

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 КОМПОНЕНТОВ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РОСТ
AZOTOBACTER»**

Студент

А. Кур

Нурмаметова Алсу Рашитовна

Руководитель

Б

Заплатин Б.П.

Нормоконтролер

Айгу

Кручинина А.Д.

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

Заведующий кафедрой

Г.А. Карпова

Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой хорошо

(протокол заседания ГЭК от 25.06.21 № 6)

Секретарь ГЭК

С.В. Клыченков

Клыченков С.В.

Пенза, 2021

Пенза, 2021
СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1 Эколого-физиологическая характеристика бактерий рода <i>Azotobacter</i> ...	5
1.2 Особенности распространения <i>Azotobacter</i> в различных типах почв.....	7
1.3 Свойства бактерий рода <i>Azotobacter</i>	9
1.3.1 Морфологическая характеристика.....	9
1.3.2 Основные физиологические свойства.....	12
1.4 Требования к питательной среде и особенности роста/метаболизма <i>Azotobacter</i> на различных питательных средах.....	14
1.4.1 Требования к питательной среде.....	14
1.4.2 Влияние компонентов питательной среды на рост <i>Azotobacter</i>	17
1.5 Известные среды.....	20
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	24
2.1 Объект исследования.....	24
2.2 Питательные среды.....	25
2.3 Посев на питательные среды.....	27
2.4 Оценка особенностей роста и метаболизма культур <i>Azotobacter</i>	28
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	30
3.1 Влияние различных компонентов культуральных сред на рост бактерий рода <i>Azotobacter</i>	30
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	38
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	40

ВВЕДЕНИЕ

Последствиями антропогенного воздействия на почву является деградация почвенных экосистем, динамическое уменьшение многообразия редуцентов, снижение их количества и физиологической активности, нарушение структуры биоценозов и биогеоценозов. Это приводит к возрастанию роли физиологически значимых микроорганизмов, к числу которых относятся бактерии рода *Azotobacter*.

Интерес к азотфиксирующим микроорганизмам, в частности, к бактериям рода *Azotobacter*, обусловлен необходимостью перехода от химизации сельского хозяйства к биологизации, что требует современных представлений о физиологическом состоянии, адаптационных возможностях и механизмах штаммов рода *Azotobacter*.

Бактерии-азотофиксаторы играют одну из основных ролей в круговороте азота в природе, они способны переводить молекулярный азот, содержащийся в атмосфере, в растворимую, доступную для растений форму. Также данный вид бактерий практически не проявляет антагонистические свойства по отношению к другим почвенным микроорганизмам и фиксирует азот в количестве, не приводящем к его избыточному накоплению в почве. Продуктивность выращивания сельскохозяйственных культур на таких почвах повышается на 15-20%, что подтверждает необходимость использования препаратов азотобактера в сельхозпроизводстве на современном этапе развития, что требует выращивания больших объемов биомассы азотобактера.

Для культивирования микроорганизмов (выращивание в искусственных условиях *in vitro*) необходимы особые субстраты – питательные среды. На средах микроорганизмы осуществляют все жизненные процессы (питаются, дышат, размножаются и т. д.), поэтому их еще называют средами для культивирования. Питательные среды являются основой микробиологической работы, и их качество нередко определяет

результаты всего исследования. Среда должны создавать оптимальные (наилучшие) условия для жизнедеятельности микробов. В настоящее время разработано большое количество питательных сред для выращивания азотобактера, однако оптимальная среда не предложена. Это и определяет актуальность настоящего исследования.

Цель исследования: оценка влияния компонентов питательной среды на рост штаммов бактерий рода *Azotobacter* и отзывчивости штаммов на изменения состава среды.

Задачи исследования:

- привести эколого-физиологическую и морфологическую характеристику бактерий рода *Azotobacter*;
- изучить требования к питательной среде и особенности роста/метаболизма *Azotobacter* на различных питательных средах;
- описать влияние компонентов питательной среды на рост *Azotobacter*;
- оценить особенности роста и метаболизма *Azotobacter*;
- оценить влияние различных компонентов культуральных сред на рост бактерий рода *Azotobacter*;
- оценить активность роста бактерий рода *Azotobacter* на средах с различными компонентами;
- предложить наиболее эффективные условия и составы сред для выращивания бактерий рода *Azotobacter*.

Выпускная квалификационная работа написана на 43 листах, содержит 7 рисунков, 5 таблиц и список литературы на русском и английских языках из 34 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эколого-физиологическая характеристика бактерий рода *Azotobacter*

Азотобактер — это группа грамотрицательных свободноживущих азотфиксирующих аэробных бактерий, обитающих в почве. Они имеют овальную или сферическую форму и при неблагоприятных условиях окружающей среды образуют толстостенные цисты (спящие клетки, устойчивые к неблагоприятным условиям) [25].

Известно, что эти бактерии используют атмосферный азот для синтеза клеточного белка, который минерализуется в почве, передавая культурным растениям значительную часть азота, доступного из почвенного источника. *Azotobacter* spp. чувствителен к кислому pH, высокой концентрации соли и температур.

Азот является компонентом белка, нуклеиновых кислот и хлорофилла. Таким образом, поступление азота в растение будет влиять на количество образующегося белка, аминокислот, протоплазмы и хлорофилла. Поэтому для достижения высокого потенциала урожайности сельскохозяйственных культур необходимо достаточное поступление азота.

Атмосфера содержит ~78% азота в инертной, недоступной форме. Над каждым гектаром земли находится ~80000 тонн этого недоступного азота. Для того, чтобы быть преобразованным в доступную форму, он должен быть зафиксирован либо с помощью промышленного процесса, либо с помощью биологической фиксации азота (BNF).

Дефицит азота (N) часто является основным ограничивающим фактором для производства сельскохозяйственных культур. Азот является важным питательным веществом для растений, широко применяемым в качестве азотного удобрения для повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Интересной альтернативой, позволяющей

избежать или сократить использование синтетических удобрений, может быть использование бактерий, стимулирующих рост растений, способных увеличить рост и урожайность многих видов растений, некоторые из которых имеют агрономическое и экологическое значение.

Исследования *Azotobacter chroococcum* в растениеводстве показали его важность в улучшении питания растений и повышении плодородия почвы [33]. Было обнаружено, что несколько штаммов *Azotobacter* способны продуцировать аминокислоты при выращивании в культуральной среде с добавлением различных источников углерода и азота [31]. Вещества, продуцируемые этими бактериями, участвуют в нескольких процессах, что приводит к стимулированию роста растений [32].

Влияние Азотобактера на продуктивность растений включает в себя повышение всхожести семян, стимулирование всхожести за счет внесения стимулирующего рост растений вещества, которое вызывает снижение химического фосфора и азота на 25%, что приводит к стимуляции роста сельскохозяйственных культур. Прямое стимулирующее действие на рост растений заключается в образовании и высвобождении подчиненного метаболита, подобного регулятору роста, а также в сглаживании поглощения питательных веществ из корневой среды.

Azotobacter продуцирует различные элементы, способствующие росту растений, например, цитокинин, ауксины и гибберелловую кислоту, которые являются основными компонентами для управления ростом растений путем улучшения содержания азота и массы растений. Эти гормональные компоненты из корневой поверхности или ризосферы также влияют на рост родственных развитых растений. Гормоны усиливают солюбилизацию фосфатов, влияют на усвоение питательных веществ за счет повышения активности фосфатазы, повышают усвоение воды и минералов, выработку аминокислот и витаминов, биологически активных компонентов. Синтез фитогормона также связан с производством внеклеточных соединений, таких как рибофлавин, витамин B12, биотин, тиамин, пиридоксин,

цианокобаламин, фолиевая кислота и пантотеновая кислота. Число азотобактерий обычно меньше в необработанных почвах и ризосфере культурных растений. Органическое вещество из почвы и корневых экссудатов питает Азотобактерию и помогает в дальнейшем закрепить атмосферное биоудобрение. *Azotobacter* с соотношением C: N (20: 1) свидетельствует о стабильности биоудобрения.

Azotobacter chroococcum оказывает положительное влияние на плодородие почвы и питание растений, способствуя значительному поглощению N и P. Синтез и секреция биологически активных соединений, таких как гибберелловая кислота, витамин B, биотин, пантотеновая кислота, никотиновая кислота, приводили к ускорению роста корней растений. Секреция аммиака азотобактериями в ризосфере также важна для модификации поглощения питательных веществ растениями. Бактерии продуцировали полифенолоксидазы (PPOs) и фенолоксидазы (POs) семейства мультимедных белков.

Кроме азотфиксации, азотобактерии продуцируют тиамин, рибофлавин, никотин, индолуксусную кислоту и гиббереллин. При нанесении азотобактерий на семена всхожесть семян значительно улучшается.

1.2 Особенности распространения *Azotobacter* в различных типах почв

Присутствие *Azotobacter* в почвах благотворно влияет на растения, однако обилие этих бактерий в почве связано со многими факторами, физико-химическими (например, органическое вещество, pH, температура, влажность почвы) и микробиологическими свойствами почвы. Содержание азотобактерий варьируется также в зависимости от глубины почвенного профиля. Азотобактерии гораздо более распространены в ризосфере растений, чем в окружающей почве, и это обилие зависит от вида культуры.

Из ряда видов рода *Azotobacter* в почве обычно встречается *Azotobacter chroococcum*. Этот микроорганизм весьма требователен к условиям среды. Он развивается лишь в достаточно увлажненных почвах, имеющих реакцию близкую к нейтральной, обеспеченных фосфором, калием и рядом микроэлементов. Такая требовательность делает понятной причину относительно ограниченного распространения азотобактера в ряде почв.

