

ВСЕРОССИЙСКИЙ КОНКУРС ЮНЫХ ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ
СРЕДЫ

НОМИНАЦИЯ: СЕКЦИЯ: МИКОЛОГИЯ, МИКРОБИОЛОГИЯ И НИЗШИЕ
РАСТЕНИЯ.

ИЗУЧЕНИЕ ЭПИФИТНОЙ МИКРОФЛОРЫ ФИЛЛОСФЕРЫ И ФИЛЛОПЛАНЫ
КОМНАТНЫХ ДРЕВЕСНО-ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ
ФИКУСА БЕНДЖАМИНА.

Автор работы: Кургаева Венера, 17 лет,
ДО «Исследователь»,
МБУДО «Детская Экологическая станция»,
Руководитель: Корчемнова Людмила Григорьевна,
педагог доп. образования
МБУДО «Детская Экологическая станция»

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	3
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	4
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	6
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	8
ВЫВОДЫ	10
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	11
ПРИЛОЖЕНИЕ	

ИЗУЧЕНИЕ ЭПИФИТНОЙ МИКРОФЛОРЫ ФИЛЛОСФЕРЫ И ФИЛЛОПЛАНЫ КОМНАТНЫХ ДРЕВЕСНО-ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ ФИКУСА БЕНДЖАМИНА.

Автор работы: Кургаева Венера, 17 лет
ЯНАО, г. Новый Уренгой, МБУДО «Детская Экологическая станция», ДО
«Исследователь»

ВВЕДЕНИЕ. В природных условиях высшие растения и микроорганизмы тесно взаимосвязаны, между ними существуют различные формы взаимоотношений и взаимного влияния. В норме на поверхности живых растений (на листьях, стеблях, плодах, семенах) обитают микроорганизмы, которые называются эпифитной микрофлорой. Эпифитные микроорганизмы играют важную роль в жизни растения-хозяина. Они имеют санитарно-экологическую роль: фиксируют азот, выполняют защитную функцию, угнетая развитие патогенных организмов, попадающих на поверхность растения. Положительное влияние выражается также в их способности продуцировать ауксины, активизирующие рост и развитие растений, редуцировать аэрозольные загрязнители, выполняя функцию “мусорщиков”. Поскольку микроорганизмы чувствительны к изменениям внешней среды, они могут служить индикаторами состояния растения, в том числе на ранних стадиях патогенеза. (https://elibrary.ru/download/elibrary_17929381_95459573.pdf).

Однако, покупая комнатные растения в магазине, мы зачастую не задумываемся о том, что кроме красоты в дом вместе с растением приносим множество различных микроорганизмов, в том числе и патогенных.

Статистика показывает, что 80% растений, которые предназначены для продажи, поражены различными болезнями и вредителями, что в свою очередь может оказывать отрицательное воздействие на человека. По нашему мнению, исследования, связанные с микробиологической чистотой комнатных растений значимы и актуальны. Между тем Правительственным Постановлением № 982 от 1 декабря 2009 года сформирован перечень изделий, которые в обязательном порядке должны пройти подтверждение соответствия нормам Госстандарта. Поскольку цветы не вошли в указанный список, сертификат качества не является непременным условием для их выращивания, применения и продажи. Фактически, данная продукция может реализовываться и без специального разрешительного документа. По этому, мы решили выяснить микробиологическую чистоту одного из самых популярных и хорошо продаваемых комнатных растений фикуса Бенджамина и изучить микрофлору, обитающую на стеблях и листьях растения.

Цель работы: изучить микрофлору филлосферы и филлопланы комнатного древесно-декоративного растения фикуса Бенджамина

Задачи исследования.

1. Изучить группы микроорганизмов населяющих филлосферу экзотических растений преимущественно рода Фикусы.
2. Определить качественный состав микрофлоры (стебли и листья) фикуса Бенджамина, используя определитель Красильникова и сгруппировать их по влиянию на растение-хозяина (эпифитную и патогенную микрофлору).

