

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:

**«ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ НА РОСТ
AZOTOBACTER»**

Студент

Аношина Полина Владимировна

Руководитель

Заплатин Б.П.

Нормоконтролер

Клыченков С.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 16.06.24 № 14)

Заведующий кафедрой

Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой

(протокол заседания ГЭК от 26.06.24 № 1)

Секретарь ГЭК

Клыченков С.В.

Пенза, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Общая характеристика <i>Azotobacter</i>	6
1.1.1 Морфологическая характеристика	6
1.1.2 Таксономия <i>Azotobacter</i>	10
1.1.3 Азотофиксация	13
1.1.4 Биохимия азотфиксации	15
1.1.5 Минеральное питание	17
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	20
2.1 Материалы и объект исследования	20
2.2 Подготовка к культивированию микроорганизмов	21
2.3 Выделение и идентификация выделенных культур <i>Azotobacter</i>	23
2.4 Выбор минеральных удобрений для культивирования	25
2.5 Определение влияния различных минеральных удобрений на рост культуры <i>Azotobacter</i>	29
2.6 Подготовка посевного материала для оценки совместного влияния азотобактера и минеральных удобрений	30
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	32
3.1 Выделение чистой культуры азотобактера	32
3.2 Оценка влияния минеральных удобрений на рост <i>Azotobacter</i>	36
3.3 Оценка совместного влияния азотобактера и минеральных удобрений на прорастание зерновых культур	40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	46
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	49
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	52

ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе развития крайне актуальной является проблема использования высокотоксичных химических удобрений. Для её решения, альтернативой будет являться использование естественных источников биологических удобрений. Отказ от использования минеральных удобрений и переход к биологизации земледелия становится популярным направлением в последние несколько лет.

На активность почвенных бактерий оказывают влияние большое количество внешних факторов, в особенности различные способы внесения удобрений. Существуют различные мнения между исследователями, о длительном применении, как органических, так и минеральных удобрений, а также их сочетании. Некоторые считают, что при совместном внесении значительно возрастает количество почвенных микроорганизмов, грибов и актиномицетов, другие в свою очередь выдвигают такое мнение, что рост бактерий увеличивается, но численность микроскопических грибов значительно уменьшается. Поэтому необходимость исследования влияния способов удобрения сельскохозяйственных культур на почвенные бактерии, с учётом всех особенностей почвенно-климатических условий, остается актуальной.

Процесс азотфиксации является одним из ключевых микробиологических процессов. В конечном итоге происходит восстановление азота в доступную для усвоения организмов форму, что вносит значительный вклад в гомеостаз азота в биосфере. В настоящее время известно достаточно много свободноживущих азотфиксирующих бактерий, одни из которых микроорганизмы, относящихся к роду *Azotobacter*. Эти бактерии широко распространены в различных средах обитания и играют значительную роль во многих сферах. Одной из них является использование представителей рода *Azotobacter* в составе биопрепаратов как в виде монокультуры, так и в консорциумах с представителями *Clostridium*,

Pseudomonas, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Agrobacterium* и представителями клубеньковых бактерий семейства *Rhizobiacea*.

Azotobacter оказывает положительное действие на состав почвы, а также способствует росту и развитию растений.

Бактерии рода *Azotobacter* способны выделять в окружающую среду: соединения азота, фитогормоны (ауксины, гиббереллины, цитокинины), витамины группы В, противогрибковые антибиотики, полисахариды.

Цель исследования: изучить действие минеральных удобрений на жизнеспособность штаммов *Azotobacter*.

На основании поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Определить оптимальную питательную среду для культивирования *Azotobacter*;
2. Провести выделение и идентификацию различных штаммов *Azotobacter* в различных видах почв;
3. Выявить ростовые активности выделенных штаммов;
4. Выделить чистую культуру *Azotobacter*;
5. Изучить влияние минеральных удобрений на жизнеспособность штаммов *Azotobacter*;
6. Произвести сравнительный анализ выделенных штаммов *Azotobacter* и промышленного штамма *A. chroococcum*.

Объектом исследования являются штаммы *Azotobacter*, выделенные из различных видов почв.

Предметом исследования выступает степень воздействия минеральных удобрений на активность роста штамма *Azotobacter*.

Научная новизна работы состоит в:

- определение биоразнообразия штаммов *Azotobacter*, выделенных из различных видов почв на основе анализа культуральных и биохимических характеристик;

- исследование действия различных концентраций минеральных удобрений на активность роста клеток *Azotobacter*;

Практическая значимость работы - при проведении сравнительного анализа выделенных чистых культур *A. chroococcum*, были выявлены наиболее активно растущие штаммы с высокой устойчивостью к высоким концентрациям минеральных удобрений.

В ходе проведения эксперимента была получена статистика, данные которой четко показывают влияние различных минеральных удобрений на почвы, в которых содержатся жизнеспособные и активные культуры клеток *A. chroococcum*, обитающие в различных почвах

Для раскрытия поставленной темы определена следующая **структура**: работа состоит из введения, 3 глав, заключения и списка литературы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика *Azotobacter*

1.1.1 Морфологическая характеристика

Azotobacter spp. — это грамотрицательные, аэробные и гетеротрофные бактерии. Они являются несимбиотическими азотфиксаторами, которые способны работать при нормальном атмосферном парциальном давлении кислорода. *Azotobacter spp.* имеет самую высокую скорость метаболизма среди других микроорганизмов. Представители рода *Azotobacter* в высшей степени разнообразны, многие из которых вырабатывают различные пигменты, желто-зеленого, красно-фиолетового или коричневатого-черного цвета. Азотобактеры характеризуются морфологически - большим размером и изменчивой формой их клеток, которые иногда напоминают дрожжи или одноклеточные водоросли, а физиологически строго аэробным образом жизни и обильным ростом на соответствующих средах, не содержащих комбинированного азота; их рост в обычных средах таких, как пептонный бульон с мясным экстрактом и агар, слабый или даже отсутствует.

Наиболее известными видами рода являются *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. chroococcum*, *A. armeniacus*, *A. paspali*, *A. salinestrus* и *A. nigricans*.

Морфология *Azotobacter* в конкретно чистых культурах удивительно изменчива, и, по-видимому, существует общее согласие в том, что встречаются следующие типы клеток:

1. Тупо-палочковидные или овальные клетки, размером примерно 2 x 4 мкм. Размер подвержен большим колебаниям и является самым большим у *A. agile*.

2. Приблизительно шаровидные клетки или несколько диаметром 2-3 мкм, в коротких цепочках или кучках, возникающих путем укорочения палочковидных клеток. Клетки типов 1 и 2 могут быть приняты за "типичные" клетки азотобактера, показанные на молодых культурах в благоприятных средах без азота, а также в почве [14, 15, 16].

3. Более мелкие палочковидные или сферические клетки, иногда менее одного диаметра, возникающие в стареющих культурах или при особых условиях питания. Процесс, который Виноградский [16] назвал "наноцитоз", приводит к образованию этих клеток.

4. Покоящиеся клетки (цисты), приблизительно сферической формы, со сжатой цитоплазмой и двухконтурной клеточной стенкой. Их образование, по мнению Виноградскому [16], благоприятствуют простые органические соединения, например, бутанол, как источники углерода, и может постоянно подавляться культивированием на средах с глюкозой или маннитом. По крайней мере один вид, *A. agile*, не образует цист и, вероятно, по этой причине также отсутствует устойчивость к высушиванию, которая в противном случае так характерна для других представителей рода [16].

5. Крупные, часто неравномерно вздутые или нитевидные клетки. Они играют важную роль в дискуссиях о плеоморфизме у азотобактера и были описаны как "гонидангии" Люхнсом и Смитом [13]. Их природа пока не ясна, но в целом они, по-видимому, возникают в условиях питания, отличных от условий в простых средах с азотом, или вообще под влиянием неблагоприятной среды [16, 19, 20, 21, 22]. Ден Дурен де Йонг [19] дал очень подробное описание множества причудливых клеточных форм *A. chroococcum*, включая иногда огромные раздутые клетки, возникающие на средах с комбинированным, особенно органическим, азотом. Виноградский [16] рассматривал вышеупомянутые типы клеток 1-4 как единственные нормальные, которые наблюдаются только в средах, напоминающих естественную среду обитания азотобактера (почва и вода); возникновение больших набухших клеток азотобактера на средах с глюкозой или маннитом интерпретировали как гипертрофию "одомашненных" азотобактеров, которые стали адаптированными к "хорошим" питательным веществам, не представленным в их естественной среде. Айзенштарк и другие [21] однако, отметили, что "в природе, конечно, азотобактер не существует в среде без азота, как это происходит в лабораторных искусственных культурах". Смит (*J.*

Gen. Microbiol., 11, vii, 1954) обнаружил разновидность *A. agile*, которая появляется исключительно в виде гигантских клеток. Поведение крупных клеток при переносе на свежую среду было описано несколько иначе. де Регель [17] интерпретировал разбухшие клетки *A. chroococcum* как инволюционные формы, неспособные к размножению, в то время как Айзенштарк и другие [21] обнаружили, что аналогичные клетки *A. agile* прорастали с регенерацией нормальных клеток и были столь же жизнеспособны, как и эти. Дондеро и Зелле [23] описали более сложную схему развития: крупные клетки *A. agile* редко были жизнеспособными. *A. agile* редко были жизнеспособными, а если и были, то они либо воспроизводили свой тип, либо возвращались к нормальным; те либо оставались неизменными, либо иногда возвращались к производству больших клеток. Этот процесс был приписан сегрегации ядерного материала в больших клетках, которые должны были быть гетерокариотическими. Клетки азотобактера часто содержат гранулярные включения, частично жир и волютин [18, 24], частично тела неизвестной пока природы. Хроматин, материал, окрашиваемый по методу Робиноу, безусловно, присутствует, по крайней мере, на некоторых стадиях роста [20, 21, 22, 23], а Биссет и Хейл [25] утверждают о существовании везикулярного ядра у *A. chroococcum*.

Большинство азотобактеров обладают жгутиками, но только *A. agile* и *A. tinelandii* демонстрируют заметную подвижность. Расположение жгутиков вызывает много споров, но, по-видимому, оно латеральное, как показали электронно-микроскопические наблюдения Хофера [21] и Красильникова и др. [26]. Последние авторы упоминают *A. nigricans* с необычной кольцеобразной конфигурацией жгутиков. Деркс [27] описал водный организм *A. insigne*, который, как утверждается, имеет постоянно полярные жгутики.

