87.
38. Verma S. K., White J. F. Indigenous endophytic seed bacteria promote seedling development and defend against fungal disease in browntop millet (*Urochloa ramosa* L.) // *J. Appl. Microbiol*. 2018. Vol.124. P.764–778
39. Pitzschke A. Developmental peculiarities and seed-borne endophytes in quinoa: omnipresent, robust bacilli contribute to plant fitness// *Front. Microbiol*. 2016. Vol. 7. P.2
40. Soldan R. et al. Bacterial endophytes of mangrove propagules elicit early establishment of the natural host and promote growth of cereal crops under salt stress // *Microbiol. Res*. 2019. Vol. 223. P. 33–43.
41. Rodríguez C. E. et al. Heritability and functional importance of the *Setaria viridis* bacterial seed microbiome// *Phytobiomes J*. Vol. 4. P. 40–52.
42. Чеботарь В.К., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н., Масленникова С.Н., Заплаткин А.Н., Мальфанова Н.В. Эндофитные бактерии как перспективный биотехнологический ресурс и их разнообразие // *С.-х. биол., Сельхозбиология, S-h biol, Sel-hoz biol, Sel'skokhozyaistvennaya biologiya, Agricultural Biology*. 2015. №5. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/endofitnye-bakterii-kak-perspektivnyy-biotehnologicheskij-resurs-i-ih-raznoobrazie> (дата обращения: 11.01.2023).
43. Портал ИС ВОИС/WIPO IP PORTAL/ Поиск по национальным патентным фондам и фондам PCT. Электронный ресурс. – URL:

https://patentscope.wipo.int/search/ru/result.jsf?_vid=P12-LCTAES-13444 (дата обращения: 12.01.2023). — Режим доступа: для авториз. пользователей.

44. Активация биосинтеза стильбенов в культуре клеток винограда при помощи биопрепаратов на основе эндофитов дикорастущего винограда *Vitis amurensis* Rupr / О. А. Алейнова, Н. Н. Нитяговский, А. Р. Супрун, К. В. Киселев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2022. – Т. 58. – № 1. – С. 53-65. – DOI 10.31857/S0555109922010020. – EDN FKZXJE.

45. Дмитриева, Д. В. Влияние фитогормонов, продуцируемых бактериями, на рост растений / Д. В. Дмитриева, Е. С. Алешина, Е. А. Дроздова // Международный студенческий научный вестник. – 2022. – № 1. – С. 60. – EDN RPCIKZ.

46. Оценка различных сортов ячменя по эндофитной микрофлоре семян / Д. С. Афанасьева, А. А. Абрамова, П. А. Дмитриева [и др.] // Агробиотехнологии и цифровое земледелие. – 2022. – № 1. – С. 12-17. – DOI 10.12737/-2022-1-1-12-17. – EDN OIOSIL.

47. Ванькова, А. А. Эндофиты плодов яблони / А. А. Ванькова, А. С. Шабля, Л. А. Свиридова // Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов : Сборник тезисов Всероссийской школы-конференции, Санкт-Петербург, 22–23 июня 2022 года. – Москва: Издательство "Перо", 2022. – С. 85-86. – EDN YDIPGZ.

48. Эффективность применения эндофитных биопрепаратов и азотного удобрения / А. А. Алферов, Л. С. Чернова, А. А. Завалин, В. К. Чеботарь // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2017. – № 5. – С. 21-24. – EDN ZWIEZP.

49. Микробные препараты на основе эндофитных и ризобактерий, которые перспективны для повышения продуктивности и эффективности использования минеральных удобрений у ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) и овощных культур / В. К. Чеботарь, А. Н. Заплаткин, А. В. Щербаков [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51. – № 3. – С. 335-342. – DOI 10.15389/agrobiology.2016.3.335rus. – EDN WJCSC

