

ФГБОУ ВО «Казанский государственный аграрный университет»

Институт агrobiотехнологий и землепользования

Направление 35.03.04 Агрономия

Профиль «Защита растений»

Кафедра общего земледелия, защиты растений и селекции

ОТЧЕТ

о производственной технологической практики в

Центре Агробиотехнологических Исследований при КГАУ

студента М121-01 группы Мамышкиной Полины Александровны
(Ф.И.О.)

Мам

(подпись, дата)

«Проверен и допущен к защите»

Руководитель практики от кафедры

проф. Шаймуратовский А.И.
(должность, Ф.И.О.)

Шаймуратовский А.И.
(подпись, дата)

Отчет защищен « отлично », _____

(оценка)

дата

Члены комиссии: д.с.х.н. проф. Ямшев М.А.
(должность, Ф.И.О.)

Ямшев М.А.

д.с.х.н. проф. Шаймуратовский А.И.
(должность, Ф.И.О.)

Шаймуратовский А.И.

асс. Семенов А.Т.
(должность, Ф.И.О.)

Семенов А.Т.

Казань, 20 23 г.

М1
6.09.23
М

МЕСТО ПРОХОЖДЕНИЯ ПРАКТИКИ

1. ФГБУ ЦАИ Казанского ГАУ
полное наименование организации, в которой проводится практика

Район Республика Татарстан почтовое отделение 420015

Республика, область, край г. Казань, ул. Ферма - 2,53

2. Производственное направление хозяйства _____

3. Расстояние _____ км. от _____
наименование железнодорожной станции или пристани

РУКОВОДИТЕЛЬ ПРАКТИКИ

4. От университета проф. Шаймуратов Ф.И.
должность, фамилия, имя и отчество

5. От профильной организации руководитель ЦАИ, Ашва Т.Н.
должность, фамилия, имя и отчество

ОТМЕТКА О ПРИЫТИИ И ВЫБЫТИИ СТУДЕНТА

6. Дата приезда на практику « 14 » апреля 2023 г.

(М.П.) Ашва Т.Н.
подпись, фамилия, имя и отчество руководителя с/х организации

7. Дата отъезда с места практики « 21 » июня 2023 г.

(М.П.) Ашва Т.Н.
подпись, фамилия, имя и отчество руководителя с/х организации



Оглавление

1 ВВЕДЕНИЕ.....	3
1.2 Характеристика предприятия	3
2 ВЫДЕЛЕНИЕ РАБОЧЕЙ КОЛЛЕКЦИИ ШТАММОВ	6
2.1 Отбор семян ячменя и пшеницы различных сортов.....	6
2.2 Выделение эндофитных микроорганизмов из семян и растений сельскохозяйственных культур	6
2.3 Определение КОЕ различных штаммов микроорганизмов в семенах сельскохозяйственных культур	7
2.4 Выявление наличия антагонизма к фитопатогенным грибам у выделенных из семян микроорганизмов	8
2.5 Выделение микроорганизмов из корней сельскохозяйственных культур, определение их КОЕ.....	8
2.6Выявление наличия антагонизма к фитопатогенным грибам у выделенных из корней микроорганизмов.....	9
3 ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ.....	10
3.1 Оценка полученных штаммов методом окрашивания по Граму	10
3.2 Оценка биологической активности штаммов бактериальных микроорганизмов.....	11
3.3 Оценка устойчивости штаммов эндофитных бактерий совместно с минеральными удобрениями к свету	12
3.4 Оценка устойчивости штаммов эндофитных бактерий к разным температурным режимам	13
3.5. Оценка устойчивости штаммов к солевым растворам NaCl разной концентрации.....	15
4 ПРОВЕДЕНИЕ СЕКВЕНАЦИИ ШТАММОВ.....	19
5 ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ ПО ПРАКТИКЕ И ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО ЕЕ УЛУЧШЕНИЮ.....	20
6 ПРИЛОЖЕНИЕ	21
7 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	29

1 ВВЕДЕНИЕ

1.2 Характеристика предприятия

Основной задачей Центра агроэкологических исследований является оказание квалифицированной помощи аграриям в увеличении конкурентоспособной качественной сельскохозяйственной продукции на российском и международном рынках путем внедрения инновационных технологий.

Лаборатории Центра оснащены самым современным оборудованием для проведения полного спектра анализов, подтверждающих качество семенного материала, зерна и продуктов его переработки, меда, кормов для животных, почвы и удобрений.

В Центре проводятся исследования биохимических и физиологических показателей растений, испытания на фитотоксичность средств защиты растений, молекулярная диагностика фитопатогенов, определение ГМО в семенах и продукции, фитоэкспертиза семян, почвы, растений и другие исследования.

Кроме того, в рамках работы Центра проводятся лабораторные исследования: ПЦР-диагностика, измерение содержания хлорофилла на спектрофотометре, вегетационные опыты, микробиологические анализы, измерение биометрических заболеваний, фитоэкспертиза семян.

В состав Центра агроэкологии входят лаборатории:

1. Лаборатория молекулярно-генетических исследований
2. Лаборатория микробиологии и фитопатологии
3. Лаборатория физиологии и биохимии растений.

Центр располагается по адресу: Республика Татарстан, город Казань, улица Ферма-2, дом 53, здание агрономического факультета Казанского Государственного Аграрного Университета.

В ведении лаборатории имеются опытные поля, располагающиеся по адресу: Республика Татарстан, село Нармонка Лаишевского района.

Село Нармонка находится южнее от республиканского центра города Казани на расстоянии 40 км. Сообщение с Казанью проходит по автотрассе регионального значения. До реки Волга – 12 км, до реки Меша 1 км. Является центром сельского поселения.

Рельеф - равнина с наклоном с Севера на Юг высотой 75...190 м. Почвы - преимущественно светло-серые, серые и тёмно-серые лесные, дерново-подзолистые.

Сегодня институт агробιοтехнологий и землепользования состоит из 5 кафедр: агрохимии и почвоведения (заведующий кафедрой – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент Миникаев Р.В.); общего земледелия, защиты растений и селекции (заведующий кафедрой – доктор сельскохозяйственных наук, профессор Сафин Р.И.); растениеводства и плодовоовощеводства (заведующий кафедрой - доктор сельскохозяйственных наук, профессор Амиров М.Ф.); землеустройства и кадастры (заведующий кафедрой – доктор сельскохозяйственных наук, профессор Сафиоллин Ф.Н.); кафедра биотехнологии, животноводства и химии (заведующий кафедрой - кандидат сельскохозяйственных наук, доцент Шайдуллин Р.Р.).

В институте в настоящее время работают 40 преподавателей, среди них 13 докторов наук, в том числе 2 члена – корреспондента Академии наук Республики Татарстан (Р.И. Сафин, Ф.З. Кадырова), член Нью-Йоркской академии (В.М. Пахомова) и 25 кандидатов.

Следую лучшим традициям научных и педагогических школ, институт продолжает развиваться. С 2011 года по новым федеральным государственным стандартам в институте ведется подготовка бакалавров по направлениям агрономия – профили агрономия, защита растений, селекция и генетика сельскохозяйственных культур, агробизнес, по направлению «агрохимия и агропочвоведение» - профили агрохимия и агропочвоведение, агроэкология, по направлению «садоводство» - профиль декоративное садоводство и ландшафтный дизайн, по направлению «технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции» - профили

технология производства и переработки продукции растениеводства, технология производства и переработки продукции животноводства, по направлению «землеустройства и кадастры» - профили землеустройство, земельный кадастр.

С 2008–2016 года факультетом руководил кандидат сельскохозяйственных наук, доцент Миникаев Рагат Вагизович.

В настоящее время директор института - доктор сельскохозяйственных наук, профессор Сержанов Игорь Михайлович.

2 ВЫДЕЛЕНИЕ РАБОЧЕЙ КОЛЛЕКЦИИ ШТАММОВ

2.1 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.

2.2 Выделение эндофитных микроорганизмов из семян и растений сельскохозяйственных культур

Для выделения эндофитов, отбирали по 15 штук семян каждого сорта, производили их поверхностную стерилизацию с использованием 70% этилового спирта, 4% раствора гипохлорита натрия, 10% раствора ДСН. Стерилизованные семена высаживали стерильными пинцетами в ламинарном боксе на агаризованную среду LB с содержанием флуконазола (Вертекс) 100 мг/л. Семена 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 и 14 суток определяли морфологическое разнообразие колоний микроорганизмов и количество колоний, выросших из 15 штук семян и 1г растений мятлика.

Результаты:

Отмечено разновидностей колоний микроорганизмов с семян ячменя, пшеницы и растений мятлика по некоторым чашкам.

