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:
«ДЕЙСТВИЕ ПРИРОДНЫХ ТОКСИНОВ НА РОСТ КУЛЬТУР AZOTOBACTER»

Студент _____ Кириченко Александра Алексеевна

Руководитель _____ Заплатин Б.П.

Нормоконтролер _____ Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 17.06.21 № 15)

Заведующий кафедрой _____ Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 25.06.21 № 5)

Секретарь ГЭК _____ Клыченков С.В

Пенза, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 6

1.1 Эколого-физиологическая характеристика бактерий рода Azotobacter 6

1.1.1 Систематическое положение бактерий рода Azotobacter 6

1.1.2 Цикл развития бактерий рода Azotobacter 6

1.1.3 Особенности распространения Azotobacter в различных типах почв 7

1.2 Морфологическая характеристика и физиологические свойства Azotobacter 8

1.3 Взаимодействие азотобактера с высшими растениями и почвенными микроорганизмами 11

1.3.1 Характеристика природных токсинов 13

1.3.2 Взаимодействие Azotobacter с фитопатогенами и токсинами 18

1.3.3 Влияние факторов внешней среды на характер роста и физиологическую активность бактерий рода Azotobacter 19

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 22

2.1 Материалы и объект исследования 22

2.2 Методы исследования 23

2.2.1 Подготовка реактивов и питательных сред 23

2.2.2 Отбор почвенных проб 25

2.2.3 Подготовка образца к микробиологическому анализу 26

2.2.4 Выделение и идентификация выделенных культур Azotobacter 26

2.2.5 Определение чувствительности выделенных штаммов к различным антибиотикам 26

2.2.6 Определение чувствительности выделенных штаммов к действию других природных токсинов 27

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 29

3.1 Выделение штаммов азотобактера 29
3.2 Изучение культуральных признаков 32
3.3 Оценка резистентности 36
3.3.1 Антибиотики 36
3.3.2 Плесневые грибы 39
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 45
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 47

ВВЕДЕНИЕ

Необходимым условием для существования на Земле органического мира является обеспечение сбалансированной деятельности микроорганизмов, которые играют важную роль в поддержании жизни нашей планеты, принимая участие в круговороте серы, фосфора, азота, и других элементов и веществ в различных экологических системах.

В связи с ростом промышленного производства и развитием сельского хозяйства, почва становится токсичной средой обитания за счет использования человеком большого количества химических веществ в данной сфере деятельности. Биогеохимическое равновесие нарушается, с деградацией почв резко уменьшается и количество природных микробных сообществ. К последствиям загрязнения почвенного покрова, водоемов и других экосистем, относится также снижение активности микроорганизмов, нарушение трофической цепи и структуры биогеоценоза в целом.

Чтобы вышеописанная проблема решилась, необходимо отказаться от применения такого огромного количества химических веществ в сельском хозяйстве и применять в практике биопрепараты естественной почвенной микрофлоры.

Бактерии рода Azotobacter являются важнейшим фактором для сельского хозяйства, так как для этих микроорганизмов характерна выраженная способность усваивать азот атмосферы. Способность фиксировать молекулярный азот из атмосферы, не вступая в симбиотические отношения с растениями, является преимуществом бактерий рода Azotobacter. Представители данного рода являются свободноживущими азотфиксаторами. Некоторые штаммы азотобактера способны фиксировать до 15 мг азота на 1 г глюкозы [14]. В результате процесса азотфиксации бактерии рода Azotobacter способны к фиксации молекулярного азота и вовлечению его в биологический круговорот.

Помимо азотфиксации, давно известна способность азотобактера продуцировать биологически активные вещества (витамины и стимуляторы роста). Благодаря этому свойству азотобактер связан не только с улучшением азотного питания и фиксацией азота, но и с поступлением в растения биологически активных соединений, вырабатываемых микроорганизмом.

На урожайность сельскохозяйственных культур оказывают влияние фитопатогенные организмы, присутствующие в почве. При бактеризации азотобактером в ризосфере угнетается развитие микроскопических грибов, задерживающих рост растений [31]. Происходит это благодаря фунгистатическому веществу, которое вырабатывает Azotobacter. Именно поэтому взаимодействие азотобактера с фитопатогенами является очень важным аспектом. Причём, различные штаммы Aazotobacter могут отличаться как по эффективности азотфиксации, так и по характеру взаимодействия природными фитопатогенами.

На основании вышеизложенного, целью моей работы является исследование действия природных токсинов на рост культур Azotobacter, выделенных из различных типов почв Пензенской области.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- Сбор и подготовка почвенных образцов, отобранных в различных районах города Пенза;
- Выделение и идентификация штаммов рода Azotobacter по ключевым культуральным и физиологическим признакам;
- Изучение влияния природных токсинов на рост выделенных штаммов Azotobacter.

Выпускная квалификационная работа написана на 50 листах, содержит 11 таблиц, 8 рисунков и список литературы на русском языке из 31 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эколого-физиологическая характеристика бактерий рода Azotobacter

1.1.1 Систематическое положение бактерий рода Azotobacter

В 1901 году голландский микробиолог и ботаник Мартин Бейеринк открыл и описал первого представителя рода Azotobacter. Ученый выделил из почвы аэробную неспорообразующую грамотрицательную бактерию, способную фиксировать молекулярный азот, и назвал ее Azotobacter chroococcum (в родовом названии отражена способность бактерии фиксировать азот, в видовом — способность синтезировать коричневый пигмент — chroo и образовывать кокковидные клетки — coccum). Azotobacter, как уже было сказано, является типичным представителем свободноживущих микроорганизмов. Свободноживущие микроорганизмы – это микроорганизмы, которые живут независимо от того, развивается ли вблизи них какое-либо растение или нет. Систематическое положение бактерий рода Azotobacter:

Отдел Gracilicutes

Класс Scotobacteria

Семейство Azotobacteriaceae

Род Azotobacter

Вид Azotobacter chroococcum, Azotobacter agile, Azotobacter Vinelandii.

1.1.2 Цикл развития бактерий рода Azotobacter

Благодаря наличию перитрихально расположенных жгутиков клетки азотобактера подвижны. Кроме жгутиков, на поверхности клетки расположены нитевидные структуры - фимбрии, которые служат для агрегации клеток и прикрепления их к твердым субстратам. Плазма молодых клеток азотобактера мелкозернистая. В процессе старения клетки азотобактера утрачивают подвижность и принимают кокковидную форму. В плазме появляются включения (жировые капли, волютин,

метахроматические включения и т.д.), резко преломляющие свет. В этот период клетка (или группа клеток азотобактера) покрываются толстой слизистой капсулой [20].

Слизеобразное вещество азотобактера защищает бактерию, делая ее относительно устойчивой к воздействию микроорганизмов. Известно, что полисахариды азотобактера в комплексе с солями железа и меди дают трудно разлагаемые микроорганизмами соединения [14].

Цвет представителей рода Azotobacter может отличаться, это зависит от вида микроорганизма. Каждому виду характерен пигмент, который образуется в процессе старения культуры. Таким образом, для Azotrobacter chroococcum характерна желтовато-коричневая окраска, для Azotobacter vinelandii – флуоресцирующая розово-фиолетовая, для представителей Azotobacter agile – желто-зеленая флуоресцирующая.

1.1.3 Особенности распространения Azotobacter в различных типах почв

Azotobacter нормально развивается, если почва достаточно увлажнена, имеет нейтральную или слабощелочную реакцию, содержит простые органические соединения, фосфор, кальций и ряд микроэлементов (молибден, магний, железо). Распространение азотобактера ограничено из-за его высокой требовательности к составу почвы и внешним факторам среды.

В торфяниках азотобактер распространен в небольших количествах. В солонцах и солончаках существуют солеустойчивые виды. В кислых подзолистых почвах если и встречаются немногочисленные колонии азотобактера, то они характеризуются низкой активностью.

Активно микробиологические процессы происходят в чернозёмах, при этом наиболее интенсивно они протекают весной и рано летом, когда почва имеет благоприятный температурный режим и достаточный запас влаги. Поэтому самое большое количество культуры образуется весной. В

огородных, хорошо окультуренных, почвах азотобактер обычно находиться в значительных количествах [18].

Можно сделать вывод, что Azotobacter является индикатором степени окультуренности почв [3]. В почвах России имеется в основном Az. Chroococcum.

1.2 Морфологическая характеристика и физиологические свойства Azotobacter

Azotobacter фиксирует азот в аэробных условиях (в присутствии кислорода). Бактерии данного рода растут на безазотистых средах, предназначенных для выделения свободноживущих азотфиксирующих организмов, например, на среде Эшби, которая содержит источник углерода (маннит, глюкозу или сахарозу) и необходимые микроэлементы, или на среде М. В. Фёдорова, содержащей большое количество микроэлементов, а также на жидкой среде Бейеринка. Рост на жидкой среде более однообразен, сопровождается помутнением или потемнением среды, образованием пленки [17]. На плотных питательных средах представители рода образуют плоские, слизистые колонии диаметром 1,5—7 мм, в жидких питательных средах образуют плёнку. Форма слизистых колоний в основном круглая, поверхность выпуклая, край волнистый или ровный. Химический состав питательной среды, на которой выращивается культура, может оказывать влияние на форму клетки. Например, пептон вызывает плеоморфизм. Индуцирующее влияние на плеоморфизм у представителей рода Azotobacter в составе пептона оказывает аминокислота глицин. Азотобактеру свойственно пигментирование, зависящее от видовой принадлежности. Колонии могут быть окрашены в тёмно-коричневый, зелёный, пурпурно-желтый, или же могут быть бесцветными. Некоторые виды способны продуцировать флуоресцирующий пигмент. Представители рода *Azotobacter* являются мезофилами и растут при температуре 20—30 °С.

Клетки азотобактера способны изменять форму от палочковидных до кокковидных, в зависимости от условий окружающей их среды, соответственно являются плеоморфными. Располагаются клетки одиночно или парами. Часто их окружает слизистая капсула, которую можно увидеть при окрашивании клеток фуксином и разбавленной тушью и последующем микроскопировании (Рис. 1). Вещество капсулы состоит из полисахаридов и содержит около 0,023% азота. Внутри клеток хорошо различима зернистость, резко преломляющая свет. Природа этих включений разнообразна (жировые капли, волютин, метахроматические включения). Размеры клеток варьируют - 2,0-7,0х1,0-2,5 мкм. Иногда длина клеток может достигать 10-12 мкм.