В течение вегетационного периода в почвах, благоприятных для развития *Azotobacter chroococcum* численность этого микроорганизма может сильно варьировать, снижаясь иногда до величин, не выявляемых стандартными методами исследования [24].

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

Многие исследователи отмечают, что в случае выделения культур азотобактера из кислых подзолистых почв, они обычно оказываются ослабленными, а иногда обладают повышенной кислотоустойчивостью. В окультуренных почвах, как правило, обнаруживаются активные штаммы азотобактера [14].

Низинные заболоченные почвы нередко содержат азотобактер, но вследствие неблагоприятного воздушно-водного режима этот микроорганизм здесь размножается слабо.

В верховых торфяниках азотобактер не встречается. Редко он обнаруживается и в низинных целинных торфяниках. Окультурирование торфяных почв улучшает условия для размножения азотобактера.

В зоне достаточно увлажненных северных мощных черноземов азотобактер обнаруживается в течение всего вегетационного периода. Эти нейтральные богатые почвы благоприятны для азотобактера. В периоды некоторого иссушения почвы численность азотобактера несколько снижается.

В зоне обычных и южных черноземов, при отсутствии орошения азотобактер появляется только как весенний эфемер. В летний период численность снижается из-за дефицита подвижного органического вещества.

Состояние азотобактера в серых лесных почвах своеобразно. В летний период, когда в почвах устанавливается благоприятный температурный и водный режим для развития азотобактера, количество клеток данного микроорганизма возрастает. Его развитие здесь, очевидно, летом обеспечивается достаточным количеством корневого опада и экзосмосом.

В целинных и богарных почвах сероземной зоны и солонцах азотобактер в основном развивается как весенний эфемер. В орошаемых окультуренных, а также целинных почвах, характеризующихся повышенным поверхностным и грунтовым увлажнением, этот микроорганизм обнаруживается постоянно.

Таким образом, основные причины ограничения развития азотных бактерий в почве, следующие:

1. кислотность почвы;
2. поступление в почву фосфора, некоторых имеющихся в ней микроэлементов и органических веществ;
3. степень увлажнения почвы.

Следует отметить, что азотобактер чувствителен к повышенной концентрации солей, по этой причине по мере увеличения засоленности почвы численность его клеток снижается.

1.3 Свойства бактерий рода *Azotobacter*

1.3.1 Морфологическая характеристика

Морфологические свойства очень важны для идентификации азотобактерий.

Azotobacter – грамотрицательные, свободноживущие, аэробные почвенные бактерии, овальной или сферической формы, образующие

толстостенные цисты (средство бесполого размножения при благоприятных условиях). В роде *Azotobacter* насчитывается около шести видов, некоторые из которых подвижны с помощью перитрихоз жгутиков, другие - нет. Они, как правило, полиморфны, и их размер колеблется от 2 до 10 мкм в длину и 1-2 мкм в ширину.

Эти бактерии используют атмосферный газообразный азот для синтеза клеточного белка, который затем минерализуется в почве после гибели клеток *Azotobacter*, тем самым способствуя доступности азота для сельскохозяйственных растений. *Azotobacter* spp. чувствителен к кислотному pH, высоким солям и температуре. *Azotobacter* оказывает благотворное влияние на рост и урожайность сельскохозяйственных культур, биосинтез биологически активных веществ, стимуляцию ризосферных микробов, продуцируя фитопатогенные ингибиторы.

Клетки обычно находятся в парах, но также могут встречаться одиночные клетки или короткие цепочки. Образуется внутриклеточный поли-β-гидроксибутират. Клетки грамотрицательны. Эндоспоры не образуются.

В роде *Azotobacter* микроцисты образуются в более старых культурах, выращенных с сахаром в качестве источника углерода. У некоторых видов среда, содержащая бутан-1-ол в качестве органического субстрата (перед заливкой агаровых пластин добавляют 0,1–0,2 мл), усиливает образование цисты. Микроцисту можно отличить от эндоспоры по ее характерной структуре: центральное тело, окруженное оболочкой кисты, состоящей из экзоцистории и экзина. В отличие от споры, клетка внутри кисты похожа на вегетативную форму, и в клетке нет цитологических изменений до ее прорастания.

Клетки *A. chroococcum* плеiomорфны, имеют тупую палочковидную, овально-яйцевидную или кокковидную форму. Средние размеры составляют 3,0–7,0 мкм в длину и 1,5–2,3 мкм в ширину. Форма клеток резко меняется во

времени или при изменении условий роста (среды). Клетки часто находятся в парах. Молодые клетки подвижны с помощью перитрихоз жгутиков.

Образуются микроцисты и капсульная слизь. Колонии умеренно слизистые, при старении становятся черными или черно-коричневыми.

Azotobacter nigricans. Клетки представляют собой тупо закругленные стержни, встречающиеся поодиночке или парами. Средние размеры ячеек составляют 4,1–4,9 мкм в длину и 1,5–2,7 мкм в ширину. Кроме того, они отличаются от *A. chroococcum* рядом питательных свойств, таких как неспособность использовать этанол, пентан-1-ол, пропионат, капроат и бензоат и производить коричнево-черные или красно-фиолетовые диффузионные пигменты. Они отличаются от *Azotobacter armeniacus* неспособностью использовать каприлат, соединение которого может быть использовано в качестве источника углерода последними видами. У *A. nigricans* производство гомополисахаридов, диффундирующих в агаре, из сахарозы или рафинозы зависит от штамма, но ни один штамм не производит ни одного гомополисахарида, удерживаемого колониями. При старении колонии *A. nigricans* становятся черно-коричневыми.

Azotobacter armeniacus. Это плохо изученный вид, впервые описанные в 1981 году. Клетки представляют собой тупо закругленные стержни, встречающиеся поодиночке или парами. Средние размеры клеток составляют 5,0–5,7 мкм на 1,7–2,0 мкм. Штаммы этого вида отличаются от *A. nigricans* наличием подвижных клеток, но у них есть общее с последними видами производство диффузного коричнево-черного или красно-фиолетового пигмента в среде. В отличие от *A. nigricans*, они могут использовать цитрат или D-галактуронат в качестве единственного источника углерода, и большинство штаммов также могут использовать валерат и каприлат, но, как и *A. nigricans*, капронат не используется.

Azotobacter vinelandii. Клетки представляют собой стержни с закругленными концами, встречающиеся поодиночке или парами. Средние размеры клеток составляют 3,0–4,5 мкм в длину и 1,5–2,4 мкм в ширину.

Клетки подвижны с многочисленными перитонеальными жгутиками. Колонии непигментированы. Они выделяют желто-зеленый, флуоресцентный, водорастворимый пигмент в среду.

1.3.2 Основные физиологические свойства

Azotobacter являются аэробными, гетеротрофными, азотфиксирующими организмами, поэтому обладают всеми окислительными ферментами для деградации многочисленных органических соединений углерода, используемых в качестве источника углерода и энергии. Многие из этих ферментов являются конститутивными, но некоторые индуцируются конкретным углеродным субстратом.

Исследования показали, что высокий уровень кислорода, даже на уровне атмосферного, подавляет активность азотфиксации у азотобактерий. детальным исследованиям роли кислорода в комплексе нитрогеназы. Эксперименты показали, что у *Azotobacter* действует специальный механизм, который защищает чувствительную к кислороду нитрогеназу от повреждения кислородом. Высокая частота дыхания азотобактерий была объяснена как механизм, который поглощает кислород из места фиксации азота нитрогеназы. Этот процесс, называемый «защитой органов дыхания» нитрогеназы, связан с множеством цитохромов и окислительно-восстановительных белков, таким образом поддерживая нитрогеназу в по существу аноксичной среде внутри клеток, которые, тем не менее, получают энергию из аэробного метаболизма.

Нитрогеназный комплекс, состоящий из двух компонентов, чрезвычайно чувствителен к кислороду, быстро и необратимо инактивируясь при воздействии воздуха, но нитрогеназа в бесклеточных экстрактах *Azotobacter* относительно стабильна к кислороду. Во время кислородного стресса, нитрогеназа, связывается с защитным белком 2Fe-2S, также называемым Fe/S II, чтобы образовать O₂-стабильный комплекс, который защищен от повреждения кислородом, но инертен к субстратам нитрогеназы.

Когда кислородный стресс низок или снижен чрезмерным дыханием, защищенный комплекс диссоциирует, давая активную нитрогеназу. Такие защитные белки были выделены и охарактеризованы для *A. chroococcum* и *A. vinelandii*.

Однако были предложены некоторые альтернативные механизмы. В частности, предполагается, что защита от кислорода обусловлена основным компонентом цитоплазматической мембраны, который появляется у этих организмов при выращивании в среде, свободной от азота. Также обнаружили зависимость выключения нитрогеназы при кислородном стрессе от активности нитрогеназы у *Azotobacter vinelandii*. Их результаты показали, что поток электронов в комплекс нитрогеназы, а не клеточное потребление кислорода (qO_2), стабилизирует активность нитрогеназы против инактивации O_2 у аэробно растущего *A. vinelandii*.

Из приведенных выше наблюдений можно сделать вывод, что механизм контроля O_2 и отсутствие серьезного ингибирования функционирующей нитрогеназы O_2 является довольно сложным процессом, в котором может участвовать несколько различных систем.