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

2.3 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 (номера разновидностей колоний микроорганизмов совпадают с предыдущим опытом):

Результаты:

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*10 ⁴
4	П.2.1 (р)	Йолдыз	Молочные, блестящие	4*10 ⁴
5	П2.2	Йолдыз	Белая, блестящая	2*10 ⁴
6	П2.3	Йолдыз	Оранжевая, блестящая	2*10 ⁴
7	П3.1	Памяти Коновалова	Белые, блестящие	1,4*10 ⁵
8	П3.2	Памяти Коновалова	Желтоватые, блестящие	6*10 ⁴
9	М1.1	Мятлик	Ярко оранжевые, блестящие	4*10 ⁴
10	М1.2	Мятлик	Желтоватые, блестящие	6*10 ⁴
11	М1.3	Мятлик	Розовая мелкая, блестящая	2*10 ⁴
12	М2.1	Мятлик	Ярко-оранжевая, блестящая	4*10 ⁴
13	М2.2	Мятлик	Светло-желтая, блестящая	2*10 ⁴
14	М2.3	Мятлик	Светло-розовая, блестящая	2*10 ⁴
15	М2.4	Мятлик	Маленькая, розовая	6*10 ⁴
16	М2.5	Мятлик	Маленькая, желтая	2*10 ⁴

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

На чашки Петри с питательной средой Чапека («Биокомпак») высадили фитопатогенные грибы видов: *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*. Грибы сажали, помещая их ровно по центру чашки. По краям чашки вокруг гриба посадили все, выделенные из семян разновидности микроорганизмов. После этого чашки Петри инкубировали в течение 5 суток при $t = 28^{\circ}\text{C}$. Через 5 суток определяли проявление у бактерий антагонизма к грибам, визуально, по способности бактерий ограничивать рост гриба.

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.*;

2.5 Выделение микроорганизмов из корней сельскохозяйственных культур, определение их КОЕ

Для выделения эндофитов из корней, семена ячменя и пшеницы всех исследуемых сортов выращивали в рулонах со стерильной водой в течение 7 суток. Затем, корни отбирали по 1 грамму, тщательно промывали, подсушивали, взвешивали. Корни поверхностно стерилизовали с использованием 70% этилового спирта, 4% раствора

гипохлорита натрия, 10% раствора ДСН. Затем стерильно в ламинаре промывали стерильной чистой водой. После чего промытые корни в ламинаре растирали с использованием ступок и пестиков. Полученную суспензию отбирали в стерильные пробирки и заливали PBS буфером в количестве 1:10, 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 $t=28^{\circ}\text{C}$. Через 2 суток определяли морфологию колоний выросших на чашках, а так же число КОЕ всех полученных колоний. Всего выделено 4 разновидностей колоний эндофитов корней.

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	$6 \cdot 10^4$

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

На чашки Петри с питательной средой Чапека («Биокомпакс») высадили фитопатогенные грибы видов: *Fusarium*, *Aspergillus*. Грибы сажали, помещая их ровно по центру чашки. По краям чашек вокруг гриба посадили все, выделенные из корней разновидности микроорганизмов. После этого чашки Петри инкубировали в течение 5 суток при $t = 28^{\circ}\text{C}$. Через 5 суток определяли проявление у бактерий антагонизма к грибам, визуально, по способности бактерий ограничивать рост гриба.

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 ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ

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

3.1 Оценка полученных штаммов методом 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.

Результаты микропирования:

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 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 ВМ 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	-	-	-	-

3.3 Оценка устойчивости штаммов эндофитных бактерий совместно с минеральными удобрениями к свету

Для проведения опыта будут использовано минеральное удобрение (solar) и штаммы эндофитных бактерий. Минеральные удобрения, в количестве 10 грамм будут помещены в стерильную чашку Петри и на их поверхность будет произведено нанесение опытных штаммов бактерий, в объеме 100 мкл. (1% от массы удобрения). Чашки с готовыми образцами будут помещены в освещенное естественным светом помещение при средней температуре 20 - 25⁰С

Результаты:

Таблица 6 – Устойчивость штаммов эндофитных бактерий совместно с минеральными удобрениями к свету.

Точка отбора	Solar «Универсал»+1% биомассы			Solar «Универсал» без биомассы
	М.2.5	П.К.3.2	П.2.1.(р)	
0 суток	8×10^3	$4,2 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	0
7 суток	4×10^3	$6,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^4$	0
14 суток	8×10^3	$8,4 \times 10^4$	$4,6 \times 10^5$	0
30 суток	0	0	0	0
45 суток	0	0	0	0

3.4 Оценка устойчивости штаммов эндофитных бактерий к разным температурным режимам

Для проведения опыта будут использованы опытные штаммы 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.