3. Сравнить микроорганизмы на листьях и стеблях, проанализировать результаты, сделать выводы и заключения по работе.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. Эпифитная микрофлора растений – особая экологическая группировка микроорганизмов, обитающих на поверхности надземных частей здоровых растений на протяжении всего вегетационного периода (ДивероллБ. Дж., 1980). Значение эпифитной микрофлоры в жизни растений определяется, главным образом, их участием в питании растений, предохранением от инфицирования болезнетворными микроорганизмами, стимулированием роста и развития растений продуктами метаболизма (Новикова Н.С., 1963).

Эпифитным микроорганизмам не предавали большого значения, так как считали, что их присутствие на растениях никак не отражается на жизнедеятельность последних и что их состав ограничен немногими видами. Между тем, сосуществование растений с микроорганизмами могло продолжаться на протяжении длительного времени, только благодаря выработке у них взаимопользных приспособлений друг к другу. В процессе естественного отбора при тесном соприкосновении разных видов живых существ эти взаимопользные приспособления закреплялись у них в потомстве, способствуя процветанию каждого вида. (<https://dlib.rsl.ru/viewer/01000807682#?page=1>)

Впервые обратили внимание на наличие микроорганизмов на поверхности растений Burti и Dtiggeli еще в 1903 году. В дальнейшем состав и значение эпифитной микрофлоры в жизни растений изучали очень мало. В основном эта микрофлора интересовала исследователей лишь при изучении микробиологических процессов, происходящих при силосовании зеленой растительной массы; при изучении условий хранения зерна; при установлении причин загрязнения молока и т. п. Кроме того, большинство исследователей обычно пользовались для выделения эпифитных микроорганизмов в качестве питательной среды мясопептонным агаром, вследствие чего обнаруживали преобладание только двух видов — *Ps. herbicola* и *Ps. fluorescens*. Другие виды, белее медленно растущие на этой среде, в присутствии этих микроорганизмов почти не выявлялись (Возняковская Ю.М., 1964). В 1944 году изучение эпифитной микрофлоры было начато Я. П. Худяковым, который поставил вопрос о необходимости выяснения её роли в жизни растений. Это направление в дальнейшем получило своё развитие.

Чаще всего, в настоящее время, микрофлора растений изучается в сельскохозяйственном производстве с целью выявления взаимовлияния агрохимикатов на микроорганизмы, в фармакологии изучается с целью прогнозирования сроков хранения.

Взаимоотношения микроорганизмов достаточно сложные процессы. При воздействии на одни виды микроорганизмов их место занимают другие. Так по исследованиям Успенской и Гринько после обработки фунгицидами листьев огурца отсутствовали представители гифомицетов из рода *Trichoderma*, однако установлено присутствие представителей рода *Penicillium*. Попадание фунгицидов на поверхность листьев вегетирующих растений так же приводит к изменению соотношения полезной микрофлоры к патогенной. А при добавлении к фунгицидам

азотистой подкормки, активизируется эпифитная микрофлора и тем самым подавляет патогенную микрофлору, развивающуюся на растении. Обобщая приведенные сведения отметим, что эпифитная микрофлора гораздо меньше защищена от стрессового влияния пестицидов, чем почвенная биота. Учитывая, что эпифитные микроорганизмы имеют существенное значение для нормальной жизнедеятельности растений, важно располагать детальной информацией о воздействии агрохимикатов на микробное население филосферы. К сожалению, этой информации очень мало, она носит фрагментарный характер. (Евсеев В.В., 2004).

При утилизации и использовании растительных отходов, которые образуются в результате промышленной переработки, учеными Кириленко О.А. и Левицким А.П. в научной статье «Микрофлора и гигроскопические свойства шротов лекарственных растений» предложены несколько вариантов решения проблемы - создание безотходной технологии и улучшение экологической обстановки и вовлечение в кормовую базу животноводства новые нетрадиционные ресурсы. Но, возникает вопрос о том, насколько безопасно применять растительные отходы как корма для животных. Так учеными были получены результаты исследования микрофлоры сырых и сухих шротов лекарственных растений после проведения водно-спиртовой экстракции. Результаты исследования показали, что в течение 1-2 месяцев в отходах лекарственных растений не развивается патогенная микрофлора в частности плесневые грибы, следовательно, в течение этого периода возможно использовать отходы как корм для животных. (Кириленко О.А., Левицкий А.П. и др., 1994).