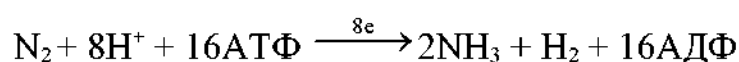
Хотя нитрогеназа является наиболее важным ферментом для аэробных азотфиксирующих бактерий, таких как *Azotobacter*, этот фермент также обнаружен у большого числа других микроорганизмов, принадлежащих к совершенно разным таксономическим группам.

Основные свойства нитрогеназы можно резюмировать следующим образом: она состоит из двух белков; она чувствительна к кислороду или может быть разрушена кислородом; она содержит переходные металлы Fe и Mo; ей нужны ионы Mg^{2+} , чтобы быть активной; она преобразует АТФ в АДФ при функционировании; она ингибируется АДФ; она уменьшает азот и несколько других небольших молекул с тройными связями (таких как C_2H_2 и CN); и она связывает ионы H^+ в газообразный H_2 , даже в присутствии N_2 .

Нитрогеназа образована двумя белками разного размера (относительная молекулярная масса 220 000 и 60 000). Оба белка содержат Fe

(количество изменчиво), и этот металл, по существу, сопровождается атомами S. Большой белок содержит дополнительно два атома Mo и поэтому обычно называется молибдопротеином. Белки нитрогеназного комплекса часто также называют компонентом I и компонентом II. Кроме того, интересно, что эти два белка очень похожи у разных азотфиксирующих организмов. Их сходство настолько велико, что можно обмениваться этими белками с белками других азотфиксирующих микробов, независимо от их происхождения (например, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus polymyxa* и *Clostridium pasteurianum*), получая полностью активные препараты.

Нитрогеназа преобразует N_2 в NH_3 , и для этой функции ей необходим аденозинтрифосфат (АТФ). In vitro 16 молекул АТФ расходуются на преобразование одной молекулы N_2 в две молекулы NH_3 , а также участвуют восемь электронов:



1.4 Требования к питательной среде и особенности роста/метаболизма *Azotobacter* на различных питательных средах

1.4.1 Требования к питательной среде

Представители азотобактерий являются типичными аэробными, хемогетеротрофными, фиксирующими азот бактериями. Поэтому любая среда с подходящим значением pH, содержащая органический источник углерода, минералы (особенно фосфат), некоторые микроэлементы (в частности, молибден и/или ванадий) может использоваться для их культивирования.

Члены этой группы лучше фиксируют азот при низком напряжении кислорода, вероятно, потому, что фиксация является восстановительным процессом (т. е. нитрогеназа ингибируется или инактивируется кислородом). Однако в культурах обогащения следует позаботиться о том, чтобы обеспечить достаточную аэрацию среды, чтобы подавить развитие

анаэробных или факультативно анаэробных бактерий (о чем свидетельствует характерный запах масляной кислоты в культуре обогащения), которые могут развиваться при низком давлении кислорода или при полном исчерпании кислорода. Поэтому рекомендуется использовать тонкие жидкие слои в колбах Эрленмейера или чашках Петри, чтобы обеспечить достаточный доступ кислорода. Эта мера предосторожности не является абсолютно обязательной для обогащения большинства видов азотобактерий, поскольку в статической культуре они обычно образуют пленку на поверхности жидкости. Желательно оставить эту пленку нетронутой, потому что неосторожное обращение или встряхивание культуры может привести к разрыву оболочки и осаждению клеток, что стимулирует развитие вышеупомянутых анаэробных или факультативных анаэробных загрязняющих бактерий, всегда присутствующих в культурах обогащения.

Таким образом, азотобактер обладает специфическими физиологическими и морфологическими характеристиками, которые в первую очередь отличают его от других грамтрицательных бактерий и азотфиксаторов.

На рост и развитие *Azotobacter* большое влияние оказывают условия внешней среды.

Значение pH среды. Азотобактер чрезвычайно требователен к реакции среды. Бактерии этого рода тяготеют к нейтральным почвам и плохо переносят подкисление. Зона pH, при котором происходит развитие азотобактера, может несколько смещаться в зависимости от состава среды и других факторов.

Уровень аэрации. Рассматривая кислородный режим, необходимый азотобактеру, следует отметить, что данный микроорганизм является аэробом. Аэрация благоприятствует размножению азотобактера. Вместе с тем установлено, что азотобактер может размножаться и в микроаэрофильных условиях. При слишком высоком уровне аэрации может наблюдаться уменьшение накопления биомассы.

Температура. В отношении температуры азотобактер является типичным мезофилом. Положение оптимальной температурной точки развития может несколько меняться в зависимости от состава и pH среды.

Минеральный состав. Большое влияние на развитие азотобактера оказывает минеральный состав. Отличительной особенностью бактерий рода *Azotobacter* является их высокая требовательность к наличию в среде микроэлементов. Совершенно необходим для большинства культур молибден.

Железо играет важную роль в процессе дыхания и фиксации молекулярного азота.

Калий требуется для азотобактера в незначительных концентрациях, высокие же концентрации могут вызывать бактерицидный эффект.

Значительна потребность культуры в *кальции*, его недостаток приводит к удлинению lag-фазы, сильной вакуолизации и вздутию клеток, нарушается синтез АТФ и полифосфатов. Но при повышении оптимальных доз этого элемента происходит угнетение развития микроорганизма.

Соединения *бора* стимулируют размножение азотобактера и процесс фиксации азота. Но он не является жизненно необходимым элементом для азотобактера.

Марганец может в некоторой степени заменить потребность азотобактера в магнии.

Медь необходима азотобактеру для образования пигмента. Стимулирующее влияние на азотфиксацию оказывают мышьяк, цинк, кобальт, стронций. Однако в больших концентрациях ионы тяжелых металлов могут быть токсичны для азотобактера.

Бактерии рода *Azotobacter* способны воспринимать широкий круг *органических соединений* – моносахариды, дисахариды, крахмал, различные спирты и органические кислоты. Для синтетического обмена азотобактера большое значение имеют источники минерального питания, в первую очередь, фосфор и кальций.

Азотобактер обычно производят диффузионные и недиффузионные большие колонии на безазотистой среде, содержащей сахар или спирт в качестве источников углерода. Колонии, как правило, гладкие, непрозрачные, несколько выпукло блестящие, хотя характер колоний меняется соответственно среде и типу используемых источников углерода, например, колонии с более крупными размерами, более прозрачные и вязкие колонии образуются на средах, содержащих сахарозу и рафинозу, чем безазотистые среды с глюкозой. Для этих видов характерно также образование серо-коричневых, черных недиффузионных пигментов [12].

Установлено также, что производство пигмента зависит от компонентов среды. Например, *Azotobacter chroococcum* производит недиффузионный коричнево-серый пигмент на окрашивающей среде, и черный диффузионный пигмент на обогащенной бензоатом среде [5].

Таким образом, требования к питательной среде включают pH 4.8-8.5, температуру 28-37 °C, наличие в питательной среде микроэлементов и подходящего источника углерода. Бактерии семейства *Azotobacter* растут на безазотистых средах, которые предназначены для выделения свободноживущих азотфиксирующих, также олигонитрофильных организмов, к примеру, в среде Эшби, содержащей источник углерода (маннит, сахароза или глюкоза) и требуемые микроэлементы (источник фосфора, серы и т. д.).

1.4.2 Влияние компонентов питательной среды на рост *Azotobacter*

Полиморфизм азотобактера зависит в значительной степени от состава среды, на которой он выращивается.

Источники углерода.

Анализ отечественных и зарубежных исследований показал, что наиболее полно в метаболизм бактерий рода *Azotobacter* включаются сахароза, глюкоза, лактоза и маннит, менее полно – арабиноза, фруктоза и рамноза.

Авторами исследования, направленного на изучение влияния источника углерода на рост биомассы и продукцию метаболитов, отмечено, что для ряда различных видов и штаммов *Azotobacter* культивирование при 2% глюкозе является одним из лучших субстратов [30].

Большинству исследователям удавалось выращивать азотобактер в чашках с питательной средой в отсутствие углерода, если чашки были помещены в камеру, где находились пары ацетона, этилового спирта или некоторых других органических соединений. В присутствии легкодоступных форм углеродсодержащих соединений азотобактер может частично применять углекислоту из атмосферы. Увеличение концентрации углекислого газа вплоть до 0,5% в атмосфере несколько активизирует развитие азотобактера.

Однако азотобактером лучше усваиваются легкодоступные формы углеродсодержащих органических соединений. В почве запас подвижного органического вещества не слишком невелик, по этой причине недостаток легкодоступных соединений углерода в первую очередь ограничивает развитие азотобактера в естественных условиях.

Источники азота.

На плотных питательных средах, не содержащих азота, азотобактер образует крупные слизистые, иногда морщинистые колонии, окрашивающиеся при старении в желтовато-зеленоватый, розовый или коричнево-черный цвет. Колониям разных видов азотобактера присуща своя специфическая пигментация.

Источниками азота в питательной среде могут быть белки, пептиды, аминокислоты, соли аммония или аммиака, нитраты, а также атмосферный азот. Однако на средах с минеральными источниками азота клубеньковые бактерии развиваются слабее. Многие бактерии нуждаются в наличии аминокислот (например, тирозина), очень хорошо используют аспарагиновую кислоту и аспарагин [5].

В экспериментах по использованию в качестве источника азота нитрата натрия NaNO_3 установлено, что максимальное производство биомассы было обнаружено при 0,05% содержании нитратов в среде (C: N соотношение 105: 1; до 5,24 г/л). При увеличении концентрации NaNO_3 в среде до 0,06% содержание биомассы снижалось [34].

