

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 06.03.01 Биология
Профиль подготовки Биохимия
Форма обучения очная

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
на тему:

**«ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ *AZOTOBACTER* С
ФИТОПАТОГЕННЫМИ ГРИБАМИ»**

Студент Ки Назарова Кристина Эдуардовна

Руководитель З Заплатин Б.П.

Нормоконтролер СВ Клыченков С. В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 18.06.24 № 14)

Заведующий кафедрой Карп Карпова Г. А.

Работа защищена с отметкой отлично
(протокол заседания ГЭК от 26.06.24 № 2)

Секретарь ГЭК СВ Клыченков С. В.

Пенза, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Эколого-физиологическая характеристика бактерий рода <i>Azotobacter</i> .	6
1.2 Особенности распространения <i>Azotobacter</i> в различных типах почв ..	12
1.3 Свойства бактерий рода <i>Azotobacter</i>	16
1.3.1 Морфологическая характеристика.....	16
1.3.2 Основные физиолого-биохимические свойства	17
1.4 Особенности взаимодействия азотобактера с растениями и фитопатогенными грибами	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	25
2.1 Объекты исследования	25
2.2 Методы исследования	26
2.2.1 Отбор почвенных образцов.....	26
2.2.2 Питательные среды и выделение чистых культур микроорганизмов	27
2.2.3 Микроскопирование	28
2.2.4 Выделение штаммов азотобактера	29
2.2.5 Культивирование фитопатогенных грибов	31
2.2.6 Метод агаровых блоков.....	31
2.2.7 Метод последовательного разведения.....	33
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	36
3.1 Учет размера колоний <i>Azotobacter</i> и оценка морфологических характеристик	36
3.2 Оценка типов исследуемых почв.....	39
3.3 Оценка фитопатогенного гриба по морфологическим признакам.....	42
3.4 Оценка измерения зон задержки видимого роста тестируемой культуры.....	44
3.5 Оценка устойчивости азотобактера	46

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	51
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	53

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наблюдается значительное распространение токсиногенных грибов, являющихся возбудителями болезней зерновых культур. Использование химических средств защиты растений несет за собой негативное влияние фунгицидов, которое со временем только приумножается, а также у фитопатогенных грибов приобретает устойчивость к данным веществам, что влечет за собой последующее увеличение концентрации препарата.

Фитопатогенные грибы, как известно, представляют собой основной источник возбудителя для культурных растений, который уничтожает до 40% потенциального урожая и может нанести непоправимый ущерб для сельскохозяйственных культур, так как грибы заражают их продуктами своей жизнедеятельности – микотоксинами. Именно поэтому важны поиск и разработка методов защиты, экологически безопасных для человека и микрофлоры почвы.

Установлено, что антагонистическими свойствами по отношению к обширному спектру фитопатогенных грибов, в свою очередь вызывающих болезни многих овощных, зерновых культур, являются некоторые представители бактерий рода *Azotobacter*. В связи с чем разработка биологических препаратов на основе штаммов *Azotobacter* и их практическое применения приобретают особую **актуальность** [11].

Azotobacter - это род свободноживущих или подвижных диязотрофных бактерий, которые имеют овальную или сферическую форму. Это аэробные и свободноживущие почвенные микроорганизмы, которые играют ключевую роль в фиксации азота, а также в качестве биоудобрения, фунгицида и индикатора питательных веществ. *Azotobacter* в основном встречается в щелочных почвах и водной среде, а также на растениях. Почва должна быть богата фосфором, чтобы способствовать процессу фиксации азота. Используемые биоудобрения на основе *Azotobacter* известны во всем мире.

Помимо того, что азотобактерии являются отличными биоудобрениями, они также используются для производства пищевых добавок и некоторых биополимеров, также было доказано, что бактерия стимулирует рост сельскохозяйственных культур на загрязненных почвах.

Один из методов защиты растений от патогенных организмов основан на использовании микроорганизмов, обладающих антагонистическим действием. На сегодняшний день проблема защиты растений от бактериальных и грибных заболеваний остается актуальной. Путем поиска высокоактивных штаммов азотобактера и изучение их взаимодействия с фитопатогенными грибами возможно найти пути ее разрешения. Актуально также изучение особенностей взаимодействия *Azotobacter* с фитопатогенными грибами, так как это направление исследований имеет большой потенциал для разработки новых экологических методов борьбы с фитопатогенами и увеличения устойчивости культурных растений.

Цель исследования: изучить особенности взаимодействия *Azotobacter* и фитопатогенных грибов.

Задачи исследования:

- дать экологическую и физиологическую характеристику бактерий рода *Azotobacter*;
- охарактеризовать морфологические свойства бактерий рода *Azotobacter*;
- изучить влияние *Azotobacter* на рост и развитие фитопатогенных грибов;
- оценить потенциал применения и использования *Azotobacter* при борьбе с фитопатогенными грибами.

Выпускная квалификационная работа написана на 57 листах, содержит 8 рисунков, 9 таблиц и список литературы на русском и английских языках из 42 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эколого-физиологическая характеристика бактерий рода *Azotobacter*

Azotobacter — это группа грамотрицательных и свободноживущих азотфиксирующих аэробных бактерий, которые как правило преимущественно обитают в почве. В основном они имеют овальную или сферическую форму и при неблагоприятных условиях окружающей среды образуют толстостенные цисты (ими являются спящие клетки, устойчивые к неблагоприятным условиям) [19].

Это несимбиотические бактерии, являющиеся гетеротрофами способными фиксировать в среднем 20 кг/га азота в год. Кроме того, они также производят вещества, способствующие росту растений. *Azotobacter* встречаются в почве, а также ризосфере многих растений, и их популяция колеблется в составе почвы в зависимости от физико-химических и микробиологических (межмикробных взаимодействий) свойств.

Azotobacter chroococcum является наиболее распространенным видом, другие описанные виды включают *A. agilis*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. insignis*, *A. macrocytogenes* и *A. paspali*.

У видов *Azotobacter* есть набор ферментов, необходимых для фиксации азота: ферредоксин, гидрогеназа и важный фермент нитрогеназа. Процесс азотфиксации требует поступления энергии в виде молекул, содержащих макроэргические связи — аденозинтрифосфата (АТФ). Процесс фиксации азота очень чувствителен к наличию кислорода, в связи с чем *Azotobacter* имеет специальный защитный механизм, который способен перевести кислород в обезвреженную форму, то есть приводит к интенсификации метаболизма, способствующей к снижению концентрации кислорода в клетках [8]. Нитрогеназа является наиболее важным ферментом в процессе азотфиксации. У бактерий вида *Azotobacter* обнаружено несколько типов нитрогеназ [2].

Биологическая азотфиксация (BNF) относится к микробиологическому процессу, основанному на ферментативном «нитрогеназном» преобразовании атмосферного азота (N_2) в аммоний, легко усваиваемый корнями. Микроорганизмы, фиксирующие N_2 , которые в совокупности называются «диазотрофами», способны биологически фиксировать N_2 в связи с корнями растений. N_2 -фиксирующие бактерии являются свободноживущими фиксаторами, которые очень разнообразны и широко распространены на пахотных землях во всем мире. Они представляют собой ключевой природный источник азота (N) в природных и сельскохозяйственных экосистемах, лишенных симбиотической N-фиксации. Подчеркнута важность видов *Azotobacter* как важных свободноживущих N_2 -фиксирующих бактерий и потенциального бактериального биоудобрения с доказанной эффективностью для питания растений и биологического плодородия почвы. Кроме того, описаны полезные свойства *Azotobacter*, способствующие развитию растений (например, эффективность использования питательных веществ, защита от фитопатогенов, биосинтез фитогормонов и т.д.) [17].

Известно, что эти бактерии используют атмосферный азот для синтеза клеточного белка, который минерализуется в почве, передавая культурным растениям значительную часть азота, доступного из почвенного источника. Азот является компонентом белка, нуклеиновых кислот и хлорофилла. Таким образом, поступление азота в растение будет влиять на количество образующегося белка, аминокислот, протоплазмы и хлорофилла.

Дефицит азота часто является одним из ключевых ограничивающих факторов для производства многочисленных видов сельскохозяйственных культур, так как азот является важным элементом, который включается в метаболизм растений.

Широко применяемым в качестве азотного удобрения для повышения урожайности сельскохозяйственных культур является использование биоудобрения. Перспективной альтернативой, которая позволит избежать или довести до минимума использование синтетических удобрений, может быть

использование бактерий, способных стимулировать рост растений и увеличить рост и урожайность многих видов, многие из которых имеют большое значение для будущего развития сельского хозяйства.

Исследования *Azotobacter chroococcum* в растениеводстве показали его важную роль в улучшении питания растений и повышении плодородия почвы [14]. Было обнаружено, что несколько уже известных штаммов *Azotobacter* способны продуцировать некоторые аминокислоты при выращивании в питательной среде с добавлением различных источников углерода и азота [18]. Вещества, вырабатываемые этими бактериями, участвуют в нескольких важных для растительного организма процессах, что приводит к стимуляции роста растений [3].

Влияние бактерий рода *Azotobacter* на продуктивность растений в основном включает заметное повышение всхожести семян, стимуляцию прорастания за счет внесения стимуляторов роста растений, что вызывает снижение примерно на 25% содержания химического фосфора и азота, что приводит к стимуляции роста сельскохозяйственных культур. Прямое стимулирующее воздействие на рост растений заключается в образовании и дальнейшем высвобождении зависимых метаболитов, аналогичных регуляторам роста, а также в улучшении усвоения питательных веществ корневой системой.

Azotobacter продуцирует различные элементы, способствующие росту растений, например, цитокинин, ауксин и гиббереллиновую кислоту, которые являются основными веществами для контроля роста растений путем улучшения накопления и содержания азота и массы растений. Эти гормональные компоненты ризосферы также влияют на рост развитых растений. Гормоны способствуют солюбилизации фосфатов, влияют на усвоение питательных веществ за счет повышения активности фосфатазы, усиливают усвоение воды и минералов, увеличивают выработку аминокислот и витаминов, биологически активных компонентов. Синтез растительных гормонов также связан с образованием внеклеточных соединений, таких как

рибофлавин, витамин В12, биотин, тиамин, пиридоксин, цианокобаламин, фолиевая кислота и пантотеновая кислота. Количество азотобактерий обычно невелико в необработанных почвах и в ризосфере культурных растений. Органические вещества из почвы и корневых выделений помогают азотобактериям питаться [22].

Несмотря на различные экспериментальные данные о свойствах биостимуляции *Azotobacter* в отношении общего роста растений, точный механизм действия, с помощью которого *Azotobacter* может усиливать рост растений, еще не до конца изучен. Однако основной способ действия, очевидно, включает BNF, учитывая способность этих бактерий фиксировать N₂, жизненно важный макроэлемент для роста растений. Более того, эти диазототрофы способны солубилизировать нерастворимые формы Р в почве. В других исследованиях были предложены другие способы действия, такие как выработка фитогормоноподобных веществ, которые изменяют рост и морфологию растений, и бактериальный механизм восстановления нитрата, который увеличивает накопление N в растениях, инокулированных штаммами *Azotobacter* [27].

