

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических и
естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.04.01 Биология
Профиль подготовки Биохимия
Форма обучения очная

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

**«ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ
AZOTOBACTER В РИЗОСФЕРНОЙ МИКРОФЛОРЕ»**

Студент

Бердникова Дарья Тимуровна

Руководитель

Заплатин Б. П.

Рецензент

Невитов М.Н.

Нормоконтролер

Солдатов С.А.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 20.05.24 № 12)

Заведующий кафедрой

Карпова Г. А.

Работа защищена с отметкой

отлично

(протокол заседания ГЭК от 20.06.24 № 1)

Секретарь ГЭК

Клыченков С. В.

Пенза, 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1. Структура ризосферы	5
1.2 Механизмы положительного влияния ризобактерий на растения	8
1.2.1 Прямая стимуляция роста растений	9
1.2.2. Опосредованная стимуляция роста растений	11
1.3 Физиолого-биохимическая активность штаммов <i>Azotobacter</i> в ризосферной микрофлоре	13
1.4 Химическая природа, синтез и транспорт фитогормонов	17
1.5 Физиологическое действие фитогормонов	19
1.6 Механизм воздействия фитогормонов	20
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	22
2.1 Объекты исследования	22
2.2 Методы исследования	23
2.2.1 Отбор почвенных образцов	23
2.2.2 Подготовка почв для анализа	23
2.2.3 Посев почвы	23
2.2.4 Приготовление среды Эшби	24
2.2.5 Выделение чистых культур <i>Azotobacter</i>	25
2.2.6 Микроскопическое исследование образца	27
2.2.7 Приготовление рабочих растворов фитогормонов	27
2.2.7.1 Препараты фитогормонов	27
2.2.7.2 Приготовление раствора чистой культуры <i>Azotoba</i>	29
2.2.8 Проращивание пшеницы	30
2.2.9 Определение ауксин- и гиббереллиноподобной активности азотобактера на тест-растениях	30
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	32
3.1 Активность роста <i>Azotobacter</i> на почвенных образцах	32
3.2 Микроскопическое исследование образца	40
3.3 Ауксин- и гиббереллиноподобная активность азотобактера на тест- растениях	41
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	56
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	58

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы играют значительную роль в биогеохимических процессах циркуляции элементов и веществ в экосистемах, будь то водные или наземные. Эти процессы прямо или косвенно влияют на химический состав атмосферы Земли. Следовательно, сбалансированная активность природных микробных сообществ является ключевым условием для поддержания жизни на планете.

В последние десятилетия загрязнение почвы различными химическими веществами в значительной степени возросло из-за интенсификации промышленного и сельскохозяйственного производства. Низкие концентрации многих из этих веществ способны подавлять жизненную активность микроорганизмов и, тем самым, нарушать биогеохимический баланс - гомеостаз, который имеется в природе. Деграция почвенных экосистем и уменьшение разнообразия микроорганизмов, а также уменьшение их численности и физиологической активности - это наблюдаемые последствия такого загрязнения, также нарушается структура биогеоценозов.

Радикальный переход от глобальной "химизации" к повсеместной "биологизации" в стратегии сельскохозяйственного производства является выходом из этой ситуации. Например, возвращение биопрепаратов естественной почвенной микрофлоры в сельскохозяйственную практику играет ключевую роль. В связи с этим принимает важность физиологически значимая роль микроорганизмов, особенно в плане регулирования циркуляции биогенных элементов, таких как азот, которые выполняют функции деструктивного процесса фиксации молекулярного азота в биологический цикл. Они также играют роль в формировании окружающей среды путем фиксации азота и выработки различных биологически активных веществ.

Целью нашей работы является исследование физиолого-биохимической активности штаммов *Azotobacter*, в ризосферной микрофлоре, то есть в почвенной зоне, окружающей корни растений.

Актуальность исследования заключается в том, что этот вид исследований может способствовать лучшему пониманию роли *Azotobacter* в процессе биологической фиксации азота и его влияния на растения. Результаты исследования могут быть использованы для повышения эффективности использования азота в сельском хозяйстве и улучшения устойчивости растений к стрессовым условиям. Также, выделение новых почвенных штаммов *Azotobacter* может способствовать улучшению плодородия почвы и стимулированию роста растений. Кроме того, *Azotobacter* применяется в медицине и пищевой промышленности.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить литературу по теме работы.
2. Собрать образцы почв с различных участков;
3. Оценить обеспеченность и активность *Azotobacter* в почвенных образцах.
4. Получить чистые культуры *Azotobacter*.
5. Изучить механизм влияния *Azotobacter* на растения
6. Проанализировать ауксин- и гиббереллиноподобную активность азотобактера на тест-растениях в сравнении с чистыми препаратами фитогормонов.
7. Сделать выводы о фитогормональной активности *Azotobacter*

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Структура ризосферы

Ризосфера представляет собой слой почвы толщиной 2-3 мм, непосредственно прилегающий к корням растений. Содержание микроорганизмов в нем в сотни раз выше, чем в остальной почве. О разнице между ризосферой и остальной почвой с точки зрения ее «микробной популяции» можно судить по следующим данным (табл.1):

Таблица 1 - Количество бактерий в почве и ризосфере приведено в тысячах клеток на 1 грамм почвы

Почва	Почва вне ризосферы	Ризосфера
Дерново – подзолистые (пшеница)	2500	1750000
Каштановы (пшеница)	14000	2100000
Сероземы (хлопчатник)	74000	3500000
Красноземы (табак)	500	500000

Первое упоминание о ризосфере относится к 1904 году, когда немецкий ученый Лоренц Хилтнер обнаружил увеличенное содержание микроорганизмов в корневой зоне различных травянистых растений и предположил, что это явление связано с жизнедеятельностью корней. Открытие *Azotobacter* (нетуберкулезных азотфиксирующих бактерий) в корневой зоне табака в 1926 г. российским ученым С. П. Костычевым [4], а также публикация в 1938 г. о влиянии высших растений на микроорганизмы ризосферы, являются одними из важнейших работ в этой области [2]. Для обозначения этих ниш используются термины филлосфера (надземные части растений), филлоплан (поверхность надземных вегетативных органов растений), ризосфера (узкий участок почвы, непосредственно окружающий корни растений) и ризоплан (поверхность корней растений), спермосфера (поверхностный слой почвы и семена). Существование микроорганизмов в этих экологических нишах обусловлено жизненными выделениями растений,

которые служат питательным субстратом для микроорганизмов (например, стебли и листья выделяют углеводы и органические кислоты). При этом микроорганизмы обитают на поверхности различных органов растений, образуя эпифитное сообщество, и проникают в ткани растений, формируя эндофитное сообщество.

Растения, в процессе жизнедеятельности через корни активно выделяют соединения органического происхождения, которые обогащают почву питательными веществами, благодаря которым создаются благоприятные условия микроорганизмам, обитающим в почве, в ризосфере и ризоплане

Эти выделения являются низкомолекулярными органическими веществами, которые образуются в процессе фотосинтеза и обмена веществ. К данным веществам относятся аминокислоты, углеводы, спирты, органические кислоты, физиологически активные вещества: гормоны, ферменты, витамины, алкалоиды и другие.

Микроорганизмы в ризосфере питаются за счет корневых экссудатов, высокомолекулярного слизистого материала из полисахаридов и белков, остатков растений. Это явление, в результате которого наблюдается повышенная плотность микроорганизмов в области корневой системы за счет использования выделения корней и представляющих остатки растений называется ризосферным эффектом.

Значение R/S показывает, во сколько раз количество микроорганизмов определенной таксономической группы в ризосфере данного растения превышает количество этих микроорганизмов в почве. Для бактерий это значение колеблется от 10 до 100 [14]. Бактерии, населяющие ризосферу и ризоплан, образуют прочные ассоциации с корневой системой растений и формируют специфические бактериальные сообщества ризосферы. Такие отношения характеризуются терминами "ассоциативные бактерии", "ассоциативные отношения" и "ассоциативный симбиоз" [3, 13, 14].

Ассоциативные ризобактерии устанавливают особую связь с растениями, проявляя ряд характеристик. Важно отметить, что данное взаимодействие не приводит к формированию специализированных структур, таких как клубеньки на корнях растений. Однако, происходит образование специфических бактериальных соединений, которые способствуют прочному прикреплению бактерий к корням растений. Процесс формирования ассоциаций представляет собой последовательный процесс, включающий перемещение бактерий к корням, их прикрепление, образование микроколоний на поверхности корней, а также проникновение в корни и заполнение межклеточного пространства. Микроколонии бактерий, находящиеся на поверхности корней, покрыты слоем слизи из полисахаридов, который играет защитную функцию, оберегая клетки и колонию от неблагоприятных условий.

Сегодня все чаще организмы растений или животных рассматриваются в контексте их микробного окружения, и для такой связи используется термин "голубионт". Теория эволюции голубионта рассматривает его как единицу отбора в эволюции, учитывая, что генетическое разнообразие микробных симбионтов играет важную роль в адаптации и эволюции организмов. Изучение функционирования растений с их микробиотой проводится с учетом экологических и эволюционных принципов.

Считается, что растения могут регулировать свою микрофлору, динамически приспосабливая ее к изменяющимся условиям окружающей среды. Для полного раскрытия потенциала культурных растений необходимо глубокое понимание взаимодействия генома растения и генома его микробиоты. Микробиом растений признан одним из дополнительных факторов, влияющих на селекцию культурных растений.

Разнообразие микробных сообществ ризосферы зависит от состава корневых выделений, которые в свою очередь зависят от типа, возраста и условий произрастания растений, а также от эдафических и климатических условий. Таким образом, во время вегетации растений происходит

регулярная смена бактериальных компонентов ризосферы, что было отмечено отечественными исследователями в 50-х и 60-х годах XX века [2]. Становление растений сопровождается изменением состава корневых экссудатов и корневых ризодепозитов, влияющих на ризосферные бактерии. В молодых верхушечных корнях преобладают грамотрицательные бактерии родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Azotobacter* и другие, которые с возрастом растений заменяются грамположительными бактериями рода *Bacillus* и актинобактериями родов *Mycobacterium* и *Streptomyces*.

Те бактерии, которые питаются экссудатами корней, затем заменяются гидролитическими бактериями, обладающими способностью разлагать опавшие листья, старые корни и микробную биомассу. Уровень бактерий в ризосфере усиливается после прорастания семян, достигая пика в период цветения и плодоношения растений. Кроме того, следует отметить, что микроорганизмы неоднородно распределены внутри корня, с наибольшей численностью в области молодых верхушечных корней, где наибольшим образом выделяются растворимые органические соединения [2].

1.2 Механизмы положительного влияния ризобактерий на растения

Последние двадцать лет ученые, изучающие микробные ассоциации растений, интересовались вопросом о том, как ризобактерии оказывают положительное влияние на растения. На основании анализа научной литературы мы можем выделить два основных механизма, которые объясняют этот эффект.

Первый механизм связан с прямым стимулированием роста растений. Ризобактерии способны синтезировать стимуляторы роста, такие как фитогормоны и другие метаболиты, что способствует активизации процессов роста у растений. Кроме того, эти бактерии улучшают питание растений, что также способствует их полноценному развитию.

Второй механизм связан с косвенным влиянием ризобактерий на рост растений. Они вытесняют и подавляют развитие почвенных патогенных микроорганизмов, таких как грибы и бактерии. Это способствует улучшению общего состояния почвы и делает ее более благоприятной средой для роста растений.

Таким образом, ризобактерии оказывают положительное воздействие на растения как прямым, так и косвенным способом. Они стимулируют рост, синтезируя специальные вещества, и повышают плодородие почвы, устраняя патогенные микроорганизмы. Эти механизмы являются основными факторами, обуславливающими успешное сотрудничество ризобактерий и растений [27, 28, 29, 30].

1.2.1 Прямая стимуляция роста растений.

Среди растительно-бактериальных ассоциаций образование бактериями фитогормонов, витаминов и других биологически активных веществ является одним из важнейших механизмов взаимодействия. Фитогормоны, такие как ауксины, цитокинины и гиббереллины, регулируют рост и развитие растений. Ауксины, например, стимулируют развитие корневой системы, регулируют дифференцировку органов и другие процессы. Цитокинины способствуют делению клеток, увеличивают всхожесть семян и благоприятно влияют на растение в неблагоприятных условиях, таких как повышенные концентрации солей, гербициды, низкие температуры и засуха. Гиббереллины, в свою очередь, стимулируют вегетативный рост и прорастание семян.

