

**Государственное образовательное учреждение
дополнительного образования Тульской области
«Областной эколого-биологический центр учащихся»**

Проект на тему:

**«ПОВЫШЕНИЕ АНТИФИТОПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА
КАРБОНАТНЫХ ПОЧВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОБНЫХ
АССОЦИАЦИЙ ГУРЬЕВСКИХ КАМЕНОЛОМЕН»**

Автор: Юрчак Елизавета Александровна,
обучающаяся структурного подразделения «Детский технопарк
естественнонаучной направленности» ГОУ ДО ТО «Областной эколого-
биологический центр учащихся»

Научный руководитель: Гришина Карина Александровна,
педагог дополнительного образования ГОУ ДО ТО «Областной эколого-
биологический центр учащихся»

город Тула, 2020 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Аннотация.....	3
Введение.....	5
Глава 1. Теоретический обзор. Современные способы борьбы с фитопатогенными плесневыми грибами.....	7
Глава 2. Объекты и методика исследования.....	13
Глава 3. Результаты. Повышение антифитопатогенного потенциала карбонатных почв с использованием микробных ассоциаций Гурьевских каменоломен.....	19
Выводы.....	37
Литература.....	38

АННОТАЦИЯ

В проекте «Повышение антифитопатогенного потенциала карбонатных почв с использованием микробных ассоциаций Гурьевских каменоломен» поднимается вопрос борьбы с фитопатогенами. В последнее время мы все чаще слышим о том, что складывается довольно опасная ситуация, связанная с заражением значимых сельскохозяйственных культур патогенными плесневыми грибами. Главная опасность жизнедеятельности таких грибов и заражения ими растений – способность грибов производить опасные соединения для жизни и здоровья человека, называемые сегодня микотоксинами. Микотоксины вызывают снижение иммунитета, уменьшают сопротивляемость человека болезням различной природы.

В проекте представлены результаты исследования микробиоты Гурьевских каменоломен Веневского района Тульской области, которые являются в настоящее время искусственными пещерами, ранее в которых добывали известняк. По исследованию места обитания данных микроорганизмов, были выявлены бактериальные ассоциации, устойчивые к различным факторам среды и приспособленных к обитанию на защелоченных карбонатных субстратах.

Гипотеза исследования: бактериальные ассоциации Гурьевских каменоломен способны блокировать воздействие фитопатогенных грибов на растения, тем самым повышая антифитопатогенный потенциал почв сельскохозяйственных угодий.

Цель проекта: повысить антифитопатогенный потенциал карбонатных почв с помощью использования микробных ассоциаций Гурьевских каменоломен.

Задачи проекта:

- 1) Провести отбор проб субстрата, воды и других субстратов обитания микробиоты Гурьевских каменоломен;
- 2) Вырастить колонии микроорганизмов в лабораторных условиях;

3) Определить состав микробиоты, составив классификацию найденных штаммов, выявить границы их устойчивости к среде обитания;

4) Выявить внешних стейкхолдеров, заинтересованных в наших исследованиях;

5) Определить способность воздействия бактериальных ассоциаций в отношении стагнации процессов жизнедеятельности фитопатогенных плесневых грибов;

6) Оценить возможность использования бактериальных ассоциаций Гурьевских каменоломен для повышения антифитопатогенного потенциала карбонатных почв.

Проекту посвящены 39 листов, Проект включает в себя следующие разделы: Титульный лист, Содержание, Аннотацию, Введение, Главы 1, 2 и 3, где представлен литературный обзор борьбы с фитопатогенными грибами, объекты и методика исследования, а также результаты, Выводы и Список литературы.

В проекте применены иллюстрации: представлено 5 таблиц, 17 рисунков. Все иллюстрации имеют авторский характер.

Использовано 11 источников литературы, охватывающих обзор по проблеме заражением растений фитопатогенными грибами и способам борьбы с ними, в том числе 1 – электронный.

ВВЕДЕНИЕ

Вопрос борьбы с фитопатогенами всегда стоял во главе проблем сельского хозяйства. В последнее время мы все чаще слышим о том, что складывается довольно опасная ситуация, связанная с заражением значимых сельскохозяйственных культур патогенными плесневыми грибами. К ним относятся несколько представителей, борьба с которыми на сегодняшний момент ведется наиболее активно, но зачастую неуспешно: фузариум, стеблевая ржавчина, ринхоспориоз, аспергиллез и другие. К примеру, во всем мире оборот зерна, зараженного фузариозом, составляет около 30%. В Краснодарском крае нашей страны по исследованиям ученых, которые уже бьют тревогу, обращая наше внимание на ход данной проблемы по стране, и более страшные цифры – 96%. Главная опасность жизнедеятельности таких грибов и заражения ими растений – способность грибов производить опасные соединения для жизни и здоровья человека, называемые сегодня микотоксинами. Микотоксины вызывают снижение иммунитета, уменьшают сопротивляемость человека болезням различной природы. Активная борьба с этой проблемой ведется с 1980 года, а значимых результатов все еще нет, так как фитопатогенные грибы обладают высокой устойчивостью к различным лекарственным химикатам и разрабатываемым средствам против таких болезней растений, хорошо приспосабливаются к новым условиям. Кроме того, многие сельскохозяйственные растения выращиваются на почвах с повышенным содержанием карбонатов. Из-за повышенного и постоянного внесения удобрений многие почвы сельскохозяйственных угодий могут выщелачиваться и самостоятельно, но выщелачивание, к сожалению, – не преграда для фитопатогенов.

Мы задались вопросом, как нам решить данную проблему, ведь фитопатогенные грибы вызывают заражение не только самих растений, вызывая разрушение клеток и проникая в ткани, но также и посевного материала, и в том числе продуктов питания, производимых из тех или иных растений, подверженным заболеваниям фитопатогенными грибами, а главное

- идет снижение антифитопатогенного потенциала почв, так как растения уже не способны сопротивляться действию данных грибов, постоянно находящихся в почве. Таким образом это ведет к снижению нашей продовольственной безопасности и несет агротехнологические риски для производителей продукции. А эти критерии с точки зрения Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации, являются одними из наиболее значимых больших вызовов для общества, государства и науки!

В период с октября 2019 по настоящее время нами проводились исследования микробиоты пещер искусственного происхождения - Гурьевских каменоломен Веневского района Тульской области. По исследованию места обитания данных микроорганизмов, были выявлены бактериальные ассоциации, устойчивые к различным факторам среды и приспособленных к обитанию на защелоченных карбонатных субстратах. Мы заинтересовались этим свойством, и решили исследовать их подробнее, попробовав использовать в борьбе с фитопатогенными грибами.

Гипотеза исследования: бактериальные ассоциации Гурьевских каменоломен способны блокировать воздействие фитопатогенных грибов на растения, тем самым повышая антифитопатогенный потенциал почв сельскохозяйственных угодий.

Цель проекта: повысить антифитопатогенный потенциал карбонатных почв с помощью использования микробных ассоциаций Гурьевских каменоломен.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи:**

- 1) Провести отбор проб субстрата, воды и других субстратов обитания микробиоты Гурьевских каменоломен;
- 2) Вырастить колонии микроорганизмов в лабораторных условиях;
- 3) Определить состав микробиоты, составив классификацию найденных штаммов, выявить границы их устойчивости к среде обитания;
- 4) Выявить внешних стейкхолдеров, заинтересованных в наших исследованиях;

5) Определить способность воздействия бактериальных ассоциаций в отношении стагнации процессов жизнедеятельности фитопатогенных плесневых грибов;

6) Оценить возможность использования бактериальных ассоциаций Гурьевских каменоломен для повышения антифитопатогенного потенциала карбонатных почв.

ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР. СОВРЕМЕННЫЕ СПОСОБЫ БОРЬБЫ С ФИТОПАТОГЕННЫМИ ПЛЕСНЕВЫМИ ГРИБАМИ

На современном этапе нашей жизни остро стоит во главе проблем сельского хозяйства вопрос борьбы с фитопатогенами. Чтобы бороться с болезнями растений, приходится принимать дорогостоящие меры – профилактическое опрыскивание растений пестицидами. Большие средства тратятся на разработку химических средств защиты растений. Мировой ассортимент пестицидов (только по действующим веществам) насчитывает около 1000 наименований, а их использование обходится человечеству в 15,32 млрд. долларов в год (на 1990 г.). Расходы на защиту растений велики, но если бы их не было, то потери урожая увеличились бы, по меньшей мере, в 2 раза (без учета возможных эпифитотий). Также с древнейших времен известны некоторые приемы предотвращения болезней растений. Например, Демокрит – автор атомистического учения о строении вещества – советовал от головни протравливать семена злаков в соке травы “исоп”(issop), а для борьбы с саранчей – опрыскивать растения отваром горького люпина. Долго не удавалось установить, что же имел в виду Демокрит под названием “исоп”. Оказалось, что это заячья капуста (*Sedum purpureum*) из семейства Crassulaceae, богатая дубильными веществами. Дубильные вещества действовали на возбудителей болезней, не давая им развиваться. Несмотря на некоторые практические успехи в защите растений, древние греки и римляне не догадывались о паразитарной природе болезней растений. Отдельные

указания на то, что грибы являются причиной болезней растений, встречались в литературе с конца 15-го века. Однако почти до конца 18-го столетия грибы и сами болезни истолковывались неверно. Формированию научной фитопатологии предшествовало развитие микологии – науки о грибах. В создании микологии большую роль сыграли средневековые ученые – Андреа Цезальпиниус (1519-1603), описавший 16 родов 9 грибов, и Карл Клузиус (1525-1609), который описал 47 родов и 104 вида грибов. В 18-м и начале 19-го века микологические исследования были, в основном, флористическими. Шло накопление сведений о грибах, так сказать, их “каталогизация”. Только с 50-60-х годов 19-го века природа паразитных грибов была установлена. Выяснилось, что паразитные грибы являются не следствием, а причиной болезней растений. Утверждению такого взгляда на грибы способствовали французские ботаники, братья 10 Тюлян; а также немецкий миколог Антонио де Бари и русский ученый Михаил Воронин. Мировым научным сообществом исследования Воронина признаны классикой фитопатологии [8].

Почва –прежде всего биологическая и биохимическая система, одним из главных компонентов которой является почвенная микрофлора [6]. Уровень эффективного и потенциального плодородия почвы в значительной степени обуславливается интенсивностью и направленностью участия микроорганизмов в разложении растительных остатков, синтезе и деструкции гумуса, формировании фитосанитарного состояния почвы, накоплении в ней биологически активных веществ, фиксации атмосферного азота. Микрофлора является важным информативным показателем происходящих в почве изменений и это делает целесообразным включение в систему агроэкологического мониторинга микробиологических параметров [5]. Важная роль в почве принадлежит микромицетам. Во–первых, с почвой связано большое количество фитопатогенов; во-вторых, микромицеты с сапротрофным типом питания, участвуя в деструкции послеуборочных остатков, способствуют снижению запаса инфекционного начала; третьих, грибы-антагонисты обеспечивают антифитопатогенный потенциал почвы [3].

Почвенные микромицеты, обладая большой линейной скоростью роста, на один-два порядка выше, чем бактерии, отмирая, поставляют большое количество органического вещества, идущего на построение гумуса. В связи с этим количество их может служить одной из важных характеристик микробиологической активности почвы.[7]

Известно, что в процессе патогенеза большое значение имеет способность патогена выделять различные ферменты, при помощи которых грибы расщепляют клеточные стенки растения-хозяина и распространяются в ткани [9]. При этом ферментный аппарат гриба-патогена играет важнейшую роль в момент внедрения и развития гриба в ткани растения-хозяина. В состав растительной ткани входят различные химические соединения полимерного характера, такие, как целлюлоза, лигнин, гемицеллюлоза, пектин и другие. Биологическую деградацию целлюлозы, гемицеллюлозы и пектина катализируют гидролитические, а биodeградацию лигнина - окислительные ферменты [1]. Поэтому среди многочисленных ферментов грибов особенно важными являются гидролитические и окислительные ферменты, с помощью которых гриб разрушает клеточную стенку растения-хозяина. Способность некоторых патогенных грибов выделять различные ферменты исследована в ряде работ [2]. Однако число этих грибов невелико, и такие патогены, относящиеся к родам *Aspergillus*, *Ascochyta*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Phoma* и *Penicillium*, в данном аспекте достаточно не исследованы.

	Число штаммов	Целлюлаза	Ксиланаза	Амилаза	Пектиназа	Протеаза
<i>Aspergillus flavus</i>	9	1.1-2.0	20.1-28.7	1.7-2.6	5.6-7.3	3.6-7.1
<i>A. fumigatus</i>	8	1.0-1.7	17.8-24.3	2.3-3.8	4.5-7.5	2.7-6.5
<i>A. niger</i>	12	2.0-4.3	35.3-42.5	3.8-5.3	9.6-11.5	4.6-7.2
<i>A. ochraceus</i>	7	0.4-0.7	13.2-17.6	1.2-2.3	7.1-8.9	3.2-4.5
<i>Alternaria alternata</i>	8	0.9-1.7	12.7-23.5	0.7-1.3	3.1-5.1	2.2-4.7
<i>A. solani</i>	9	0.5-1.2	17.8-30.1	0.5-0.8	2.7-4.3	1.9-5.7
<i>Botrytis cinerea</i>	10	0.5-0.7	21.2-24.6	следы	1.2-2.5	0.7-1.2
<i>Fusarium avenaceum</i>	8	1.1-1.6	16.4-21.9	1.4-2.2	1.5-3.5	следы
<i>F. gibbosum</i>	10	0.8-1.3	15.6-25.3	1.8-3.0	2.6-4.8	0.3-0.8
<i>F. moniliforme</i>	11	0.9-1.3	25.3-35.4	2.7-4.2	3.1-5.4	0.2-0.9
<i>F. oxysporum</i>	10	0.7-1.2	20.2-31.4	2.3-3.5	2.3-4.6	следы
<i>Verticillium dahliae</i>	11	0.3-0.5	18.9-23.5	1.1-1.5	3.5-6.7	0.8-1.1
<i>P. martensii</i>	9	0.2-0.5	23.4-31.3	следы	2.9-6.1	2.3-4.5

Таблица 1. Ферментативная активность микроскопических грибов, вызывающих различные болезни сельскохозяйственных растений

Амилазы объединяют большую группу ферментов, которые осуществляют гидролиз преимущественно α -(1,4)-гликозидной связи в амилозе, амилопектине, гликогене и других мальт олигосахаридах. Амилазы бывают двух типов: эндо- и экзоамилазы. Четко выраженной эндоамилазой является α -амилаза, способная к разрыву внутримолекулярных связей в полимерных цепях субстрата. Глюкоамилаза и β -амилаза являются экзоамилазами, т. е. ферментами, атакующими субстрат с нередуцирующего конца.

Реакции, катализируемые амилазами, имеют две стадии: короткую предстационарную и длительную — стационарную. Во время первой стадии эндоамилаза быстро уменьшает молекулярную массу субстрата, образуя смесь линейных и разветвленных олигосахаридов. Второй этап реакции продолжается, пока продукты гидролиза не перестанут окрашиваться иодом; он протекает значительно медленнее и зависит от индивидуальных свойств фермента и его природы.[11]

Многие виды рода Фузариум заражают различные растения, вызывая у них разного рода заболевания. Одни виды заражают подземные части молодых растений и вызывают корневые гнили и выпадения всходов, другие — проникают внутрь зараженных растений и, поселяясь в сосудистой системе, препятствуют току воды с питательными веществами, вследствие чего зараженные растения увядают даже в достаточно влажной почве. Некоторые виды заражают цветки и развивают свой мицелий в генеративных органах (фузариозы колоса). В результате болезни колосковые чешуйки часто приобретают красноватый цвет от пигментов, образуемых грибом, а зерна становятся щуплыми и тоже красноватыми. Фузариоз колоса особенно опасен, так как зерна содержат токсины, не разрушающиеся при хлебопечении. Большинство фузариотоксинов имеют структурное сходство и общий начальный путь биосинтеза с описанным уже грибным антибиотиком трихотецином, поэтому их называют трихотециновыми токсинами. Они ингибируют синтез белка в эукариотных клетках, поэтому высокотоксичны

для многих эукариотных организмов, включая человека и позвоночных животных. Кроме того, трихотециновые токсины сходны с половыми гормонами млекопитающих и могут замещать их в физиологических процессах, вызывая серьезные нарушения течения беременности. [4]

Фузариоз зерна ухудшает посевные качества семян, пищевые достоинства зерна и продуктов его переработки и поэтому во всем мире рассматривается как одно из наиболее вредоносных заболеваний сельскохозяйственных культур. Проблема фузариоза зерна имеет международное значение. Исключительно широкая распространенность фузариевых грибов, их изменчивость, а также бесспорные доказательства опасности микотоксинов для здоровья человека и животных заставляют специалистов постоянно обращаться к данной проблеме. Источник первичной инфекции – конидии, фрагменты гиф и, при наличии сумчатого спороношения, аскоспоры грибов. Современными методами снижения вредоносности фузариоза являются: предпосевная подготовка семян, севооборот, е. Уничтожение в посевах сорняков агротехническими приемами или применением гербицидов, биологический и др.