Azotobacter chroococcum оказывает положительное влияние на плодородие почвы и питание растений, способствуя значительному поглощению таких важнейших для развития растений элементов, как азот и фосфор. Синтез и секреция биологически активных соединений, таких как гибберелловая кислота, витамин В, биотин, пантотеновая кислота, никотиновая кислота, приводили к ускорению роста корней растений. Секреция аммиака азотобактериями в ризосфере также важна для модификации поглощения питательных веществ растениями. Бактерии продуцировали полифенолоксидазы и фенолоксидазы, относящиеся к семейству мультимедных белков [30].

Для *Azotobacter* характерным является также образование цист, проявляющих высокую устойчивость по отношению к высыханию, а также способность развивать повышенную частоту дыхания, производить

внеклеточные полисахариды (альгинаты, леваны и целлюлозу) и накапливать полигидроксibuтират.

Образование цист происходит естественным путем в условиях неблагоприятных и экстремальных условий, таких как высокие или низкие температуры, заморозки, засоление и засуха. Образование цист также индуцируется в ответ на изменения концентрации питательных веществ в среде или добавление некоторых органических веществ, таких как этанол, н-бутан-1-ол или β -гидроксibuтират. На него также влияют альдегиддегидрогеназа и регулятор реакции AlgR. Эти морфологические изменения сопровождаются метаболическими сдвигами, изменениями в катаболизме, дыхании и биосинтезе макромолекул [42].

Цисты *Azotobacter* имеют сферическую форму и состоят из так называемого «центрального тела», уменьшенной копии вегетативных клеток с несколькими вакуолями и «двухслойной оболочкой». Внутренняя часть оболочки имеет волокнистую структуру, называемую интин, в то время как внешняя часть имеет гексагональную кристаллическую структуру, называемую экзин. В центральном теле всегда наблюдаются многочисленные гранулы полигидроксibuтирата, альгинат является основным компонентом капсулы, а алкилрезорцины (фенольный липид) и алкилпироны, которые синтезируются при индукции инцистментации, заменяют фосфолипиды мембран цист и являются компонентами экзина. Одной из основных особенностей цисты является ее способность противостоять высыханию, она способна выживать в сухой почве более 10 лет, тогда как вегетативные клетки, хранящиеся в тех же условиях, инактивировались менее чем за 2 года. В частности, они в два раза устойчивее к ультрафиолетовому излучению. Они также устойчивы к высушиванию, ультразвуку, гамма- и солнечному облучению, но не к нагреванию [10].

Azotobacter легко культивировать, благодаря чему их широко использовали при изучении фундаментальных биохимических процессов, например, транспорта электронов и хранения железа. Эти исследования

привели к фундаментальным достижениям в понимании физиологии, биохимии и генетики фиксации азота и метаболизма [36].

В дополнение к своему положительному влиянию на стимуляцию роста растений, бактерии рода *Azotobacter* также связаны с подавлением патогенных заболеваний растений.

В литературе присутствует несколько примеров, подтверждающих важность подавления болезней различными видами *Azotobacter*. Штамм TRA2 *A. chroococcum*, который является изолятом ризосферы пшеницы, показал сильную антагонистическую активность против грибов корневой гнили *Macrophomina phaseolina* и *Fusarium oxysporum* в дополнение к улучшению роста растений пшеницы, что могло быть связано с улучшением здоровья растений [28].

Азотобактер обеспечивает хорошую защиту растений, агрессивно заселяя корни пшеничных культур. Заболеваемость узловатой нематодой *Meloidogyne incognita* значительно снижается, когда применялся к растениям нута [31].

Очень важным свойством *Azotobacter* является то, что он вырабатывает бактериостатическое вещество, представляющее собой метиловый эфир алифатической тетраеновой кислоты, содержащий гидроксильную группу и В-метиловую группу. Обнаруженный антибиотик хлоромидин активен в отношении значительного числа фитопатогенных грибов. Благодаря описанным свойствам, при бактериализации азотобактерами в ризосфере подавляется развитие микроскопических грибов, многие из которых замедляют рост растений. Итак, культура *Az. Chroococcum* ослабляет ингибирующее действие фитотоксичного гриба *Alternaria* на кукурузу и стимулирует рост незараженных растений [25].

1.2 Особенности распространения *Azotobacter* в различных типах почв

В почвах на популяции *Azotobacter* могут оказывать влияние физико-химические (к примеру, различные органические вещества, pH, температура, глубина почвы и также её влажность) и микробиологические (межмикробные взаимодействия) свойства почвы. *Azotobacter* чувствителен к кислому pH, превышающие значения оптимума концентрации соли и повышенной температуре. В отношении физико-химических свойств почвы многочисленные исследования в основном сосредоточены на определении содержания питательных веществ (P, K, Ca) и органических веществ и их положительном воздействии на популяции бактерий рода *Azotobacter*.

Концентрации NaCl влияют на активность PGPR *Azotobacter*, в основном BNF в почве. Однако известно, что некоторые виды *Azotobacter* переносят концентрации соли до 10% NaCl. Например, было показано, что *Azotobacter salinestris* переносит концентрацию NaCl 8%, но общие значения КОЕ/мл были снижены по сравнению с более низкими концентрациями NaCl. Что касается температуры, *Azotobacter* является типичным мезофильным организмом, который процветает при оптимальной температуре 25-30° С для роста и физиологических свойств. Минимальная температура для роста *Azotobacter*, очевидно, находится на отметке немногим выше 0° С. Клетки *Azotobacter* не переносят высоких температур, хотя они могут выживать при 45-48 °С, образуя цисты, которые прорастают при благоприятных условиях. *A. salinestris* выжил при 45° С и зафиксировал оптимальную скорость роста при 35 ° С, рост замедлялся при повышении температуры выше 35° С.

Присутствие популяций *Azotobacter* в почвенных экосистемах контролируется уровнем pH. Как правило, более низкий уровень pH (<6,0) снижает популяцию азотобактерий, а в некоторых случаях полностью подавляет их рост. Кислые почвы обладают неблагоприятными свойствами бедных и физиологически активных питательных веществ и неудовлетворительным воздушно-водным режимом, так что

присутствие *Azotobacter* в этих почвах было очень низким или даже отсутствовало. Оптимальный уровень pH 7-7,5 благоприятен для физиологических функций *Azotobacter*. При этом значении pH численность популяции может составлять от 10^2 до 10^4 на грамм почвы. Между тем, *A. chroococcum* выживал при pH 9, и его рост не подавлялся при более высоких значениях pH, тогда как *A. salinestris* был чувствителен к pH выше 9, и выше этого диапазона роста не наблюдалось [4].

Представители *Azotobacter* обычно встречаются в почве, воде, донных отложениях и корнях растений. Виды *Azotobacter* обычно встречаются на почвах со слабой кислотностью или щелочью, что часто определяет появление определенных видов. Например, виды, относящиеся к *Azotobacter chroococcum* и *Azotobacter vinelandii*, более распространены в тропических почвах, в то время как виды *Azotobacter beijerinckii* часто регистрировались в кислых почвах. Однако было описано, что только *Azotobacter paspali* специфически ассоциируется с корнями растений *Paspalum notatum* cv *Batatais*.

Из ряда видов рода *Azotobacter* в почве обычно встречается *Azotobacter chroococcum*. Этот микроорганизм весьма требователен к условиям среды. Он развивается лишь в достаточно увлажненных почвах, имеющих значения pH близкие к нейтральной, также обеспеченных фосфором, калием и рядом других важнейших микроэлементов. Такая высокая селективность и строгость контроля выявляют причину ограниченного распространения азотобактера во многих почвах. В течение вегетационного периода в почвах, благоприятных для развития *Azotobacter chroococcum*, численность этого микроорганизма сильно колеблется и может снижаться до значений, которые не выявляются стандартными методами исследования [15].

При окультуривании подзолов условия для развития азотобактера улучшаются. В окультуренных огородных почвах азотобактер находится обычно в значительных количествах и легко обнаруживается любым методом.

Было отмечено, что в случае выделения культур азотобактера из кислых подзолистых почв, они скорее всего оказываются ослабленными, а иногда

обладают повышенной устойчивостью к кислотности почвы. В окультуренных почвах, как правило, обнаруживаются активные штаммы азотобактера [9].

В серых лесных почвах в летний период, при условии, что почва в достаточной степени увлажнена и установлен благоприятный температурный режим, количество азотобактера может иметь наибольшее количественное значение.

Светло-серые лесные почвы близки по свойствам к дерново-подзолистым, за счет чего выдвигаются предположения, что и степень распространения в них азотобактера также равна, темно-серые же почвы по органическому составу близки к оподзоленным и выщелоченным чернозёмам.

На почвах с высокой влажностью и пастбищной растительностью азотобактер обычно обнаруживается в течение всего вегетационного периода. К таким почвам относятся пойменные почвы с хорошей экологической реакцией и относительно высоким содержанием питательных веществ в подзолистой зоне. Болотно-низинные почвы нередко содержат азотобактер, но, вследствие неблагоприятного воздушно-водного режима, а также недостатка фосфора, кальция и микроэлементов этот микроорганизм здесь размножается слабо.

В низинных целинных торфяниках азотобактер обнаруживается редко, а в верховных не встречается совсем, в связи с их критически низким уровнем pH. Окультуривание торфяных почв улучшает условия для размножения азотобактерий, но некоторые торфа являются токсичными для них.

Чернозем характеризуется высокой активностью микробиологических процессов. Наиболее интенсивно они протекают весной и в начале лета, когда в почве хороший температурный режим и достаточное увлажнение. Это нейтральные или слабощелочные почвы с высоким содержанием солей кальция и магния. Черноземные почвы в более северных регионах содержат азотобактер в течение всего вегетационного периода. В обычной южной зоне черноземов этот микроорганизм не очень распространен, поскольку летом эти почвы не очень богаты органическими остатками. Азотобактер чаще всего

встречается в черноземных почвах, на лугах, в долинах рек. Наиболее благоприятными оказывается лучше, чем в оподзоленных.

В целинных и неполивных, окультуренных каштановых почвах данный микроорганизм встречается лишь весной, с наступлением засушливой погоды его обнаружение очень затрудняется. В целинных почвах сероземной зоны, а также в степных солонцах азотобактер развивается в основном как весенний эфемер. По мере возрастания засоленности почв данный микроорганизм встречается реже. Отмечается, что данный род бактерий является более чувствительным к содовому засолению и менее к сульфатному и хлоридному.

Высококультурные подзолистые почвы, сформировавшиеся на суглинке, имеют хороший водно-воздушный режим, слабокислую реакцию ($pH = 5,5$), что повышает активность полезной почвенной микрофлоры, в том числе азотистых бактерий.