Определение микроорганизмов очень трудоемкий процесс. Эти объекты живой природы не имеют четкой морфологической структуры, как у растений или животных. Среди ученых, которые делали попытки систематизировать микроорганизмы до сих пор нет четкого понимания и конкретики, почему одни виды микроорганизмов должны принадлежать к той или иной группе. К характерным культуральным признакам эпифитных микроорганизмов можно отнести яркую пигментацию колонии у многих из них, а также способность к обильному образованию слизи, что несомненно является защитным приспособлением для существования на поверхности растений. Кроме культуральных признаков, изучаются морфологические особенности выделенных микроорганизмов, в том числе характер расположения жгутиков (Возняковская Ю.М., 1964).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Исследование проводилось в МБУДО «Детская Экологическая станция» с сентября 2017 г. по январь 2018 г.

Объект исследования – микрофлора фикуса Бенджамина. Предмет исследования – качественный состав микрофлоры филосферы и филопланы фикуса Бенджамина.

Место расположения опытного растения - оранжерея декоративных экзотических растений МБУДОР «Детской Экологической станции», условия произрастания: t° почвы 23°C ; t° на границе расположения филосферы -23°C ;

t°окружающей среды-22°C; влажность воздуха более70%: влажность почвы-56%, высота растения 221см.В районе произрастания экспериментального растения находятся растения преимущественно семейства фикусовые (прил. 1., рис. 1).

Опытные образцы микрофлоры отобраны в зоне формирования филосферы на высоте 15см, 73 см, 146 см и 221 см от поверхности почвы; филопланы- на высоте 73см,146см, 221см. На высоте 15 см листья отсутствовали.

В работе изучали преимущественно бактериальные, дрожжевые и актиномицетные формы микроорганизмов используя метод культивирования микроорганизмов на плотных питательных средах (МПА и Сабуро), внешний вид колоний микроорганизмов по Красильникову, внешний вид микроорганизма просматривали под микроскопом Альтами при увеличении в 640 раз. Определение микроорганизмов проводили до крупной таксонометрической единицы (рода) по определителю Красильникова.

Подготовка питательных сред и их стерилизация. Изучение филосферы растения проводили методом прямого посева на плотных средах: МПБагаризованная, при РН=8(среду подщелачивали NaOH), дрожжевые и аскомицетные формы: среда Сабуро при рН от 5.5 до 5 (подкисляли среду при помощи HCl).

Среда Сабуро: Использовали сухую среду следующего состава: пептон (1%), глюкоза (4%), агар-агар (2%) и дистиллированная вода (93%),Для приготовления среды воду нагрели до растворения агара, отфильтровали в горячем виде через вату и марлю, разлили в чашки Петри и стерилизовали 30минна водяной бане.

МПБагаризованный: в 1 л мясного бульона (вода прокипяченная, отфильтрованная) добавили 5г агар-агара, 5г поваренной соли. Полученный бульон довели до кипения при температуре 180° С, в горячем виде отфильтровали через ватно-марлевый фильтр и разлили по стерильным чашам Петри. Чашки с готовой средой стерилизовалина водяной бане 30 мин.

Стерилизация лабораторного оборудования. Чашки Петри промыли в посудомоечной машине, затем прокипятили в течении 3-х часов. Перед стерилизацией на водяной бане чашки завернули в бумагу и стерилизовали 1 час. Бактериальные петли прокаливалине посредственно перед работой в пламени спиртовой горелки до покраснения. Петлю в горизонтальном положении вносят в нижнюю, наиболее холодную, часть пламени горелки, чтобы не произошло разбрызгивания сжигаемого патогенного материала. После того как он сгорит, петлю переводят в вертикальное положение, накаливают докрасна вначале нижнюю, затем верхнюю часть проволоки и прожигают петледержатель. Прокаливание проводят 5—7 с.