Поиск микроорганизмов для борьбы с фузариозом колоса был начат в Бразилии в 1980 гг. Более 300 бактерий и грибов, выделенных из растений пшеницы, были проверены в лабораторных условиях на активность против *F.graminearum* (Luz, 1988). Показана эффективность подавления фузариевых грибов штаммами бактерий из родов *Bacillus*, *Kluyvera*, *Lysobacter*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, дрожжей *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*. Существует мнение, что биологические препараты защищают колос пшеницы от фузариоза так же эффективно, как контактные фунгициды, но менее эффективно, чем системные. Предлагаются два пути использования средств биологической защиты растений от фузариоза. Первый – прямое воздействие биоагентов или их метаболитов на колос незадолго до периода или в период восприимчивой фазы, второй – обработка растительных остатков антагонистами задолго до периода инфицирования растения для

подавления численности инфекции. Так, обработка пшеничной соломы в поле суспензией грибов *Trichoderma harzianum* (Fernandez, 1992) и *Microsphae ropsis* sp. (Buijold et al., 2001) показала значительное снижение зараженности и образования спороношения грибом *G. zeae*. Механизмы действия агентов биологического контроля активно изучаются. Важным действием на патогены является влияние антибиотиков. В лабораторных опытах *Paenibacillus macerans*, *Pseudomonas putida*, *Sporobolomyces roseus*, *B. subtilis* способны подавлять рост *F. graminearum* на 95–100 % (Perondi et al., 1996; Stockwell et al., 1997). В поле и теплицах уменьшение заболевания при применении их культуральных фильтратов составило 21–26 % (Luo, Bleakley, 1999; Fernando, 2001). Другой важной составляющей действия микроорганизмов является конкуренция за питательную среду. Перспективные результаты получены рядом авторов, выделивших микроорганизмы из колосьев пшеницы во время цветения и использовавших их для снижения развития *F. graminearum* (Pearce et al., 1976; Strange, Smith, 1978; Fokkema et al., 1979; Schisler et al., 2002; Van Cauwenberge et al., 2009). Изучают применение микроорганизмов и их метаболитов для повышения иммунитета и снижения вредоносности фузариоза, при этом в клетках растения происходят сложные биологические и физиологические реакции, в результате которых оно приобретает иммунитет и готово противостоять внедрению патогенов (Jochum et al., 2006). Показана способность микроорганизмов подавлять синтез микотоксинов, образуемых грибами, однако механизм этого явления неясен. Отмечено уменьшение синтеза и накопления ДОН до 23 % в зерне пшеницы при обработке растений в теплице и поле некоторыми видами бактерий (Stockwell et al., 1997, 2000) [10].

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Объекты исследования

Объектами исследования стали бактерии, полученные из смывов со стен, образцов воды и субстрата Гурьевских каменоломен.

Перечень проб представлен в таблице 2, места сбора отмечены на рисунке 3.

Таблица 2. Объекты исследования

№	Проба	Тип пробы
1.	Питьевое озеро	Образец воды
2.	Свежее пиво	Образец воды
3.	Глюкало	Образец субстрата
4.	Лестница в небо	Образец субстрата
5.	Тройка	Смыв со стены
6.	Трапезная	Смыв со стены
7.	Заячья щель	Смыв со стены
8.	Чайник	Смыв со стены
9.	Жижа	Образец субстрата
10.	Ракушки	Смыв со стены
11.	Жернова	Смыв со стены
13.	Гук	Смыв со стены
14.	Ск Св	Смыв со стены

2. Методика исследования

Исследования проводились в период с ноября 2019 по февраль 2020 года на территории отбора проб, указанных в сопроводительных бланках, а также в лаборатории ГОУ ДО ТО «Областной эколого-биологический центр учащихся» г. Тулы.



Рис 1. Гурьевские каменоломни внутри

2.1. Методика отбора водных проб

Водные пробы отбирали по методике отбора водных проб для короткого санитарно-химического анализа. Для этого в чистую ёмкость объёмом 0.5 л производили отбор воды, предварительно однократно ополаскивая ёмкость отбираемой водой. На каждой ёмкости с пробой были указаны следующие параметры: дата отбора пробы, место забора.

2.3. Методика отбора проб субстрата

Подземный субстрат отбирали сразу в чистые zip-пакеты, включая только первый пятисантиметровый слой.



Рис 2. Отбор смывов и проб

2.4. Методика отбора смывов со стен

Смывы со стен отбирали по методике отбора смывов для короткого санитарно-биологического анализа. Для этого стерильной ватной палочкой проводили по поверхности, с последующим её помещением в чистый zip-пакет. На каждом пакете с пробой были указаны следующие параметры: дата отбора пробы, место забора.

2.5. Методика выращивания штаммов бактерий

Бактерии выращивались в чашках Петри в универсальной питательной среде Luria-Bertany. Для этого среду смешали с агар-агаром в соотношении: 25граммов среды - 1 л. агар-агара. Смесь предварительно была простерилизована. После застывания среды, в чашки были помещены суспензии бактерий, полученные путем помещения ватных палочек со смывами в дистиллированную воду. Бактерии росли в термостате в течение 7 дней при температуре 31,5 градусов Цельсия.



Рис 4. Выращенные бактерии

2.6. Методика исследования бактериологического материала

1. Выращенные колонии были описаны по критериям: форма колонии, структура поверхности колонии, цвет колонии и контур края.

2. Из колоний каждого типа были взяты бактерии, с помощью микробиологической иглы, помещены в каплю воды на предметном стекле и покрашены раствором метиленового синего. Затем препарат высушили и исследовали в эмульсионном масле при помощи микроскопа «Микромед-1». Некоторые образцы были покрашены по Граму.



Рис 5. Окрашивание препаратов бактерий

2.7. Методика определения количества расщепленного крахмала в почве, в которой выращивалась зараженная фитопатогенными плесневыми грибами пшеница, и изменения этих параметров под воздействием процессов жизнедеятельности бактерий Гурьевских каменоломен

1. Отбор зараженных зерен (преимущественно, грибами р.Fusarium)
2. Выращивание пшеницы в почве на протяжении двух недель.
2. Приготовление почвенных вытяжек путем фильтрации каждой пробы.
3. В вытяжку внесли 1%-ный раствор крахмала, подкрашенный спиртовым раствором йода до ярко-синего цвета, разделили на 5 равных частей и смешали с суспензией смесей бактерий с разных точек.

4. Было проведено измерение оптической плотности растворов фотоколориметром «Экотест 2020» сразу после внесения раствора крахмала, через 30 минут и 12 часов. В пробах, где работа грибных амилаз, разлагающих углеводы, была более активной, синяя окраска раствора крахмала исчезала быстрее и оптическая плотность таких растворов была меньше, уменьшаясь в прямой зависимости от обесцвечивания крахмала в пробах.



Рис 6. Зараженная пшеница



Рис 7. Процесс фильтрации



Рис 8. Процесс измерения оптической плотности проб фотоколориметром

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.