Продуценты фитогормонов широко распространены среди ризобактерий, включая роды *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus*. Эти вещества являются не только необходимыми для собственного развития бактерий, но и для установления связей с растениями и другими микроорганизмами в почве.

Р как и N играет большую роль в питании растений, так как является основным питательным веществом. В почвах содержится очень много

общего фосфора в виде растворимых и нерастворимых формах. Но эти формы наименее доступны растениям в качестве питательных веществ для растений в различных типах почв. Для растений доступна лишь очень маленькая часть Р (<1 мг / кг).

Однако эти формы могут быть преобразованы в растворимый фосфор микроорганизмами, соллюбилизирующими фосфаты в почве (PSM) [47]

Сообщалось, что многочисленная почвенная микрофлора соллюбилизирует нерастворимые комплексы Р в растворимые формы, легко усваиваемые растениями [51]. Среди фосфатсоллюбилизирующих бактерий (PSB) наиболее распространены *Bacillus* и *Pseudomonas*, а также некоторые виды *Azotobacter*, также известные своей способностью к Р-соллюбилизации.

Также было обнаружено, что виды *Azotobacter* улучшают соллюбилизацию Р посредством мутагенеза, начиная с почвенных изолятов[51].

Также известно, что 80-90% всех известных почвенных бактерий способны фиксировать атмосферный азот. В ризосфере обычно развивается смешанная популяция бактерий, и диазотрофы часто образуют ассоциации с пектинолитическими и разрушающими целлюлозу бактериями. Например, диазотрофы родов *Azospirillum* и *Fzotobacter* могут образовывать ассоциации с бактериями рода *Bacillus*, что способствует более эффективному усвоению полимеров и стимулирует фиксацию азота.

Некоторые ризобактерии, которые обладают ферментом 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминой (АСК), имеют универсальное антистрессовое действие. Использование АСК в качестве источника питания ризобактериями приводит к снижению его содержания в растениях и, как результат, к уменьшению синтеза этилена в корнях, что является стрессовой сигнальной молекулой. Это позволяет ингибировать стрессовое воздействие этилена на рост растений. Защитный эффект ризобактерий, использующих АСК, проявляется при различных

неблагоприятных условиях, включая избыток и дефицит влаги в почве, осмотический стресс, засоление почвы и наличие тяжелых металлов.

1.2.2 Опосредованная стимуляция роста растений.

Механизмы стимуляции роста растений с помощью бактерий PGPR (plant-growth promoting rhizobacteria - это свободноживущие бактерии, которые играют непосредственную роль в росте растения и корневой системе у растений) основаны на их антагонистических отношениях с патогенными микроорганизмами растений, такими как грибы и микроскопические бактерии [29]. В ризосфере, где обитает полезная, нейтральная и вредная микрофлора, между ними возникает конкуренция за доступные питательные вещества и места обитания. При успешной конкуренции бактерии PGPR подавляют рост и развитие почвенных патогенов, вытесняя их из зоны влияния на растения. В результате заражение и заболевание растений ограничиваются, что способствует нормальному росту и развитию растений. Таким образом, ризобактерии выполняют функцию биологического контроля, используя живые организмы для ограничения роста и развития патогенных микроорганизмов растений [42].

Один из механизмов антагонизма ризобактерий к патогенам растений осуществляется за счет конкуренции за железо, важный элемент питания [43]. Почвенные микроорганизмы, включая ризобактерии, образуют более 500 сидерофоров - низкомолекулярные вещества различной природы (гидроксаматы, α -гидроксикарбоксилаты, катехолы и пиовердины) [44]. В почве сидерофоры образуют комплексы с железом, которые затем возвращаются в бактериальные клетки. Ризобактерии производят сидерофоры для удовлетворения своих потребностей в железе и подавления конкурентной микрофлоры. Комплексы сидерофоры-железо, образованные ризобактериями, становятся недоступными для патогенных микроорганизмов, что замедляет их рост. Важно отметить, что конкуренция за железо эффективна только при низком содержании этого элемента в почве,

а не в кислых почвах, где растворимость железа и его доступность для всех микроорганизмов повышены. Избыток железа, наоборот, подавляет синтез сидерофоров [43].

Важным механизмом биологического контроля является также образование ризобактериями антибиотиков. Антибиотики и токсины, вырабатываемые ризобактериями, напрямую влияют на патогены растений, что приводит к подавлению их роста или гибели [14]. Например, антибиотики из группы феназинов, флороглюкинов, оомицина и другие антибиотики, вырабатываемые бактериями рода *Pseudomonas*, играют важную роль в подавлении болезней растений [43]. Бактерии рода *Bacillus* образуют широкий спектр противогрибковых антибиотиков пептидной природы, что имеет особое значение для биологического контроля, так как микроскопические грибы являются наиболее разрушительными возбудителями болезней растений [31].

Контакт с непатогенными бактериями может стимулировать развитие у растений системной индуцированной устойчивости к болезням. Салициловая кислота, цианистый водород, липополисахариды, сидерофоры и другие вещества, вырабатываемые ризобактериями, могут быть сигнальными молекулами, которые запускают защитные реакции у растений, направленные на повышение устойчивости к патогенам растений. В результате такого взаимодействия повышается лигнизация корневой ткани и содержание фитоалексинов у растений [49].

Для достижения положительного влияния ризобактерий на растения необходимо успешное их колонизация в ризосфере и на поверхности корней. Поэтому колонизационная активность является важным критерием отбора штаммов ризобактерий для инокуляции растений. Общепринятыми факторами, способствующими колонизации, являются способность бактерий использовать компоненты корневого секрета, адгезия к поверхности корня, скорость размножения, выживаемость в ризосфере и взаимодействие с аборигенной микрофлорой [47, 48]. Ризосфера растений является богатым

источником микроорганизмов с полезными свойствами. Исследования ризобактерий остаются актуальными и перспективными, создавая научную основу для разработки биологических препаратов в качестве экологически чистой альтернативы.

Ризосфера растений - это неисчерпаемое хранилище микроорганизмов, обладающих практически полезными свойствами. Исследования ризобактерий остаются актуальными и перспективными, закладывая научную основу для создания биологических препаратов в качестве экологически чистой альтернативы химическим средствам защиты растений и минеральным удобрениям. Деятельность человека оказывает большое влияние на микробные ассоциации. Среди них наиболее значительным является использование химических средств борьбы с сорняками (гербицидов), всевозможных средств защиты семян и минеральных удобрений. Все это в сочетании с различными видами обработки почвы (вспашка, орошение, мелиорация земель) изменяет микробные ценозы, часто стойко и не всегда в благоприятную для экономики сторону. В связи с этим во всем мире проводится множество исследований.

1.3 Физиолого-биохимическая активность штаммов *Azotobacter* в ризосферной микрофлоре

Azotobacter spp. - это грамотрицательные, аэробные и гетеротрофные бактерии без симбиотического существования, которые способны фиксировать азот при нормальном атмосферном давлении кислорода. Они обладают самым высоким метаболическим темпом среди других микроорганизмов. *Azotobacter* spp. обладает самой высокой скоростью метаболизма среди других микробов [36]. Виды *Azotobacter* гетеротрофны и требуют углерода и других питательных веществ. Углеводы, органические кислоты и сахара являются источниками углерода для них. *Azotobacter* получает энергию из окислительно-восстановительных реакций и использует органические соединения в качестве доноров электронов.

Метод метаболизма *Azotobacter* заключается в связывании азота путем его превращения в аммиак. Три различных фермента нитрогеназы используются для фиксации азота *Azotobacter*, и они представляют интерес сельскохозяйственному сектору.

Azotobacter играет важную роль в устойчивом сельском хозяйстве, поскольку обладает свойствами рост-промоуторов грибкакорневых систем. Они также могут использоваться для биоконтроля против различных фитопатогенов. Современные методы выделения и культивирования *Azotobacter* включают использование специальных сред, например, среды Норриса, Берка, Липмана и Эшби. Все эти среды имеют сходства и отличаются только минеральными, микро- и макроэлементами, а также источниками углерода. Оптимальная температура для роста *Azotobacter* составляет 27-30°C.

Представители рода *Azotobacter* представляют собой гетерогенную группу грамотрицательных бактерий, несимбиотических фиксаторов азота, которые вырабатывают пигменты различного цвета - от желто-зеленого до красно-фиолетового и коричневатого-черного. Наиболее известными видами являются *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. chroococcum*, *A. armeniacus*, *A. paspali*, *A. salinestrus* и *A. nigricans*. В экстремальных условиях *Azotobacter* также может образовывать цисты с толстой стенкой, хотя они не способны фиксировать азот, как указывал Аасфар. Бейеринк показал, что *Azotobacter* может фиксировать атмосферный азот в свободной форме без симбиотической ассоциации [18].

Для фиксации азота большинству азотфиксирующих бактерий необходимы анаэробные условия. У этих микроорганизмов кислород не только инактивирует фермент нитрогеназу, но и подавляет гены, связанные с фиксацией азота. Однако они обладают уникальной способностью фиксировать азот в аэробных условиях. Теория "защиты органов дыхания" является наиболее широко принимаемым объяснением для этой переносимости кислорода в процессе азотфиксации, как указывали Робсон и

Постгейт и Дас . *Azotobacter* обладает одним из самых высоких показателей дыхательной активности среди изученных биологических систем, что обусловлено высоким уровнем цитохрома d, как указывал. Кроме пути, опосредуемого железомолибден-данитрогеназой (nif), у некоторых видов *Azotobacter* также существуют альтернативные пути фиксации азота, опосредуемые железованадиевой данитрогеназой (vnf) и железоданитрогеназой (anf), как отмечали Робсон в 1986 году [30]. Обнаружено, что конверсия азота в аммиак выше при фиксации азота, опосредуемой путем nif, чем при использовании альтернативных путей vnf и anf.

Azotobacter spp. - это грамотрицательные, аэробные и гетеротрофные бактерии, которые способны фиксировать азот при нормальном атмосферном давлении кислорода. Есть предположение, что они обладают самым высоким уровнем метаболической активности среди других микроорганизмов, что было замечено еще Дженсеном в 1954 году [36]. Виды *Azotobacter* требуют углерода и других питательных веществ, источниками которых могут быть углеводы, органические кислоты и сахара. Энергию *Azotobacter* получают из окислительно-восстановительных реакций и используют органические соединения в качестве доноров электронов. Одним из методов метаболизма *Azotobacter* является связывание азота путем его превращения в аммиак. Для фиксации азота *Azotobacter* использует три различных фермента нитрогеназы, что представляет интерес для сельскохозяйственного сектора.

Azotobacter играет важную роль в устойчивом сельском хозяйстве, так как способствует развитию грибкакорневых систем и может использоваться для биологического контроля различных фитопатогенов.

Оптимальная температура для роста *Azotobacter* составляет 27-30°C.

Представители рода *Azotobacter* представляют собой гетерогенную группу грамотрицательных бактерий, которые несимбиотически фиксируют азот и обладают различными пигментами - от желто-зеленого до красно-фиолетового и коричневатого-черного. Наиболее известными видами являются

A. vinelandii, *A. beijerinckii*, *A. chroococcum*, *A. armeniacus*, *A. paspali*, *A. salinestris* и *A. nigricans*. В экстремальных условиях *Azotobacter* может образовывать цисты с толстой стенкой, хотя они не способны фиксировать азот, как отмечали Aasfar и его коллеги в 2021 году [17] и Das в 2019 году [27]. В 1901 году Бейеринк показал, что *Azotobacter* может фиксировать азот из атмосферы без симбиотической ассоциации [21].

Для большинства азотфиксирующих бактерий необходимы анаэробные условия для фиксации азота. Кислород как инактиватор фермента нитрогеназы подавляет гены, отвечающие за фиксацию азота. Однако *Azotobacter* обладает уникальной способностью фиксировать азот в аэробных условиях. Теория "защиты органов дыхания" объясняет эту способность *Azotobacter* переносить кислород в процессе азотфиксации, как указали Робсон и Постгейт в 1980 году [47] и Das в 2019 году [27]. Бактерии *Azotobacter* обладают одним из самых высоких показателей дыхательной активности среди изученных биологических систем, что связано с высоким уровнем цитохрома d, как указал Das в 2019 году [27]. Кроме пути, опосредованного ферментом гененитрогеназой (nif) с железомолибденом, у некоторых видов *Azotobacter* есть альтернативные пути фиксации азота, опосредованные ферментами железованадиевой даниитрогеназой (vnf) и железоданиитрогеназой (anf), как отмечали Робсон и его коллеги в 1986 году [47]. Было обнаружено, что конверсия азота в аммиак выше при фиксации азота через путь nif, чем при использовании альтернативных путей vnf и anf.