Простое бинарное деление, по-видимому, является нормальным способом размножения у видов *Azotobacter* и рассматривалось Виноградским [16] как исключительное в средах без азота с простыми источниками углерода (низшие спирты и органические кислоты). В качестве дополнительного

способа размножения в гипертрофированных клетках, возникающих на средах с глюкозой или маннитом, происходит почкование, сходное с таковым у дрожжей [21, 22]. Вероятно, это "экзоспорообразование", описанное Люхнисом и Смитом [13]. Цисты, по-видимому, прорастают путем локального растворения клеточной стенки, после чего цитоплазма выходит наружу и приобретает палочковидную форму, характерную для молодых культур [22]. Размножение эндогенно продуцируемыми гонидиями [17, 25] все еще остается нерешенным вопросом, и не было найдено никаких доказательств существования фильтрующей стадии в клетках *Azotobacter* [27]. Изображения "конъюгационных клеток", которые Люхнис и Смит [13] рассматривали как свидетельство половых процессов, были объяснены как стадии незавершенного деления клеток [23]. E. J. Petersen (частное сообщение) недавно обнаружил прямые доказательства слияния клеток у *A. chroococcum*.

Остается добавить, что Ден Дурен Де Йонг [19] не нашел никаких доказательств существования бактериофагов у азотобактера, хотя и считал их появление вероятным.

В экстремальных условиях *Azotobacter* также может образовывать небольшие круглые толстостенные цисты. Циста азотобактера представлена центральным телом (клетка похожая на вегетативную, но более меньшего размера и имеющая большое количество вакуолей) и двухслойной оболочкой, внутренняя часть которой называется интима и имеет волокнистое строение, а внешняя называется экзина и представлена ровной, отражающей структурой, имеющей гексагональное кристаллическое строение.

Для фиксации азота большинству азотфиксирующих бактерий требуются анаэробные условия. У этих микроорганизмов кислород не только инактивирует фермент нитрогеназу, но и подавляет гены, участвующие в фиксации азота. С другой стороны, они обладают уникальной способностью фиксировать азот аэробным способом. Теория "защиты органов дыхания" является наиболее широко признанным объяснением устойчивости

Azotobacter к кислороду и азотфиксации (Robson and Postgate, 1980; Das, 2019). Микроорганизмы рода *Azotobacter* обладают одним из самых высоких респираторных показателей среди всех изученных биологических систем, чему способствует высокий уровень цитохрома d. Помимо пути, опосредуемого железомолибдендинитрогеназой (*nif*), у некоторых видов *Azotobacter* существуют и другие альтернативные пути фиксации азота. Эти альтернативные пути опосредуются железованадиевой динитрогеназой (*vnf*) и железодинитрогеназой (*anf*). Обнаружено, что превращение азота в аммиак выше при фиксации азота, опосредованной *nif*, а не альтернативными путями *vnf* и *anf* [24].

1.1.2 Таксономия *Azotobacter*

Azotobacter легко распознается как род, дифференциация на виды не столь очевидна. Два оригинальных вида Бейеринка, *A. chroococcum* и *A. agile*, остались неоспоримыми. *A. woodstownii*, *A. hilgardii* и *A. smyrnii* не определены четко и, вероятно, представляют собой разновидности *A. chroococcum*. *A. vitreum*, который должен был характеризоваться постоянной шаровидной формой, неподвижностью и отсутствием пигмента, позже был признан разновидностью *A. agile*. Асо и Йошида обнаружили, что он серологически отличается от других азотобактеров, а его способность связывать азот кажется настолько незначительной, что могут возникнуть сомнения в том, что он вообще является азотобактером. Некоторые совсем недавно описанные виды до сих пор настолько мало известны, что возможность их исследования не используется. К ним относятся *A. insigne* Derx, водный организм с полярными жгутиками, и два других, упомянутых Красильниковым и др.: *A. nigricans* и *A. fluorescens* [5, 13].

Таким образом, у нас остаются четыре вида, которые могут претендовать на право считаться обоснованными: *chroococcum*, *beijerinckii*, *vinelandii* и *agile*. *A. beijerinckii* часто рассматривают как разновидность *A. chroococcum* [6]. По Липману он должен характеризоваться желтым пигментом и склонностью к образованию стрептококкоподобных цепочек.

Формирование пигмента, однако, не дает четкого разделения, поскольку любая более крупная коллекция штаммов, как указывает Виноградский, будет демонстрировать довольно широкий спектр, охватывающий каждый оттенок от очень светлого до темно-коричневого или почти черного, и, кроме того, это подвержены мутационным изменениям, иногда проявляющимся образованием белых секторов в нормально пигментированных колониях [9, 10].

Клюйвер и ван Риннен обратили внимание на больший размер клеток у *A. beijerinckii*, но остается неясным, выходит ли это, а также склонность к образованию цепочек, в диапазон вариаций штаммов [27]. Асо и Йошида считали его серологически идентичным *A. chroococcum*. Однако представляется возможным сохранить название *A. beijerinckii* для группы штаммов, характеризующихся неподвижностью и желтоватым, а у некоторых штаммов белым ростом на агаре [18,27] Эти штаммы также иногда лишены образования цист и гидролиза крахмала, обладают несколько большей устойчивостью к кислой реакции, и кажутся серологически отличными от *A. chroococcum* (E.J. Petersen, личное сообщение).

Два оставшихся вида, *A. agile* и *A. vinelandii*, явно отличаются от предыдущих своей активной подвижностью, образованием водорастворимых флуоресцентных пигментов и обитанием на поверхности грунта [11]. Лёнис и Смит считали их одним видом (*A. agile*), и это предложение было принято в последнем издании Руководства Берджи [6]. Клюйвер и ван Риннен, с другой стороны, считали их разными видами по морфологическим признакам: более крупные, более округлые и более прозрачные клетки *A. agile*. Виноградский [15] добавил характер образования цист, который имел место у *A. vinelandii* (хотя мог быть утрачен при длительном культивировании на богатой среде), но никогда не наблюдался у *A. agile*. Ввиду этого различия Виноградский предложил поместить *A. agile* в качестве единственного вида нового рода *Azotomonas* (использование *Azotomonas* Орла-Йенсеном в качестве нового родового названия *Azotobacter* было проигнорировано Виноградским).

Чан разделял точку зрения Виноградского, но по лингвистическим соображениям он заменил название *Azotococcus* на *Azotomonas*, заявив: "Это общее название не подходит, потому что *azo* по-французски не означает азот". Предложение Виноградского и Чана об отдельном роде, основанном на отсутствии кист, трудно принять, поскольку у разновидностей *A. beijerinckii* [5] также может отсутствовать образование кист, но это свойство вместе с различиями в размере и форме клеток вполне может служить для дифференциации между *A. agile* и *A. vinelandii*. Следующий ключ к виду *Azotobacter* тогда можно предположить:

- Слабоподвижные или неподвижные организмы, образующие нерастворимые пигменты от желтого до темно-коричневого. Типичные обитатели почвы.
 - a. Подвижный, пигмент от светло- до темно-коричневого *A. chroococcum*.
 - b. Неподвижные, с желтым пигментом или без него: *A. beijerinckii*.
- Энергичные организмы, образующие растворимые пигменты от зеленовато-желтого до фиолетового цвета, иногда [15] отсутствуют. Типичные обитатели воды.
 - a. Палочковидные клетки, образующие цисты: *A. vinelandii*.
 - b. Очень крупные клетки от овальной до круглой формы, без кист: *A. agile*.

Вариабельность штамма и специфичность штамма в *Azotobacter* оставляют много материала для будущего исследования, и до тех пор, пока они не будут проработаны более полно, концепция вида, вероятно, будет оставаться подверженной той диффузности, которая находит свое выражение в таких терминах, как "*var.* атипичные", "разновидности ацидотолеранов" и "разновидности ахромогенных генов" [18]. Несомненно, значительное расширение наших знаний могло бы быть достигнуто путем изучения специфического поведения штаммов, недавно выделенных из почвы, как предписано Виноградским, принимая во внимание природу и степень

морфологических и биохимических изменений, которые претерпевают такие "дикие" штаммы *Azotobacter* может подвергаться культивированию в лабораторных средах. Работа Грина и Уилсона по метаболизму нитратов является заслуживающим внимания шагом в этом направлении.

1.1.3 Азотофиксация

Только ограниченное число простых азотных соединений, по-видимому, доступно для азотобактера в дополнение к свободному азоту. Большинство ранних экспериментов в этой области не дали результатов, поскольку фиксация азота в присутствии комбинированного азота не всегда рассматривалась и не всегда использовались адекватные среды. Хорнер и Эллисон обнаружили, что *A. chroococcum* использует только аммиак и соединения, легко превращающиеся в это соединение, если исключить свободный азот. Нитрат, нитрит, мочевины, аденин, аспарагин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты были легко доступны, а гуанин, айлантоин, цитозин и урацил - в незначительной степени. Оксиды и закись азота недоступны, а гидроксилламин токсичен даже в небольших концентрациях [4, 5, 12]. Ассимилируемые органические соединения азота, за исключением мочевины, используются менее охотно, чем аммиак, нитраты и свободный азот, по мнению Грина и Уилсона. Три последних соединения, таким образом, представляют наибольший интерес, не в последнюю очередь с экологической точки зрения.

Аммиак [4, 12] доступен без адаптации. Он оказывает немедленное ингибирующее действие на фиксацию азота и, по-видимому, является ключевым соединением этого процесса, где он вступает в реакцию с α -кетоглутаровой кислотой с образованием глутаминовой кислоты в качестве основной аминокислоты.

Нитрат (и нитрит) демонстрируют несколько более сложные взаимоотношения, поскольку его использование зависит от предыдущей адаптации. Эксперименты, проведенные Уилсоном [12], показали, что адаптированные клетки *A. vinelandii* используют нитрат практически

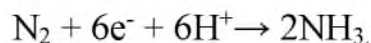
полностью, исключая свободный азот, и что адаптация происходит быстро у этого вида. В экспериментах по стационарному росту Бортелс и Гомер и Эллисон нашли доказательства того, что *A. chroococcum* фиксирует определенное количество азота в нитратной среде с достаточным количеством молибдена. Очевидное разногласие, возможно, находит свое объяснение в недавних экспериментах Грина и Уилсона, которые показали, что адаптация к нитрату происходит с разной скоростью у разных штаммов. Они сообщили, что один штамм *A. agile* и один *A. chroococcum*, свежевыделенные из почвы, были не способны утилизировать нитрат, хотя последний мог производить нитрат-утилизирующие мутанты.

Фиксация азота обычно связана с пролиферацией клеток и приводит, как известно, к приросту примерно 15-16 мг азота на грамм потребленной глюкозы, сахарозы или маннита при оптимальных условиях, но не более 20 мг. Специфичность штамма в определенной степени влияет на прирост, но особенно на скорость фиксации азота.

Большая часть азота, фиксируемого азотобактером, присутствует в виде клеточного вещества, хотя азотистые соединения обычно выделяются во время активного роста. По оценкам *Robberg* и *Horner* и *Burk*, внеклеточный азот составляет от 10 до 25% от общего количества в молодых культурах [20, 21, 26]. Количество значительно увеличивается, когда среда истощается энергетическим материалом и происходит автолиз; оно также варьирует у разных видов и зависит от состава среды. Бартельс даже обнаружил почти 40% внеклеточного азота в 4-дневных культурах *A. vinelandii* на среде с низким содержанием железа. Выделяемый азот, по-видимому, присутствует главным образом в виде высокомолекулярных соединений, доступен некоторым бактериям, растущим в ассоциации с азотобактером, и включает небольшие количества тех более простых азотных соединений, которые занимают столь видное место в дискуссиях о механизме фиксации азота, а именно: аспаргиновую кислоту и следы гидроксиламина, свободного или связанного в виде оксима.

