

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение  
высшего образования  
«Удмуртский государственный университет»  
Институт естественных наук  
Кафедра ботаники, зоологии и биоэкологии  
Направление подготовки 06.03.01-Биология  
Профиль – Ботаника

Допущена к  
защите

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Зав. кафедрой

\_\_\_\_\_  
(подпись)

д.б.н.

Н. И.

Науменко

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА на тему:  
«Получение бактериального удобрения на основе молочной сыворотки,  
содержащего бактерии рода *Azospirillum*, и исследование его влияния  
на прорастание овса»

Выполнил студент

группы ОАБ-06.03.01-436

Черкасова

\_\_\_\_\_ П. В.

(подпись)

Научный руководитель

Старший преподаватель  
Маградзе

\_\_\_\_\_

Е. И.

(подпись)

Ижевск, 2021

## Содержание

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы по теме исследования.....	5
1.1. Общие сведения о бактериях рода <i>Azospirillum</i> .....	5
1.1.1. Таксономическое положение азоспирилл.....	5
1.2. Морфология и физиология <i>Azospirillum</i> .....	6
1.3. Среда обитания.....	7
1.4. Геном <i>Azospirillum</i> .....	8
1.4.1. Гены, участвующие в процессе хемотаксиса и закрепления на поверхности корней растений.....	9
1.5. Взаимодействие с растениями.....	10
1.5.1. Колонизация корней.....	11
1.5.2. Физиологические механизмы закрепления в ризосфере.....	15
1.5.3. Продуцирование фитогормонов.....	17
1.5.4. Влияние на рост растений и урожайность.....	21
1.5.5. Влияние совместной инокуляции с другими микроорганизмами на рост растений и урожайность.....	22
Глава 2. Методология проведения экспериментов.....	24
2.1. Объект исследования и питательная среда для культивирования.....	24
2.2. Выделение бактерий из прикорневой части растений.....	24
2.3. Получение удобрения путем выращивания <i>Azospirillum</i> на молочной сыворотке.....	25

2.4. Постановка эксперимента по проращиванию семян овса посевного ( <i>Avena sativa L.</i> ) в почве.....	25
2.5. Постановка эксперимента по проращиванию семян овса посевного ( <i>Avena sativa L.</i> ) на фильтровальной бумаге	26
2.6. Определение всхожести семян и энергии прорастания	26
2.7 Посев по методу Коха.....	27
Глава 3. Результаты исследований и их обсуждение.....	28
3.1. Выделение бактерий рода <i>Azospirillum</i> .....	28
3.2. Результаты опытов по проращиванию семян овса посевного ( <i>Avena sativa L.</i> ) в почве в зависимости от вида полива.....	28
3.3. Результаты опытов по проращиванию семян овса посевного с использованием фильтровальной бумаги.....	36
Выводы.....	40
Список литературы.....	41

## Введение

Население Земли беспрестанно растет, задавая сельскохозяйственной отрасли все более и более высокую планку объемов производства продовольствия. Существует ряд некоторых трудностей, ограничивающих возможности пищевой промышленности, например, нехватка пахотных земель и дороговизна удобрений, необходимых в выращивании различных культур растений, в том числе и кормовых культур для разведения скота. Однако, работу сельского хозяйства можно оптимизировать, сделав его более продуктивным, а влияние на окружающую среду менее разрушительным.

Очевидно, что продуктивность отрасли во многом зависит от плодородия почв. Пригодной для использования почву делает в первую очередь ее химический состав и присутствие в ней микроорганизмов, способных вступать с культурами растений в симбиотические отношения, поскольку такие организмы влияют на способность растений к более активному росту и развитию.

Бактериальные удобрения абсолютно безопасны для окружающей среды, что является их несомненным преимуществом перед другими видами удобрений.

**Цель работы:** выявление влияния бактериального удобрения на основе молочной сыворотки, содержащего *Azospirillum*, на всхожесть и рост овса.

### **Задачи:**

1. Выделить азоспириллы из ризосферы злаковых.
2. Получить удобрения путем выращивания бактерий на молочной сыворотке.

3. Исследовать влияние удобрения на рост овса в почве.
4. Исследовать влияние удобрения на рост овса на фильтровальной бумаге
5. Сравнить влияние удобрений, содержащих азоспириллы и азотобактеры, на рост овса в почве.

## **Глава 1. Обзор литературы по теме исследования**

### **1.1. Общие сведения о бактериях рода *Azospirillum***

*Azospirillum* – это аэробные грамотрицательные гетеротрофы, ускоряющие рост растений, способные влиять на рост и урожайность многочисленных видов растений, осуществляют фиксацию азота в микроаэрофильных условиях, имеют агрономическое и экологическое значение [8].

Основная теория относительно способности бактерий к ускорению роста заключается в их способности синтезировать различные фитогормоны, которые, в свою очередь, улучшают рост корней, адсорбцию воды и минеральных веществ, что в конечном итоге дает более крупные и, в большинстве случаев, более продуктивные растения. Данная версия всё ещё обсуждается, так как продолжают накапливаться новые данные о фиксации азота и воздействии на мембраны. С момента повторного открытия в середине 1970-х было доказано, что азоспириллы являются весьма многообещающими ростостимулирующими бактериями (РСБ). В некоторых развивающихся и развитых странах для многих культур азоспириллы используются в качестве бактериологического инокулянта отдельно, либо совместно с другими РСБ или везикулярно-арбускулярными микоризными грибами (ВАМ). Так же они служат потенциальными агентами для решения экологических проблем. Согласно обширным генетическим, биохимическим и прикладным исследованиям, азоспириллы считаются одними из наиболее изученных РСБ. [27]

### **1.1.1. Таксономическое положение азоспирилл**

К роду *Azospirillum* на относят 18 штаммов бактерий: *A. Melinis*, *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. picis*, *A. halopraedoebereinerae*, *A. inerae*, *A. oryzae*, *A. canadense*, *A. zeaе*, *A. fermentarium*, *A. rugosum*, *A. palatum*, *A. largimobile*, *A. thiophilum*, *A. formosense*, *A. humicireducens*, *A. soli* и *A. Agricola*.

Эти штаммы относятся к отряду *Rhodospirillales*, к подклассу *Alphaproteobacteria*. Для них является характерным установление с растениями и патогенными микроорганизмами растений симбиотических отношений.

Большинство известных штаммов были получены из прикорневой части растений или почвы, хотя некоторая часть была выделены из нехарактерных сред обитания для почвенных бактерий, а именно бактериальные маты, сформировавшиеся в серном источнике, и отработанное дорожное покрытие [2].

### **1.2. Морфология и физиология *Azospirillum***

Впервые азоспириллы выделил Мартин Бейеринк. Эти бактерии способны расти на безазотных агаровых средах и используют выделяемую слизь как защитный механизм от воздействия кислорода, тем самым препятствуя диффузии кислорода в среде [3].

Для азоспирилл характерна отличительная способность к метаболизму азота и углерода, данная способность способствует адаптации, приживаемости и



жизнедеятельности микроорганизмов в условиях конкуренции с другими бактериями [6].

При неблагоприятных условиях среды, таких как, например, дефицит питания, бактерии способны переходить в цистоподобные состояния, за счет чего повышается выживаемость. Морфологическим изменениям сопутствуют развитие внешней оболочки, состоящей из полисахаридов, и накопление поли- $\beta$ -гидроксибутирата. Поли- $\beta$ -гидроксибутират служит источником энергии и углерода в стрессовых условиях [4].

Для азоспирилл характерна повышенная подвижность, являющаяся дополнительным защитным фактором ввиду возможности к миграции в более благоприятные зоны, а именно в ризосферу. Подвижность достигается благодаря дополнительным флагеллам, которые нужны бактериям для способности к движению в плотных и жидких средах. У азоспирилл отмечается положительный хемотаксис к корневым сахарам, органическим кислотам, экссудатам, аминокислотам. В опытах выявлена миграция *A. brasilense* в ризосферу проростков пшеницы и показана ее зависимость от уровня влаги в почве, которой и лимитируется. На примере *Azospirillum brasilense* были представлены доказательства способности азоспирилл к свободному движению через водную пленку в исследованиях Йова Башана. Данный процесс в естественных условиях оказывает значительное влияние на хемотаксис микроорганизмов. К тому же, *Azospirillum* способны к аэротаксису [50].

*Azospirillum* отличаются многообразием метаболизма  $N_2$ . Эти бактерии способны к осуществлению всех реакций цикла  $N_2$ , кроме нитрификации. Азоспириллы, в зависимости от

свойств штамма, обеспечивают растения  $N_2$  в процессе азотфиксации и денитрификации. В качестве источников  $N_2$  для микроорганизмов служит азот из атмосферы, различные нитраты и нитриты, а также аммоний [15].

В условиях отсутствия кислорода бактерии используют как акцептор дыхательного электрона нитрат и восстанавливают его до молекулярного азота через нитрит и одновалентный оксид азота. В жидких средах *Azospirillum* способны осуществлять азотфиксацию только лишь в условиях пониженного давления  $O_2$ . Присутствие нитратов в среде угнетает азотфиксацию, но определенные концентрации необходимы для процесса денитрификации, за протекание которой у азоспирилл отвечают диссимиляторные нитритредуктазы, превращающие  $-NO_2$  в  $N_2O$  [9].

Бактерии по форме прямые или немного изогнуты, а диаметр составляет около 1 мкм, длина 2,1-3,8 мкм [1].

### **1.3. Среда обитания**

Все представители *Azospirillum sp.*, кроме *A. halopraeferanse*, факультативные эндофиты, по причине того, что они способны колонизировать поверхность, а также и внутреннюю часть корней. При том, могут проникать внутрь корня и расти в межклеточных пространствах как эндофиты, но чаще всего представлены эпифитами. Некоторые штаммы способны заселять внутреннюю корневую часть [18].