В тропиках низкие значения pH наблюдаются в достаточно увлажненных почвах. В этих регионах азотобактер заменяется более кислотоустойчивой бактерией *Beijerinckia*. В хорошо заросших садовых почвах азотобактер обычно встречается в значительных количествах [13].

Таким образом, азотобактер может служить индикатором степени окультуренности почвы.

Исходя из вышесказанного, основными причинами ограничения развития азотобактерий в почве, могут быть следующие факторы:

- 1) кислотность почвы (низкий уровень pH);
- 2) обогащение почвы фосфором, а также некоторых имеющихся в ней микроэлементов и органических веществ;
- 3) степень увлажненности почвы.

Также следует отметить, что при повышении засоления почвы, число клеток азотобактерий заметно снижается.

1.3 Свойства бактерий рода *Azotobacter*

1.3.1 Морфологическая характеристика

Азотобактер является аэробным почвенным микроорганизм, который сочетает в себе морфологию палочек и кокков. Клетки молодых культур (до 2х суток культивирования) имеют форму палочек с закругленными концами, часто расположены попарно. Молодые клетки также обладают таким свойством, как подвижность, вследствие наличия на ее поверхности перитрихально расположенных жгутиков [33].

Прикрепление бактерий, а также их агрегация происходят благодаря наличию нитевидных структур – фимбрий. Размер клеток бывает разным – 2,0-7,0х1,0-2,5 мкм. В некоторых случаях длина клеток достигает 10-12 мкм. Размножение азотобактера происходит путем простого деления клеток с образованием поперечной перегородки, иногда наблюдается нитевидность. Внутри рода наблюдается характерное распределение клеток вида *Azotobacter* при его делении: клетки *Az. chroococcum* располагаются концентрически в начале деления, и чаще всего клетки объединяются по две. При дальнейшем делении образуются ряды радиально расположенных клеток, образуется расслоение образовавшихся колоний. В процессе старения они приобретают форму кокков и округляются. Клетки *Az. vinelandii* расположены радиально на ранних стадиях колонизации и сохраняют такое расположение на протяжении всего дальнейшего развития. Клетки *Az. agilis* выделяют большое количество слизи, благодаря чему колония имеет выпуклую структуру [41].

Содержание ДНК в клетках азотобактера значительно ниже, чем у других видов бактерий и находится в диапазоне 0,81-0,70%. У молодых клеток азотобактера плазма представляет собой мелкозернистую структуру. При старении клетки теряют подвижность, укорачиваются и приобретают почти кокковидную форму. В плазме появляются зерна, которые резко преломляют свет. Природа этих включений может оказаться различной: от жировых капель и волютина, до метакроматических включений и др.

В данный период клетки азотобактера покрываются толстой слизистой капсулой. Капсула содержит в своем составе вещество, которое состоит из полисахаридов и содержит примерно 0,023% азота. Ангидрид уреновой кислоты составляет до 75% слизи азотобактера. Данное слизиобразное вещество помогает бактериям быть относительно устойчивыми к воздействию других различных микроорганизмов. В старых культурах могут быть найдены гигантские клетки шаровидной формы, а также клетки очень мелких размеров (до 0,2 мкм в диаметре и мельче). При благоприятных условиях эти микроскопические клетки начинают развиваться и дают клетки нормальной величины. Такое разнообразие форм азотобактерий определяется в первую очередь полиморфизмом этой бактерии, а также зависит от состава среды. Азотобактерии образуют крупные слизистые, иногда сморщенные колонии на твердой питательной среде, не содержащей азотистых соединений. С возрастом эта колония микроорганизмов приобретает характерный цвет за счет образования пигментов [37].

Образование пигментов является одним из признаков для систематизации видов. Для *Az. agilis* и *Az. vinelandii* характерно образование растворимых в воде флуоресцирующих пигментов, имеющих желто-зеленый цвет. Клетки *Az. chroococcum* при взрослении колонии накапливают меланоидные нерастворимые в воде пигменты, окрашивающие клетки бактерий в цвет от буро-коричневого до черного [32].

1.3.2 Основные физиолого-биохимические свойства

Поскольку *Azotobacter* является анаэробным, гетеротрофным, фиксирующим азот организмом, он обладает семейством оксидаз для расщепления углерода и большим количеством органических соединений углерода, используемых в качестве источников энергии. Многие из этих ферментов являются конститутивными, но некоторые индуцируются специфическими углеродными субстратами.

Виды *Azotobacter* играют важную роль в поддержании N-статуса почвы. Предполагаемый вклад несимбиотических показателей BNF может варьироваться из-за нескольких факторов, включая изменчивость окружающей среды, методы управления и возделывания сельскохозяйственных культур, генотипические различия и технические аспекты, связанные с методами, используемыми для оценки BNF. Доля этих свободноживущих N₂-фиксирующих бактерий в поступлении азота в почву колеблется от 0,3 до 15 кг га⁻¹ год⁻¹, в других исследованиях сообщалось о 60 кг га⁻¹ год⁻¹ [35].

Этот процесс BNF в аэробных условиях является основной характеристикой рода, который чрезвычайно устойчив к кислороду во время фиксации N₂ благодаря защите дыхания нитрогеназой. Двухкомпонентные белки Mo-зависимой нитрогеназы называются железо (Fe)-белком или динитрогеназа-редуктазой. Эти два составляющих белка действуют совместно, катализируя снижение содержания азота в сложной реакции с идеальной стехиометрией реакции, показанной следующим образом (1):



Fe-белок представляет собой гомодимер, который содержит два сайта связывания нуклеотидов (MgATP или MgADP), по одному на каждой субъединице и одиночный кластер 4Fe–4S, соединяющий две субъединицы. MoFe-нитрогеназа представляет собой α, β гетеротетрамер. Каждая α, β-димерная единица содержит два уникальных металлокластера: P-кластер (8Fe–7S) и FeMo-кофактор (FeMo-co). Во время каталитического цикла Fe-белок связывается с одной αβ-единицей MoFe-белка. Во время этого взаимодействия один электрон переносится из кластера 4Fe–4S в белок MoFe. Эта стадия переноса электронов связана с гидролизом как минимум двух молекул MgATP. После переноса электронов и гидролиза АТФ белок Fe отделяется от белка MoFe, и на его месте связывается новый белок Fe, повторяя цикл. Учитывая, что за цикл переносится только один электрон, для снижения N должно произойти минимум восемь встреч, как показано в уравнении

1. Основные и второстепенные кластеры генов, кодирующих ферменты нитрогеназного комплекса, были тщательно изучены у *A. vinelandii* [34].

Это энергозатратный процесс, требующий химической энергии в виде энергии фосфодиэфирных и макроэргических связей из АТФ. Тем не менее, этот процесс остается менее энергозатратным и экологически безопасным по сравнению с промышленной фиксацией Азота с помощью энергоемкого метода Хабера-Боша или геохимических процессов, таких как воздействие молнии.

Кроме того, вид *Azotobacter* можно рассматривать как эволюционирующую бактерию, поскольку в дополнение к использованию классического Мо-содержащего фермента для BNF, виды *Azotobacter* способны синтезировать одну или несколько альтернативных нитрогеназ в условиях недостатка молибдена. Например, было обнаружено, что *A. Vinelandii* кодирует три различных фермента нитрогеназы с различными структурными подразделениями: 1) традиционный Мо-содержащий фермент для получения молибдена, 2) нитрогеназа ванадийсодержащий фермент (нитрогеназа-2, кодируемая генами *vnf-H*, *vnf-D*, *G*, *K*) и 3) железосодержащая нитрогеназа (нитрогеназа-3, кодируемая кластером генов *H*, *D*, *G*, *K*).

Понимание механизмов, используемых видами *Azotobacter* для достижения аэробного BNF, может быть неотъемлемой частью определения того, как перенести этот процесс в наземные бактерии, ткани наземных растений или лучше использовать этот процесс в листовых эндофитах или других эндофитах, связанных с наземными фотосинтетическими тканями растений [27].

Помимо N, P является основным питательным веществом, которое играет важную роль в физиологии и биохимии растений, а также в физиологии микроорганизмов, таких как BNF. Почвы обычно содержат большое количество общего фосфора в различных доступных формах, включая нерастворимые формы, такие как трикальций P (Ca_3PO_4)₂, алюминий P

(Al_3PO_4) и железо Р (Fe_3PO_4). К сожалению, по сравнению с другими основными питательными веществами, Р на сегодняшний день является наименее мобильным и доступным питательным веществом для растений в большинстве почв, даже если общее содержание Р в почве значительно превышает потребности растений (400-1200 мг / кг). Низкая подвижность почвенного Р обусловлена высокой реакционной способностью ионов Р со многими компонентами почвы, при этом для роста растений доступна лишь небольшая доля малого количества Р ($<1 \text{ мг / кг}^{-1}$) [40].

Однако эти формы могут быть преобразованы в растворимый фосфор микроорганизмами, солюбилизирующими фосфаты в почве (PSM). Сообщалось, что многочисленная почвенная микрофлора солюбилизирует нерастворимые комплексы Р в растворимые формы, легко усваиваемые растениями. Среди фосфатсолюбилизирующих бактерий (PSB) наиболее распространены *Bacillus* и *Pseudomonas*, а также некоторые виды *Azotobacter*, также известные своей способностью к Р-солюбилизации. Механизм солюбилизации нерастворимого Р остается предметом исследований. Солюбилизация Р с помощью низкомолекулярных органических кислот была хорошо изученной и широко принятой теорией, являющейся основным механизмом солюбилизации, и различные исследования идентифицировали и количественно определили органические кислоты и определили их роль в солюбилизации. Этот процесс включает подкисление микробных клеток и их окружения, что приводит к высвобождению Р-ионов из Р-минерала путем замещения кальция H^+ . Однако эффективность процесса солюбилизации Р зависит от типа и количества высвобождаемых органических кислот, при условии, что качество высвобождаемых органических кислот более важно, чем общее количество кислот. Другие исследования показали, что солюбилизация Р может осуществляться другими механизмами, помимо высвобождения органических кислот [23].

Другим важным аспектом является взаимосвязь между уровнем BNF и доступностью питательных веществ в почве (особенно Р). Хорошо известно, что BNF часто ограничивается низкой доступностью Р в почвах, однако не было обнаружено исключительного ограничения Р ни на одном из своих экспериментальных участков, где BNF, по-видимому, ограничен только Мо в почвах, богатых Р, и совместно ограничен как молибденом, так и Р в почвах, бедных Р. Другое исследование показало, что ограничение BNF Р и Мо является динамическим процессом. Р, вероятно, может ограничивать BNF на ранней стадии вегетационного периода, в то время как Мо является лимитирующим фактором в середине сезона [29].