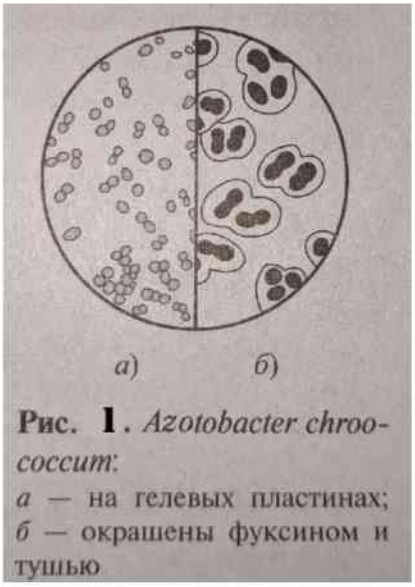

Рис. 1. *Azotobacter chroococcum*:
а — на гелевых пластинах;
б — окрашены фуксином и тушью

Рисунок 1. Azotobacter chroococcum под микроскопом

Размножается азотобактер путём простого деления клетки с образованием поперечной перегородки, иногда наблюдается перешнуровывание. В пределах рода существуют характерные распределения клеток видов азотобактера при его делении. Клетки Az. chroococcum в начале деления располагаются концентрически, причем чаще клетки агрегируются по две. При дальнейшем делении формируются радиально расположенные ряды клеток и слоистость образуемой колонии. В процессе старения они округляются и приобретают морфологию кокков.

Клетки Az. vinelandii на начальных стадиях формирования колонии располагаются радиально и сохраняют такое расположение на всем протяжении развития. Клетки Az. agilis образуют большое количество слизи, за счёт этого колонии имеют выпуклое строение. Количество клеток в колонии значительно меньше двух предыдущих видов с расположением определенной закономерности - звездчато - рассеянный тип строения.

Азотобактер распространен в почве не повсеместно из-за его требовательности к условиям окружающей среды [16].

Как уже было сказано, в родовом названии отражена способность бактерии фиксировать азот. Способность азотобактера усваивать азот атмосферы является одной из основных физиологических особенностей. Некоторые штаммы азотобактера могут фиксировать до 15 мг азота на 1 г глюкозы, хотя большинство не усваивают более 10 мг [14].

Следующим физиологическим свойством является то, что Azotobacter способен усваивать в качестве источника углерода моносахара, дисахара, спирты, соли органических кислот. Следовательно, азотобактер – полифаг. Но все же, предпочтительным энергетическим материалом считаются одноатомные и многоатомные спирты: этиловый и бутиловый. Существуют некоторые штаммы азотобактера, которые не ассимилируют лактозу, бензойную кислоту, маннит.

Очень важное физиологическое свойство азотобактера заключается в его умении вырабатывать фунгистатическое вещество, которое представляет собой метиловый эфир алифатической тетраеновой кислоты, содержащей гидроксильную и β-метильную группы. Данное вещество является антибиотиком, активным против большого количества фитопатогенных грибов. Описанное свойство помогает при бактеризации азотобактером, оно угнетает развитие микроскопических грибов в ризосфере, некоторые из которых вызывают задержку роста растений. Например, культура Az. chroococcum устраняет угнетающее действие фитотоксичного гриба Alternaria на кукурузу, а рост не зараженного растения стимулирует.

1.3 Взаимодействие азотобактера с высшими растениями и почвенными микроорганизмами

Azotobacter способен оказывать стимулирующее действие на прорастание семян растений и ускорять их рост. Происходит это благодаря продукции биологически активных веществ, таких как витамины, ауксины и гибереллины. Особенное значение это имеет в ранние фазы развития растения [17]. Ауксины — это класс растительных гормонов, они являются регуляторами роста растений. Ауксинам принадлежит важная роль в координации многих ростовых и поведенческих процессов в жизненном цикле растения. Таким образом, бактерии рода Azotobacter являются продуцентами различных фитогормонов.

Способность азотобактера синтезировать ростовые вещества имеет огромное практическое значение в особенности для тех растений, которые произрастают в условиях недостаточной влажности. Под их действием происходит быстрое удлинение зародышевого корня, это позволяет ему уходить из пересушенной зоны вглубь почвы, где влаги больше [29].

Внесение в почву удобрений, содержащих азотобактер, благоприятно влияет на урожай: обеспечивает растения азотным питанием, существенно снижает токсическое влияние фунгицидов на проростки растений, позволяет выращивать экологически чистые продукты с высоким содержанием витаминов, способствует развитию вегетативной системы растений и восстанавливает плодородие почв [11].

На распространение в почве микроорганизмов оказывает значительное влияние корневая система растений. Но и формирование корневой системы, в свою очередь, зависит от количества и видового состава сообществ микроорганизмов. Именно около корней растений скапливается наибольшее число бактерий. Обусловлено это тем, что в процессе своей жизнедеятельности растения выделяют в прикорневую зону почвы определенное количество органических соединений. Слой почвы,

непосредственно прилегающий к поверхности корня, называется ризосфера, ее толщина составляет примерно 2 мм [11]. Согласно исследованиям Костычева, у разных растений состав прикорневой микрофлоры неоднороден, так как корневые выделения отдельных видов растений тоже не одинаковы [15]. Таким образом, растения по их отношению к азотобактеру, можно разделить на три группы:

- Растения, способствующие развитию и накоплению азотобактера в почве (люцерна, донник, клевер, горох);
- Растения, не стимулирующие, но и не угнетающие развитие азотобактера (ячмень, томат, свёкла, овёс);
- Растения, подавляющие развитие азотобактера (лён, хлопчатник).

Помимо растений существует большое количество почвенных микроорганизмов, оказывающих влияние на культуру Azotobacter. В слизи, выделяемой азотобактером, могут присутствовать бактерии-спутники, представителем которых является Pseudomonas radiobaster. Названная бактерия принадлежит к виду грамотрицательных, облигатно аэробных палочковидных почвенных бактерий рода Rhizobium. Этот микроорганизм развивается на безазотистой среде и обладает способностью фиксировать молекулярный азот. За счет деятельности амилолитических и протеолитических ферментов Pseudomonas radiobaster активирует биохимическую активность азотобактера.

Метабиоз – это тип взаимоотношений, при котором пользу из них извлекает только один партнер, не причиняя при этом вреда другому. Чаще всего, один организм развивается за счет продуктов жизнедеятельности другого, продолжая начатый им процесс. Подобные взаимоотношения возникают между группой целлюлозоразрушающих бактерий и азотобактером, который не обладает способностью использовать клетчатку, но развивается за счет глюкозы и органических кислот, образующихся при ее разложении целлюлозоразрушающими бактериями [19].

Бактерии рода Azotobacter способны образовывать ассоциации с пектинолитическими бактериями рода Bacillus. В ходе данного взаимовыгодного взаимодействия ускоряется усвоение полимеров и стимулируется азотфиксация, так как азотобактер потребляет продукты разложения полимеров бациллами, снабжая их при этом фиксированным азотом [23].

Можно сказать, что метабиотические отношения микроорганизмов лежат в основе круговорота биогенных элементов в природе [19].

1.3.1 Характеристика природных токсинов

Токсины — это химические вещества белковой природы животного, растительного, микробного или иного происхождения, которые обладают высокой токсичностью и поражающим действием.

Природные токсины можно классифицировать по источнику происхождения:

1. Фитотоксины — токсины растительного происхождения;

Примером фитотоксина является рицин. Рицин представляет собой гликопротеин с глобулярной структурой. Белковая часть его молекулы состоит из 560 аминокислотных остатков, она построена из двух субъединиц: доменов А и В, соединенных дисульфидным мостиком. В организме рицин транспортируется кровотоком, а при достижении поражаемой клетки, домен В связывается со специфическими рецепторами клеточных мембран и вызывает структурную перестройку мембраны с образованием трансмембранного канала. По этому каналу домен А проникает в клетку, инактивирует ферменты рибосом, тем самым нарушая трансляцию белков.

2. Зоотоксины — токсины животного происхождения, входящие в состав ядов некоторых животных;

Зоотоксины высокотоксичны, их химический состав очень разнообразен.

Лизоцимы — это белки-ферменты с антибиотическим действием. Лизоцим из белка куриных яиц представляет собой небольшой фермент из 129 аминокислотных остатков с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными мостиками. По отношению к человеку и животным лизоцим не проявляет токсических свойств, а наоборот, подобно биостимулятору активирует защитные свойства макроорганизма.

Для микроорганизмов лизоцим токсичен, поскольку является антибиотиком. Фермент класса гидролаз разрушает клеточную стенку бактерий за счет гидролиза пептидогликана (муреина). Лизоцим «опасен» главным образом для грамположительных бактерий, чья клеточная стенка состоит только из пептидогликана. А клеточная стенка грамотрицательных бактерий имеет более сложное строение [24].

Антибиотики пенициллинового ряда (пенициллин, ампициллин, карбенициллин и др.) или циклосерин, подавляют синтез муреина. Фермент лизоцим действует на β-1,4-гликозидные связи муреина и разрушает его у бактерий со сформировавшейся клеточной стенкой. Антибиотики пенициллинового ряда и циклосерин оказывают действие только на растущие бактерии, они нарушают синтез муреина клеточной стенки, препятствуют поперечной сшивке пептидогликановых цепей, а, следовательно, образованию пептидных связей [19].

3. Микробные токсины — токсины, вырабатываемые микроорганизмами;

Бактериальные токсины, классификация которых основана на физико-химических свойствах, делятся на две группы:

а) Эндотоксины — это липополисахариды, входящие в состав клеточных стенок грамотрицательных бактерий. Они могут освободиться и начать оказывать свое действие только после гибели микробов. Их небольшое количество активизирует выработку фагоцитов, В-лимфоцитов и интерферона в организме человека. Благодаря этому происходит повышение иммунитета и нейтрализация болезнетворных микробов и токсинов.