1.1.4 Биохимия азотфиксации

В основе биохимического механизма фиксации молекулярного азота воздуха лежит процесс восстановления азота, в котором непосредственное участвует нитрогеназа и проходит это по уравнению:



Нитрогеназа представляет собой комплекс двух белков - азотоферредоксин (*Fe*-белок) и молибдоферредоксин (*MoFe*-белок). Нитрогеназы, выделенные из разных организмов, осуществляющих азотфиксацию, различаются как по содержанию металлов, так и по молекулярной массе. Данные комплексы участвуют в активации молекулярного азота. Ключевую роль в этом процессе играют молибден- и железосодержащие центры, по которым происходит передача электронов от восстановителя. Кроме того, близость группировок серы также способствует осуществлению данной реакции [5, 7].

В результате активации и хемосорбции азота нитрогеназой происходит высвобождение энергии и разрыв двух связей в молекуле азота (рис. 1).

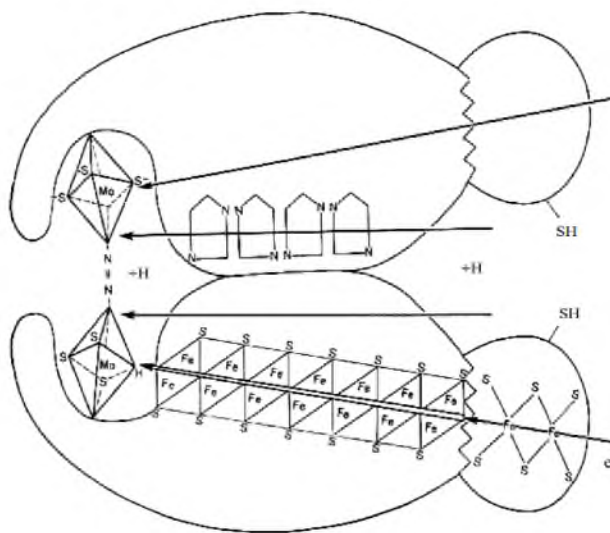


Рисунок 1. Механизм активации азота ферментом нитрогеназой.

В. Е. Шилов и Г. И. Лихтенштейн.

Особенность функционирования нитрогеназы заключается в том, что такой процесс осуществляется только в анаэробных условиях. В связи с таким условием многие микроорганизмы, фиксирующие азот, являются облигатными или факультативными анаэробами, либо растут в анаэробных условиях, либо имеют специализированную систему защиты нитрогеназы от кислорода и растут в нормальных условиях.

Также особо важными процессами являются формирование систем защиты нитрогеназы от кислорода, ассимиляция продуктов азотфиксации, а также обеспечение энергетических потребностей нитрогеназного комплекса.

Как уже говорилось выше многие азотфиксаторы имеют специальные механизмы защиты нитрогеназы, у представителей рода *Azotobacter* их целых два: дыхательная и конформационная защиты [3, 5, 7].

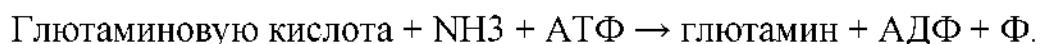
Азотобактер имеет очень развитую дыхательную систему с множеством разветвлений. В одной из ветвей цепи переноса электронов есть три пункта, где происходит процесс фосфорилирования, а в двух других ветвях лишь по одному. Именно поэтому, когда концентрация кислорода повышается, скорость дыхания микроорганизмов может значительно увеличиваться, в связи с тем, что фосфорилирование частично разобщается. В результате такого процесса редуцированные нуклеотиды (NADH_2) теряются, а нитрогеназа, необходимая для фиксации азота, защищается от повреждений кислородом. Такой механизм называется дыхательной защитой [6].

Механизм конформационной защиты работает по следующему пути: при внезапном увеличении концентрации кислорода нитрогеназный комплекс у азотобактера “выключается”, такая защита достигается за счет конформационных изменений в молекуле нитрогеназы и ассоциации с защитными белками. При снижении концентрации кислорода, нитрогеназный комплекс снова активируется.

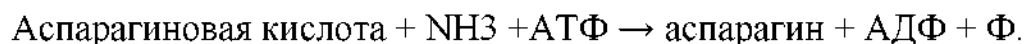
Растения потребляют аммиак, который образуется в процессе азотфиксации или восстановления нитратов в почве. Данный процесс

осуществляется с помощью ферментов, связанных с биосинтезом первичных аминокислот.

Одной из таких аминокислот является глутаминовая. Под действием фермента глутаминсинтетазы, которая принимает участие в присоединении аммиака к глутаминовой кислоте с образованием ее амида и последующим использованием в реакциях синтеза азотсодержащих органических соединений:



Аналогично протекает и процесс присоединения аммиака к аспарагиновой кислоте под действием аспарагинсинтетазы:



В результате таких реакций азот в виде аминогрупп вступает в биосинтетические реакции, которые направлены на поддержку жизнедеятельности организмов.

1.1.5 Минеральное питание

Фосфор, сера, калий, кальций, магний и железо, а также молибден являются необходимыми питательными веществами для азотобактера. В этой области существует значительная неопределённость, поскольку многие эксперименты проводились с использованием сред неоптимального состава. Кроме того, не всегда проводилось различие между скоростью и величиной роста. *Krzemieniewaka* [10] впервые провела количественное исследование общих минеральных потребностей *A. chroococcum* (выращенного только со свободным азотом). Было установлено, что для оптимальной фиксации азота (13-15 мг/г глюкозы) в растворе с гуминовой кислотой в качестве активатора роста необходимы следующие количества, приведенные в таблице 1.

Таблица 1- Количественное соотношение элементов в растворе глюкозы, для активации роста азотобактера.

Элементы	Необходимое количество, мг/г
P (K_2HPO_4)	2.46
S (K_2SO_4)	0.49
K (K_2SO_4)	0.38
Ca ($Ca(H_2PO_4)_2$)	0.36
Mg ($MgSO_4 \times 7H_2O$)	0.35

Таким образом, фосфор требуется в самом большом количестве. Также кроме неорганических фосфатов, используется фосфор, содержащийся в глицерофосфате и 1,6-гексозодифосфате [8, 10, 12], что, по-видимому, обеспечивает более высокую скорость роста.

Burk и *Lineweaver* [20] установили, что кальций можно заменить только стронцием, и что для оптимального роста на свободном азоте он необходим в количестве от 0,40 до 1 мг/л. Существует много разногласий по поводу его необходимости в процессе роста в сочетании с азотом. Однако многие [16] утверждают, что он не требуется для усвоения нитратов или аммиака. *Burk* и *Horner* [19], в свою очередь, пришли к выводу, что для нормального роста в случае использования свободного азота, нитратов, аммиака или аспарагина необходимы равные концентрации кальция. Однако точная физиологическая функция кальция до сих пор остаётся неизвестной.

Horner и *Burk* [19] установили, что магний требуется в равных количествах независимо от источника азота. Они обнаружили, что для оптимального роста *A. chroococcum* требуется не менее 0,56 - 0,80 мг/л магния, что является высоким значением для граммотрицательного организма.

Магний, играет роль активатора фосфорилирования у азотобактера. Это означает, что данный элемент может быть активен на разных стадиях дыхания

[12]. Поэтому логично предположить, что высокая потребность в магнии может быть связана с интенсивной дыхательной активностью, которая требует высокой концентрации фосфорилирующих ферментов.

Марганец, который замещает магний во многих ферментативных процессах, используется и азотобактером. *Stone* и *Wilson* [12] обнаружили, что магний безусловно необходим для окисления ацетата, но заменяется марганцем при окислении малата и фумарата бесклеточными экстрактами *A. vinelandii*. *Nilsson* и др. [22] обнаружили, что магний и марганец вызывают одинаково хороший рост *A. chroococcum* в экспериментах. Однако рост при использовании марганца характеризовался более длительным периодом. Эксперименты, которые проводились в менее продолжительные сроки [12, 19] показали, что рост, индуцированный марганцем на среде без магния, был сильно замедлен. Исходя из этого можно было сказать, что марганец не является эквивалентной заменой магния. Четких доказательств адаптации азотобактера к марганцу обнаружено не было.

Молибден - элемент, который вызывает достаточно много интереса в отношении использования его азотобактером. *Bortels* впервые показал, что он активирует фиксацию азота у *A. chroococcum* [17, 20, 23]. Он оказывает стимулирующий эффект для роста *A. chroococcum* и *A. vinelandii* свободным азотом. И всё же, молибден не является уникально специфичным для фиксации азота, поскольку он также способствует росту с нитратом, но не с аммиаком [26].

Существенность других элементов для азотобактера остается неясной. По данным *Plaut* и *Lardy*, марганец активирует оксалацетат декарбоксилазу *A. vinelandii* сильнее, чем магний. *Schroder* считает, что медь и цинк необходимы, по крайней мере, для роста при наличии свободного азота, в то время как *Mulder* обнаружил, что *A. chroococcum* нуждается в меди только для производства темного пигмента, но не для фактического роста.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и объект исследования

Объектом исследования являлись почвенные азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter*. В качестве исследовательского материала использовались образцы почв, из которых и были выделены данные микроорганизмы. Для исследования использовалось 13 образцов грунта из под различных растений (Приложение 1).

Такое разнообразие почв, отличных друг от друга по влажности, pH, минеральному составу, наличию различных грибов и микроорганизмов, позволит оценить влияние этих факторов на процесс культивирования и дальнейшего развития азотобактерий (рис. 2).

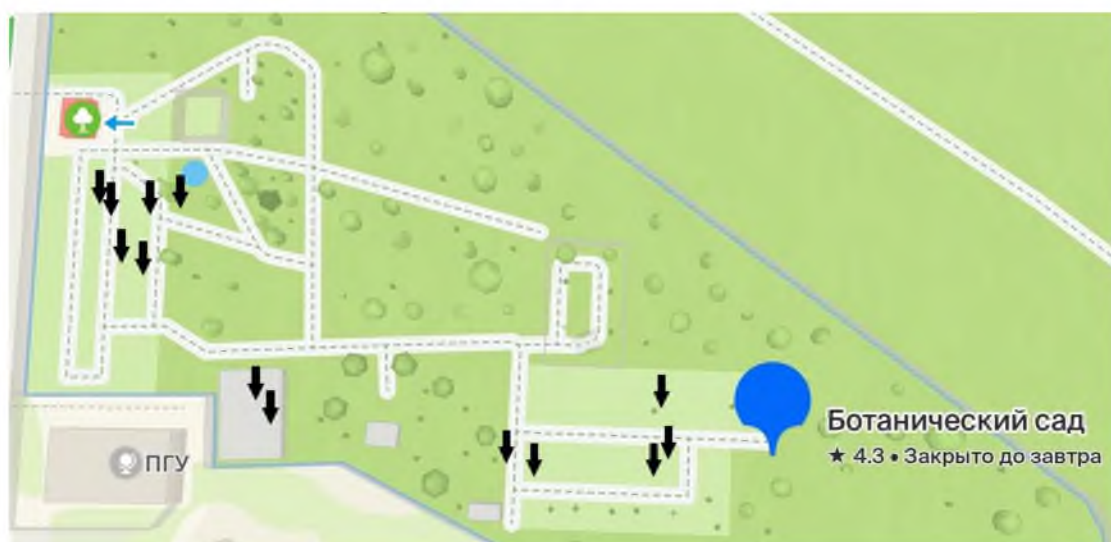


Рисунок 2. Схема Ботанического сада им. И. И. Спрыгина. Отмечены точки сбора почвенных проб.