ПРИЛОЖЕНИЯ
ЭНДОФИТЫ ИЗ СЕМЯН

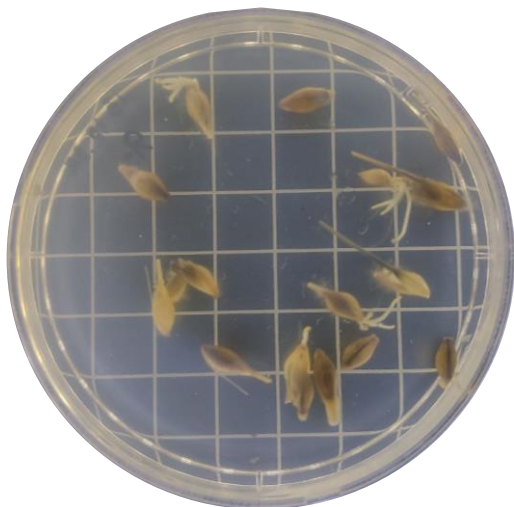


Рис.1 – Эндифиты семян ячменя «Ергень»

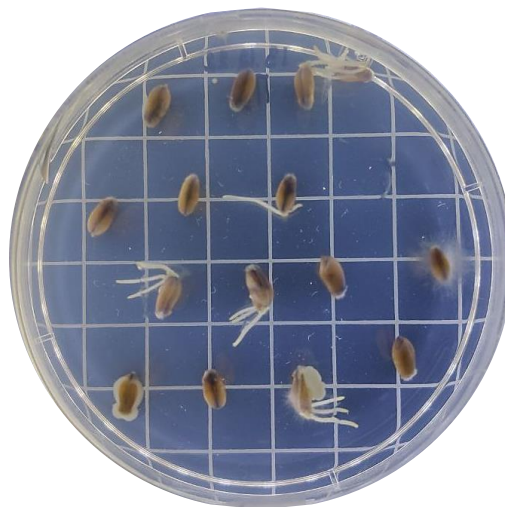


Рис.4 – Эндифиты семян пшеницы «Памяти Коновалова»

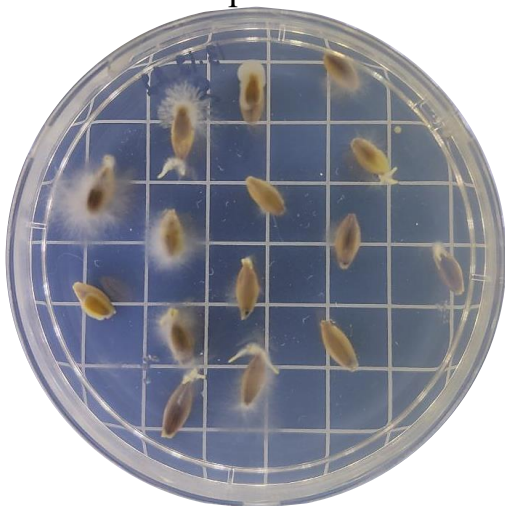


Рис.2 – Эндифиты семян ячменя «Раушан»

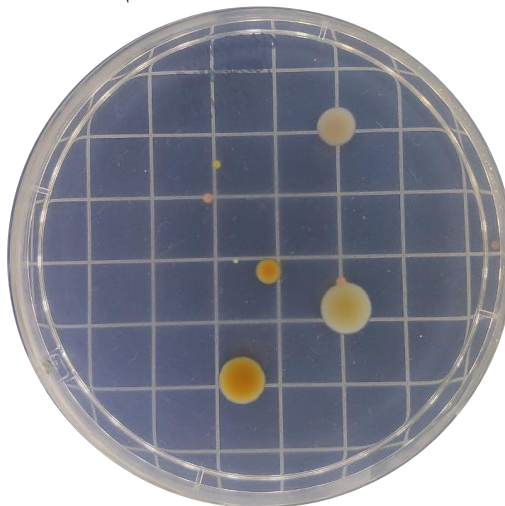


Рис.5 – Эндифиты семян растения мятлика

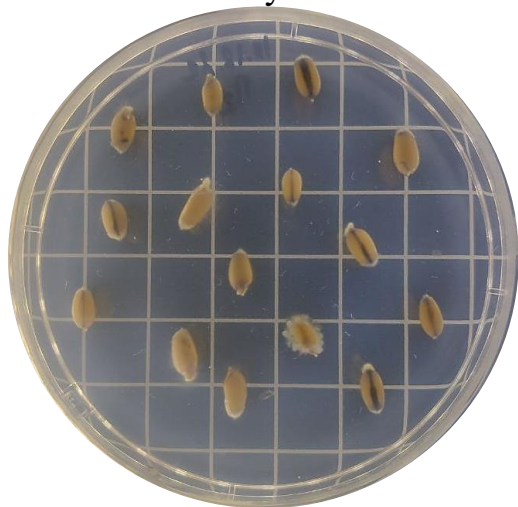


Рис.3 – Эндифиты семян пшеницы «Йолдыз»