Azotobacter влияет на рост растений, так как улучшается развитие корней и корни быстрее поглощают и усваивают питательные вещества. *Azotobacter* искусно производит и выделяет значительные количества биологически активных веществ, таких как витамины группы B, никотиновая кислота, пантотеновая кислота, биотин, гетероауксин и гиббереллин, которые способствуют стимуляции роста корней растений [43].

Солюбилизация неорганического и органического фосфора штаммами *Azotobacter* является еще одним стимулирующим рост признаком, который

характерен для эффективного скрининга свободноживущих N_2 -фиксирующих бактерий [44].

Еще одним свойством, стимулирующим рост растений, демонстрируемым видами *Azotobacter*, является выработка ауксина (IAA). Этот важный фитогормон регулирует развитие и рост растений. Ауксин способствует образованию более длинных корней, увеличивает количество корневых волосков и боковых корешков, которые играют важную роль в поглощении питательных веществ. Он имеет центральное значение в клеточном делении, удлинении, развитии плодов и процессе старения. Ауксин стимулирует формирование корней, листьев и цветков. Некоторые исследования предполагают, что виды *Azotobacter* могут способствовать росту растений через синтез этого фитогормона, а не только за счет фиксации азота [35].

1.4 Химическая природа, синтез и транспорт фитогормонов

Гормоны растений - это природные органические соединения с определенной молекулярной массой, которая варьирует в диапазоне от 8 до 346. Они обычно имеют химическую структуру слабых кислот.

Например, индолилуксусная кислота (рис.1)- это производная индола, которая образуется в верхней части побега путем синтеза из триптофана. Движение гормонов в растении происходит вдоль стебля, от верхней части к нижней.

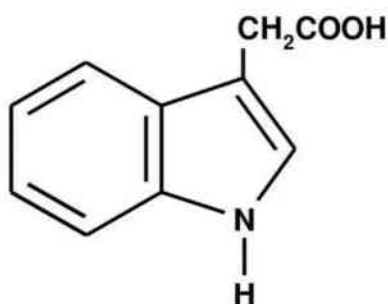
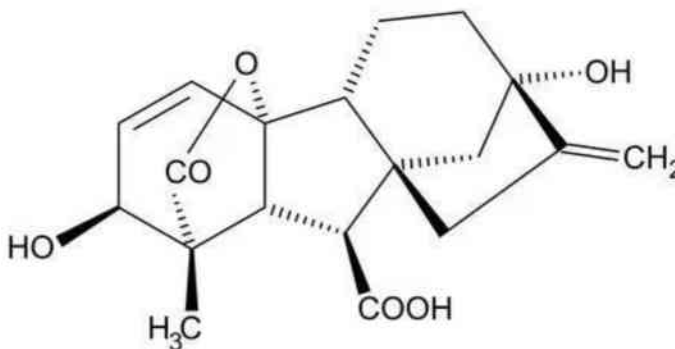


Рисунок 1. Индолилуксусная кислота

CC(CO)C=CCNc1ncnc2c1[nH]c2

Гиббереллины (рис.3) - это широкая группа близких по структуре карбоновых кислот, относящихся к дитерпенам. Они обычно синтезируются в интенсивно растущих органах растения, таких как молодые листья, прицветники, части цветков, прорастающие семена. Фактором, стимулирующим образование фитогормонов, является свет.



18

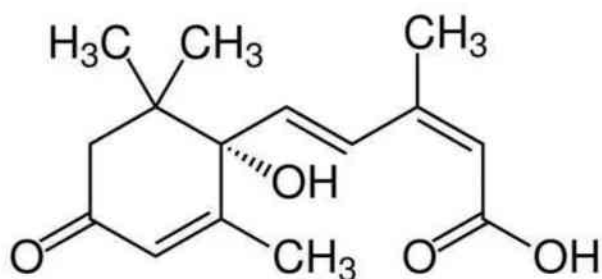


Рисунок 4. Абсцизовая кислота

Гиббереллины и абсцизовая кислота перемещаются на короткие расстояния путем диффузии и на дальние - по транспортным каналам.

Этилен синтезируется из метионина через 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту и способен транспортироваться по всем органам и тканям растения. Он обычно образуется во всех органах и тканях, но особенно активен в зонах меристем, стареющих листьях, созревающих плодах, а также при стрессовых ситуациях или повреждениях.

1.5 Физиологическое действие фитогормонов

Фитогормоны – основные вещества, которые регулируют разные этапы развития растений. В основе роста и морфогенеза растений лежат процессы деления и растяжения клеток. Именно эти процессы контролируются фитогормонами. Основную контролирующую функцию этого процесса выполняют цитокинины и ауксины. И если возникает полное отсутствие этих гормонов, то это ведет к гибели растения. Форма растения определяется действиями гиббереллинов, ауксинов и цитокининов, но воздействие на растения у них разное. Ауксины влияют на формирование корней и направление роста корня, в зависимости от направления света и силы тяжести (фото- и геотропизм). Ауксины обеспечивают верхушечный рост побегов и препятствуют росту боковых побегов, а благодаря цитокининам происходит ветвление боковых побегов. Гиббереллины стимулируют рост растений и активизируют апикальные и интеркалярные меристемы.

Цитокинины и абсцизовая кислота являются гормонами противоположного действия (гормоны-антагонисты). Под их влиянием

происходит формирование фотосинтетического аппарата и транспирации растений. Благодаря цитокипинам происходит развитие хлоропластов, открываются устьица. А так как абсцизовая кислота является антагонистом, то она подавляет эти процессы.

Гиббереллины, цитокинины и этилен регулируют цветение у многих растений. Фитогормоны необходимы также для формирования плодов и семян. Фитогормоны, производимые растениями, оказывают важное влияние на различные процессы в их жизненном цикле. Например, ауксины, гиббереллины и цитокинины способствуют опылению и образованию плодов, в то время как этилен и абсцизовая кислота контролируют созревание и опадение плодов и листьев. При наличии стрессовых условий растения активно вырабатывают этилен, а недостаток воды провоцирует увеличение уровня абсцизовой кислоты. Важную роль играют также гиббереллины, цитокинины и в некоторых случаях этилен, которые способствуют прорастанию семян и повышают всхожесть. Кроме того, аномально высокие концентрации ауксинов и цитокининов, вырабатываемые патогенными микроорганизмами, могут вызвать ростоподобные опухоли у растений.

1.6 Биохимический механизм воздействия фитогормонов

Биохимический механизм действия фитогормонов в целом и даже во многих молекулярных "деталях" схож с механизмом действия гормонов животных, хотя изучен он гораздо меньше. Чувствительные клетки воспринимают гормон благодаря специфическим рецепторам, которые расположены в основном на плазматической мембране. После взаимодействия с гормоном рецепторы меняют свою пространственную форму (конфигурацию) и передают соответствующий сигнал клетке. Как и у животных, каскады протеинкиназ, фосфоинозитол, диацилглицерин, фосфатидные и жирные кислоты, кальций, циклические нуклеотиды, оксид азота и перекись водорода также могут служить передатчиками сигналов

(вторичными медиаторами) у растений. Гормональный сигнал, который поступает к эффекторным структурам, обычно значительно усиливается. Конечными мишенями фитогормонов в клетке являются гены. В зависимости от вида растительного гормона и типа ткани активируется или подавляется определенная группа генов-рецепторов (генов, которые могут реагировать на стимуляцию). Под воздействием растительных гормонов на рецепторы происходит образование или исчезновение соответствующих ферментов. Хотя рецепторы составляют небольшую часть от общего числа активных генов, изменений в их активности обычно достаточно, чтобы инициировать или остановить метаболические процессы, контролируемые растительными гормонами.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2. 1 Объекты исследования

Материалом для исследования служили

- образцы почв, взятые в массиве Арбековского леса. Почвы светло серые лесные легкосуглинистые.
 - а так же культуры *Azotobacter*, выделенные из них.
- сорт озимой мягкой пшеницы Клавдия.

Царство Растения

Отдел Покрытосеменные

Класс Однодольные

Порядок Злаковые

Семейство Злаки

Род Пшеница

Вид Пшеница мягкая

Данный сорт рекомендован для выращивания на территории Пензенской области. Куст является промежуточным, среднерослым, с восковым налетом на верхнем междоузлии, колосе и влагалище флагового листа. Колос пирамидальной формы, белого цвета средней плотности и средней длины, обладает остями на конце средней длины. Нижняя колосковая чешуя имеет среднее опушение на внутренней стороне. Плечо косое, средней ширины, зубец слегка изогнут или умеренно изогнут и средней длины. Опушение верхушечного сегмента оси колоса имеет среднюю выпуклость. Зерновка окрашена, масса 1000 зерен составляет 36-43 грамма. Среднеспелый. Вегетационный период - 286-311 дней.

- Коммерческий препарат азотобактера “Азотник”, биологически активный комплекс. Состав препарата: живые клетки азотфиксирующих микроорганизмов и бактерии *Bacillus azotofixans* штамма ВА55 с титром не менее 1×10^{10} КОЕ/г и продукты их метаболизма (фитогормоны ауксинового, гибберелинового и цитокининовым рядов, аминокислоты, витамины).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Отбор почвенных образцов

В ходе проведения работы были взяты пробы почвы в лесополосе Арбековского леса с двух точек с разных глубин. Пробы брали чистым инструментом с верхнего слоя почвы. Материал исследования поместили в стерильную банку с ватной пробкой с указанием места и глубины взятия пробы:

Образец 1. 1 точка, 1 повторность, глубина 15 см. координаты: 53.199581 с. ш., 44.868317 в. д.

Образец 2. 1 точка, 2 повторность, глубина 10 см. 53.199308 с. ш., 44.868241 в. д.

Образец 3. 1 точка, 3 повторность, глубина 5 см. 53.199232 с. ш., 44.867684 в. д.

Образец 4. 2 точка, 1 повторность, глубина 15 см. 53.217254 с. ш., 44.874251 в. д.

Образец 5. 2 точка, 2 повторность, глубина 10 см. 53.217301 с. ш., 44.874353 в. д.

2.2.2 Подготовка почвы для анализа:

- 1) Почву высушили, крупные частицы остатков растений, камни, мусор убрали
- 2) Несколько грамм почвы поместили в емкость с высокими бортиками.
- 3) В емкость с почвой добавили по каплям дистиллированную воду с помощью пипетки Пастера до получения пастообразной массы и тщательно перемешали.

2.2.3. Посев почвы

- 1) Из подготовленной почвы каждого образца взяли 45 комочков диаметром 3-4 мм;

- 2) Чашку Петри, которую заполнили питательной средой Эшби поставили, на трафарет, совместив края чашки с контуром трафарета;
- 3) В чашке Петри в узлах трафарета разместили подготовленные комочки земли
- 4) Чашки Петри накрыли крышками и оставили на 3-4 дня при комнатной температуре.

Желательно хранить чашки Петри во влажной атмосфере. Для создания более влажной среды можно накрыть чашки «колпаками» из пластиковых бутылок.

Наблюдаемые эффекты:

1. Через 3-4 дня после посева вокруг комочков должны появиться обрастания комочков почвы колониями бактерий штаммов *Azotobacter*.
2. Через 6-8 дней обрастания могут приобрести окрашивание

Наиболее распространенный и хорошо изученный *Azotobacter chroococcum* (обитает в почвах всех типов, кроме кислых) образует колонии с бурым, почти чёрным пигментом. Для *Azotobacter agilis* характерны бесцветные колонии. *Azotobacter vinelandii* образует колонии с флуоресцирующей желтовато-зеленоватой окраской.

2.2.4 Приготовление питательной среды Эшби

1. Подготовили навески:

- гидрофосфат калия K_2HPO_4 – 0,2 г.;
- сульфат магния $MgSO_4$ – 0,2 г.;
- хлорид натрия $NaCl$ – 0.2 г.;
- сульфат калия K_2SO_4 – 0,1 г.;
- маннит– 20 г.;
- карбонат кальция $CaCO_3$ – 5 г..

- 2 В водопроводной воде объемом 1 л. растворили приготовленные навески. Приготовленную среду (без маннита) простерилизовали автоклавированием

при 1 атм. в течение 20 минут (рис.5), затем добавили манит и еще раз простерилизовали в течении 20 минут при 0,5 атм. Чтобы получить твердую питательную среду Эшби добавили 1,5% агар-агара.