Использование сульфата аммония как источника азота показало, что при концентрации 0,04% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ рост *Azotobacter* и содержание биомассы увеличивалось до максимального уровня - 8,3 г/л, а более высокие концентрации не влияли на содержание биомассы, поскольку снижение pH среды ограничивало развитие бактерий.

Однако органические источники азота (пептон, дрожжевой экстракт) позволяют добиться большего производства биомассы: до 10 г/л при концентрации пептона 0,05 % (соотношение C: N 100 - 120: 1) и до 11,1 г/л при концентрации дрожжевого экстракта 0,05 % (соотношение C: N 168: 1).

Таким образом, можно сделать вывод, что максимальный рост *Azotobacter* наблюдается в среде, содержащей 0,05–0,06% дрожжевого экстракта как источника азота (соотношение углерод / азот 168: 1).

Таким образом, азобактерии хорошо растут на безазотистых средах, а также на средах с добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. В качестве источников азота применяют нитраты, соли аммония, а также некоторые аминокислоты.

Источники фосфора. Недостаток фосфора ингибирует рост и снижает жизнеспособность бактерий рода *Azotobacter*. Источником фосфора в питательных средах для *Azotobacter* является KH_2PO_4 (0,03-0,08 %).

Минеральные источники – микронутриенты.

Максимальное влияние на рост и развитие бактерий рода *Azotobacter* оказывают ионы железа, меди, марганца, цинка, бора, молибдена, кобальта и ряда других металлов. Бактерии нуждаются в микродозах данных элементов. В случае если эти вещества присутствуют в средах в больших количествах, чем это необходимо для развития микроорганизма, то они проявляют

ингибирующее действие, что объясняется законами конкурентного и неконкурентного торможения.

Значение pH.

Зона pH, при котором происходит развитие азотобактера, может несколько смещаться в зависимости от состава среды и других факторов. Так на связанном азоте азотобактер может расти в более кислой среде, чем на молекулярном азоте. Можно считать, что азотобактер способен развиваться на средах, имеющих диапазон pH от 4,5 до 9,0. Однако процесс азотфиксации происходит в более узком интервале 5,5-7,2 (иногда 7,7). Штаммы азотобактера, выделяемые из почв с разными значениями pH, по данным многих исследователей, по-разному реагируют на pH питательной среды.

Повышенная кислотность и щелочность отрицательно сказываются на интенсивности потребления энергетического материала и продуктивности азотфиксации. Физиологические и биохимические процессы протекают весьма неравномерно: чрезвычайно слабо в сильнокислой среде (pH 5,05-5,29), удовлетворительно в слабокислой и сильнощелочной (pH 5,8 и 9,12), относительно хорошо при pH 8,05-8,29 и наиболее интенсивно при 1,2-1,4.

Кислородный режим

Рассматривая кислородный режим, необходимый азотобактеру, следует отметить, что данный микроорганизм является аэробом. Аэрация, как отмечают многие исследователи, благоприятствует размножению азотобактера. Вместе с тем установлено, что азотобактер может размножаться и в микроаэрофильных условиях. В присутствии значительно высокого уровня аэрации может наблюдаться снижение накопления биомассы.

1.5 Известные среды

Анализ литературных источников показал, что в настоящее время предложен ряд питательных сред для развития бактерий рода *Azotobacter*.

Кандыба Е.В. и Назаров А.Г. в патенте RU 2414509 C1 в 2011 году предложили агаризованную питательную среду, имеющую состав (г/л): KH_2PO_4 - 0,5; MgSO_4 - 0,3; NaCl - 0,3; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ - следы; раствор микроэлементов - 0,1; сахароза - 20; агар - 20, pH 6,8-7,2, при $29\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 96 часов, культура образует круглые выпуклые блестящие слизистые колонии 2-4 мм, гладкие с ровным краем, непрозрачные, тягучей консистенции, при микроскопировании мелкие палочки $0,8\times 2,0\mu$, встречаются кокковидные формы [27].

На твердой питательной среде Берка, имеющей состав (г/л): KH_2PO_4 - 0,8; K_2HPO_4 - 0,2; MgSO_4 - 0,2; NaCl - 0,2; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ - 0,01; CaSO_4 - 0,1; глюкоза - 10; агар - 20, pH 6,8-7,0 после 96 часов культивирования при $29\pm 1^\circ\text{C}$, колонии прозрачные, в диаметре 1,5-3 мм, с гладкой блестящей поверхностью, круглые, выпуклые с ровными краями. При микроскопировании мелкие палочки.

Для культивирования бактерий в жидкой среде традиционно используется жидкая среда Берка следующего состава (г/л): KH_2PO_4 - 0,2, K_2HPO_4 - 1,05, MgSO_4 - 0,4, NaCl - 0,1, FeSO_4 - 0,01, Na_2MoO_4 - 0,06, CaCl_2 - 0,1, цитрат Na - 0,5, сахароза - 20.

При выращивании на жидкой питательной среде Федорова с мелассой (г/л): меласса - 30; K_2HPO_4 - 0,3; MgSO_4 - 0,3; NaCl - 0,5; K_2SO_4 - 0,2; FeCl_3 - 0,01; CaCO_3 - 5; раствор микроэлементов - 0,1; pH 6,8-7,2 при температуре $29\pm 1^\circ\text{C}$ и непрерывном перемешивании-аэрации, равной 1 объем воздуха/1 объем питательной среды в минуту в течение 24 часов, культура представляет собой слизистую жидкость; при микроскопировании клетки мелкие палочки, слабоподвижные; на 48 часу роста зрелые клетки полиморфные: от мелких палочек до кокковидных форм, неподвижные, образуют толстостенные цисты. Недостатком этой питательной среды является сравнительно низкая скорость роста и активность биомассы.

Известна питательная среда для выращивания азотфиксирующих микроорганизмов, в частности, штамма *Azotobacter chroococcum*,

содержащая, г/л: сахарозу - 20; K_2HPO_4 - 0,64; KH_2PO_4 - 0,16; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2; NaCl - 0,20; $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ - 0,05; Na_2MoO_4 - 0,001; $FeSO_4$ - 0,003. Недостатком приведенной выше питательной среды является низкая скорость роста биомассы.

Муталиевой Б.Ж. и Астафьевой Е.А. в патенте KZ (13) A4 (11) 26067 в 2011 году предложена питательная среда для культивирования микроорганизма *Azotobacter chroococcum* состава (г/л): сахароза - 20; K_2HPO_4 - 50; K_2SO_4 - 0,1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2; NaCl - 0,2; Na_2MoO_4 - 0,005; $FeCl_3$ - 0,01; $CaCO_3$ - 5. Предлагаемая питательная среда обеспечивает за более короткие сроки наращивание биомассы микроорганизма *Azotobacter chroococcum* [18].

Размеры клеток варьируют от мелких палочек до колоний диаметром 1,5- 3 мм при росте на различных питательных средах 1-1,2×1,5-2,5μ. Реакция по Граму - отрицательная.

Характер среды для выделения *Azotobacter* sp. основан на их основной природе хемогетеротрофии и фиксации азота. Сообщалось о различных методах выделения *Azotobacter* sp., таких как метод почвенной пасты и метод силикагеля.

Один из старейших методов, при котором почвенная паста изготавливается и обогащается источниками углерода, такими как глюкоза, сахароза, маннит, и помещается в часовое стекло или гипсовый блок и выдерживается на пластине Петри, содержащей фильтровальную бумагу, и инкубируется при температуре 27-30 °C в течение трех-семи дней. После инкубации слизистую колонию снимают [22].

Силикагель обогащают подходящим источником углерода для выделения питательных веществ, пластины засевают просеянной почвой и выдерживают при температуре 27-30 °C в течение 48-72 ч. Колонии *Azotobacter* растут вокруг частиц почвы на силикагеле.

Но в настоящее время вышеуказанные методы изоляции не используются, современные методы изоляции включали использование различных безазотистых твердых или агаровых сред, включая безазотистые

среды Виноградского, среду Берка, среду Эшби, среду Норриса. Все эти среды являются общей средой для выделения *Azotobacter*.

Среды, описанные выше, несколько схожи, различаются только по некоторым источникам углерода и процентному содержанию минералов и микро- и макроэлементов). Недостатком большинства предложенных сред является низкая скорость роста биомассы. В среде, предложенной Муталиевой Б.Ж. и Астафьевой Е.А., содержится 5 % K_2HPO_4 , что значительно превышает содержание этого компонента в других средах. Это обеспечивает большую скорость наращивания биомассы. Как показали исследования, присутствии увеличенного содержания калия фосфорнокислого (вплоть до 5 %) в составе питательной среды, скорость роста биомассы культуры *Azotobacter chroococcum* увеличилась в 10 раз.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Объект исследования

Объектом исследования являлись почвенные азотфиксирующие микроорганизмы *Azotobacter chroococcum*, выделенные из почвы, отобранной с огорода, рядом с газовой заправкой и на аллее в парке. Выбор мест отбора проб обусловлен тем, что эти почвы различаются по влажности, минеральному составу, pH, наличию почвенных микроорганизмов, что позволит оценить влияние почвы на рост и развитие азотобактерий.

Отбор проб осуществлялся согласно ГОСТ 17.4.4.01-83 "Общие требования к отбору проб почвы"; ГОСТ 17.4.4.02-84 "Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа" [7, 8]. На территорию, подлежащую контролю, составлялась описание с указанием адреса, точки отбора, расположения мест отбора.