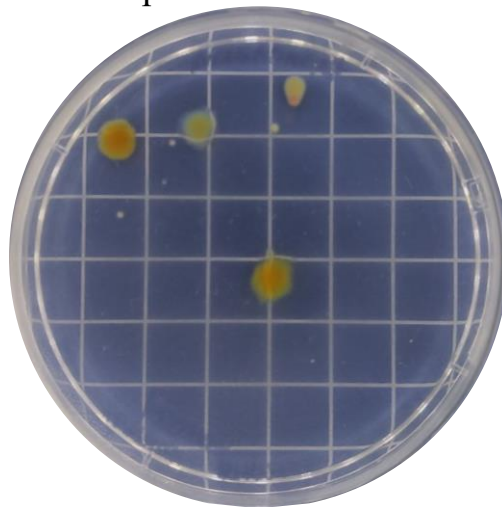


Рис.6 – Эндифиты семян растения мятлика

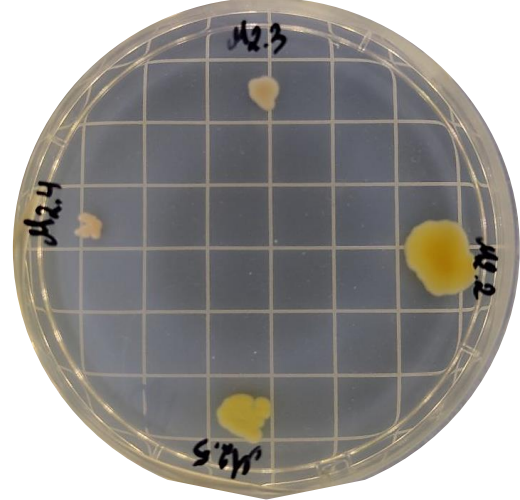
