

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:
**«ТЕРМОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ
AZOTOBACTER»**

Студент

Безбородова Кристина Михайловна

Руководитель

Заплатин Б.П.

Нормоконтролер

Кручинина А.Д.

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

Заведующий кафедрой

Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой

хорошо

(протокол заседания ГЭК от 25.06.21 № 2)

Секретарь ГЭК

Ключников С.В.

Пенза, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Эколого-физиологическая характеристика бактерий рода <i>Azotobacter</i>	6
1.2 Особенности распространения <i>Azotobacter</i> в различных типах почв.....	11
1.3 Свойства бактерий рода <i>Azotobacter</i>	14
1.3.1 Морфологическая характеристика.....	14
1.3.2 Основные физиологические свойства.....	16
1.4 Влияние температуры на характер роста и физиологическую активность бактерий рода <i>Azotobacter</i>	18
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	23
2.1 Объект исследования.....	23
2.2 Питательные среды и посев культур.....	24
2.3 Инкубирование при различных температурах.....	25
2.4 Оценка особенностей роста и метаболизма культур <i>Azotobacter</i>	26
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	28
3.1 Влияние температуры на активность роста бактерий рода <i>Azotobacter</i> ...	28
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	37
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	38

ВВЕДЕНИЕ

Азотобактер играет важную роль в круговороте азота в природе, связывая недоступный растениям атмосферный азот и выделяя связанный азот в виде ионов аммония в почву. Используется человеком для производства азотных биоудобрений, является продуцентом некоторых биополимеров.

Азотобактер – свободноживущий азотофиксатор, его распространение значительно зависит от питательного режима почвы, то есть, он чувствителен к наличию в среде фосфора, калия и кальция. Существующие данные по активной колонизации азотобактером зоны корней растений, а также способности проникать вглубь тканей корня, дают основание относить этот микроорганизм к группе ассоциативных diaзотрофов.

Бактерии рода *Azotobacter* уникально приспособлены к свободному существованию в почве, ведь почти все представители этого рода являются высокоактивными азотфиксаторами и продуцируют вещества фитогормонального действия, органические кислоты, витамины.

Большинство представителей рода обладают способностью мобилизовать труднорастворимые соединения в почве, продуцируя продукты обмена в среду. Описаны штаммы, продуцирующие антибиотические вещества антифунгального и антибактериального действия. Несмотря на нетребовательность к источникам углерода и энергии, то есть отсутствие зависимости от корневых выделений, многие представители рода адаптируются к условиям внешней среды.

В почве, как среде обитания, микроорганизмы находятся под влиянием биогенных и абиогенных факторов, которые оказывают воздействие на их физиологическую активность.

К числу факторов внешней среды, влияющих на характер роста и физиологическую активность бактерий рода *Azotobacter*, относится температура.

В природе и лабораторных условиях микроорганизмы могут подвергаться кратковременному воздействию высоких температур. Во время такого теплового воздействия клетки обычно не размножаются. После прекращения действия этого неблагоприятного для развития микроорганизма фактора одни штаммы могут сохранить репродуктивную способность (способность к размножению), другие оказываются менее устойчивыми и погибают. Устойчивость микроорганизмов к кратковременному воздействию высоких температур без повреждения репродуктивной способности микроорганизма (при снятии действия этих температур) характеризуют термином терморезистентность.

Селекция и отбор физиологически активных штаммов бактерий, устойчивых к неблагоприятным факторам, обладающих повышенной продуктивностью и терморезистентностью, позволяют повысить эффективность создания бактериальных препаратов.

Для мезофильных бактерий, к которым относятся бактерии рода *Azotobacter*, оптимальной температурой роста считается 37 °С, хотя они способны размножаться в широком температурном диапазоне от – 22 °С до 42 °С. Штамм бактерий *Azotobacter chroococcum*, входящий в состав азобактерина, – мезофил, его рост возможен в интервале 25-35°С, оптимальная для роста температура 29±1°С.

Из-за тепляющего влияния снежного покрова среднегодовые температуры почвы выше среднегодовых температур воздуха и возрастают с севера на юг и с востока на запад. Наиболее низкие значения среднегодовой температуры почвы отмечаются на островах Северного Ледовитого океана, на п-ове Таймыр и северо-востоке Якутии, наиболее высокие характерны для Черноморского побережья Кавказа и Прикаспийской низменности.

Регулирование теплового режима почв можно осуществлять с помощью агротехнических, агро-мелиоративных и агрометеорологических приемов.

Хозяйственная ценность препаратов *Azotobacter* повышается если эти препараты будут работать в большом диапазоне температур. Также важно выяснить – какая температура является оптимальной для промышленных препаратов и для диких штаммов *Azotobacter*, поскольку возможно, что дикие штаммы бактерий могут превосходить коммерческий препарат. Это и определяет актуальность исследования.

Цель исследования: оценить терморезистентность различных штаммов *Azotobacter*.

Задачи исследования:

- провести эколого-физиологическую характеристику бактерий рода *Azotobacter*;
- охарактеризовать морфологические и физиологические свойства бактерий рода *Azotobacter*;
- описать особенности распространения бактерий рода *Azotobacter* в различных типах почв;
- изучить влияние температуры на характер роста и физиологическую активность различных штаммов бактерий рода *Azotobacter*;

Выпускная квалификационная работа написана на 41 листе, содержит 9 рисунков, 5 таблиц и список литературы на русском и английских языках из 41 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эколого-физиологическая характеристика бактерий рода *Azotobacter*

После фотосинтеза вторым по важности биологическим процессом на земле является биологическая фиксация азота, которая заключается в восстановлении атмосферного азота (N_2) до аммиака. Фиксация азота опосредуется исключительно прокариотами, включая многие роды бактерий, цианобактерий и актиномицета *Frankia*. Азотфиксирующие микробы могут существовать как независимые, свободноживущие организмы или в ассоциациях различной степени сложности с другими микроорганизмами и растениями. Азот, самый распространенный элемент в атмосфере, является ограничивающим элементом для роста большинства организмов. Из-за ограничений, которые почва накладывает на микробную биоту с точки зрения ограничений в питании и экологических стрессов, многие почвенные организмы взаимодействуют друг с другом для преодоления этих ограничений.

Azotobacter – свободноживущие аэробные бактерии, доминирующие в почвах. Это несимбиотические гетеротрофные бактерии, способные фиксировать в среднем 20 кг/га азота в год. Кроме того, они также производят вещества, способствующие росту растений. *Azotobacter* встречаются в почве и ризосфере многих растений, и их популяция колеблется от незначительных до 10^4 г⁻¹ почвы в зависимости от физико-химических и микробиологических (микробных взаимодействий) свойств.

Azotobacter chroococcum является наиболее распространенным видом, другие описанные виды включают *A. agilis*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. insignis*, *A. macrocytogenes* и *A. paspali*. В почвах на популяции *Azotobacter* влияют физико-химические (например, органическое вещество, pH, температура, глубина почвы, влажность почвы) и микробиологические

(например, микробные взаимодействия) свойства почвы. Что касается физико-химических свойств почвы, то многочисленные исследования были сосредоточены на содержании питательных веществ (т. е. P, K, Ca) и органических веществ и их положительном влиянии на *Azotobacter* spp. популяции в почвах.

У видов *Azotobacter* есть полный набор ферментов, необходимых для фиксации азота: ферредоксин, гидрогеназа и важный фермент нитрогеназа. Процесс азотфиксации требует притока энергии в виде аденозинтрифосфата (АТФ). Фиксация азота очень чувствительна к присутствию кислорода, поэтому *Azotobacter* имеет специальный защитный механизм против кислорода, а именно значительную интенсификацию метаболизма, снижающую концентрацию кислорода в клетках [20].

Бейеринк в 1901 году обнаружил, что *Azotobacter* могут фиксировать атмосферный азот в свободноживущем состоянии, без какого-либо симбиоза или ассоциации с каким-либо растением.

Нитрогеназа – наиболее важный фермент, участвующий в азотфиксации. У видов *Azotobacter* есть несколько типов нитрогеназ [18]. Фермент нитрогеназа состоит из двух ферментов: динитрогеназы и динитрогеназы-редуктазы.

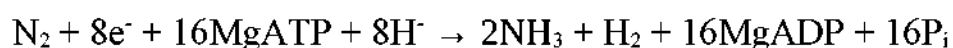
Динитрогеназа, которая также известна как компонент I, представляет собой железо-молибденовый белок. Редуктаза динитрогеназы, компонент II, является железосодержащим белком.

Динитрогеназа состоит из двух α -субъединиц и двух β -субъединиц, каждая из которых имеет среднюю молекулярную массу 56 кДа.

Редуктаза динитрогеназы состоит из двух идентичных субъединиц, каждая из которых имеет молекулярную массу 34 кДа. Один кластер $4\text{Fe}:4\text{S}$ соединен между двумя субъединицами динитрогеназы редуктазы.