Рисунок 1 – устойчивость исследуемых штаммов к температуре 0 °С

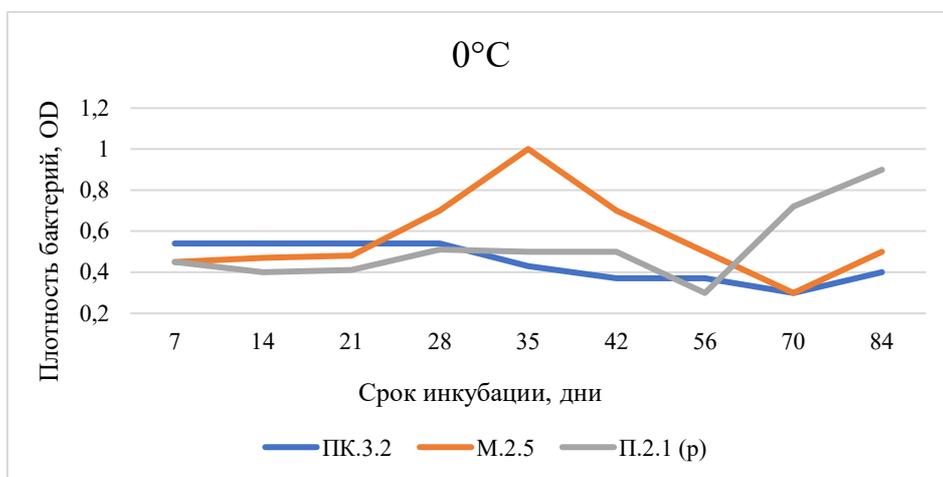


Рисунок 2 – устойчивость исследуемых штаммов к температуре +5 °С

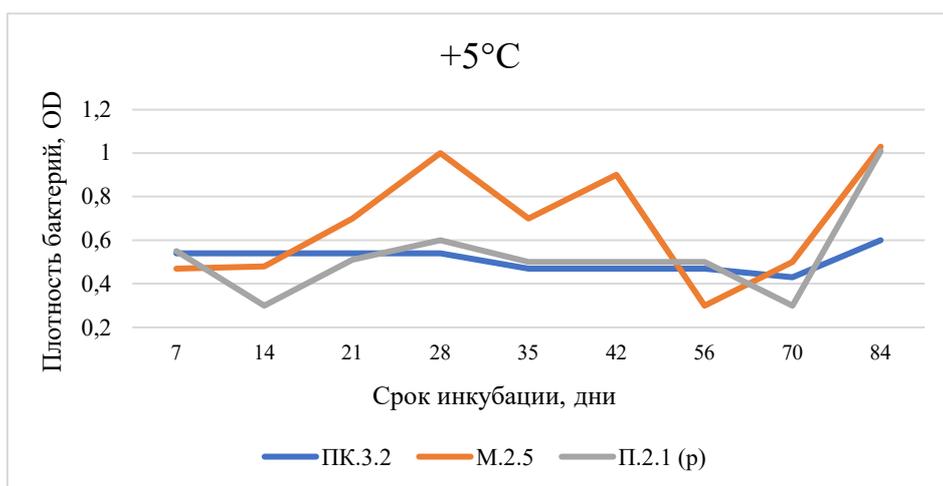


Рисунок 3 – устойчивость исследуемых штаммов к температуре +15 °С

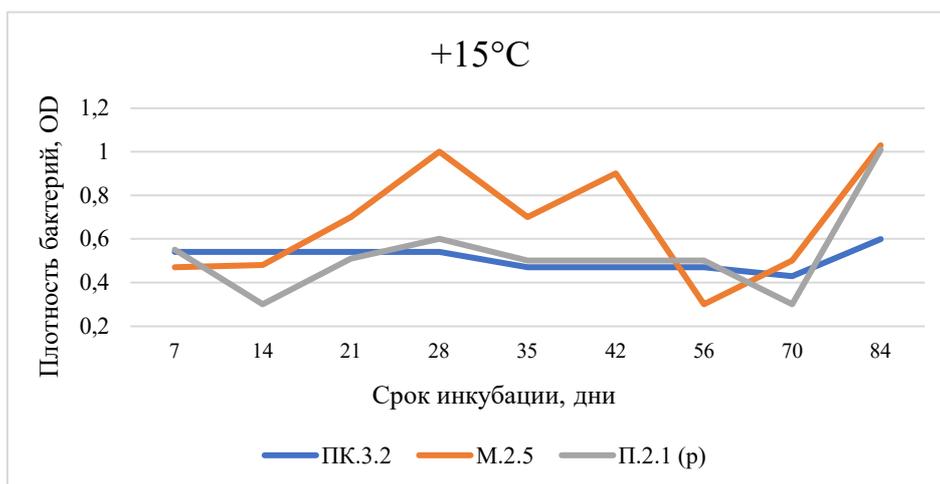


Рисунок 4 – устойчивость исследуемых штаммов к температуре +25 °С

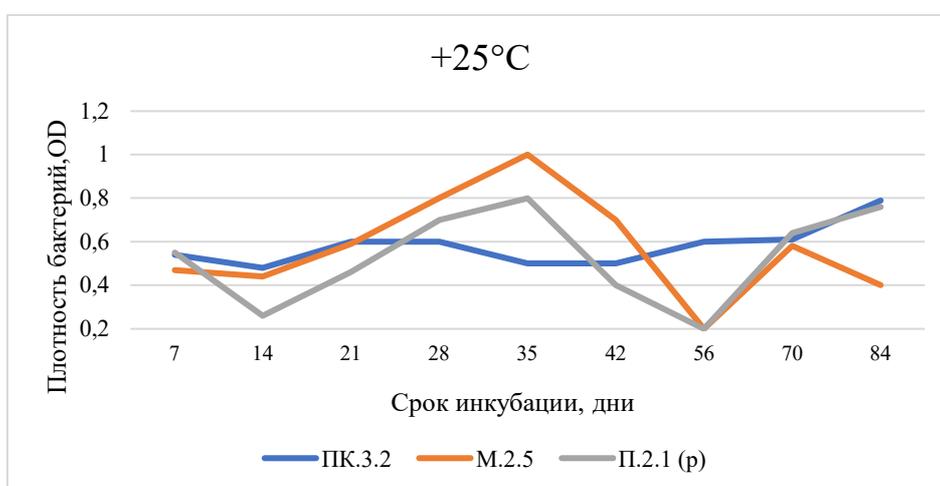
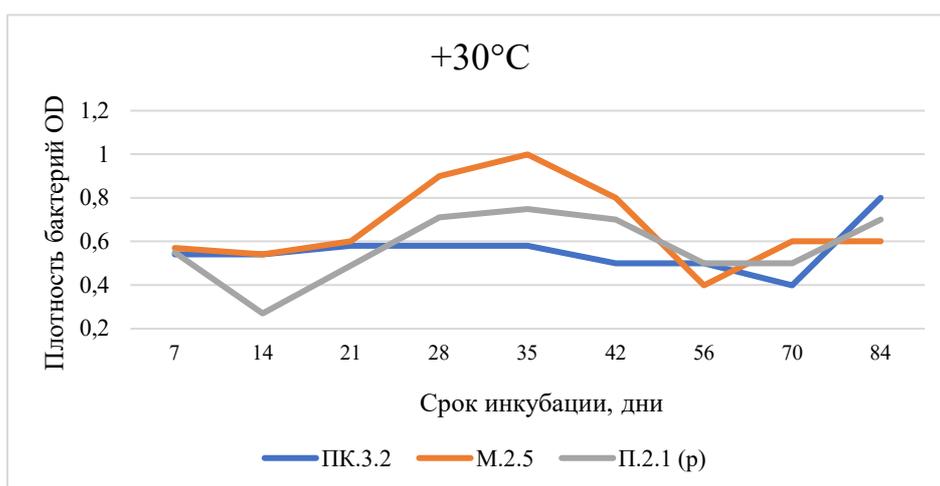


Рисунок 5 – устойчивость исследуемых штаммов к температуре +30 °С



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.

3.5. 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:

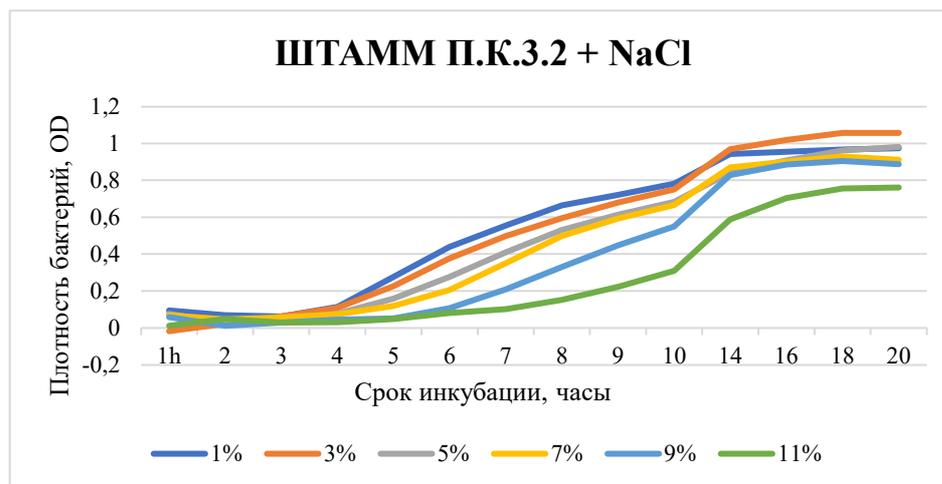


Рисунок 6 – Влияние солевого раствора разной концентрации на штамм П.К.3.2.

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.

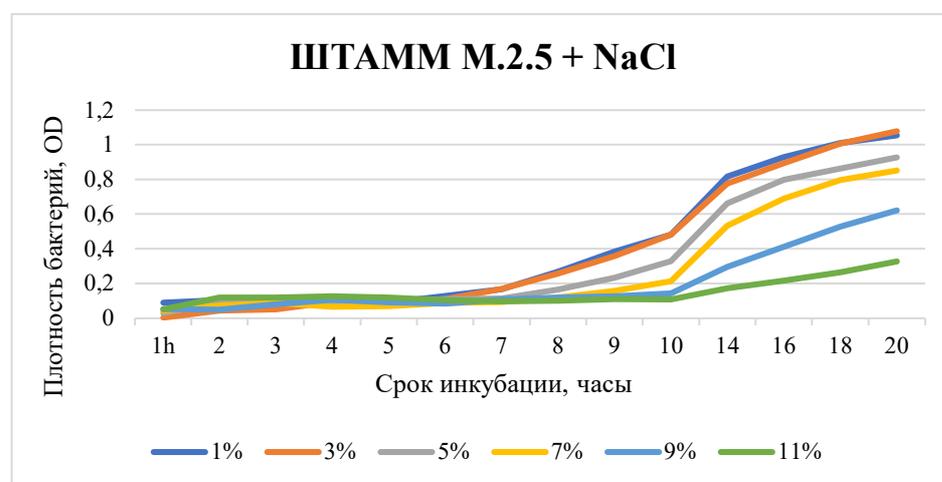


Рисунок 7 – Влияние солевого раствора разной концентрации на штамм М.2.5

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.

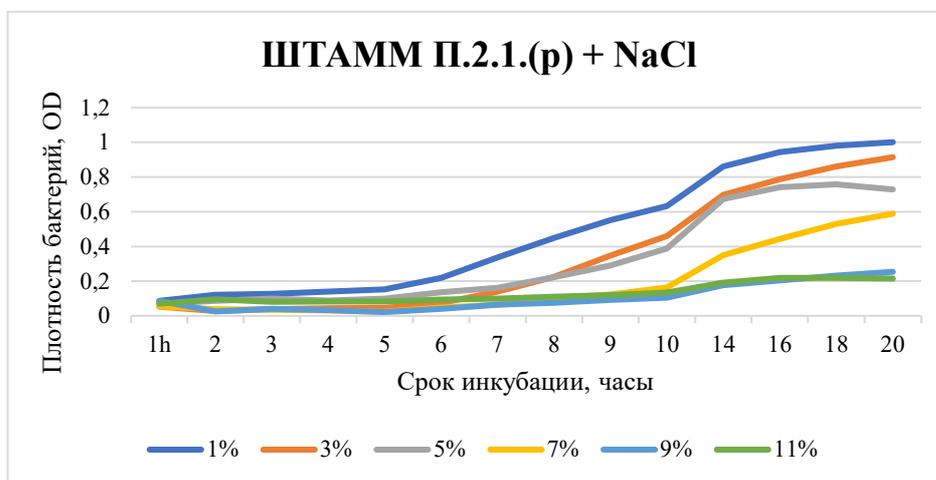


Рис. 8 – Влияние солевого раствора разной концентрации на штамм П.2.1.(p)

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.