3. Полученную смесь прокипятили на плите до максимального растворения компонентов (часть взвеси не растворится, однако большая часть компонентов должна перейти в раствор);

4. Затем смесь охладили до 50-60⁰С и заполнили ей чашки Петри так, чтобы смесь полностью покрывала дно (~25 мл на одну чашку);



Рисунок 5. Автоклавирование среды Эшби

2.2.5 Выделение чистых культур *Azotobacter*

После того как выросли культуры сделали пересев в чистую питательную среду микроорганизмов, используя микробиологическую петлю, которую перед пересаживанием микроорганизмов, стерилизовали в пламени спиртовки (рис. 6).



Рисунок 6. Пересев микроорганизмов в чистую питательную среду

Затем пересаженные культуры оставили на сутки в термостате.

Изолированные колонии рассеивали методом истощающегося штриха, предварительно приготовив фиксированный препарат для подтверждения чистоты выделенной культуры и изучения морфологии клеток. После культивирования в течение 2-4 суток типичные колонии отсевали штрихом на стерильную среду Эшби (рис. 7).



Рисунок 7. Выделение чистой культуры

2.2.6 Микроскопическое исследование образца.

- 1) Протерли предметное стекло салфеткой, смоченной в спирте, чтобы очистить поверхность стекла от грязи и жира.
- 2) Из чашки Петри с выращенными колониями микроорганизмов выбрали несколько колоний, отличающихся по окраске.
- 3) С помощью бактериологической петли отобрали пробу для исследования с помощью микроскопа
- 4) На предметное стекло нанесли образец колоний и размазали его по центральной части стекла.

Рекомендуемая площадь покрытия образцом – 1 см²;

- 5) Нанесли каплю фуксина Циля на предметное стекло с образцом с помощью пипетки Пастера;
- 6) Нанесли каплю туши на ту же область стекла, что и фуксин Циля, с помощью пипетки Пастера;
- 7) Тщательно перемешали бактериологической петлей красители и биомассу до получения равномерного тонкого слоя грязно-розового цвета;
- 8) Высушили получившийся препарат на воздухе, процесс сушки может занять от 10 до 30 минут;
- 9) Нанесли каплю воды на препарат и изучили его с помощью светового микроскопа при увеличении $\times 100$ (объектив 40, окуляр 10)[46].

2.2.7 Приготовление рабочих растворов фитогормонов

2.2.7.1 Препараты фитогормонов

Препараты фитогормонов:

1. **индол-3-уксусной кислоты 98%** (ИУК индолилуксусная кислота водорастворимая $C_{10}H_9NO_2$) вещество группы ауксинов, фитогормон, стимулятор роста растений. Химическое вещество высокой физиологической активности, образующееся в растениях и влияющее на ростовые процессы; один из наиболее широко распространённых ауксинов (рис. 8).

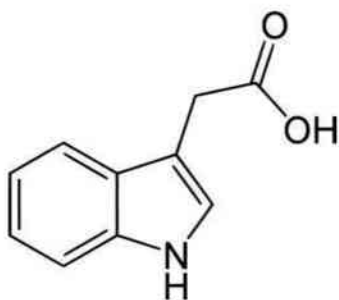


Рисунок 8. Индолилуксусная кислота

2. **Гиббереллиновая кислота (ГК)**, содержащая 90% активного вещества регулятор роста растений, стимулирует быстрый рост стеблей и корней, вызывает митотическое деление листьев некоторых растений и увеличивает скорость прорастания семян (рис.9).

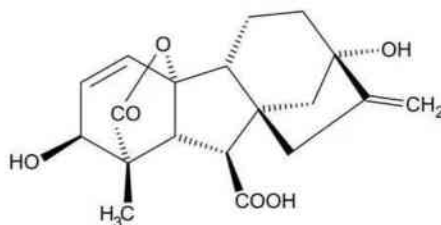


Рисунок 9. Гиббереллиновая кислота

3. **Коммерческий препарат “Азотник”** (рис.10), биологически активный комплекс. Состав препарата: живые клетки азотфиксирующих микроорганизмов и бактерии *Bacillus azotofixans* штамма BA55 с титром не менее 1×10^{10} КОЕ/г и продукты их метаболизма (фитогормоны ауксинового, гибберелинового и цитокининовым рядов, аминокислоты, витамины).

Изготовитель : ИП Огородников В.К. ОГРН 323430000003663



Рисунок 10. Коммерческий препарат “Азотник”

Приготовление стандартного раствора ИУК (ауксина)

Навеску 1 мг препарата ИУК на кальке перенесли в мерную пробирку. Добавили 2—3 капли 80%-го этанола, растворили навеску и довели раствор до 1 мл водой.

Для обработки семян использовался раствор ИУК 0,001 мг/л, который получили из стандартного раствора методом десятикратных разведений:

1. 1 мл раствора стандартного раствора внесли в пробирку + 9 мл воды (раствор 1)
2. Из полученного раствора 1 взяли 1 мл, перенесли в другую пробирку и прилили 9 мл воды. Таким образом получили раствор ИУК 0,001 мг/л

Данная концентрация приводит к увеличению всех ростовых показателей, что следует из работы «Влияние обработки семян разными дозами гетероауксина на ростовые параметры двух сортов фасоли» Матюнина В.Д.*, Чистоедова А.В., Маркова О.В., Гарипова С.Р. Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия [10].

Приготовление раствора гиббереллиновой кислоты (ГК)

Навеску гиббереллина массой 50 мг растворили в 50 мл теплой дистиллированной воды и довели объем до 1 л.

Концентрации растворов следующие: гиббереллиновая кислота – 50мг/л. Оптимальная концентрация гиббереллиновой кислоты была определена экспериментальными методами в работе “Действие гиббереллина, ауксина, хлорхолинхлорида на рост и полегаемость проростков пшеницы” [10].

Приготовление раствора “.Азотник”

препарат развели с водой в соотношении 1:100

2.2.7.2 Приготовление раствора чистой культуры *Azotobacter*

В пробирку наливали 10 мл стерилизованной водопроводной воды и бактериологической петлей соскабливали колонию *Azotobacter* с поверхности

агара и тщательно размешивали с водой до получения однородной суспензии.

2.2.8 Проращивание пшеницы

Первоначально все зерновки обрабатывали 0,5% раствором перманганата калия в течении 15 мин. .

Затем зерновки замочили в воде, в чашках Петри на сутки.

2.2.9 Определение ауксин- и гиббереллиноподобной активности азотобактера на тест-растениях

1. Спустя сутки, зерновки пригодные к проращиванию отобрали и разместили на заранее подготовленных предметных стеклах, обмотанных фильтровальной бумагой по 5 штук в 2 ряда.
2. Предметные стекла, с расположенными на них зерновками, поместили в чашки Петри.
3. В чашки Петри прилили растворы, в соответствии со схемой опыта.

Схема опыта

1 вариант

1– первый вариант пророщенных семян пшеницы обработали раствором гиббереллина, 2. - второй - раствором чистой культуры *Azotobacter*, выращенный на образцах почвы (с наибольшим содержанием *Azotobacter*), 3- третий.- раствором чистой культуры *Azotobacter*, выращенный на образцах почвы (с наименьшим содержанием *Azotobacter*) 4.-четвертый - раствором коммерческого препарата “Азотник” (контроль) (в трех повторностях).

2 вариант

1 –первый вариант пророщенных семян пшеницы обработали раствором ауксин, 2. - второй - раствором чистой культуры *Azotobacter*, выращенный на образцах почвы(с наибольшим содержанием *Azotobacter*), 3- третий.- раствором чистой культуры *Azotobacter*, выращенный на образцах

почвы (с наименьшим содержанием *Azotobacter*) 4.-четвертый - раствором коммерческого препарата “Азотник” (контроль) (в трех повторностях).

4. После закладки опыта все чашки Петри поместить на длинный день – 14 часов, в бокс с постоянной температурой в 24°C и освещением в 10 тыс. люкс.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Активность роста *Azotobacter* на почвенных образцах

Выращенные на питательной среде чистые культуры *Azotobacter* использовали для определения в дальнейшем эксперименте ауксин- и гиббереллиноподобной активности *Azotobacter* на тест-растениях (рис. 11).

Для этого отобрали выращенные чистые культуры *Azotobacter*:

1 вариант - наиболее активные (с наибольшим содержанием *Azotobacter*. Данный образец был выращен на образце почвы № 2, взятым в точке 1 53.199308 с. ш., 44.868241 в. д. на глубине 10 см и № 4, взятым в точке 2 53.217254 с. ш., 44.874251 в. д. на глубине 15 см)

2 вариант - наименее активные (с наименьшим содержанием *Azotobacter*. Данный вариант был выращен на образце № 5, взятым в точке 2 53.217301 с. ш., 44.874353 в. д. на глубине 10 см)



Рисунок 11. Посев образцов почвы на питательную среду Эшби

Через три дня появились первые обрастания комочков почвы колониями бактерий штаммов *Azotobacter*.

**Результаты обрастания комочков почвы бактериями штаммов
Azotobacter на 3 сутки (рис. 12-16)**



Рисунок 12. Внешний вид колоний на 3 день после посева. Образец 1 (1 точка, 1 повторность глубина 15 см. координаты: 53.199581 с.ш., 44.868317 в.д.)



Рисунок 13. Внешний вид колоний на 3 день после посева. Образец 2. (1 точка, 2 повторность глубина 10 см. координаты 1.2 53.199308 с.ш., 44.868241 в.д.)



Рисунок 14. Внешний вид колоний на 3 день после посева. Образец 3 (1 точка, 3 повторность, глубина 5 см. координаты 1.353.199232 с.ш., 44.867684 в.д.)



Рисунок 15. Внешний вид колоний на 3 день после посева. Образец 4 (2 точка, 1 повторность глубина 15 см. 53.217254 с.ш., 44.874251 в.д.)



Рисунок 16. Внешний вид колоний на 3 день после посева. Образец 5 (2 точка, 2 повторность, глубина 10 см. координаты 53.217301с.ш., 44.874353в.д..)

На третий день наблюдений больше всего обрастания комочков почвы колониями *Azotobacter* появилось на образце №4, взятым в точке 2 на глубине 15 см. (Арбековский лес 53.217254 с.ш., 44.874251 в.д.)

Результаты обрастания комочков почвы бактериями штаммов *Azotobacter* на 7 сутки (рис. 17- 21)



Рисунок 17. Внешний вид колоний на 7 день после посева. Образец 1 (1 точка, 1 повторность глубина 15 см. координаты: 53.199581 с.ш., 44.868317 в.д.)



Рисунок 18. Внешний вид колоний на 7 день после посева. Образец 2. (1 точка, 2 повторность глубина 10 см. координаты 1.2 53.199308 с.ш., 44.868241 в.д.)



Рисунок 19. Внешний вид колоний на 7 день после посева.

Образец 3 (1 точка, 3 повторность, глубина 5 см. координаты 1.353.199232с.ш., 44.867684в.д.)



Рисунок 20. Внешний вид колоний на 7 день после посева.

Образец 4 (2 точка, 1 повторность, глубина 15 см. 53.217254с.ш., 44.874251в.д.)



Рисунок 21. Внешний вид колоний на 7 день после посева. Образец 5 (2 точка, 2 повторность, глубина 10 см. координаты 53.217301с.ш., 44.874353в.д.)

На седьмые сутки мы наблюдаем, как бактерии штаммов *Azotobacter* начинают активно заселять частицы почвы, и цвет колоний изменяется.

Результат обрастаний комочков почвы бактериями штаммов *Azotobacter* на десятые сутки (рис. 22 - 26):



Рисунок 22. Внешний вид колоний на 10 день после посева.

*Образец 1 (1 точка, 1 повторность
глубина 15 см. координаты:
53.199581 с. ш., 44.868317 в. д.)*



Рисунок 23. Внешний вид колоний на 10 день после посева.

*Образец 2 (1 точка, 2 повторность
глубина 10 см. координаты 1.2
53.199308 с. ш., 44.86824 в. д.)*



Рисунок 24. Внешний вид колоний на 10 день после посева.

*Образец 3 (1 точка, 3 повторность,
глубина 5 см. координаты
1.353.199232 с. ш., 44.867684 в. д.)*



Рисунок 25 Внешний вид колоний на 10 день после посева.

*Образец 4 (2 точка, 1 повторность,
глубина 15 см. 53.217254 с. ш.,
44.874251 в. д.)*



Рисунок 26. Внешний вид колоний на 10 день после посева. Образец 5 (2 точка, 2 повторность, глубина 10 см. координаты 53.21730 с. ш., 44.874353 в. д.)