Всего 16 атомов Fe присутствуют в четырех кластерах $4\text{Fe}:4\text{S}$ (P-кластер), которые принимают 1 электронную пару на кластер от динитрогеназы редуктазы. Перенос электронов от динитрогеназы редуктазы

к динитрогеназе требует участия Mg-АТФ. В общей сложности четыре молекулы MgАТР гидролизуются для каждой пары электронов, передаваемых между редуктазой динитрогеназы и динитрогеназой. Поскольку переносятся 4 пары электронов, реакция, как показано ниже, требует минимум 16 MgАТР:



Следующим шагом является перенос электрона на железо-молибденовый кофактор (Fe-Mo-co), который был впервые выделен в 1977 году.

Во время катализа электроны текут от пары молекул АТР в Компоненте II к кластеру Fe-S, к Р-кластеру и, наконец, к FeMo-co, где происходит восстановление N₂ до NH₃.

В дополнение к фиксации атмосферного азота, который используется растениями, *Azotobacter* также вырабатывают гормоны роста растений. Было обнаружено, что как *A. vinelandii*, так и *A. chroococcum* выделяют индолуксусную кислоту, действие которой усиливается в присутствии ее предшественника триптофана.

Известно, что растения могут усваивать только растворимую форму фосфатов. Азотобактерии способны солубилизировать нерастворимые фосфаты в почве.

Для *Azotobacter* характерно образование устойчивых к высыханию кист, способность развивать высокую частоту дыхания, производить внеклеточные полисахариды (альгинаты, леваны и целлюлозу) и накапливать полигидроксibuтират. *Azotobacter*, как правило, легко культивировать, поэтому их широко использовали при изучении фундаментальных биохимических процессов, например, транспорта электронов и хранения железа. Эти исследования привели к фундаментальным достижениям в понимании физиологии, биохимии и генетики фиксации азота и метаболизма

H₂.

Azotobacter оказывают благоприятное воздействие на рост и урожай сельскохозяйственных культур за счет биосинтеза биологически активных веществ, производства фитопатогенных ингибиторов, изменения поглощения питательных веществ и, в конечном итоге, усиления биологической фиксации азота. Исследования *Azotobacter chroococcum* в растениеводстве показали его важность в улучшении питания растений и повышении плодородия почвы.

Было обнаружено, что несколько штаммов *Azotobacter* способны продуцировать аминокислоты при выращивании в культуральной среде с добавлением различных источников углерода и азота. Вещества, продуцируемые этими бактериями, участвуют в нескольких процессах, что приводит к стимулированию роста растений. Использование *Azotobacter chroococcum* в исследовательских экспериментах в качестве микробного инокулянта за счет выделения ростовых веществ и их воздействия на растения заметно улучшило урожайность сельскохозяйственных культур [38].

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

В литературе присутствует несколько примеров, подтверждающих важность подавления болезней различными видами *Azotobacter*. Штамм TRA2 *A. chroococcum*, который является изолятом ризосферы пшеницы, показал сильную антагонистическую активность против грибов корневой гнили *Macrophomina phaseolina* и *Fusarium oxysporum* в дополнение к улучшению роста растений пшеницы, что могло быть связано с улучшением здоровья растений [39].

Азотобактер обеспечивает хорошую защиту растений, агрессивно заселяя корни пшеничных культур. Заболеваемость узловатой нематодой *Meloidogyne incognita* значительно снижается, когда *A.*

chgoosossimприменялся к растениям нута [34].

Предложено несколько механизмов борьбы бактерий с болезнями растений. Они включают производство сидерофоров, антимикробных веществ, токсинов, а также гормонов роста, таких как ауксины, гиббереллины и цитокинины. Было продемонстрировано, что такие стратегии придают большую устойчивость к атаке патогенов растений.

Azotobacter spp. обладают способностью производить сидерофоры, которые связываются с доступной формой железа Fe^{3+} в ризосфере, тем самым лишая фитопатогены доступности железа и защищая здоровье растений. Некоторые примеры патогенов, с которыми удалось справиться с использованием *Azotobacter* в качестве биоинокулянта, включают *Alternaria*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *C-urvularia*, *Helminthosporium* и *Aspergillus* [19].

Сидерофоры составляют группу хелатирующих железо молекул, которые изменяют доступность железа во внеклеточной среде благодаря его способности вытеснять другие природные лиганды [41].

Сообщается о более чем 500 сидерофорах, однако они используют только ограниченный набор обычных фрагментов для удержания железа. Бактерии, принадлежащие к роду *Azotobacter*, экспрессируют богатые железом нитрогеназы, с помощью которых они восстанавливают азот [35].

Azotobacter spp. получают доступ к труднорастворимому Fe в окружающей среде, создавая комплекс Fe-сидерофор, а затем этот комплекс поглощается мембраносвязанными рецепторами. Такие комплексы Fe-сидерофор могут быть недоступны для других конкурирующих микроорганизмов, поэтому они могут проявлять антифитопатогенную активность и могут напрямую улучшать рост растений, защищая растения от атаки патогенов [37].

Исследования показали, что сидерофоры, продуцируемые *A. vinelandii*, обладают способностью связывать молибден (Mo) и ванадий (V), которые необходимы нитрогеназам, а также поглощать токсичные тяжелые металлы,

такие как вольфрам (W) и цинк (Zn).

Baars и др. провели детальную характеристику метаболома сидерофоров и обнаружили более 35 вторичных метаболитов, связывающих металлы, которые указывают на большой хелом *A. vinelandii*, который включает вибриоферрин, который ранее известен только у морских бактерий [35]. Также сообщается, что *A. chroococcum* продуцирует вибриоферрин и амфибактины. Однако еще не определены структуры сидерофоров, а также механизм, с помощью которого *A. chroococcum* получает доступ к Fe, необходимому для генерации высоких уровней нитрогеназ [40].

Весьма важное свойство азотобактера заключается в том, что он вырабатывает фунгистатическое вещество, представляющее собой метиловый эфир алифатической тетраеновой кислоты, содержащей гидроксильную и В-метиловую группы. Обнаруженный антибиотик-азохроомицин активен против значительного числа фитопатогенных грибов. Благодаря описываемому свойству при бактеризации азотобактером в ризосфере угнетается развитие микроскопических грибов, многие из которых задерживают рост растений. Так, культура *Az. chroococcum* снимает угнетающее действие фитотоксичного гриба *Alternaria* на кукурузу, а рост не зараженного растения стимулирует.

1.2 Особенности распространения *Azotobacter* в различных типах почв

Азотобактерии – это широко распространенный почвенный организм, который обычно рассматривается как имеющий определенное значение в большинстве пахотных почв в результате его способности связывать азот и производства факторов роста. Развитие или выживание азотобактерий, встречающихся естественным путем в почве или внесенных в нее, зависит от наличия доступного источника энергии; минералов, таких как кальций, фосфор, калий, железо и молибден; надлежащей аэрации почвы; подходящей влажности и благоприятной реакции почвы.

Открытие Бейеринком в 1901 году азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter* привело к многочисленным исследованиям, посвященным их распространению в почвах.

Азотобактерии широко распространены на поверхности земли, будучи обнаруженными в почвах практически всех стран мира. Они обнаружены в очень влажных и очень сухих регионах; в почвах в жарком и холодном климате; на высоких и низких высотах; как в плодородных, так и в бесплодных почвах; в поверхностных почвах и подпочвах; в целинных, возделываемых и лесных почвах; и в новообразованных торфяных и вулканических почвах; однако примерно половина всех исследованных почв показала отсутствие азотобактерий. Следовательно, должен существовать какой-то фактор или факторы, ограничивающие рост и распространение азотобактерий в почвах.

Работа многих исследователей показала, что азотобактерии чувствительны к кислотности, было заявлено, что они обычно не встречаются в почвах, имеющих реакцию более кислую, чем pH 6,0. Этот вывод был сделан на основе исследований, в которых использовались жидкие питательные среды. Поскольку азотобактерии являются строгими аэробами, они плохо растут в жидких средах, которые обеспечивают частично анаэробные условия, и результаты полученных таким образом испытаний не являются репрезентативными для тех, которые были бы получены в естественных условиях, существующих в почве. В пленке, которая образуется на поверхности среды этими организмами, существует конкуренция с другими бактериями за доступный источник углерода. Кроме того, жидкая среда часто заряжается угольной и масляной кислотами, которые могут ограничивать развитие азотобактерий, так что коричневая пленка, характерная для этих организмов, образуется только тогда, когда испытываемая почва содержит относительно большое количество специфических организмов. Таким образом, почва может содержать большое количество организмов, и все же они могут избежать обнаружения с

помощью теста на жидкую культуру. В поисках более точного метода обнаружения присутствия азотобактерий в среде, которая более близка к окружающей среде, существующей в почве, Виноградский разработал два метода: метод почвенного налета и метод пластин силикагеля.

На развитие азотобактера в почве и его азотофиксацию оказывает большое влияние минеральный состав почвы. Например, отсутствие или недостаток фосфора уменьшает развитие культуры и азотофиксацию. В определенных условиях азотобактер может использовать фосфолипиды как источник фосфора. Гидролиз фосфолипидов осуществляется с помощью фосфолипаз, а образующиеся эфиры фосфорной кислоты расщепляются фосфотазы. Однако фосфолипазная активность азотобактера довольно низкая.