3.6 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.(p) 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:

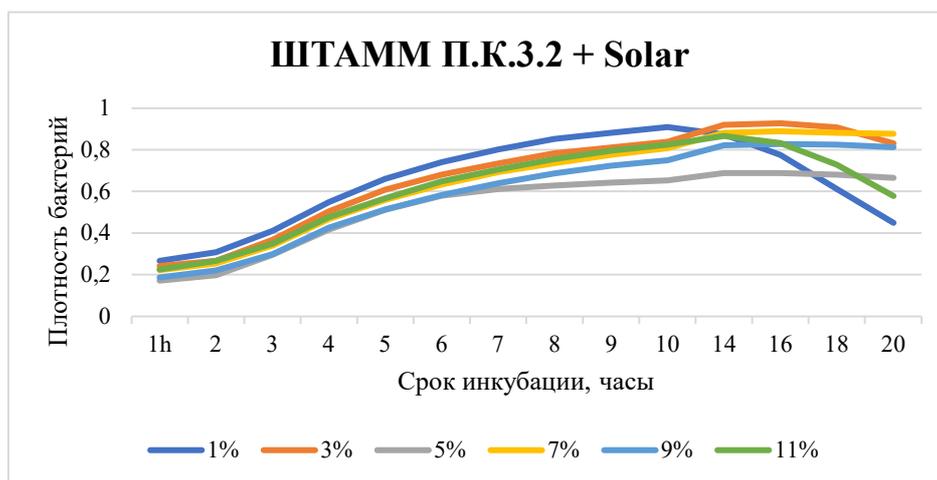


Рис. 9 – Влияние раствора минерального удобрения разной концентрации на штамм П.К.3.2.

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.

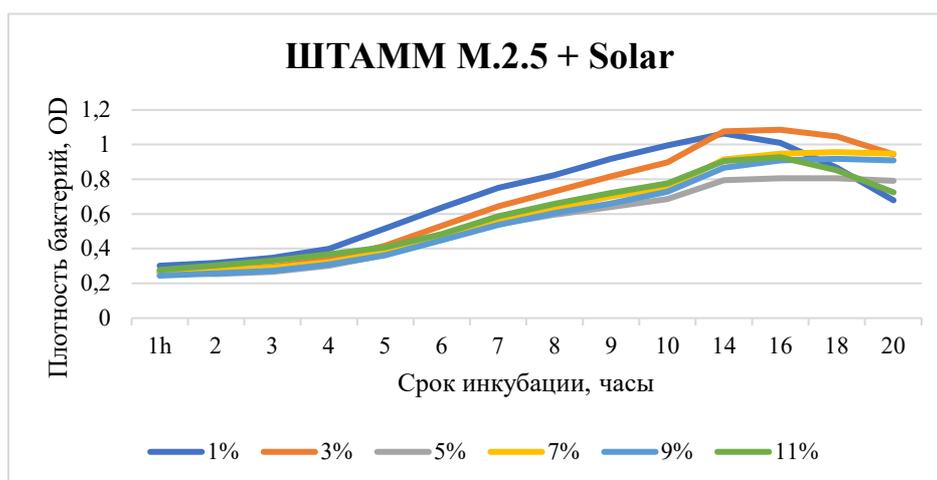


Рис. 10 – Влияние раствора минерального удобрения разной концентрации на штамм M.2.5

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.

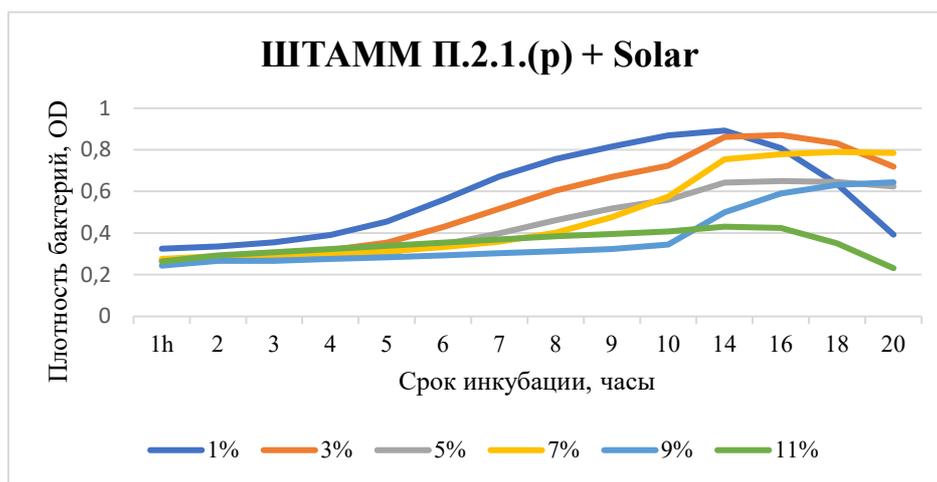


Рис. 11 – Влияние раствора минерального удобрения разной концентрации на штамм П.2.1.(p)

При анализе данного графика становится видно, что бактерии штамма П.2.1.(p) 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.

3.7 Оценка выбранных штаммов к стрессовым факторам

Ниже представлены общие результаты по оценке выбранных штаммов к стрессовым факторам. Оценивались такие показатели как: устойчивость к свету, температуре, солевым растворам, устойчивость к минеральному удобрению.

Таблица 7 – Оценка отобранных штаммов к стрессовым факторам

Штамм	Устойчивость к свету	Устойчивость к температуре	Устойчивость к солевым растворам	Устойчивость к минеральному удобрению
М.2.5	+++--	+++ - +	++++++	-++++-
П.К.3.2	+++--	-++++	++++++	-++++-
П.2.1.(p)	+++--	+++++	++++--	-++++-

4 ПРОВЕДЕНИЕ СЕКВЕНАЦИИ ШТАММОВ

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

Таблица 8 – 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

5 ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ ПО ПРАКТИКЕ И ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО ЕЕ УЛУЧШЕНИЮ

В ходе прохождения практики мной были освоены методики в области защиты растений, растениеводства, физиологии и биохимии растений. Получены навыки проведения лабораторных опытов, а именно выделения микроорганизмов, определение их КОЕ, выявление антагонистических свойств и окрашивание штаммов про Граму.

Мною проводились различные лабораторные работы, такие как выделение ДНК из микроорганизмов, проведение электрофореза и секвенации.

На сегодняшний день Центр Агроэкологического исследования успешно справляется с задачами по своей специализации. Рационально организованная финансово-хозяйственная деятельность позволяет уверенно осуществлять программу дальнейшего развития предприятия.

6 ПРИЛОЖЕНИЕ

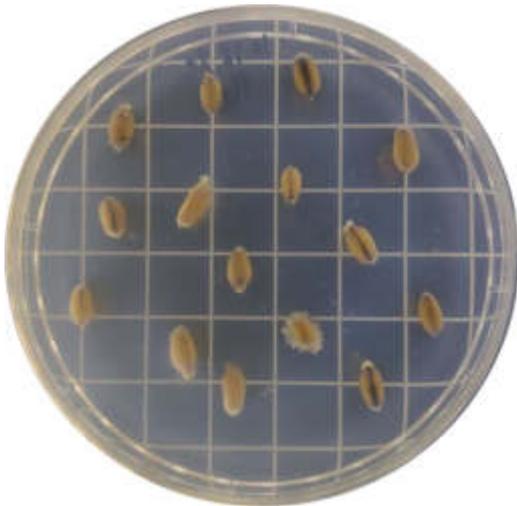


Рис.1 – Эндوفиты семян пшеницы
«Йолдыз»