Пробы почвы, предназначенные для бактериологического анализа, в целях предотвращения их вторичного загрязнения мы отбирали с соблюдением правил асептики: отбирали стерильными инструментами, перемешивали на стерильной поверхности, помещая в стерильную тару. Для каждой пробы писалась подробная этикетка, обозначающая дату взятия образца и место.

При невозможности проведения анализа в течение одного дня пробы почвы хранили в холодильнике при температуре от 4 до 5°C не более 24 ч.

Для подготовки к анализу пробу почвы в лаборатории рассыпали на стерильную поверхность и разминали стерильным пестиком крупные комки. Затем выбирали включения - корни растений, насекомых, камни, стекло, уголь, кости животных, а также новообразования - друзы гипса, известковые журавчики и др. Почву растирали в стерильной ступке и просеивали через стерильное сито с диаметром отверстий 3 мм, накрытое стерильной бумагой.

2.2 Питательные среды

Для культивирования азотобактера нами использовались:

- элективная среда Эшби следующего состава (г/л): глюкоза – 20,0; K_2HPO_4 – 0,2; $MgSO_4$ – 0,2; $NaCl$ – 0,2; K_2SO_4 – 0,1; $CaCO_3$ – 5,0; агар-агар – 20,0; вода дистиллированная – 1000 мл. [9];
- жидкая среда Виноградского (г/л): K_2HPO_4 - 1,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,04; $CaCO_3$ - 0,5;
- жидкая модифицированная среда Бейеринка (г/л): глюкоза - 20,0; K_2HPO_4 - 0,2; $CaCO_3$ - 5,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2; 1 см³ смеси микроэлементов по Федорову.

Как показали исследования, присутствию увеличенного содержания калия фосфорнокислого (вплоть до 5 %) в составе питательной среды, скорость роста биомассы культуры *Azotobacter chroococcum* увеличилась в 10 раз. Однако ряд исследований показали, что увеличение количества K_2HPO_4 не дает увеличения титров и скорости роста, а даже наоборот снижает [5, 3].

Присутствие факторов роста в питательных средах обеспечивали путем введения в состав автолизата дрожжей.

В составе питательной среды дрожжевой автолизат является источником добавочных питательных и ростовых веществ, т.к. в указанном количестве продуцент компенсирует свои потребности в азоте за счет имеющихся минеральных соединения азота.

С целью сокращения сроков культивирования и повышения выхода биомассы в качестве основы разрабатываемой питательной среды было решено использовать отвар семян бобовых культур.

Присутствие факторов роста в питательных средах обеспечивали путем введения в состав автолизата дрожжей, который получали путем помещения 100 г пекарских прессованных дрожжей в 500 мл воды, выдерживая при температуре от 58 °С в течение 48 ч, встряхивая 2 раза в сутки. Конец

автолиза устанавливали по полному разжижению дрожжей. Полученный автолизат автоклавировали при 120 °С 15 мин.

Отвар семян бобовых культур готовили, заливая сырье дистиллированной водой комнатной температуры, помещая на кипящую водяную баню, и варили в течение 60 мин, после чего настаивали 10 мин. Затем отвар процеживали, стерилизовали при 1.5 атм 120 °С в течение 30 мин.

Чечевица характеризуется значительным содержанием большого количества витаминов и минеральных веществ, кроме того заменимых и незаменимых аминокислот, пектина и пр. Чечевица богата фолиевой кислотой, витамином В₁, пантотеновой кислотой, витамином В₆, гамма-токоферолом, холином, витамином РР, витамином В₂.

Минеральный состав чечевицы разнообразен и богат макро-, микро- и ультрамикроэлементами. В нем преобладают: бор, кремний, кобальт молибден, никель, литий, ванадий, марганец, медь, хром, фосфор, железо, титан, цинк, калий, рубидий, цирконий, магний, сера, мышьяк, селен.

Достаточно высоко в чечевице содержание суммы углеводов (17.2%), в составе которых преобладают клетчатка и пектин. Чечевица содержит существенное количество крахмала, мальтозу, а также незначительное количество сахарозы.

Фасоль характеризуется высоким содержанием витаминов группы В, многих минеральных элементов, белков, незаменимых и заменимых аминокислот, фитостеролов, клетчатки, крахмала и пуринов.

Важно также, что азотобактер является продуцентом метилового эфира алифатической тетраеновой кислоты, обладающего фунгистатической активностью против многих фитопатогенов, для биосинтеза и накопления которого необходимы источники калия и фосфора, содержащиеся в семенах бобовых культур.

В качестве источников углеводов использовали глюкозу [5].

2.3 Посев на питательные среды

Выделение накопительной культуры. Приготовленную культуральную среду стерилизовали при 35 °С в течение 20 минут и разливали в стерильные чашки Петри. Небольшое количество почвы увлажняли до пастообразного состояния стерильной водопроводной водой и хорошо растирали в ступке резиновым пестиком. Небольшие комочки извлекали из подготовленной почвы с помощью бактериологической петли и помещали их по трафарету на поверхность агаровой среды Эшби. На одну чашку помещали 25–50 комочков почвы. Чашку помещали во влажную камеру, которую ставили в термостат при 28–30 °С на 6–8 суток.

Уменьшение времени культивирования не позволяет получить достаточную клеточную массу. Выращивание при температуре ниже 26 °С продлевает развитие микробных клеток, повышение температуры может привести к преждевременной гибели некоторых бактерий.

О наличии азотобактера судили по образованию характерных колоний вокруг комочков почвы. Колонии рассматривали, описывали, готовили из них мазки для микроскопирования морфологии клеток. На агаризованных средах *Az. chroococcum* растет в виде бесцветных (в молодом возрасте) густослизистых капель, которые по мере старения приобретают бурый, темно-коричневый или черный цвет.

Морфология клеток азотобактера специфична, что позволяет отличать его от клеток других организмов. Молодые клетки имеют форму крупных палочек (3 - 6 мкм) одиночных или сцепленных попарно, с округлыми концами. Они подвижны. С возрастом они превращаются в крупные кокки (до 4 мкм в диаметре), напоминающие число восемь (в случае попарного сцепления). Кокковидные клетки, как правило, покрываются капсулой, утрачивают подвижность, начинают выделять пигмент.

После посева методом комочков, те комочки, на которых появились колонии *Az. chroococcum*, перенесли из чашки Петри в ступку. Перемешали

все комочки до пастообразного состояния, для выравнивания КОЕ *Az. chroococcum*. Зараженная *Az. chroococcum* почва нужна будет для дальнейшего эксперимента.

В своем эксперименте, мы добавляли в готовую среду Эшби с известным составом автолизат дрожжей, отвар семян бобовых культур. Также увеличивали в питательной среде содержание соли калия фосфорнокислого (K_2HPO_4).

Культивирование осуществляли при 25-28 °C.

2.4 Оценка особенностей роста и метаболизма культур *Azotobacter*

Учет площади каждого комочка и площади ореола вокруг него производили посуточно. Основанием для расчета площади комочка послужило визуальное увеличение их площади и в некоторых случаях - «распада» колоний, связанного с ростом и отмиранием клеток, разрушением физических связей между частицами.

После установления наличия колоний азотобактера в почвенных комочках рассчитывают процентное содержание азотобактера по формуле:

$$X = A \cdot 100 / B,$$

где А – число комочков с ростом азотобактера; В – общее число комочков почвы [20].

Бактериальные колонии описывали, обращая внимание на следующие признаки: размер колонии (колония крупная – 10 мм в диаметре; средняя – 1-10 мм; мелкая, точечная – 1 мм); профиль колонии (колония выпуклая, конусоидная, плоская, кратерообразная); край колонии (ровный, лопастной, волнистый, зубчатый, бахромчатый, фестончатый); поверхность колонии (гладкая, бугристая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами, радиально исчерченная); цвет колонии; блеск и прозрачность; консистенция

(тестообразная, густая, слизистая, тягучая, жидкая, клейкая), вид колонии под микроскопом (зернистая, однородная, исчерченная).

Колонии рассматривали под микроскопом при различном увеличении (x8, x10, x40, x100).

Морфологию живых бактериальных клеток изучали в препаратах "раздавленная капля", микроскопируя их при большом увеличении с иммерсионным объективом (x100). Размеры клеток отмечали путем измерения их окулярным микрометром, подвижность клеток (с использованием 12-24-часового культивирования) и формы клеток.

Для исследования деталей строения клетки – органоидов, спор, жгутиков, различных включений готовили фиксированный и окрашенный препараты. Бактериальный препарат для фиксации и окрашивания (мазок) наносили на чистые обезжиренные стекла. На приготовленное стекло наносили каплю суспензии бактериальных клеток и делали тонкий мазок на поверхности стекла петлей или краем покровного стекла, после чего мазки сушили при комнатной температуре.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Влияние различных компонентов культуральных сред на рост бактерий рода *Azotobacter*

Производили посев взвеси *Azotobacter chroococcum* из расчета 1 мл на чашку с питательными средами: с добавлением автолизата дрожжей, с добавлением отвара семян бобовых культур, с увеличенным содержанием K_2HPO_4 .

Через 24 часа рост не регистрировался ни на одной из питательных сред. Первый видимый рост был зарегистрирован через 36 часов на всех средах, колонии округлые, выпуклые, блестящие, непрозрачные, слизистой консистенции размером 2–3 мм (рис. 1–3).