В почвенной экосистеме популяции *Azotobacter* на них влияют физико-химические параметры почвы, такие как органическое вещество, pH, температура, глубина почвы, влажность и засоленность почвы.

Azotobacter – типичный мезофильный организм, который процветает при оптимальных температурах 25–30 ° C для роста и физиологических свойств. Минимальная температура для роста *Azotobacter* находится чуть выше 0 ° C. Клетки *Azotobacter* не переносят высоких температур, однако они могут выжить при 45–48 °C, образуя цисты, которые прорастают в благоприятных условиях.

Присутствие популяций *Azotobacter* в почвенных экосистемах контролируется pH. Как правило, более низкий pH (<6,0) уменьшает популяцию *Azotobacter*, а в некоторых случаях полностью подавляет их рост. Кислые почвы имеют неблагоприятные свойства бедных и физиологически активных питательных веществ и неудовлетворительного водно-воздушного режима, поэтому присутствие *Azotobacter* в этих почвах было очень низким или даже отсутствовало. Оптимальный pH 7–7,5 благоприятствует проявлению физиологических функций *Azotobacter*.

Из микроэлементов наиболее значимым является молибден, т.к. входит

в состав нитрогеназы. Клетки азотобактера, как жизнедеятельные, так и покоящиеся, поглощают молибден из среды, причём растущие клетки поглощают значительно активнее чем старые. Для азотобактера установлена необходимая концентрация молибдена в виде соли Na_2MoO_4 10-100 мг/л.

Бром угнетает азотофиксацию.

Окультуривание торфяных почв улучшает условия для размножения, но некоторые торфа токсичны для азотобактера. Чернозёмы отличаются высокой активностью микробиологических процессов. Наиболее интенсивно они протекают весной и рано летом, когда почва имеет благоприятный температурный режим и достаточный запас влаги. Это нейтральные или слабощелочные почвы с высоким содержанием солей кальция и магния. Черноземные почвы более северных районов содержат азотобактер в течение всего вегетационного периода [9].

Наиболее часто азотобактер встречается в черноземных почвах лугов долин рек. Наиболее благоприятными оказывается лучше, чем в оподзоленных [4].

В целинных почвах сероземной зоны, а также в степных солонцах азотобактер развивается в основном как весенний эфемер. По мере возрастания засоленности почв данный микроорганизм встречается реже. Отмечено, что данный род бактерий более чувствителен к содовому засолению и менее к сульфатно-хлоридному [7].

Сильно окультуренные подзолистые почвы, образованные на суглинках, имеют благоприятный водно-воздушный режим, слабокислую реакцию (рН 5.5) чем обеспечивается активная деятельность полезной почвенной микрофлоры, в том числе и азотобактера [29].

В хорошо окультуренных огородных почвах азотобактер обычно находится в значительных количествах. Таким образом, азотобактер может служить индикатором степени окультуренности почвы [6].

1.3 Свойства бактерий рода *Azotobacter*

1.3.1 Морфологическая характеристика

Клетки рода *Azotobacter* относительно крупные для бактерий (2–4 мкм в диаметре). Клетки молодых культур (вплоть до 2-х суток культивирования) имеют форму палочек с закругленными концами, чаще расположены попарно. Молодые клетки подвижны, вследствие наличия на ее поверхности перитрихально расположенных жгутиков. Прикрепление бактерий, а также их агрегация осуществляется за счёт наличия нитевидных структур – фимбрий.

В микроскопических препаратах клетки могут быть рассредоточены или образовывать нерегулярные кластеры или цепочки различной длины. В свежих культурах клетки подвижны благодаря многочисленным жгутикам. Позже клетки теряют подвижность, становятся почти сферическими и производят толстый слой слизи, образуя клеточную капсулу. Электронная микрофотография отрицательно окрашенного *A. vinelandii* UW, выращенного на модифицированной безазотной среде Берка при 30 ° C, показана на рис. 1.

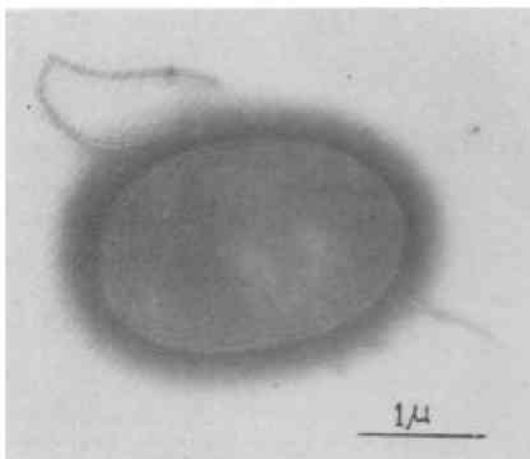


Рисунок 1. Электронная микрофотография отрицательно окрашенного *A. vinelandii* ATCC 13705.

Виды *Azotobacter* обладают некоторыми уникальными особенностями, такими как образование цист. Формирование цист происходит естественным

путем в неблагоприятных и экстремальных условиях, таких как высокие или низкие температуры, замерзание, засоление и засуха. Формирование цист индуцируется также в ответ на изменение концентрации питательных веществ в среде или добавление некоторых органических веществ, таких как этанол, н-бутан-1-ол или β -гидроксibuтират.

Эти морфологические изменения сопровождаются метаболическими сдвигами, изменениями катаболизма, дыхания и биосинтеза макромолекул. Цисты азотобактера имеют сферическую форму и состоят из так называемого «центрального тела», уменьшенной копии вегетативных клеток с несколькими вакуолями и «двухслойной оболочкой». Внутренняя часть раковины имеет волокнистую структуру, называемую интиной, а внешняя часть – гексагональной кристаллической структурой, называемой экзиной. В центральном теле всегда наблюдаются многочисленные гранулы полигидроксibuтирата, альгинат является основным компонентом капсулы, а алкилрезорцины (фенольный липид) и алкилпироны, которые синтезируются при индукции инцистирования, заменяют фосфолипиды мембран кисты и являются компонентами экзина.

Одной из основных характеристик цисты является ее способность противостоять высыханию, способность выживать в сухой почве более 10 лет, тогда как вегетативные клетки, хранившиеся в тех же условиях, были инактивированы менее чем за 2 года. В частности, они вдвое более устойчивы к ультрафиолетовому излучению. Они также устойчивы к сушке, ультразвуку, гамма- и солнечному облучению, но не к нагреванию.

Во время роста бактерии рода *Azotobacter* образует плоские, слизистые, пастообразные колонии диаметром 5–10 мм, которые могут образовывать пленки в жидких питательных средах. Колонии могут быть темно-коричневого, зеленого или другого цвета, также могут быть бесцветными, в зависимости от вида. Росту благоприятствует температура 20–30 °C.

Бактерии рода *Azotobacter* также известны тем, что образуют внутриклеточные включения полигидроксиалканоатов при определенных

условиях окружающей среды (например, при недостатке таких элементов, как фосфор, азот или кислород в сочетании с избыточным поступлением источников углерода).

1.3.2 Основные физиологические свойства

Азотобактерии – это аэробные, в основном почвенные организмы, обладающие уникальным набором метаболических возможностей в дополнение к фиксации азота. Различные виды и штаммы обладают различными способностями синтезировать альгинаты, полигидроксibuтират, пигменты и растительные гормоны.

Азотобактерии образуют небольшие кисты фазы покоя, которые менее дифференцированы, чем споры. В стареющих культурах были обнаружены небольшие фильтруемые клетки, менее метаболически активные, чем цисты.

Азотобактерии – это первые азотфиксирующие организмы, которые содержат более одного типа фермента нитрогеназы. Хорошо известная нитрогеназа молибдена синтезируется, если металл присутствует в окружающей среде. Если концентрация молибдена меньше 10 нМ, фермент на основе ванадия доступен для фиксации азота *Azotobacter chroococcum* и *Azotobacter vinelandii*.

Другой важной и уникальной особенностью азотобактерий является их чрезвычайная толерантность к кислороду при фиксации азота; механизмы защиты нитрогеназы от повреждения O_2 существуют наряду с зависимостью от аэробного метаболизма для энергии и роста. Кроме того, H_2 , выделяющийся во время фиксации азота, может катаболизироваться поглощающей гидрогеназой.

Azotobacter синтезирует и секретирует значительные количества биологически активных веществ, таких как витамины группы В, никотиновая кислота, пантотеновая кислота, биотин, гетероксины и гиббереллин, которые усиливают рост корней растений.

Еще один признак, способствующий росту растений,

продемонстрированный видами *Azotobacter*, - это продукция ауксина (ИУК). Это основной фитогормон, который регулирует рост и развитие растений. Этот фитогормон способствует образованию более длинных корней и увеличивает количество корневых волосков и боковых корней, которые участвуют в усвоении питательных веществ. Он играет центральную роль в делении, удлинении, развитии и старении плодов. Ауксин инициирует корни, листья и цветы

Помимо производства этих веществ, некоторые штаммы *Azotobacter* характеризуются своей способностью синтезировать противогрибковые вещества, которые подавляют развитие некоторых фитопатогенных видов.