Результаты роста колоний азотобактера представлены в таблице 2, (рис. 27).

Таблица 2 - Развитие колоний бактерий Azotobacter

Номер образца	Число комочков (шт.)	Число обрастаний (шт.)		
		На 3 сутки 1.03.24	На 7 сутки 05.03.24	На 10 сутки 08.03.24
1	45	18 (40,0%)	29 (64,0%)	34 (75,5%)
2	45	20 (44,0%)	36 (80,0%)	45 (100%)
3	45	15 (33,0%)	17 (37,7%)	38 (84,0%)
4	45	28 (62,0%)	42 (93,0%)	45 (100%)
5	45	8 (17,7%)	10 (22,0%)	12 (26,6%)

Для оценки достоверности различий между несколькими группами наблюдений мы использовали метод дисперсионного анализа. Ценность этого метода заключается в том, что он позволяет выявить и суммарное действие факторов, и действие каждого фактора в опыте в отдельности.

Таблица 3 - Двухфакторный дисперсионный анализ развития колоний бактерий *Azotobacter* без повторений

ИТОГИ	Счет	Сумма	Среднее	Дисперсия
№ 1	3	81	27	67
№ 2	3	101	33,66667	160,3333
№ 3	3	70	23,33333	162,3333
№ 4	3	115	38,33333	82,33333
№ 5	3	30	10	4
На 3 сутки	5	89	17,8	53,2
На 7 сутки	5	134	26,8	174,7
На 10 сутки	5	174	34,8	184,7

Таблица 4 - Дисперсионный анализ развития колоний бактерий *Azotobacter*

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Строки	1421,733	4	355,4333	12,43499	0,001638	3,837853
Столбцы	723,3333	2	361,6667	12,65306	0,003329	4,45897
Погрешность	228,6667	8	28,58333			
Итого	2373,733	14				

Проверка значимости результатов дисперсионного анализа показывает, что нулевая гипотеза отвергается и влияние исследуемого фактора можно считать доказанным, так как P-Значение < 0,05, а критерий Фишера значим (таблицы 3 и таблица 4). Таким образом, имеются статистически значимые

существенные различия и между вариантами, и по срокам роста азотобактера.

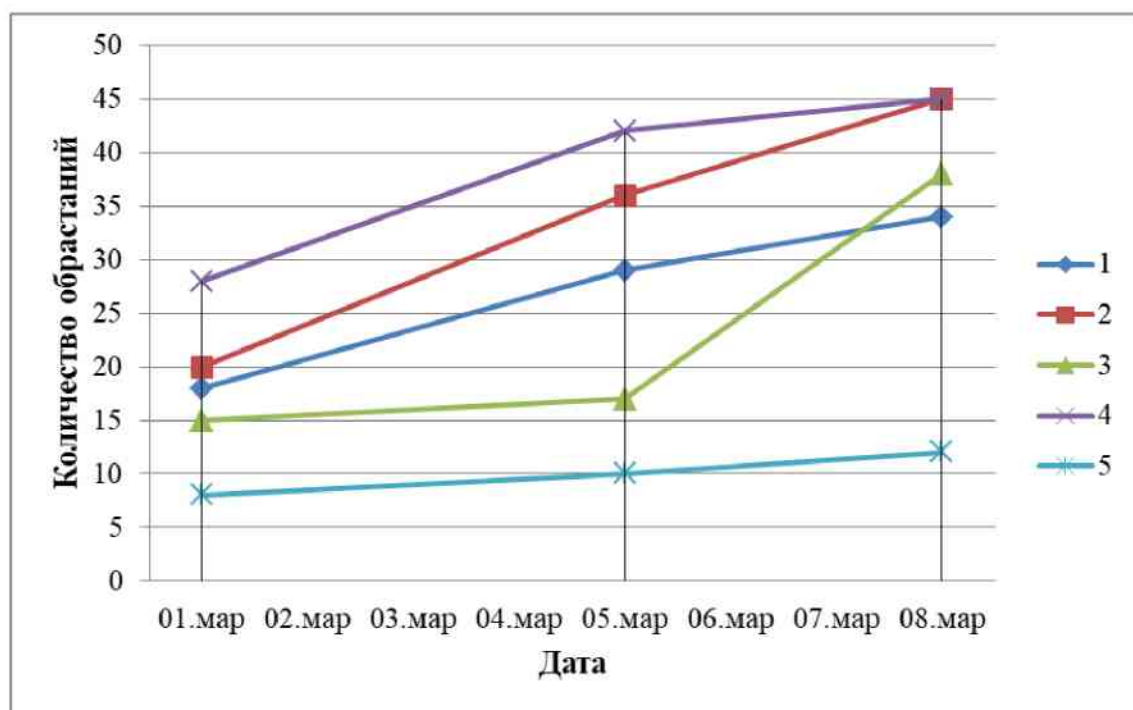


Рисунок 27. Изменение числа обрастаний комочков почвы

(1. Образец 1 (1 точка, 1 повторность глубина 15 см. координаты: 53.199581 с. ш., 44.868317 в. д., 2. Образец 2 (1 точка, 2 повторность глубина 10 см. координаты 1.2 53.199308 с. ш., 44.86824 в. д.), 3. Образец 3 (1 точка, 3 повторность, глубина 5 см. координаты 1.3 53.199232 с. ш., 44.867684 в. д.), 4. Образец 4 (2 точка, 1 повторность, глубина 15 см. 53.217254 с. ш., 44.874251 в. д.), 5. Образец 5 (2 точка, 2 повторность, глубина 10 см. координаты 53.21730 с. ш., 44.874353 в. д.)

Образец №2 и №4 через десять дней дали наибольшее число обрастаний. Образец №4 был взят в точке 2 координаты 53.217254 с.ш., 44.874251 в.д. на глубине 15 см, а образец №2 – в точке 1 координаты 53.199308 с.ш., 44.868241 в.д. на глубине 10 см Образцы №1 и №3 также имеют хороший результат обрастания. Менее активен образец №5, давший наименьшее число обрастаний, был взят в точке 2 координаты 53.217301 с.ш., 44.874353 в.д.. на глубине 10 см)

3.2 Микроскопическое исследование образца.

Для подтверждения чистоты выделенной культуры приготовили фиксированный препарат и изучили морфологию клеток.

Для этого на предметное стекло, с помощью бактериологической петли, нанесли небольшое количество биомассы с «обрастаний». В центр, покрытый образцом наносили каплю фуксина Циля и каплю туши. С помощью биологической петли смешали биомассу и красители, подсушили препарат и нанесли каплю воды и изучали препарат с помощью светового микроскопа с увеличением $\times 100$. (рис.28). На фотографии видим скопления неокрашенных клеток *Azotobacter*.

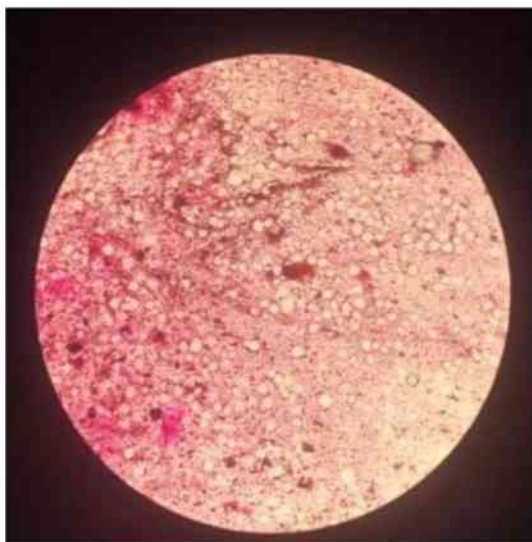


Рисунок 28. Микроскопическая фотография клеток *Azotobacter*

Клетки рода *Azotobacter* являются относительно крупными для бактерий (2-4 мкм в диаметре) с овальной формой, но могут иметь различные формы. В микроскопических препаратах они могут быть рассредоточены, образовывать кластеры или цепочки. В свежих культурах клетки подвижны благодаря жгутикам, но со временем становятся почти сферическими и выделяют клеточную капсулу из слизи. Аминокислота глицин влияет на форму клетки.

Azotobacter является свободноживущим микроорганизмом, который использует легкодоступные углеродосодержащие органические соединения в качестве источника углерода, а также фиксирует азот из атмосферы и

различных азотсодержащих соединений. При отсутствии связанных форм азота они способны фиксировать молекулярный азот.

По результатам выращивания чистой культуры (рис. 29), были отобраны следующие варианты:

1 вариант - наиболее активные (с наибольшим содержанием *Azotobacter*. Данный образец был выращен на образце почвы № 2, взятым в точке 1 координаты 53.199308 с. ш., 44.868241 в. д. на глубине 10 см и № 4, взятым в точке 2 координаты 53.217254 с. ш., 44.874251 в. д. на глубине 15 см)

2 вариант - наименее активные (с наименьшим содержанием *Azotobacter*. Данный вариант был выращен на образце № 5, взятым в точке 2 координаты 53.217301 с. ш., 44.874353 в. д. на глубине 10 см)



Рисунок 29. Выращивание чистой культуры *Azotobacter*

3.3 Ауксин- и гиббереллиноподобная активность азотобактера на тест-растениях.

Перед проращиванием, семена пшеницы сорта Клавдия обработали 0,5% раствором перманганата калия в течение 15 мин. (рис.30)



Рисунок 30. Замачивание семян в 0,5% растворе $KMnO_4$



Рисунок 31. Определение ауксин- и гиббереллиноподобной активности азотобактера на тест-растениях.

В течение лабораторных опытом, мы изучали динамику изменения следующих морфофизиологических показателей растений: длина проростка, длина корня, биомасса проростка, биомасса корня (рис.31 - 37).



Рисунок 32. Результат обработки семян ауксином на 15 суток

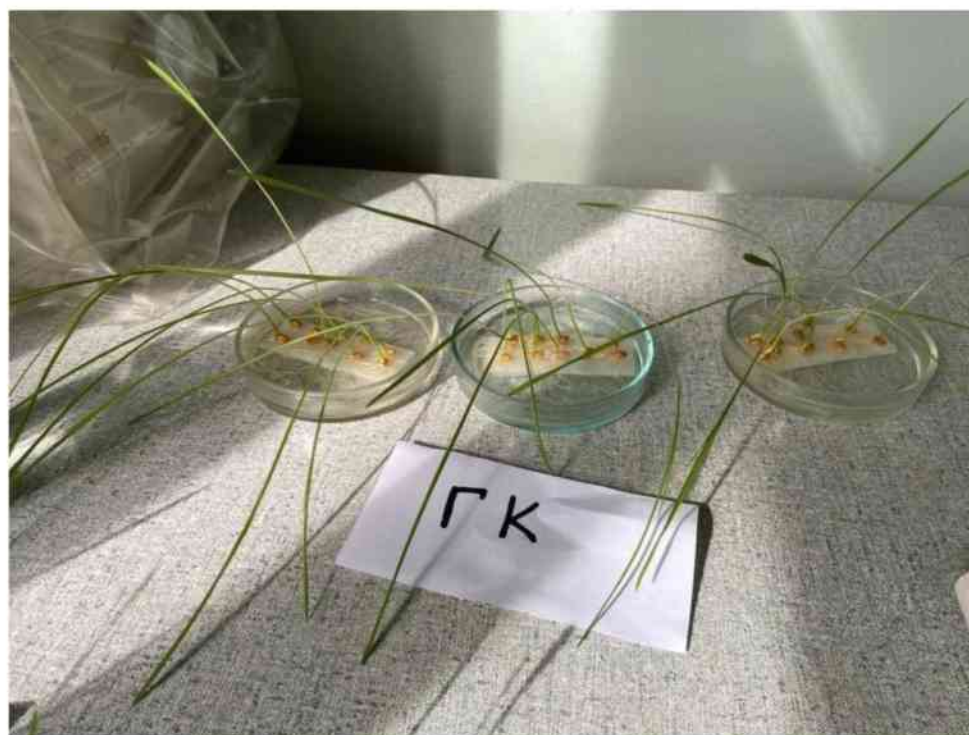


Рисунок 33. Результат обработки семян ГК на 15 суток



Рисунок 34. Результат обработки чистой культурой *Azotobacter*, выделенной из образца почвы №2



Рисунок 35. Результат обработки чистой культурой *Azotobacter*, выделенной из образца почвы №4



*Рисунок 36. Результат обработки чистой культурой Azotobacter
(коммерческий препарат)*



*Рисунок 37. Результат обработки чистой культурой Azotobacter,
выделенной из образца почвы №5*

Результаты морфометрических измерений за 15 дней дали следующие результаты (табл. 5,8,11,12; рис.38-43):

Таблица 5 - Изменение высоты проростка (мм.)