1.4 Особенности взаимодействия азотобактера с растениями и фитопатогенными грибами

Помимо BNF, благотворное воздействие *Azotobacter* на рост растений также объясняется улучшением развития корней, увеличением скорости усвоения минералов корнями, а также их антагонизмом к грибам и патогенным бактериям растений. *Azotobacter* синтезирует и выделяет значительные количества биологически активных веществ, таких как витамины группы В, никотиновая кислота, пантотеновая кислота, биотин, гетероксины и гиббереллин, которые усиливают рост корней растений. Солюбилизация неорганического и органического фосфора штаммами *Azotobacter* является еще одним стимулирующим рост признаком, который характерен для эффективного скрининга свободноживущих N₂-фиксирующих бактерий [26].

Еще одним свойством, стимулирующим рост растений, демонстрируемым видами *Azotobacter*, является выработка ауксина (IAA). Это фундаментальный фитогормон, который модулирует рост и развитие растений. Этот фитогормон способствует образованию более длинных корней и увеличивает количество корневых волосков и боковых корешков, которые участвуют в усвоении питательных веществ. Он играет центральную роль в

делении клеток, удлинении, развитии плодов и старении. Ауксин инициирует образование корней, листьев и цветков. В нескольких работах было высказано предположение, что виды *Azotobacter* могут способствовать росту растений за счет синтеза этого фитогормона, а не N-фиксации.

Помимо выработки этих веществ, некоторые штаммы *Azotobacter* (такие как *Atropicalis tropicalis*, *Azorhizophilus paspali* и *A. vinelandii*) характеризуются способностью синтезировать противогрибковые вещества, которые подавляют развитие некоторых фитопатогенных видов, таких как *Helminthosporium* sp., *Macrophomina* sp. И *Fusarium* sp.. Исследователи продемонстрировали, что использование смеси *Azotobacter*, *Azospirillum* и *Klebsiella* значительно снижало рост мицелия некоторых патогенных грибов, таких как *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* и *Fusarium solani*. Кроме того, было охарактеризовано, что изоляты *A. vinelandii* обладают способностью продуцировать полисахариды, такие как альгинат, в количестве от 4,88 до 5,26 г/л. Производство цианистого водорода (HCN) и сидерофоров также было охарактеризовано для видов *Azotobacter* [41].

Солюбилизация калия (K) и цинка (Zn) являются частью важного потенциала того, как *Azotobacter* может способствовать росту растений. Ученые продемонстрировали способность почвенных бактерий *A. chroococcum* повышать биодоступность Zn в почвенной системе. В этом процессе задействованы различные механизмы, включая подкисление. Эти микробы продуцируют в почве органические кислоты, которые связывают катионы Zn и снижают pH близлежащей почвы. Другие механизмы, возможно вовлеченные в солюбилизацию Zn, включают продуцирование *A. chroococcum* нового семейства сидерофоров, например вибриоферрина, амфибактинов и крохелинов, которые могут связывать железо гексадентатным способом с использованием новой γ -аминокислоты, хелатирующей железо. Такие сидерофоры помогают бактериям получать доступ к ресурсам железа, но также способствуют борьбе с патогенами растений в почве.

Способность видов *Azotobacter* солюбилизировать К была доказана в нескольких работах. В других работах предполагалось, что виды *Azotobacter* могут не только солюбилизировать К, но и играть важную роль в улучшении усвоения К растениями [38].

Фермент 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (АСС) дезаминаза также является ключевым признаком, продуцируемым *Azotobacter*. Организмы, продуцирующие АСС дезаминазу, снижают уровень этилена в растениях, который при наличии в высоких концентрациях может привести к торможению роста растений или даже гибели. Этот фермент отвечает за расщепление растительного предшественника этилена, АСС, до аммиака и -кетобутирата путем снижения уровня АСС в растениях.

Многие штаммы *Azotobacter* продуцируют пигменты, которые участвуют в метаболизме других микроорганизмов. Например, *A. chroococcum* образует темно-коричневый водорастворимый пигмент меланин, который метаболизируется на высоком уровне во время BNF. Считается, что этот процесс защищает нитрогеназную систему от воздействия кислорода. Эффективность использования питательных веществ может быть повышена в ответ на инокуляцию *Azotobacter* [24].

Важность *Azotobacter* в качестве микробного инокулянта убедительно доказана в ходе различных экспериментов и большого количества полевых испытаний. Исследователи показали в своем обзоре, что использование *Azotobacter* в качестве N-биоудобрения увеличивало рост и урожайность различных сельскохозяйственных культур в полевых условиях с процентным увеличением до 40% для цветной капусты и на 15-20% для кукурузы по сравнению с обычными удобрениями. Эти благоприятные эффекты можно объяснить биосинтезом биологически активных веществ, стимуляцией ризосферных микроорганизмов, выработкой фитопатогенных ингибиторов и улучшением доступности питательных веществ N, P, углерода и серы за счет BNF и минерализации органических остатков в почве [36].

В многочисленных исследованиях описывалась реакция сельскохозяйственных культур на инокуляцию *Azotobacter* в тепличных и полевых условиях. Реакция растений варьировалась при увеличении скорости прорастания семян, развития корней, увеличения поглощения питательных веществ, биомассы корней и побегов, количества и площади листьев. Также сообщалось о таких показателях качества, как содержание белка, общее количество растворимых сухих веществ в плодах и стабильность плодов после сбора урожая. Другие исследования также продемонстрировали, что использование видов *Azotobacter* либо отдельно в качестве биоудобрения, либо в комбинации с другими полезными видами, такими как PSB и *Azosprillum*, улучшает урожайность и качество различных культур.

Виды *Azotobacter* продуцируют фитогормоны, такие как ауксины, цитокинины, гиббереллиновая кислота, индолуксусная кислота и такие вещества, как тионин, рибофлавин, никотин, гибералин и др., которые стимулируют развитие корней и рост растений, помогают в защите от фитопатогенов и улучшает усвоение питательных веществ [28].

Кроме того, *Azotobacter* продуцирует противогрибковое соединение, которое защищает растение от различных почвенных заболеваний, вызываемых различными грибами, такими как *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Curvularia* и др. *Azotobacter* продуцирует несколько типов противогрибковых соединений, таких как азотобактин, азотохелин, аминокхелин, HCN, тестин, вискозинамид, цвиттермицин А и т.д. 2,4-DAPG является одним из эффективных антибиотиков, которые хорошо действуют против различных патогенов и обладают противогрибковыми, противоглистными и антибактериальными свойствами. *Azotobacter* обладает широким потенциалом в качестве антибиотика, который может быть использован в сельском хозяйстве и различных отраслях пищевой промышленности в качестве средства биоконтроля в качестве альтернативы химическим веществам [21].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Объекты исследования

Объектом исследования являлись бактерии *Azotobacter chroococcum*, выделенные из почв, отобранных в Ботаническом саду имени И.И. Спрыгина г. Пенза. Пробы отбирались с различных участков, имеющих различия по влажности и типу почв, наличию почвенных микроорганизмов и произрастающих на ней растений, а также имеющих отличный друг от друга минеральный состав и рН. Большая выборка позволяет выявить тип почвы с наиболее активным штаммом микроорганизмов, который и будет в дальнейшем использован для проведения исследования.

В процессе работы было отобрано 13 образцов почвы с различных участков ботанического сада (рис. 1).



Рисунок 1. План-схема ботанического сада имени И. И. Спрыгина в г. Пенза

Отбор почв осуществлялся согласно ГОСТ 17.4.4.01-83 «Общие требования к отбору проб почвы», ГОСТ 17.4.4.02-84 «Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа» [6].

В качестве второго объекта исследования были выбраны фитопатогенные грибы, которые были собраны с образца испорченной тыквы. Культивирование проходило на среде МПА, содержащей необходимые питательные элементы и азот, для лучшего роста и развития гриба.

Грибы – это эукариоты, вегетативное тело которых организовано в виде мицелия, а также может быть представлена грибницей – сплетением тонких ветвящихся нитей (гиф).

Объект был рассмотрен под микроскопом при малом и большом увеличении с помощью метода раздавленной капли.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Отбор почвенных образцов

Для проведения бактериологического анализа пробы почв отбирались с соблюдением асептических правил, с целью предотвращения вторичного загрязнения образцов. В процессе отбора использовались стерильные инструменты, гомогенизация происходила на стерильных поверхностях с последующим перемещением в стерильную тару. Каждой пробе был присвоен номер, писалась подробная этикетка, несущая информацию о дате и месте взятия образца, а также вид растения, произрастающего на данном типе почвы.

Хранение почв происходило в холодильнике, с установленной температурой от 4 до 5° С не более 24 часов, если проведение анализа в течении одного дня было затруднено.

Подготовка проб почв для проведения анализа проводилась в лаборатории: рассыпалась на стерильную поверхность и гомогенизировалась стерильным пестиком при наличии крупных комков. Инородные включения,

находящиеся в пробе почв выбирались пинцетом – это все возможные камни, стекла, корни растений и др. Почва растиралась в стерильной ступке и просеивалась в дальнейшем через стерильное сито с диаметром отверстий 3 мм, накрытое стерильной бумагой.

2.2.2 Питательные среды и выделение чистых культур микроорганизмов

Для выращивания культур различных штаммов *Azotobacter* мы использовали агаризованную питательную среду Эшби, она имела следующий состав, представленный в таблице 1.

Таблица 1 – Состав питательной среды Эшби

Сахароза	20,0 г
K ₂ HPO ₄	0,2 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 г
NaCl	0,2 г
KH ₂ PO ₄	0,1 г
CaCO ₃	5,0 г
агар–агар	20,0 г
вода дистиллированная	1000 мл

Для выделения накопительной культуры мы стерилизовали приготовленную среду и разливали в стерильные чашки Петри. Дистиллированной водой увлажняли небольшое количество почвы до пастообразного состояния и затем растирали пестиком. По специальному трафарету 1х1см располагали с помощью бактериологической петли на поверхности агаризованной среды Эшби небольшие комочки приготовленной почвы. На одну чашку размещали 30-40 комочков почвы, после чего помещали во влажную камеру и далее ставили в термостат при 28-30 С° на 6-8 суток.

Для культивирования фитопатогенных грибов использовалась среда – МПА, которая имела состав, представленный в таблице 2.

Таблица 2 – Состав среды МПА

Пептон	10 г
NaCl	5 г
Вода мясная	1000 мл
Агар-агар	20 г
pH	7,3-7,5

Смесь кипятили на слабом огне, постоянно помешивая до полного растворения добавленных компонентов. Бульон фильтровали и устанавливали pH, затем добавляли агар-агар. После добавления агара кипятили среду на слабом огне при постоянном помешивании до его полного растворения. Приготовленную среду разливали в пробирки или флаконы и стерилизовали в автоклаве при 121° С, в течении 20 минут. Готовую среду разливали в чашки Петри в количестве 3 штук, для последующего засеивания в них фитопатогенного гриба.

Стерилизация данных питательных сред производилась с помощью автоклава «Tuttnauer 2540 ML». Последующие посевы культур производились в микробиологическом стерильном боксе «БМБ-II-«Ламинар – С» - 1.2. Инкубация последующих посевов производилась с помощью суховоздушного термостата «ТВ – 20 –ПЗ – К».