Как уже говорилось, Семейство *Azotobacteriaceae* относится к отделу *Gracilicutes*, классу *Scotobacteria*, группе аэробных грамотрицательных бактерий, является индикатором плодородной почвы и исходя из проведенного исследования, можно сравнить динамику роста микроорганизмов каждой пробы, и проанализировать, как данный вид бактерий взаимодействует с различными минеральными удобрениями.

Отбор почвенных проб осуществлялся согласно ГОСТ 17.4.4.02-84. "Межгосударственный стандарт. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа" [1, 2]. На территорию, где проводился отбор проб почв, составлялось описание с указанием GPS-точек, мест отбора точечных проб.

При отборе точечных проб для бактериологического анализа исключалась возможность их вторичного загрязнения. Исходя из этого при заборе материала соблюдались условия асептики: использование стерильных инструментов при отборе и транспорт проб только в стерильной таре.

Важным условием хранения проб в лаборатории являлось обязательное наличие подробной этикетки с датой взятия образца, шифр пробы. Также при отсутствии возможности проведения анализа в течении суток пробы хранились в холодильнике при температуре от 4 °С до 5 °С не более 24 ч.

Для бактериологического анализа необходимо были подготовлены пробы почвы. Это осуществлялось следующим образом:

- Точечные пробы берутся почвенным буром.
- Каждая проба должна представлять собой часть почвы, характерную для определенного слоя грунта.

При этом соблюдались все условия асептики: почва рассыпалась на стерильную поверхность, все операции выполнялись стерильными инструментами.

- Затем почву просеивали через стерильное сито.
- Выбирали включения - корни растений, камни и др.
- Затем почву растирали в стерильной ступке.

2.2 Подготовка к культивированию микроорганизмов.

Для обнаружения микроорганизмов рода *Azotobacter* использовался метод почвенных комочков. Чтобы изолировать почвенные микробы, следует, как правило, прямо заражать элективный кремнекислый питательный гель исследуемой почвой [6].

Нами для культивирования азотобактера использовалась элективная среда Эшби следующего состава (г/л): K_2HPO_4 - 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2; NaCl - 0,2; KH_2PO_4 - 0,1; $CaCO_3$ - 5,0; маннит (или сахароза) - 20,0; агар - 20,0; вода дистиллированная. Обязательным условием является полная стерильность среды, для этого проводился процесс автоклавирования [3].

Также при увеличении содержания сахарозы и гептагидрата сульфата магния в составе питательной среды скорость культивирования *Azotobacter* значительно увеличивалась.

При данном методе колония образовывалась довольно быстро, если рассматривать ее под микроскопом, такая масса выглядела довольно однородно.

После застывания среды следовал этап подготовки исследуемого материала. Для этого было взято ~ 3 грамма сухой, чистой почвы, которая была перенесена в чистое часовое стекло. К почве с помощью пипетки Пастера по каплям была добавлена дистиллированная вода до получения пастообразной массы. Затем стеклянной палочкой, слегка касаясь почвы, захваченный комочек переносился в узлы, намеченного трафарета, при этом диаметр образца не превышал 2-х мм.

Для правильного и быстрого результата образцы находились во влажной среде и при комнатной температуре, поэтому использовались смоченные фильтровальные диски, которые покрывали внутреннюю часть крышки, закрывающей чашку Петри, затем образцы помещались в термостат при температуре 25-26 градусов, которая является оптимальной для активного роста данного вида азотобактерий. Также учитывалось, что для культивирования рода *Azotobacter* в среде обязательно должен отсутствовать связанный азот, и она должна быть аэробной. Именно этот фактор обеспечивает элективность культуры на данном этапе исследования.

2.3 Выделение и идентификация выделенных культур

Azotobacter.

Через 4-5 суток о наличии азотобактера можно судить по характерным обрастаниям вокруг комочков почвы. Для более точного исследования колоний проводилось микроскопическое исследование с использованием иммерсионной системы и описание колоний.

Для микроскопирования были подготовлены фиксированные препараты с использованием туши и фуксина Циля.

В ходе исследования фиксированного препарата был выделен один из наиболее распространённых видов *Azotobacter chroococcum*. Молодая культура этого вида представляет собой бесцветную, густослизистую жидкость. По мере старения культура приобретает буро-коричневый оттенок.

Молодые клетки имеют характерную форму палочек, которые могут быть сцеплены попарно или встречаться одиночно. В процессе жизнедеятельности клетки могут изменять свою форму, становясь кокковидными, покрываться капсулой и выделять бурый пигмент.

Важным этапом исследования является получение чистой накопительной культуры. Для этого необходимо обеспечить абсолютную стерильность.

Чистая культура необходима для изучения морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств, по совокупности которых определяется видовая принадлежность исследуемого микроорганизма. Для выделения чистых культур микроорганизмов из материалов, содержащих обильную смешанную микрофлору, предложено много различных методов, в данном исследовании использовалась техника посева микроорганизмов на скошенный агар с целью накопления чистой культуры.

Для начала подготавливалась элективная безазотистая среда, которая заливалась в пробирки и подвергалась автоклавированию; подготовленные пробирки со средой следовало оставлять под углом 30-40 градусов до полного

застывания. Важно учитывать то, что пробки также следует стерилизовать для избежания заражения патогенными микроорганизмами.

Далее осуществлялся перенос на скошенную среду. Изолированную колонию микроорганизмов следовало отбирать бактериологической петлей с пластинчатой среды, затем эта петля вводилась в пробирку со скошенной агаризованной средой почти до дна. Слегка прикасаясь петлей к поверхности среды, следовало провести от дна вверх зигзагообразную или прямую черту-штрих. Пробирки необходимо было закрыть пробками для того, чтобы на среду не попали посторонние бактерии [6].

Через 3-4 суток проводился визуальный осмотр, культивированная культура азотобактера имела вид прозрачной густой жидкости. Также на этом этапе делали микроскопирование, для подтверждения чистоты выделенной колонии [5, 6].

Для получения чистой накопительной культуры использовался метод Дригальского, который основан на механическом разделении микробных клеток на поверхности плотной питательной среды в чашках Петри.

Для посева по методу Дригальского использовали несколько чашек Петри, залитых плотной питательной средой - среда Эшби. На поверхность среды вносили каплю исследуемого материала. Затем с помощью стерильного шпателя эту каплю распределяли по всей питательной среде (посев газоном) (рис. 3).

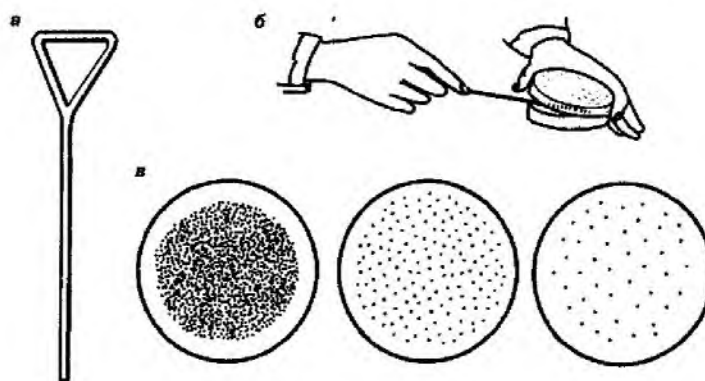


Рисунок 3. Посев культуры микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды шпателем. а - шпатель Дригальского,

б - процесс посева, в - рост микроорганизмов после посева.

Этим же шпателем производился посев и в другие чашки. Как правило, в первой чашке после культивирования посева появлялся рост микробов в виде сплошного налета, в последующих чашках содержание микроорганизмов снижалось, образуя изолированные колонии.

2.4 Выбор минеральных удобрений для культивирования.

Использование минеральных и органических удобрений составляет основу химизации земледелия. Основным источником питательных веществ является почва, но в условиях непрерывной интенсификации сельскохозяйственного производства, часто не хватает тех питательных веществ, которые растения могут получить из органического вещества и труднорастворимых минеральных соединений, содержащихся в ней. Также для полноценного усваивания они становятся доступными только после определенного воздействия микроорганизмов, которые переводя такие вещества в более доступные для растений формы [4, 7].

Минеральные удобрения являются источником питательных элементов как для растений, так и для свойств почвы. При их отсутствии или при повышенном содержании в почве, растение не сможет нормально развиваться.

При выборе удобрения для проведения исследования были изучены составы различных удобрений (таблица 3). Источником азота для азотобактера служит молекулярный азот, но этот микроорганизм может также усваивать азот нитратов, солей аммония, аминокислот. Углерод и энергию азотобактер получает из разнообразных органических веществ: углеводов, спиртов, органических кислот и их солей. Азотобактер требователен к наличию в среде фосфора, кальция и железа, а также микроэлементов – молибдена, бора.

Таблица 3 – Перечень удобрений и их химический состав.

Название удобрения	Химический состав
Аммиачная селитра	Азот (N) ~ 35% от общего Водород (H) ~ 6% от общего объема; Кислород (O) ~ 60% от общего объема; Аммиак (NH ₃) - содержится в аммиачной селитре в виде ионов аммония (NH ₄ ⁺).
Карбамид (мочевина)	Азот (N) ~ 47% от общего объема; Водород (H) ~ 7% от общего объема; Кислород (O) ~ 27% от общего объема; Углерод (C) ~ 20%.
Хлористый калий	Содержание K ₂ O ~ 60%
“ГУМАТ 7+”	Гуматы – 40%; Азот – 1,5%; Калий – 5%; Медь – 0,2%; Марганец – 0,3%; Цинк – 0,2%; Молибден – 0,04%; Кобальт – 0,02%; Бор – 0,5%; Железо – 0,45%.
“Фертика. Универсал-2”	Азот – 12%; Фосфор – 8%; Калий – 14%; Магний – 2%; Сера – 8%; Бор – 0,1%; Медь – 0,1%; Железо – 0,1%; Марганец – 0,2%; молибден – 0,01%; Цинк – 0,1%.

В первую очередь использовались азотные минеральные удобрения - аммиачная селитра и карбамид (мочевина). Азотные удобрения, в основном являются минеральными солями, которые содержат повышенную концентрацию азота. Данные удобрения подразделяются на несколько групп:

нитратные, аммиачные, аммиачно-нитратные и амидные. Именно этот класс минеральных добавок регулирует точное и быстрое питание растений.