Проведение посевов. Для проведения бактериальных посевов микроорганизмов филосферы, использовали метод штрихов Дригальского. Предварительно зону забора биологического материала обеззаразили пламенем спиртовки, что бы все сторонние микроорганизмы с потоком воздуха изолировались. Затем обработав петлю в пламени спиртовки, провели забор материала для исследования согласно схеме опыта и приоткрыв крышку чашки Петри со средой (в присутствии пламени) внесли петлю с материалом и провели несколько штрихов. Выращивание микроорганизмов проводили в брудере при температуре + 33°C с относительной

влажностью 65% с экспозицией 48 часов согласно методике культивирования микроорганизмов (Кирай З., 1974).

Приготовление микропрепаратов. Перед приготовлением микропрепаратов необходимо простерилизовать предметные и покровные стекла спиртовым раствором или спиртовой салфеткой. Простерилизовать бактериальные петли, которыми будут брать образцы, и надеть перчатки, чтобы не испачкать стекла.

Приготовление сухого препарата. Сухие препараты используются для изучения образцов, не требующих для выживания контакта с водой. Необходимо осторожно поместить как можно более тонкий срез образца в центр предметного стекла и накрыть его покровным стеклом. Можно слегка придавить покровное стекло, чтобы выровнять препарат.

Приготовление влажного препарата. Влажные препараты используются, если образец не может обходиться без воды, чтобы оставаться живым. Это часто бывает с одноклеточными организмами и мелкими животными. С помощью пипетки, поместите одну-две капли дистиллированной воды в центр стекла. Поместите в воду образец и накройте его покровным стеклом. Можно немного прижать покровное стекло (<http://refleader.ru/meryfsrnyafs.html>).

В ходе работы описаны колонии микроорганизмов (форма, цвет, структура), определены формы микроорганизмов и их родовая принадлежность, проведены сравнительный анализ идентичности населения микрофлоры филлосферы и филлопланы в зависимости от высоты растения.

Определение общего количества грибов и дрожжей.

Определение общего количества грибов проводят на твердой среде Сабуро, на которую засевают 0,5 мл цельного или разведенного 1:10 препарата. Посевы инкубируют при 24°C в течение 5 суток, затем подсчитывают число выросших колоний и определяют количество грибов в 1 мл (1 г) препарата.

Определение микробной обсемененности.

В асептических условиях (в стерильной чашке Петри, обожжёнными ножницами и пинцетом) из листа и верхнего слоя стебля вырезают кусочек площадью 1 см², который помещают в пробирку с 10 мл стерильного физиологического раствора и взбалтывают в течение 5 мин. Из полученного смыва готовят четыре десятикратных разведения (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000), для посева в связи с большой обсемененностью растительного материала используют два последних (1:1000 и 1:10000) разведения. В стерильную чашку Петри вносят 1 мл смыва, после чего в нее наливают 15 мл расплавленного и остуженного до 45°C мясо-пептонного агара (МПА), перемешивают и после застывания агара посевы инкубируют при 37°C 24 - 48 ч. Производят подсчет выросших колоний на поверхности и в глубине агара. Полученное число колоний следует умножить на степень разведения.

число колоний X образец разведения X10=число бактерий на 1 мл

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Изучив результаты научного исследования Возняковской Ю.М. «Микрофлора здоровых растений», мы составили примерный перечень с фотографиями наиболее часто встречаемых микроорганизмов на листьях и корнях некоторых культурных растений,

выявленных Возняковской Ю.М. и её коллегами. Из чего мы предположили, что возможно некоторые из них могут обитать на экспериментальном растении (фикус Бенджамина) (прил. табл. 1). В результате нашего исследования мы составили перечень микроорганизмов, обитающих непосредственно на экспериментальном растении в области формирования филлосферы и филлопланы. По данным таблицы 1 мы видим, что формируется микрофлора различного состава. Преимущественно чаще всего встречаются представители класса актиномицетов.