2.2.3 Микроскопирование

Далее проводили микроскопирование и получение чистой культуры азотобактера. Были приготовлены фиксированные окрашенные препараты, с использованием иммерсионной системы.

Колонии рассматривались под микроскопом при различных увеличениях (x10; x40; x100).

Для более детального исследования строения клеток готовился фиксированный и окрашенный препарат. Делался мазок бактериального препарата на чистом обезжиренном стекле с последующей фиксацией и окрашиванием. На подготовленное стекло наносилась капля суспензии, содержащая бактериальные клетки и делался тонкий мазок на поверхности стекла стерильной бактериологической петлей или краем покровного стекла, после чего производилась сушка при комнатной температуре или над пламенем спиртовки для уменьшения времени высыхания.

Микроскопирование фитопатогенного гриба для морфологического исследования производилось с помощью метода «раздавленная капля», микроскопировался препарат при большом увеличении с иммерсионным объективом (x100). Препарат с фитопатогеном описывался по следующим признакам, характерным для плесневых грибов: строению мицелия, так как это является основой их вегетативного тела и выглядит как комплекс ветвящихся тонких нитей (гиф).

2.2.4 Выделение штаммов азотобактера

Выделение штаммов азотобактера из 13 образцов почв являлось первым этапом данной работы. На среду Эшби помещали комочки грунта и помещали в термостат в течение 4 суток при 35° С. Вывод о появлении культуры делали на основании появления слизистого обрастания вокруг комочков почвы, что представлено на рисунке 3.

Активность роста бактерий *Azotobacter* оценивали по размерам колоний на 5 день культивирования, результаты определения размеров колоний (в мм) на 4, 7 и 10 день.

Чтобы колонии хорошо развивались в чашках Петри, были созданы оптимальные условия по температуре и влажности, дабы избежать высыхания, так как это могло привести к остановке роста азотобактерий. Для этого были

использованы диски фильтровальной бумаги, подходящие по диаметру к крышкам всех чашек Петри, они смачивались дистиллированной водой и помещались на внутреннюю часть крышек и смачивались ежедневно. Это помогало избежать дегидратацию микроорганизмов, вследствие чего и могло наступить замедление или прекращение всех процессов метаболизма.

После созревания накопительной культуры был произведен контроль качества культуры путем микроскопирования мазка с окраской тушью. Под микроскопом азотобактерии имели сферическую форму и располагались одиночно и/или попарно. В микроскопическом препарате клетки находились рассредоточено, не образуя цепочек. Выделенные штаммы на основе морфологических признаков: окраска, размер, форма, мы отнесли к виду почвенных микроорганизмов - *Azotobacter chroocum*, что представлено на рисунке 2.

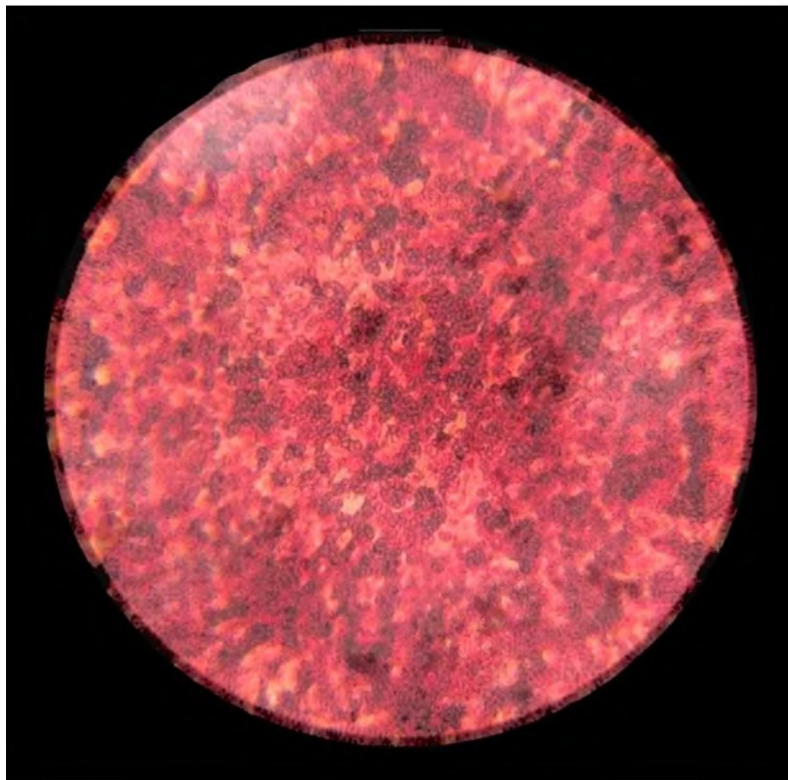


Рисунок 2. Фиксированный препарат *Azotobacter chroocum*

2.2.5 Культивирование фитопатогенных грибов

Культура микромицета была использована для оценки фунгицидной активности выделенной нами культуры азотобактера. Культура была выделена из природной среды – плод тыквы. Для выращивания культуры была использована среда МПА, так как она содержит все необходимые источники питательных веществ для микромицетов: азот, витамины, минеральные соли и аминокислоты.

С образца тыквы с зараженным участком производился забор образца фитопатогена, который затем суспендировали встряхиванием в дистиллированной стерильной воде в соотношении 1:100. Полученная эмульсия, содержащая плесневый гриб, в объеме 2-3мл была помещена в чашку Петри стерильной пипеткой и с помощью шпателя равномерно распределена по всей площади. Культуру выращивали 5-7 суток.

2.2.6 Метод агаровых блоков

Метод агаровых блоков часто применяется при изучении антагонистических свойств микроорганизмов. Его преимуществом является возможность культивирования микроорганизмов-антагонистов и тест-культур на разных по составу плотных питательных средах. Исследуемый на антагонистическую активность микроорганизм, в нашем случае азотобактер, засевают на поверхность агаризованной среды в чашке Петри так, чтобы в процессе роста сформировался сплошной газон. Бактериологической петлей переносили объект в 1 мл стерильной воды, распределяя по 0,1–0,2 мл этих суспензий шпателем по всей поверхности среды в чашках. Посевы инкубировали при подходящей температуре 4-7 суток.

Затем стерильным пробочным сверлом (диаметр 6–8 мм) из слоя среды, засеянной плесневым грибом, вырезают агаровые блоки и переносят их на поверхность агаризованной среды, только что засеянной тест-

организмом(азотобактер). Тест-организм в виде суточной культуры засеивали шпателем на поверхность плотной среды (метод Коха).

Агаровые блоки размещали ростом (газоном) вверх, на равном удалении друг от друга и от краев чашки, плотно прижимая к агаровой пластинке. На агаровой пластинке в одной чашке Петри разместили 4–5 агаровых блоков с выделенным ранее фитопатогенным грибом.

Если тест-культура чувствительна к антимикробному веществу, которое продуцирует микроб-антагонист в составе агарового блока, то после инкубирования вокруг этого блока должна сформироваться зона задержки (ингибирования, отсутствия) роста. Чем больше выделяется антимикробного вещества и чем оно активнее, тем будет больше ширина зоны задержки роста тест-организма. В случае если тест-культура окажется не чувствительна к антимикробному веществу данного продуцента, она будет расти в непосредственной близости от агарового блока продуцента.

С помощью данного метода мы сможем проверить влияние азотобактера на фитопатогенные грибы. Опыт делался в трех повторностях, после того как на засеянную азотобактером поверхность помещали блоки с фитопатогеном и выдерживали их в термостате в течение 18-24 часов при температуре 37° С.

По диаметру зон задержки роста азотобактера судили об антагонистических свойствах данной культуры к выделенному фитопатогену.

Для оценки антагонистических свойств сначала мы выделили чистую культуру азотобактера. Работа проводилась в ламинарном боксе при соблюдении всех правил асептики. После того как накопительная культура созрела, были произведены посевы стерильной микробиологической петлей на косой агар в пробирки, содержащие плотную питательную среду Эшби. Выделенная чистая культура использовалась в дальнейшем для эксперимента при засеивании микроорганизмов «газоном» в чашках Петри.

Выделенная чистая культура переносилась микробиологической петлей на стерильную среду Эшби в чашке Петри и с помощью шпателя производилось распределение культуры равномерно по всей площади среды.

Далее сверлом или в нашем случае стерильным горлышком пробирки вырезали по 4-5 агаровых диска из чашки Петри, в которой находился, выращенный «газоном» фитопатогенный гриб. Подготовленные блоки были размещены на равные друг от друга расстояния на среде Эшби, содержащей культуру азотобактера. Был обеспечен плотный контакт между блоками с фитопатогеном и исследуемыми микроорганизмами, для лучшего их взаимодействия и скорейшего проявления видимого эффекта в зоне блоков. Опыт был проведен в трех повторностях. После заложения блоков на культуру, чашки Петри были убраны в термостат для инкубации в течении 3 суток при температуре 37° С.

После того, как прошло время термостатирования культуры были визуальны исследованы на предмет наличия или отсутствия зон задержки роста вокруг блоков с фитопатогеном. Результаты учитывали путем измерения диаметра зоны отсутствия роста культуры азотобактера вокруг блоков в миллиметрах.

2.2.7 Метод последовательного разведения

Инокулянт с культурой микроорганизмов в различных концентрациях готовился по способу последовательного разведения. Разбавляли порционную культуру путем последовательного разведения 1:10, перенося 1 мл предыдущего разведения в последующую пробирку, содержащую 9 мл стерильной дистиллированной воды, что показано на рисунке 3.

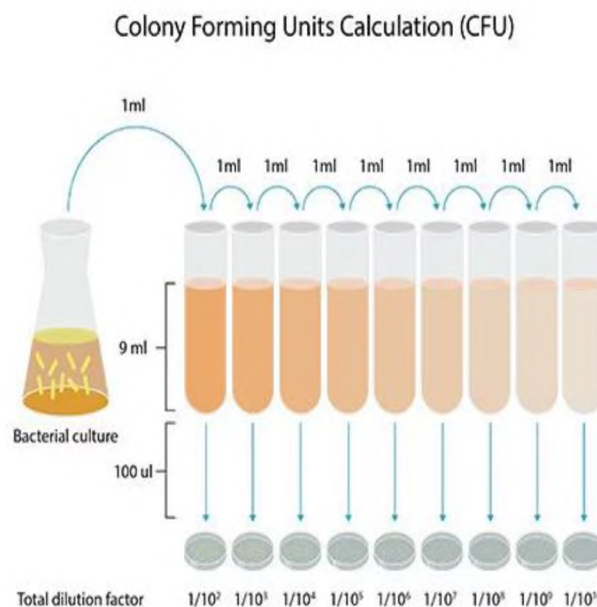


Рисунок 3. Способ последовательного разведения

Для эксперимента были выбраны 3 концентрации азотобактера: 10^{-2} КОЕ; 10^{-5} КОЕ; 10^{-9} КОЕ.

