

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»

Институт фундаментальной медицины и биологии

Кафедра микробиологии

Направление подготовки (специальность): 06.03.01 – Биология

Профиль (специализация): Биология


ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ
РИЗОСФЕРЫ КАРТОФЕЛЯ

Обучающийся 4 курса
группы 01-004



Попова Т.М.

Научный руководитель
д-р биол. наук, доцент



Марданова А.М.

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



Ильинская О.Н.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Микробиота ризосферы как источник активных штаммов	7
1.1.1 Роль ризосферы в физиологии растений	7
1.1.2 Прямые механизмы стимуляции роста растений ризобактериями ...8	
1.1.3 Непрямые механизмы влияния PGPR на растения	12
1.2 Бактерии рода <i>Bacillus</i> как основа биопрепаратов для сельского хозяйства	17
1.2.1 Характеристика биотехнологического потенциала бактерий рода <i>Bacillus</i>	17
1.2.2 Антагонистическая активность <i>Bacillus</i>	18
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	22
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	22
2.1 Объект исследования	22
2.2 Питательные среды и условия культивирования	22
2.3 Исследование фунгистатической активности бактерий	23
2.4 Исследование ферментативной активности	23
2.4.1 Выявление протеолитической активности	23
2.4.2 Выявление амилалитической активности	23
2.4.3 Выявление РНКазной активности	24
2.5 Определение продукции ИУК	24
2.6 Исследование способности стимулировать рост растений	24
2.7 Выделение РНК из пшеницы	25
2.8 Определение экспрессии генов, связанных с абиотическим и биотическим стрессом	25
2.9 Идентификация генов синтетаз липопептидов в геномах ризосферных штаммов	26
2.10 Идентификация исследуемых штаммов	27

2.11 Статистическая обработка данных.....	28
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	30
3.1 Фунгистатическая активность.....	30
3.2 Сравнительная характеристика ферментативной активности бацилл	31
3.3 Скрининг бактерий на продукцию ИУК.....	33
3.4 Оценка ростостимулирующих свойств бацилл	35
3.5 Анализ экспрессии гена POD в проростках пшеницы.....	38
3.6 Идентификация генов синтетаз липопептидов в геномах ризосферных штаммов	40
3.7 Идентификация исследуемых штаммов	41
ВЫВОДЫ	43
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	44

ВВЕДЕНИЕ

С течением времени все более остро встает проблема повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. Традиционные химические удобрения и пестициды загрязняют почву, воду и воздух. К тому же их влияние на микроорганизмы только усугубляет состояние почв [Mohanty *et al.*, 2021]. Это привело человечество к поиску более экологичных путей повышения урожайности растений, к таким путям относится и использование биоудобрений.

Биоудобрения основаны на действии Plant Grow-Promoting Rhizobacteria (PGPR). Эти бактерии заселяют ризосферу – тонкий слой почвы, прилегающий к корням, и влияют на рост растения различными механизмами [Kumar *et al.*, 2021]. Применение PGPR в сельском хозяйстве основано на их уникальных характеристиках, разнообразии и особенностях взаимосвязи с растениями. Бактерии рода *Bacillus*, в частности *Bacillus subtilis*, способны образовывать долгоживущие, устойчивые к стрессу споры и секретировать метаболиты, которые стимулируют рост растений и предотвращают заражение патогенами. Их применение в сельском хозяйстве дает культурам повышение устойчивости к абиотическим стрессам, особенно к экологическим стрессам, вызванным изменением климата. *B. subtilis* также играет важную роль в повышении устойчивости к биотическим стрессам. Эта индукция устойчивости к болезням включает экспрессию специфических генов, продукцию ряда ферментов, биологически активных веществ, сидерофоров и предшественников фитогормонов (например, индолилуксусной кислоты) [Hashem *et al.*, 2019].

Таким образом, поиск бактериальных штаммов, способных увеличивать продуктивность растений – актуальное направление исследований. Глубокое понимание механизмов влияния микробиоты ризосферы на растение даст возможность значительно увеличить его продуктивность, не нанося вред окружающей среде и здоровью человека.

Целью настоящей работы было исследование ростостимулирующих и антагонистических свойств ризосферных штаммов *Bacillus*.

В соответствии с поставленной целью, в работе решались следующие задачи:

- 1) Охарактеризовать фунгистатическую активность штаммов рода *Bacillus* в отношении почвенных микромицетов.
- 2) Изучить способность исследуемых штаммов к синтезу различных ферментов и липопептидов.
- 3) Оценить способность штаммов *Bacillus* к продукции индолилуксусной кислоты.
- 4) Исследовать влияние тестерных штаммов на прорастание пшеницы *in vivo*.
- 5) Идентифицировать до вида исследуемые штаммы.

ВЫВОДЫ

1) Все исследуемые штаммы ризосферных *Bacillus* проявляли фунгистатическую активность в отношении фитопатогенных микромицетов *Fusarium oxysporum* и *Alternaria alternata*. Самую высокую активность против микромицетов проявляли штаммы *Bacillus* sp. 1 и *Bacillus* sp. 20.

2) Все исследуемые штаммы проявляли протеолитическую, амилазную и РНКазную активности. В геномах бацилл были идентифицированы от 2 до 4 генов синтаз разных липопептидов.

3) Исследуемые штаммы в разной степени способны к синтезу ИУК по триптофанзависимому пути. Наиболее активным и стабильным продуцентом ИУК является штамм *Bacillus* sp. 1.

4) Исследуемые штаммы не влияют на всхожесть семян пшеницы, штаммы *Bacillus* sp. 1, 4 и 21 повышают накопление биомассы корней проростков. Все исследуемые штаммы, кроме *Bacillus* sp. 1, могут снижать экспрессию гена пероксидазы пшеницы.

5) На основании гомологии гена 16S рРНК все исследуемые бактерии были идентифицированы как штаммы *Bacillus subtilis*.