Препараты, используемые для обработки тест-растений	Дата измерения			
	3.04	7.04	2.04	5.04
Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы №2 (активный)	52,0	36,0	40	83
Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы № 4 (активный)	33,0	20,0	20	37
Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы № 5 (пассивный)	28,0	28,0	53	65
ГК	53,3	90,0	30	43
ИУК	9,3	8,3	3	5
Коммерческий препарат	0,5	10,0	12	40

*Таблица 6 - Двухфакторный дисперсионный анализ влияния исследуемых растворов чистых культур *Azotobacter*, растворов ауксина, гиббереллина и коммерческого препарата “Азотник” на рост проростка без повторений*

<i>ИТОГИ</i>	<i>Счет</i>	<i>Сумма</i>	<i>Среднее</i>	<i>Дисперсия</i>
Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы №2 (активный)	4	511	127,75	3002,917
Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы № 4 (активный)	4	610	152,5	9011
Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы № 5 (пассивный)	4	474	118,5	3877,667
ГК	4	716,3	179,075	7539,489
ИУК	4	95,6	23,9	230,18
Коммерческий препарат «Азотник»	4	62,5	15,625	289,2292
13.04.2024	6	176,1	29,35	467,219
17.04.2024	6	602,3	100,3833	5070,802
22.04.2024	6	778	129,6667	8820,267
25.04.2024	6	913	152,1667	8125,767

Таблица 7 - Дисперсионный анализ влияния исследуемых растворов чистых культур *Azotobacter*, растворов ауксина, гиббереллина и коммерческого препарата "Азотник" на рост проростка

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Строки	91926,39	5	18385,28	13,45666	4,27E-05	2,901295
Столбцы	51357,57	3	17119,19	12,52998	0,00023	3,287382
Погрешность	20493,88	15	1366,258			
Итого	163777,8	23				

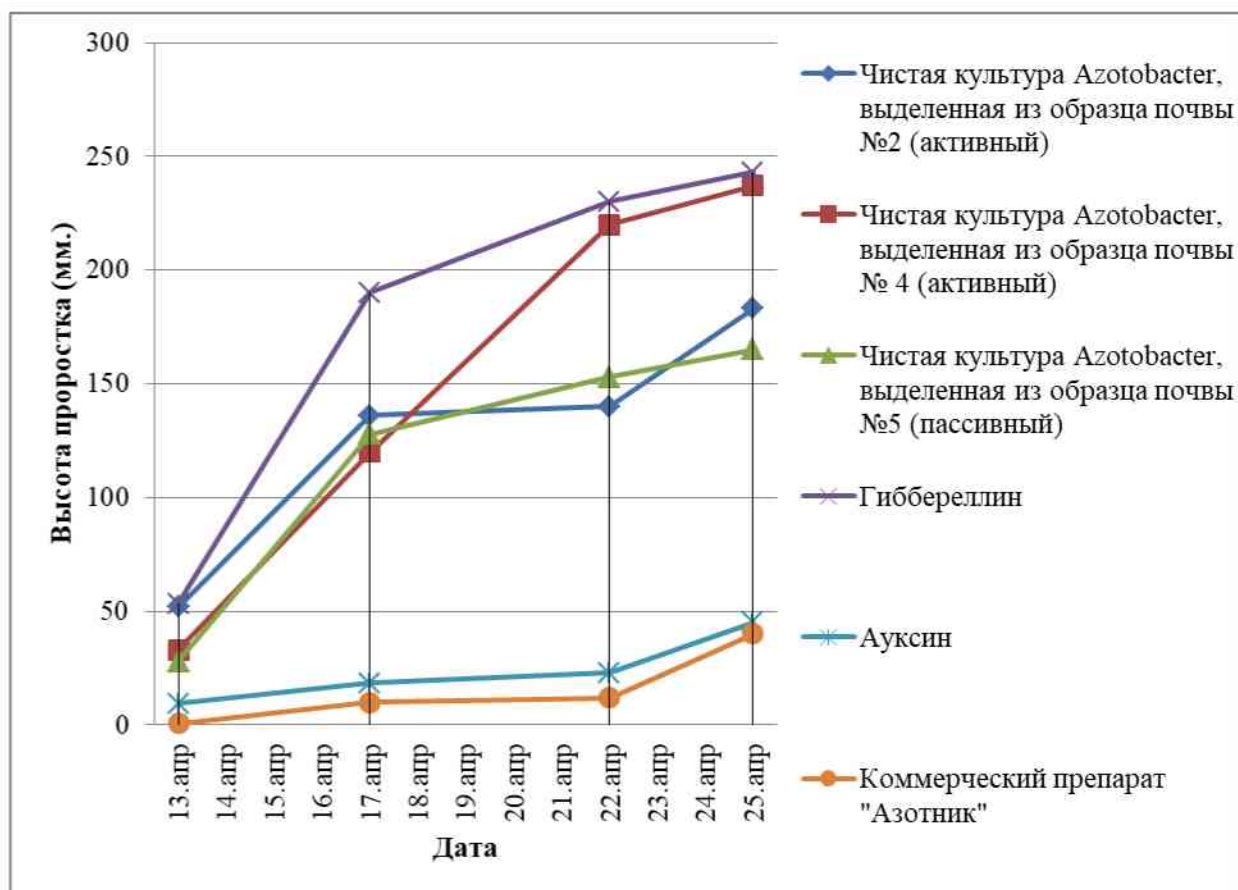


Рисунок 38. Изменение высоты проростка (мм)

Проверка значимости результатов дисперсионного анализа показывает, что нулевая гипотеза отвергается и влияние исследуемого фактора можно считать доказанным, так как Р-Значение $< 0,05$, а критерий Фишера значим (табл.6,7). Таким образом, имеются статистически значимые

существенные различия и между вариантами, и по срокам роста азотобактера

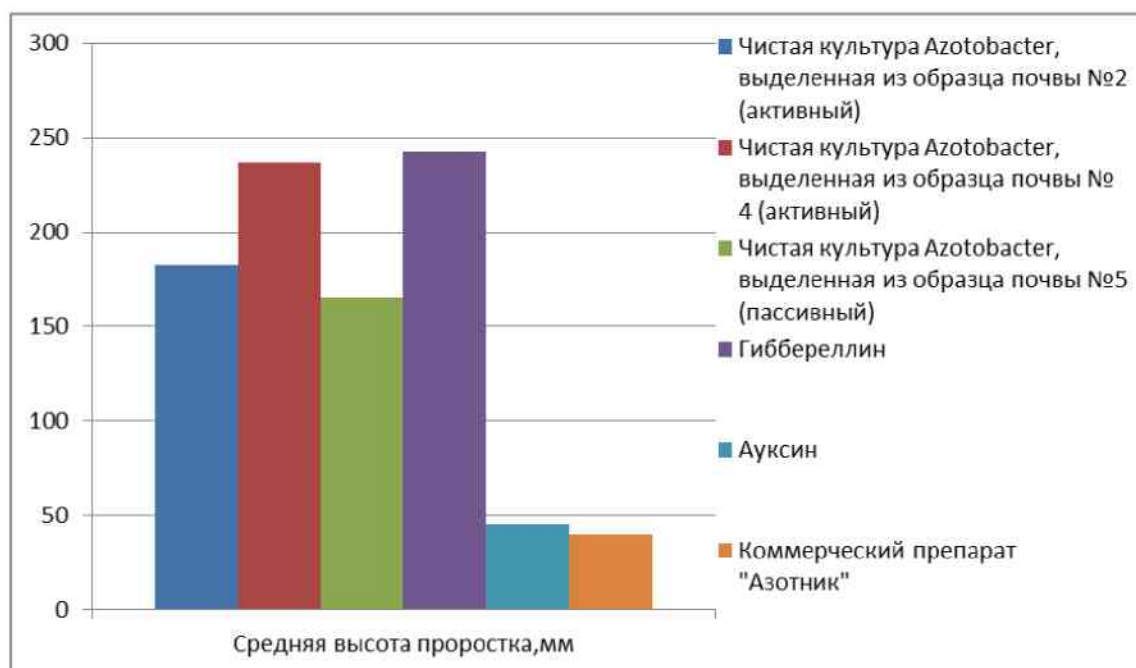


Рисунок 39. Средняя высота проростка

Таблица 8 - Изменение длины корня (мм.)

Препараты, используемые для обработки тест-растений	Дата измерений			
	3.04	7.04	2.04	5.04
Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы №2 (активный)	34,0	62,0	71,0	80
Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы №4 (активный)	38,0	68,0	85,0	107
Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы №5(пассивный)	25,0	44,0	55,0	116
ГК	22,0	53,0	68,0	77
ИУК	2,3	4,3	8,3	15
Коммерческий препарат «Азотник»	1,7	2,1	3,3	14

Таблица 9 - Двухфакторный дисперсионный анализ влияния исследуемых растворов чистых культур *Azotobacter*, растворов ауксина, гиббереллина и коммерческого препарата “Азотник” на изменение длины корня без повторений

ИТОГИ	Счет	Сумма	Среднее	Дисперсия
Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы №2 (активный)	4	247	61,75	396,25
Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы № 4 (активный)	4	298	74,5	847
Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы № 5(пассивный)	4	240	60	1547,333
ГК	4	220	55	582
ИУК	4	29,9	7,475	31,38917
Коммерческий препарат	4	21,1	5,275	34,29583
13.04.2024	6	123	20,5	239,136
17.04.2024	6	233,4	38,9	831,328
22.04.2024	6	290,6	48,43333	1184,011
25.04.2024	6	409	68,16667	1954,967

Таблица 10 - Дисперсионный анализ влияния исследуемых растворов чистых культур *Azotobacter*, растворов ауксина, гиббереллина и коммерческого препарата “Азотник” на изменение длины корня

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Строки	17824,06	5	3564,811	16,59002	1,21E-05	2,901295
Столбцы	7091,653	3	2363,884	11,00112	0,000449	3,287382
Погрешность	3223,152	15	214,8768			
Итого	28138,86	23				

Проверка значимости результатов дисперсионного анализа показывает, что нулевая гипотеза отвергается и влияние исследуемого фактора можно

считать доказанным, так как Р-Значение $< 0,05$, а критерий Фишера значим (табл.9,10). Таким образом, имеются статистически значимые существенные различия и между вариантами, и по срокам роста азотобактера

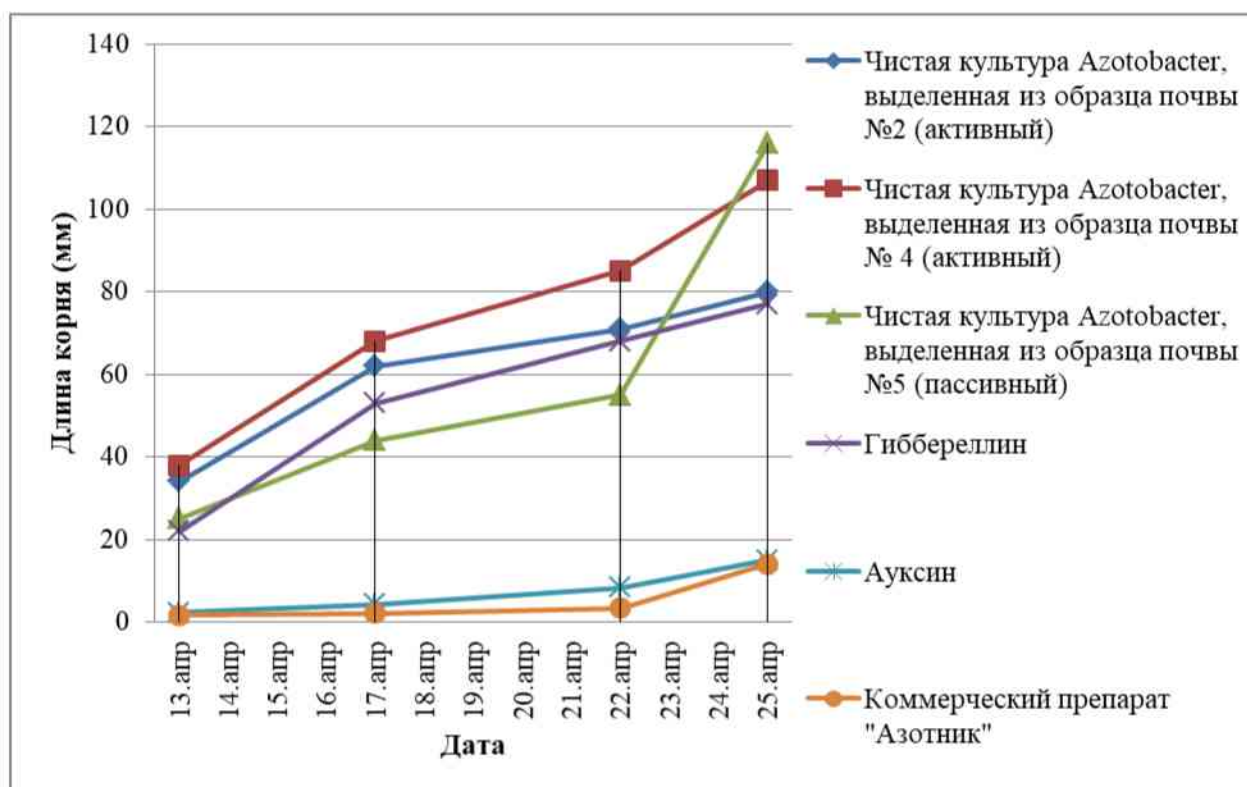


Рисунок 40. Изменение длины корня (мм)