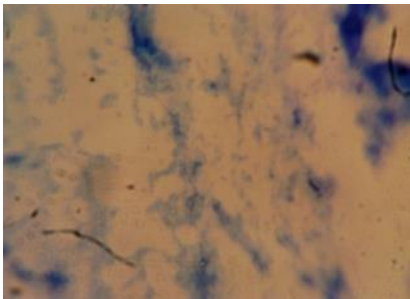
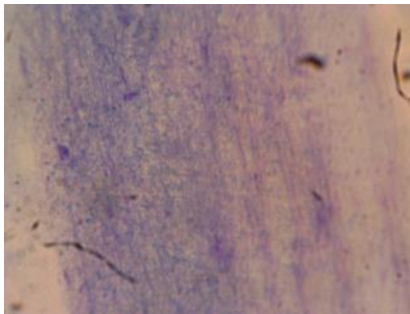
ПОВЫШЕНИЕ АНТИФИТОПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА КАРБОНАТНЫХ ПОЧВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОБНЫХ АССОЦИАЦИЙ ГУРЬЕВСКИХ КАМЕНОЛОМЕН

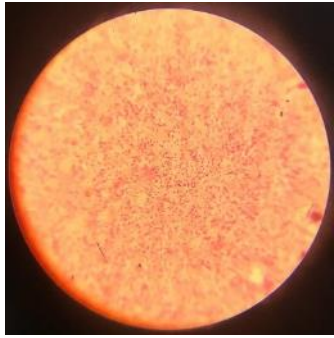
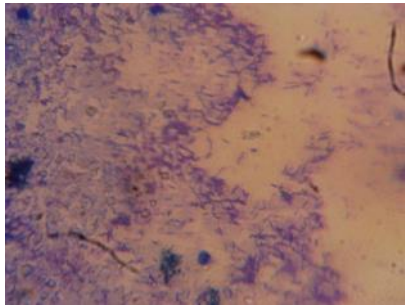
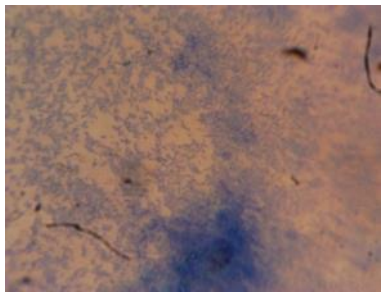
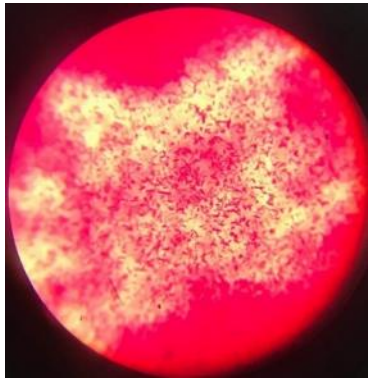
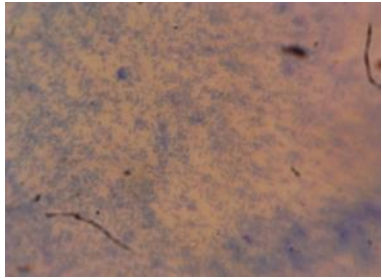
3.1. Выращивание колоний бактерий

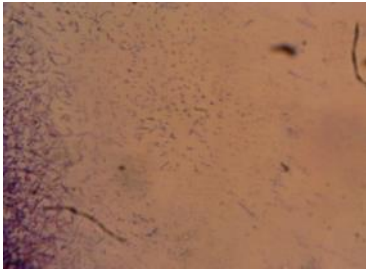
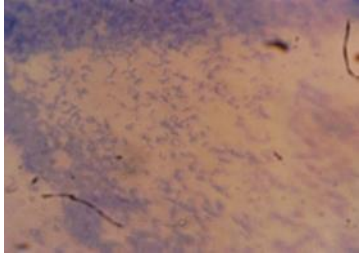
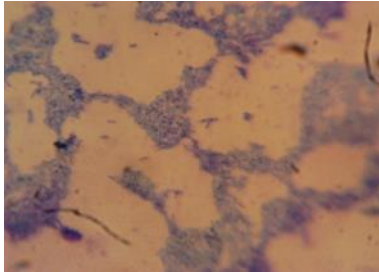
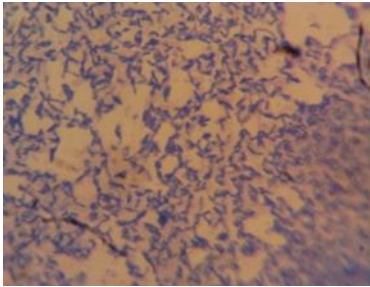
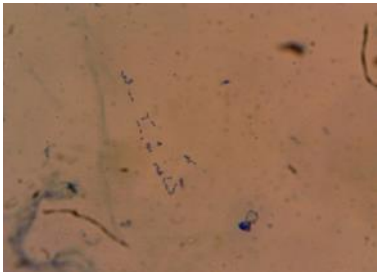
По результатам культивирования бактерий из разных точек отбора проб в Гурьевских каменоломнях получены штаммы различных микроорганизмов, преимущественно – бактерий (рис. 4).

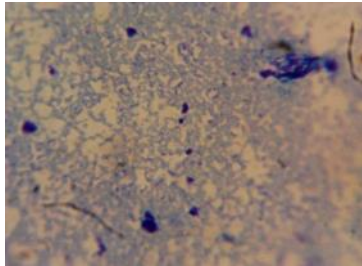
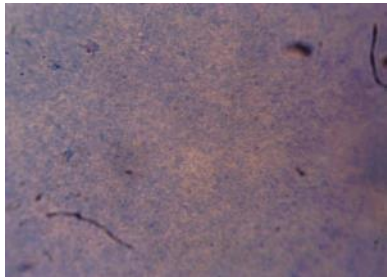
Результаты описания колоний представлены в таблице 3. Так как форма и размеры многих бактерий достаточно похожи, определение до вида без генетического анализа не представляется возможным, каждой колонии вне зависимости от того, определен род или штамм бактерии, присвоен шифр.

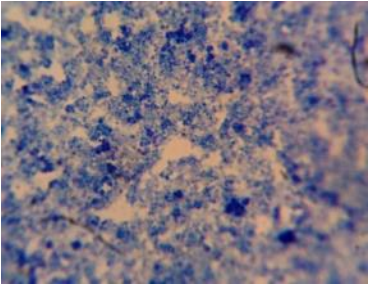
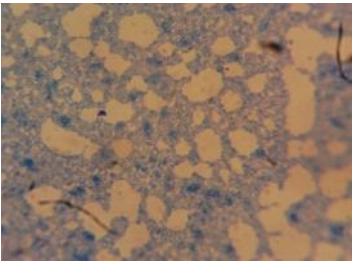
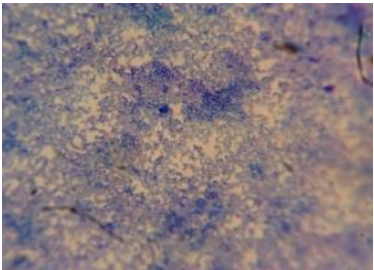
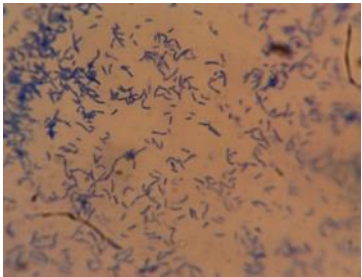
Таблица 3. Результаты определения бактерий

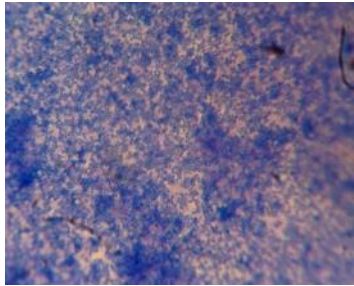
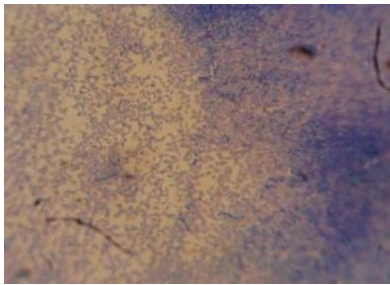
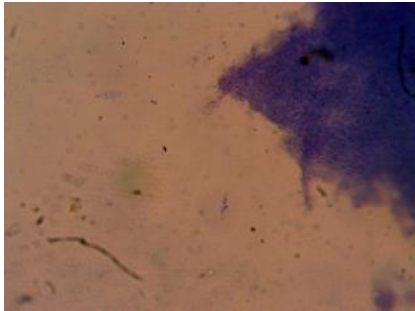
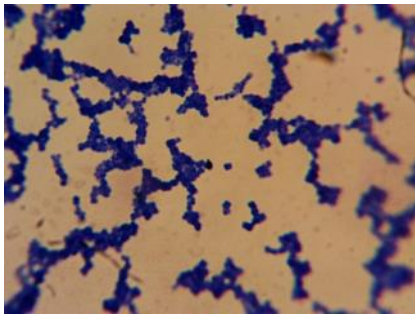
Место отбора пробы	Шифр колонии	Форма	Размер	Окр. по Граму	Фото, предполагаемый род/штамм, семейство
питьевое озеро	a1	стрепто-кокки	0,5 мкм	+	Streptococcaceae 
	б1	кокки	0,3 мкм	*	