Изучение микрофлоры растения на разных уровнях формирования филлосферы и филлопланы показали следующие результаты: разнообразие микрофлоры отмечено на высоте от 146 см – 221 см. Здесь обнаружено три типа колоний микроорганизмов (род *Actinobacillus*, *Pantoea*) и представитель плесневых грибов класс зигомицетов (род *Mucor*). На уровне от 73 см до 146 см в зоне формирования филлосферы развитие микроорганизмов не выявлено, а в зоне филлопланы обнаружено развитие колонии стрептококков (грамположительные микроорганизмы) и развитие плесневых грибов рода *Mucor*. На высоте от 15 до 73 см обнаружено развитие бактериальной колонии в зоне формирования филлосферы *Actinobacillus* (Bokor, 1930). Культура хорошо развивается на мясо-пептоном агаре. На питательных средах воздушный мицелий и спораносцы не образуются. Колонии белые, тестообразной консистенции, легко захватываются петлей, гладкие, бугристые, складчатые, блестящие или слегка матовые. Бокор (1930) описал этот организм под новым родовым названием - *Mucosoccus*. Однако, Красильников Н.А. отмечает, что описание этого организмичем не отличается от проактиномицетов. По Красильникову эти организмы названы *Proactinomycesoligocarboophilus* (Красильников Н.А., 1949).

На питательной среде Сабуро преимущественно развитие получили плесневые грибы рода *Mucor*. Сравнивая микроорганизмы филлосферы и филлопланы мы выявили, что одинаковые микроорганизмы встречаются на стеблях и листьях, преимущественно в верхних частях растения (146-221 см) - представители *Proactinomycesalbus*, *Pantoeastewartii*, *Mucor*.

Наибольшее количество было получено на среде МПА. Причем преобладали микроорганизмы аэробного способа дыхания (образуют видимые колонии на поверхности питательной среды).

Таблица 1.

Состав микрофлоры фикуса Бенджамина на надземных органах.

название	15-73 см		73-146 см		146-221 см	
	Ст-ль	лист	Ст-ль	лист	Ст-ль	лист
(МПА)						
<i>Actinobacillus</i> (Bokor, 1930), <i>Proactinomyces</i> (Beijerinck, 1903-1914) <i>Mycobacterium</i> <i>Proactinomycesalbus</i> (Krassilnikov, 1941)	+	-	-	-	-	+
Палочковидные бактерии					+	

грамотрицательные (сафранин)						
Rantoeastewartii Коковидные бактерии					+	
Стрептококи				+		
(Сабуро)						
Класс зигомицеты				+	+	+
Род Mucor						+
Серо-зелёная плесень						+

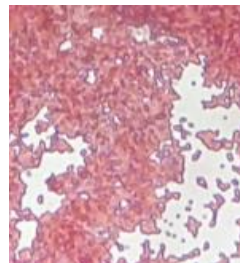
ВЫВОДЫ:

1. В зоне формирования филосферы и филопланы фикуса Бенджамина обитают преимущественно бактериальные и актиномицетные формы микроорганизмов.
2. Распределение микроорганизмов по зоне филосферы и филопланы различно, в зависимости от высоты их формирования. На высоте 146 см и выше более богата микрофлора чаще всего это представители муконовых плесневых грибов.
3. Установлено, что *Proactinomyces albus* и *Mucor* входят в состав микрофлоры филосферы и филопланы на всей поверхности растения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Возняковская Ю.М., Микрофлора здоровых растений. Диссертация автореферат, 1964 - [ЭЛЕКТРОННЫЙ РЕСУРС] – доступ к ресурсу - <https://dlib.rsl.ru/viewer/01000807682#?page=1>
2. Евсеев В.В. Эпифитная микрофлора и агрохимикаты // научная статья в журнале «Аграрная наука»// Курганская государственная сельскохозяйственная академия им. Т. С. Мальцева [ЭЛЕКТРОННЫЙ РЕСУРС] – доступ к ресурсу - <https://elibrary.ru/item.asp?id=18354248>
3. Диверолл Б. Дж. Защитные механизмы растений. – М.: Колос, 1980. – 127 с.
4. Новикова Н.С. Бактериальная флора надземных органов растений. – Киев: Изд-во АН Украинская ССР, 1963. – 88 с
5. Определитель Красильникова Н.А. [ЭЛЕКТРОННЫЙ РЕСУРС] – доступ к ресурсу <http://books.e-heritage.ru/book/10081638>
6. Кириленко О.А., Левицкий А.П., Кочетова А.А., Станкевич Г.Н., Апостол Н.В., Ратушная М.М., Дмитренко Л.Д. // Микрофлора и гигроскопические свойства шротов лекарственных растений // статья в журнале «Известия высших учебных заведений. Пищевая технология» Издательство: Кубанский государственный технологический университет (Краснодар) - [ЭЛЕКТРОННЫЙ РЕСУРС] – доступ к ресурсу <https://elibrary.ru/item.asp?id=19101718>