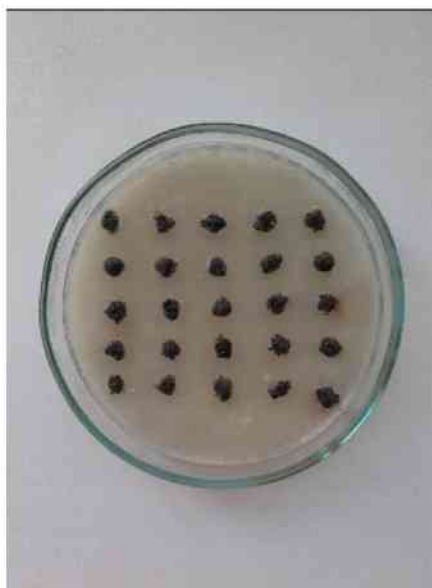


Рисунок 1. Почва с заправки на среде с добавлением отвара бобовых культур

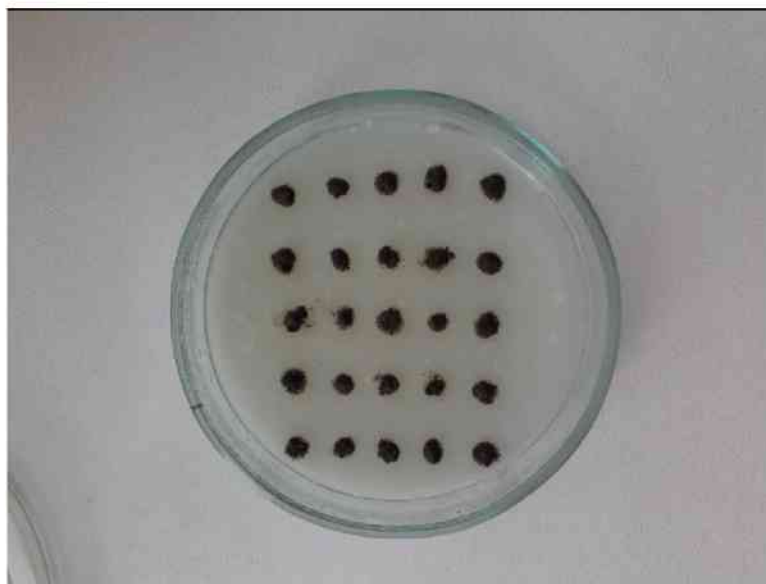


Рисунок 2. Почва с парка на среде с добавлением автолизата дрожжей



Рисунок 3. Почва с заправки на среде с добавлением K_2HPO_4

Существенного отличия морфологических и культуральных характеристик не наблюдалось. На рисунке 4 представлен снимок микробиологического препарата *Azotobacter chroococcum*, выделенного из почвы с огорода, выращенные на питательной среде с добавлением автолизата дрожжей.



Рисунок 4. Микроскопические препараты Azotobacter, выделенных из почвы с огорода на питательной среде с добавлением автолизата дрожжей (окраска гуашью)

Под микроскопом азотобактерии имели сферическую форму, некоторые расположены попарно. В микроскопическом препарате клетки рассредоточены, ассоциаций и цепочек не образуют. По окраске, размеру и форме выделенные штаммы отнесли к виду *Azotobacter chroococcum*.

Активность роста бактерий *Azotobacter* оценивали по размерам колоний на пятый день культивирования.

Результаты определения размеров колоний бактерий, отобранных на заправке, с огорода и с аллеи парка, выращенных на питательных средах с добавлением автолизата дрожжей, отвара семян бобовых и с увеличенным содержанием K_2HPO_4 представлены в таблицах 1 – 3 соответственно.

Таблица 1 – Размеры колоний Azotobacter, выращенных на питательной среде с добавлением автолизата дрожжей

Критерий	Заправка		Огород		Тропа	
	1	2	1	2	1	2
Размер колоний, мм	6	6	5	5	5	6
	5	6	4,8	6	4,8	5
	4,8	5,5	5	5,5	5	5,5
	6	4	5	4,5	4,5	4
	6,2	4,5	5	5	5	4
	7	6	5	6	5	6

Таблица 1 – Продолжение

	4,8	5,5	5,2	5,5	5,2	5,5
	5	5,5	6	5,5	6	5,5
	5	5	6,5	6	6,5	5
	6	5,5	6	5,5	6	6
	6	5,8	6	6	6	6
	6	4,5	6,8	5	6	4,5
	6,3	4,5	6,5	5	6,5	4,5
	6	4,8	7	4,5	6	5
	6,5	6	5	6	5	6
	5	6,5	5	6,5	5	6,5
	5,2	6	6,2	5	5,3	6
	4,5	5	6	4	6	4
	4	5	6	4,5	5,5	4
	4	5,5	7	5,5	4	5
	4,5	5	5	5	4,5	5
	4,8	6	5,5	5,5	4	5
	5,8	5,5	4,7	6	3,8	5,5
	6	6	4,5	5	4,2	4
	4,7	4,5	6,7	5	5,5	4,5
Среднее арифметическое повторности	5,404	5,364	5,656	5,32	5,212	5,12
Общее среднее	5,384		5,488		5,166	

Таблица 2 – Размеры колоний *Azotobacter*, выращенных на питательной среде с добавлением отвара семян бобовых культур

Критерий	Заправка		Огород		Тропа	
	1	2	1	2	1	2
Размер колоний, мм	6	5,5	6,5	6	5	6,5
	7,2	6,5	5	6,5	5	6
	7	7	5	7	5	6
	6	6	6,5	6	6,5	6
	6,5	6	6	6	5,5	6
	7	6,5	6	6,5	6	6,5
	6	6,8	5,5	6	6	7
	6	6	6	6	6	5,5
	5,5	6	7	6	6,5	6
	5,4	6	6,5	6	6	6
	5,8	5,5	6,5	6	6	6,5
	6	5,5	6	5,5	6,5	6
	7,3	7	7	7	5	6,5
	6	6,5	7	6,5	6,5	6
	6	6	6,5	6	5	5,8
	6,8	6,8	5	6,5	6,5	5,8
	6,5	6	5,8	6	5	6

Таблица 2 – Продолжение

	5,8	5	5,5	5	5,5	6
	5,5	5,5	6	6	6	5,5
	5,5	6,5	6	6,5	5	6
	5	6,6	6	6,6	5,5	5,5
	6	7	5,5	6	6,5	6
	6	7,5	5	6,5	6	6
	6,5	7,3	6	7	6	6
	7	7	6,5	6	6	6
Среднее арифметическое						
повторности	6,172	6,32	6,012	6,204	5,78	6,044
Общее среднее	6,246		6,108		5,912	

Таблица 3 – Размеры колоний *Azotobacter*, выращенных на питательной среде с увеличенным содержанием K_2HPO_4

Критерий	Заправка		Огород		Тропа	
	1	2	1	2	1	2
Размер колоний, мм	6,5	6,5	7	6,5	6	6
	6,6	6	6	7	6,5	6,5
	7	7	6,5	7	6,5	6,5
	6	7,5	8	7,5	6,5	7
	7,5	8	8	8	7	7
	7	8,4	7	8	7	6
	6,5	8	7	6,7	7	6,5
	7	7,5	7	8	6	6,5
	6	7	6,5	7,5	6,5	7
	6	7	6	7	7,4	6,5
	6,5	6,5	7	6,5	6	6,5
	7,5	6	6,5	6	6,5	6
	6,5	6	5	6	6	6
	7	6	7	6	6	6
	8	6,5	7,5	7	6,5	6,5
	7	6,5	7	6,5	6,5	6,5
	6	7	6	6,5	7	7
	7	7,5	7,5	7,5	6	6,5
	7,6	7,8	7	7	7	6
	7,5	8	8	8	6,5	6
	7	8,5	6,8	8,5	6	6
	6	8	6	8	6,5	5,5
	7,5	7,5	7	7,5	6	5,5
	6	7,3	8	7,5	7	6
	7	7	7,5	7	6,5	6
Среднее арифметическое						
повторности	6,808	7,16	6,912	7,148	6,496	6,3
Общее среднее	6,984		7,03		6,398	

Дисперсионный анализ показал, что размеры колоний достоверно отличаются: при одинаковых температурах наименьший рост азотобактерий отмечался у образцов, отобранных в парке, наибольший рост при температуре – у образцов рядом с заправкой или у образцов с огорода (рис. 5).