Жизнедеятельность азотобактера осуществляется в зоне, окружающей корень растения, – ризосфере. Ризосферу (с окружающей ее почвой) растений можно рассматривать как своеобразный проточный культиватор микроорганизмов, где наблюдается высокая активность естественно смешанных культур микроорганизмов.

1.4 Влияние температуры на характер роста и физиологическую активность бактерий рода *Azotobacter*

По отношению к температуре азотобактер типичный мезофил. Температурный оптимум его развития соответствует 25-30 °С, максимальный – 35-37 °С, минимальной температурой, при которой ещё возможно развитие данных бактерий, лежит в диапазоне 5-10 °С.

Азотобактер переносит пониженные температуры лучше, чем повышенные. Показано, что при температуре 5 °С заметного развития в культурах не происходит и численность популяции держится на одном уровне. При 20 °С число клеток в культуре значительно увеличивается. Однако максимальная скорость роста азотобактера наблюдается при 30 °С. При 40 °С у *A. chroococcum* сокращается цикл развития. Высокая и низкая температуры снижают интенсивность не только роста и размножения, но и

использование энергетического материала, а также продуктивность азотификации.

Влияние температуры инкубации на бактерии рода *Azotobacter* были изучены путем варьирования температуры инкубации 25-40 °С. Азотобактерия ПВ-3 показала максимальный рост - 0,93 мг/мл после инкубации при 30 °С. В то время как *A. vinelandii* показал максимальный рост 0,88 мг/мл при температуре инкубации 30 °С. Небольшое повышение температуры увеличивает скорость роста, потому что скорость ферментативно-катализируемой реакции также увеличивается вместе с ней и по мере увеличения скорости; микроорганизм растет быстрее. Оптимальная температура для роста *Azotobacter* была сообщена как 30 °С, но некоторые виды могут расти при оптимальной температуре 34 °С [36].

Azotobacter chroococcum выращивали в непрерывной культуре при двух температурах (30 °С и 20 °С) и различном напряжении растворенного кислорода (DOT) (от 30% до 40% и от 70% до 80% насыщения воздухом) соответственно. При температуре 30 °С и низком DOT были получены относительно высокая объемная производительность и эффективность азотфиксации. После снижения температуры до 20 °С наблюдалось интенсивное образование кист, связанное с резким уменьшением роста бактерий. Бактерии в виде цист сохраняли свою физиологическую активность длительное время в зависимости от температуры и препарата.

Эксперименты с использованием повышенной температуры в качестве стрессирующего воздействия проводились с *A. chroococcum* в работе [2].

При температуре 40 °С активность роста клеток *A. chroococcum* не отличалась от таковой при 26 °С. Последняя температура рассматривалась в качестве контрольной. При повышении температуры до 45 °С наблюдалось изменение активности роста клеток. Если пятиминутное выдерживание клеток при данной температуре не оказывало эффекта на активность роста, то 15-минутная экспозиция сопровождалась торможением роста числа клеток.

В течение одного часа после температурной экспозиции количество клеток оставалось на том же уровне, что и до температурного воздействия, затем пролиферативная активность возобновлялась. При пятиминутной экспозиции клеток при температуре 50°C было выявлено сохранение числа клеток на неизменном уровне в течение 3 часов, а затем постепенное его увеличение. Выдерживание клеток при температуре 50°C в течение пятнадцати минут приводило к подавлению роста на протяжении всего периода наблюдения.

Алексеевой А.Е. также было исследовано влияние высоких температур на накопление биомассы культурой *A. chroococcum*, находящейся на разных стадиях роста. Культура, находящаяся на более поздней стадии экспоненциального роста (26 часов), характеризовалась большей устойчивостью к действию высоких температур в сравнении с 20-часовой культурой. Выявлено, что период торможения деления клеток при 5-ти минутном воздействии температуры 50°C короче (1,5-2 часа), чем у более молодой 20-часовой культуры (до 3 часов) [2].

Анализ числа клеток через сутки после нагревания показал, что культуры, подвергавшиеся воздействиям экстремальных температур, равных 45°C и 50°C, в течение 15-ти и 5-ти минут, соответственно, статистически достоверно опережали контрольную культуру (26°C) по числу клеток. В первом случае повышение составило 41% и во втором случае - 32%. В то же время пятнадцатиминутное воздействие температуры, равной 50°C, привело к более медленному нарастанию биомассы и через 24 часа культивирования количество клеток было в 3,4 раза меньше, чем в контроле ($P < 0,05$).

Динамика роста культуры после действия повышенных температур (5 мин при 50 °C и 15 мин. при 45°C) свидетельствовала о том, что клетки *A. chroococcum* находились в состоянии стресса, так как именно для стрессовой реакции характерен такой ростовой эффект – прекращение (торможение) роста числа клеток, а затем его активация. Более жесткое воздействие (15 мин при 50 градусах) приводило к снижению числа клеток вследствие их

гибели. И через 24 часа после теплового шока культура значительно отставала по числу клеток от контрольного варианта.

Объектом исследования Гущиной Ю.Ю. и соавт. служили клетки бактерий – чистая культура *Azotobacter chroococcum* 66. Бактерии выращивали при 26°C на агаризованной среде Эшби. Клетки в экспоненциальной (односуточная культура) и стационарной (двухсуточная) фазах роста смывали с агара раствором хлорида натрия (0,15 М), либо раствором глюкозы (0,1М), центрифугировали (6000 об/мин, 15 мин), вновь суспендировали в указанных растворах и после выравнивания по оптической плотности подвергали тепловому шоку (ТШ). Диапазон использованных температур: 41°, 47° (для бактерий в экспоненциальной фазе роста); 44°, 47°, 50° (в стационарной фазе); экспозиция 10-40 мин. По окончании термошока бактерии высевали на твердую питательную среду, культивировали в течение 48 часов при температуре, оптимальной для их роста (26°C), и путем подсчета образовавшихся макроколоний оценивали колониеобразующую способность (КОЕ) стрессированных клеток (контроль – бактерии, не подвергавшиеся ТШ) [13].

Воздействие повышенными температурами индуцировало изменение размеров клеток, преимущественно за счет изменения их длины.

У бактерий, подвергнутых тепловому шоку в стационарной фазе роста, шероховатость их поверхности резко снижалась (44°C, 10 мин). С увеличением времени прогрева или величины температурного воздействия (47°C) этот эффект уменьшался; при 50°C наблюдалась обратная реакция – шероховатость становилась максимальной относительно контроля.

У бактерий, стрессированных в экспоненциальной фазе роста колоний, длина клеток увеличивалась только при тепловом шоке 47°C, 10 мин (в среднем в 1,6 раза); в стационарной фазе роста при десятиминутном прогреве – в среднем в 1,4 раза при 44°C и 47°C, в 1,2 раза при 50°C.

Наблюдались также и другие морфологические изменения, в частности, у стрессированных клеток (независимо от дозы гипертермического

воздействия) зафиксировано появление вдавливаний на полюсах, тогда как у контрольных бактерий подобных особенностей в структуре клеточной стенки не обнаружено.

Клетки односуточной культуры оказались чувствительнее к гипертермии. Их прогрев при 44°C в течение 40 мин полностью подавлял репродуцирующую активность, в варианте “термошок, двухсуточная культура” при такой же дозе воздействия она оставалась довольно высокой [13].

Таким образом, установлено, что размеры клеток, структурированность их поверхности изменяются в зависимости от величины и времени внешнего воздействия (тепловой шок). Уменьшение структурированности поверхности, а также увеличение размеров клеток характерно для более терморезистентной стадии в развитии культуры (стационарная фаза роста).

Смена направленности в изменении вышеперечисленных параметров предшествует летальным дозам теплового шока, свидетельствуя об истощении адаптивного потенциала.

Целью исследования Четверикова и соавт. являлся поиск оптимальных условий биосинтеза экзополисахарида (ЭПС) с максимальной вязкостью при культивировании бактерий *Azotobacter vinelandii* в жидкой среде с мелассой в качестве источника углерода [27].

Для оценки влияния температуры на образование вязкого ЭПС микроорганизмы культивировали в течение 48–144 ч при температурах 25, 30 и 35 °C в жидкой питательной среде с содержанием мелассы 20, 40 и 60 г/л.

Анализ результатов показал, что крайне негативно на вязкости культуральной жидкости сказывается увеличение температуры культивирования до 35 °C (во всех вариантах культивирования при этой температуре достигнутая вязкость ниже среднего уровня), тогда как культивирование при температуре 25 °C дает положительный эффект [27].

Таким образом, влияние температуры на микроорганизмы имеет обычный характер: рост и активность микробов замедляются при низких

температурах и повышаются с повышением температуры. Большинство представителей азобактеров – мезофилы, предпочитающие температурные условия в пределах 15-35 °C.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Объект исследования

Объектом исследования являлись штаммы почвенных азотфиксирующих микроорганизмов *Azotobacter chroococcum*, выделенные из почв, отобранных 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, антропогенному влиянию, что позволит оценить влияние почвы на рост и развитие азотобактерий.

Отбор проб осуществляется 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» [10, 11]. На территорию, подлежащую исследованию, мы составляли описание с указанием адреса, точки отбора, расположения мест отбора.