ПРИЛОЖЕНИЕ

Вариант
опыта15-73 см
МПАКолонии округлые,
матовые, глянцевыеActinobacillus (Bokor,
1930),
Proactinomyces (Beijerinck,
1903-1914)
Mycobacterium
Proactinomyces albus
(Krassilnikov, 1941)

СТЕБЕЛЬ

САБУРО

73-146 см
МПА
Не выросло

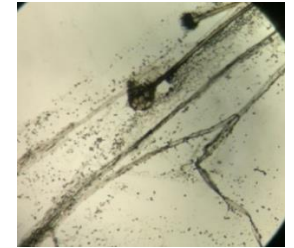
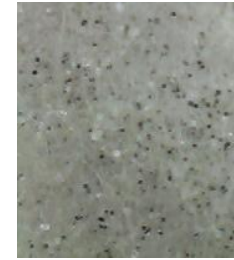
САБУРО

146-221 см
МПАФорма колоний
круглая, по цвету
оранжевая, глянцевая,
гладкой структуры.Палочковидные бактерии
грамотрицательные
(сафранин)Колонии округлые,
желтого цвета,
глянцевыеPantoeastewartii
Коковидные бактерии

САБУРО

Не выросло

Не выросло



Класс зигомицеты
Род мукор

МПА
Не выросло

МПА

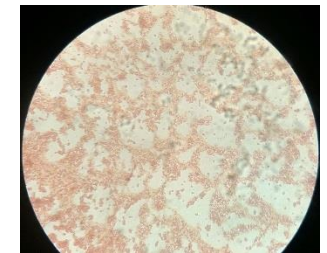


Стрептококки
граммотрицательные
(сафранин)



Колонии округлые,
матовые, глянцевые

МПА



Actinobacillus (Bokor, 1930),
Proactinomyces(Beijerinck, 1903-1914)
Mycobacterium
Proactinomycesalbus(Krassilnikov, 1941)

САБУРО

САБУРО

ЛИСТ



Класс зигомицеты
Род мукор

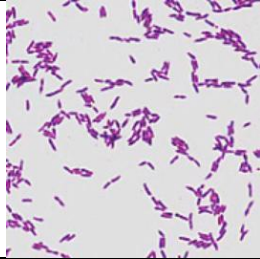
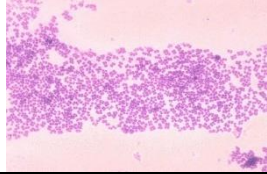
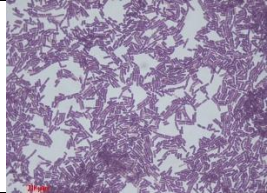



Класс зигомицеты
Род мукор



Род актиномицеты

ПРИЛОЖЕНИЕ
Таблица 1

№ п/п	Название рода	
1.	Pseudomonas	
2.	Azotomonas	
3.	Bacterium	
4.	Chromobacterium	
5.	Mycobacterium	
6.	Mycococcus	
7.	Lactobacterium	
8.	Pseudobacterium	
9.	Micrococcus	
10.	Planosarcina	
11.	Bacillus	
грибы		
1.	Pullularia	
2.	Hormiszium	
3.	Cladosporium	