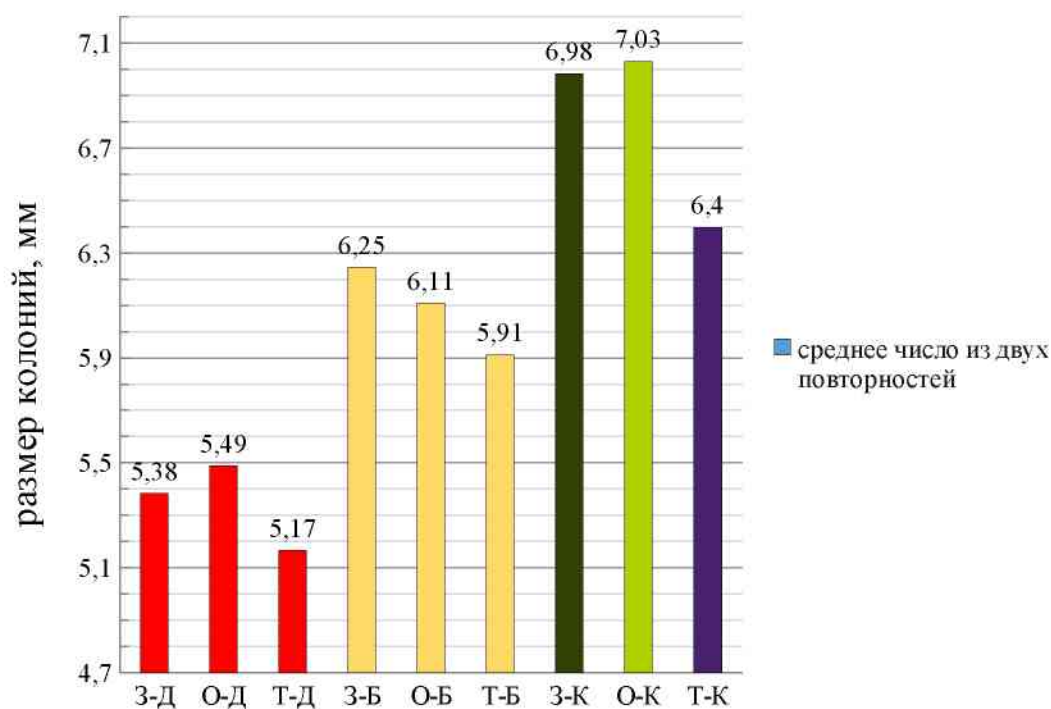


Рисунок 5. Диаграмма, показывающая размеры азотобактерий в зависимости от состава питательной среды: З – заправка, О – огород, Т – тропы; Д – с добавлением автолизата дрожжей, Б – с добавлением семян бобовых культур, К – с увеличенным содержанием K_2HPO_4

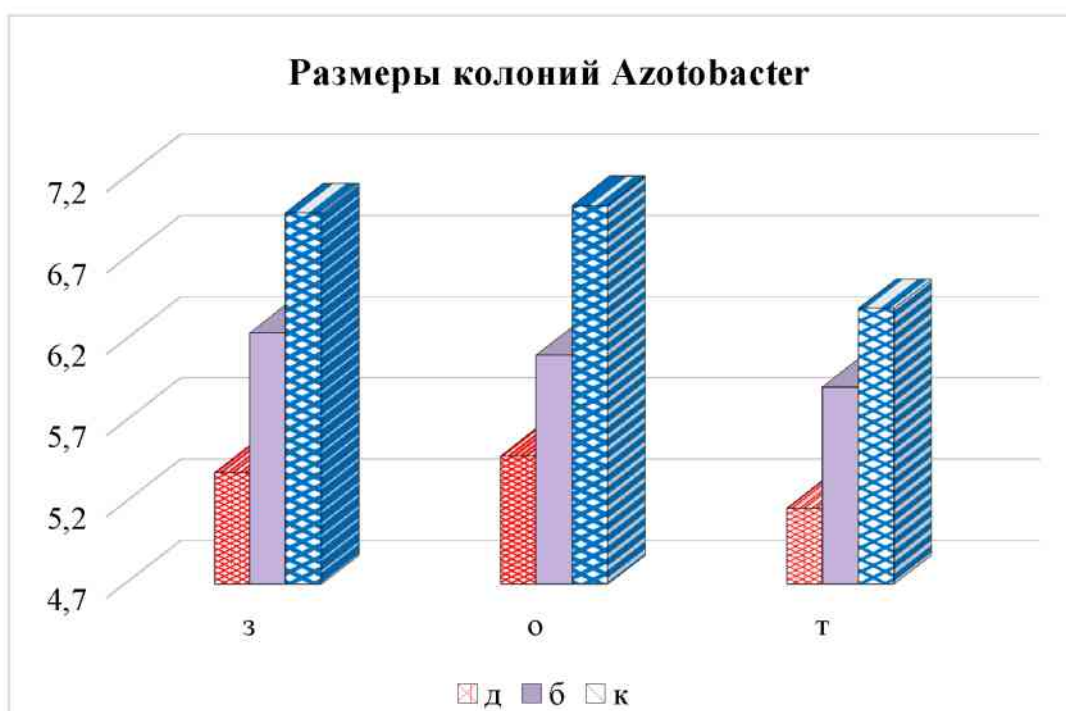


Рисунок 6. Размеры колоний азотобактерий у штаммов из различных мест обитания. Обозначения: З – заправка, О – огород, Т – тропа; Д – с добавлением автолизата дрожжей, Б – с добавлением семян бобовых культур, К – с увеличенным содержанием K_2HPO_4

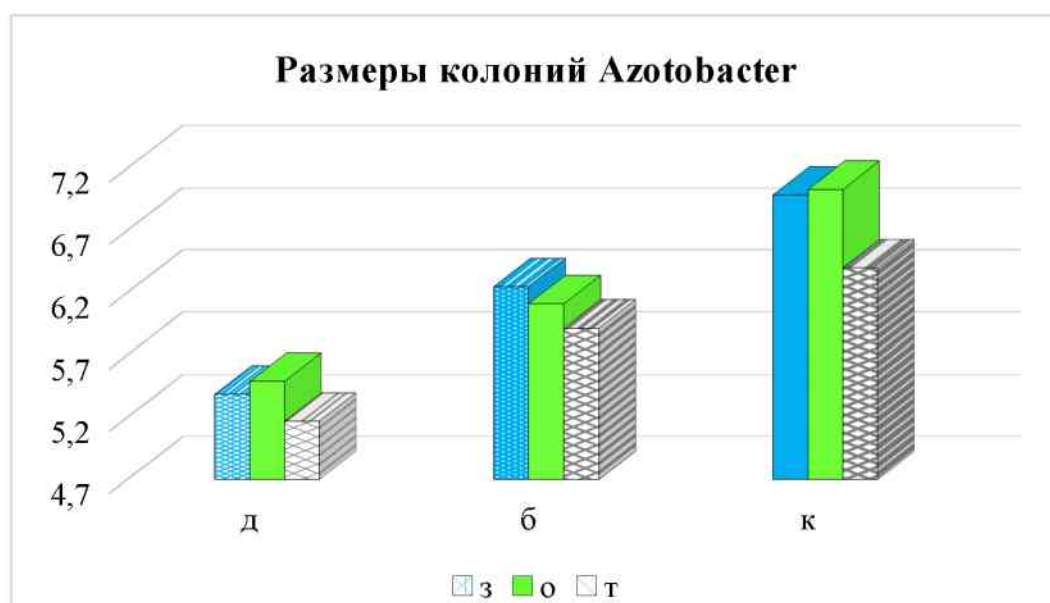


Рисунок 7. Диаграмма, показывающая сравнение размеров колоний азотобактерий при различном составе питательной среды. Обозначения: З – заправка, О – огород, Т – тропа; Д – с добавлением автолизата дрожжей, Б – с добавлением семян бобовых культур, К – с увеличенным содержанием K_2HPO_4

На питательной среде с добавлением автолизата дрожжей рост азотобактерий из огорода на 1,9 % превышал рост азотобактерий из заправки и на 5,9 % – из тропы парка. Похожие результаты были получены при использовании питательной среды с повышенным содержанием K_2HPO_4 : рост азотобактерий из огорода на 0,7 % превышал рост азотобактерий из заправки и на 9,0 % – из тропы парка.

На питательной среде с добавлением отвара семян бобовых культур наибольший рост показали азотобактерии из заправки: их рост на 2,2 % превышал рост азотобактерий из огорода и на 5,3 % - из тропы парка (рис. 6 – 7).

Анализ данных, представленных на рисунке 5 показал, что наименьший рост колоний на всех питательных средах происходил с азотобактериями, выделенными из почвы тропы в парке. Это может быть вызвано тем, что почва тропы в парке кислая и не содержит микроэлементы, необходимые для роста и развития азотобактерий.

Более активный рост бактерий из заправки на питательной среде с добавлением автолизата дрожжей может быть связан с использованием азотобактериями бензина в качестве источников углерода, что соответствует литературным данным [11].

Анализ роста азотобактерий на различных питательных средах показал, что оптимальной является питательная среда с увеличенным содержанием K_2HPO_4 : рост *Azotobacter chroococcum* из заправки на этой среде на 10,6 % превосходит рост на среде с добавлением отвара семян бобовых культур и на 22,9 % – с добавлением автолизата дрожжей. Рост азотобактерий из огорода на питательной среде с повышенным содержанием K_2HPO_4 на 13,1 % превышает на среде с отваром бобовых и на 21,9 % - на среде с добавлением автолизата дрожжей. Аналогичные результаты получены для азотобактерий из тропы парка: рост азотобактерий на питательной среде с повышенным содержанием K_2HPO_4 на 7,6 % превышает на среде с отваром бобовых и на 19,3 % - на среде с добавлением автолизата дрожжей.

Литературные данные по влиянию K_2HPO_4 на рост *Azotobacter chroococcum* противоречивы [5, 3], однако полученные нами результаты подтверждают положительное влияние K_2HPO_4 на рост азотобактерий.

Для определения зависимости между составом питательной среды и размером колоний провели однофакторный дисперсионный анализ (таблица 4).

Таблица 4 – Результаты однофакторного дисперсионного анализа

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Между группами	177,384	8	22,17299	52,53529	1,72E-59	3,340974
Внутри групп	186,128	441	0,422059			
Итого	363,5119	449				

Дисперсионный однофакторный анализ по выборкам показал, что состав питательной среды (как фактор) достоверно оказывает влияние на рост азотобактерий ($\alpha = 0,001$).