Пробы почвы, предназначенные для бактериологического анализа, в целях предотвращения их вторичного загрязнения следует отбирать с соблюдением правил асептики: отбирают стерильными инструментами, перемешивают 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 хранят в холодильнике при температуре от 4 до 5°C не более 24 ч.

Для подготовки к анализу пробы почвы рассыпали на стерильную поверхность и разминали стерильным пестиком крупные комки. Затем выбирали включения, почву растирали в стерильной ступке и просеивали через стерильное сито с диаметром отверстий 3 мм, накрытое стерильной бумагой.

2.2 Питательные среды и посев культур

Для выращивания культур различных штаммов *Azotobacter* мы использовали агаризованную питательную среду Эшби следующего состава, г: 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 [28].

Выделение накопительной культуры. Приготовленную питательную среду стерилизовали и разливали в стерильные чашки Петри. Небольшое количество почвы увлажняли до пастообразного состояния стерильной водопроводной водой и хорошо растирали в ступке резиновым пестиком. Бактериологической петлей брали небольшие комочки из приготовленной почвы и раскладывали их по трафарету на поверхность агаризованной среды Эшби. На одну чашку помещали 25–50 комочков почвы. Чашку помещали во влажную камеру, которую ставили в термостат при 28–30 °C на 6–8 суток.

Уменьшение времени культивирования не позволяет получить достаточную массу клеток. Культивирование при температуре ниже 26 °C продлевает сроки развития микробных клеток, повышение температуры может привести к преждевременному отмиранию части 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 *A. chroococcum* растет в виде бесцветных (в молодом возрасте) густослизистых капель, которые по мере старения приобретают бурый, темно-коричневый или черный цвет.

Микроскопия культур показала, что морфология клеток азотобактера специфична, это позволяет отличать его от клеток других организмов. Молодые клетки имеют форму крупных палочек (3 - 6 мкм) одиночных или сцепленных попарно, с округлыми концами. Подвижны. С возрастом они превращаются в крупные кокки от 4 до 9 мкм в диаметре), напоминающие

восьмерки (в случае попарного сцепления). Кокковидные клетки обычно покрываются капсулой, теряют подвижность, начинают выделять пигмент.

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.

После посева методом комочков, те комочки, на которых появились колонии Азотобактера, перенесли из чашек Петри в ступку. Перемешали все комочки до пастообразного состояния, добавили почву для заражения ею Азотобактером. Зараженная Азотобактером почва использовалась дальнейшего эксперимента.

2.3 Инкубирование при различных температурах

Согласно литературным данным, *Azotobacter* – мезофил, рост возможен в интервале 25-35°C, оптимальная для роста температура 29±1°C [33].

Понижение температуры азотобактер переносит хорошо, поэтому зимой даже в северных широтах численность его клеток в почве заметно не уменьшается [16].

После выделения чистой культуры, различные штаммы *Azotobacter* высевались на питательную среду Эшби в чашках Петри. Для этого, на питательную среду Эшби, были разложены небольшие комочки почвы одинакового размера.

Далее, каждый из трёх штаммов инкубировался при различных температурах:

первый вариант оставляли в холодильнике при температуре 5-7°C;

второй – в герметичном боксе при температуре 10-15°C;

третий – при комнатной температуре 20°C;

и четвертый вариант – в термостате при температуре 30 - 32 °C.

За ростом культур наблюдали в течение 3 суток. Оценку темпов роста проводили по накоплению биомассы, путем измерения диаметра колоний, обрастающих комочками почвы.

Исследование проводили в 2 повторностях.

2.4 Оценка особенностей роста и метаболизма культур *Azotobacter*

Влияние температуры на азотобактер определяли по накоплению биомассы. Известно, что период торможения деления клеток при 5-ти минутном воздействии температуры 50°C короче (1,5-2 часа), чем у более молодой 20-часовой культуры (до 3 часов) [2].

Также скорость роста может быть оценена по числу клеток. Культуры азотобактера, подвергавшиеся воздействиям экстремальных температур, равных 45°C и 50°C, в течение 15-ти и 5-ти минут, соответственно, статистически достоверно опережали контрольную культуру (26°C) по числу клеток. В то же время пятнадцатиминутное воздействие температуры, равной 50°C, привело к более медленному нарастанию биомассы и через 24 часа культивирования количество клеток было в 3,4 раза меньше, чем в контроле [2].

Чтобы правильно оценить рост культуры обычно пользуются такими понятиями, как: а) концентрация клеток в 1 мл; б) время генерации - промежуток времени, за который число клеток удваивается; в) константа скорости деления - число удвоений в час; г) константа скорости роста. Для количественной оценки роста микроорганизмов требуется определение числа клеток в конкретный момент.

Мы подсчитывали комочки почвы, обросшие микроорганизмами, а затем определяли, какой процент они составляют от общего числа комочков почвы (относительная оценка плотности заселения микроорганизмов учитываемых групп в почве).

Кроме того, посуточно производили учет площади каждого комочка и площади ореола вокруг него. Размер колонии является косвенным

показателем её биомассы. Основанием для расчета площади колонии было визуальное увеличение их площади и, в некоторых случаях, «распада» колонии, что связано с ростом и отмиранием клеток, разрушением физических сцеплений между частицами.

После инкубации вынули чашки с засеянными средами из термостата и проанализировали их по культуральным признакам: характеру роста на агаре, цвету, краю, форме, размеру.

Подсчет количества колоний проводили, не открывая чашек Петри. Для удобства каждую просчитанную колонию отмечали точкой на наружной стороне дна чашки. При большом количестве колоний дно чашки Петри делили на секторы, просчитывали колонии в каждом секторе и суммировали результаты.

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.

Размер диаметра колоний проводился с помощью миллиметровой бумаги.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Влияние температуры на активность роста бактерий рода *Azotobacter*

Метод почвенных комочков для выделения культур азотобактера максимально приближен к естественным условиям обитания, поэтому дает оптимальный результат. Колонии *Azotobacter* образовывались вокруг всех комков почвы из всех образцов на среде Эшби. На вторые сутки культивирования практически все штаммы образовывали довольно крупные слизистые бесцветные колонии диаметром до 7 мм на плотной среде. С возрастом колонии стали еще более слизистыми и распространились по поверхности агара.

Под микроскопом азотобактерии имели форму палочек с закругленными концами, некоторые расположены попарно. На микроскопическом препарате (рис. 2) клетки рассредоточены, также отмечено образование коротких цепочек различной длины. Полученные результаты соответствуют литературным данным о морфологии бактерий рода *Azotobacter* [15, 19].

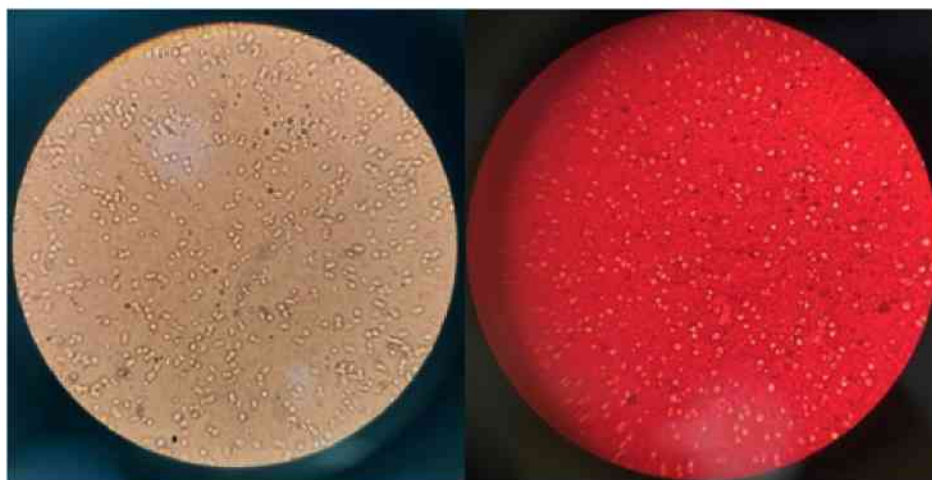


Рисунок 2. Микроскопические препараты штаммов *Azotobacter*,
выделенных из огородной почвы с (окраска гуашью)

Колонии азотобактера напоминают слизь, которая вначале белого цвета или бесцветная, по мере возрастания колонии буреют и приобретают коричневый оттенок (рис. 3). По комплексу фенотипических признаков (образование светло-коричневого и коричневого пигмента, соответствующие размер и форма) выделенные штаммы отнесли к виду *Azotobacter chroococcum*.



Рисунок 3. Колония *Azotobacter chroococcum*, выделенная из огородной почвы, культивируемая при 20 °С

Активность роста бактерий *Azotobacter* оценивали по размерам колоний на пятый день культивирования. Подсчеты по размерам проводились на пятый день. Размер колоний отличался в зависимости от места отбора пробы и температуры культивирования.

Результаты определения размеров колоний бактерий, отобранных на заправке, с огорода и с аллеи парка при температурах 30 °С, 20 °С и 5 °С представлены в таблицах 1 – 3 соответственно.

Таблица 1 – Размеры колоний *Azotobacter*, культивируемых при 30 °С. Обозначения вариантов: З – штамм из почвы заправки, О – штамм из огородной почвы, Т – штамм из почвы тропы; 30 – 30 °С.