Для первой пробы было взято удобрение аммиачно-нитратной группы - аммиачная селитра или нитрат аммония. По своему распространению и доступности используется повсеместно.

Нитрат аммония по своим свойствам сильно гигроскопичен и имеет вид кристаллов, которые на воздухе отсыревают и слеживаются. Для предотвращения к нему добавляют кондиционирующие вещества по типу тонкоразмолотой фосфоритной муки, гипса, каолинита, не разлагающих аммиачную селитру и способных поглощать влагу. В ходе производства удобрений нитрат аммония выпускается в виде гранул или чешуек. Гранулированная аммиачная селитра обладает более стойкими физическими свойствами и удобна в использовании.

Главным плюсом такого удобрения является то, что содержит до 35% нитратного и аммиачного азота и быстро и полностью растворяется в почвенной влаге, что способствует более полному поглощению растениями катионов NH_4^+ . Аммиачная селитра относится к группе физиологически кислых удобрений, именно поэтому, в результате обменного поглощения NH_4^+ адсорбируется коллоидами почвы, а NO_3^- образуется в растворе соли с различными ионами.

В сельскохозяйственной отрасли аммиачную селитру используют в качестве допосевного удобрения, внося при этом, в частности, в подкормку в период вегетации. Важным фактором будет являться систематическое внесение такого удобрения, также следует учитывать сезонность и влажность климата. В условиях, когда почва сильно размыта, возрастает риск вымывания аммиачной селитры, что не приведёт ни к какому результату, поэтому важно учитывать климатогеографические свойства и сезонность внесения удобрений в грунт.

Следующим удобрением, которое использовалось в исследовании был карбамид или мочевины. Это удобрение синтетического происхождения,

которое содержит до 47% азота и является самым концентрированным, среди представителей, имеющих твердую структуру. Мочевина имеет вид кристаллов, которые хорошо растворяются в воде, в силу невысокой гигроскопичности при хранении имеет свойство слеживаться, что ухудшает её структуру.

В производстве основными исходными продуктами карбамида являются жидкий аммиак и углекислый газ, что делает такое удобрение достаточно доступным в больших количествах. Промышленным продуктом по итогу становится гранулированная мочеви́на, которая в редких случаях может оказывать токсичное действие на растения, так как в процессе грануляции побочным продуктом выступает биурет, и, когда его содержание превышает 3-4%, происходит полное угнетение будущего урожая.

Мочевина также легко растворяется в почве, но только под действием фермента уреазы, которые выделяют микроорганизмы, она переходит в усваиваемую форму для растений, то есть в углекислый аммоний.

В сельском хозяйстве мочеви́на используется чаще, чем аммиачная селитра, так как не требует учитывания свойств грунта и используется на всех почвах. Также главной особенностью мочевины является ее амидный азот, который быстро превращается в аммиачный, в свою очередь последний быстрее поглощается и меньше вымывается в глубь почвы.

Также в исследовании использовали минеральные удобрения, которые выступали источником калия. Такие удобрения, в частности, используются совместно с азотными и/или фосфорными, так как именно калий способствует тому, что растение усваивает нитратную форму и не происходит накопление аммиака в клетках. Калий также отвечает за морозоустойчивость (способствует накоплению сахаров) и усиливает процесс фотосинтеза растений.

Калийные удобрения широко используются в сельском хозяйстве, поэтому их разнообразие достаточно велико. Основными видами, которые

использовались в исследовании это - концентрированные калийные удобрения и комплексные удобрения.

К концентрированным калийным удобрениям относят хлористый калий, имеющий наибольший удельный вес 58-60% оксида калия. Получают хлористый калий из сильвинита, что делает его повсеместно доступным. Выпускаются такие удобрения в виде гранул, но в естественном виде имеют вид кристаллов.

Комплексные удобрения в своем составе помимо калия имеют большинство других питательных элементов. Для постановки опытов были взяты такие комплексные удобрения как “Фертика. Универсал-2” и “ГУМАТ 7+”.

Каждое из этих удобрений имело в своем составе более 5 дополнительных элементов, но наибольший процент содержания приходился на калий, фосфор и азот. Единственным отличием между комплексными удобрениями была норма внесения, которая является важным фактором при использовании таких удобрений в разных видах почв.

Эффективность применения калийных удобрений будет варьироваться в зависимости от типа почв, потребности в нем выращиваемой культуры, а также применения сопутствующих азотных и фосфорных удобрений. Существует также множество нюансов при внесении в определенные почвы или при сочетании каких-либо удобрений, поэтому всегда важно учитывать особенности разновидностей калийных удобрений.

В сельском хозяйстве, для получения высоких урожаев, необходимо использовать минеральные калийные удобрения, особенно при выращивании культур требовательных к калию (сахарная свекла, томаты, картофель).

2.5 Определение влияния различных минеральных удобрений на рост культуры *Azotobacter*.

При оценке влияния минеральных удобрений на развитие культуры *Azotobacter* использовались методы, аналогичные тем, что применяются для определения антибиотикочувствительности микроорганизмов.

В эксперименте были задействованы методы диффузии из лунок в агаре и из агаровых блоков.

Метод диффузии из лунок агара широко используется для оценки антимикробной активности растительных компонентов. Суть данного метода состоит в том, что в питательной среде после инокуляции микробной взвеси в асептических условиях делают отверстия диаметром от 6 до 8 мм с помощью стерильного сверла. Затем в лунки вносят по 20–100 мкл исследуемого вещества [3, 11, 28].

В случае с методом диффузии из агаровых блоков тест - культура выращивается отдельно и среды с минеральными удобрениями также разводятся в отдельной чашке Петри. После образования тест - культурой «сплошного газона», из чашек, где были разведены удобрения, стерильным сверлом вырезают агаровые блоки и переносят на поверхность среды с микроорганизмами, так чтобы эти блоки были плотно прижаты к агаровой пластинке и были расположены на равноудаленном расстоянии друг от друга.

Чашки инкубировали во влажной стерильной среде, при температуре оптимальной для культивирования азотобактера. В случае положительного влияния различных концентраций удобрения на рост культуры, вокруг лунок и агаровых блоков образовывались зоны обрастания *Azotobacter*. При подавляющем влиянии концентрации удобрения, обрастание отсутствовало либо было слишком мало.

2.6 Подготовка посевного материала для оценки совместного влияния азотобактера и минеральных удобрений.

Для того, чтобы полноценно оценить влияние азотобактера в совокупности с минеральными удобрениями, был поставлен опыт, на основе данных которого и был сделан вывод.

При проведении исследования влияния азотобактера и минеральных удобрений в совокупности, были использованы семена пшеницы. Первым этапом работы было протравливание семян марганцовкой. Сам процесс протравливания является наиболее простым и распространенным методом

обеззараживания, также марганцовокислый калий имеет наиболее широкий спектр действия.

Обработку семян проводили при комнатной температуре с последующей отмывкой водопроводной водой. Для приготовления 2%-ного раствора 2 г марганцовки растворяли в 100 мл (1/2 стакана) воды и замачивали на 30-40 минут. После того, как семена были тщательно промыты, их замачивают в воде на чашках Петри. (рис. 4)



Рисунок 4. Протравливание семян перманганатом калия (марганцовкой).

По истечении суток, производился отбор зерновок, которые были пригодны для прорастания. Для этого заранее подготавливались предметные стекла, обмотанные фильтровальной бумагой, которые помещались в сухие чашки Петри. Также, чтобы было легче проводить наблюдение за прорастанием, зерновки выкладывались в 2 ряда по 5 штук. Завершением данного этапа было добавление растворов удобрений и азотобактера по схеме. Культура азотобактера вносилась в виде смывки с чашки Петри засеянной чистой культурой сплошным “газоном”.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Выделение чистой культуры азотобактера.

Первым этапом исследования было выделение штаммов азотобактера из всех взятых образцов почв (таблица 4).

Таблица 4 - Перечень видов, произрастающих на местах сбора образцов почвы.

Шифр	Расшифровка данных	Название места сбора	Описание рельефа, растительности и т.д.	Дата забора образца	Координаты места разреза
1.1-1.3	Орляк обыкновенный	Ботанический 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, торфяная, песчано-перегнойная; песчаная, кислые и умеренно влажные супесчаные нейтральные почвы.	26.10.23г	53.188 45.005
2.1-2.3	Хвощ зимующий				
3.1-3.3	Гвоздика песчаная				
4.1-4.3	Ирис безлистный				
5.1-5.3	Чемерица чёрная				
6.1-6.3	Тысячелистник таволговый				
7.1-7.3	Тысячелистник				
8.1-8.3	Ковыль узколистный				

Продолжение таблицы 4

Шифр	Расшифровка данных	Название места сбора	Описание рельефа, растительности и т.д.	Дата забора образца	Координаты места разреза
9.1-9.3	Овсяница луговая	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.	26.10.23г	53.187, 45.004
10.1-10.3	Чубушник венечный				53.187, 45.004
12.1-12.3	Львиный зев большой смесь сортов;(Живокость высокая)				
13.1-13.3	Амарант метельчатый				
15.1-15.3	Бамбук		Оранжерея		53.187, 45.005

В первые 24 часа рост колоний не наблюдался. Первый видимый прирост был зарегистрирован на 4 сутки, в большинстве образцов наблюдались колонии, имеющие слизистую консистенцию и округлую форму, также они имели небольшой блеск на среде. Учет за обрастанием комочков почвы азотобактером проводился в течении 10 дней. Сводные результаты

первого этапа работы по обрастанию комочков почвы расположены в Приложении 2.

Также для оценки достоверности различий между несколькими группами наблюдений мы использовали метод дисперсионного анализа. Ценность этого метода заключается в том, что он позволяет выявить и суммарное действие факторов, и действие каждого фактора в опыте в отдельности. Проверка значимости результатов дисперсионного анализа показывает, что нулевая гипотеза отвергается и влияние исследуемых факторов можно считать доказанным, так как Р-Значение $< 0,05$, а критерий Фишера значим.

Таким образом, имеются статистически значимые существенные различия и по размерам колоний Азотобактера, и между образцами почвы, и по динамике роста азотобактера. Зависимость скорости роста колоний от почвенного образца не доказана (таблица 5).

Таблица 5 - Двухфакторный дисперсионный анализ размера колоний Azotobacter с повторениями.

Источник вариации	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>- Значение	<i>F</i> критическое
Выборка	284,3547	12	23,6962	12,703	0	1,878482215
Столбцы	34,3974	2	17,1987	9,2199	0,00026	3,11379226
Взаимодействие	77,3248	24	3,2219	1,727	0,0376	1,657693719
Внутри	145,5	78	1,8654			
Итого	541,577	116				

Число колоний азотобактера в течении 10-ти дней увеличивалось. Те образцы, в которых наблюдался наибольший и наименьший прирост были изучены под микроскопом (рис. 5).