Организм может среагировать на присутствие эндотоксинов аллергическими проявлениями.

б) Экзотоксины представляют собой белки, которые способны сохранять биологическую активность вне бактериальной клетки. Механизм их действия основан на повышении проницаемости клеточных мембран, блокировке синтеза белковых структур, нарушении процесса взаимодействия клеток между собой.

В зависимости от связи с бактерией, микробные экзотоксины делятся на 3 класса:

- Класс А — белковые токсины, выделяемые во внешнюю среду;
- Класс В — микробные токсины, особенностью которых является то, что они секретируются во внешнюю среду и при этом одновременно взаимодействуют с бактериальной клеткой;
- Класс С — экзотоксины, связанные с микроорганизмом, но выделяющиеся наружу после его гибели.

4. Микотоксины — токсины, которые продуцируются некоторыми видами плесневых грибов.

Микотоксины — низкомолекулярные вторичные метаболиты, продуцируемые микроскопическими плесневыми грибами, зачастую поражающие кормовые растения в периоды их вегетации и хранения. Известно более 300 микотоксинов, наиболее распространенные из них:

а) Трихоцетеновые микотоксины (трихоцетены) — группа токсинов, состоящая из более чем 170 сходных по строению веществ, оказывающих одинаковый токсический эффект при разных летальных дозах. К трихотеценовым микотоксинам типа А относятся: токсин Т-2, токсин НТ-2, диацетоксискирпенол (ДАС) и неозоланиол (НЕО). Как правило, представители данного типа в 10 раз токсичнее трихотеценов типа Б. Диоксиниваленон (ДОН, или вомитоксин) и его 3-ацетил и 15-ацетил производные (3-АцДОН и 15-АцДОН соответственно), ниваленон (НИВ) и фузаренон Х относятся к трихотеценовым микотоксинам типа Б.

В основе механизма токсического действия лежит способность ингибировать синтез белка.

Перечисленные токсины продуцируются: F.graminearum (ДОН); F.sporotrichiella, F.sambucinum, F.tricinctum (Т-2); F.nivale (ниваленон) и другими видами грибов рода Fusarium [10].

б) Зеараленоновые микотоксины, к которым относятся F2-токсин (зеараленон), FES, RAL, загрязняют чаще зерновые корма, особенно кукурузу, пшеницу. Не обладают высокотоксическим эффектом, но имеют гормоноподобную структуру.

Продуцентами являются: F.graminearum, F.roseum, F.moliniforme.

Грибы рода Fuzarium являются возбудителями фузариозной корневой гнили. Симптомы болезни выражены в поражении корневой системы, узлов кущения и оснований стеблей растения. При сильном поражении семени, возможна гибель проростков еще до выхода на поверхность почвы. Характерно появление коричневых полос и пятен на колеоптиле, на проростках, корнях. Зараженные органы растения буреют и разрушаются, превращаясь в сухую гниль. Листья желтеют и отмирают (Рис. 2). Если больное растение находилось в условиях повышенной влажности, можно обнаружить образование мицелия и спороношение в виде бело-розового налета [6].

Рисунок 2. Признаки поражения пшеницы фузариозом

Патоген в почве существует постоянно. Грибы в форме грибниц, склероциев и хламидоспор сохраняются на зерне и остатках растений. Споры легко распространяются с каплями воды и потоком ветра, а также в ходе антропогенной деятельности. Распространяются через почву и путем заражения конидиями. Патоген, проникая в корни, заселяет верхнюю часть и ксилему.

Заражение растений может происходить при +1°С – +35°С (оптимальная температура +13°С – + 20°С) и относительной влажности воздуха от 40 до 80 %. Резкие колебания влажности могут способствовать усилению поражения корней растения. Корневая гниль злаков, вызываемая грибами рода Fusarium, развивается активно в прохладную и влажную погоду с низкой солнечной радиацией. Сочетание высокой концентрации углекислоты с низким содержанием кислорода и слабокислая среда только благоприятствуют развитию возбудителя корневой гнили. Ослабленные растения с пониженным тургором клеток больше всего подвержены заражению [6].

Фузариозная корневая гниль злаковых культур распространена во всех регионах выращивания хлебных злаков и является составной частью патогенов обыкновенной корневой гнили [13].

в) Патулин – продукт обмена ряда плесневых грибов, встречающихся на фруктах и других пищевых продуктах. Обладает канцерогенными и мутагенными свойствами.

Основные продуценты: Penicillium expansum – возбудитель коричневой гнили в яблоках, грушах, абрикосах, персиках, томатах; Penicillium urticae – встречающийся иногда на этих же плодах и вызывающий гниение; Byssochlamis nivea – термоустойчивый гриб, выделенный из фруктовых соков.

1.3.2 Взаимодействие Azotobacter с фитопатогенами и токсинами

Азотобактер обладает фунгистатическим действием, продуцируя антибиотические вещества, препятствующие развитию плесневых грибов. Это можно назвать антагонистической активностью по отношению к возбудителям болезней растений.

Согласно литературным источникам, для культуры Azotobacter характерна способность снимать угнетающее действие фитотоксического гриба Alternaria на кукурузу, а рост незараженного растения стимулирует (Рис. 3) [9].

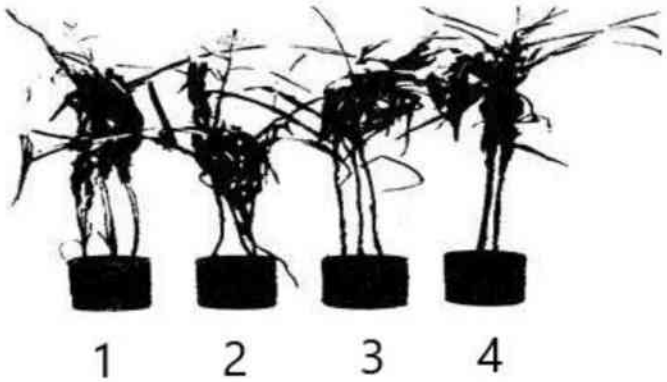

Рисунок 3. Способность культуры Azotobacter снимать угнетающее действие фитотоксического гриба Alternaria на кукурузу. 1— контроль; 2 — инфицирование кукурузы грибом Alternaria sp.; 3 — инфицирование грибом Alternaria и внесение культуры Azotobacter; 4 —внесение в почву культуры Azotobacter

Bacillus subtilis, Bacillus cereus, грибы родов Penicillium и Aspergillus являются сильными антагонистами азотобактера, они задерживают или полностью подавляют его развитие на питательных средах в первые сутки культивирования [5]. Среди почвенных микроорганизмов плесневые грибы составляют основную массу активных антагонистов - 40-80%. В летний период в связи с понижением влажности почвы их численность и активность

возрастают. В весенний период большую долю антагонистов составляют бактерии (до 40%).

При исследовании антагонизма культур азотобактера и фитопатогенного мицеллиального гриба Fusarium culmorum, являющегося возбудителем заболеваний растений, было обнаружено, что представители рода Azotobacter обладают широким спектром антагонистической активности в отношении данного гриба. При этом наиболее активными антагонистами являются виды Azotobacter vinelandii и Azotobacter chroococcum [17].

1.3.3 Влияние факторов внешней среды на характер роста и физиологическую активность бактерий рода Azotobacter

Условия внешней среды оказывают серьезное влияние на рост и развитие азотобактера.

Сильнокислая среда (pH 5,5-5,29) оказывает губительное действие на развитие азотобактера в первые же сутки роста. Действие щелочной среды сказывается на развитии культуры гораздо меньше - увеличивается время генерации, сокращается число делений клеток в сутки, численность популяции возрастает незначительно. Повышенная кислотность и щелочность среды отрицательно сказывается на интенсивности потребления энергетического материала и продуктивности азотофиксации. Физиологические и биохимические процессы в сильнокислой среде протекают очень слабо. В слабокислой и сильнощелочной средах чуть лучше. Наиболее интенсивно физиологические и биохимические процессы идут при pH=7,2 – 7,4. Можно сделать вывод, что кислые среды, по сравнению с щелочными, менее благоприятны для развития культуры Azotobacter.

По отношению к температурному режиму азотобактер можно назвать типичным мезофилом. 25-30°С - температурный оптимум его развития. Максимальная температура соответствует 35-37°С. Минимальная температура, при которой культура Azotobacter еще способна развиваться,

лежит в диапазоне 5-10°С. Пониженные температуры переносятся бактерией лучше, чем повышенные. Слишком высокая и слишком низкая температуры снижают интенсивность роста и размножения, а также использование энергетического материала и продуктивность азотофиксации. При температуре 5°С заметного развития в культурах не происходит и численность популяции остается на одном уровне. При 20°С число клеток в культуре значительно увеличивается. Но при 30°С наблюдается максимальная скорость роста азотобактера. А при температуре 40°С у Az. chroococcum цикл развития сокращается [21].

Для развития азотобактера в естественной среде большое значение имеет наличие влаги. Потребность азотобактера во влаге приравнивается к потребности в ней высших растений. 60-80% полной влагоемкости почвы – это оптимальный уровень влажности для развития азотобактера. Известно, что в высушенном состоянии микроорганизмы неактивны. Поэтому иссушение почвы губительно для жизнедеятельности азотобактера. Прекращаются или максимально замедляются все процессы метаболизма, происходит торможение жизнедеятельности. Степень торможения и потеря жизнеспособности зависит от уровня остаточной влажности в клетках и индивидуальных свойств культуры, которые определяются их ксерочувствительностью. Ксерочувствительность - это биологическое свойство микроорганизмов, которое отражает их восприимчивость к содержанию остаточной влаги в биомассе. Для азотобактера характерна повышенная ксерочувствительность в зоне остаточной влажности 20-30%. Обезвоживание биомассы азотобактера до 60-70% остаточной влажности значительно не сказывается на его жизнеспособности. Но дальнейшее обезвоживание вызывает отмирание клеток.

Азотобактер – аэробный микроорганизм и аэрация благоприятствует его размножению, поэтому в естественных природных условиях почва должна быть уплотнена в пределах 1,2-1,4 г/см. Известно, что при наличии 4% O_2 в атмосфере усваивается в 3 раза больше азота, чем при 10-20%.