Критерий	З - 30		О - 30		Т - 30	
	1	2	1	2	1	2
Размер колоний, мм	6	7	6,5	7	5	7
	8,5	7,5	9	8	5,3	6,5
	9,5	6	7,5	7	6	6
	7,5	6	6,5	6,5	6	7
	6	6,5	6	6	6,5	7,5

Таблица 1 – Продолжение

	7	6	7	6	5,5	6
	7	6	5,2	7	5	6
	6,5	9	7	9	7	7,5
	7,5	7	9,5	7	7,3	7
	6,5	6	9,5	6	7,5	6
	7	6	9	6	5	6,5
	7,5	6,5	8	7,5	5	7
	8	7	8	7	7,5	7
	8	7,5	8,5	8	7,5	7,5
	6,5	8	6	8	7	8
	5	8,5	6	7	5	8
	7	8,8	7	7	8,5	9
	7,2	8	6,5	8	8,5	7
	5	9	6	9	8	8,5
	6,5	9,5	7,5	7	5,5	8
	6,5	8	6,5	8	5	7,5
	7	7	6	9,5	6	7
	7	6	6	9	6,3	6
	7,5	6,5	6,5	6,5	5,5	8
	9,5	7	7	7	6	7
Среднее арифметическое	7,088	7,212	7,128	7,36	6,09231	7,14
Общее среднее	7,15		7,244		6,61615	

Таблица 2 – Размеры колоний *Azotobacter*, культивируемых при 20 °С.
Обозначения вариантов: З – штамм из почвы заправки, О – штамм из огородной почвы, Т – штамм из почвы тропы; 20 – 20 °С.

Критерий	З - 20		О - 20		Т - 20	
	1	2	1	2	1	2
Размер колоний, мм	5,3	6	5	6	7	6
	5,5	6,5	5	6	5	5
	8,5	7	6	6,5	6,5	6
	6,5	7	7,5	6	6	6
	8	7	8	7,5	6	6,5
	8,5	7	8	7	6,5	6,5
	7	7,5	8,5	6	7,5	6
	6,8	7,5	7	6	5	6,5
	6	6	5	8	7	7
	6,2	6	7,8	6	7,3	6
	6	8	7,5	8	7,5	7
	6,1	8,5	7	7	5	5,5
	5	8	5	6	5	6
	7	8,5	6	6,5	7,5	7
	7	8	6,5	6	7,5	7,5
	7	8	6,5	7	7	7
	7,5	7,5	6	7	6,5	7
	6	7	6	6	8	8

Таблица 2 – Продолжение

	6	7	7	6,5	7,5	7
	8,3	6	6	7,5	8	7
	6,4	6,5	6,5	6,5	5,5	6
	6,5	8,5	8	6,5	5	5
	6	9	7	6	6	5
	7	9	6,5	6	6	5,5
	6,5	9	6,5	7,5	5	6
Среднее арифметическое	6,664	7,44	6,632	6,6	6,432	6,32
Общее среднее	7,052		6,616		6,376	

Таблица 3 – Размеры колоний *Azotobacter*, культивируемых при 5 °С.
Обозначения вариантов: 3 – штамм из почвы заправки, О – штамм из огородной почвы, Т – штамм из почвы тропы; 5 – 5 °С.

Критерий	3 - 5		О - 5		Т - 5	
	1	2	1	2	1	2
Размер колоний, мм	5	5,5	5	5	5	4,3
	4,5	5	5	5	5	4
	5,5	5	5,5	5,5	5,5	5
	4,5	5,3	4,5	4,8	4,5	4
	4	4,8	4	5	4	4
	5	4,5	5	5	5	5
	5,5	6	5,5	5,5	5	4,5
	6	5,5	5	5	5	5
	5	5,5	5	4,5	5	5
	4,8	6	4,8	5	5,3	4
	4,3	4,5	4,5	5	4,3	4,5
	4,5	6	6	4	4,5	5,5
	6	6	6	5	5,5	5
	5,5	4	5,5	4,8	5,5	5,5
	5	4,5	5	5	5	5
	5,5	4,5	5,5	5,5	5,5	5,5
	5	5	5	5	5	5
	5,3	5	5,5	6	5,3	5,5
	4,8	5	4,8	5,5	6	3,8
	4,8	5,5	4,5	5	4,8	4,5
	4,5	5	4,8	4,5	4,5	4
	4	4,5	4	4	4	4
	4,4	4,5	4,4	5	4,5	4
	4,5	4	4,5	4	5	5
	5	5	5	5	5	5
Среднее арифметическое	4,916	5,044	4,972	4,944	4,94583	4,664
Общее среднее	4,98		4,958		4,80492	

На рисунках 4 и 5 приведены снимки колоний *Azotobacter*, выделенных

из почвы с огорода и культивируемых при 30 °С, и выделенных из огородной почвы и почвы рядом с заправкой при инкубации 20 °С и 30 °С соответственно.



Рисунок 4. Колония Azotobacter chroococcum, выделенная из огородной почвы культивируемая при 30 °С



Рисунок 5. Колония Azotobacter chroococcum, выделенная из почвы рядом с заправкой, культивируемая при 20 °С

Анализ показал, что размеры колоний отличаются: при одинаковых температурах наименьший рост азотобактерий отмечался у образцов, отобранных в парке, наибольший рост при температуре 30 °С – у образцов с огородной почвы, при других температурах – у образцов рядом с заправкой (рис. 6).

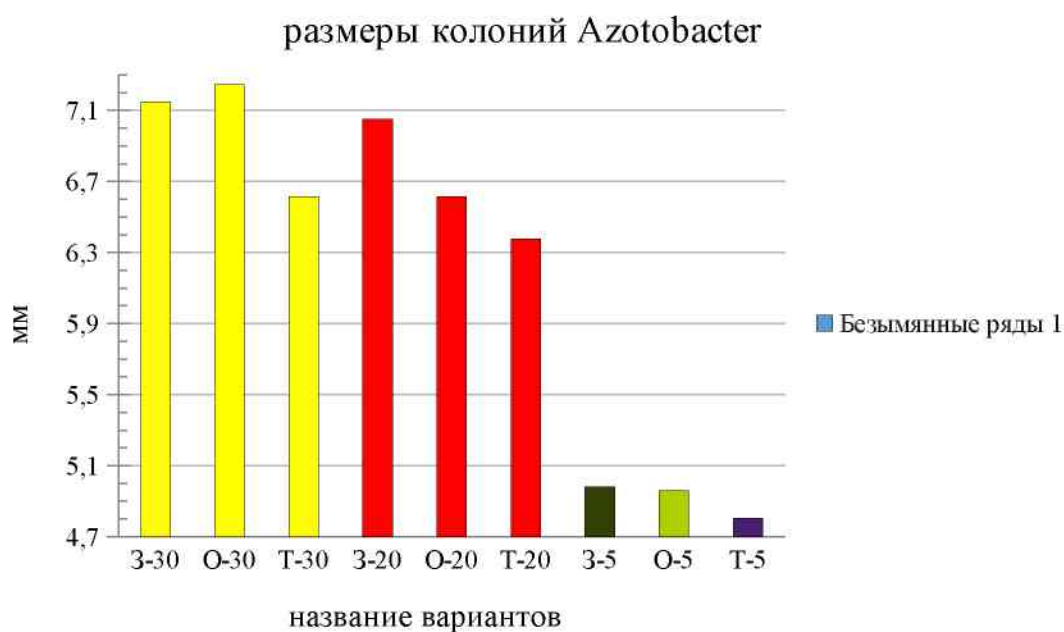


Рисунок 6. Диаграмма, показывающая размеры колоний азотобактерий в зависимости от температуры культивирования.
 Обозначения: З – заправка, О – огород, Т – тропы; 30 – 30 °C, 20 – 20 °C, 5 – 5 °C

Также в ходе проведения эксперимента установлено, что при понижении температуры культивирования скорость роста азотобактерий из почвы рядом с заправкой, из огорода и из парка уменьшается (рис. 7).