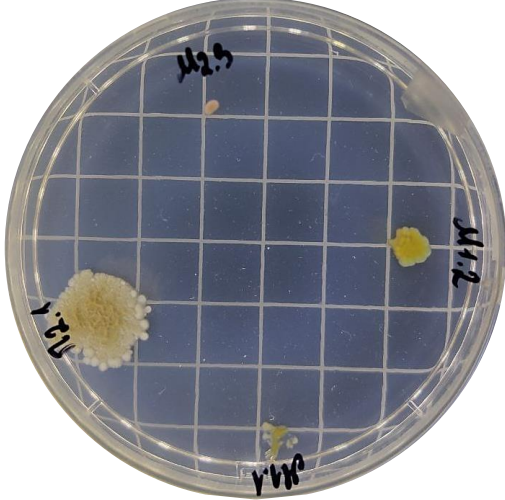
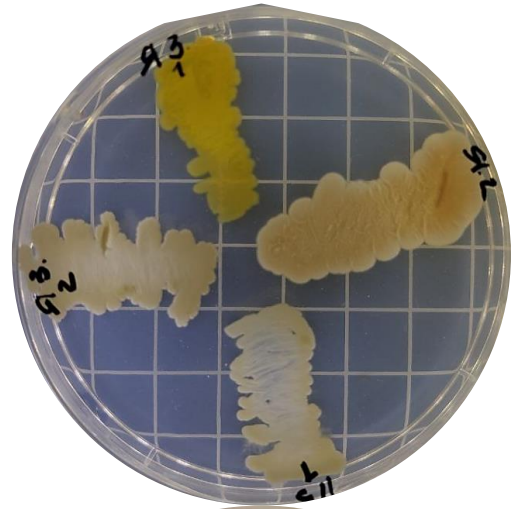
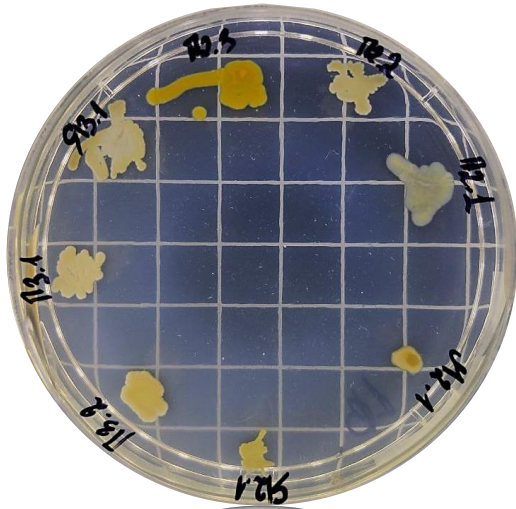
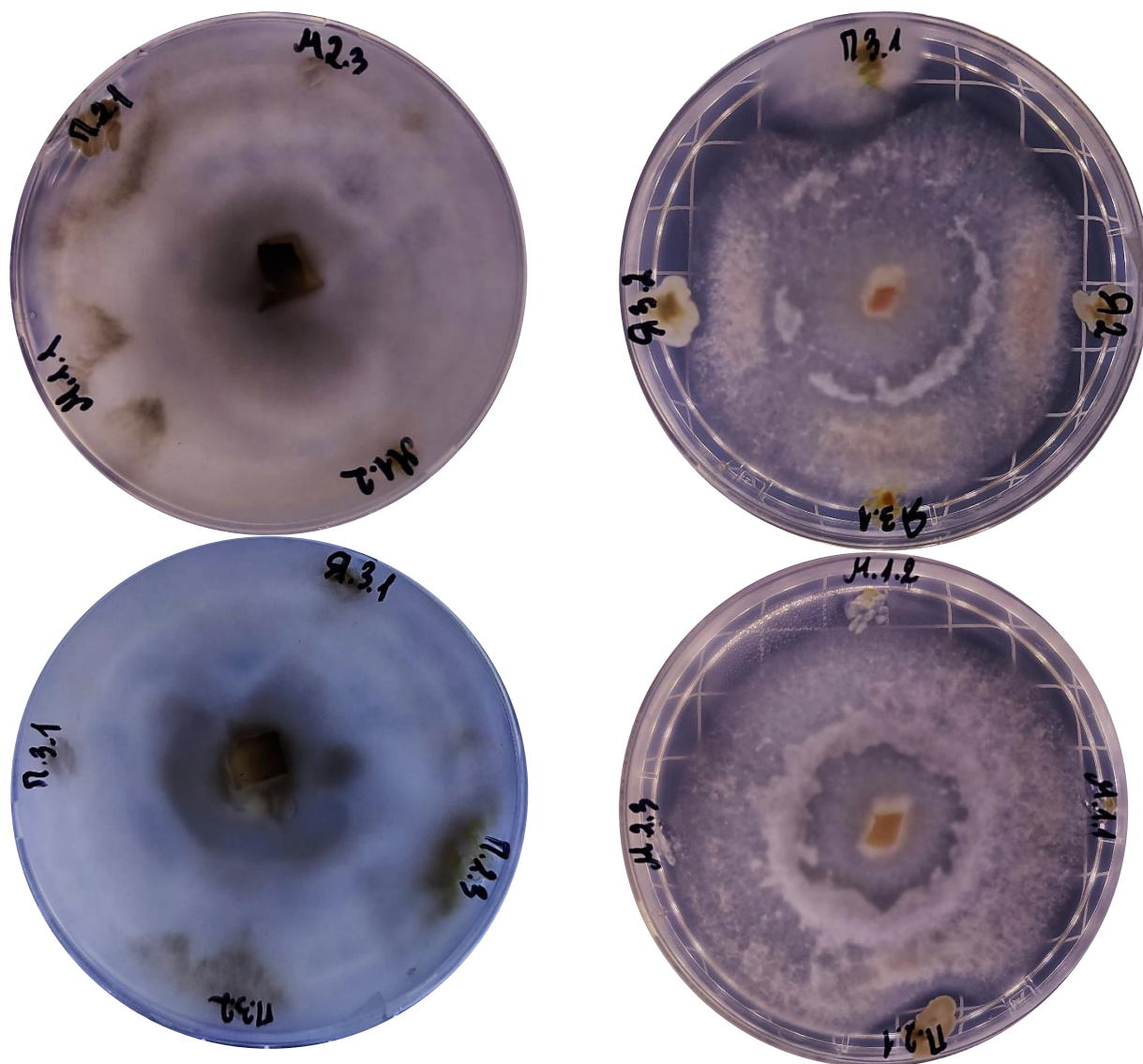