Существует мнение, что азот и кислород вполне могут конкурировать между собой в качестве конечных акцепторов H+.

Касательно микроэлементов, наиболее значимым является молибден, потому что он входит в состав нитрогеназы. Клетки азотобактера поглощают молибден из среды, причём растущие клетки поглощают гораздо активнее, чем старые. Необходимая концентрация молибдена в виде соли для азотобактера - Na_2MoO_4 10-100 мг/л. Если почва нейтральная, то требуемая концентрация молибдена больше, чем для кислой почвы, так как соли молибдена здесь уже растворены и доступны микроорганизмам. Положительно влияние на азотофиксацию оказывает ванадий, он способен частично заменят молибден для некоторых азотфиксирующих микроорганизмов, но на Azotobacter он не влияет. Полезным, но не жизненно необходимым является Бор. В концентрации 0,005% он стимулирует размножение бактерии и процесс азотофиксации. Бром, в свою очередь, азотофиксацию угнетает.

Нефтяное загрязнение почв увеличивает процессы лизиса колоний азотобактера, снижает рост клеток микроорганизмов и их интенсивность в среде. Была проведена оценка качества нефтезагрязненных земель по лизису колоний азотобактера с помощью метода обрастания комочков почвы. Токсичность почв определяли по наличию стерильных зон на поверхности агара: из 25 комочков только на шести образовались колонии бактерий рода Azotobacter. Таким образом, было экспериментально установлено пагубное влияние наличия в почве продуктов нефти на рост колоний азотобактера [28].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и объект исследования

Материалом для данного исследования являлись образцы почв и культуры азотобактера, выделенные из них. Для исследования было решено использовать три абсолютно разных типа почв, чтобы проанализировать различия в численности и особенностях жизнедеятельности бактерии.

В процессе работы было исследовано 3 образца различных типов почв Пензенской области, и на каждом из образцов была выделена культура азотобактера (Рис. 4).

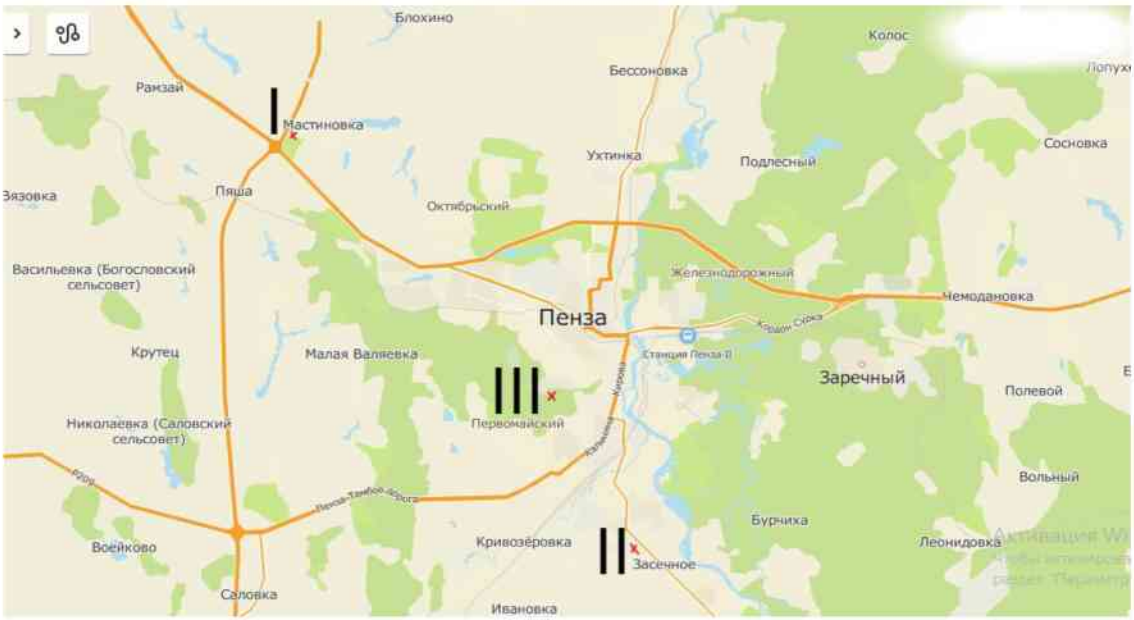

Рисунок 4. Карта Пензенской области. Отмечены места сбора проб почвы: I - Сильноокультуренный чернозем из теплицы (село Мастиновка); II - Образец, взятый возле АЗС; III - Образец, взятый в месте большого скопления людей (Олимпийская аллея)

Почва, взятая с территории АЗС, является самой загрязненной и отравленной продуктами антропогенной деятельности.

Почва из теплицы, соответственно, самая окультуренная. На ней выращивался урожай без применения каких-либо синтетических удобрений,

и регулярно осуществлялся уход: рыхление, внесение органических удобрений, систематический полив. Данный образец почвы не был загрязнен химикатами, в отличие от предыдущего.

Образец почвы с Олимпийской аллеи является «серединой», так как он не подлежал должному уходу, но и не был отравлен продуктами АЗС.

Уже было отмечено, что Azotobacter является индикатором окультуренности почвы, поэтому в данном исследовании благодаря трём совершенно разным образцам почвы, можно сравнить динамику роста культуры на каждом из образцов, и проанализировать взаимоотношения бактерий рода Azotobacter с природными токсинами при различных условиях.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Подготовка реактивов и питательных сред

Для выявления азотобактера в почве и определения его относительного содержания, применялся метод Виноградского на гелевых пластинах. Для этого гелевые пластины были пропитаны 3-5 мл питательной среды следующего состава (г/200 мл дистиллированной воды): маннит или тростниковый сахар – 20; K_2HPO_4 – 1; $MgSO_4*7H_2O$ – 0,5; NaCl – 0,5; $FeSO_4*7H_2O$ – 0,01; $MnSO_4*4H_2O$ - 0,01; $CaCO_3$ – 0,5.

После упаривания среды на поверхности геля раскладывали 50 комочков почвы по трафарету. Для этого брали 2 фламбированных часовых стекла, в одно из которых был помещен исследуемый образец почвы, а в другое налита дистиллированную воду. Далее концом стерильной палочки формировали небольшие почвенные комочки, диаметром около 2-х мм. Комочки помещали на поверхность гелевой пластины. Чтобы вырастить азотобактер, в среде обязательно должен отсутствовать связанный азот, и она должна быть аэробной. Эти условия обеспечивали элективность культуры.

Далее чашки с посевом помещали во влажную камеру. Если клетки азотобактера присутствовали в образце, то после 5-6 суток инкубации комочки почвы обрастают его колониями.

Чтобы установить, какая из исследуемых почв, богаче заселена азотобактером, проводили сравнительную оценку. Для каждого из образцов определяли степень обрастания азотобактером по отношению обросших колониями комочков почвы к общему числу комочков на чашке.

Со временем колонии могут менять окраску. Если окраска стала бурой, то это колония A. Chroococcum. Если колония образовала зеленый флуоресцирующий пигмент, то в зависимости от морфологических особенностей их относят или к A. agile (обитают в основном в воде), или к A. vinelandii.

Далее проводили микроскопирование и получение накопительной и чистой культуры азотобактера. Чтобы произвести микроскопирование, были приготовлены фиксированные окрашенные препараты, использовалась иммерсионная система.

Для того, чтобы получить накопительную культуры была приготовлена *жидкая среда Бейеринка* (г/л водопроводной воды): маннит или глюкоза – 20; K_2HPO_4 – 0,2; $CaCO_3$ – 5; смесь микроэлементов по Федорову – 1мл; $MgSO_4*7H_2O$ – 0,2.

Смесь микроэлементов по Федорову (г/л дистиллированной воды): H_3BO_3 – 5; $(NH_4)_2MoO_4$ – 5; KI – 0,5; NaBr – 0,52; $ZnSO_4*6H_2O$ – 0,2; $Al_2(SO_4)_3$ – 0,3.

В колбы Эрленмейера на 100 мл наливали по 30 мл жидкой среды для азотобактера и добавляли туда 1/3 чайной ложки исследуемого образца почвы. Колбы были помещены в термостат при 28- 30 градусах С. Если в образцах присутствовали клетки азотобактера, то через 5-6 дней инкубации на поверхности среды образовывалась пленка [26].

После проверки накопительной культуры под микроскопом, для выделения чистой культуры азотобактера, делали посев на агаризованную среду Эшби.

Элективная питательная *среда Эшби* следующего состава (г/л водопроводной воды): K_2HPO_4 – 0,2; $MgSO_4*7H_2O$ – 0,2; NaCl – 0,2; K_2SO_4 – 0,1; маннит – 20; $CaCO_3$ – 5. Вода водопроводная до 1 л.

Приготовленную среду (без маннита) стерилизовали автоклавированием при 1 атм. в течение 20 минут, после добавляли маннит и автоклавировали ещё 20 минут при 0,5 атм.

Для получения твердой питательной среды Эшби добавляли 20,0 агар-агара.

Добавляли смесь микроэлементов по Фёдорову (1 мл), которая содержит (г/л дистиллированной воды): H_3BO_3 – 5; $(NH_4)_2MoO_4$ – 5; KI – 0,5; NaBr – 0,52; $ZnSO_4*6H_2O$ – 0,2; $Al_2(SO_4)_3$ – 0,3.

Материалы и оборудование: гелевые пластины, пропитанные средой Виноградского для азотобактера (при отсутствии гелевых пластин используют жидкие питательные среды Виноградского или Бейеринка), часовые стекла, почва, палочки с оттянутым концом, цилиндры, колбы Эрленмейера на 100 мл. Микроскопы и все, что потребуется для микроскопирования [27].

2.2.2 Отбор почвенных проб

При сборе проб для исследования, использовалась чистая стерильная лопатка. Проба была отобрана с верхнего слоя почвы. Материал исследования был помещен в стерильную банку с ватной пробкой. Для каждой пробы была написана подробная этикетка, на которой указывали дату взятия образца и место.