Какое-то время азоспириллы считались представителями субтропической и тропической зоны,

позднее были обнаружены и в зонах умеренного и субарктического климата [11].

По численности, на грамм ризосферной почвы в почвах умеренной зоны азоспириллы встречаются в меньшем количестве, чем в тропических и субтропических зонах. По данным исследователей из Польши, в ризосфере культур ячменя и кукурузы плотность бактерий составила от нескольких единичных клеток до двух тысяч на один грамм почвы [13].

#### **1.4. Геном *Azospirillum***

Как одни из самых изученных РСБ азоспириллы используются в качестве модели для генетических и молекулярных исследований ризосферных бактерий. Согласно данным Мартина и Дидонет, размер генома этих бактерий варьируется от 4,8 Mbp у *A. irakense* до 9,7 Mbp у штамма *A. lipoferum*. Геномы 5 штаммов (*A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. irakense*, *A. halopraeferens*), анализируемые методом электрофореза в пульсирующем поле, обладали несколькими мега-репликонами размером 0,2 - 2,7 Mbp и гибридизовались с 16s рДНК у *A. brasilense* [25].

Горизонтальный электрофорез в опытах Кабаллеро и Меладо показал, что ризосферные и эндофитные изоляты *A. brasilense*, выделенные из растений сахарного тростника и референс-штамм *A. brasilense* Sp7 и Cd, содержали 5 - 8 репликонов более 1,8 Mbp. Самыми маленькими бактериальными хромосомами, среди описанных на данный момент, являются репликоны *Azospirillum* размером около 0,6 Mbp, данные результаты свидетельствуют о том, что геном *A.*

*brasilense* состоит из нескольких мини-хромосом вместо одной кольцевой. Функции этих репликонов неизвестны, вероятно они способствуют экологическому распределению и метаболическим особенностям азоспирилл. Согласно сообщениям Джамаса и Билака, такие хромосомы также характерны для *Rhodobacter sphaeroides*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia cepacia*, *Brucella spp.*, *Vibrio parahaemolyticus* и *Phyllobacterium*. [44].

В экспериментах Педраза и Риччи было отмечено, что внутренняя часть корня сахарного тростника является защитной средой для *A. brasilense*. После 4-кратного прохождения через внутреннюю часть корня в ходе выполнения различных экспериментов никаких изменений в геноме бактерий не наблюдалось [18].

#### **1.4.1. Гены, участвующие в процессе хемотаксиса и закрепления на поверхности корней растений**

*Azospirillum* прикрепляются к корневым поверхностям растений и колонизируют их, данный процесс зависит от активности подвижности и хемотаксиса по отношению к корневым экссудатам. В работах Вандерлайдена репортерная система  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS) у нефлагеллированных мутантных штаммов и мутантного штамма *Tn5* с низкой хемотаксической подвижностью по отношению к различным аминокислотам, сахарам и органическим кислотам показала, что мутанты колонизировали корни пшеницы в гораздо меньшей степени, чем родительский штамм. Методом фенотипической комплементации хемотаксических мутантов Хауваертс идентифицировал гены, которые кодируют

центральный путь передачи сигнала для хемотаксиса у *A. brasilense*. Секвенирование фрагмента ДНК мутантных по хемотаксису штаммов, выявило область из 5 открытых рамок считывания, кодирующих гомологи известных генов (*cheA*, *cheW*, *cheY*, *cheB* и частичный ген *cheR*). По сообщениям ученого, эти гены включают пути возбуждения и адаптации для хемотаксиса и у других видов бактерий [23].

Ван Доммелен пишет, что ген кодирующий белок, подобный *ChvE* у *Agrobacterium tumefaciens*, необходим для индукции гена *vir* при реакции на сахара. Ген был клонирован у *A. brasilense Sp245*. Метод инсерционного мутагенеза показал, что сахаросвязывающий белок А (*SbpA*) штамма *A. brasilense* участвует в хемотаксисе в направлении D-галактозы, L-арабинозы и D-фукозы и является частью высокоаффинной системы поглощения D-галактозы [6].

Катупитий отмечает, что подвергшийся спонтанному мутагенезу штамм *A. brasilense Sp7* не имел капсульных полисахаридов, снизил количество продуцируемого ацетилена и колонизировал поверхность корня в меньшей степени, чем родительский штамм, что в результате привело к идентификации нового регуляторного гена у *A. brasilense*, *flcA*. В процессе изучения влияния мутантного гена *flcA* на пшеницу была выявлена его ключевая роль в клеточных процессах, связанных с адгезией, а именно в образовании капсульных полисахаридов, флокуляции в культуре и колонизации корней. Перегдерк предполагает, что *flcA* напрямую влияет на скорость активности нитрогеназы [22].

Обилие различных экспериментов, направленных на изучение хемотаксиса, показывают, что хемотаксис является основным процессом, ведущим к колонизации корней.

## 1.5. Взаимодействие с растениями

Несмотря на активные исследования физиологии и молекулярной биологии этих бактерий, их точный механизм воздействия на растения сегодня ненамного яснее, чем и десять лет назад. Существует несколько неоспоримых фактов: бактерии фиксируют азот и продуцируют фитогормоны как в культуре, так и при ассоциации с растением, но перенос этих продуктов ограничен и не всегда обнаруживается. Тем не менее, реакция роста очевидна. Бактерии влияют на метаболические пути растений, включая активность клеточных мембран. Наиболее очевидным результатом инокуляции является изменение морфологии корневой системы (как положительные, так и отрицательные). Инокулированные растения лучше усваивают минералы и воду [14].

Для объяснения этих явлений было предложено несколько возможных механизмов, некоторые из которых имели больше экспериментальных данных, чем другие. Тем не менее, нет однозначного согласия относительно того, как именно бактерии влияют на рост растений, каковы основные механизмы или существует ли один основной механизм, ответственный за наблюдаемые эффекты на рост растений и, в частности, на урожайность растений. Эти вопросы являются движущей силой в области исследований азоспирилл. Аддитивная гипотеза, предложенная более 30 лет назад, по-видимому, все еще верна. Гипотеза рассматривает несколько механизмов, вместо одного, участвующего в ассоциации. Эти механизмы действуют

одновременно или последовательно, причем вклад отдельного механизма менее значим, если оценивать его отдельно. Сумма их активности, вызванная соответствующими условиями окружающей среды, приводила к наблюдаемым изменениям в росте растений. Сегодня наиболее распространенным объяснением воздействия этих бактерий на растения является выработка фитогормонов, которые изменяют метаболизм и морфологию растения, улучшая усвоение минеральных веществ и воды. Вклад азотофиксации более спорный. В 1990 году Башан и Леванони выдвинули идею непосредственного воздействия бактерий на мембраны растительных клеток [26].

### **1.5.1. Колонизация корней**

Ассоциация между бактериями и растением может успешно возникнуть только в том случае, если бактерии способны выжить в почве и найти подходящую по размерам популяцию корней [12].

В ризосфере градиент уменьшения питательных веществ от корня к его окружению генерируется экссудатами растений. [16]

Благодаря механизмам хемотаксиса и подвижности, бактерия может перемещаться к растению и использовать экссудаты в качестве источника углерода.

Инокуляция азоспириллами приводит к внешним и физиологическим изменениям корней, в них понижается активность окислительных ферментов, содержание жиров, скорость усвоения нитратов, калия и дигидрофосфатов наоборот увеличивается. Согласно исследованиям Хехт-

Буххольца, а также Бенизри, недостаточная колонизация приводит к минимальному росту растений или во все к его отсутствию [19].

Некоторые штаммы *A. lipoferum* и *A. brasilense* способны колонизировать внутреннюю часть корней пшеницы. Данное свойство не проявляется на начальной стадии колонизации (стадия закрепления) [21].

В исследованиях Рамоса, крупные группы клеток наблюдались в местах появления боковых корней и в межклеточном пространстве клеток эпидермиса корней. А по сообщениям Лью, иногда большая часть бактерий обитала на поверхности корня, внутри корня меньше. В зоне корневых волосков бактерий наблюдалось больше, но преимущественно они располагались в углублениях между эпидермальными клетками [20].

Хорошо известно, что *A. brasilense*, выращенные в стандартных условиях, распределяются по всей корневой системе пшеницы, за исключением зоны роста. Однако в работах Фишера бактерии, подвергшиеся физиологическому стрессу, в основном локализовались на кончиках корней и боковых корнях [49].

Точно так же, согласно сообщениям Пуэнте, инокуляция саженцев черных мангровых деревьев в морской воде *A. halopraeferens*, либо *A. brasilense* приводила к высокой плотности колонизации поверхности корней. *A. halopraeferens* в основном давали одиночные клетки, заключенные в толстую оболочку, тогда как *A. brasilense* производят в основном микроскопления. Клетки *A. brasilense* были скреплены с поверхностью корней и между собой сетью фибрилл. *A. halopraeferens* были лучшими колонизаторами



поверхности корней, в то время как *A. brasilense* были успешнее в колонизации всего корня. [17].

Шлотером и Хартманом были проанализированы различные сорта пшеницы, корни которых колонизировали бактерии *A. brasilense* (штаммы *Sp7*, *Sp245* и *Wa5*). Все из них обильно колонизировали кончики корней. *A. brasilense Sp245* показал самый высокий колонизационный потенциал даже и может быть обнаружен в других частях корня, включая внутреннюю корневую ткань, образуя микроколонии в межклеточном пространстве. Два других штамма образовывали колонии исключительно на поверхности корней. Далее, после этапа колонизации, от семядоли до стадии цветения исследователи продемонстрировали, что, в то время как показатели колонизации всего корня *A. brasilense Sp7* и *Wa5* непрерывно падали, внутри корней *Sp245* оставались постоянными во время этих стадий роста. Среди штаммов азоспирилл была продемонстрирована конкуренция - совместная инокуляция всех 3 штаммов *A. brasilense* привела к сходным закономерностям колонизации, но популяция штамма *Wa5* на корнях сократилась [22].