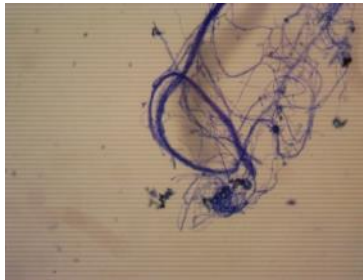
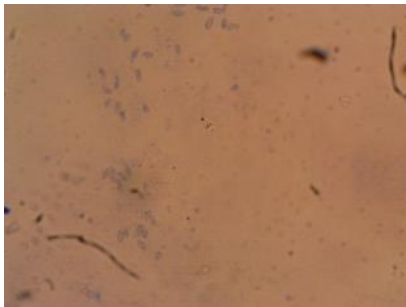
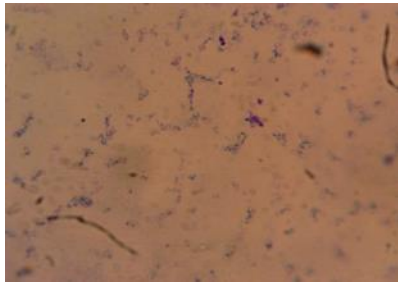
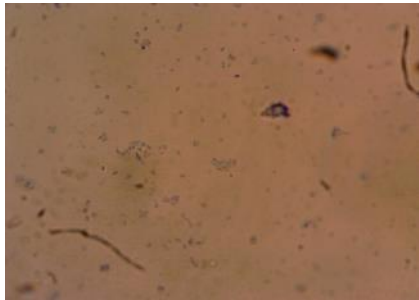
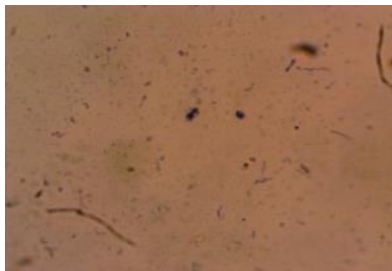
	в1	бацилла	1x0,5 мкм	-	Bacillus sp. 
свежее пиво	а2	стрепто- бацилла	2,5x1 мкм	* -	Pseudomonas aeruginosa 
	б2	стрепто- бацилла	1,5x0,5 мкм	-	Streptobacillus sp. 
	в2	бацилла	3x2мкм	-	Bacillus sp. 
глюкало	а6	стрепто- бацилла	1,5x0,3 мкм	*	Streptobacillus sp. 

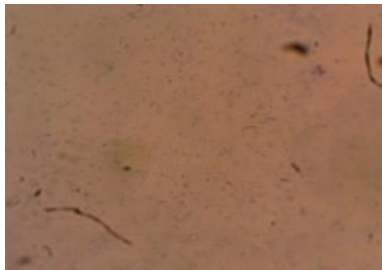
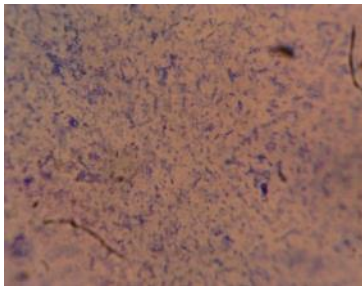
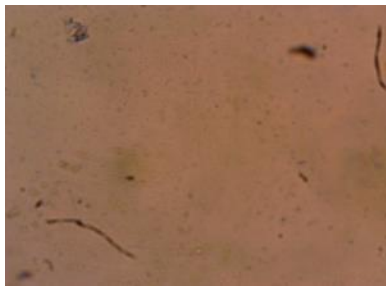
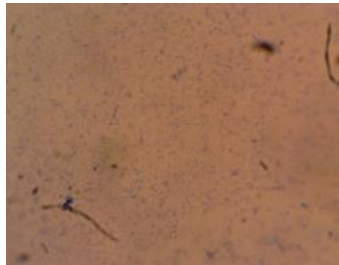
	б6	бацилла	1x0,2 мкм	*	Bacillus sp. 
лестница в небо	а7	стрепто- бацилла	1,3x0,5 мкм	*	Streptobacillus sp. 
	в7	стафило- кокки	0,4 мкм	*	Staphylococcus sp. 
тройка	а8	бацилла	3x1,5 мкм	-	Escherichia sp. 
	б8	диплобацилла	2x1 мкм	+	

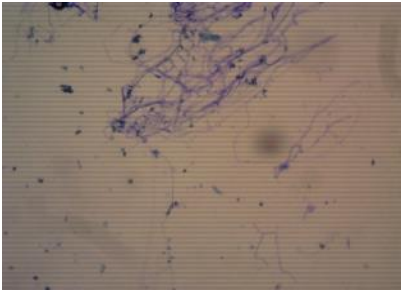
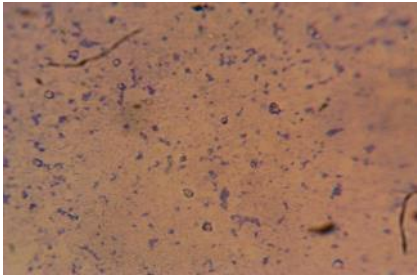
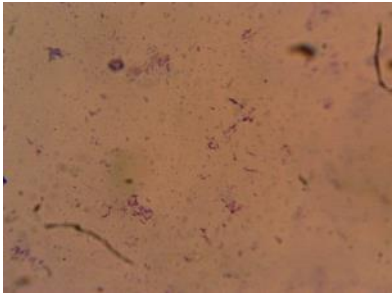
	в8	стрептококки	1,8 мкм	*	Streptococcaceae 
	г8	бацилла	0,5x0,1 мкм	*	Bacillus sp. 
трапезная	а9	плесень	гифы >2 мм		Cladosporium sp. 
	б9	кокки		*	
	в9	кокки		*	

заячья щель	а10	стафилококки	1,2 мкм	*	Staphylococcus sp. 
	б10	плесень	гифы >10 мм		Mucor sp. 
	в10	стафилококки	0,8 мкм	*	Staphylococcus sp. 
	г10	бацилла	1,2x0,3 мкм	*	Bacillus sp. 
	д10	бацилла	2,5x1,2 мкм	*	Escherichia sp. 

	е10	диплококки	1,2 мкм	*	Neisseria sp. 
	ж10	дрожжи	3—7 мкм	*	Lipomyces sp. 
чайник	а11	кокки	1 мкм	*	
	б11	дрожжи	3—7 мкм	-	Lipomyces sp. 
	в11	стафилококки	2 мкм	+	Staphylococcus sp. 

	г11	плесень	гифы> 10мм		Rhizopus sp. 
жижа	а12	дрожжи	3—7 мкм	*	Lipomyces sp. 
	б12	кокки	1 мкм	*	
	в12	кокки	0,5-0,7 мкм		
ракушки	а13	плесень	гифы> 3мм		Rhizopus sp. 

	б13	кокки	1 мкм		
жернова	а14	бацилла	1,6 мкм		Bacillus sp. 
	б14	вибрионы	<0,5 мкм		Vibrionaceae 
гук	а15	плесень	гифы > 6мм		Penicillium sp. 
	б15	стрептобацилла	<0,5 мкм		Streptobacillus sp. 

СК СВ	a16	плесень	гифы > 10мм		Penicillum sp. 
	б16	стрептококки	1 мкм		Streptococcaceae 
	в16	бацилла	0,9x0,3 мкм		Bacillus sp. 

Данными нашего исследования пещерной микробиоты заинтересовались спелеологические сообщества, так как исследования бактерий пещер и каменоломен довольно фрагментарны.

Первое – это информационно-поисковая система «Пещеры», представители которой готовы разместить на сайте сообщества <http://speleoatlas.ru> результаты определения пещерной микробиоты Гурьевских каменоломен в соответствующем разделе «Биота» (Гурьевские каменоломни, или Бякинские пещеры представлены на сайте «Спелеоатласа»).