Семена были разделены на 4 группы: 1 группа – контроль (семена замачивались в воде); 2 группа – зараженные (семена замачивали в экстракте гриба *Penicillium*); 3 группа – семена, замоченные в инокулянте азотобактера в трех разных концентрациях; 4 группа – семена, замоченные в экстракте гриба *Penicillium*, а затем обработанные культурой микроорганизмов азотобактера в различных концентрациях. Все опыты проводились в трех повторностях.

В стерильные чашки Петри помещали 2 слоя фильтровальной бумаги, смоченной дистиллированной водой, сверху размещали 3 предметных стекла, обернутых фильтровальной бумагой, на которые выкладывали семена. В чашку №1 выкладывались семена из контрольной группы, которые являлись стерильными (обработаны дистиллированной водой); в чашку №2 – обработанные культурой азотобактера, в концентрации 10^{-2} КОЕ; в чашке №3 – концентрация 10^{-5} КОЕ; в чашке №4 – концентрация 10^{-9} КОЕ; в чашке №5 семена были замочены в эмульсии плесневого гриба; в чашках №6, 7, 8 – семена обрабатывались сначала плесневым грибом, а затем инокулянтом

азотобактера в соответствующих концентрациях. Далее чашки Петри были помещены в термостат при температуре 25° С и были выдержаны там в течение 7 суток. Измерение проводили на 3, 5 и 7 сутки. Измерялась длина корешков и побегов семян каждой группы, также была взвешена общая масса семян для каждой исследуемой группы.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Учет размера колоний *Azotobacter* и оценка морфологических характеристик

О наличии азотобактера судят по образованию характерных колоний вокруг комочков почвы, что показано на рисунке 4.



Рисунок 4. Накопительная культура *Azotobacter* на среде Эшби

Колонии рассматривали, описывали, готовили из них мазки для микроскопирования морфологии клеток. На агаризованных средах *Az. chroococcum* растет в виде бесцветных (в молодом возрасте) густослизистых капель, которые по мере старения приобретают бурый, темно-коричневый или черный цвет. *Az. vinelandii* образует колонии желтовато-зеленого цвета. Пигмент, выделяемый им, проникает в питательную среду. Для *Az. agilis* характерны бесцветные колонии в любом возрасте. Морфология клеток азотобактера специфична, что позволяет отличать его от клеток других организмов. Молодые клетки имеют форму крупных палочек (3-6 мкм)

одинокими или сцепленными попарно, с округлыми концами. Подвижны. С возрастом они превращаются в крупные кокки от 9 до 4 мкм в диаметре), напоминающие восьмерки (в случае попарного сцепления). Кокковидные клетки обычно покрываются капсулой, теряют подвижность, начинают выделять пигмент. Для каждого из образцов по отношению комочков почвы, которые обросли, к общему числу комочков в чашке Петри определялась обеспеченность почвы азотобактером [12].

Микроскопия культур показала, что морфология клеток азотобактера позволяет легко отличать его от клеток других организмов, так как имеет специфичную форму клеток. Молодые клетки могут иметь форму крупных палочек с округлыми концами, которые могут располагаться одиночно или сцеплены попарно. Клетки подвижны и с возрастом превращаются в крупные кокки, достигающих в диаметре 4-9 мкм и напоминающие в случае попарного сцепления восьмерки. Шаровидные клетки обычно теряют подвижность и покрываются капсулой, а также могут начать выделять пигмент.

Бактериальные колонии описывали, обращая внимание на такие признаки, как размер колонии (крупная - 10мм в диаметре; средняя – 1-10мм; мелкая – до 1 мм); профиль колонии (выпуклая, конусоидная, плоская, кратерообразная); край колонии (ровный, лопастной, волнистый, зубчатый, бахромчатый, фестончатый); поверхность колонии (гладкая, бугристая, складчатая, морщинистая, радиально исчерченная); цвет; блеск; прозрачность и консистенция (густая, слизистая, тягучая, жидкая, клейкая); вид колонии под микроскопом (исчерченность, однородность, зернистость).

Активность роста бактерий *Azotobacter* оценивали по размерам колоний на 5 день культивирования, результаты определения размеров колоний (в мм) на 4, 7 и 10 день представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Учет размера колоний *Azotobacter* на 4, 7 и 10 дни (мм)

Номер образца	День 4			День 7			День 10		
	Повторность			Повторность			Повторность		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	1	3	1	1	3	1	1	3	1
2	1	1	1	2	2	2	3	2	3
3	1	1	1	1	3	1	1	5	1
4	3	1	1	5	4,5	2	4	4	4
5	1	1	1	2	2	2	0	0	0
6	3	3	3	5	5	5	5	5	5
7	1	1	1	1	2	4	3	2	6
8	2	2	2	4	4	4	0	0	7
9	1	1	1	3	3	3	7	0	0
10	1	1	2	2	2	4	6	0	7,5
11	4	4	4	4	4	4	0	0	0
12	5	5	5	6	6	6	7,5	6	6
13	5	5	5	7	7	7	7	7	7

После 4 дня со дня посева, размеры колоний увеличились. Образовавшиеся колонии имели выпуклую форму; слизистую консистенцию, тянущуюся за микробиологической петлей; цвет прозрачный белесый, слегка желтоватый в некоторых образцах; форма выпуклая, за счет обильного количества слизи. Дисперсионный анализ размера колоний *Azotobacteria* представлен в таблице 4.

Таблица 4 – Двухфакторный дисперсионный анализ размера колоний *Azotobacteria*

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Выборка	35,38	2	17,69	9,53	0,00019	3,11

Продолжение таблицы 4

Столбцы	280,31	12	23,36	12,58	8,333E-14	1,88
Взаимодействие	78,11	24	3,25	1,75	0,03	1,66
Внутри	144,83	78	1,86			
Итого	538,64	116				

Проверка значимости результатов дисперсионного анализа размеров колоний на 4, 7 и 10 день показывает, что нулевая гипотеза отвергается и влияние исследуемого фактора можно считать доказанным, так как Р-Значение $< 0,05$, а критерий Фишера значим. Таким образом, имеются статистически значимые существенные различия и между образцами, и по срокам роста азотобактера. Кроме того, имеется некоторая зависимость между образцами и динамикой роста колоний.

3.2 Оценка типов исследуемых почв

Для работы было отобрано 13 образцов почв с территории ботанического сада. Более детальное описание типов почв, рельефа и растительности на данных участках представлено в таблице 5.

Таблица 5 – Описание типов почв, с которых происходил сбор образцов

Шифр	Расшифровка данных	Глубина взятия пробы (без учета верхнего слоя)	Название места сбора	Описание рельефа, растительности и т.д.	Дата забора образца	Координаты места разреза
1.1 (1.2; 1.3)	Орляк обыкновенный	10-15 см	Ботанически й сад им. И.И. Спрыгина при ПГУ им. В.Г. Белинского	Данные виды растений произрастают на коллекционно-систематическом участке ботанического сада. Соответственно каждая проба почвы будет отличаться по своим свойствам в зависимости от того какое растение произрастало конкретно в данном месте. Основными видами почв выделенных на данной территории являются: супесчаная, суглинистая, торфяна, песчано-перегнойная; песчаная, кислые и умеренно влажные супесчаные нейтральные почвы.	26.10.2023	53.187782, 45.004892
2.1 (2.2; 2.3)	Хвощ зимующий	10-15 см				
3.1 (3.2; 3.3)	Гвоздика песчаная	10-15 см				
4.1 (4.2; 4.3)	Ирис безлистный	10-15 см				
5.1 (5.2; 5.3)	Чемерица чёрная	10-15 см				
6.1 (6.2; 6.3)	Тысячелистник таволговый	10-15 см				
7.1 (7.2; 7.3)	Тысячелистник	10-15 см				
8.1 (8.2; 8.3)	Ковыль узколистный	10-15 см				
9.1 (9.2; 9.3)	Овсяница луговая	10-15 см				

Продолжение таблицы 5

10.1 (10.2; 10.3)	Чубушник венечный	10-15 см	Ботанический сад им. И.И. Спрыгина при ПГУ им. В.Г. Белинского	Цветочно-декоративный участок. Увлажненные, плодородные, нейтральные или слабокислые почвы с хорошо дренированной почвой. Также предпочтительны питательные удобрения.	26.10.2023	53.186945, 45.003629
12.1 (12.2; 12.3)	Львиный зев большой смесь сортов;(Живокос ть высокая)	10-15 см				53.186763, 45.003783
13.1 (13.2; 13.3)	Амарант метельчатый	10-15 см				
15.1 (15.2; 15.3)	Бамбук	5-10 см		Оранжерея		53.187011, 45.004503

3.3 Оценка фитопатогенного гриба по морфологическим признакам

Объект был отнесен по морфологическим признакам к Аскомицетам, род *Penicillium*, который по-другому еще называют плесневым грибом. Имеет хорошо развитый многоклеточный мицелий, цвет – от голубовато-зеленого до сизого. Пример выращенной культуры представлен на рисунке 5.



Рисунок 5. Культивирование фитопатогенного гриба на среде МПА

Под микроскопом также были обнаружены конидии, благодаря которым происходит спороношение. Грибы рода *Penicillium* называют кистевиками, так как их конидии образуются на концах мутовчаторазветвленных конидиеносцев, иногда отдельный пучок конидиеносцев, которые выходят из одной точки и отчленяют конидии, напоминают рисовальные кисти, что и было просмотрено на препарате.

При просмотре строения Пеницилла препаровальной иглой был взят кусочек мицелия и помещен в каплю воды на предметное стекло, сверху на мицелий было положено покровное стекло. Основное внимание было уделено краям препарата, так как там обычно лучше всего видно кисти конидиеносцев [7].

К роду *Penicillium* относится большое число плесневых грибов, распространённых в верхних горизонтах почвы, в воздухе плохо проветриваемых помещений, они часто вызывают порчу кормов и различных органических материалов, встречаются в виде налета голубого, зелёного, сизого, реже других цветов на продуктах растительного происхождения, овощах, фруктах, ягодах, особенно в период хранения, отсыревших изделиях из кожи, обоях. По морфологическим признакам пенициллы имеют ветвящийся септированный мицелий (диаметр гифов 2-3 мкм) и септированные конидиоспоры, напоминающие кисть (поэтому их синоним «кистевик»), разветвляющиеся на конце виде отростков стеригм, от них отходят конидии (мелкие округлые), состоящие из цепочек спор. В зависимости от вида конидии могут быть разного цвета (белые, зеленые и др.).

Некоторые органические вещества, которые разлагают данные грибы, находятся в почве (опавшие фрукты, листья и др.). Другие же виды получают пищу, паразитируя на различных растениях, фруктах, овощах, что зачастую приводит к огромным экономическим потерям [20].