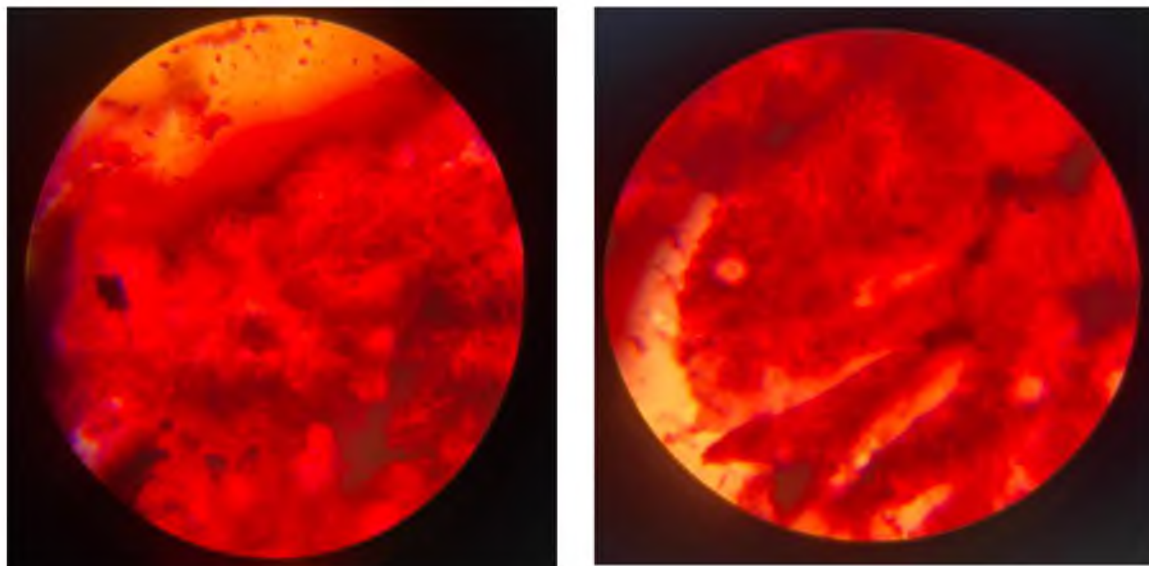


Рисунок 5. Микроскопические препараты *Azotobacter*, выделенные из образца 8.3(наибольшее обрастание) и 3.2 (наименьшее обрастание).

Клетки бактерий *Azotobacter chroococcum*, которые изучались под микроскопом, были относительно крупными и имели форму кокков, а также диплококков, что свидетельствует о старении культуры.

На микроскопических препаратах клетки располагались одиночно, парами или скоплениями. Однако в наиболее обрастаемом образце, который имел буроватый оттенок слизи, были зафиксированы покоящиеся формы – цисты (рис. 6).



Рисунок 6. Покоящиеся форма клетки азотобактера (циста).

Также в ходе исследования было отмечено, что влияние повышенной и пониженной температуры и недостаток влаги, оказывают ингибирующее действие на рост колоний азотобактера. Это связано с дегидратацией микроорганизмов, что приводит к замедлению, а иногда и к полному прекращению процессов метаболизма, в данном случае торможение процессов жизнедеятельности культуры. Именно поэтому все образцы находились в термостате при температуре 26-27 градусов, а на внутреннюю часть крышки чашки Петри помещался смоченный диск фильтровальной бумаги, который ежедневно менялся.

3.2 Оценка влияния минеральных удобрений на рост

Azotobacter.

Так как из образца № 8 (ковыль узколистый) была выделена чистая культура, которая подверглась микроскопированию (исходя из чего и сделан вывод о том, что это чистая культура), дальнейшие опыты проводились с ней. Вторым этапом исследования была оценка ответной реакции чистой культуры азотобактера, выделенной на среде Эшби по методике скошенного агара, на внесение к образцам различных концентраций минеральных удобрений по двум методикам: метод диффузии агаровых блоков и метод диффузии из лунок.

Для оценки влияния минеральных удобрений на чисто-выделенную культуру *Azotobacter*, они были использованы в различных концентрациях. Это позволило определить, как азотобактер реагирует на эти удобрения: происходит активация роста, то есть увеличение количества колоний, в частности вокруг блоков или лунок, или запускается процесс ингибирования, итогом которого служит отсутствие видимого обрастания (таблица 6).

Таблица 6- Результаты ответной реакции микроорганизмов на внесение разных концентраций удобрений (обрастание чистой культуры азотобактера вокруг лунок/блоков в мм)

Удобрение	Концентрация внесения, мг/мл		
	25 мг/мл	100 мг/мл	200 мг/мл
Аммиачная селитра	2	3,2	4,7
Мочевина	1,4	3	3,4
Универсальное - 2	2,4	3,2	3,7
Гумат 7+	0	2,1	2,4
Калийная соль (KCl)	0	0	0
0 - обрастание отсутствует, процесс ингибирования			

В ходе первичной постановки исследования в образцах спустя 3 суток был обнаружен обильный прирост патогенных грибов [28]. Область образования *Azotobacter* полностью совпадала с областью образования грибов. Место, где были образованы колонии, соответствовало расположению лунок, в которых содержание удобрения на основе азота, приходилось на нормы и повышенные концентрации (рис. 7).

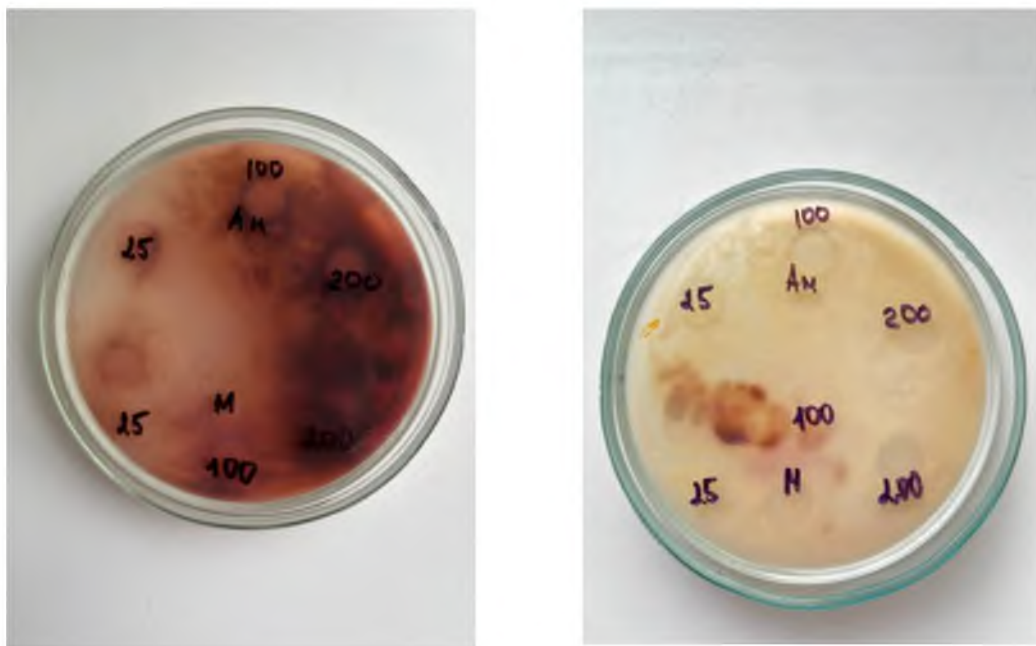


Рисунок 7. Образования колоний Azotobacter и патогенных грибов в областях концентраций, соответствующих значениям 100 мг/мл и 200 мг/мл на безазотистой среде Эшби.

Образцами для постановки опыта выступали удобрения на основе азота и калия. Аммиачная селитра и мочеви́на (карбамид) являлись источниками азота, которые стимулируют рост и развитие колоний азотобактера. В концентрациях приближенной к норме и превышающей ее, наблюдалась активация роста микроорганизмов. Такой результат показал, что испытываемые удобрения имеют в своем составе не только высокое содержание азота, но и форму микроэлемента, которая легко усваивается азотобактером.

В опыте с калийной солью результатом реакции стало полное ингибирование роста колоний азотобактера. Как известно, именно калий способствует тому, что растение усваивает нитратную форму, а поскольку в среде для культивирования не было азотистых соединений, не было и реакции на минеральное удобрение.

В следующих образцах за основу были взяты комплексные удобрения “Фертика. Универсал-2” и “ГУМАТ 7+”, имеющие в своем составе дополнительные микроэлементы и имели в своем составе преимущественно

до 15% общего азота, именно они показали обратный результат, т.е активировали рост колоний азотобактера.

Комплексное удобрение “Фертика. Универсал-2” показало наилучший результат по приросту примерно на 48% во всех концентрациях. Вероятнее всего это связано с тем, что в своем составе оно имеет до 15% общего азота, 14% K_2O и соответственно 8% P_2O_5 .

Результатом комплексного удобрения “ГУМАТ 7+” стал прирост колоний в нормальной и повышенной концентрациях, что свидетельствует о достаточном наличии общего азота для активации роста азотобактера.

Также для оценки достоверности различий между несколькими группами наблюдений использовался метод дисперсионного анализа. При его проведении были выявлены статистически достоверные различия между типами удобрений, так и между использованными концентрациями этих удобрений (таблица 7).

Таблица 7 - Двухфакторный дисперсионный анализ ответной реакции азотобактера на внесение удобрений разных концентраций без повторений.

<i>Источник вариации</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-Значение</i>	<i>F критическое</i>
Строки	22,38	4	5,595	15,84986	0,0007	3,8379
Столбцы	7,356	2	3,678	10,4193	0,006	4,459
Погрешность	2,824	8	0,353			
Итого	32,56	14				

Из данного опыта можно сделать вывод о том, что различные минеральные удобрения оказывают существенное влияние на нитрогеназную активность данных микроорганизмов, одни ингибировали процесс роста колоний, другие в свою очередь проявляли стимулирующий эффект. Так как фиксация азота - энергоемкий процесс, то наличие безазотистой среды богатой

углеводами, являлось хорошим энергетическим субстратом для дальнейшего развития культуры. Исходя из этого азотные удобрения и комплексное удобрения “ГУМАТ 7+”, которые вносились к такой среде, оказывали положительное действие на рост азотобактера. Отрицательное действие (ингибирование) удобрений на микроорганизмы напрямую связано с угнетением их нитрогеназного комплекса. В случае с комплексным удобрением “ГУМАТ 7+” в концентрации 25 мг/мл и калийной солью (KCl) во всех представленных концентрациях, был частичный или полный дефицит микроэлементов (для нормального протекания процесса азотфиксации необходимы Mo, Fe и Co, поскольку Mo и Fe входят в состав фермента нитрогеназы), задействованных в нитрогеназном комплексе, соответственно нитрогеназная активность сводилась к минимуму и это приводило к частичному или полному ингибированию.

3.3 Оценка совместного влияния азотобактера и минеральных удобрений на прорастание зерновых культур.