Рис.7 – Чистые культуры с колониями полученных эндофитов из семян

Рис.8 – Чистые культуры с колониями полученных эндофитов из семян

АНТАГОНИЗМ К ФИТОПАТОГЕННЫМ ГРИБАМ



6. Рис.15 – Антагонизм к *Alternaria sp* и *Fusarium sp*.

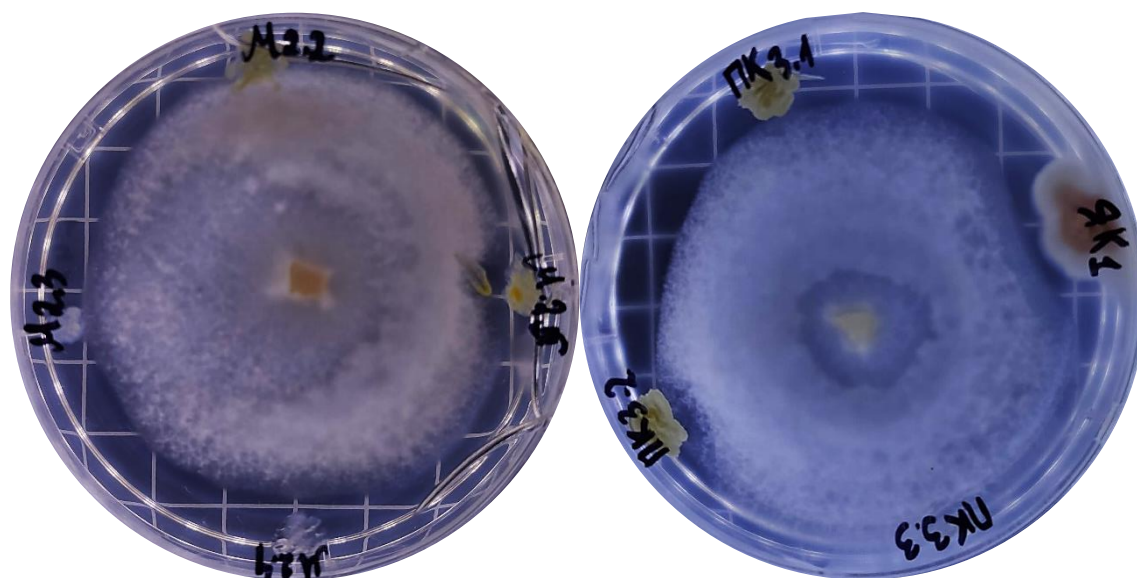
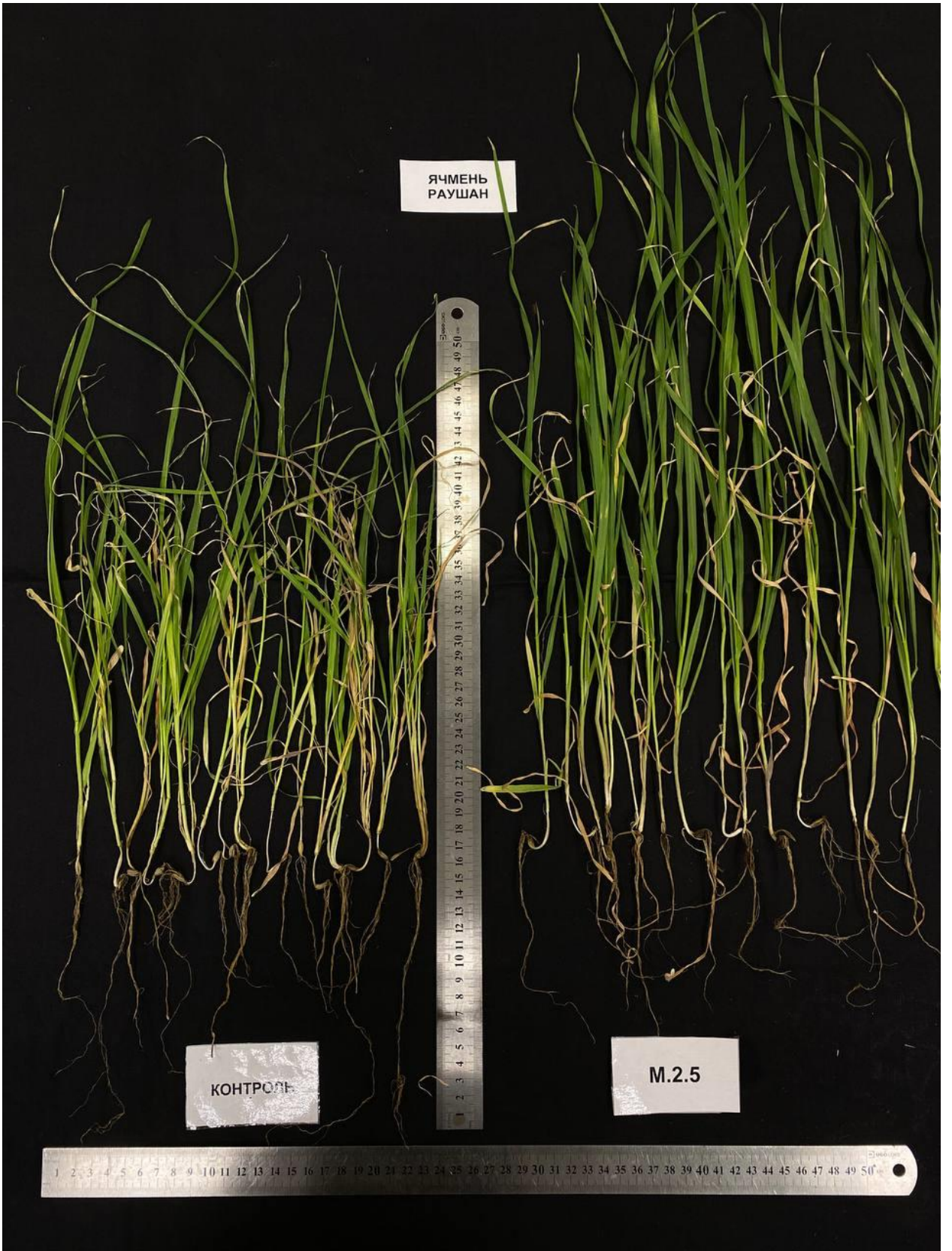