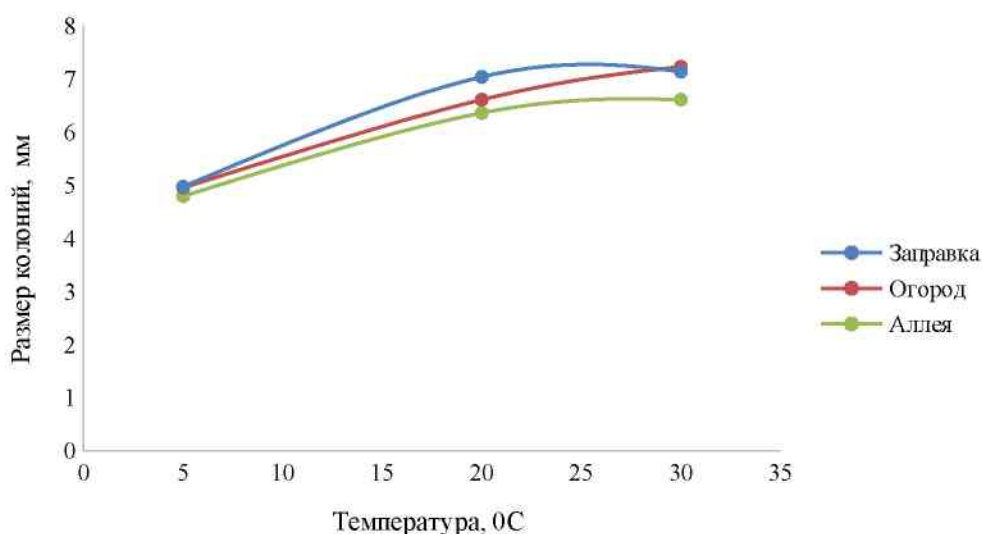


Рисунок 7. Зависимость размеров колоний от температуры

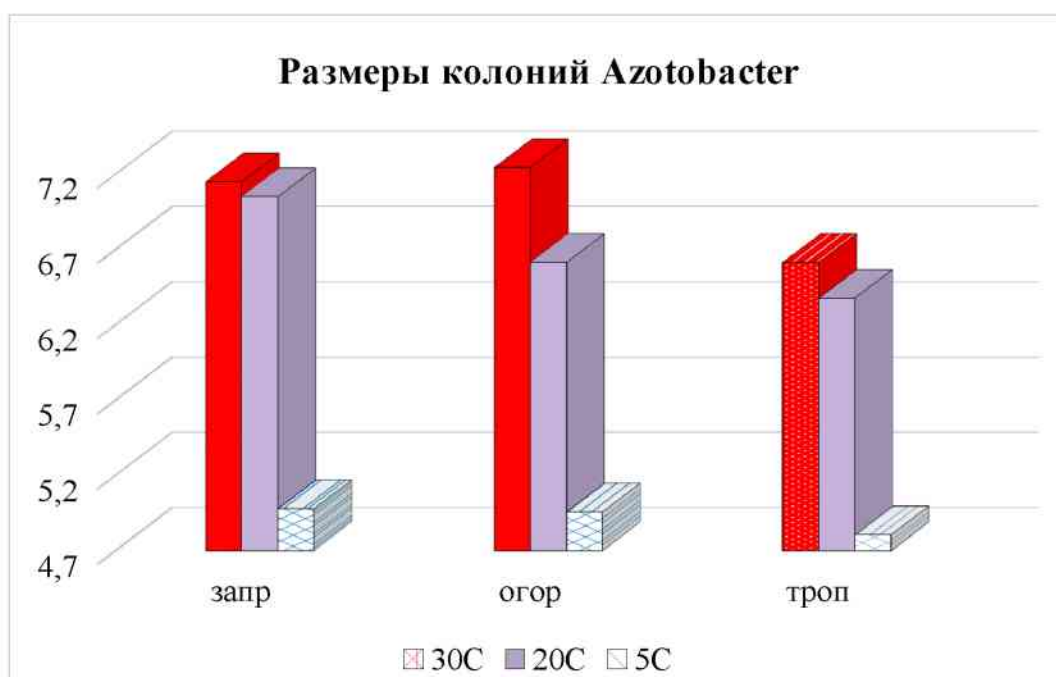


Рисунок 8. Размеры колоний азотобактерий у штаммов из различных мест обитания. Обозначения: запр – заправка, огор – огород, троп – тропы; 30 – 30 °C, 20 – 20 °C, 5 – 5 °C

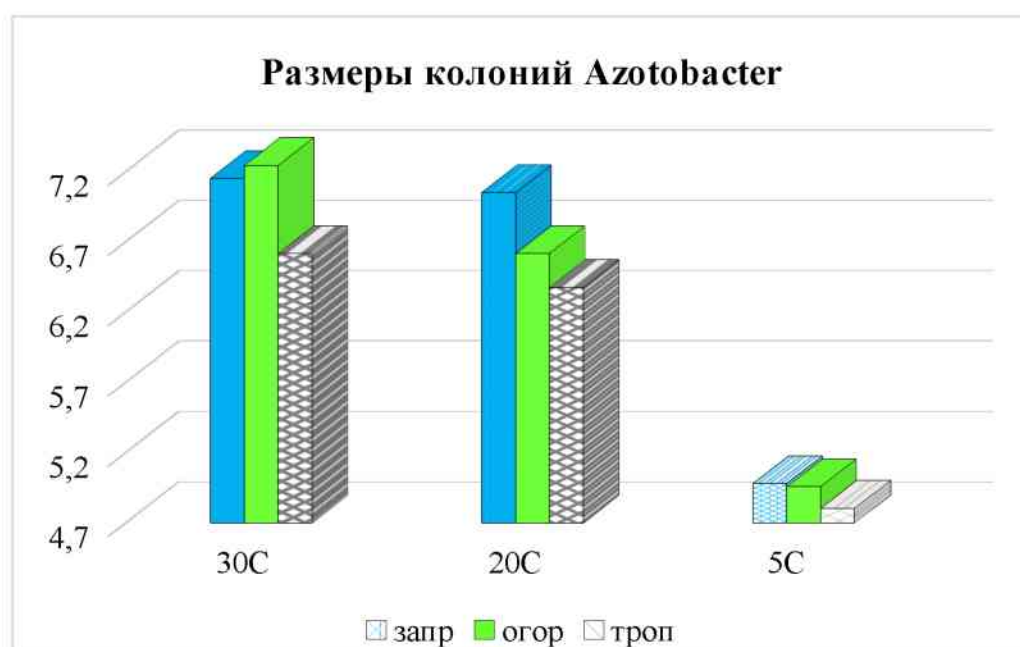


Рисунок 9. Диаграмма, показывающая сравнение размеров колоний азотобактерий при различной температуре инкубации. Обозначения: запр – заправка, огор – огород, троп – тропы; 30 – 30 °C, 20 – 20 °C, 5 – 5 °C

Наибольшее снижение роста отмечено у бактерий из почвы огорода:

при уменьшении температуры с 30 °C до 5 °C размер колоний уменьшился на 31,5%. Для других бактерий получены схожие результаты: скорость роста З-30 снизилась на 30,3 %, Т-30 – на 29,5 %. Наибольший рост азотобактера при 30 °C обусловлен его физиологическими свойствами (*Azotobacter* – мезофил, оптимальная температура для роста составляет 29±1°C) [33].

Анализ размеров колоний в зависимости от места обитания азотобактерий показал, что при 30 °C отмечается более выраженная разница в размере колоний, чем при 5 °C. При 30 °C рост *Azotobacter chroococcum* из огорода на 1,2 % превышал рост бактерий из заправки и на 8,6 % - из аллеи парка. При 20 °C наибольшая скорость роста отмечена у бактерий с заправки: она на 6,2 % превышает скорость роста бактерий из огорода и на 9,6 % - из аллеи парка (рис. 8).

Обращает на себя тот факт, что азотобактер из почвы заправки при 20 и 5 °C рос более активно, чем остальные образцы. Это может быть связано с тем, что в данных условиях бактерии *Azotobacter chroococcum* использовали бензин в качестве источника углерода, что подтверждается литературными данными [12, 17].

Полученные результаты согласуются с данными литературы и подтверждают тот факт, что азотобактер достаточно требователен к условиям среды обитания. Различные перегнойные вещества не всегда могут усваиваться азотобактером. По этой причине в почвах, которые богаты перегноем, а также содержащих азотные минеральные удобрения, азотобактеры не размножаются, поэтому рост азотобактера из почвы с огорода был меньше, чем из почвы около заправки. Медленный рост азотобактера из почвы аллеи может быть связан с тем, что это почва не содержит необходимых для роста азотобактера микроэлементов. Также причиной замедленного роста азотобактера может быть кислая среда почвы и низкая влажность.

Для определения зависимости между температурой 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	408,1892	8	51,02366	64,38266	2,32E-69	3,340974
Внутри групп	349,4952	441	0,792506			
Итого	757,6844	449				

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

Двухфакторный анализ проведен по первому фактору – местоположение штамма и по второму фактору – температура инкубации (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты двухфакторного дисперсионного анализа

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Местоположение	14,54858	2	7,274289	9,178843	0,000124	3,016175
Температура	387,678	2	193,839	244,5899	3,39E-72	3,016175
Взаимодействие	5,962622	4	1,490656	1,880939	0,11272	2,392164
Внутри	349,4952	441	0,792506			
Итого	757,6844	449				

Взаимное влияние температуры и местоположения недостоверно. Самое значительное влияние на различие между вариантами оказывает температура.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы были сделаны следующие выводы:

1. Изучение выделенных нами почвенных штаммов бактерий рода *Azotobacter* подтвердила литературные данные относительно культуральных признаков, способности к азотфиксации, морфологии клеток, способности к образованию цист и позволило отнести их к виду *Azotobacter chroococcum*.
2. Исследование температурного режима роста колоний показало, что:
 - при 30 °C разница в размере колоний азотобактерий из разных мест обитания более выражена, чем при более низких температурах.
 - азотобактер из почвы заправки при 20 и 5 °C рос более активно, чем остальные образцы, что, видимо, связано с использованием азотобактером бензина в качестве источника углерода в данных условиях.
 - медленнее всего накапливал биомассу штамм полученный из почвы тропы.
 - Максимальный рост показал штамм из огородной почвы при 30 °C;
 - экспериментальным путем установлено, что при уменьшении температуры от 30 до 5 °C наблюдается замедление роста *Azotobacter chroococcum*. Максимальное влияние температуры на накопление биомассы отмечено у азотобактерий из почвы огорода (снижение роста на 31,5 %)
3. Таким образом, в нашей работе показано, что различные штаммы имеют неодинаковую устойчивость к различным температурам. Для выращивания при повышенных температурах больше подходит штамм огородной почвы. При температурах ниже оптимальных большую биомассу дают штаммы полученные из почвы заправки.