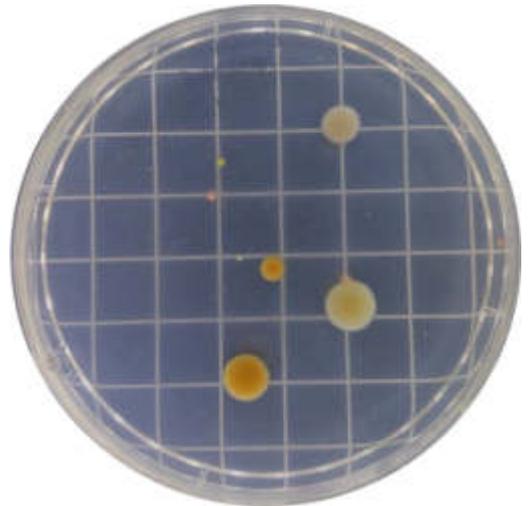


Рис.2 – Эндوفиты семян растения
мятлика

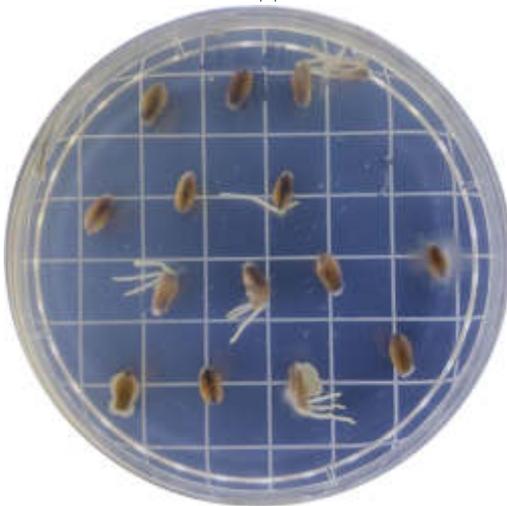


Рис.3 – Эндوفиты семян пшеницы
«Памяти Коновалова»

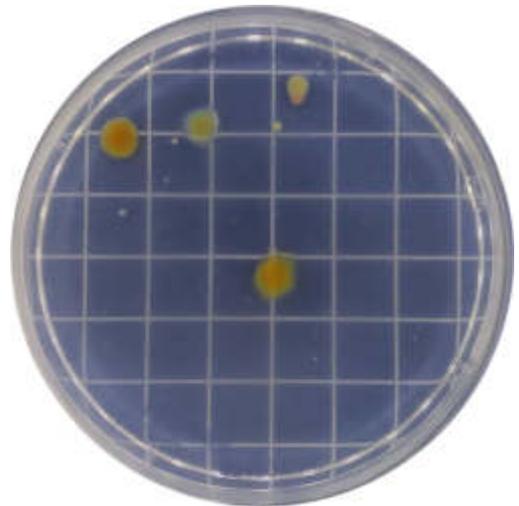


Рис.4 – Эндوفиты семян растения
мятлика

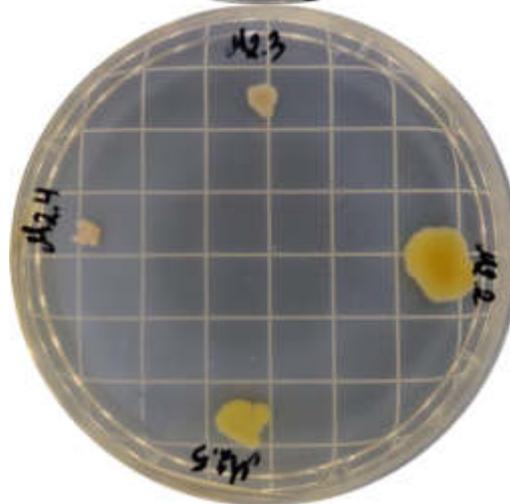
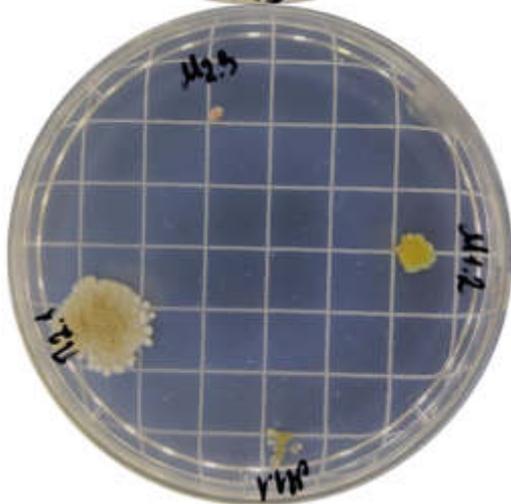
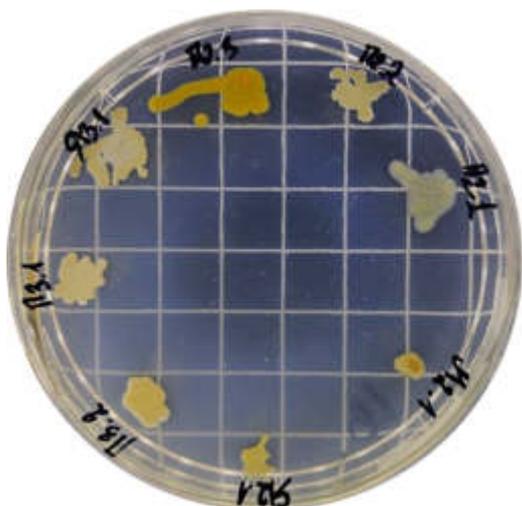