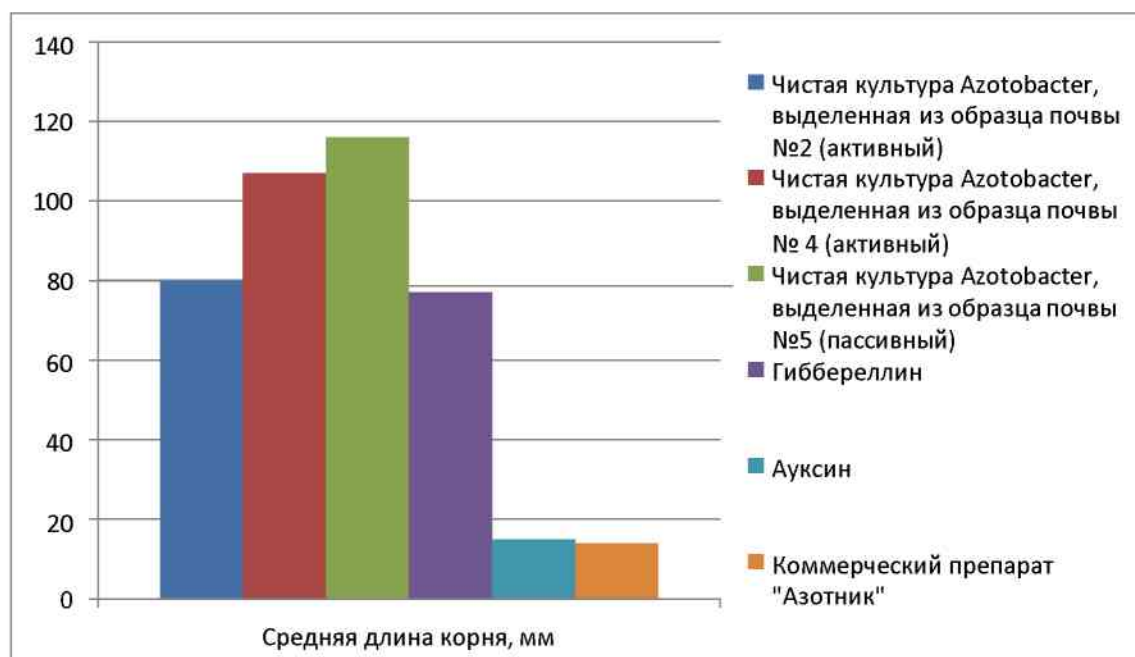


Рисунок 41. Средняя длина корня

Таблица 11- Сырой вес проростков (мг.)

Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы №2 (активный)	Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы № 4 (активный)	Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы №5 (пассивный)	ГК	ИУК	Коммерческий препарат «Азотник»
100,0	154,0	80,0	141,6	4,0	6,0

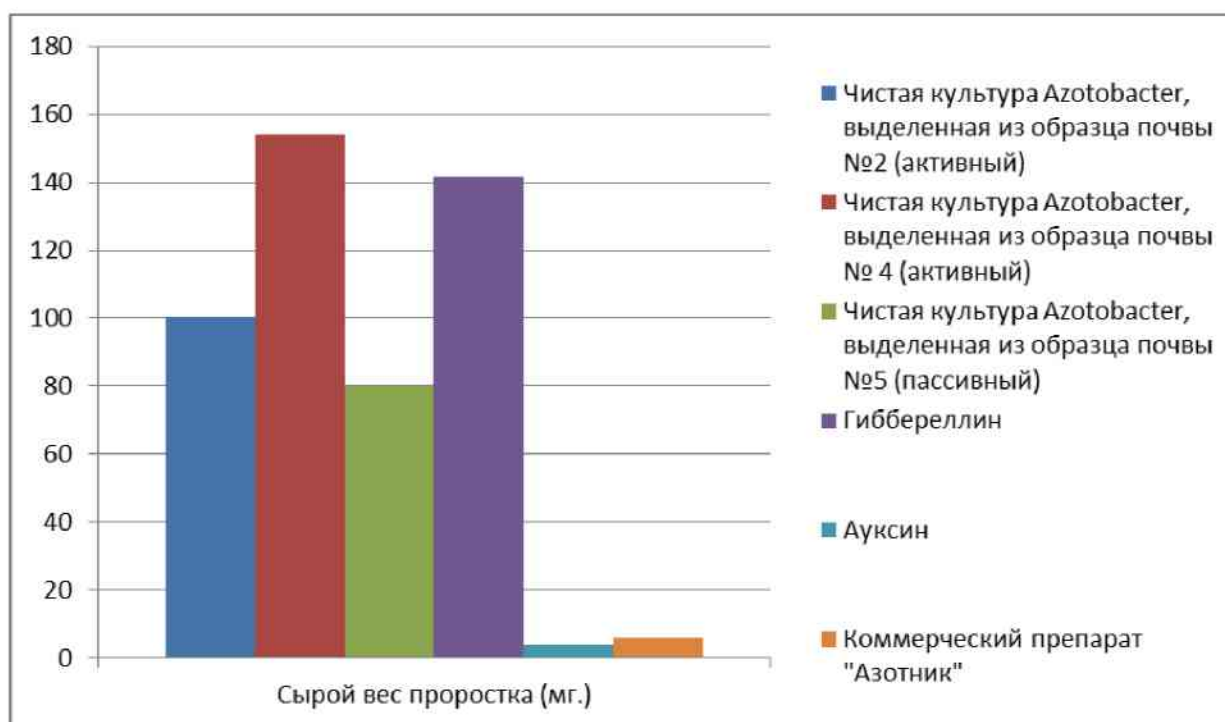


Рисунок 42. Сырой вес проростка

Таблица 12 - Сырой вес корня

Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы №2 (активный)	Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы № 4 (активный)	Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы №5 (пассивный)	ГК	ИУК	Коммерческий препарат «Азотник»
167,5	272,0	117,5	96,4	2,5	2,3

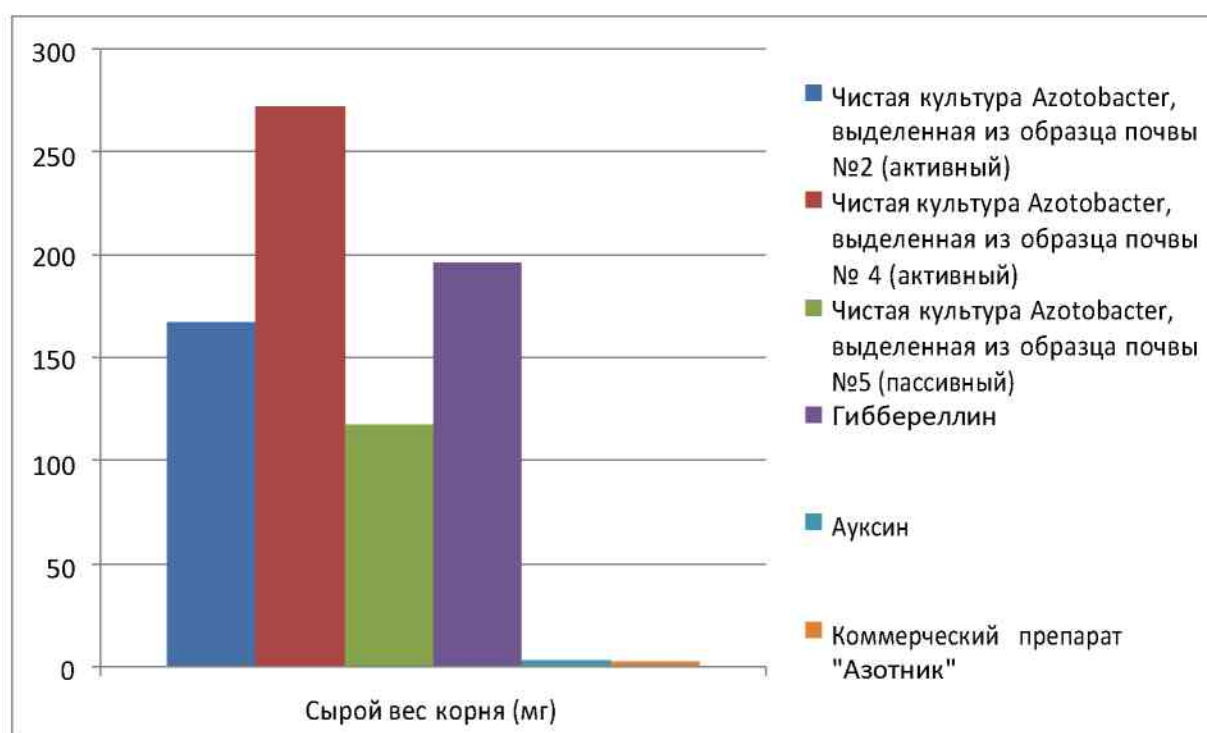


Рисунок 43. Сырой вес корня

Таблица 13 - Двухфакторный дисперсионный анализ влияния исследуемых растворов чистых культур *Azotobacter*, растворов ауксина, гиббереллина и коммерческого препарата "Азотник" на сырой вес проростка и корня. без повторений (по таблицам 11, 12)

ИТОГИ	Счет	Сумма	Среднее	Дисперсия
Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы №2 (активный)	2	267,5	133,75	2278,125
Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы № 4 (активный)	2	426	213	6962
Чистая культура <i>Azotobacter</i> , выделенная из образца почвы №5 (пассивный)	2	197,5	98,75	703,125
ГК	2	338	169	1501,52
ИУК	2	6,5	3,25	1,125
Коммерческий препарат	2	8,3	4,15	6,845
Сырой вес проростка	6	485,6	80,93333	4183,467
Сырой вес корня	6	758,2	126,3667	11723,96

Таблица 14 - Дисперсионный анализ влияния исследуемых растворов чистых культур *Azotobacter*, растворов ауксина, гиббереллина и коммерческого препарата "Азотник" на сырой вес проростка и корня. (по таблицам 11, 12)

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Строки	74276,95	5	14855,39	14,12062	0,005683	5,050329
Столбцы	6192,563	1	6192,563	5,886269	0,059662	6,607891
Погрешность	5260,177	5	1052,035			
Итого	85729,69	11				

Проверка значимости результатов дисперсионного анализа показывает, что нулевая гипотеза отвергается и влияние исследуемого фактора можно считать доказанным, так как Р-Значение $< 0,05$, а критерий Фишера значим (табл.13,14). Таким образом, имеются статистически значимые существенные различия и между вариантами, и по срокам роста азотобактера.

В ходе исследования были взяты образцы почвы с разных участков в районе Арбековского леса. Из этих образцов вырастили чистые культуры микроорганизмов *Azotobacter*.

Затем изучили фитогормональную активность полученных культур *Azotobacter*. Также сравнили их действие с растворами фитогормонов и коммерческим препаратом «Азотник», который тоже содержит микроорганизмы *Azotobacter*.

Морфометрические показатели (такие как высота проростка и длина корня) при действии чистой культуры *Azotobacter* и раствора гиббереллина (ГК) отличаются.

Высота проростка при обработке ГК и чистой культурой *Azotobacter*, полученной из образца почвы № 4, взятого на глубине 15 сантиметров, примерно одинаковая. Однако высота проростка, обработанного чистой культурой *Azotobacter*, полученной из образца почвы № 2, взятого с глубины 10 сантиметров, меньше.