2.2.3 Подготовка образца к микробиологическому анализу

На сухое стерильное предметное стекло выкладывали почву. Далее в пламени спиртовки фламбировали пинцет и удаляли им посторонние объекты, присутствующие в почве. Для того, чтобы работать было удобно, из уже очищенной почвы отбирали небольшие порции.

2.2.4 Выделение и идентификация выделенных культур Azotobacter

Используя в качестве посевного материала собранные образцы почвы, получали накопительные культуры Azotobacter. Для этого почву увлажняли и фламбированной микробиологической петлей в чашке Петри формировали 20 комочков на поверхности среды. Закрытые чашки помещали в термостат при 29 - 30°С на 2-4 суток. Вокруг сформированных комочков почвы образовывались слизистые колонии. Для проведения дальнейшего анализа их перемещали на скошенный агар. Данный метод позволяет воссоздать условия близкие к естественным, поэтому используется часто [17].

2.2.5 Определение чувствительности выделенных штаммов к различным антибиотикам

Для определения чувствительности выделенных штаммов азотобактера к различным антибиотикам можно использовать один из двух самых распространенных методов:

1. Метод бумажных дисков.

На питательный агар в чашку Петри делали посев микробов, в данном случае культуру Azotobacter. После того как взвесь микробов впитается в агар, при помощи пинцета на засеянную поверхность помещали бумажные диски с антибиотиками. Чашки Петри выдерживались в термостате в течение 18-24 часов при температуре 37°С. При этом антибиотики из дисков диффундировали, то есть проникали в агар [7].

По диаметру зон задержки роста азотобактера судили о чувствительности исследуемой культуры к данному антибиотику.

Преимуществом метода бумажных дисков является то, что можно одновременно определить чувствительность культуры сразу к нескольким видам антибиотиков, используя бумажные диски с разными антибиотиками (диски должны отличаться по цвету) [3].

Главный недостаток метода – его невозможно применить, если определяется чувствительность к антибиотику, который плохо диффундирует в агар [25].

2. Метод «канавки».

Данный метод был предложен А. Флемингом. В чашке Петри с питательным агаром была вырезана полоска агара шириной 1см. Это и есть «канавка», которую далее заполняли расплавленным агаром, смешанным с антибиотиком. После того как канавка застыла, чашки Петри помещали в термостат на 3-4 часа, для того, чтобы препарат из канавки диффундировал в окружающую его среду. Перпендикулярно канавке был сделан посев исследуемых культур (штрихами, от края до края чашки Петри). Далее проводили инкубацию в термостате в течение суток.

По интенсивности роста культуры анализировали результаты. Устойчивые штаммы микроорганизмов росли даже на поверхности канавки. В зависимости от чувствительности культуры к антибиотику, ее рост задерживался или вовсе прекращался на разных от канавки расстояниях [1].

Преимуществом данного метода является возможность определения чувствительности к антибиотику сразу нескольких культур микроорганизмов.

2.2.6 Определение чувствительности выделенных штаммов к действию других природных токсинов

Fusarium oxisporum var. cubense – патогенный гриб, паразитирующий на растениях.

Для того, чтобы определить присутствует ли антагонизм между азотобактером и представителем микромицетов можно использовать метод

«почвенного сэндвича». Метод был разработан Гессайоном для выявления в почве трихотецина – устойчивого к нагреванию антибиотика, выделяемого грибом Trichothecium roseum [24]. Суть метода заключается в том, что на газон микромицетов или рядом с ним помещали диски культуры бактерии.

В.С. Артамонова (2016) считает, что взаимоотношения азотобактера с фузариозными грибами неоднозначны. Штаммы азотобактера, выделенные из почв с техногенным загрязнением, в присутствии микромицетов этих же почв, не проявляли антифунгальный эффект. Однако эти же штаммы азотобактера в присутствии микромицетов, выделенных из контрольного участка, характеризовались ускоренным ростом и выраженным разрушением поверхности колонии грибов. Агрессивный характер азотобактера, в данном случае, обусловлен, скорее всего, приобретенной адаптацией к токсичной среде обитания.

Для культивирования фитопатогенных грибов р. Fusarium использовалась среда Чапека следующего состава: сахароза - 30 г/л, $NaNo_3$ - 2 г/л, K_2HPO_4 - 1 г/л, $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ - 0,5 г/л, KCl - 0,5 г/л, $FeSO_4 \times 7\ H_2O$ - 0,01 г/л, агар - 20 г/л [22].

Сначала осуществлялся посев бактерий на поверхность агаризованной среды соответствующего состава, которая была предварительно засеяна конидиями штамма грибов р. Fusarium. Далее в течение двух недель проводилось культивирование в термостате при температуре 28°С. В процессе культивирования отмечали рост бактериальных колоний, а вокруг них наблюдалась зона отсутствия роста гриба, за счет фунгицидных свойств азотобактера [21].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Выделение штаммов азотобактера

Выделение штаммов азотобактера из трех разных образцов почв было первым этапом работы.

В таблицах 1 и 2 представлены результаты первого этапа.

Таблица 1 – Учет обросших комочков на 5-й день после посева (20.10.20)

№ пробы	Общее число комочков	Число обросших комочков (шт.)	Число обросших комочков (%)
1.	25	23	92
2.	25	19	76
3.	25	20	80

Таблица 2 – Учет обросших комочков на 6-й день после посева (21.10.20)

№ пробы	Общее число комочков	Число обросших комочков (шт.)	Число обросших комочков (%)
1.	25	24	96
2.	25	19	76
3.	25	20	80

Проба №1 - образец почвы, взятый в с. Мастиновка;

Проба №2 – образец почвы с Олимпийской аллеи;

Проба №3 - почва с территории заправки ЛукОйл (район Терновка).

Число колоний азотобактера на 6-й день после посева увеличилось, Новообразовавшиеся колонии имели прозрачный или желтоватый цвет и выпуклую форму, за счет большого количества слизи.

Было отмечено, что при недостатке влаги колонии азотобактера перестают расти. Связано это с тем, что при недостатке влаги азотобактер теряет воду из собственных клеток и лишается возможности ее потреблять.

Дегидратация микроорганизмов приводит к тому, что предельно замедляются или совсем прекращаются все процессы метаболизма, таким образом происходит торможение жизнедеятельности культуры. Для того, чтобы колонии азотобактера продолжали расти, находясь в термостате, и жизнедеятельности бактерии ничего не угрожало, диски фильтровальной бумаги, помещенные на внутренней части крышки каждой чашки Петри, ежедневно смачивались дистиллированной водой.

Активность роста Azotobacter оценивали по размерам колоний на шестой день культивирования. Результаты определения размеров колоний азотобактера представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Размеры колоний Azotobacter, культивированных на разных образцах почвы

Критерий	с. Мастиновка	Олимпийская аллея	Заправка
Размер колоний, мм	2	3	1,5
	2	3	1,5
	2	3	1,9
	2	3,2	2
	2	3,2	2
	2	3,4	2
	2,1	3,4	2
	2,1	3,5	2
	2,1	3,5	2
	2,1	3,5	2,3
	2,2	3,5	2,5
	2,2	3,8	2,5
	2,2	4	3
	2,5	4,1	3
	2,5	4,5	3
	2,6	4,5	3,2
	2,8	4,6	3,5
	2,8	5	4,5
	2,9	5	4,5
	3,0	-	5
	3,0	-	-
	3,0	-	-

Продолжение таблицы 3

Размер колоний, мм	3,0	-	-
	-	-	-
Среднее арифметическое повторности	2,4	3,8	2,7

Для определения зависимости между образцами почвы и размером колоний был проведен дисперсионный анализ, результаты которого представлены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4 – Результаты однофакторного дисперсионного анализа

Группы	Счет	Сумма	Среднее	Дисперсия
Мастиновка	24	57,6	2,4	0,1530434783
Аллея	19	71,7	3,773684211	0,4409356725
Заправка	20	53,9	2,695	1,033131579

Таблица 5 – Результаты дисперсионного анализа

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Между группами	21,3396896	2	10,66984482	20,5939537	0,0000001551	3,1504113106
Внутри групп	31,0863421	60	0,518105702			
Итого	52,4260318	62				

Дисперсионный однофакторный анализ по выборкам показал, что уровень токсичности почвы (как фактор) достоверно оказывает влияние на рост азотобактерий ($\alpha = 0,05$).

3.2 Изучение культуральных признаков

Следующим этапом нашей работы являлось изучение культуральных признаков – морфологических особенностей образовавшихся колоний, клеток, физиолого-биохимических признаков выделенных штаммов, для определения принадлежности их к роду Azotobacter и конкретным видам. Результаты этих исследований приведены в таблице 6 и 7. Установлено, что выделенные штаммы бактерий из трех различных образцов почв по ключевым морфологическим и физиолого-биохимическим признакам относятся к роду Azotobacter, вид Azotobacter chroococcum.

Таблица 6 – Признаки выделенных штаммов Azotobacter

Проба почвы	Подвиж-ность	Пигмент	Использование углеводов (сахароза)	Цисты	Капсулы
№1	+	Темно-коричневый	+	+	+
№2	+	Темно-коричневый	+	+	+
№3	+	Темно-коричневый	+	+	+

Пигмент, придающий колонии коричневую окраску – водорастворимый пигмент меланин, характерный для вида Azotobacter chroococcum.

Таблица 7 – Морфологические особенности колоний Azotobacter

Проба почвы	Размер, мм	Форма	Характер контура края	Поверхность	Блеск/ прозрачность	Цвет	Диффузия пигмента в среду
№1	2-3	Круглая	Ровный	Гладкая	Блестящая мутная	Темно-коричневый	–
№2	3-5	Круглая	Волнистый	Гладкая	Блестящая мутная	Темно-коричневый	–
№3	1,5-5	Круглая	Волнистый	Гладкая	Блестящая мутная	Темно-коричневый	–

Для всех колоний была характерна слизистая консистенция, они прилипали и тянулись за бактериологической петлей.

Новообразовавшиеся колонии сначала были желтовато-прозрачными. Но культура, находясь в термостате, старела и приобретала характерную для вида Azotobacter chroococcum темно-коричневую окраску, т. к. образовывался пигмент – меланин.

Для изучения культуры под микроскопом из всех проб почвы были приготовлены фиксированные препараты, на которых обнаружены следующие особенности (Рис. 5, 6):

- Молодые колонии:

Морфология клеток: кокковидные и палочковидные.