Рис.7 – Чистые культуры с колониями полученных эндофитов из семян

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

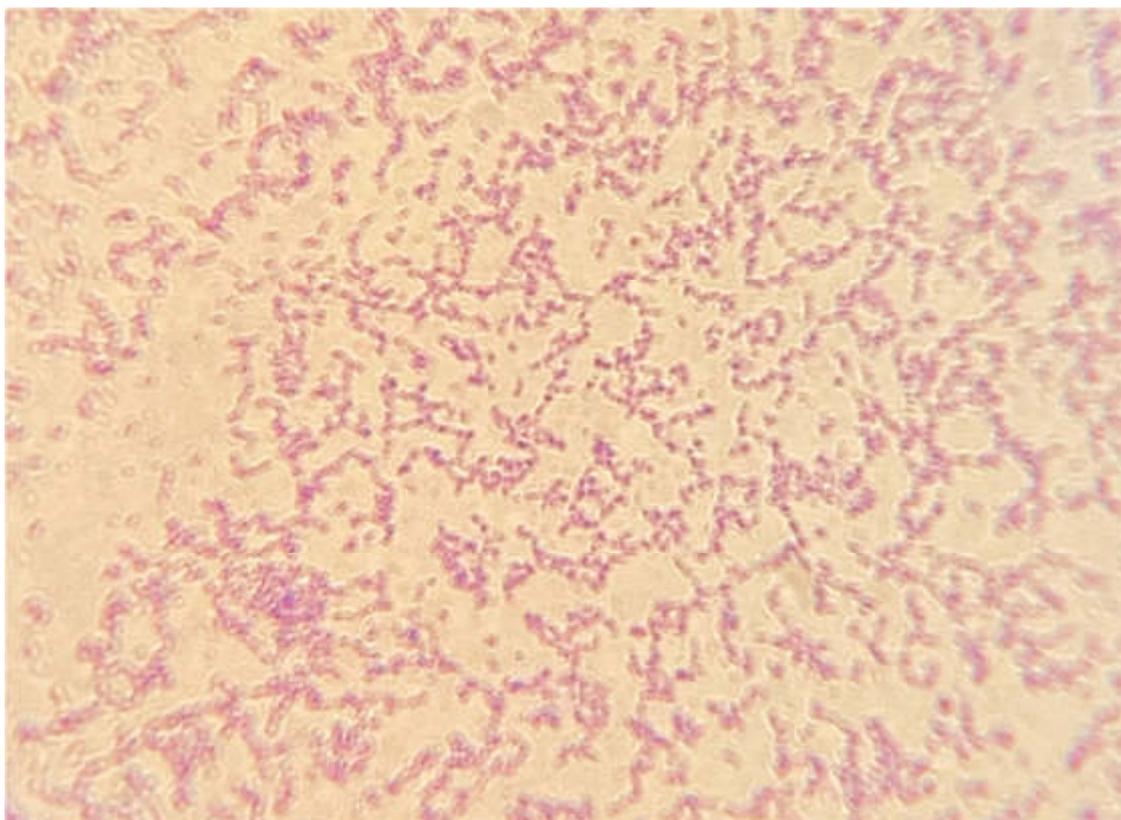


Фото 1 – мазок бактерий штамма ЯЗ.2

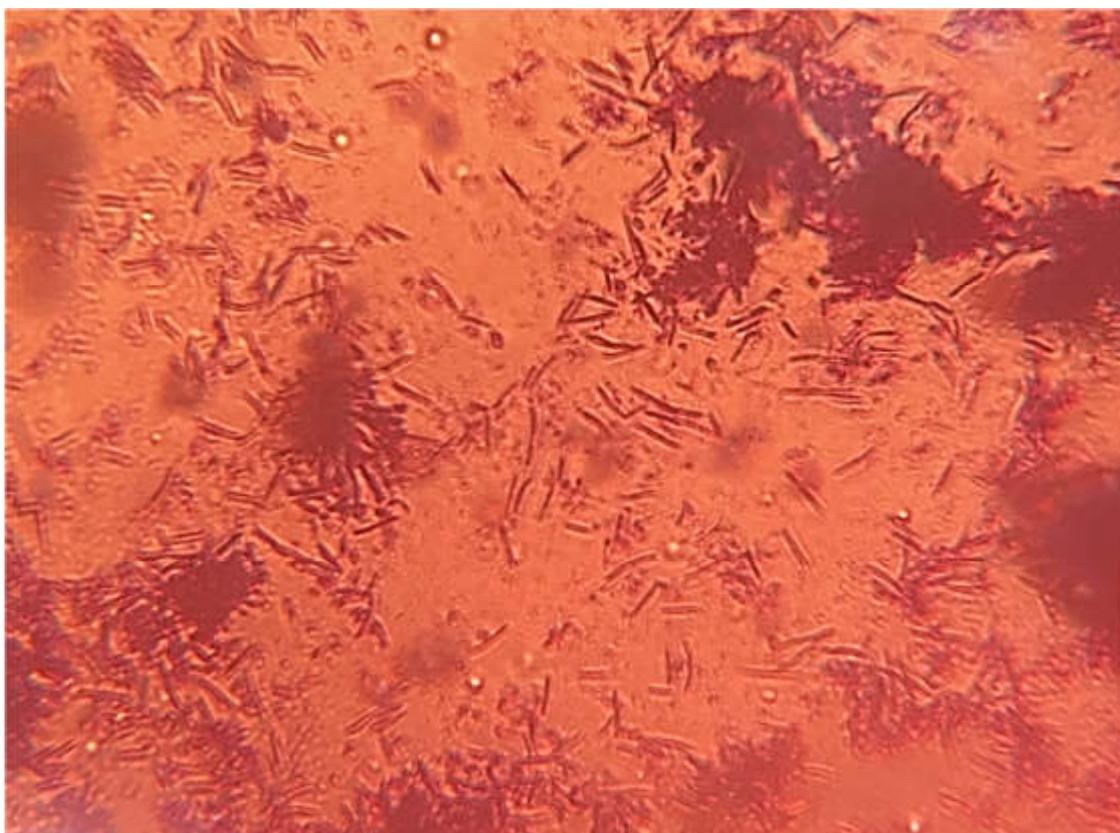


Фото 2 – мазок бактерий штамма П.2.1



Фото 3 – мазок бактерий штамма П.2.3

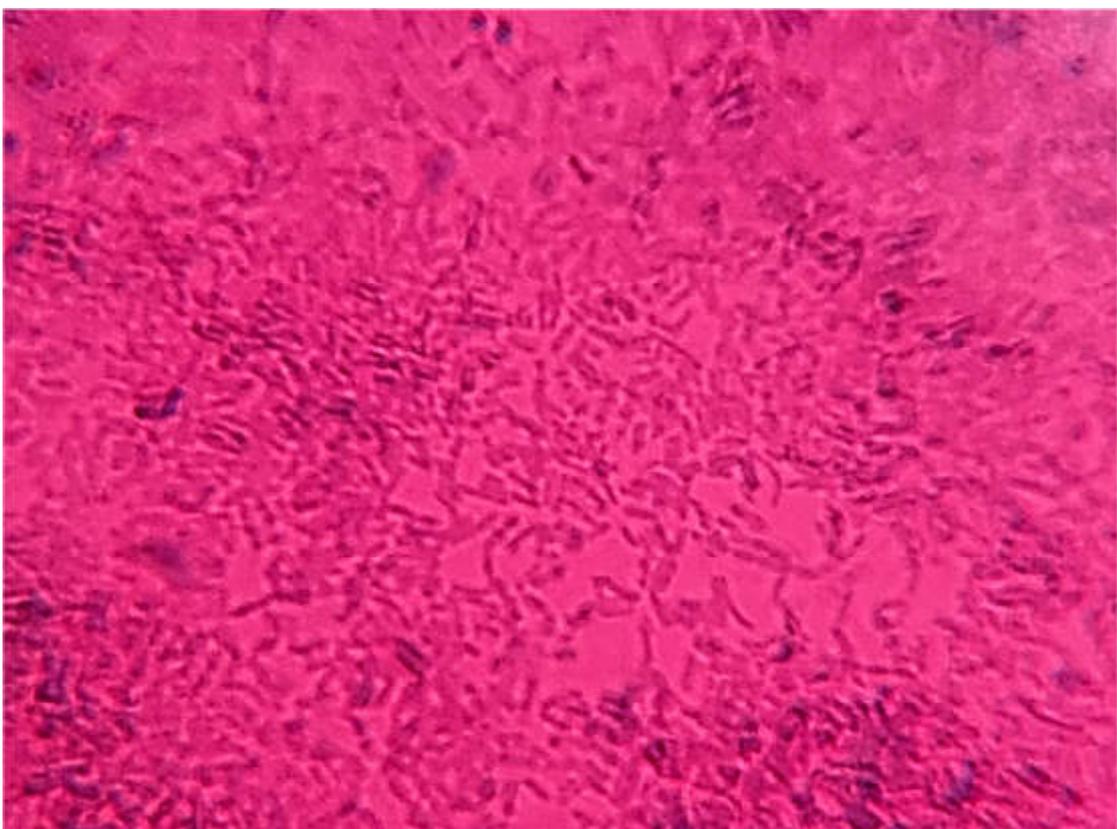


Фото 4 – мазок бактерий штамма Я.2

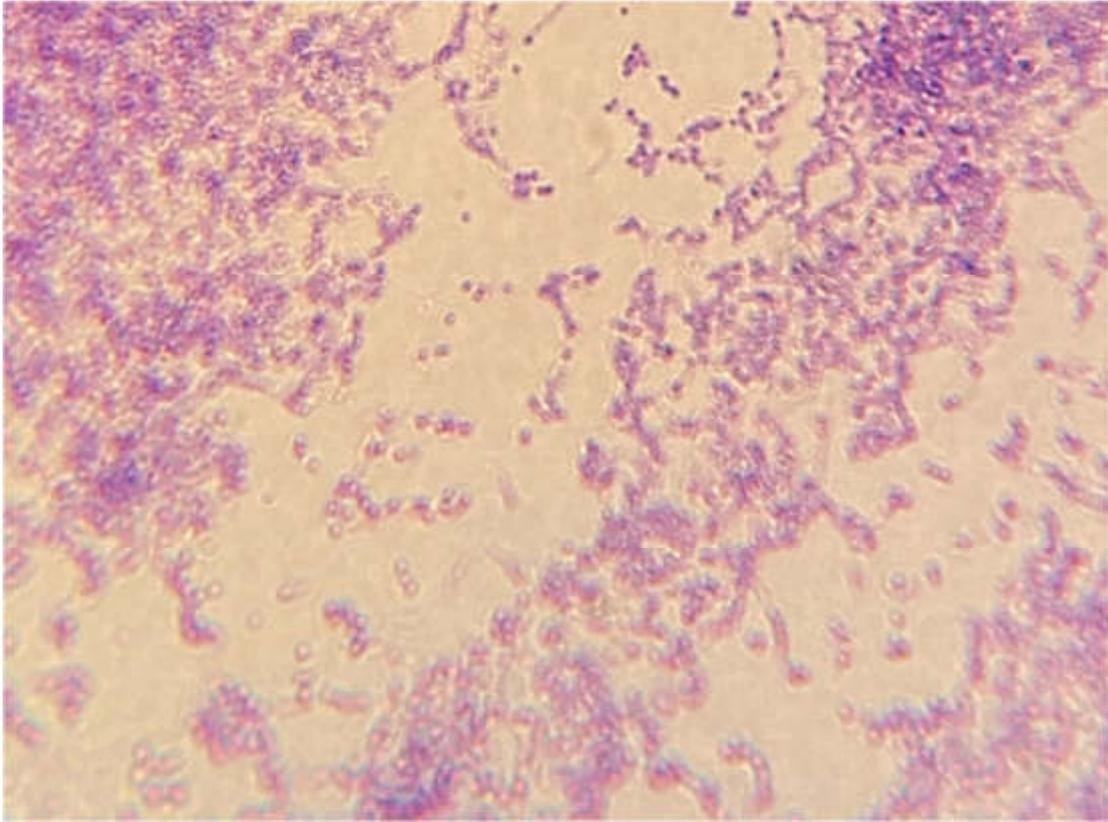


Фото 5 – мазок бактерий штамма П.2.1 (р)