В 1997 году Асмус с сотрудниками обнаружил, что после совместной инокуляции штаммов *Sp7*, *Wa3* и *Sp7* показала лучшие результаты, чем только *Wa3*, для колонизационных ниш. Конкуренция с естественным эндофитным РСБ на рисе исключала колонизацию корней инокулированных *A. brasilense*. [24].

У пшеницы, кукурузы и риса могут развиваться опухоли (параclubеньки) на первичных и вторичных корнях при обработке низкими концентрациями ауксинов, наиболее известным из которых является гербицид 2,4-дихлорфенокси-

уксусная кислота (2,4-Д). Как следствие, между ними может развиваться эндофитный diaзотрофный “симбиоз”. Гистологически ауксин-индуцированные опухоли проявляются в виде злокачественных корневых меристем. Из-за воздействия ауксина корневые меристемы не восстанавливаются и в дальнейшем развиваются в крупные клубеньковидные структуры. Теоретически, привнесенные diaзотрофы (*Azospirillum spp.*, *Azorhizobium caulinodans*, *Rhizobium spp.*) населяют параклубеньки в качестве основной колонизационной ниши. Кристенсен-Венигер продемонстрировал в своих работах как колонизирующие бактерии проникают через “входную трещину” в места, в которых развивающиеся опухоли появились через ритидом корня и эпидермис, формируют высокую плотность клеток внутри межклеточных пространств кортикальных и других тканей. Происходит инфицирование опухолевых клеток бактериями, находящимися внутри клеточной цитоплазмы, которая окружает мембраноподобные структуры. Как только они заселяют параклубеньки, инокулированные diaзотрофы эндофитно колонизируют большим числом клеток [25].

В своих исследованиях Кеннеди говорил о том, что не все diaзотрофы способны эффективно колонизировать параклубеньки. В пшенице только *Herbaspirillum seropedicae*, *Azorhizobium caulinodans* и мутантный штамм *A. brasilense Sp7S* показали значительную эндофитную колонизацию параклубеньков, в то время как *Acetobacter diazotrophicus*, *Azotobacter vinelandii*, *Derxia gummosa* и другие штаммы *Azospirillum* колонизировали ризоплану, а не внутреннюю часть параклубеньков [31].

Также, согласно Фишеру, при влиянии солевого стресса на колонизацию параклубеньков пшеницы бактериями *A. brasilense Cd*, параклубеньки ведут себя как защищенные бактериями ниши, поддерживающие более высокие бактериальные популяции, чем у растений без параклубеньков. В параклубеньках большинство бактерий присутствовало вокруг базальной поверхности модифицированных боковых корневых структур. Никакого серьезного прорыва в изучении процесса прикрепления и последующей колонизации корней не произошло. Сообщалось лишь об уточнениях предыдущих исследований. Возможно, лучшее понимание генов растений, участвующих во взаимодействии, прольет дополнительный свет на эти ключевые моменты [48].

Клеточная агрегация является одним из самых основных явлений, характерных для азоспирилл при колонизации корней. Процесс агрегации был детально изучен Башаном и Леванони. Данные их экспериментов взаимодействия показали, что явление агрегации опосредуется белками и полисахаридами, но сам механизм действия пока не ясен. Поскольку агрегацией можно легко манипулировать, это может дать возможность создать лучшие инокулянты азоспирилл [30].

### **1.5.2. Физиологические механизмы закрепления в ризосфере**

Башан и Хольгин установили, что прикрепление азоспирилл к корням представляет собой двухэтапный процесс, состоящий из адсорбции и закрепления. Первая

фаза адсорбции протекает достаточно быстро, в течение 2 часов после воздействия бактерий на корни, процесс обратимый и, вероятно, управляется бактериальными белковыми соединениями. Фаза закрепления занимает несколько часов, она необратима и осуществляется благодаря бактериальным внеклеточным поверхностным полисахаридам, включающих сеть фибриллярного материала, который соединяет бактерии с поверхностью корня и предотвращает их отсоединение. В своей работе Егоренкова подтвердила данную последовательность процесса закрепления на примере пшеницы [27].

Кастелланос оценивал адсорбцию путем измерения заряда клеточной поверхности и гидрофобности у 10 штаммов *Azospirillum spp.* *Azospirillum spp.* обладал умеренной гидрофобностью и зарядом ниже известных значений, которые отмечались у патогенных микроорганизмов человека. На гидрофобность и заряд поверхности клеток азоспирилл можно повлиять внешним воздействием, но общую закономерность для всех штаммов выявить не удалось [39].

Федоненко сравнивал *A. brasilense Sp245* и мутанты штаммы, дефектные по липополисахаридам. Несмотря на сходство динамики адсорбции родительского и мутантного штамма, способность к прикреплению мутантных организмов была ниже, чем у родительского штамма. Мутантный штамм обладал значительно сниженной гидрофобностью поверхности клеток. Эти результаты демонстрируют, что гидрофобность и заряд не играют большой роли в первичной адсорбции *Azospirillum spp.* к корневым поверхностям [43].

Также Кастелланос подвергал бактериальные клетки голоданию, при этом многие характеристики клеточной стенки изменялись, но эти изменения не были существенными, вследствие чего был сделан вывод, что голодание не является основным ограничивающим фактором в прикреплении азоспирилл к поверхности корней [39].

Пинеиро было изучено влияние pH и катионов. Наличие значительных концентраций  $\text{Ca}^{+2}$  или  $(\text{PO}_4)^{-3}$  в элективной среде снижало адсорбцию бактерий. Влияние pH среды на адсорбцию азоспирилл показало, что штаммы из корней или ризосферы пшеницы имели оптимальную адсорбцию при показателях pH равных 6,0, в то время как все остальные штаммы предпочитали pH 7,0. Кроме того, в работах Егоренковой и Федоненко липополисахариды, экстрагированные из наружной мембраны *A. brasilense Sp245* и его мутантных клеток, индуцировали деформацию корневых волосков проростков пшеницы после воздействия [26].

Кастелланос предполагает, что некоторые лектины, играют определенную роль в фазе адсорбции, поскольку эти соединения были идентифицированы в клеточной стенке *A. brasilense* и *A. lipoferum*. Адсорбция *A. brasilense* на корнях яровой пшеницы зависела от концентрации бактерий и возможного участия лектинов. Количество прикрепленных клеток увеличивалось с увеличением инокулята и времени контакта. Насыщение поверхностной адсорбции корней наблюдалось через 3-24 часа инкубации, в зависимости от штамма. Чем дольше длился период инкубации, тем сильнее было закрепление на поверхности корня. Адсорбция на корнях частично ингибировалась, в случаях, если корни

обрабатывались N-ацетил-D-глюкозамином, что и указывает на возможное участие лектинов [19].

Бурдман занимался очищением основного белка внешней мембраны *A. brasilense Cd*, действующего в качестве адгезина и участвующего в адсорбции корней и агрегации клеточных бактерий. Белок способен связывается с экстрактами корней различных видов растений, наиболее выраженная адгезия наблюдалась с корнями злаковых. Эти исследования указывают на участие молекул лектина в процессе прикрепления.

### **1.5.3. Продуцирование фитогормонов**

*Azospirillum spp.* известны главным образом своей способностью продуцировать растительные гормоны, а также полиамины и аминокислоты в культуре. Среди этих гормонов большую роль могут играть индолы, главным образом 3-индолилуксусная кислота (ИУК) и гиббереллины [29].

#### **1.5.3.1. 3-индолилуксусная кислота**

Синтез ИУК зависит от типа питательной среды и наличия триптофана в качестве предшественника. Также значительное влияние на количество вырабатываемой ИУК оказывает рН. В своих исследованиях Захарова выявила, что очень низкие уровни витаминов группы В, особенно пиридоксина и никотиновой кислоты, способствуют увеличивали выработку ИУК. [34].

Считается, что продуцирование ауксинов азоспириллами играет основную роль в стимулировании роста растений. В

экспериментах Эль-Хаваса и Адати *A. brasilense* продуцировали большое количество внеклеточной ИУК и триптофола в питательную среду обогащенной триптофаном, предшественником ИУК. Добавление отфильтрованной надосадочной жидкости культуры к корням риса, выращенных в гидропонных резервуарах, по сравнению с необработанными корнями привело к удлинению корней, увеличению площади поверхности и сухого вещества корней, развитию боковых корней и корневых волосков. Более высокие концентрации надосадочной жидкости сильно ингибировали удлинение корней, развитие боковых корней и вызывали узелковидные опухоли на корнях. Аналогично, в работах Молла, внеклеточная надосадочная жидкость *A. brasilense Cd*, примененная к растениям сои, индуцировала наибольшее количество корней и увеличивала их длину. Инокуляция пшеницы дикими штаммами *A. brasilense Sp245* и *Sp7* приводила к сильному уменьшению длины корней и увеличению образования корневых волос, что характерно для таких инокуляций [35].

Исследования Доббеларе показывают, что влияние на морфологию корней было дополнительно усилено добавлением триптофана, это можно было имитировать, заменив клетки *Azospirillum* на ИУК.

Кунду в своих работах продемонстрировал, что мутантные *A. brasilense* с низкой продукцией фитогормонов, но с высокой нитрогеназной активностью не усиливали рост корней по сравнению с некулированной контрольной группой. Напротив, мутанты с повышенной продукцией фитогормонов существенно влияли на морфологию корней. В целом, увеличение биомассы растений и N<sub>2</sub>-фиксации было

замечено у штаммов, имеющих повышенную продукцию индольных соединений [47].