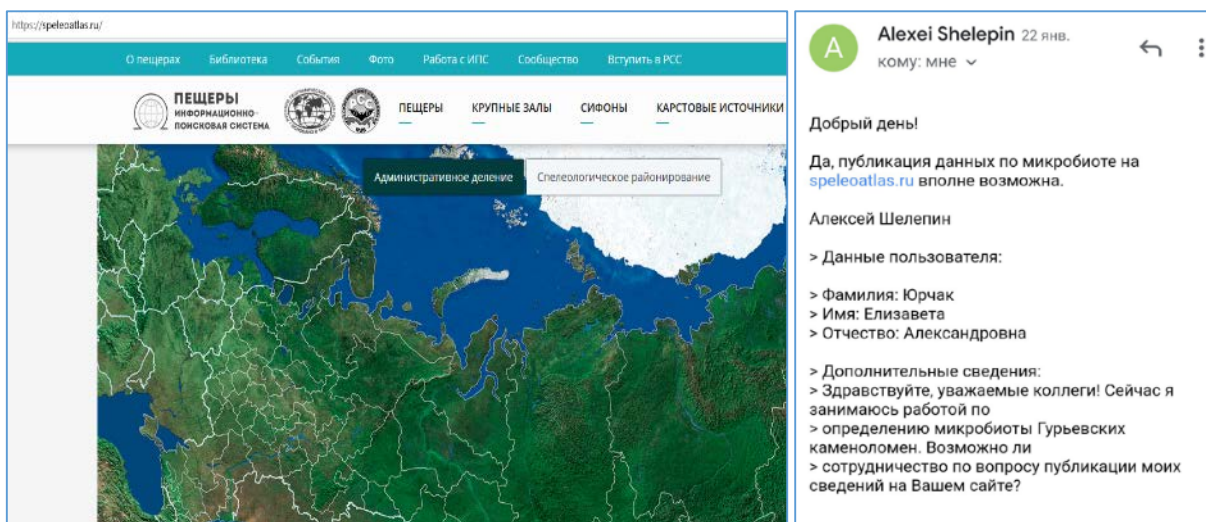


Рис.9. Сайт информационно-поисковой системы «Пещеры», ответ администратора

Мы наладили контакты с сайтом, администратор и соавтор проекта Алексей Леонидович Шелепин высказал положительное мнение о публикации наших результатов на сайте «Пещер» (рис.9).

Второе сообщество – региональный «Тульский спелеологический портал» (организаторы – турклубы «Недра» и «Одиссей»), руководителем которого является Сергей Олегович Иващенко (тульский спелеолог по прозвищу «Таксист», создавший самую подробную карту Гурьевских каменоломен, которую вы могли видеть на рисунке 3). Сейчас ведется работа по размещению материалов по определению микробиоты на сайте портала <http://tulaspeleo-ru.1gb.ru/> (рис.10)

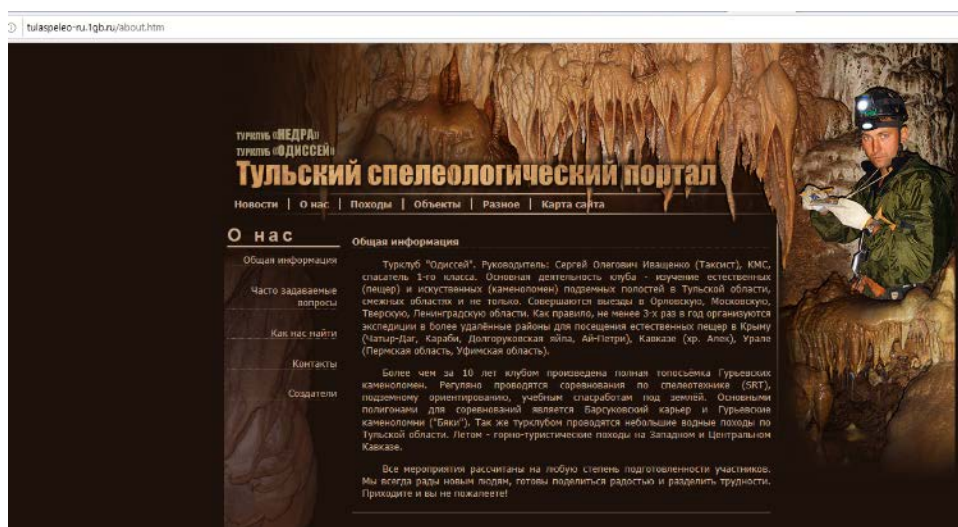


Рис.10. Тульский спелеологический портал (сайт)

3.2. Условия среды обитания и пределы выживаемости бактерий.

В рамках работы были определены условия и границы выживаемости бактерий.

Гурьевские каменоломни— подземные сооружения XV—XVI веков по добыче известняка на берегу реки Осётр (бассейн Оки) в Тульской области.

Представляют собой три отдельных системы подземных ходов суммарной протяжённостью до 50 километров. Оба варианта названия происходят от топонимов Венёвского района: Название «Гурьевские каменоломни» — по расположенной недалеко от входа в систему деревне Гурьево; название «Бяковские каменоломни»— по деревне Бяково, также расположенной недалеко от входа. Не рекомендованы к посещению без квалифицированного сопровождения.

Таблица 4. Факторы среды обитания микроорганизмов

Фактор	Изменяемость	В момент забора (29.10.2019)
Ветра	Летом и зимой усиливаются: чем больше разница температур, тем сильнее проникновение. Сильный ветер только у единственного входа. Едва заметный в коридорах. В забоях отсутствует.	Типичная осень, незначительные ветра (менее 0,5 м/с).
Влажность воздуха	~70%	~70%
рН почвы	-	8-8,5
рН воды	-	7,5-8
Температура воды; воздуха	+5; +8 °С	+5; +8 °С
Растения	Естественным образом не выживают, но удачно проводились эксперименты по выращиванию картофеля и лука	-
Крупная биота	Беспозвоочные: насекомые (комары, мокрицы), черви. Позвоночные: крысы, летучие мыши.	

pH почвы и воды в пещерах смещен в сторону щелочного, так как бывших каменоломнях добывали известняк, на сегодняшний момент основной средообразующей породой являются различные формы известняка и карбонатов.

Границы выживаемости бактерий были определены для установления условий, в которых бактерии функционируют наиболее активно. Для этого мы учитывали температуру, pH среды, наличие карбонатов при отборе проб (в естественной среде обитания), во время культивации колоний в лаборатории на питательных средах и дальнейшем экспериментальном исследовании при комнатной температуре без термостата. Данные отражены в таблице 5.

Таблица 5. Границы выживаемости бактерий

Характеристика	Условия		
	Естественная среда обитания	Культивирование на питательной среде (термостат)	Культивирование на питательной среде (без термостата)
Температура, °C	+7	+31,5	23
pH среды	8,5	7,0	7,0
Наличие карбонатов	+	+	+ (сниженная концентрация)

Таким образом, из таблицы 5 видно, что бактерии имеют достаточно широкие пределы выживаемости в рамках затронутых нами значений: при температуре в диапазоне (+7) - (+32) °C, pH среды от 7,0 до 8,5. Для обеспечения нормальной жизнедеятельности бактерий необходимо обеспечить наличие карбонатов, но замечено, что колонии обладают высокой активностью и при сниженном содержании данных солей при выращивании в лабораторных условиях.

3.3. Исследование способности бактерий Гурьевских каменоломен расщеплять ферменты фитопатогенных плесневых грибов.

Многие сельскохозяйственные растения выращиваются на почвах с повышенным содержанием карбонатов. Из-за повышенного и постоянного внесения удобрений многие почвы сельскохозяйственных угодий могут

выщелачиваться и самостоятельно. Карбонатность почв определяется присутствием в составе карбоната кальция (CaCO_3 , или кальцит). Например, карбонатные почвы приемлемы для выращивания таких сельскохозяйственных растений, как виноград, зерновые культуры, пасленовые культуры, масличные (подсолнечник и др.) При невысоком защелачивании (рН менее 8) успешно можно сажать многие плодовые растения – персик, абрикос, черешню, грушу, айву, кизил, орех грецкий, миндаль, шелковицу. Из овощных культур такие условия выдержат свекла, капуста, горох, фасоль, тыква, кабачок, лук, чеснок.

Проблема защелачивания почв карбонатом кальция актуальна для южных сельскохозяйственных районов России, но к сожалению, изменение рН почв из-за этого не является препятствием для распространения и адаптации фитопатогенных плесневых грибов, паразитирующих на растениях. Проблема заражения растений фузариозом и другими подобными болезнями актуальна до сих пор, так как данные грибы довольно быстро приспосабливаются к создаваемым против них препаратам и распространяются на огромные расстояния благодаря высокой степени спороношения и проникания в различные субстраты, где могут продолжить свою жизнедеятельность и активное размножение. Единственная особенность этих грибов, что в основном их питание осуществляется за счет работы грибных амилаз, использующих углеводы, производящиеся и накапливающиеся в растениях в процессе их роста и развития. Протеолитических ферментов у таких грибов мало, в основном действуют именно различные типы амилаз. Мы решили проверить, как это можно использовать для борьбы с фитопатогенами с помощью бактерий Гурьевских каменоломен.

Ассоциации бактерий Гурьевских каменоломен для своей жизнедеятельности используют в основном для расщепления субстрата и питания протеолитические ферменты. Так как гифы плесневых грибов имеют

в своем составе белки, они могут быть разложены с помощью ферментов исследованных нами бактерий.