Двухфакторный анализ проведен по первому фактору – местоположение и по второму фактору – состав питательной среды (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты двухфакторного дисперсионного анализа

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Местоположение	14,54271	2	7,271356	17,22829	6,25E-08	3,016175
Среда	159,451	2	79,72549	188,8966	5,54E-60	3,016175
Взаимодействие	3,390222	4	0,847555	2,008145	0,092376	2,392164
Внутри	186,128	441	0,422059			
Итого	363,5119	449				

Взаимное влияние состав питательных сред и местоположения недостоверно. Самое значительное влияние на различие между вариантами оказывает состав среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Выделенные нами из почвенных проб бактерии рода *Azotobacter*, по способности к азотфиксации и морфологии бактерий соответствуют литературным данным для вида *Azotobacter chroococcum*: азотобактерии имели сферическую форму, некоторые расположены попарно, в микроскопическом препарате рассредоточены.
2. Результаты нашей работы также подтверждают литературные данные о том что азотобактер:
 - это группа грамотрицательных свободноживущих азотфиксирующих аэробных бактерий, обитающих в почве;
 - чрезвычайно требователен к реакции среды, плохо переносит подкисление - растёт при pH 4.8-8.5;
 - азотобактер – типичный мезофил. 28-37 °C;
 - большое влияние на развитие азотобактера оказывает минеральный состав среды. Совершенно необходим для большинства культур молибден.;
 - требует подходящего источника углерода.
3. Модифицируя питательную среду для *Azotobacter chroococcum* добавлением автолизата дрожжей, отвара семян бобовых культур, увеличением содержания K_2HPO_4 мы установили, что:
 - наименее активный рост наблюдался у азотобактерий, выделенных из почвы тропы парка на всех питательных средах. Это может быть связано с тем, что почва тропы парка является кислой, либо не содержит необходимых азотобактеру микроэлементов;

- наиболее оптимальной является среда с увеличенным содержанием K_2HPO_4 . Литературные данные по влиянию K_2HPO_4 на рост *Azotobacter chroococcum* противоречивы, однако, полученные нами результаты подтверждают положительное влияние K_2HPO_4 на рост азотобактерий;
- наиболее высокий рост *Azotobacter* на средах с содержанием автолизата дрожжей и с добавлением отвара семян бобовых культур наблюдался у азотобактерий из заправки. Это может быть связано с использованием азотобактериями бензина в качестве источников углерода, что соответствует литературным данным;
- рост азотобактерий из огорода на питательной среде с повышенным содержанием K_2HPO_4 на 13,1% превышает рост на среде с отваром бобовых и на 21,9% - на среде с добавлением автолизата дрожжей.

4. С помощью дисперсионного анализа установлено, что наибольшее влияние на рост азотобактерий оказывают не особенности штаммов из разных сред обитания, а состав питательной среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аглеева В. А., Золотарева В. С., Капаева А. В. Определение бактерий рода *Azotobacter*, выделенных из почв естественных экосистем и участков приусадебных хозяйств // Юный ученый. 2021. № 4. С. 28-31.
2. Бетке И. А. Формирование оптимальной среды для развития колоний *Azotobacter* в интересах растениеводства. // Материалы 58-й Международной научной студенческой конференции. Новосибирск, 2020. С. 42.
3. Биосинтез альгинатов бактериями рода *Azotobacter* / Г. А. Бонарцева [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. № 1. С. 61-68.
4. Биосинтез альгината и поли(3-оксибутирата) бактериальным штаммом *Azotobacter agile* 12 / А.А. Дудун [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. № 6. С. 559-565.
5. Гарбуз С. А., Корытова В. Е. Подбор оптимальной питательной среды для гомогенного, периодического культивирования *Azotobacter chroococcum* // Международный научно-исследовательский журнал. 2016. № 12 (54). С. 12-14.
6. Госманов Р. Г., Ибрагимова А. И., Галиуллин А. К. Микробиология. СПб. : Лань, 2013. 320 с.
7. ГОСТ 17.4.4.01-83. Общие требования к отбору проб почвы. М. : Стандартинформ, 2008. 4 с.
8. ГОСТ 17.4.4.02-84. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. М. : Стандартинформ, 2008. 4 с.
9. ГОСТ Р 54653-2011 Удобрения органические. Методы микробиологического анализа. М. : Стандартинформ, 2011. 10 с.

10. Емцев В. Т., Мишустин Е. Н. Микробиология. М. : Агропромиздат, 2003. 383 с.
11. Использование бактерий рода *Azotobacter* при биоремедиации нефтезагрязненных почв / Н. Б. Градова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. № 3. С. 318-321.
12. Методы выделения, изучения и культивирования микроорганизмов / Т.И. Громовых [и др.]. Красноярск, 2002. 150 с.
13. Колтовская С. Г., Коршунова Я. М., Иванов К. Д. Изучение динамики образования полисахаридного комплекса *Azotobacter chroococcum* // Вестник современных исследований. 2019. № 2.2. С. 4-7.
14. Коростелёва Л. А., Кошаев А. Г. Основы экологии микроорганизмов. СПб. : Лань, 2013. 320 с.
15. Николаева Д. А. Биосинтез поли-3-гидроксibuтирата разной молекулярной массы культурой *Azotobacter chroococcum* и его биодegradация // автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М. , 2004. 30 с.
16. Новокупцев Н. В. Оптимизация условий культивирования *azotobacter vinelandii* д-08 для увеличения выхода экзополисахарида // Известия Саратовского университета. 2016. № 2. С. 164-168.
17. Оптимизация условий культивирования и биосинтеза экзополисахарида *Azotobacter vinelandii* / С. П. Четвериков [и др.] // Башкирский химический журнал. 2006. №5. С. 8-15.
18. Питательная среда для культивирования микроорганизма *Azotobacter chroococcum* : пат. 26067 Республика Казахстан. № 2011/1155.1 ; заявл. 07.11.2011 ; опубл. 14.09.2012, 2 с.
19. Руководство к практическим занятиям по цитологии / Е. З. Усубова [и др.]. Волгоград: Изд-во ВолГУ, 2014. 55 с.
20. Селивановская С. Ю., Лапытова В. З. Микроорганизмы в круговороте биогенных элементов. Казань, 2014. 11 с.

21. Смирнова Д. Б., Ивахнова Д. А., Апрятина К. В. Изменение скорости роста естественных почвенных микроорганизмов при добавлении в среду различных концентраций коллоидного селена // Потенциал современной науки. 2014. № 6. С. 23-27.
22. Способ получения биоудобрения : пат. 2130005 Рос. Федерация. № 99111333/13 ; заявл. 04.06.1996 ; опубл. 10.05.1999, 7 с.
23. Способ приготовления бактериального удобрения на основе бактерий рода *Azotobacter* : пат. 2390517 Рос. Федерация. № 2008129928/13 ; заявл. 23.07.2008 ; опубл. 27.05.2010, 9 с.
24. Терещенко Н. Н., Акимова Е. Е., Минаева О. М. Современные методы оценки микробиологических свойств и экологического статуса почвы. Томск : Издательский дом ТГУ, 2017. 152 с.
25. Шильникова В. К., Ванькова А. А. Микробиология. М. : Дрофа, 2004. 265 с.
26. Штамм бактерий *Azotobacter chroococcum* ЗАО «Биофлора» N В-05 для получения биопрепарата для повышения почвенного плодородия, повышения урожая сельскохозяйственных культур и качества его, оздоровления почвы, восстановления нарушенных земель и биопрепарата на его основе для повышения почвенного плодородия и восстановления нарушенных земель : пат. 21177466 Рос. Федерация. № 99112161/13 ; заявл. 04.06.1999 ; опубл. 27.12.2001, 6 с.
27. Штамм бактерий *Azotobacter chroococcum*, обладающий антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным микроорганизмам, и его применение : пат. 2414509 Рос. Федерация. № 2009127881/10 ; заявл. 21.07.2009 ; опубл. 20.03.2011, 6 с.
28. Штамм бактерий *Azotobacter chroococcum*, обладающий широким спектром фунгицидного действия и биопрепарат на его основе : пат.

2289620 Рос. Федерация. № 2005129297/13 ; заявл. 21.09.2005 ; опубл. 20.12.2006, 6 с.

29. Шутова В. В., Русяева А. Б. Получение и оценка молекулярных свойств альгината, синтезированного при культивировании *Azotobacter vinelandii* д-05 // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2018. № 4. С. 455-461.
30. Galal GF, Ouda SM. Production of alginate by different isolates of *Azotobacter* species // Life Sci. J. 2014. № 11(9). P. 29-38.
31. González-López J., Rodelas B., Pozo C. Liberation of amino acids by heterotrophic nitrogen fixing bacteria // Amino Acids. 2005. № 28(4). P. 363–367.
32. Jnawali A. D., Ojha R. B., Marahatta S. Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability. A review // Adv. Plants Agric. Res. 2015. № 2(6). P. 1-5.
33. Kurrey D. K., Sharma R., Lahre M. K. Effect of *Azotobacter* on physio-chemical characteristics of soil in onion field // Pharma Inn. J. 2018. № 7(2). P. 108*113.
34. Revin V., Shutova V., Novokuptsev N. Biocomposite materials from lignocellulose raw materials and levan produced by *Azotobacter vinelandii* // Journal of Biotechnology. 2016. № 231. P. 345-356.

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 Нурмаметова Алсу Рашитовна

Тема работы: «Влияние компонентов культуральной среды на рост
Azotobacter»

Утверждена приказом по Университету от «25» ноября 2020 г. № 883/0

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

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки вы- полнения 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 компонентов сред.	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 влияния различных компонентов культуральных сред на рост бактерий Azotobacter	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 06.11.2020

Руководитель  Заплатин Б.П.

Задание принял к исполнению 