Воздействием на параклубеньки корней риса ауксинами 2,4-Д, нафталинуксусной кислотой (НУК) и ИУК Секар усиливал полигалактуроназную активность в корнях при образовании параклубеньков и эндофитной колонизации азоспириллами. При инокуляции азоспириллами в небольшой степени возрастала полигалактуроназная активность рисовых корней без какого-либо видимого влияния на корневой морфогенез; применение ауксинов, совместно с инокуляцией *Azospirillum*, повышало активности полигалактуозную активность риса корней до высокого уровня, таким образом, продуктивность корней менялась внутри параузелков, которые позже были колонизированы *A. brasilense* [46].

Еще одним из эффектов инокуляции *Azospirillum* является увеличение интенсивности дыхания, что демонстрировал в своих опытах Веддер-Веисс [33].

### **1.5.3.2. Гиббереллины**

По Кассану бактериальным ферментом, ответственным за синтез гиббереллинов является 2-оксоглутарат-зависимая диоксигеназа.

Пикколи высказывал предположение, что благоприятное воздействие *Azospirillum spp.* на растения частично обусловлено выработкой гиббереллинов. Применение гиббереллинов оказывает влияние, аналогичное инокуляции *Azospirillum* – увеличению густоты корневых волосков. При культивировании штамма *A. lipoferum USA 5b*,



продуцирующего гиббереллин, в присутствии глюкозилового эфира или гликозида гиббереллина A20, оба конъюгата подвергались гидролизу. Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что стимуляция роста растений, вызванная инокуляцией *Azospirillum*, является результатом комбинации как продукции гиббереллина, так и деконъюгации гиббереллин-глюкозид/глюкозилового эфира бактерией [37].

Известно, что с увеличением водного потенциала происходит увеличение количества гиббереллина A<sub>3</sub> (основного гиббереллина, выявленного у *Azospirillum*), продуцируемого на клетку [7].

Лукангели и Боттини было также высказано предположение об причастности гиббереллина A<sub>3</sub>, продуцируемого *Azospirillum spp.*, к стимулированию роста кукурузы [38].

### 1.5.3.3. Этилен

В своих работах Глик продемонстрировал, что у растений на протяжении большинства фаз роста дозировка продуцируемого этилена минимальна. Этилен играет важную роль в прорастании семян, фитогормон пробуждает их из состояния покоя, хотя высокие концентрации этилена ингибируют последующее удлинение корней. В ответ на биологические или экологические стрессы этилен может синтезироваться в большом количестве, вызывая увядание и старение. В сельском хозяйстве контроль концентраций этилена предотвращает ощутимые экономические затраты. Одним из предшественников синтеза этилена является 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота (АКК). АКК-

дезаминаза является ферментом, который встречается у многих почвенных микроорганизмах и ростостимулирующих бактерий, способных разрушать АКК. Таким образом, понижение концентрации этилена в растениях можно рассматривать, как способ стимулирования роста растений. У штаммов *Azospirillum spp.* отсутствует АКК-дезаминаза, но не смотря на этот факт, некоторые штаммы могут продуцировать этилен [41].

Модуляция этилена воздействием ростостимулирующих бактерий происходит за счёт деградации предшественника этилена АКК с помощью АКК-дезаминазы, в результате чего в качестве побочных продуктов образуются аммиак и  $\alpha$ -кетобутират [23].

Структурный ген АКК-дезаминазы (*acdS*) ростостимулирующих бактерий *Enterobacter cloacae* UW4 Хольгин и Глик клонировали в плазмиде широкого спектра хозяев под контролем *lac*-промотора, а затем переносили в *A. brasilense* Cd и Sp245. Корни проростков рапса и томатов, чувствительных к этилену, получились значительно длиннее у растений, привитых трансформантами *A. brasilense*, чем у растений, привитых нетрансформированными штаммами той же бактерии.

Предположив, что конструкция с геном АКК-дезаминазы под контролем конститутивного промотора, более слабого, чем *lac*-промотор, может оказывать меньшую метаболическую нагрузку на азоспирилл, ген *acdS* был клонирован под контролем промотора гена устойчивости к тетрациклину: трансформанты *A. brasilense* Cd, удерживающие *acdS*, слитые с промотором гена Tet<sup>r</sup>, показали более низкую активность АКК-дезаминазы, чем

трансформанты с *acdS*, контролируемые *lac*-промотором. Однако, *acdS*, контролируемые промотором гена *Tet<sup>r</sup>*, оказывали меньшую метаболическую нагрузку на *Cd*-трансформанты *A. brasilense*, чем *acdS*, контролируемые *lac*, что приводило к увеличению синтеза ИУК, скорости роста, выживаемости на поверхности листьев томата и способности стимулировать рост проростков [27].

#### **1.5.4. Влияние на рост растений и урожайность**

Продуктивность азотфиксации в зонах умеренного климата и интенсивность фотосинтеза ниже, чем в тропической зоне. Азоспириллы являются важным составляющим компонентом азотфиксирующей микрофлоры корней злаковых трав в умеренной климатической зоне. [44].

Волкогон изучал эффективность инокуляции азоспириллами костреца безостого и райграса пастбищного с применением азотных удобрений. При внесении 40–80 кг/га минерального азота в первый год жизни трав был замечен значительный эффект от инокуляции. Снижение же прибавок было замечено от инокуляции на второй и третий годы жизни [5].

В ходе своих исследований Башан и Хольгин сделали вывод, что азоспириллы обладают способностью к инокуляции более чем сотни видов других незлаковых культур.

Окон проводил оценку применения азоспирилл в течении двадцати лет и продемонстрировал способность микроорганизмов увеличивать урожайность злаковых культур в различных климатических зонах. Так прибавки

урожайности кукурузы составили 10-20% в Джорджии и Нью-Джерси, 20-30% в Израиле и Индии, а у злаковых растений 11-24% во Флориде, в Израиле 15-20%, в Индии 20-30% [36].

Отмечается, что стабильность результатов экспериментальных исследований зависит в том числе от выбора штамма для инокуляции. [32]

В ходе полевых экспериментов Михайловской с злаковыми травами были получены данные, согласно которым бактериальное удобрение «Азобактерин» обеспечивало положительный эффект на четырех видах злаковых трав. На костреце безостом и еже сборной наблюдалась наибольшая эффективность инокуляции. Увеличение содержащегося в урожае белка подтвердило влияние азотфиксации на азотное питание [40].

#### **1.5.5. Влияние совместной инокуляции с другими микроорганизмами на рост растений и урожайность**

Инокуляция азоспирилл более успешна, когда совместно с ними инокулируются и другие микроорганизмы. Такие консорциумы эффективнее работают, когда встречаются фосфатсольбилизирующие бактерии, азотобактерии, ризобии и везикулярно-арбускулярные микоризные грибы, так как способствуют росту друг друга за счет совместного обеспечения питательными веществами, удалению продуктов, замедляющих протекание реакций, повышая таким образом продуктивность растений, улучшая усвоение питательных веществ. [28].

Анализ научной литературы показал, что перспективность использования азоспирилл в качестве действующих агентов бактериальных удобрений обусловлена их свойствами: способностью стимулировать рост растений, фиксировать молекулярный азот в ассоциации с различными культурами, хемотаксисом и аэротаксисом, способность осуществлять мобилизацию почвенного фосфора. При выборе соответствующего штамма, сочетающего способность к колонизации корней культуры, высокий уровень азотфиксирующей и ростостимулирующей активности. В процессе улучшения минерального азотного питания, применение *Azospirillum* может обеспечить повышение содержания белка в урожае. Необходимые условия для успешной инокуляции – правильное изготовление качественного удобрения, корректное хранение и его внесение. [45]

## **Глава 2. Методология проведения экспериментов**

### **2.1. Объект исследования и питательная среда для культивирования**

Объект исследования – бактерии рода *Azospirillum*.

Состав твердой селективной питательной среды для культивирования азоспирилл на 100 мл.:

$K_2HPO_4$  – 0,3 г.;

$KH_2PO_4$  – 0,2 г.;

$NH_4CL$  – 0,05 г.;

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,02 г.;

лактат Na (50%) – 2 капли;

агар микробиологический – 2г.

Компоненты смешивались и помещались в колбу Эрленмейера, водопроводной водой объем раствора доводился до 100 мл. Содержимое колбы тщательно перемешивалось. Среда нагревалась до кипения, постоянно перемешивалась.

Питательную среду разливали по пробиркам на 2/3 объема, пробирки укупоривали ватно-марлевыми пробками. Питательная среда подвергалась стерилизации в автоклаве при 1,1 ати. в течение 30 минут, после чего среду слегка остужали и разливали по стерильным чашкам Петри.

### **2.2. Выделение бактерий из прикорневой части растений.**

Чтобы выделить культуру было собрано несколько видов злаковых растений вместе с корневой частью и почвой с

глубины до 15 см., по причине того, что азоспириллы обитают в ризосфере злаков.

Корни растений промывались под проточной водой до полного удаления почвы и помещались стерильным пинцетом в чашки Петри с питательной средой. Чашки помещались в термостат крышками вниз на три дня при температуре  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Изолировать получилось только колонии, выделенные с корней мятлика обыкновенного (*Poa trivialis* L.). Путем многократного пересева была получена чистая культура *Azospirillum*. В дальнейшем работали с данной культурой.

### **2.3. Получение удобрения путем выращивания *Azospirillum* на молочной сыворотке**

Готовилась жидкая питательная среда того же состава, что и у твердой питательной среды, но без добавления агара. Раствор разливался по колбам и подвергался стерилизации в автоклаве. Чистые культуры из пробирок с твердой питательной средой пересевались на жидкую среду микробиологической петлей в пламени горелки для сохранения стерильных условий. После чего колбы с жидкой средой отправляли в термостат для культивирования на неделю с постоянной температурой  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Молочная сыворотка разводилась в 8 раз водой и стерилизовалась в автоклаве, далее в нее засеивались бактерии, выращенные на жидкой среде. Колба с удобрением помещалась на неделю в термостат для культивирования бактерий при температуре  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ .

## **2.4. Постановка эксперимента по проращиванию семян овса посевного (*Avena sativa L.*) в почве**

Семена овса были посажены в контейнеры, по 12 штук в каждом. Всего было 9 контейнеров, содержимое 3 из них поливалось только удобрением с бактериями, 3 только сывороткой и 3 только водой. Такой полив происходил однократно при закладке эксперимента, после все семена поливались уже водой по мере необходимости, не допуская переувлажненности или пересыхания почвы.

## **2.5. Постановка эксперимента по проращиванию семян овса посевного (*Avena sativa L.*) на фильтровальной бумаге**

Семена овса были помещены между несколькими слоями листов фильтровальной бумаги в чашках Петри, в каждой чашке было по 12 семян. Всего было взято 9 чашек, содержимое 3 из них при закладке эксперимента единожды было смочено удобрением с бактериями, 3 сывороткой, 3 водой (контрольная группа). В дальнейшем все 9 чашек периодически смачивались обычной водой. Чашки помещались в темный ящик для исключения возможности попадания солнечного света

Чашки Петри ежедневно приоткрывались на несколько секунд для попадания воздуха, проверялась увлажненность слоев бумаги, при необходимости содержимое чашек смачивалось водой, не допуская высыхания или переувлажнения.



## **2.6. Определение всхожести семян и энергии прорастания**

На 4 сутки, в соответствии с ГОСТ 12038-84, просчитывалась энергия прорастания семян, а на 7 сутки всхожесть, длина корней и побегов. При определении энергии прорастания подсчитывали только нормально проросшие семена, удаляли только те, которые загнили. Для овса к нормально проросшим семенам относятся те, которые имеют не меньше двух нормально развитых корешков размером больше длины семени, а росток не менее половины его длины с различимыми первичными листочками, занимающими не меньше половины длины coleoptilya. Длину ростка учитывают по той его части, которая вышла за пределы цветковых чешуй.

## **2.7 Посев по методу Коха**

Для определения числа бактерий использовался метод Коха, определяли колониобразующие единицы (КОЕ). Аликвоту из удобрения разводили последовательными десятикратными разведениями в 7 пробирках. Из каждой пробирки 1 мл высевался в чашку Петри, после чего туда добавлялась агаризованная питательная среда.

Для сравнения параллельно проводился такой же эксперимент, но полученные разведения уже заливались в чашку Петри по 0,1 мл поверх питательной среды.

Результаты обрабатывали статистически с помощью программы Microsoft Excel

## **Глава 3. Результаты исследований и их обсуждение**

### **3.1. Выделение бактерий рода *Azospirillum***

Для того, чтобы получить бактерии рода *Azospirillum* использовались такие растения как: ежа сборная (*Dactylis glomerata* L.), тимофеевка луговая (*Phleum pratense* L.), мятлик обыкновенный (*Poa trivialis* L.), с поверхности корневой системы которых выделялись образцы микроорганизмов.

В процессе выделения и культивирования на элективной питательной твердой среде из полученных культур наиболее удачными оказались образцы с корневой части мятлика обыкновенного. Данные культуры содержали большие по численности колонии, к тому же среди них отсутствовали плесневые грибы.

В ходе дальнейшего многократного пересева удалось получить чистую культуру бактерий рода *Azospirillum*. Бактерии идентифицировались методом микроскопирования и по характерному налету на среде. В препарате азоспириллы имеют форму вибриона и обладают спиральной подвижностью.

### **3.2. Результаты опытов по проращиванию семян овса посевного (*Avena sativa* L.) в почве в зависимости от вида полива**

Для оценки влияния удобрения на рост овса посевного (*Avena sativa* L.) было исследовано несколько параметров, а

именно зависимость длины корней и длины побегов от вида полива в различные сезонные периоды.

На рисунке 1 представлены данные по зависимости прорастания семян овса в почве от вида полива (лето).

Как видно из графика, среди общей массы семян, больше всего проросло тех, в почву с которыми было внесено удобрение, что составило 75% от количества посаженных семян в контейнерах с этим видом полива. Промежуточные результаты показали семена, выросшие на сыворотке, 61%, меньше всего взошло семян на воде без дополнительного внесения других веществ, 47%.



Рис. 1. Зависимость прорастания семян овса в почве от вида полива (лето)

По длине побега проросшие семена продемонстрировали следующие результаты, отображенные на рисунке 2:

По данным графика можно заметить, что среди наиболее длинных стеблей преобладают растения, которые росли на удобрении, среди более низкорослых растений чаще всего встречаются те, что росли на воде, промежуточные результаты у растений, выращиваемых на сыворотке. Максимальная длина побегов растений составила 36,5 см, а минимальная 23,3 см.

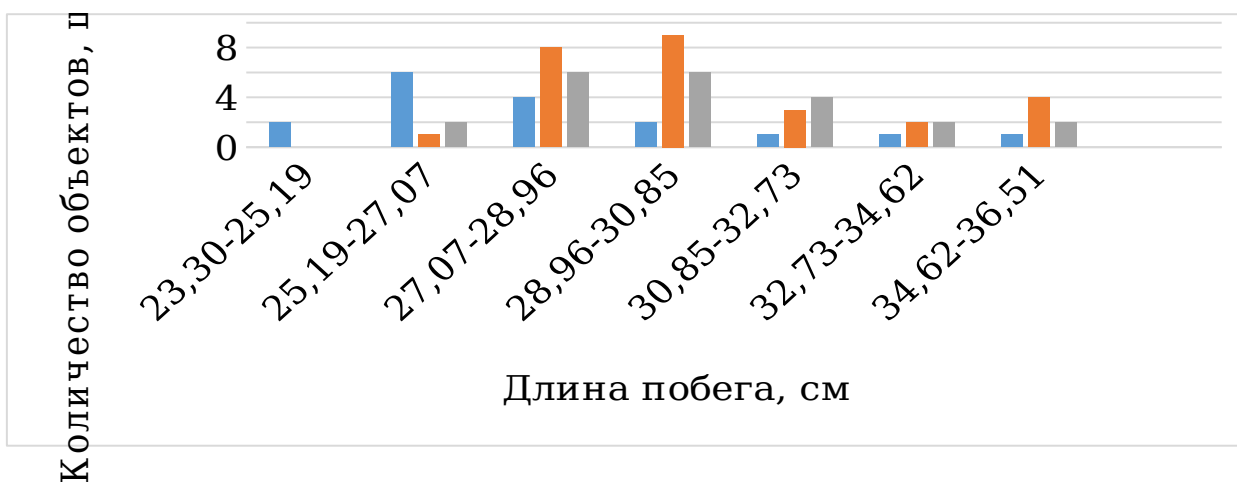


Рис. 2. Зависимость длины побегов овса от вида полива (лето).  
 Условные обозначения: столбцы синего цвета – результаты после полива водой, столбцы оранжевого цвета – результаты после полива удобрением, столбцы серого цвета – результаты полива сывороткой.

Можно сказать, что в конкретно этом случае показатели для удобрения и сыворотки практически одинаковые и сильных различий не имеют. Вероятно, это связано с тем, что в сыворотке содержится большое число различных веществ и элементов, которые благоприятно повлияли на рост растений. Мы считаем, что для более четкой картины следует провести эксперименты в открытом грунте, так как бактериям в удобрении нужно больше времени для того, чтобы проникнуть в ризосферу и закрепиться в ней, так же не исключается влияние конкурентных отношения растений за ограниченное пространство в контейнере.

Для сравнения эффективности удобрения в другие сезонные периоды были проведены опыты в осенне-зимний период, результаты представлены на рисунке 3 и 4.

На рисунке 3 показаны данные по всхожести семян. Больше всего семян взошло при поливе сывороткой, что

составило 75% от числа посаженных в контейнер с удобрением. По 61% вошло на удобрения и воде.

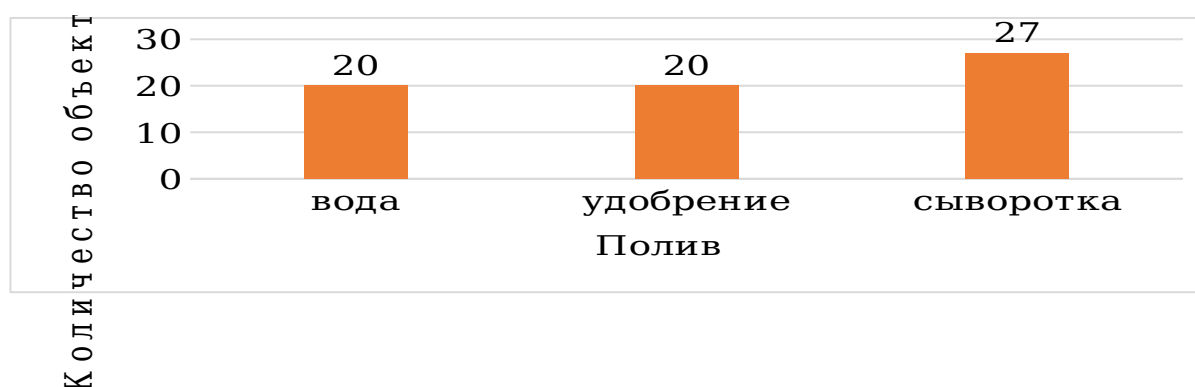


Рис. 3. Зависимость прорастания семян овса в почве от вида полива (осень).

Проросшие растения показали следующие результаты, рисунок 4:

Среди самых высоких побегов преобладали растения, выращенные на удобрении. Промежуточные результаты были характерны для растений, которые поливались сывороткой, аналогичные, но более низкие показатели встречались на растениях, выращенных только на воде. При этом минимальные и максимальные значения длины растений были гораздо ниже, чем в летний период. Минимальная длина побегов составила 14 см, а максимальная 26,9 см.