Рис.16 – Антагонизм к *Fusarium sp*.

ВЕГЕТАЦИОННЫЕ ОПЫТЫ







РАСЧЕТ ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЯЧМЕНЯ СОРТА «РАУШАН»

Потери от болезней и вредителей составляют 30%

Урожайность без применения пестицидов =

$$0,8 * 0,7 (70\%) = 0,56$$

Расчет экономической эффективности проводится по следующим формулам: SOLAR

1. ПУ(графа 1) = $0,8 - 0,56 = 0,24$ ц

2. СПУ(графа 2) = $0,24 * 10000 = 2400$ руб

3. Закупка препаратов =

СОЛАР – 1 л x 800 руб/л = 800 руб

На обработку: Опрыскивание: 400 руб/на x 1 = 400 руб/га

Итого: 1200 руб/га

На уборку дополнительной продукции: СПУ x 10% = 2400 x 10% = 240 руб

Общая сумма дополнительных затрат: $4596 + 866 + 511 = 5973$ руб

4. ЧД (графа 7) = СПУ (графа 2) – ДЗ (графа 6). = $2400 - 1440 = 960$ руб

5. УР (графа 8) = $ЧД / ДЗ * 100. = 960 / 1440 * 100 = 66$

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ПОЛЕВОГО ОПЫТА

Культура: яровой ячмень

Сорт: Раушан

Схема опыта:

1. Контроль – без обработки;
2. Некорневая подкормка удобрением;
3. Некорневая подкормка удобрением + биопрепарат 1
4. Некорневая подкормка удобрением + биопрепарат 2
5. Некорневая подкормка удобрением + биопрепарат 3

Общая площадь деланки: 25 м², повторность четырехкратная (на каждый вариант по 100 м²).