Растворы, которые использовались в данном опыте, показали наилучшие результаты при исследовании влияния минеральных удобрений на чистую культуру азотобактера. Исходя из этого в разведении были взяты удобрения на основе азота - аммиачная селитра в пониженной (25 мг/мл) и в повышенной (200 мг/мл) концентрациях, а также комплексное удобрение “Универсальное - 2” в аналогичных концентрациях, а также участвовала смывка чистой культуры *Azotobacter*.

Для проведения данного опыта были взяты 8 чашек Петри, в которых находились пророщенные семена (длина отростка каждого составляла 10 мм). По очередности к каждому образцу добавлялись соответствующие растворы минеральных удобрений и/или чистой культуры азотобактера, также учитывался контроль, к которому добавлялась чистая проточная вода. Таким образом было поставлено 8 вариантов эксперимента:

1. Контролем в данном опыте были пророщенные семена пшеницы, к которым добавлялась чистая проточная вода.

2. К семенам добавлялось удобрение “Фертика. Универсал-2” в концентрации 25 мг/мл, что является пониженной концентрацией;
3. К семенам добавлялось удобрение “Фертика. Универсал-2” в концентрации 200 мг/мл, что соответствует повышенной концентрации;

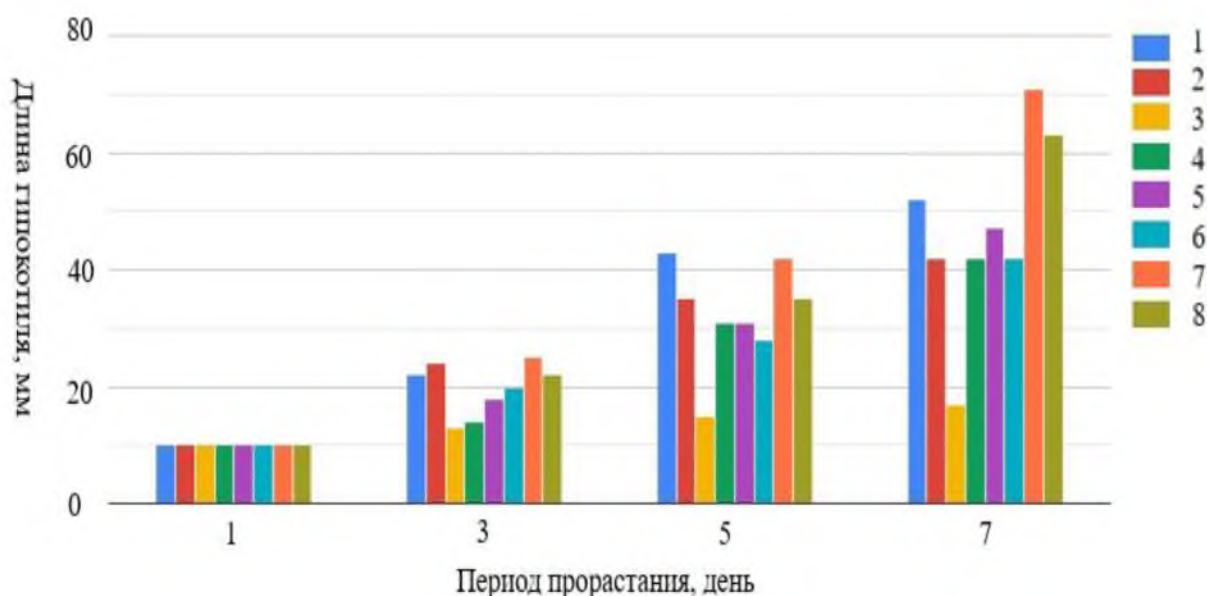


Рисунок 7- Диаграмма роста гипокотилля зерновок в зависимости от внесенных растворов удобрений. Перечень вариантов эксперимента:

- 1 - контроль (протравленные и вымоченные семена пшеницы);
 - 2 - “Универсальное-2” в пониженной концентрации;
 - 3 - “Универсальное-2” в повышенной концентрации;
 - 4 - Аммиачная селитра в пониженной концентрации;
 - 5 - Аммиачная селитра в повышенной концентрации;
 - 6 - чистая культура *Azotobacter*;
 - 7 - чистая культура *Azotobacter* и аммиачная селитра;
 - 8 - чистая культура *Azotobacter* и “Универсальное-2”.
4. Аммиачная селитра в концентрации 25 мг/мл (пониженная) добавлялась к проросшим семенам;
 5. Аммиачная селитра в концентрации 200 мг/мл (повышенная) добавлялась к проросшим семенам;
 6. К пророщенным семенам добавлялась смывка с агаровой пластины, где находилась чистая культура азотобактера (также использовался образец № 8 ковыль узколистный);

7. К семенам добавлялась чистая культура азотобактера в виде смывки, а также удобрение аммиачная селитра в концентрации 100 мг/мл (соответствует нормальному значению концентрации);
8. К семенам добавлялась чистая культура азотобактера в виде смывки, а также удобрение “Фертика. Универсал-2” в концентрации 100 мг/мл (соответствует нормальному значению концентрации).

Завершающим этапом данного опыта было наблюдение и фиксация прорастания семян пшеницы (рис. 7). Более подробные данные наблюдения приведены в таблице 8.

Таблица 8 - Двухфакторный дисперсионный анализ темпа роста гипокотили проростков пшеницы под влиянием различных удобрений и чистой культуры *Azotobacter* с повторениями.

ИТОГИ	1 день	3 день	5 день	7 день	Итого
контроль (протравленные и вымоченные семена пшеницы);					
Счет	2	2	2	2	8
Сумма	20	41	88	104	253
Среднее	10	20,5	44	52	31,625
Дисперсия	0	0,5	2	2	331,982
“Универсальное-2” в пониженной концентрации;					
Счет	2	2	2	2	8
Сумма	20	48	66	81	215
Среднее	10	24	33	40,5	26,875
Дисперсия	0	2	2	0,5	148,125
“Универсальное-2” в повышенной концентрации;					
Счет	2	2	2	2	8
Сумма	20	28	29	33	110
Среднее	10	14	14,5	16,5	13,75
Дисперсия	0	2	0,5	0,5	6,786
Аммиачная селитра в пониженной концентрации;					
Счет	2	2	2	2	8
Сумма	20	32	58	82	192
Среднее	10	16	29	41	24
Дисперсия	0	2	2	2	164,857

Продолжение таблицы 8.

ИТОГИ	1 день	3 день	5 день	7 день	Итого
<i>Аммиачная селитра в повышенной концентрации;</i>					
Счет	2	2	2	2	8
Сумма	20	37	62	85	204
Среднее	10	18,5	31	42,5	25,5
Дисперсия	0	0,5	2	0,5	174,286
<i>чистая культура Azotobacter;</i>					
Счет	2	2	2	2	8
Сумма	20	42	56	82	200
Среднее	10	21	28	41	25
Дисперсия	0	2	2	2	145,429
<i>чистая культура Azotobacter и аммиачная селитра;</i>					
Счет	2	2	2	2	8
Сумма	20	52	85	141	298
Среднее	10	26	42,5	70,5	37,25
Дисперсия	0	2	0,5	4,5	573,0714
<i>чистая культура Azotobacter и “Универсальное-2”.</i>					
Счет	2	2	2	2	8
Сумма	20	46	69	128	263
Среднее	10	23	34,5	64	32,875
Дисперсия	0	2	0,5	2	455,554
Итого					
Счет	16	16	16	16	
Сумма	160	326	513	736	
Среднее	10	20,375	32,0625	46	
Дисперсия	0	16,25	79,929	257,333	

Аналогично предыдущим опытам для оценки достоверности различий между несколькими группами наблюдений использовался метод дисперсионного анализа. Проверка значимости результатов дисперсионного анализа показывает, что нулевая гипотеза отвергается и влияние исследуемых факторов можно считать доказанным, так как Р-Значение $< 0,05$, а критерий Фишера значим. Таким образом, имеются статистически достоверные различия как между вариантами эксперимента, так и по динамике роста проростков пшеницы. Так же, статистически доказана зависимость темпов роста проростков от варианта обработки (таблица 9).

Таблица 9 - Двухфакторный дисперсионный анализ темпа роста гипокотыля проростков пшеницы с повторениями

Двухфакторный дисперсионный анализ темпа роста гипокотыля с повторениями						
Источник вариации	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i> -Значение	<i>F</i> критическое
Выборка	2813,6094	7	401,9442	334,0835	0	2,3125
Столбцы	11511,5467	3	3837,1823	3189,3463	0	2,9011
Взаимодействие	2450,5781	21	116,6942	96,9926	0	1,8957
Внутри	38,5	32	1,2031			
Итого	16814,234	63				

Исходя из полученных данных можно сделать вывод о том, что при добавлении растворов аммиачной селитры и удобрения “Универсальное-2” совместно с чистой культурой *Azotobacter* к проращиваемым зерновкам, оказывает стимулирующий эффект. К 7 суткам данные образцы имеют наибольшую длину прорастания равную 72 мм и 64 мм соответственно.

Самый наименьший результат на выходе имеет образец, где было добавлено удобрение “Универсальное-2” в повышенной концентрации. По итогу можно сказать, что такая концентрация оказывает ингибирующий

эффект на рост растения, так как длина к концу опыта составляет 17 мм от 10 мм первоначальных.

На основании полученных данных можно сказать, что выделенная из образцов почвы культура *Azotobacter* совместно с добавлением к ней азотных и комплексных, на основе калия, удобрений, обладает способностью стимулировать рост и развитие надземной части растений. Эффективность минеральных удобрений, с микробиологической точки зрения, определяется уровнем биологического потенциала почвы, в частности нитрогеназной активностью. Исходя из этого, в зависимости от количества вносимых минеральных удобрений и от физиологического состояния самого растения, данный показатель будет меняться.

Это говорит о возможности посредством удобрений контролировать содержание и накопление биологического азота, а также других важных микроэлементов в почве для получения положительного результата в сельскохозяйственном производстве. Также для повышения качества и получения более быстрых результатов рекомендуется совместно с минеральными удобрениями вносить источник энергетического субстрата - органические удобрения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При посеве на безазотистую среду Эшби во всех анализируемых пробах почв были обнаружены колонии культуры *Azotobacter*. Также в ходе микроскопирования по ряду морфологических и физиолого-биохимических признаков, данный штамм микроорганизма полностью соответствовал литературным данным.

Почва, взятая в виде образцов из-под различных растений, имеет различное количественное содержание бактерий *Azotobacter*. Наиболее богаты данными микроорганизмами образцы № 6, № 8.

Почва, которая содержится в образцах № 6 (тысячелистник таволговый) и № 8 (ковыль узколистный) отличается высоким содержанием известняка и гипса, и имеет слабокислый рН от 5,5 до 8. Отличительной чертой таких почв является повышенная влажность и дренированность. Такая характеристика полностью подходит под условия хорошего роста бактерий рода *Azotobacter*. Количество обросших колониями азотобактера комочков составило около 60%.