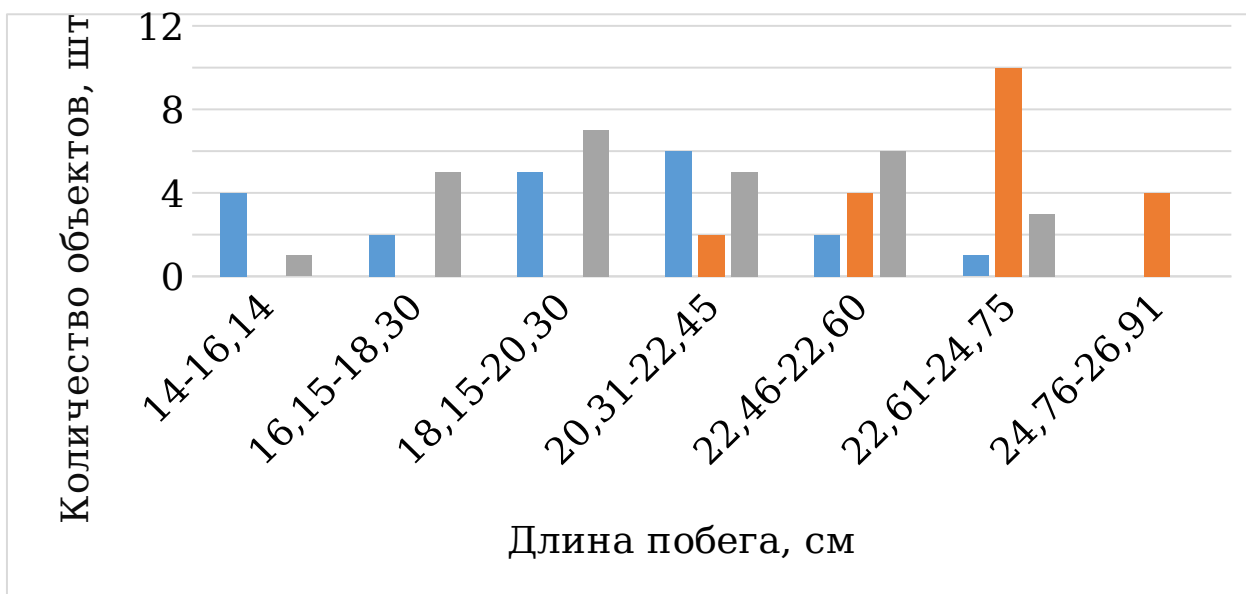


Рис. 4. Зависимость длины побегов овса от вида полива (осень-зима).

Условные обозначения: столбцы синего цвета – результаты после полива водой, столбцы оранжевого цвета – результаты после полива удобрением, столбцы серого цвета – результаты полива сывороткой.

Мы считаем, что такие показатели прежде всего связаны с характерным для этого времени года уменьшением длины светового дня, а также с меньшей влажностью воздуха, чем в летний период.

В весенний период показатели несколько изменились, что показано на рисунках 5 и 6.

На рисунке 5 отображено количество проросших семян. Больше всего семян проросло в контейнерах, содержимое которых поливалось удобрением, что составило 80,5% от изначально заложенного числа семян в контейнеры с удобрением. На сыворотке вышло 66,7% от изначально количества семян в контейнерах, на воде 50%.



Рис. 5. Зависимость прорастания семян овса в почве от вида полива (весна)

Проросшие растения выросли со следующими показателями, рисунок 6:

Среди самых высоких растений чаще остальных встречались те, что выросли на удобрении, промежуточные показатели чаще были у растений, которые росли на сыворожке, самые низкорослые экземпляры в большинстве случаев встречались у растений, семена которых поливались водой. Самые низкими был побеги длиной 23 см, а самые длинные 36 см.

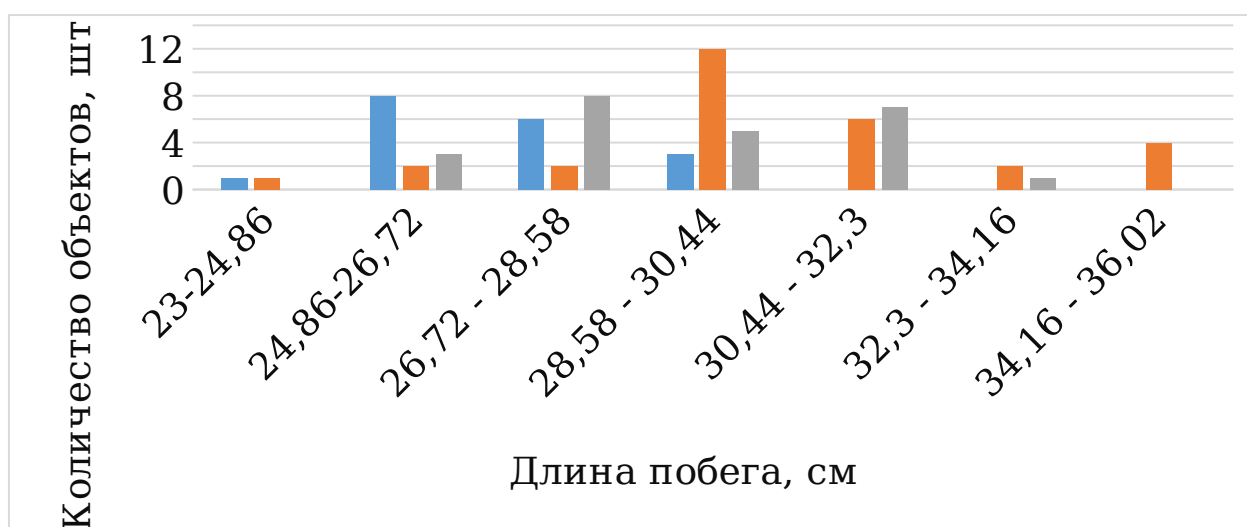


Рис. 6. Зависимость роста побегов овса от вида полива (весна).

Условные обозначения: столбцы синего цвета – результаты после полива водой, столбцы оранжевого цвета – результаты после полива удобрением, столбцы серого цвета – результаты полива сывороткой.



Мы считаем, что такие результаты получились по причине увеличения долготы солнечного дня, и повышения влажности воздуха.

Таким образом, мы можем сделать вывод, что удобрение на основе молочной сыворотки и бактерий рода *Azospirillum* оказывает положительный эффект на рост побегов овса посевного.

### 3.3. Результаты опытов по проращиванию семян овса посевного с использованием фильтровальной бумаги

Как и в опытах по проращиванию семян в почве, при проращивании с использованием фильтровальной бумаги исследовались такие показатели, как длина побегов и длина корней в зависимости от полива в летний и осенне-зимний периоды.

Так, на рисунке 7 продемонстрирована зависимость роста побегов овса от вида полива (лето) при выращивании на фильтровальной бумаге.

Лучше всего показала в работе себя молочная сыворотка и вода, длина побегов составила от 6,40 см. до 21,80 см.

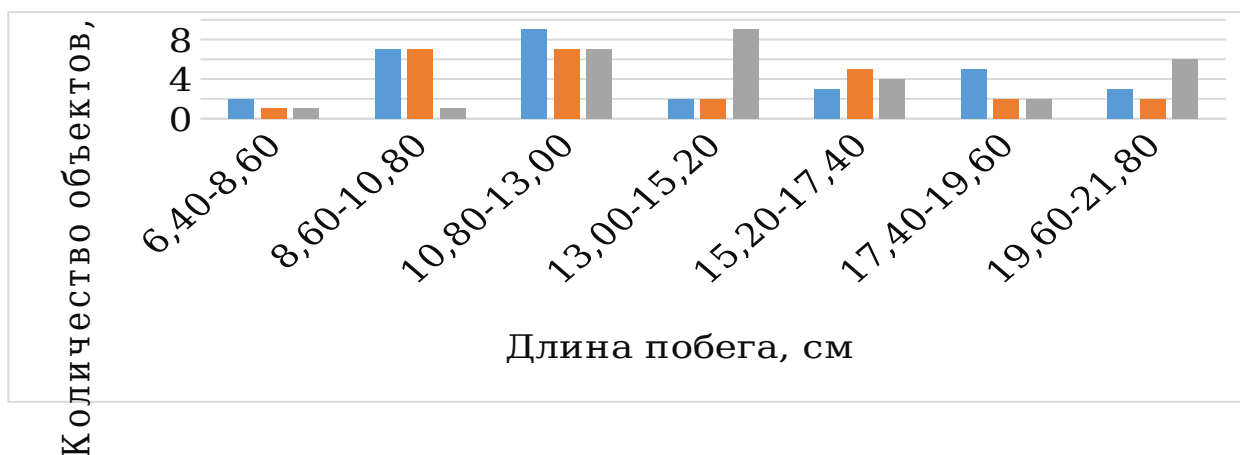


Рис. 7. Зависимость роста побегов овса от вида полива (лето) при выращивании на фильтровальной бумаге

Условные обозначения: столбцы синего цвета – результаты после полива водой, столбцы оранжевого цвета – результаты после полива удобрением, столбцы серого цвета – результаты полива сывороткой.

Аналогичные результаты были получены и при повторении опыта в осенне-зимний период, что демонстрируется на рисунке 8, отражающем зависимость роста побегов овса от вида полива (осень-зима) при выращивании на фильтровальной бумаге.

Лучше всего показала в работе себя снова молочная сыворотка и вода, длина побегов составила 4,0 см. для самых низкорослых побегов, самые длинные составили 19,9 см.