Также в препарате были обнаружены бесцветные споры, которые имели шаровидную форму, характерные для данного рода грибов.

Гифы представляют собой бесцветные, микроскопических размеров, тонкие нити, имеющие под микроскопом вид трубчатых волокон. Они лучеобразно расходятся от центра. При наличии оптимальных условий образуют обильные скопления, заметные невооруженным глазом, органов плодоношения и спорообразования.

Микроскопирование фитопатогенного гриба позволила рассмотреть морфологические признаки данного организма, по которым можно было определить, к какому роду плесневых грибов он относится – род *Penicillium*, что показано на рисунке 6.

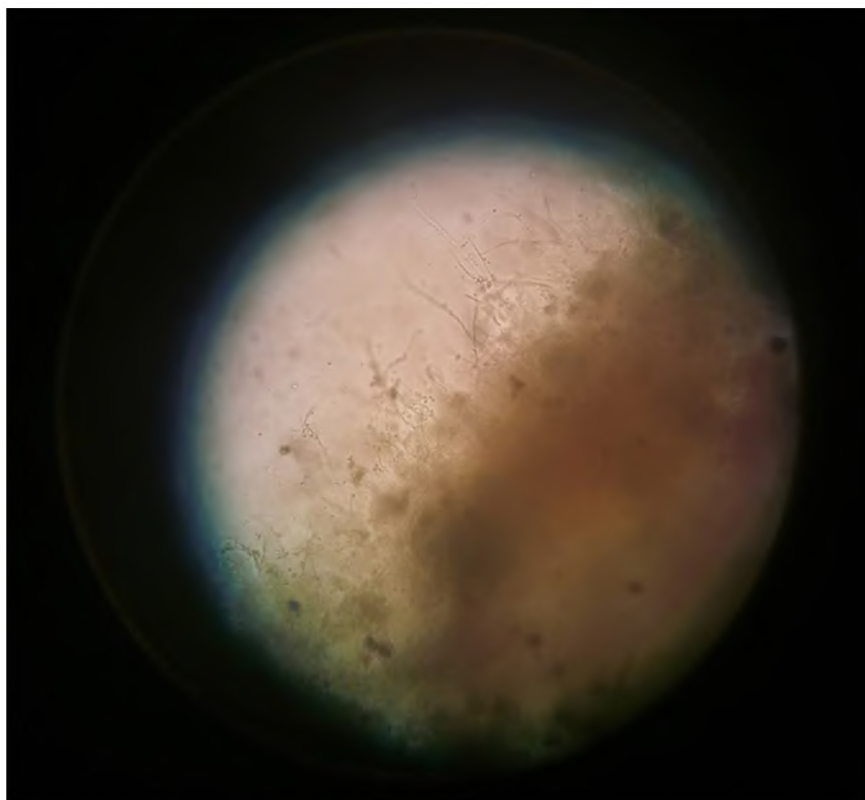


Рисунок 6. Микроскопирование микромицета рода Penicillium

3.4 Оценка измерения зон задержки видимого роста тестируемой культуры

Данная культура была взята с образца почвы, взятого с коллекционно-систематическом участка ботанического сада. Образцу был присвоен №6, на данном типе почвы произрастал тысячелистник таволговый, данное растение предпочитает плодородную, хорошо дренируемую песчаную почву. Ему нравится расти в немного кислых почвах с показателем pH в 5,5-8. В 3 чашки Петри, где газоном была засеяна культура бактерий одного штамма помещали блоки с фитопатогенным грибом, чтобы увидеть их влияние друг на друга.

Пример культуры до инкубационного периода представлен на рисунке 7.

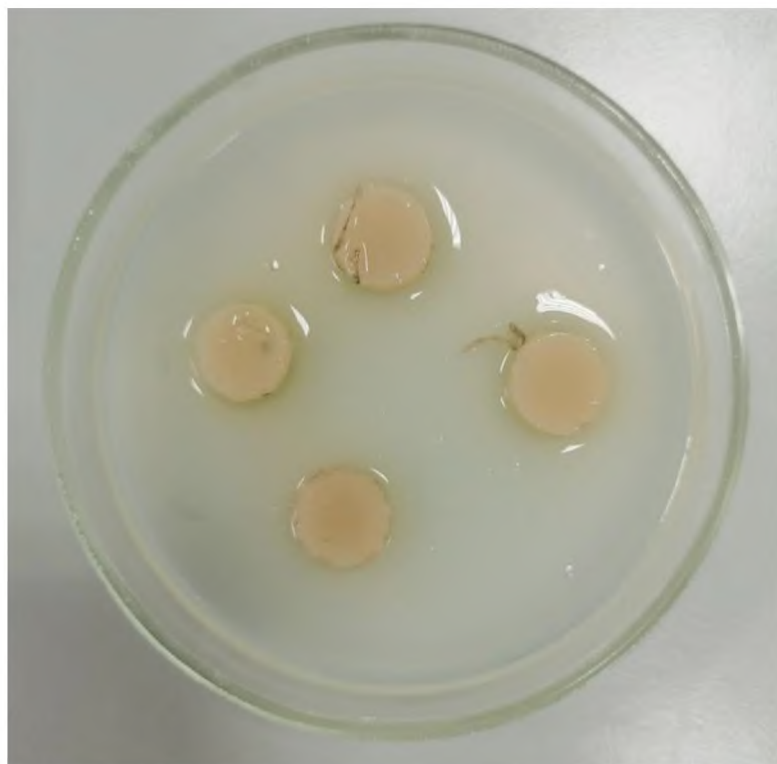


Рисунок 7. Метод агаровых блоков до инкубационного периода

Пример культуры после инкубационного периода представлен на рис.8.



*Рисунок 8. Результат взаимодействия культуры *Azotobacter chroocum* с фитопатогеном*

Результаты измерения зон задержки видимого роста тестируемой культуры представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Зона задержки видимого роста в мм при анализе антагонистических свойств культуры *Azotobacter chroocum*

Чашки (1, 2, 3)	№ блока с фитопатогеном	Антагонистический эффект (мм)	Среднее значение (мм)
<i>Azotobacter chroocum</i> + блок с <i>Penicillium</i>	1	6	7,22
	2	8	
	3	5	
	4	12	
	5	5	
	6	4	
	7	10	
	8	9	
	9	6	

Полученные результаты свидетельствуют о наличии антагонистической активности бактерий рода азотобактер в отношении плесневого гриба *Penicillium*, полученного с зараженного образца тыквы.

3.5 Оценка устойчивости азотобактера

Для комплексной оценки устойчивости азотобактера к действию патогенного гриба был проведен эксперимент, поставленный на семенах злаковой культуры пшеницы. Семена были разделены на 4 групп: 1 группа – контроль (семена замачивались в воде); 2 группа – зараженные (семена замачивали в экстракте гриба *Penicillium*); 3 группа – семена, замоченные в инокулянте азотобактера в трех разных концентрациях; 4 группа – семена, замоченные в экстракте гриба *Penicillium*, а затем обработанные культурой микроорганизмов азотобактера в различных концентрациях. Все опыты проводились в трех повторностях.

В результате исследования было выявлено, что культура Азотобактера проявляет широкий спектр антагонистической активности по отношению к фитопатогенному грибу рода *Penicillium* и задерживает его развитие.

По итоговым данным эксперимента, спустя семь суток, максимальная длина проростков группы №1 (контроль) достигла 17см, группы №2 (семена, обработанные наибольшей концентрацией азотобактера) – 19,5см, в то время, как группа № 5 (семена, замоченные в эмульсии плесневого гриба) – 7см. В группах, где семена обрабатывались последовательно плесневым грибом и азотобактером максимальная длина достигла 16см при концентрации азотобактера 10^{-2} и 10^{-5} КОЕ. При наименьшей концентрации азотобактера длина достигла 15см.

Данные об измерениях средней длины корешков и побегов пшеницы на 3, 5 и 7 дни представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты измерений длин проростков и корешков пшеницы

	3 сутки			5 сутки		7 сутки	
№ вариант а	Кол-во проросших семян, шт	Высота ростков, см	Длина корней, см	Высота ростков, см	Длина корней, см	Высота ростков, см	Длина корней, см
№1 Контроль	8	1,9	3,2	7,5	8,5	14,5	17
№2 <i>Azotobacter</i> 10^{-2} КОЕ	8	2,8	4,5	8	9,7	16	19,5
№3 <i>Azotobacter</i> 10^{-5} КОЕ	8	3	3,5	7,2	8,8	14,5	18

Продолжение таблицы 7

№4 <i>Azotobacter</i> 10 ⁻⁹ KOE	8	2,5	3,5	7	8,5	14	17
№5 <i>Penicillium</i>	6	1,5	2,5	5,5	4	11	7
№6 <i>Penicillium</i> + <i>Azotobacter</i> 10 ⁻² KOE	8	2,5	2,8	7,3	8,2	14,5	16
№7 <i>Penicillium</i> + <i>Azotobacter</i> 10 ⁻⁵ KOE	8	3	3,2	6,7	8,5	13,5	16
№8 <i>Penicillium</i> + <i>Azotobacter</i> 10 ⁻⁹ KOE	7	2,3	3	6,1	7,7	11	15

Рост и развитие корней и проростков группы № 5 были ингибированы фитопатогенным грибом рода *Penicillium*. Уже на 3 сутки эксперимента в этой группе были наименьшие показатели, что говорит о неблагоприятном влиянии фитопатогена на рост семян пшеницы, также некоторые семена вообще не смогли взойти в этой экспериментальной группе. При этом группы № 6, 7, 8, в которые был добавлен еще и азотобактер, по получившимся результатам стали приближены к контролю. Группы № 2, 3, 4, содержащие семена, обработанные только азотобактером даже в самой наименьшей концентрации

имели средние значения длин корешков и побегов выше, чем у контроля, что доказывает благоприятное влияние культуры азотобактера на рост семян пшеницы. Анализируя результаты эксперимента, можно прийти к выводу, что бактерии рода *Азотобактер* проявили антагонистическое действие по отношению к плесневому микромицету, а также оказали стимулирующее действие на рост и развитие как побегов, так и корневой системы пшеницы.

Дисперсионный анализ результатов измерений длин проростков пшеницы представлен в таблице 8.

Таблица 8 – Двухфакторный дисперсионный анализ без повторений измерений длин проростков пшеницы

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Строки	19,36	7	2,76	4,33	0,0095	2,76
Столбцы	507,31	2	253,66	397,04	4,685E-13	3,74
Погрешность	8,94	14	0,64			
Итого	535,62	23				

По результатам таблицы можно сделать вывод, что имеются статистически значимые существенные различия и между образцами, а также по срокам роста.

Дисперсионный анализ результатов измерений длин корешков пшеницы представлен в таблице 9.