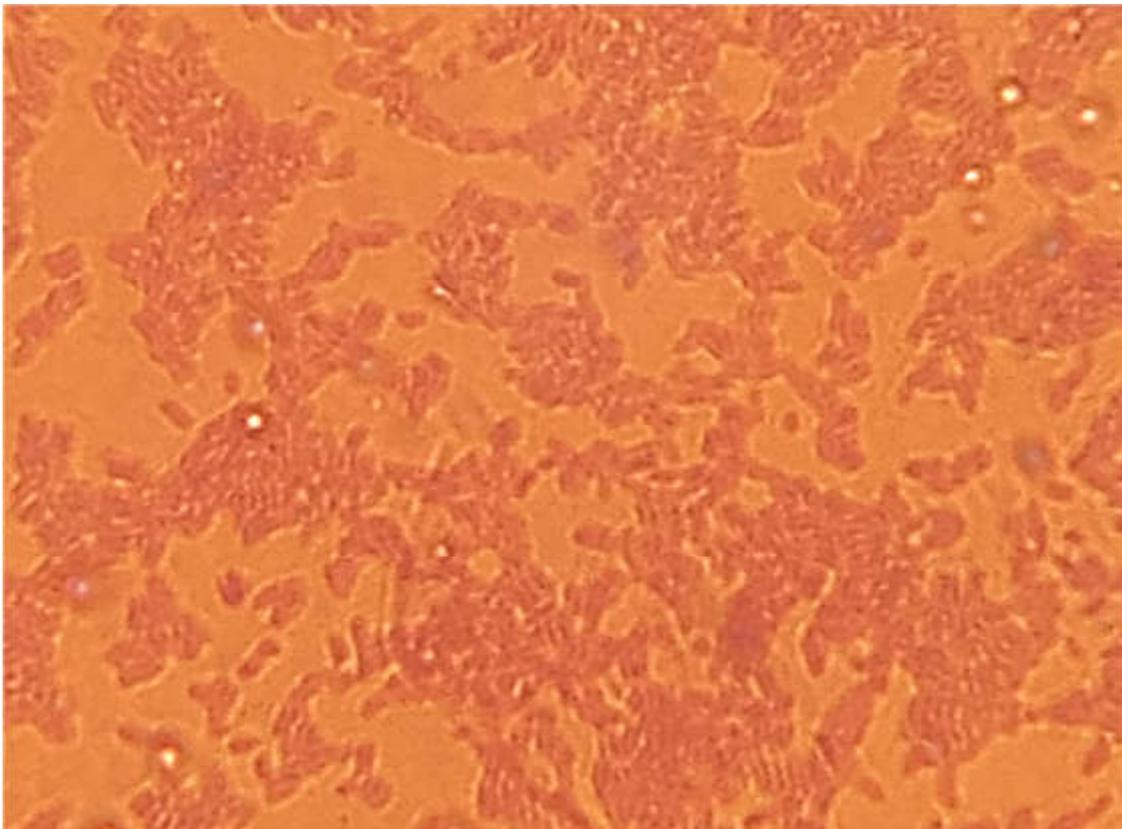


Фото 6 – мазок бактерий штамма М.2.4

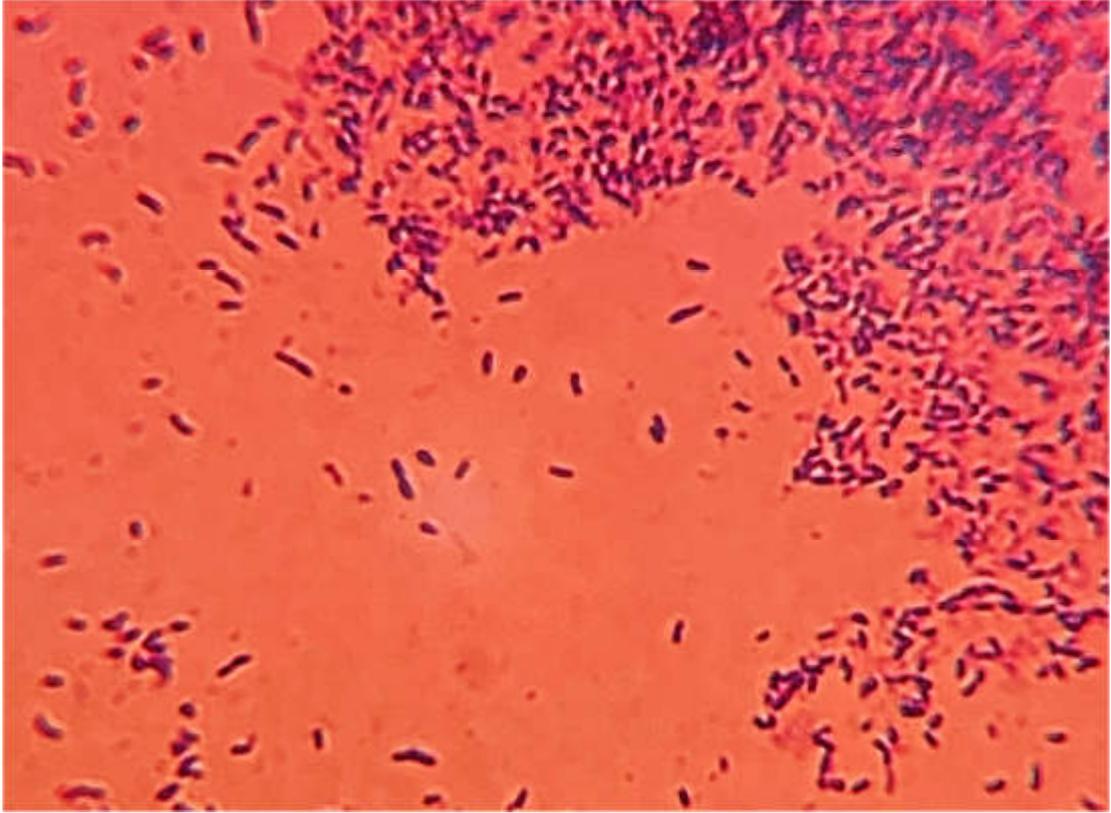


Фото 7 – мазок бактерий штамма М.2.5

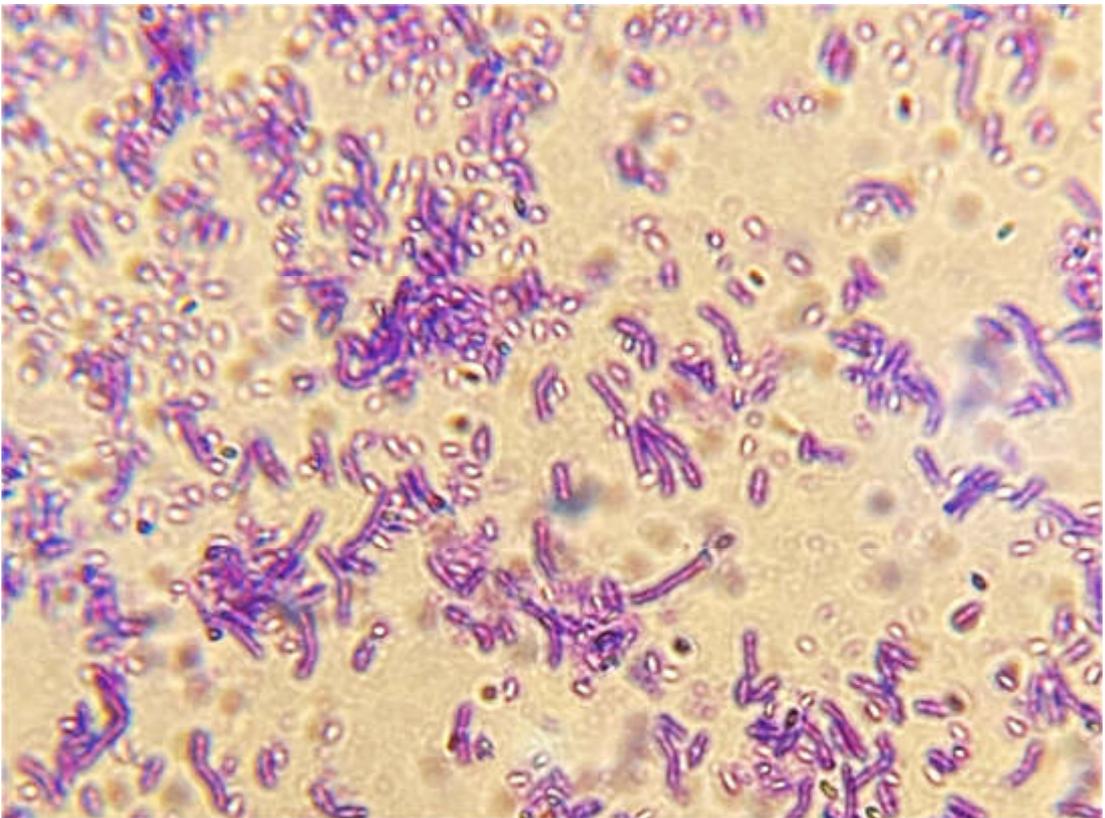


Фото 8 – мазок бактерий штамма ЯК.1

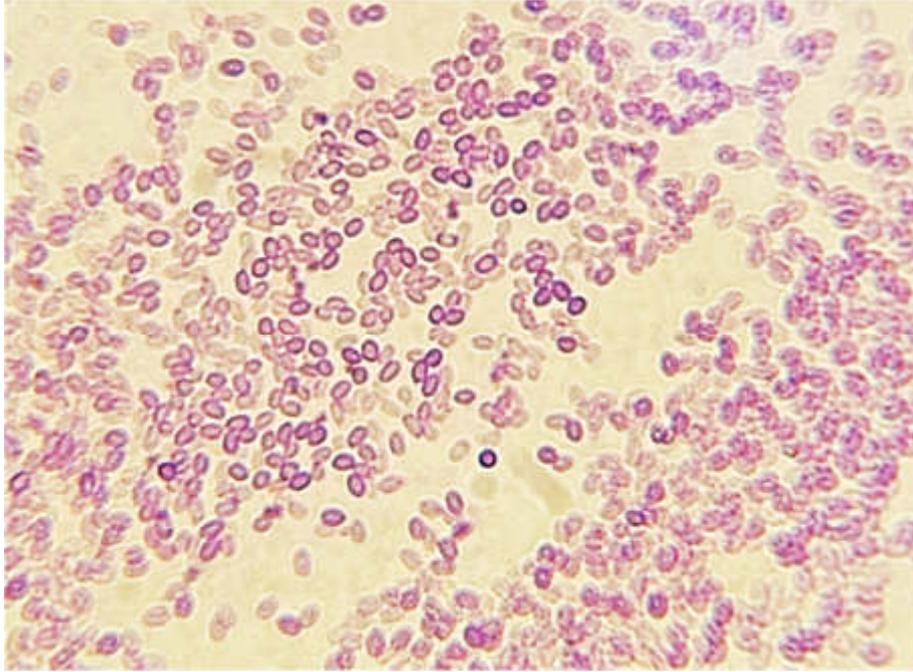


Фото 9 – мазок бактерий штамма ПК.3.2



Фото 10 – вегетационные сосуды с опытами в климатической камере



Фото 11 – опрыскивание опытов с вегетационными сосудами

7 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сафин Р.И. Фитосанитарный мониторинг (учебное пособие с грифом УМО РФ по агрономическому образованию). – Казань: КГСХА, 2005. – 105 с.
2. Система земледелия Республики Татарстан. Часть 1. – Казань:ЦОП, 2013. – 166 с.
3. Система земледелия Республики Татарстан. Часть 2. Агротехнологии производства продукции растениеводства – Казань:ЦОП, 2014. – 292 с.
4. Методические указания для подготовки бакалавров агрономического факультета «Перечень основных вредных организмов на сельскохозяйственных культурах РТ» /Сафин Р.И., Зиганшин А.А., Колесар В.А., Каримова Л.З.// Казань: Из-во КГАУ, 2018 – 20 с.
5. Шкаликов В.А. Защита растений от болезней / В.А. Шкаликов, Белошапкина О.О., Букреев Д.Д., Стройков Ю.М. и др. Под ред. В.А.Шкаликова . – 3-е изд. испр. и доп. – М.: КолосС, 2010. – 404 с.
6. Исаичев В.В. Защита растений от вредителей / Горбачёв И.В., Гриценко В.В., Захваткин Ю.А. и др. Под ред. проф. В.В. Исаичева. – М.: Колос, 2003. – 472 с.
7. Чулкина В.А., Торопова Е.Ю., Чулкин Ю.И., Стецов Г.Я. Агротехнический метод защиты растений. – М.: Маркетинг, – 2000. – 540 С..
8. Чулкина В.А. Экологические основы интегрированной защиты растений: учебник / В.А. Чулкина, Е.Ю. Торопова, Г.Я. Стецов, Под ред. М.С. Соколова, В.А. Чулкиной. – М.: Колос, 2007. – 568 с.

9. Чулкина В.А. Интегрированная защита растений: фитосанитарные системы и технологии : учебник / В.А.Чулкина, Е.Ю. Торопова, Г.Я. Стецов, Под. ред. М.С.Соколова, И.А. Чулкиной. – М.: Колос, 2009. – 670 с.

10. Щербакова, Л.Н. Защита растений: методические указания, контрольные задания и программа курса [Электронный ресурс] : методические указания / Л.Н. Щербакова, Г.И. Зарудная. — Электрон. дан. — Санкт-Петербург : СПбГЛТУ, 2013. — 32 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/45243>.

11. Ганиев, М.М. Химические средства защиты растений [Электронный ресурс] : учебное пособие / М.М. Ганиев, В.Д. Недорезков. — Электрон. дан. — Санкт-Петербург : Лань, 2013. — 400 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/30196>.

12. Каплин В.Г. Фитосанитарный контроль и защита семян зерновых злаковых культур от болезней и вредителей/ Каплин В.Г., Леонтьева Г.В., Макеева А.М., Кошелева А.Б. // Учебно – методическое пособие. – Самара:ССХА, 2000. – 120 с.