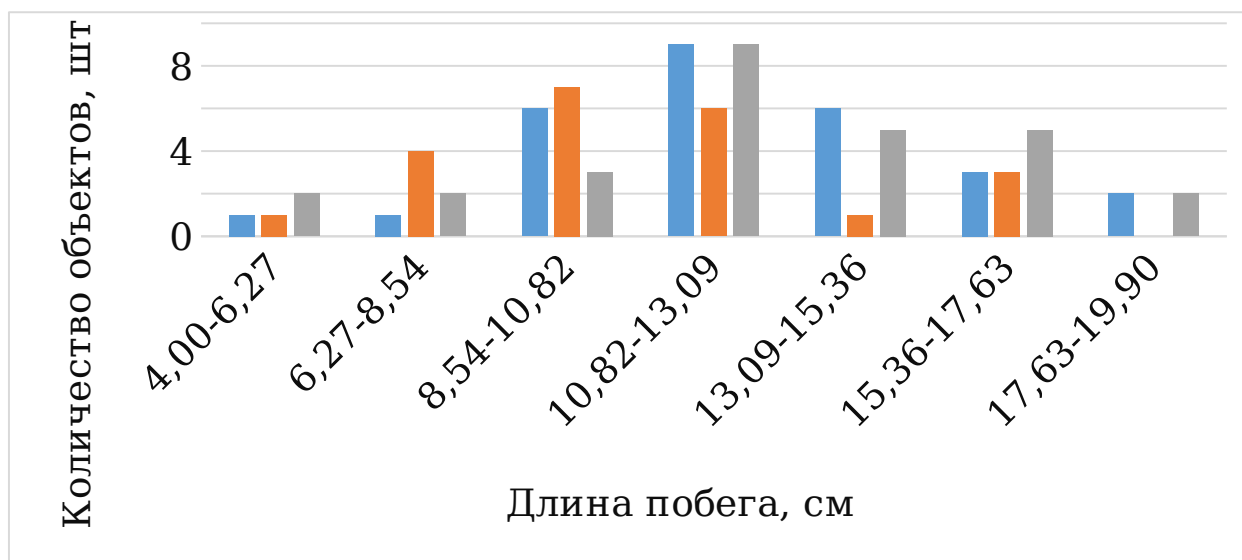


Рис. 8. Зависимость роста побегов овса от вида полива (осень-зима) при выращивании на фильтровальной бумаге

Условные обозначения: столбцы синего цвета – результаты после полива водой, столбцы оранжевого цвета – результаты после полива удобрением, столбцы серого цвета – результаты полива сывороткой.

Такие показатели объясняются тем, что для работы удобрения прежде всего необходима почва, поскольку азоспириллы являются ризобактериями.

Исходя из данных рисунков 9 и 10, посвященных зависимости длины корней овса от вида полива при выращивании на фильтровальной бумаге, видно, что корни растений также лучше росли на воде и сыворотке, чем на удобрении.



Рис. 9. Зависимость длины корней овса от вида полива (лето) при выращивании на фильтровальной бумаге

Условные обозначения: столбцы синего цвета – результаты после полива водой, столбцы оранжевого цвета – результаты после полива удобрением, столбцы серого цвета – результаты полива сывороткой.

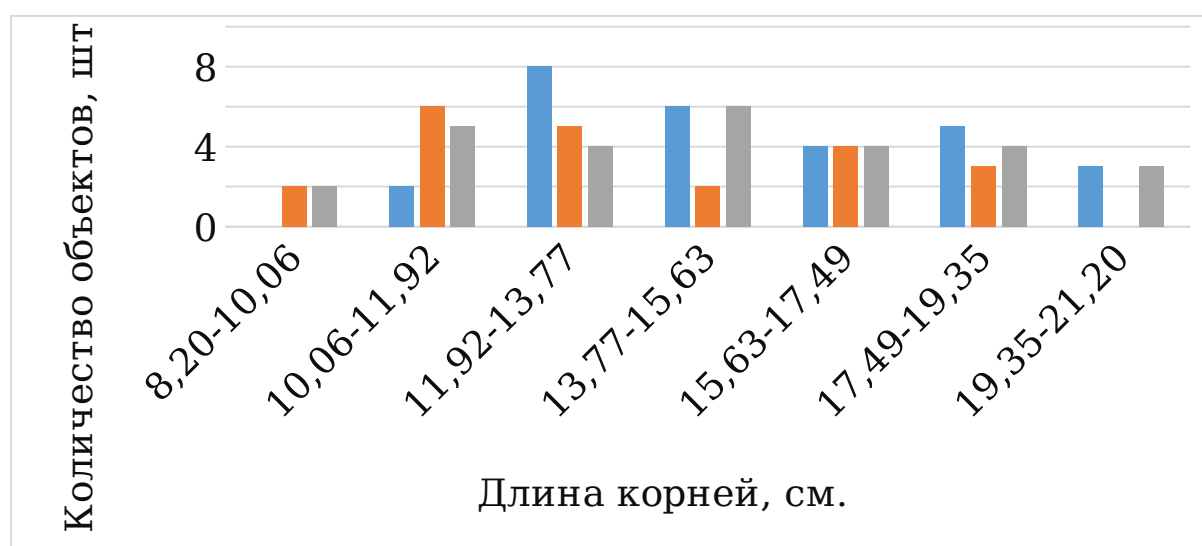


Рис. 10. Зависимость длины корней овса от вида полива (осень-зима) при выращивании на фильтровальной бумаге

Условные обозначения: столбцы синего цвета – результаты после полива водой, столбцы оранжевого цвета – результаты после полива удобрением, столбцы серого цвета – результаты полива сывороткой.

Мы считаем, что показатели зависимости длины корней овса от вида полива при выращивании на фильтровальной бумаге тоже связаны с тем фактом, что для работы удобрения прежде всего необходима почва, поскольку азоспириллы являются ризобактериями. Ввиду отсутствия возможности для создания симбиоза, удобрение не оказало эффекта на рост растений.

#### **3.4. Результаты опытов по проращиванию семян овса посевного (*Avena sativa* L.) в почве с использованием удобрения на основе молочной сыворотки и бактерий рода *Azotobacter*.**

Для сравнения эффективности работы удобрения на основе бактерий рода *Azospirillum* мы провели опыт по проращиванию семян овса посевного в почве с применением удобрения на основе бактерий рода *Azotobacter*, рисунок 11.

В большинстве случаев самыми высокими были показатели у семян, которые поливались сывороткой, промежуточные результаты у семян, поливаемых удобрением и водой, ростки семян, поливаемых удобрением, попадают во все интервалы, но их встречается меньше, чем тех, которые поливали водой.

Минимальная длина побегов составила 6,5 см, а максимальная 37,6 см. Диапазон значений оказался меньше в сравнении с работой удобрения на основе бактерий рода *Azospirillum*.

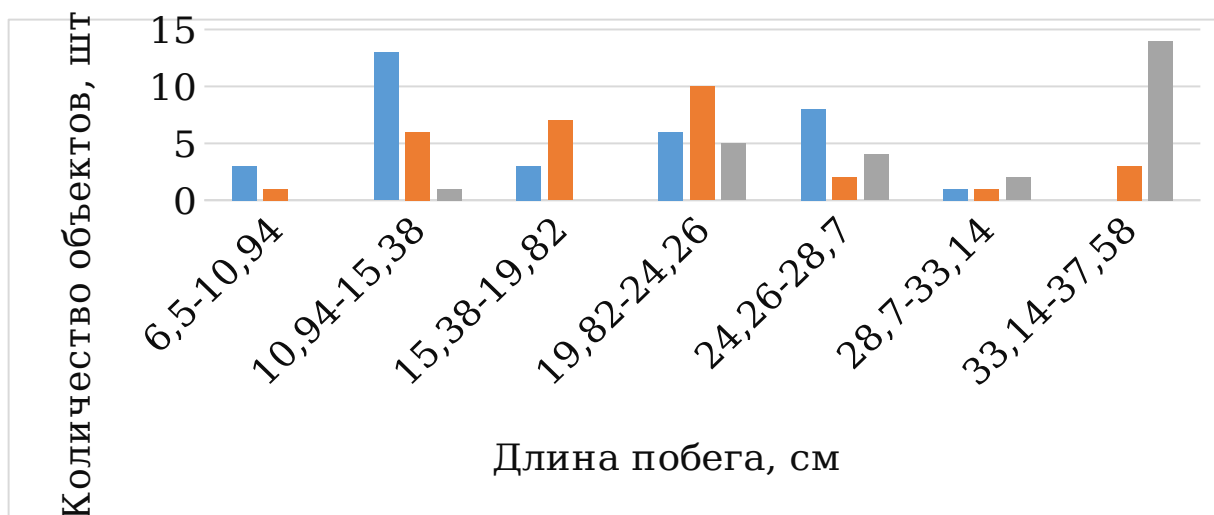


Рис. 11. Зависимость роста побегов овса от вида полива (весна). В качестве удобрения *Azotobacter*.

Условные обозначения: столбцы синего цвета – результаты после полива водой, столбцы оранжевого цвета – результаты после полива удобрением, столбцы серого цвета – результаты полива сывороткой.

Вероятнее всего такие показатели объясняются тем, что для овса более предпочтительно удобрение на основе азоспирилл, поскольку в отличие от свободноживущего азотобактера, азоспириллы образуют с растениями симбиоз в ризосфере, на установление которого хоть и требуется время.

### 3.5. Результаты по выявлению количества КОЕ в удобрении

Проведя посев методом Коха мы выяснили, что бактерии хорошо растут на разбавленной молочной сыворотке, в семикратно разведенном растворе насчитывалось  $10^{10}$  колониобразующих единиц (КОЕ). Бактерии показали

активный рост после многократных разведений, так как *Azospirillum spp.* относятся к микроаэрофилам.



## **Выводы**

1. Азоспириллы были выделены из прикорневой части мятлика обыкновенного.

2. Опыты показали, что выделенные бактерии хорошо растут на разведенной сыворотке.