Таблица 9 – Двухфакторный дисперсионный анализ без повторений измерений длин корешков тиеницы

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Строки	82,36	7	11,76	4,11	0,01	2,76
Столбцы	628,18	2	314,09	109,84	2,77E-09	3,74
Погрешность	40,03	14	2,86			
Итого	750,57	23				

Из результатов анализа видно, что имеются статистически значимые существенные различия и между образцами, и по срокам роста

Полученные в ходе эксперимента результаты могут позволить рекомендовать этот штамм бактерий для дальнейших исследований и испытаний его в составе различных микробных биопрепаратов, что в будущем может дать большие перспективы в его использовании для стимуляции роста растений, а также их защиты от всевозможных микоризных заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Признаки, выделенных нами из собранных на территории ботанического сада имени И. И. Спрыгина почвенных проб бактерии, принадлежащие к роду *Azotobacter*, соответствуют литературным данным для вида *Azotobacter chroocum*. Реакция по Граму – отрицательна. Выделенные азотобактерии имели сферическую форму и были расположены рассредоточено или попарно в микроскопическом препарате.

В ходе проведенного исследования взаимодействия бактерий рода *Azotobacter* с фитопатогенными грибами, была экспериментально подтверждена антифунгальная активность выделенного нами штамма в отношении гриба рода *Penicillium*, собранного с сельскохозяйственной бахчевой культуры (тыква).

Также, в ходе работы была отмечена и экспериментально подтверждена способность стимулировать рост и развитие побегов и корневой системы пшеницы.

В ходе проведенной работы нами были решены следующие задачи:

- дана экологическая и физиологическая характеристика бактерий рода *Azotobacter*;
- охарактеризованы морфологические и тинкториальные свойства бактерий рода *Azotobacter*;
- изучено влияние *Azotobacter* на рост и развитие фитопатогенных грибов;
- оценен потенциал применения и использования *Azotobacter* при борьбе с фитопатогенными грибами.

Полученные в ходе эксперимента данные позволяют нам рекомендовать этот штамм для дальнейших исследований и испытаний в составе различных микробиологических биопрепаратов для борьбы с фитопатогенными грибами растений и сельскохозяйственных культур

Проведенное исследование позволяет заключить, что цель достигнута и поставленные задачи решены.

При взаимодействии азотобактера с микроскопическим грибом *Penicillium* на зараженных семенах пшеницы, было показано, что при бактеризации азотобактером происходит угнетение микромицета, который задерживает рост растений. Данный факт может стать подтверждением, что взаимодействие бактерий рода азотобактер с фитопатогенами, является важнейшим фактором, который оказывает влияние на урожайность сельскохозяйственных культур [20].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антибиотическая активность и гетерогенность популяции *Azotobacter chroococcum* / И. Н. Позмогова, Г. Л. Герасимова, Н. В. Садова, М. П. Ховрычев // Прикладная биохимия и микробиология. 1987. Т. 24, № 2. С. 182-186.
2. Биосинтез альгинатов бактериями рода *Azotobacter* / Г. А. Бонарцева [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. № 1. С. 61-68.
3. Блинков, Г. К. Азотобактер и его значение для высших растений / Г. К. Блинков. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1959. 123 с.
4. Госманов Р. Г., Ибрагимова А. И., Галиуллин А. К. Микробиология. СПб.: лань, 2013. 320 с.
5. ГОСТ 17.4.4.01-83. Общие требования к отбору проб почвы. М.Стандартинформ, 2008. 4 с.
6. ГОСТ 17.4.4.02-84. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. М.: Стандартинформ, 2008. 4 с.
7. ГОСТ Р 54653-2011 Удобрения органические. Методы микробиологического анализа. М.: Стандартинформ, 2011. 10 с.
8. Готтшалк, Г. Д. Метаболизм бактерий / Г. Д. Готтшалк. М.: Мир, 1982. С. 280-285.
9. Громов, Б. В. Экология бактерий / Б. В. Громов, Г. В. Павленко. Л.: ЛГУ, 1989. 248 с.
10. Гущина Ю. Ю., Олюнина Л. Н., Гончарова Т. А. Исследование морфологии поверхности клеток *Azotobacter Chroococcum* в условиях гипертермии методом атомно-силовой микроскопии // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2005. № 5. С. 87-92.
11. Ерофеева Е. А., Речкин А. И., Савинов А.Б. Всхожесть семян и состояние проростков пшеницы. *Triticum aestivum* в условиях воздействия на них

- суспензии клеток *Azotobacter chroococcum* // Принципы экологии. 2019. Т. 8. № 2. С. 4-11.
12. Калганова Т. Н. Практикум по микробиологии и биотехнологии: лабораторные работ. Южно-Сахалинск: СахГУ. 2011. 56с
13. Коростелева Л. А., Кошаев А. Г. Основы экологии микроорганизмов. СПб.: лань, 2013. 320 с.
14. Кретович, В. Л. усвоение и метаболизм азота у растений / В. Л. Кретович. М.: Наука, 1987. 483 с.
15. Латышенко К. П. Экологический мониторинг. М.: Юрайт, 2016. 376 с.
16. Логинов О. Н. Бактерии *Pseudomonas* и *Azotobacter* как объекты сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Наука, 2005. 178 с.
17. Мишустин, Е. Н. Круговорот азота и его соединений в природе / Е. Н. Мишустин // Роль микроорганизмов в круговороте газов в природе. М.: Наука, 1972. С. 68-91.
18. Урюмцева Т. И., Кабдрасилова А. М. Разработка рецептуры питательной среды для культивирования бактерий *Azotobacter* Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2019. № 3. С. 61-65.
19. Шильникова В. К., Ванькова А. А. Микробиология. М.: Дрофа, 2004. 265 с.
20. Штамм бактерий *Azotobacter chroococcum*, обладающий антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным микроорганизмам, и его применение: пат. 2414509 Рос. Федерация. № 2009127881/10; заявл. 21.07.2009; опубл. 20.03.2011, 6 с.
21. Штамм бактерий *Azotobacter chroococcum*, обладающий широким спектром фунгицидного действия и биопрепарат на его основе: пат. 2289620 Рос. Федерация. (Denepaunn. NY 2005129297/13; 3UIBJ1. 21.09.2005; опубл. 20.12.2006, 6 с.
22. Alkama, N., Ounane, G., and Drevon, J. J. (2012). Is genotypic variation of H⁺ efflux under P deficiency linked with nodulated-root respiration of N₂ fixing

- common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Plant Physiol.* 169, 1084–1089. doi: 10.1016/j.jplph.2012.03.013
23. Andjelković, S., Vasić, T., Radović, J., Babić, S., Marković, J., Zornić, V., et al. (2018). Abundance of azotobacter in the soil of natural and artificial grasslands. *Solut. Proj. Sustain. Soil Manage.* 172.
24. Aquilanti, L., Favilli, F., and Clementi, F. (2004). Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1475–1483. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.04.024
25. Arora, M., Saxena, P., Abdin, M. Z., and Varma, A. (2018). Interaction between *Piriformospora indica* and *Azotobacter chroococcum* governs better plant physiological and biochemical parameters in *Artemisia annua* L. plants grown under in vitro conditions. *Symbiosis* 75, 103–112. doi: 10.1007/s13199-017-0519-y
26. Azcón, R., and Barea, J. M. (1975). Synthesis of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter beijerinckii* related to effects produced on tomato plants. *Plant Soil* 43, 609–619. doi: 10.1007/BF01928522
27. Bali, A., Blanco, G., Hill, S., and Kennedy, C. (1992). Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1711–1718.
28. Bhosale, H. J., Kadam, T. A., and Bobade, A. R. (2013). Identification and production of *Azotobacter vinelandii* and its antifungal activity against *Fusarium oxysporum*. *J. Environ. Biol.* 34, 177–182.
29. Das, H. K. (2019). *Azotobacters* as biofertilizer. *Adv. Appl. Microbiol.* 108, 1–43.
30. Gauri, S. S., Archanaa, S., Mondal, K. C., Pati, B. R., Mandal, S. M., and Dey, S. (2011). Removal of arsenic from aqueous solution using pottery granules coated with cyst of *Azotobacter* and Portland cement: characterization, kinetics and modeling. *Bioresour. Technol.* 102, 6308–6312. doi: 10.1016/j.biortech.2011.02.037

31. Deshmukh, R. P., Nagre, P. K., Wagh, A. P., and Dod, V. (2014). Effect of different bio-fertilizers on growth, yield and quality of cluster bean. *Indian J. Adv. Plant Res.* 1, 39–42.
32. Hafez, M., Elbarbary, T. A., Ibrahim, I., and Abdel-Fatah, Y. (2016). *Azotobacter vinelandii* evaluation and optimization of Abu Tartur Egyptian phosphate ore dissolution. *Saudi J. Pathol. Microbiol.* 1, 80–93. doi: 10.21276/sjpm.2016.1.3.2
33. Kennedy, C., Rudnick, P., MacDonald, M. L., Melton, T. (2015). «*Azotobacter*,» in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, eds M. E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F. A. Rainey and W. B. Whitman (Atlanta, GA: American Cancer Society), 1–33. doi: 10.1002/9781118960608.gbm01207
34. Kirn, J., and Rees, D. C. (1992). Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenase molybdenum–iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Nature* 360, 553–560. doi: 10.1038/360553a0
35. Kumar, V., Behl, R., and Narula, N. (2001). Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. *Microbiol. Res.* 156, 87–93. doi: 10.1078/0944-5013-00081
36. Ledbetter, R., Garcia-Costas, A. M., Lubner, C. E., Mulder, D. W., TokminaLukaszewska, M., Artz, J. H., et al. (2017). The electron bifurcating FixABCX protein complex from *Azotobacter vinelandii*: generation of low-potential reducing equivalents for nitrogenase catalysis. *Biochemistry* 56, 4177–4190.
37. Lenart, A. (2012). Occurrence, characteristics, and genetic diversity of *Azotobacter chroococcum* in various soils of Southern Poland. *Polish J. Environ. Stud.* 21, 415–424.
38. Makawi, A. A. M. (1973). The density of *Azotobacter* in root-free soils and in the rhizosphere of several plants in arid and semi-arid Libyan regions. *Z. Bakterirol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.* 128, 135–139. doi: 10.1016/S0044-4057(73)80051-

39. Milošević, N., Tintor, B., Protić, R., Cvijanović, G., and Dimitrijević, T. (2012). Effect of inoculation with *Azotobacter chroococcum* on wheat yield and seed quality. *Rom. Biotechnol. Lett.* 17, 7352–7357.
40. Mrkovacki, N., and Milic, V. (2001). Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agricultural application. *Ann. Microbiol.* 51, 145–158.
41. Rodriguez-Salazar, J., Moreno, S., and Espín, G. (2017). LEA proteins are involved in cyst desiccation resistance and other abiotic stresses in *Azotobacter vinelandii*. *Cell Stress Chaperones* 22, 397–408. doi: 10.1007/s12192-017-0781-1
42. Youssef Zeroual. Nitrogen Fixing *Azotobacter* Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability. *Front. Microbiol.*, 25 February 2021. Sec. Microbiotec