Цвет клеток: розовый (окрашивание очень интенсивное т.к. была взята культура, образовавшаяся менее двух дней назад).

Тип клеток по Граму: грамотрицательные.

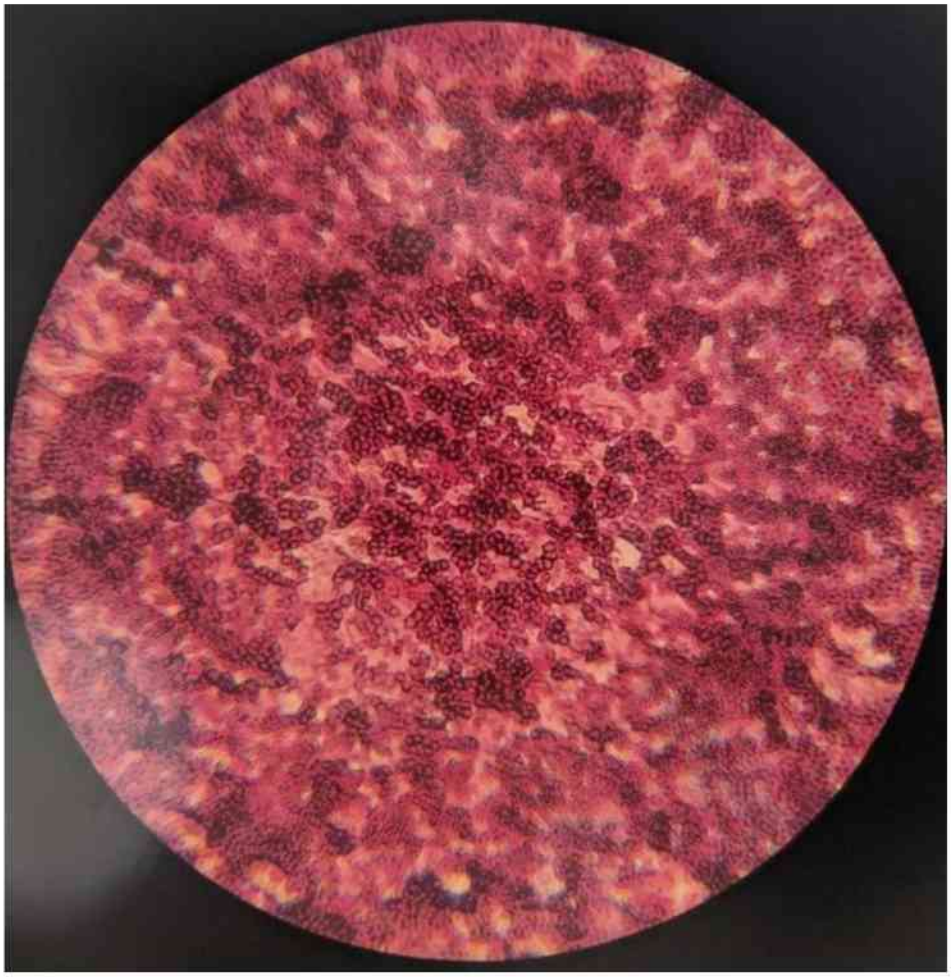

Рисунок 5. Фиксированный препарат Azotobacter chroococcum (молодая колония)

- Старые колонии

Морфология клеток: большинство кокковидные.

Цвет клеток: розовый (окрашиваются значительно хуже, т.к. культура старее).

Цвет колонии: темно-коричневый

Тип клеток по Граму: грамотрицательные.

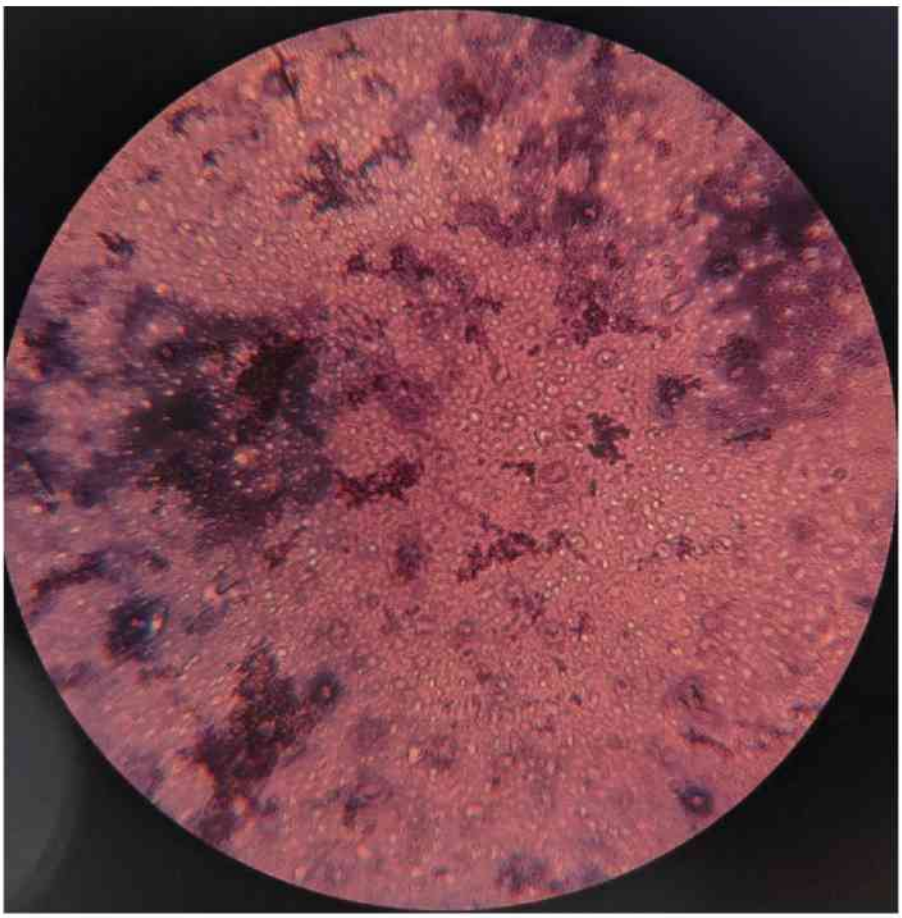

Рисунок 6. Фиксированный препарат Azotobacter chroococcum (более старая колония, которая уже приобрела темно-коричневую окраску)

Благодаря микроскопированию образцов разных по возрасту колоний было выявлено следующее:

а) В процессе старения клетки Azotobacter chroococcum приобретают кокковидную форму.

б) Лучше окрашиваются по Граму бактерии в молодых культурах.

Всего было приготовлено и окрашено по Граму 6 препаратов Azotobacter chroococcum: для изучения были взяты молодые и старые колонии из каждой пробы почвы. Отличий в морфологии, количестве клеток и их окрашивании между культурами, взятыми из разных проб, обнаружено не было.

3.3 Оценка резистентности

На третьем этапе работы проводился анализ уровней резистентности азотобактера к действию природных токсинов. Учитывалось то, что микроорганизмы в природе существуют в тесных ассоциациях друг с другом, испытывают взаимное влияние друг на друга и, в связи с постоянными изменениями условий внешней среды, физиологической изменчивостью самих микроорганизмов, их взаимоотношения динамичны. В процессе эволюции, у определенных видов микроорганизмов, населяющих почву, выработались определенные механизмы адаптации к условиям среды и к другим ее обитателям. Эти взаимоотношения регулируются продукцией стимулирующих или ингибирующих жизнеспособность веществ. Продукция антибиотических веществ может влиять на ассоциантов по-разному. Если адаптивные механизмы не были выработаны - оказывается пагубное влияние, вызывающее гибель микроорганизмов. Наличие адаптивных механизмов позволяет избежать последствий неблагоприятного воздействия.

Чувствительность вида Azotobacter chroococcum определялась к природным токсинам, продуцентами которых являлись микроорганизмы и грибы.

3.3.1 Антибиотики

Для анализа резистентности азотобактера к антибиотикам природного происхождения применялся метод “канавки”, предложенный А. Флемингом.

В чашке Петри была вырезана полоска шириной примерно 1см. В нее была залита среда Эшби, смешанная с антибиотиком. В качестве антибиотика для эксперимента использовался препарат Фитолавин, содержащий 32г/л стрептомициновых антибиотиков – препарат природного происхождения, произведенный почвенными микроорганизмами [2]. Перпендикулярно канавке был сделан посев азотобактера, предварительно выращенного на среде Эшби методом обрастания комочков почвы. Культура

«нанесена» на среду штрихами, от края до края чашки Петри (включая поверхность самой канавки).

Преимущество данного метода - возможность определения чувствительности к антибиотику сразу нескольких культур микроорганизмов. Таким образом, чтобы проанализировать особенности жизнедеятельности культуры Azotobacter Chroococcum, был сделан посев 3 культур азотобактера, выделенных из трех разных образцов почв.

Культура 1 - Azotobacter Chroococcum, выделенный из образца почвы, взятого в с. Мастиновка.

Культура 2 - Azotobacter Chroococcum, выделенный из образца почвы, взятого с Олимпийской аллеи.

Культура 3 - Azotobacter Chroococcum, выделенный из образца почвы, взятого с территории заправки ЛукОйл (район Терновка).

Далее была проведена инкубация в термостате в течение суток.

В результате данного эксперимента, было выяснено, что резистентность к определяемому антибиотику проявила культура №2. Колонии данной анализируемой группы выросли по всей длине штриха, сделанного при посеве, от края до края чашки Петри, включая область, зараженную фитопатогеном. Образец №3 рос активно, близко к "канавке" со стрептомицином, но не на самой ее поверхности. Слизистые колонии культуры №1 образовались вдали от патогена, их рост был наименее активным по сравнению с другими двумя исследуемыми образцами (Рис. 7).