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. Алексеева А. Е. Физиолого-биохимическая активность и биоразнообразие штаммов *Azotobacter chroococcum*, выделенных из почв Нижегородской области // дис...канд.биол.наук. Нижний Новгород, 2005. 141 с.
3. Ананьева Н. Д., Стольникова Е. В. Микробный почвенный компонент, его структура (грибы / бактерии) и продуцирование парниковых газов (CO_2 , N_2O) почвами // Биосферные функции почвенного покрова Материалы Всероссийской научной конференции, посвященной 40-летнему юбилею Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, 2010. С. 14-16.
4. Апарин Б. Ф. Почвоведение. М. : Академия, 2014. 256 с.
5. Биосинтез альгинатов бактериями рода *Azotobacter* / Г. А. Бонарцева [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. № 1. С. 61-68.
6. Вальков В. Ф., Казеев К. Ш., Колесников С. И. Почвоведение. М. : Юрайт, 2013. 527 с.
7. Волкова И. Н. Экологическое почвоведение. Ярославль, 2013. 112 с.
8. Гарбуз С. А., Корытова В. Е. Подбор оптимальной питательной среды для гомогенного, периодического культивирования *Azotobacter chroococcum* // Международный научно-исследовательский журнал. 2016. № 12-1. С. 12-14.
9. Горбылева А. И., Воробьев В. Б., Петровский Е. И. Почвоведение. М. : Новое знание, 2015. 400 с.
10. ГОСТ 17.4.4.01-83 Общие требования к отбору проб почвы. М. : Стандартиформ, 1983. 4 с.

11. ГОСТ 17.4.4.02-84 Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. М. : Стандартиформ, 1984. 4 с.
12. Градова Н. Б., Горнова И. Б., Салина Р. Н. Использование бактерий рода *Azotobacter* при биоремедиации нефтезагрязненных почв // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. № 3. С. 318-321.
13. Гущина Ю. Ю., Олюнина Л. Н., Гончарова Т. А. Исследование морфологии поверхности клеток *Azotobacter Chroococcum* в условиях гипертермии методом атомно-силовой микроскопии // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2005. № 5. С. 87-92.
14. Дудун А. А., Акулина Е. А., Махина Т. К. Биосинтез альгината и поли(3-оксибутирата) бактериальным штаммом *Azotobacter agile* 12 // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. № 6. С. 559-565.
15. Емцев В. Т., Мишустин Е. Н. Микробиология. М. : Юрайт, 2017. 456 с.
16. Жизнь растений. Том 1. Введение. Бактерии и актиномицеты // под ред. Н. А. Красильникова, А. А. Уранова. М. : Просвещение, 1974. 487 с.
17. Коршунова Т. Ю. Микробиологические технологии ликвидации нефтезагрязнений в различных климатических условиях // дисс. ... докт. биол. наук. Уфа, 2019. 437 с.
18. Круглов Ю. В. Микробное сообщество почвы: физиологическое разнообразие и методы исследования // Сельскохозяйственная биология. 2016. № 1. С. 46-59.
19. Ксенофонов Б. С. Основы микробиологии и экологической биотехнологии. М. : Инфра-М, 2015. 224 с.
20. Латышенко К. П. Экологический мониторинг. М. : Юрайт, 2016. 376 с.
21. Логинов О. Н. Бактерии *Pseudomonas* и *Azotobacter* как объекты сельскохозяйственной биотехнологии. М. : Наука, 2005. 178 с.
22. Мамонтов В. Г. Почвоведение. Справочное пособие. М.: Инфра-М, 2016. 368 с.

23. Муравьев А. Г., Каррыев Б. Б., Ляндзберг А. Р. Оценка экологического состояния почвы: практическое руководство. СПб. : Крисмас+, 2015. 208 с.
24. Николаева Д. А. Биосинтез поли-3-гидроксibuтирата разной молекулярной массы культурой *Azotobacter chroococcum* и его биodeградация // автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М. , 2004. 30 с.
25. Новокупцев Н. В. Оптимизация условий культивирования *azotobacter vinelandii* д-08 для увеличения выхода экзополисахарида // Известия Саратовского университета. 2016. № 2. С. 164-168.
26. Олюнина Л.Н., Мацкова Ю. А., Гончарова Т. А. Оценка терморезистентности *Azotobacter chroococcum* 66 методом атомно-силовой микроскопии // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. № 1. С. 45-50.
27. Оптимизация условий культивирования и биосинтеза экзополисахарида *Azotobacter vinelandii* / С. П. Четвериков [и др.] // Башкирский химический журнал. 2006. №5. С. 8-15.
28. Руководство к практическим занятиям по цитологии / Е. З. Усубова [и др.]. Волгоград: Изд-во ВолГУ, 2014. 55 с.
29. Тихонова И.О. Экологический мониторинг почв. М. : Инфра-М, 2017. 106 с.
30. Урюмцева Т. И., Кабдрасилова А. М. Разработка рецептуры питательной среды для культивирования бактерий *Azotobacter* // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2019. № 3. С. 61-65.
31. Шкуропат М. Н., Гуля Н. И., Сорокина Е. Ф. Геохимические процессы, вызываемыми бактериями цикла превращений азота в почве // Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов Сборник тезисов III Пущинской школы-конференции, 2016. С. 20-22.
32. Штамм *Azotobacter chroococcum* – продуцент поли-β-оксибутирата : пат. 2194759 Рос. Федерация. № 2001128135/13 ; заявл. 18.10.2001 ; опубл. 20.12.2002, 4 с.

33. 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.
34. Akram M., Rizvi R., Sumbul A. Potential role of bio-inoculants and organic matter for the management of root-knot nematode infesting chickpea // Cogent Food Agric. 2016. № 2(1). P. 1183-1457.
35. Baars O., Zhang X., Morel F.M. The siderophore metabolome of *Azotobacter vinelandii* // Appl. Environ. Microbiol. 2016. № 82(1). P. 27–39.
36. Hamid M., Hina B. Optimization of growth conditions for *Azotobacter* species and their use as biofertilizer // J Bacteriol Mycol Open Access. 2018. № 6(5). P. 274–278.
37. Hayat R., Ali S., Amara U. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review // Ann. Microbiol. 2010. № 60(4). P. 579–598.
38. Gothandapani S., Sekar S., Padaria J.C. *Azotobacter chroococcum*: Utilization and potential use for agricultural crop production: An overview // Int. J. Adv. Res. Biol. Sci. 2017. № 4(3). P. 35–42.
39. Maheshwari D.K., Dubey R.C., Aeron A. Integrated approach for disease management and growth enhancement of *Sesamum indicum* L. utilizing *Azotobacter chroococcum* TRA2 and chemical fertilizer // World J. Microb. Biot. 2012. № 28(10). P. 3015–3024.
40. McRose D.L., Baars O., Seyedsayamdost M.R. Quorum sensing and iron regulate a two-for-one siderophore gene cluster in *Vibrio harveyi* // PNAS. 2018. № 115(29). P. 7581–7586.
41. Wichard T., Bellenger J.P., Morel F.M. Role of the siderophore azotobactin in the bacterial acquisition of nitrogenase metal cofactors // Environ. Sci. Tech. 2009. № 43(19). P. 7218–7224.

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 Безбородова Кристина Михайловна

Тема работы: «Терморезистентность различных штаммов Azotobacter»

Утверждена приказом по Университету от « 15 » 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	<i>выполнено</i>
2.	Сбор и анализ литературных данных. Написание обзора литературы.	январь 2020	<i>выполнено</i>
3.	Изучение методик культивирования бактерий и подбор соответствующих сред.	февраль 2020	<i>выполнено</i>
4.	Подготовка реактивов и питательных сред. Отбор почвенных проб. Подготовка образца к микробиологическому анализу	март 2021	<i>выполнено</i>
5.	Выделение и идентификация выделенных культур Azotobacter	апрель 2021	<i>выполнено</i>
6.	Постановка эксперимента. Определение влияния температуры на характер роста и физиологическую активность бактерий рода Azotobacter	апрель 2021	<i>выполнено</i>
7.	Анализ результатов эксперимента Подготовка доклада для защиты ВКР	май 2021	<i>выполнено</i>
8.	Проверка ВКР в системе «Антиплагиат»	май 2021	<i>выполнено</i>
9.	Сдача оформленных и переплетенных экземпляров ВКР	май 2021	<i>выполнено</i>

Дата выдачи задания *06.11.2020*

Руководитель



Заплатин Б.П.

Задание принял к исполнению