На протяжении двух недель мы вырастили 5 одинаковых образцов пшеницы, из зараженного посевного материала, в том числе и фузариозом. Количество почвы и семян было одинаковым во всех образцах (рис.11).



Рис.11. Образцы пшеницы для исследования

Затем мы отобрали ассоциации бактерий из нескольких наиболее ярких и отличных друг от друга локаций каменоломен: «Глюкало», «Свежее пиво», «Лестница в небо», «Питьевое озеро» и «Карбонатная порода».

После приготовления суспензий бактерий, профильтровали почву и зерновки пшеницы (без верхней части растения), таким образом получив почвенные вытяжки, куда внесли суспензии бактерий. После интенсивного смешивания внесли в полученные пробы 1 мл 1%-ного раствора крахмала, подкрашенного йодом. Далее измеряли оптическую плотность проб по обесцвечиванию крахмала сразу после внесения крахмала, через 30 минут и 12 часов. Нас интересовали пробы, в которых расщепление крахмала, и, как следствие, изменение оптической плотности, было самым медленным. Результаты измерений представлены ниже на графиках 12-16.



Рис.12. Расщепление грибных амилаз ассоциацией бактериальных колоний локации «Глюкало» по изменению оптической плотности вытяжки с внесенным раствором крахмала, подкрашенного йодом

На рис.12 видно, что в первые 30 минут расщепление крахмала происходило, оптическая плотность пробы уменьшилась на 0,003 единицы, через 12 часов произошло уменьшение оптической плотности ещё на 53 единицы.

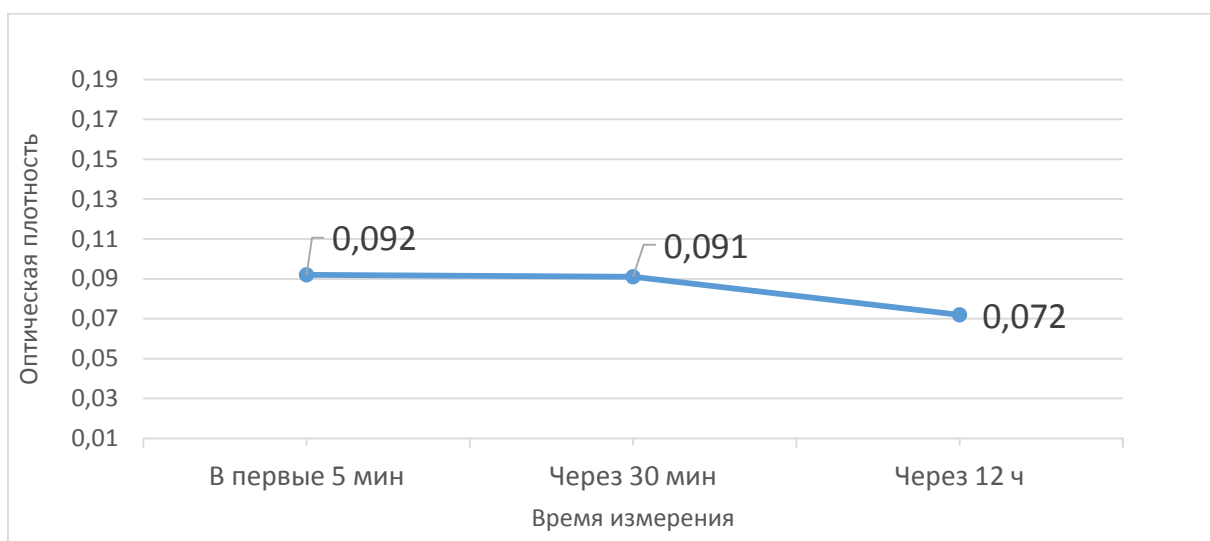


Рис.13. Расщепление грибных амилаз ассоциацией бактериальных колоний локации «Свежее пиво» по изменению оптической плотности вытяжки с внесенным раствором крахмала, подкрашенного йодом

На рис.13 заметно менее интенсивное уменьшение оптической плотности пробы, в первые 30 минут крахмал практически не расщеплялся, оптическая плотность изменилась на 0,001 единицу, через 12 часов наблюдали уменьшение оптической плотности еще на 0,019 единиц.

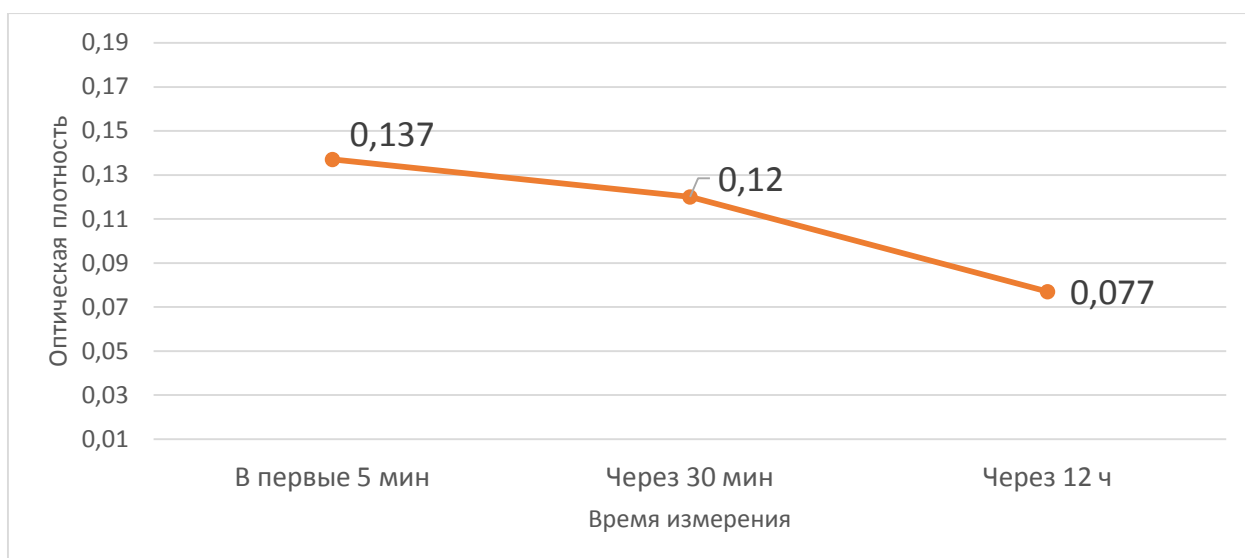


Рис.14. Расщепление грибных амилаз ассоциацией бактериальных колоний локации «Питьевое озеро» по изменению оптической плотности вытяжки с внесенным раствором крахмала, подкрашенного йодом

Рис.14 показывает, что уже в первые 30 минут оптическая плотность этой пробы уменьшилась на 0,017 единиц. Это наибольший результат по расщеплению крахмала во всех пробах в первые 30 минут. Через 12 часов оптическая плотность пробы уменьшилась еще на 0,043 единицы.

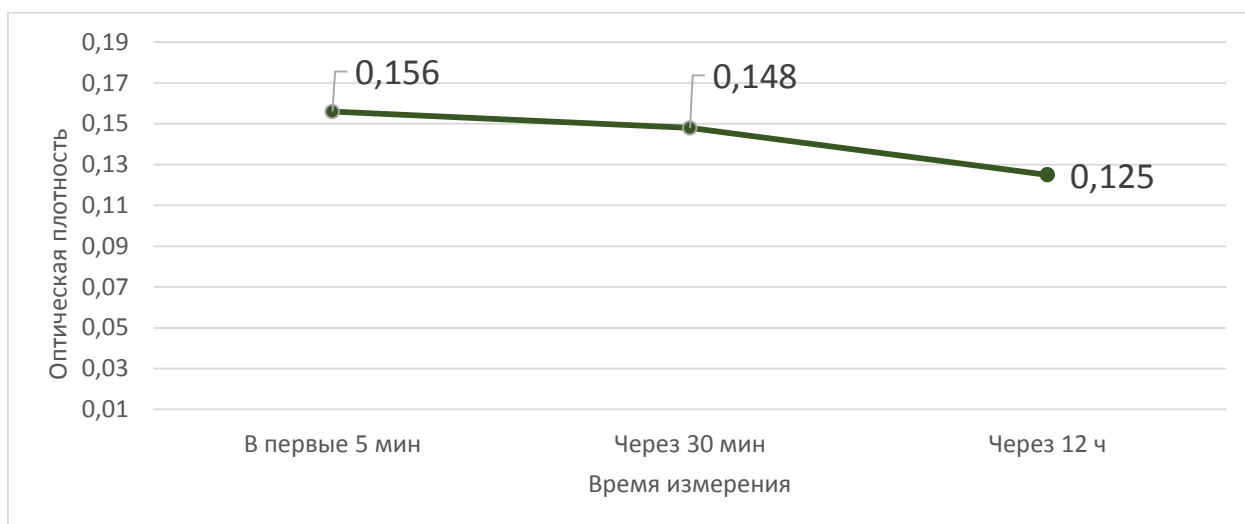


Рис.15. Расщепление грибных амилаз ассоциацией бактериальных колоний локации «Лестница в небо» по изменению оптической плотности вытяжки с внесенным раствором крахмала, подкрашенного йодом

На рис.15 показано расщепление крахмала в первые 30 минут, которое повлекло уменьшение оптической плотности раствора на 0,008 единиц, в следующие 12 часов уменьшение было на 0,023 единицы.