Размещение деланок

					4 повторность
					3 повторность
					2 повторность
					1 повторность
1	2	3	4	5	

Варианты

Сроки обработки: колошение (расход рабочей жидкости – 200 л/га)

Концентрация рабочего раствора удобрения: 10 г/л (ВРУ Solar 11:14:11 99% удобрения + 1% биомассы)

Количество наносимой биомассы: 1% от сухой массы удобрения

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ПОЛЕВОГО ОПЫТА:

Культура: картофель

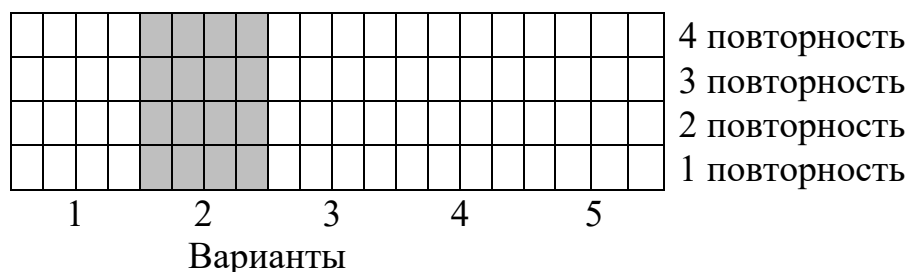
Сорт: Ред Скарлетт

Схема опыта:

1. Контроль – без обработки;
2. Некорневая подкормка удобрением;
3. Некорневая подкормка удобрением + биопрепарат 1
4. Некорневая подкормка удобрением + биопрепарат 2
5. Некорневая подкормка удобрением + биопрепарат 3

Общая площадь делянки: 28 м² (у картофеля делянка из 4 рядков с междурядьями 70 см, длина 10 м), повторность четырехкратная (на каждый вариант по 112 м²).

Размещение делянок



Сроки обработки: полные всходы (10-15 см) и бутонизация-цветение (расход рабочей жидкости – 300 л/га).

Концентрация рабочего раствора удобрения: 10 г/л

Количество наносимой биомассы: 1% от сухой массы удобрения

СПРАВКА

Казанский Государственный Аграрный
Университет









о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

Автор работы: Малышкина П.А.
Самоцитирование
рассчитано для: Малышкина П.А.
Название работы: ВКР М121-01 Малышкина П.А.
Тип работы: Магистерская диссертация
Подразделение: кафедра Общего земледелия, защиты растений и селекции

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

СОВПАДЕНИЯ		26.9%	СОВПАДЕНИЯ		34.97%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ		65.03%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ		65.03%
ЦИТИРОВАНИЯ		0%	ЦИТИРОВАНИЯ		0%
САМОЦИТИРОВАНИЯ		8.07%	САМОЦИТИРОВАНИЯ		0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 30.05.2024

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 30.05.2024 09:25

Структура документа: Проверенные разделы: основная часть с.2-3, 5-45

Модули поиска: Перефразирования по коллекции IEEEE; СПС ГАРАНТ: аналитика; Переводные заимствования*; ИПС Адилет; IEEEE; Библиография; Шаблонные фразы; Цитирование; Диссертации НББ; Кольцо вузов; Перефразирования по коллекции издательства Wiley; Переводные заимствования издательства Wiley; Переводные заимствования IEEEE; Издательство Wiley; Перефразирования по Интернету (EN); Медицина; Патенты СССР, РФ, СНГ; Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования); СМИ России и СНГ; Публикации eLIBRARY; Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Коллекция НБУ; Сводная коллекция ЭБС; Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация; Публикации РГБ;

Работу проверил: Сафин Радик Ильясевич

ФИО проверяющего

Дата подписи:

Подпись проверяющего



Чтобы убедиться
в подлинности справки, используйте QR-код,
который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.