Показатели длины корня также больше при обработке чистой культурой *Azotobacter*, чем при обработке ГК.

Сырой вес проростка больше при обработке чистой культурой *Azotobacter* из образца почвы № 4, взятого на глубине 15 сантиметров. Вес корня также больше при обработке чистой культурой *Azotobacter*.

При сравнении морфометрических показателей на ауксин активность получены следующие результаты: высота проростка, длина корня, сырой вес проростка и сырой вес корня значительно выше при обработке тест-растений чистой культурой *Azotobacter* как с наибольшей, так и с наименьшей активностью.

При сравнении морфометрических показателей действия чистой культуры *Azotobacter* и коммерческого препарата «Азотник» на основе культуры *Azotobacter* результат получился такой же, как и при обработке ауксином. То есть показатели высоты проростка, длины корня, сырого веса проростка и корня намного выше при обработке тест-растений чистой культуры *Azotobacter*.

Исходя из полученных результатов можно сделать вывод о фитогормональной активности штаммов *Azotobacter* в ризосферной микрофлоре. Чистая культура *Azotobacter* оказывает влияние на растения, ускоряя рост проростка и корня, тем самым увеличивая урожайность растений. Выделение штаммов *Azotobacter* позволит увеличить плодородие почвы и стимулировать рост растений. Микроорганизмы *Azotobacter* оказывают большее влияние на рост и развитие растений, чем коммерческие препараты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения нашей работы были изучены физиолого - биохимические свойства штаммов *Azotobacter* по которым можно сделать следующие выводы, исходя из поставленных задач:

1. Для изучения активности *Azotobacter* были взяты образцы почв с разных точек и с разной глубины.
2. Количество чистой культуры *Azotobacter*, выращенных на отобранных образцах почвы (с наибольшим содержанием *Azotobacter*) не зависит от глубины взятия образца.
3. Штаммы *Azotobacter* ризосферной микрофлоры растений обладают фитогормональной активностью.
4. Полученные нами в ходе работы чистые культуры *Azotobacter* показали положительное влияние на рост и развитие растений, ускоряя рост проростка и корня, тем самым увеличивая урожайность растений.
5. Фитогормональная активность выделенной нами чистой культуры *Azotobacter* оказалась выше, чем у коммерческого препарата “Азотник” и препарата ауксина использованного в концентрации 0,001 мг/л
6. Чистая культура *Azotobacter* влияет на рост и развитие растений пшеницы сорта Клавдия.

Во многих литературных источниках показано влияние бактерий *Azotobacter* на рост и развитие растений в различных условиях. Вместе с тем, не всегда описан механизм влияния, а также есть сведения о незначительном влиянии азотобактера. Наши исследования подтверждают, что в ответ на обработку *Azotobacter*, у растений изменяется рост, длина корня, биомасса, скорость роста и другие показатели.

Выделенные нами чистые культуры *Azotobacter* показали большее влияние на рост и развитие растений, чем коммерческий препарат “Азотник”.

Таким образом, полученные нами чистые культуры *Azotobacter* можно применять в сельском хозяйстве для получения биоудобрений для

восстановления и повышения плодородия почвы и повышения урожайности растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беззубенкова О.Е., Юхлимова М.Н., Нестерова Н.И. Микрофлора ризосферы и ризопланы и её влияние на растительный организм // Естественные и технические науки. 2012. Т. 4. С. 99–102.
2. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Немцева Н.В., Черкасов С.В. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2006. 264 с.
3. Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв. Москва: ИКЦ «Академкнига» 2002. 282 с.
4. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.Л., Зенова Г.М. Биология почв. Москва: Изд-во Моск. ун-та, 2005. 445 с.
5. Звягинцев Д.Г., Добровольская Т.Г., Лысак Л.В. Растения как центры формирования бактериальных сообществ почв // Общая биология. 1993. № 2. С. 183–199.
6. Иванов В.П. Корневые выделения и их значение в жизни фитоценозов. Москва: Наука, 1973. 193 с.
7. Каменева С.В., Муромец Е.М. Генетический контроль процессов взаимодействия бактерий с растениями в ассоциациях // Генетика. 1999. Т. 35. № 11. С. 1480–1494.
8. Ланкина Е.П., Хижняк С.В., Кулижский С.П. Перспективы использования смешанных культур психрофильных и психротолерантных бактерий в биологической защите растений от болезней // Вестн. КрасГАУ. 2013. № 4. С. 101–105.
9. Матюнина В.Д. и др. «Влияние обработки семян разными дозами гетероауксина на ростовые параметры двух сортов фасоли»// Экобиотех, 2023. Том 6, № 3 С. 175-184.
10. Мишке И.В. Микробные фитогормоны в растениеводстве. Рига: Зинатне, 1988. 151 с.
11. Моргун В.В., Коць С.Я., Кириченко Е.В. Ростстимулирующие ризобактерии и их практическое применение // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т. 41, № 3. С. 187–207.

12. Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация. Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1986. 133 с.
13. Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов А.Л. Микробиологическая трансформация азота в почве. Москва: ГЕОС, 2007. 137 с.
14. Шапошников А.И., Белимов А.А., Кравченко Л.В., Виванко Д.М. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями: механизмы образования и факторы эффективности ассоциативных симбиозов (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 3. С. 16–22.
15. Afzal M., Khan Q., Sessitsch A. Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants // Chemosphere. 2014. V. 117. P. 232–242.
16. Asfar, A., Bargaz, A., Yakubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zerual, Yu. et al. (2021). Nitrogen-fixing azotobacter species as potential soil biological enhancers of crop nutrition and yield stability. The front. Microbiol. 12. doi: 10.3389/fmicb.2021.628379 стр 16, 14
17. Babu N., Jogaiah S., Ito S., Nagaraj K., Tran L. Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase // Plant Sci. 2015. V. 231. P. 62–73.
18. Balandreau J. Microbiology of the association // Can. J. Microbiol. 1983. V. 29, No 8. P. 851–859.
19. Beneduzi A., Ambrosini A., Passaglia L.M.P. Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents // Genet. Mol. Biol. 2012. V. 35, Suppl. 4. P. 1044–1051.
20. Beijerinck M.W. Über oligonitrophile Mikroben // Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. 1901. Abteilung II, Vol 7. P. 561–582.

21. Berg G., Rybakova D., Grube M., Koberl M. The plant microbiome explored: implications for experimental botany // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 67, No 4. P. 995–1002.
22. Bulgarelli D., Schlaeppi K., Spaepen S., Ver Loren van Themaat E., Schulze-Lefert P. Structure and function of bacterial microbiota of plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2013. V. 64. P. 807–838.
23. Chapparo J.M., Badri D.V., Bakker M.G., Sugiyama A., Manter D.K., Vivanco J.M. Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions // *PloS One*. 2013. V. 8, No 8. P. 55731.
24. Chowdhury S.P., Hartmann A., Gao X-W., Borriss R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. 780, P. 1–11.
25. Couillerot O., Ramírez-Trujillo A., Walker V., von Felten A., Jansa J., Maurhofer M., Défago G., Prigent-Combaret C., Comte G., Caballero-Mellado J., Moëgne-Loccoz Y. Comparison of prominent *Azospirillum* strains in *Azospirillum*-*Pseudomonas*-*Glomus* consortia for promotion of maize growth // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 9, No 7. P. 4639–4649.
26. Das H.K. - *Achievements in Applied Microbiology*, 2019. Elsevier
27. Description of *Azotobacter chroococcum* subsp. *isscasi* subsp. nov. isolated from paddy soil and establishment of *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* subsp. nov. / H. Jin, H. Wang, Y. Zhang, T. Hu, Z. Lin, B. Liu, J. Ma, X. Wang, Q. Liu, X. Lin., Z. Xie // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020. Vol. 70. P. 2124–2131.
28. Djordjevic M.A., Mond-Radzman N.A., Imin N. Small-peptide signals that control root nodule number, development, and symbiosis // *J. Exp Bot.* 2015. V. 66, No 17. P. 5171–5181.

29. Dobereiner J. Dinitrogen fixation in rhizosphere and phyllosphere associations // *Inorganic Plant Nutrition*. Berlin etc.: Springer-Verlag, 1983. P. 330–350.
30. Döbereiner J. Nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere // Quispel A. (ed.) *The biology of nitrogen fixation*. Amsterdam: North-Holland Pub. Co, 1974. P. 86–120.
31. Duca D., Lory J., Patten C.L., Rose D., Glick B.R. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2014. V. 106, No 1. P. 85–125.
32. Fahad S., Hussain S., Bano A., Saud S., Hassan S., Shan D., Khan F.A., Khan F., Chen Y., Wu C., Tabassum M.A., Chun M.X., Afzal M., Jan A., Jan M.T., Huang J. Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2015. V. 22, No 7. P. 4907–4921.
33. Haas D., Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonas // *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. V. 3, No 4. – P. 307–319.
34. Isobe K., Ohte N. Ecological perspectives on microbes involved in N-cycling // *Microbes Environ.* 2014. V. 29, No 1. P. 4–16.
35. Jensen H. L. The Azotobacteriaceae // *Bacteriological Reviews*. 1954. Vol. 18, № 4. 195–214
36. Klopffer J.W., Lifshitz R., Zablotowicz R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity // *Trends Biotechnol.* 1989. V. 7, No 2. P. 39–43.
37. Koul V., Adholeya A., Kochar M. Sphere of influence of indole acid and nitric oxide in bacteria // *J. Basic Microbiol.* 2015. V. 55, No 5. P. 543–553.
38. Layne J. S. Natural Factors Involved in the Induction of Cyst Formation in *Azotobacter* // *Journal of Bacteriology*. 1964. Vol. 87, № 3. P. 684— 689.

39. Lynch J.M. The rhizosphere – form and function // *Appl. Soil Ecol.* 1994. V. 1, No 3. P. 193–198.
40. Maksimov I.V., Abizgil'dina R.R., Pusenkova L.I. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protections from pathogens // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2011. V. 47, No 4. P. 333–345.
41. McNear Jr. D.H. The rhizosphere – roots, soil and everything in between // *Nat. Educ. Knowl.* 2013. V. 4, No 3. P. 1.
42. Nascimento F.X., Rossi M.J., Soares C.R.F.S., McConkey B.J., Glick B.R. New insights into 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase phylogeny, evolution and ecological significance // *PLoS One.* 2014. V. 9. No 6. Art. e99168, P. 1–17.
43. Panhwar Q.A., Naher U.A., Jusop S., Othman R., Latif Md.A., Ismail M.R. Biochemical and molecular characterization of potential phosphate-solubilizing bacteria in acid sulfate soil and their beneficial effects on rice growth // *PLoS One.* 2014. V. 9, No 10. Art. e97241.
44. Rajkumar M., Vara Prasad M.N., Freitas H., Ae N. Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2009. V. 29, No 2. P. 120–130.
45. Robson R. L. and Postgate J.R. (1980). Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *The annual edition of Microbiology.* 34, 183-207.
46. Robson, R. L., Eadie, R. R., Richardson, T. H., Miller, R. V., Hawkins, M. and Postgate, J. R. (1986). An alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme. *Nature* 322, 388-390. doi: 10.1038/322388a0
47. Rodriguez H., Fraga R. (1999). Bacteria that solubilize phosphates and their role in stimulating plant growth. *Biotechnology. Adv.* 17, 319-339. doi: 10.1016/S0734-9750(99)00014-2
48. Schlaeppi K., Bulgarelli D. The plant microbiome at work // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2015. V. 28, No 3. P. 212–217.

49. Sharma S.B., Sayyed R.Z., Trivedi M.H., Gobi T.A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils // SpringerPlus. 2013. V. 2. Art. 587, P. 1–14.
50. Turner T.R., James E.K., Poole P.S. The plant microbiome // Genome Biol. 2013. V. 14, No 6. Art. 209, P. 1–10.
51. Ullah A., Mushtag H., Ali H., Munis M.F., Javed M.T., Chaudhary H.J. Diazotrophs assisted phytoremediation of heavy metals: a novel approach // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2015. V. 22, No 4. P. 2505–2514.
52. Vandenkoornhuyse P., Quaiser A., Duhamel M., Le Van A., Dufresne A. The importance of the microbiome of plant holobiont // New Phytol. 2015. V. 206, No 4. P. 1196–1206.
53. Zilber-Rosenberg I., Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution // FEMS Microbiol. Rev. 2008. V. 32, No 5. P. 723–735.