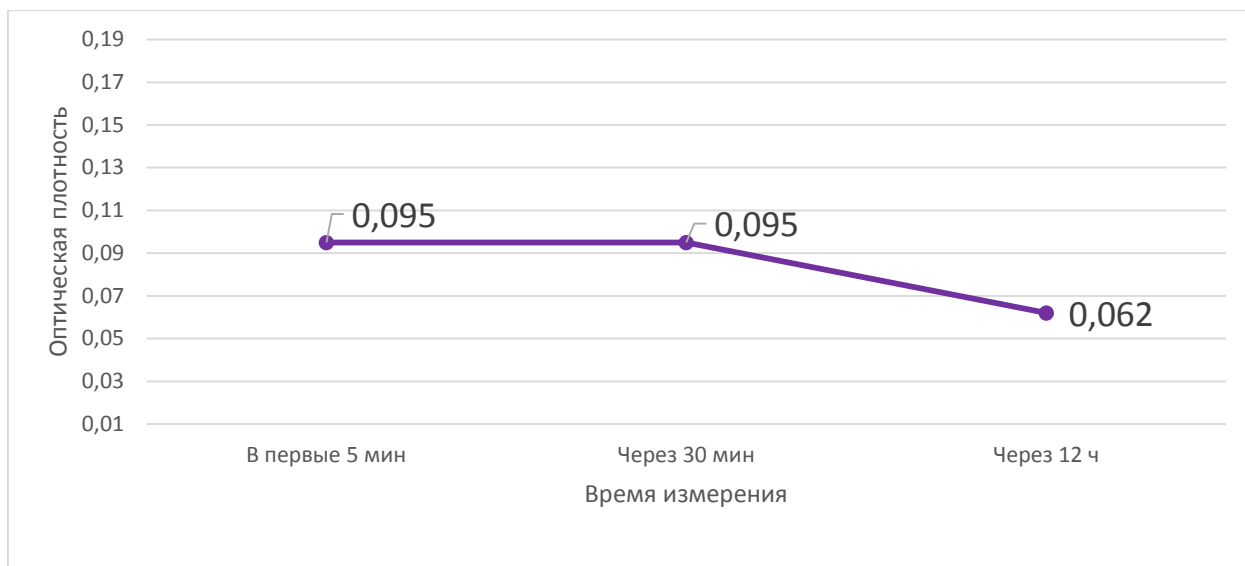


Рис.16. Расщепление грибных амилаз ассоциацией бактериальных колоний локации «Карбонатная порода» по изменению оптической плотности вытяжки с внесенным раствором крахмала, подкрашенного йодом

На рис.16 хорошо видно, что оптическая плотность не изменилась в первые 30 минут, крахмал не расщеплялся. В следующие 12 часов произошло уменьшение оптической плотности раствора на 0,033 единицы.

Таким образом, смотря на графики, отраженные на рис. 10-14, можно сделать вывод, что не все бактериальные ассоциации подходят для расщепления протеолитических ферментов фитопатогенных грибов, однако наиболее выражено действовали бактерии из локаций «Свежее пиво» и «Карбонатная порода», так как блокировали деятельность грибных амилаз, тем самым не давая им использовать крахмал в качестве субстрата. Предположим, что дальнейшее расщепление крахмала во всех пробах может говорить о прекращении жизнедеятельности бактериальных ассоциаций, поэтому необходимо варьировать состав суспензий на их основе для борьбы с фитопатогенными грибами.

Так как данные виды бактерий довольно устойчивы к температурным перепадам и pH среды 7-8,5, рекомендовано продолжить исследование как бактериальных ассоциаций, так и отдельных штаммов бактерий Гурьевских каменоломен для создания вариабельных комплексных биопрепаратов для повышения антифитопатогенного потенциала почв сельскохозяйственных

угодий. Таким образом мы решим впоследствии проблему заражения сельскохозяйственных растений фитопатогенными плесневыми грибами, которая влечет за собой заражение продуктов питания, распространение грибов и снижение антифитопатогенного потенциала почв.

На рисунке 17 схематично представлено, каким путем можно решить проблему, описанную выше.



Рис.17. Схема решения проблемы снижения антифитопатогенного потенциала почв

ВЫВОДЫ

По итогам проекта сделаны следующие выводы:

- 1) Проведен отбор 14 проб воды, субстрата и смывов из предполагаемых мест обитания микробиоты на базе Гурьевских каменоломен Веневского района Тульской области,;
- 2) Получено 40 колоний микроорганизмов после культивирования их в лабораторных условиях;
- 3) В состав микробиоты Гурьевских каменоломен входят ассоциации бактерий, плесневых грибов, почвенных дрожжей различных родов и штаммов;
- 4) Классифицированные результаты исследования будут размещены на информационных порталах в сети Интернет: в этом заинтересованы спелеологические порталы – информационно-поисковая система «Пещеры» (<https://speleoatlas.ru>) и Тульский спелеологический портал (<http://tulaspeleo.ru.1gb.ru/>);
- 5) Некоторые бактериальные ассоциации Гурьевских каменоломен вызывают антифитопатогенное воздействие на грибные амилазы, что способно останавливать процессы жизнедеятельности фитопатогенных плесневых грибов, но требуется изучение взаимодействия конкретных бактериальных штаммов в отношении друг друга;
- 6) Бактериальные ассоциации Гурьевских каменоломен вполне можно использовать для создания биопрепаратов на их основе, в отношении повышения антифитопатогенного потенциала карбонатных почв и снижения зараженности фитопатогенными грибами сельскохозяйственных растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бекер М.Е. (под ред.). Трансформация продуктов фотосинтеза. - Рига: Знание, 1984. - 252 с.
 2. Бицадзе Н.Г. Способность к выделению пектолитических, целлюлолитических ферментов и токсических веществ патогенным грибом *Coniothyrium cerasi*.//Микология и фитопатология - 2006. - Т.40, в.5. С.433-437.
 3. Горьковенко В.С. Влияние условий окружающей среды на обилие супрессивных видов в агроценозе озимой пшеницы / В.С. Горьковенко, Н.А. Москалева, Л.А. Шадрин, Н.М. Смоляная // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем: матер. Междунар.науч.-практ.конф. «Биологическая защита растений, перспективы и роль в фитосанитарном оздоровлении агроценозов и получении экологически безопасной с.-х. продукции» 23-25 сент.2008.-Краснодар 2008.-С.107-109.
 4. Дьяков Ю.Т. Занимательная микология
 5. Енкина, О. В. Микробические аспекты сохранения плодородия черноземов Кубани / О. В. Енкина, Н. Ф. Коробской . - Краснодар, 1999. - С. 4-33
 6. Звягинцев Д.Г. Современные проблемы почвенной микробиологии /Д.Г.Звягинцев// Тезисы докладов III Всероссийской конференции; Изд. МГУ, - 1986.- С.4.
 7. Научный журнал КубГАУ, №81(07), 2012 года
 8. Общая фитопатология Чикин Ю.А.
 9. Тарр С.Основы патологии растений. - М.: Мир, 1975. - 587с.
 10. Т.Ю. ГАГКАЕВА, О.П. ГАВРИЛОВА, М.М. ЛЕВИТИН, К.В. НОВОЖИЛОВ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (ВИЗР) Фузариоз зерновых культур
- Электронные ресурсы:
11. Новый справочник химика и технолога. Режим доступа:
http://chemanalytica.com/book/novyuy_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/06_syre_i_produkty_promyshlennosti_organicheskikh_i_neorganicheskikh_veshchestv_chast_II/5426