Рисунок 7. Колонии азотобактера, культивированные на среде Эшби методом "канавки": 1 - Azotobacter Chroococcum, выделенный из образца почвы, взятого в с. Мастиновка; 2 - Azotobacter Chroococcum, выделенный из образца почвы, взятого с Олимпийской аллеи; 3 - Azotobacter Chroococcum, выделенный из образца почвы, взятого с территории заправки ЛукОйл (район Терновка)

Таким образом, наименее устойчивой к стрептомицину, оказалась культура №1 - Azotobacter Chroococcum, выделенный из образца почвы, взятого в с. Мастиновка. Бактерии данной экспериментальной группы не проявили резистентности по отношению к патогену, несмотря на то, что почва из с. Мастиновка - единственная окультуренная почва из всех трёх исследуемых образцов. Судя по зоне ингибирования, штамм бактерий данной анализируемой группы оказался чувствителен к антибиотику.

Культура №2, по итогам проведенного эксперимента, напротив, проявила устойчивость к стрептомицину. Можно предположить, что уровень резистентности Azotobacter Chroococcum, выделенного из образца почвы,

взятого с Олимпийской аллеи, к антибиотику, обусловлен приобретенной адаптацией к токсичной среде обитания. Вполне возможно, что адаптация азотобактера к загрязнению почв в местах большого скопления людей, обеспечивает им высокую встречаемость. Подтверждение данному предположению было найдено в статье В.С. Артамоновой "О состоянии почвенных азотфиксирующих бактерий на территории городского леса", 2016.

Культура №3 оказалась умеренно резистентной к стрептомицину. Azotobacter Chroococcum, выделенный из образца почвы, взятого с территории заправки ЛукОйл (район Терновка), рос и развивался достаточно активно, в непосредственной близости к канавке с фитопатогеном. Можно сделать вывод, что бактерии данной группы являются промежуточно-устойчивыми по отношению к антибиотику, используемому в ходе эксперимента.

Полученные в результате опыта данные, позволяют сделать вывод, что повышение токсичности почв в ходе антропогенного загрязнения, оказывает влияние на уровень резистентности азотобактера к патогенам, в данном случае - к стрептомицину. Обнаружено, что вид азотфиксирующих бактерий Azotobacter chroococcum способен вырабатывать адаптационные механизмы для выживания в условиях техногенного и антропогенного загрязнения почв.

3.3.2 Плесневые грибы

Для комплексной оценки устойчивости азотобактера к действию всего спектра токсинов, продуцентами которых являются патогенные грибы, был проведен эксперимент, поставленный на семенах злаковой культуры пшеницы. Семена были разделены на 2 группы: 1 группа - контроль (семена замачивали в воде), 2 группа - зараженные (семена замачивали в экстракте гриба Fusarium).

В две стерильные чашки Петри помещали 2 слоя фильтровальной бумаги, смоченной дистиллированной водой. В чашку №1 выкладывали

семена из контрольной группы (стерильные), в чашку №2 - зараженные семена. Далее обе чашки Петри были помещены в термостат при температуре 25^0 С и были выдержаны там в течение 4 суток. Через четверо суток измерялась длина корешков семян каждой группы. Также была взвешена общая масса семян в обеих чашках. Далее семена были снова помещены в чашки Петри по группам, на новую фильтровальную бумагу с добавлением 20 мл культуральной среды, содержащей Azotobacter chroococcum. Обе чашки были помещены в термостат на сутки. Через 24 часа снова были проведены замеры длины проростков в чашках №1 и №2 и была измерена их общая масса в каждой чашке Петри. После проведенных измерений семена были перемещены в чашки Петри, содержащие дистиллированную воду, для дальнейшего прорастания при естественном освещении в течение недели. Через 7 суток были сделаны замеры длины корешков, побегов и измерение общей массы, приходящейся на каждую исследуемую группу.

Морфологические изменения, происходящие с микромицетами рода Fusarium под воздействием метаболитов азотобактера, изучали с помощью микроскопа (Рис. 8).

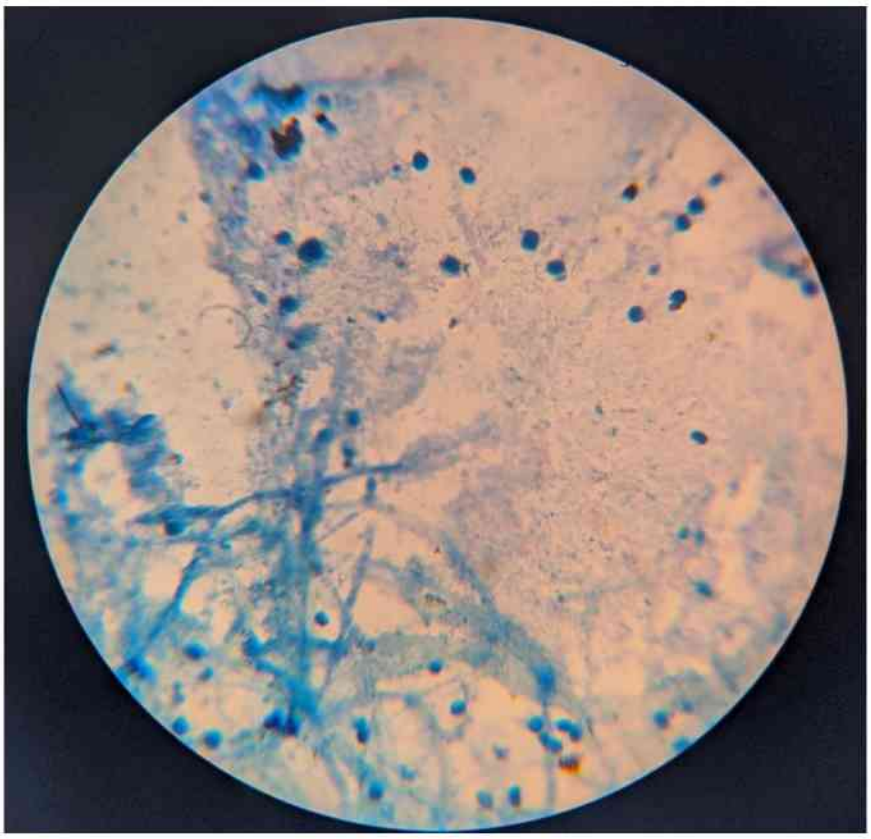

Рисунок 8. Мицелий гриба рода Fusarium. Фиксированный препарат, окрашенный метиленовым синим. Микроскопирование с объективом МИ-100

В результате исследования было выявлено, что культура Azotobacter chroococcum проявляет широкий спектр антагонистической активности в отношение фитапатогенного гриба рода Fusarium и задерживает его рост.

По итогу эксперимента, спустя восемь суток, максимальная длина проростков группы №1 (контроль), достигла 17 см, группы №2 - 12 см, в то время как проростки дополнительной группы №3 (семена, зараженные фузариозом, без добавления культуральной среды, содержащей азотобактер) остановились в росте еще на шестые сутки, их длина, в среднем, составляла всего 2,5 см.

Данные об измерениях средней длины корешков представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты измерения длин главных корней проростков пшеницы

№ экспериментальной группы	Средняя длина, см
1	8
2	6
3	2,5

В таблице 9 приведены результаты измерений длин проростков семян каждой из трех групп.

Таблица 9 – Результаты измерений длин проростков пшеницы

Критерий	Группа №1	Группа №2	Группа №3
Длина проростков, см	2	2	2
	3	2	2
	4	2	2
	5	3	2,4
	6	3	2,5
	7	5	2,5
	8	6	2,5
	13	10	3
	13	10	3
	15	10	3,5
	17	12	5

Для того, чтобы определить зависимость между средой и длиной проростков, провели однофакторный дисперсионный анализ (таблица 10, 11).

Таблица 10 – Результаты однофакторного дисперсионного анализа

Группы	Счет	Сумма	Среднее	Дисперсия
1	11	93	8,454545455	26,87272727
2	11	65	5,909090909	15,09090909
3	11	30,4	2,763636364	0,7745454545

Таблица 11 – Результаты дисперсионного анализа

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Между группами	178,785454545	2	89,39272727	6,274908533	0,005288754	3,3158295
Внутри групп	427,381818181	30	14,24606060			
Итого	606,167272727	32				

Дисперсионный анализ показал, что различия между вариантами достоверны при уровне значимости $\alpha = 0,05$.

Рост и развитие проростков группы №3 были ингибированы фитопатогенным грибом рода Fusarium. На восьмые сутки побеги потемнели и потеряли тургор. То же самое произошло бы с проростками группы №2, если бы в ходе эксперимента к ним не была бы добавлена культуральная среда, содержащая Azotobacter Chroococcum. Анализируя результаты эксперимента, можно сделать вывод, что бактерии рода Azotobacter проявили антагонистическую активность по отношению к фитопатогену и стимулировали рост и развитие как побегов, так и корневой системы пшеницы.

В научной литературе имеются схожие результаты по подобному эксперименту. Куаталиева Д.Т., анализируя антифунгальную активность микроорганизмов рода Azotobacter, определила, что 4 штамма бактерий рода

Azotobacter проявляют антагонистическую активность и задерживают рост микромицетов родов Alternaria, Stemphilium и Fusarium. При этом, автор подчеркивает, что наибольшую активность проявляет вид Azotobacter chroococcum [17].

На основании полученных данных можно предположить, что азотфиксирующие бактерии рода Azotobacter имеют определенные адаптационные механизмы, которые способствуют сохранению жизнеспособности в неблагоприятных условиях. Согласно результатам исследования, выделенный из природы штамм почвенной бактерии Az. chroococcum обладает способностью стимулировать всхожесть, рост и развитие наземной части и корневой системы Triticosecale. Показано, что штамм Azotobacter chroococcum обладает антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным микроорганизмам, задерживает их рост и увеличивает устойчивость сельскохозяйственных культур к различным заболеваниям [30].

Полученные в ходе эксперимента данные позволяют рекомендовать этот штамм бактерий для дальнейших испытаний на предмет использования его в составе микробных биопрепаратов для стимуляции роста растений, защиты их от вредителей и улучшения состояния почвы [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Во всех анализируемых пробах почвы при посеве на безазотистую среду Эшби был обнаружен рост колоний Azotobacter.

По ряду признаков (морфологическим, физиологическим, биохимическим), было установлено, что выделенные штаммы принадлежали виду Azotobacter chroococcum.