13. Каплин В.Г., Макеева А.М., Кошелева А.Б., Авраменко Н.Р. Учебная практика по защите растений. Самара, 2004

14. История развития и проблемы защиты растений / А.Ф. Ченкин [и др.]; под общ. ред. А.Ф. Ченкина. – М.: РАСХН, 1997. – 331 с

15. Бегляров Г. А. Химическая и биологическая защита растений / Г. А. Бегляров, А. А. Смирнова, Т. С. Баталова и др.; под редакцией Г. А. Беглярова. – М., Колос, 1983. – 351 с. (15 экз.).

СПРАВКА

об обеспечении безопасных условий прохождения практики

Дана студенту Молошикиной Т.А. в том, для обеспечения
(Ф.И.О. студента)

безопасных условий прохождения производственной
технической практики,
(название практики)

отвечающих санитарным правилам и требованиям охраны труда в
ФГБУ ВНИИ КРАУ, ул. Ферма-2, 53
(место прохождения практики (название организации, местонахождение))

ему «14» апреля 2023 года был проведен инструктаж по
ознакомлению с требованиями охраны труда, техники безопасности,
пожарной безопасности, а также правилами внутреннего трудового
распорядка.

Руководитель практики
от профильной организации

Ошва Т.Н.
(Ф.И.О)



«14» апреля 2023 г.

СПРАВКА

о прохождении производственной технологической практики

1. Ф.И.О. Малогожикина Полина Андреевна группа М121-01
2. Место прохождения практики ФГБУ ЦНИ Кадрового РАУ

3. Сроки 17.04.23 - 21.07.23

4. Оценка отлично дата сдачи 21.07.23
(оценка прописью)

Ашва Т. Н.

(Ф.И.О. руководителя от профильной организации)

5. Перечень выполненных работ, включая ремонт машин.

№ п/п	Марка машины	Кол-во дней	Вид работы	Объем работ
1				
2				
...				
10				

6. Общая сумма заработной платы: —

руб.

(прописью)

Руководитель предприятия Ашва Т. Н.

Главный бухгалтер _____



М.П.

ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

В период с 14.04.23 по 21.04.23
обучающийся Мамышкина Т.А.
(Ф.И.О.)

проходил (а) производственную технологическую практику в _____

РТБУ ЦАИ Казанского ГАУ
(место прохождения практики)

За время прохождения практики студент изучил вопросы: _____

практических навыков по формированию и проведению работ по фитосанитарному мониторингу, мониторингу и осуществлению защитных мероприятий

Самостоятельно провел следующую работу: Возведение рабочих кампусов иштампов; определение КВЕ различных штампов микроорганизмов в средах с.-х. культур; выявление наиболее оптимальных к фитопатогенной работе.

При прохождении практики студент проявил себя как ответственной, заинтересованной и инициативной.
(отношение к делу, реализация умений и навыков)

Отлично выполняла все поставленные задачи, использовала весь свой потенциал и добилась значительных результатов.

Руководитель предприятия

Алиева Т.Н. 21.04.23
(подпись, Ф.И.О., дата)



М.П.