В случае образцов, отобранных в оранжерее образец № 15 или на торфяной почве № 4, количество обросших комочков составляло менее 40%. Такие результаты были получены в связи с тем, что почва в образцах № 15 и № 4 характеризуется повышенным содержанием влаги, которая удерживается в ней на продолжительное время, а также относящихся к почвам с повышенной кислотностью - торфяная почва, именно эти факторы одни из немногих, которые оказывают губительное влияние на рост бактерий *Azotobacter*.

В процессе сравнения роста колоний азотобактера на безазотистой среде и при наблюдении за ростом hypocotyle, закладываемых в опыте семян в 6, 7, 8 вариантах эксперимента, под влиянием минеральных удобрений было выяснено:

1. Азотобактер — азотфиксаторы, вследствие чего азотные минеральные удобрения, которые являются источником свободного азота, в небольших или в повышенных концентрациях стимулируют рост данных микроорганизмов как на безазотистой среде, так и непосредственно при проращивании семян. Именно поэтому в таких условиях азотобактер не нуждается в фиксации азота из воздуха и растет более активно.

2. Минеральные удобрения, в основе которых содержится калий (KCl), оказывают ингибирующее действие на рост колоний азотобактера при культивировании их на элективной безазотистой среде. Что свидетельствует о полном отсутствии какого-либо положительного эффекта.

3. Также существуют комплексные минеральные удобрения, в составе которых помимо калия есть ряд других элементов. В исследовании применялись два препарата - “Гумат 7+” и “Универсальное-2” в одном содержался азот, а во втором азот и фосфор в пределах до 15%. Такие удобрения оказали стимулирующий эффект на рост азотобактера при внесении их в безазотистую среду и оказали положительное действие при добавлении к прорастающим семенам. Очевидно, что в этом случае, отсутствие энергозатратного процесса азотификации, позволяет эффективно использовать другие минеральные микроэлементы.

Полученные данные показывают, что минеральные удобрения по большей части оказывают стимулирующее действие на рост микроорганизмов рода *Azotobacter*, но при соблюдении определенных условий (стерильность, температурный режим, влажность, совместимость тех или иных удобрений между собой), а также рекомендаций по внесению самих удобрений.

Таким образом, очевидно, что состав, структура флоры, а также минеральные удобрения, оказывают заметное влияние на микрофлору почвы и, в том числе, на развитие *Azotobacter*. Эти обстоятельства следует учитывать,

во-первых, при скрининге высокоэффективных штаммов азотобактера, во-вторых, при разработке технологий растениеводства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ 17.4.4.01-83. Общие требования к отбору проб почвы. М.: Стандартиформ, 1983. 4 с.
2. ГОСТ 17.4.4.02-84. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. М.: Стандартиформ, 1984. 4 с.
3. Евсеев В.В. Лабораторный практикум по экологии микроорганизмов : учеб. пособие / Курганский гос. ун-т. Курган, 2008. 128 с.
4. Игнашев Н. Е., Рыжих Л. Ю. Влияние систем земледелия на обилие аэробной азотфиксирующей микробиоты // Российский журнал прикладной экологии. 2020. №1. С. 30-32.
5. Клещев Н. Ф. Агробиотехнология: Биологическая фиксация молекулярного азота : учебное пособие / НТУ "ХПИ". Харьков, 2014. 168 с.
6. Красильников Н. А. Определитель бактерий и актиномицетов. Москва : Изд-во и 2-я тип. Изд-ва Акад. наук СССР в Москве, 1949. 832 с.
7. Методы выделения и культивирования микроорганизмов : учеб. пособие / Т. И. Громовых и др. Красноярск : Изд-во ГОУ ВПО КГУ, 2006. 159 с.
8. Рубенчик Л. И. Азотобактер и его применение в сельском хозяйстве. Киев: Изд-во АН УССР Ин-т микробиологии им. акад. Д. К. Заболотного, 1960. 327 с.
9. Bortels H. Weitere Untersuchungen über die Bedeutung von Molybdän, Vanadium, Wolfram und anderen Erdaschenstoffen für stickstoffbindende und andere Mikroorganismen // Zentrum. Bakt. Parasiten. 1936. Abt. II. С. 193 – 218.
10. Bortels H. Über die Wirkung von Agar sowie Eisen, Molybdän, Mangan und anderen Spurenelementen in stickstoff freier Nährlösung auf Azotobakter // Zentr. Bakt. Parasiten. 1939. Abt. II. С. 373 – 393.

11. Krzemieniewski H. Der Einfluss der Mineralbestandteile der Nährlösung auf die Entwicklung des Azotobakteriums : Schulungsmaterial / Classe sci. math. nat. Cracovie, 1910. C. 376 – 413.
12. Stapp C., and Ruschmann G. Zur Biologie von Azotobacter. Berlin – Dahlem : Arb. biol. Reichsanstalt Land u. Forstwirtsch, 1924. C. 305 – 368.
13. Jensen H. L. The magnesium requirements of Azotobacter and Beijerinckia // Acta Agr. Scand. 1954. V. 4. C. 224 – 236.
14. Petersen E. J. Studies on the Azotobacter test and the reaction condition of the soil // Tidsskr. Planteavl. 1925. V. 31. C. 246 – 337.
15. Greaves J. E., and Anderson A. Sulfur requirements of Azotobacter chroococcum // Soil Sci. 1936. V. 41. C. 197 – 201.
16. Greene R. A. The applicability of the Azotobacter (plaque) method for determining the fertility requirements of Arizona soils // Soil Sci. 1932. V. 34. C. 83 – 93.
17. Burk D., and Lineweaver H. The influence of calcium and strontium upon the catalysis of nitrogen fixation by Azotobacter // Arch. Microbiol. 1931. V. 2. C. 155 – 186.
18. Birch – Hirschfeld L. Über den Einfluss von Molybdän und Bodenextraktstoffen auf die N-Bindung von Azotobacter chromococcum // Arch. Mikrobiol. 1932. V. 3. C. 341 – 361.
19. Schroder M. 1932 Die Assimilation des Luftstickstoffs durch einige Bakterien // Zentr. Bakt. Parasit K. 1932. Abt. II. V. 85. C. 177 – 212.
20. Horner C., K. and Burk D. Magnesium, calcium and iron requirements for growth of Azotobacter in free and fixed nitrogen // J. Agr. Research. 1934. V. 48. C. 981 – 995.
21. Burk D., and Horner C. K. Molybdenum and calcium in Azotobacter nutrition // Proc. Third Intern. Congr. Microbiol. 1940. C. 489 – 490.
22. Stone R. W. and Wilson P. W. Respiratory activity of cell-free extracts from azotobacter // J. Bacteriol. 1952. V. 63. C. 605 – 617.

23. Nilsson R., ALM F., and Burstrom D. Mangan als Vertreter für Magnesium im Betriebsstoffwechsel und im Baustoffwechsel der Zelle // Arch. Mikrobiol. 1942. V. 12. C. 353 – 376.
24. Bortels H. Molybdän als Katalysator bei der biologischen Stickstoffbindung // Arch. Mikrobiol., 1930, V. 1. C. 333 – 342.
25. Kovats J. Über den Einfluss von Eisen und Molybdän auf die Stickstoffbindung durch *Azotobacter chromococcum* in Gegenwart von Huminsubstanzen oder von deren Aschen : Schulungsmaterial / Classe sci. math. nat. Cracovie, 1938. C. 91 – 112.
26. Horner C. K., Burk D., Allison F. K., and Sherman I. Nitrogen fixation by *Azotobacter* as influenced by molybdenum and vanadium // J. Agr. Research. 1942. V. 65. C. 173 – 192.
27. Mulder E. G. Importance of molybdenum in the nitrogen metabolism of microorganisms and higher plants // Plant and Soil. 1948. V. 1. C. 94 – 119.
28. Winogradsky S. Études sur la microbiologie du sol et des eaux. // Annales de l'Institut Pasteur. 1938. V. 60. C. 351 – 400.
29. Противогрибковый потенциал видов *Azotobacter* и их метаболитов в отношении *Fusarium verticillioides* и биodeградация фумонизина // PubMed URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35809236> / (дата обращения: 10.03.2024).

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица 1 - Двухфакторный дисперсионный анализ размера колоний *Azotobacter* при обрастании методом комочков, с повторениями.

ИТОГИ	4 день	7 день	10 день	Итого
<i>Орляк обыкновенный</i>				
Счет	3	3	3	9
Сумма	5	5	5	15
Среднее	1,667	1,667	1,667	1,667
Дисперсия	1,334	1,334	1,334	1
<i>Хвощ зимующий</i>				
Счет	3	3	3	9
Сумма	3	6	8	17
Среднее	1	2	2,667	1,889
Дисперсия	0	0	0,334	0,611
<i>Гвоздика песчаная</i>				
Счет	3	3	3	9
Сумма	3	5	7	15
Среднее	1	1,667	2,333	1,667
Дисперсия	0	1,333	5,333	2
<i>Ирис безлистный</i>				
Счет	3	3	3	9
Сумма	5	11,5	12	28,5
Среднее	1,667	3,833	4	3,167
Дисперсия	1,333	2,583	0	2,25
<i>Чемерица чёрная</i>				
Счет	3	3	3	9
Сумма	3	5	0	8
Среднее	1	1,667	0	0,889
Дисперсия	0	0,334	0	0,611

Продолжение таблицы 1

<i>Тысячелистник таволговый</i>				
Счет	3	3	3	9
Сумма	9	15	15	39
Среднее	3	5	5	4,333
Дисперсия	0	0	0	1
<i>Тысячелистник</i>				
Счет	3	3	3	9
Сумма	3	7	11	21
Среднее	1	2,333	3,667	2,333
Дисперсия	0	2,33	4,333	3
<i>Ковыль узколистный</i>				
Счет	3	3	3	9
Сумма	6	12	7	25
Среднее	2	4	2,333	2,778
Дисперсия	0	0	16,333	4,944
<i>Овсяница луговая</i>				
Счет	3	3	3	9
Сумма	3	9	7	19
Среднее	1	3	2,333333333	2,111
Дисперсия	0	0	16,33333333	4,861
<i>Чубушник венечный</i>				
Счет	3	3	3	9
Сумма	4	8	13,5	25,5
Среднее	1,333	2,667	4,5	2,833
Дисперсия	0,333	1,333	15,75	6,25

Продолжение таблицы 1

<i>Львиный зев</i>				
Счет	3	3	3	9
Сумма	12	12	0	24
Среднее	4	4	0	2,667
Дисперсия	0	0	0	4
<i>Амарант метельчатый</i>				
Счет	3	3	3	9
Сумма	15	18	19,5	52,5
Среднее	5	6	6,5	5,833
Дисперсия	0	0	0,75	0,625
<i>Бамбук</i>				
Счет	3	3	3	9
Сумма	15	21	21	57
Среднее	5	7	7	6,333
Дисперсия	0	0	0	1
<i>Итого</i>				
Счет	39	39	39	
Сумма	86	134,5	126	
Среднее	2,2051	3,4487	3,2308	
Дисперсия	2,3776	3,3263	7,6427	