Почва различных территорий имеет различную осемененность Azotobacter. Наиболее богата бактериями этого рода окультуренная почва, взятая с территории с. Мастиновка. Меньше всего бактерий содержится в образцах, собранных на территории Олимпийской аллеи. Эти различия, видимо, связаны с различным плодородием и загрязнением почв разных участков.

Также необходимо отметить, что в ходе эксперимента с применением стрептомицина - антибиотика природных микромицетов, были обнаружены адаптационные механизмы, выработанные азотобактером к токсичным условиям окружающей среды. Максимальный уровень резистентности к стрептомицину показали образцы азотобактера, выделенного из антропогенно загрязненной почвы. Минимальную устойчивость к этому антибиотику проявили бактерии, обитающие в окультуренной почве.

Сравнив динамику роста культуры Azotobacter chroococcum в каждом из исследуемых образцов почвы, при взаимодействии с полным спектром токсинов микроскопического гриба Fusarium oxisporum на заражённых проростках пшеницы, было показано, что при бактеризации азотобактером ризосферы, угнетается развитие микроскопических грибов, задерживающих рост растений. Данный факт подтверждает, что взаимодействие бактерий рода азотобактер с фитопатогенами, является важнейшим фактором, оказывающим влияние на урожайность сельскохозяйственных культур [31].

В ходе работы, нами была отмечена и экспериментально подтверждена еще одна особенность взаимодействия культуры Azotobacter Chroococcum с высшими растениями. Выделенный штамм почвенной бактерии Az.

chroococcum обладает способностью стимулировать всхожесть, рост и развитие наземной части и корневой системы Triticosecale.

Суммируя полученные нами результаты и литературные данные, можно сделать вывод, что из-за интенсивного развития промышленного и сельскохозяйственного производства в значительной степени усилилось загрязнение почвенного покрова различными химическими веществами, что пагубно влияет на жизнедеятельность почвенных микроорганизмов, некоторым из которых удалось выработать адаптации, увеличивающие уровень резистентности к токсичности среды.

Данные, полученные нами в ходе работы, могут быть полезны для решения вышеописанной проблемы, так как мы подтвердили на практике, что внесение бактерий рода азотобактер в почву оказывает положительное влияние на рост и развитие растений сельскохозяйственного значения, и, в то же время, угнетает рост и развитие токсичных микроорганизмов.

Возможно, необходимо отказаться от применения химических веществ в сельском хозяйстве в больших количествах и заменить их на биопрепараты естественной почвенной микрофлоры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акименко Ю. В., Казеев К. Ш., Колесников С. И. Устойчивость микробоценоза чернозема обыкновенного североприазовского к загрязнению антибиотиками // Известия вузов. Северо - Кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2016. №1 (189). С. 39-44.
2. Акименко Ю. В., Казеев К. Ш., Колесников С. И., Козунь Ю. С., Мясникова М. А. Изменение биологических свойств чернозема обыкновенного североприазовского при загрязнении современными биоцидами // Известия Самарского научного центра РАН. 2016. №2-2. С. 276-279с
3. Акименко Ю. В., Казеев К. Ш., Колесников С. И., Минникова Т. В. Оценка устойчивости экологических функций почв к загрязнению антибиотиками // Известия Самарского научного центра РАН. 2017. №2-2. С. 207-210.
4. Артамонова В. С., Бортникова С. Б. О состоянии почвенных азотфиксирующих бактерий на территории городского леса // Вестник ПГУ. Биология. 2016. №2. С. 150-159.
5. Билай В. И. Токсинообразующие микроскопические грибы и вызываемые ими заболевания человека и животных / под ред. В. И. Билай, Н. М. Пидопличко. Киев: Наукова думка, 1970. 298 с.
6. Бойко А. К. Поражаемость сортов ярового ячменя фузариозом колоса / А. К. Бойко // Весці нацыянальнай акадэміі навук беларусі. Серыя аграрных навук. 2006. №5.
7. Буравцева Н. П., Аксенова Л. Ю., Рязанова А. Г. Методические подходы при определении чувствительности Bacillus anthracis к антибактериальным препаратам // Антибиотики и химиотерапия. 2009. №3-4. С. 6-10.
8. Влияние природного штамма Azotobacter Chroococcum на ростовые характеристики тритикале (Triticosecale) / О. Н. Жук, Я. С. Камельчук, Д. А. Грушевская, Г. А. Лагодич // Биотехнология: достижения и перспективы развития. Сборник материалов III международной научно-

практической конференции / под ред. К. К. Шебеко, 2018. Пинск: Полесский государственный университет, 2018. С. 72-75.

9. Гагкаева Т. Ю. Болезни сельскохозяйственных культур // Агроэкономический атлас России и сопредельных стран: экономические значимые растения, их болезни, вредители и сорные растения. 2011. URL: http://www.agroatlas.ru/ru/content/diseases/Hordei/Hordei_Fusarium (дата обращения: 05.11.2020).
10. Гриба фузариум биомасса: инструкция и применение / Государственный реестр лекарственных средств. Официальное издание: в 2 т. М.: Медицинский совет, 2009. Т.2, ч.1 - 568 с.; ч.2 - 560 с.
11. Гурьев Г. П. Влияние препаратов клубеньковых бактерий и комплексного микробного удобрения (КМУ) на симбиотическую азотфиксацию и урожай гороха // Научно–производственный журнал «Зернобобовые и крупяные культуры». 2017. №1 (21). С. 15 – 18.
12. Дубинина М. Н., Лыхман В. А. Влияние ризосферы почвы на ее микробиологическую активность // Эпоха науки. 2020. №21. С. 11-14.
13. Коваль С. Ф. Влияние корневой гнили на чувствительность пшеницы к неблагоприятным абиотическим факторам / С. Ф. Коваль, В. З. Рогинский // Сиб. Вестник с.-х. науки. 1977. Вып. 3. С. 44-51.
14. Колешко О. И. Азотфиксирующие бактерии (физиология развития). Минск: Издательство БГУ, 1981. 111 с.
15. Костычев П. А. Почвы Черноземной области России: переиздание работы 1886 г. М.: Сельхозгиз, 1989. 240 с.
16. Котляров В. В., Сединина Н. В., Донченко Д. Ю., Котляров Д. В. Системное использование препаратов на основе бактерий и грибов в защите растений и улучшении микробиологического состава почв // Научный журнал КубГАУ - Scientific Journal of KubSAU. 2015. №105. С. 636-647.

17. Куаталиева Д. Т. Активность микроорганизмов рода Azotobacter в почвах города Астрахани // Научно-методический электронный журнал «Концепт». 2017. Т. 39. С. 3876–3880.
18. Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2019» / Отв. ред. И. А. Алешковский, А. В. Андриянов, Е. А. Антипов. [Электронный ресурс]. М: МАКС Пресс, 2019.
19. Микробиология: учеб. Пособие / В. В. Лысак. Минск: БГУ, 2007. 430.
20. Микробиология: Учебник для студ. биол. специальностей вузов / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. 4-е изд., стер. М.: Издательский центр “Академия”, 2003. 464 с.
21. Нетрусов А. И. Практикум по микробиологии. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.
22. Препарат, влияющий на тканевой обмен и применение штамма гриба Fusarium sambucinum Fuckel var ossicolum (Berk et Curt) bilai для его получения: пат. 2040932 Рос. Федерация. №93057876/14; заявл. 21.12.1993; опубл. 09.08.95. 15 с.
23. Ризосферные бактерии / Н. В. Феоктистова [и др.] // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2016. Т. 158, кн. 2. С. 207–224.
24. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии. М.: Колос, 1983. 296 с.
25. Тапальский Д. В., Бильский И. А. Определение чувствительности к антибиотикам методом микроразведений в бульоне: модификация, доступная для всех // КМАХ. 2018. №1. С. 62-67.
26. Теппер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по микробиологии. М.: Дрофа, 2004. 256с.
27. Урюмцева Т. И., Кабдрасилова А. М. Разработка рецептуры питательной среды для культивирования бактерий azotobacter // Вестник АГАУ. 2019. №3 (173). С. 61-65.
28. Усачева Ю. Н. Функциональная активность и численность микроорганизмов в условиях нефтяного загрязнения почв // Вестник НВГУ. 2013. №3. С. 56-59.

29. Фёдоров М. В. Микробиология. М.: Сельхозиздательство, 1963. 448 с.
30. 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. 20.03.11, Бюл. №8. 7с.
31. Штамм бактерий Azotobacter chroococcum, обладающий широким спектром фунгицидного действия и биопрепарат на его основе: пат. 2 289 620 Рос. Федерация. № 2005129297/13; заявл. 21.09.05; опубл. 20.12.06, Бюл. № 35. 7 с.

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»

Утверждаю:
Зав. кафедрой
_____ Г.А. Карпова

«06» ноября 2020г.

Задание

По ВКР студента Кириченко Александры Алексеевны

Тема работы: «Действие природных токсинов на рост культур Azotobacter»

Утверждена приказом по Университету от «25» ноября 2020 г. № 883/о

Срок сдачи студентом законченной работы «31» мая 2021 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1.	Выбор темы и обоснование ее актуальности. Определение объектов изучения	ноябрь - декабрь 2020	выполнено
2.	Сбор и анализ литературных данных. Написание обзора литературы.	январь 2020	выполнено
3.	Изучение методик культивирования бактерий и подбор соответствующих природных токсинов.	февраль 2020	выполнено
4.	Подготовка реактивов и питательных сред. Отбор почвенных проб. Подготовка образца к микробиологическому анализу	март 2021	выполнено
5.	Выделение и идентификация выделенных культур Azotobacter	апрель 2021	выполнено
6.	Постановка эксперимента. Определение чувствительности выделенных штаммов к действию природных токсинов	апрель 2021	выполнено
7.	Анализ результатов эксперимента Подготовка доклада для защиты ВКР	май 2021	выполнено
8.	Проверка ВКР в системе «Антиплагиат»	май 2021	выполнено
9.	Сдача оформленных и переплетенных экземпляров ВКР	май 2021	выполнено

Дата выдачи задания «06» ноября 2020г

Руководитель _____ Заплатин Б.П.

Задание принял к исполнению _____