3. Удобрение положительно влияет на рост овса в почве, поскольку бактерии вступают в симбиоз с растениями. Длина побегов растений, которые были выращены с применением удобрения, была больше, чем у тех, что выращивались на воде на 2,5% (лето), на 20% (весна), на 16% (осень-зима).

4. Удобрение не оказало положительного влияния на рост овса на фильтровальной бумаге, так как у микроорганизмов отсутствует возможность попасть в ризосферу.

5. Удобрение, содержащее азоспириллы, лучше влияет на рост овса, чем удобрение, содержащее азотобактеры.

## Список литературы

1) Белимов, А.А. Эффективность инокуляции ячменя смешанными культурами diaзотрофов: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 06.01.04 / А.А. Белимов. 1990 – 19 с.

2) Берестецкий, О.А. Азотфиксирующая активность в ризосфере и на корнях небобовых растений / О.А. Берестецкий, Л.Ф. Васюк // Изв. АН СССР, серия биол. 1983 – с. 44–50.

3) В.Н. Нестеренко, Л.А. Карягина, Т.Б. Барашенко, Н.А. Михайловская, Н.А. Курилович, Г.В. Мороз. Штамм ассоциативных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* В-4485 для обработки семян зерновых культур и многолетних злаковых трав. 2002 – с.76-80.

4) Васюк, Л.Ф. Азотфиксирующие микроорганизмы на корнях небобовых растений и их практическое использование / Л.Ф. Васюк // Биологический азот в сельском хозяйстве СССР. 1989 – с. 88–98.

5) Волкогон, В.В. Эффективность бактеризации злаковых трав азоспириллами / В.В. Волкогон // Сельскохозяйственная биология. 1997 – с. 75–77.

6) .Стинхаунд И., О. Вандерлайден, Д. *Azospirillum*, свободноживущая азотфиксирующая бактерия, тесно связанная с травами: генетический, биохимический и экологический аспекты. FEMS микробиологические обзоры. 2000 – с.487-506.

7) Гомез М. М., Меркадо Э. К., Пинеда, Э.Г. *Azospirillum* ризобактерии с потенциальным использованием в сельском хозяйстве. Биологический журнал DES Сельскохозяйственные биологические науки. 2015 - с. 11-18.

8) Каннаян С. Биотехнология биодобровений. Alpha Science Int'l Ltd. 2002 - 3с.

9) Карягина, Л.А. Влияние микроорганизмов рода *Azospirillum* на урожайность многолетних злаковых трав / Л.А. Карягина, В.Н. Нестеренко // Весці АН БССР. 1988 – с. 79–82.

10) Лукин, С.А. Азоспириллы и ассоциативная азотфиксация у небобовых культур в практике сельского хозяйства / С.А. Лукин, П.А. Кожевин, Д.Г. Звягинцев // Сельскохозяйственная биология. 1987 – с. 51–58.

11) Майорова, Т.Н. Подходы к оптимизации интродукции азоспирилл /Т.Н. Майорова, П.А. Кожевин, Д.Г. Звягинцев // Микробиология. 1996 – с. 277–279.

12) Мальцева, Н.Н. Азотфиксирующая бактерия *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) в почве, ризосфере и ризоплане сельскохозяйственных растений / Н.Н. Мальцева, В.В. Волкогон // Микробиология. 1984 - с.6–8.

13) Михайловская, Н.А. Влияние минерального питания на эффективность бактеризации овсяницы луговой *Azospirillum brasilense* В-4485 / Н.А. Михайловская, Л.А. Юрко // Земляробства і ахова раслін.2005 – с. 15–16.

14) Михайловская, Н.А. Эффективность бактеризации ежи сборной *Azospirillum brasilense* В-4485 на дерново-подзолистой супесчаной почве / Н.А. Михайловская, Г.В. Жила, Л.А. Юрко // Почвенные исследования и применение удобрений. -Минск. 2004 – с. 217–222.

15) Н.А. Михайловская, Н.Н. Курилович, Л.Н. Лученок, Л.А. Юрко, С.В. Дюсова. Способ повышения продуктивности многолетних трав: пат. 8239 Респ. Беларусь; заявитель РУП

«Ин-т почвоведения и агрохимии» – № а 20010740// Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлект. уласнасці. 2006 – 82с.

16) Н.А. Михайловская. Активность азотфиксации и азотфиксирующие микроорганизмы ризосферы озимой ржи // Микробиологический журнал. 1992 - с. 10–16.

17) Н.А. Михайловская. Активность фосфатмобилизации у ризобактерий // Почвоведение и агрохимия. – 2007. – № 1(38). – С. 225–231.

18) Н.А. Михайловская. Эффективность бактериализации разных видов трав *Azospirillum brasilense* // Почвоведение и агрохимия. 2006 - с. 202–207.

19) Нестеренко, В.Н. Использование ассоциативных микроорганизмов для повышения урожайности ячменя и многолетних злаковых трав. / В.Н. Нестеренко. – Минск, 1993. – 23 с.

20) Нестеренко, В.Н. Корневые diaзотрофы небобовых культур в дерново-подзолистых почвах Белоруссии / В.Н. Нестеренко // Почвоведение и агрохимия. 1987 – с. 116–119.

21) Несцярэнка, В.М. Асацыятыўная азотфіксацыя у рызаплане небабовых раслін ва умовах Беларусі / В.М. Несцярэнка, Л.А. Карагіна // Весці АН БССР. 1986 – с. 36–39.

22) О.А. Берестецкий. Азотфиксирующая активность и эффективность спирилл, обитающих на корнях растений. Микробиология. 1985 – с. 1102–1104.

23) Умаров, М.М. Ассоциативная азотфиксация / М.М. Умаров. – М.: МГУ. 1986 – 132 с.

24) Хальчицкий, А.Е. Приживаемость и эффективность действия бактерий рода *Azospirillum* при инокуляции сельскохозяйственных растений/ А.Е. Хальчицкий. – Ленинград. 1989 – 16 с.

25) Barak R. Aerotactic response of *Azospirillum brasilense* // J. Bacteriol. 1982- c. 643–649.

26) Barak, R. Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense* / R. Barak, I. Nur, Y. Okon // J. Appl. Bacteriol. 1983 - c. 399–403.

27) Bashan, Y. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil / Y. Bashan // J. Gen. Micro- biol. 1986 - c. 3407–3414.

28) Dobereiner, J. Nitrogen fixing rhizocoenoses / J. Dobereiner, H. De Polli // Nitro- gen Fixation: Acad. Press, London. / Eds. W.D.P. Stewart and Y.R. Gallon. - London. 1980 - c. 301–333.

29) Fages, J. An individual view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology / J. Fages // Symbiosis. 1992 - c. 15–26.

30) Heinrich, D. Chemotactic attraction of *Azospirillum lipoferum* by wheat roots and characterization of some attractants / D. Heinrich, D. Hess // Can. J. Microbiol. 1985 - c. 26–31.

31) Holl, P.G. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense* / P.G. Holl, N.R. Kreig // Appl. Environ. Microbiol. 1984 - c. 433–435.

32) Kennedy, I.R. Biological nitrogen fi xation in non-leguminous fi eld crops: recent advances / I.R. Kennedy, Y. Tchan // Plant Soil. 1992 - c. 93–118.

33) Kennedy, I.R. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? / I.R. Kennedy, A.T.M.A.

Chouhury, M.L. Kecskes // Soil Biol. Biochem. 2004 - c. 1229–1244.

34) Michiels, K. Azospirillum - plant root associations: a review / K. Michiels, J. Vanderleyden, A. Gool // Biol. Fertil. Soils. 1989- c. 356–368.

35) Mikhailovskaya, N. The effect of seed inoculation by Azospirillum brasilense B-4485 on flax yield and its quality / N. Mikhailovskaya // Plant, Soil and Environment. 2006 - c. 402–406.

36) Moens S. Cloning sequencing and phenotypic analysis of laf1, encoding the flagellum of the lateral flagella of Azospirillum brasilense Sp. 7 // J. Bacteriol. 1995 - c. 5419–5426.

37) Okon, Y. Advances in agronomy and ecology of the Azospirillum/plant association. Nitrogen Fixation: Fundamentals and applications / Y. Okon // Kluwer Academic Publishers. - Netherlands. 1995 – 655c.

38) Okon, Y. Agronomic application of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation / Y. Okon, C.A. Labandera-Gonzalez // Soil Biol. Bio-chem. 1994 – c. 1591–1593.

39) Patriquin, D.G. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil / D.G. Patriquin, J. Dobereiner // Can. J. Microbiol. 1978 – c. 734–735.

40) Patriquin, D.G. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses / D.G. Patriquin, J. Dobereiner, D.K. Jain // Can. J. Microbiol. 1983 - c. 900–902.

41) Recent advances in BNF with non-legume plants / J.I. Baldani [et al.] // Soil. Biol. Biochem. 1997 - c. 911–912.

42) Reinhold, B. Stain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. / B. Reinhold, T. Hurek, I. Fendrik // *J. Bacteriol.* 1985 - c. 190–191.

43) Sadasivan, L. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145 / L. Sadasivan, C.A. Neyra // *J. Bacteriol.* 1987 - c. 1670–1671.

44) Schank S.C. Fluorescent antibody technique to identify *Azospirillum brasilense* associated with roots of grasses. *Soil Biol. Biochem.* 1979 - c. 287–295.

45) Sumner, M.E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation / M.E. Sumner // *Advances in Soil Science.* 1990 - 53 c.

46) Tal, S. Production of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. / S. Tal, Y. Okon // *Can. J. Microbiol.* 1985 - c. 608–609.

47) Tal, S. The regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* during balanced growth and starvation / S. Tal, P. Smirnoff, Y. Okon // *J. Gen. Microbiol.* 1990 - 1196 c.

48) Yoav Bashan, Gina Holguin, and Luz E. de-Bashan / *Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances.* 2003 - c. 765-766.

49) Zhulin I.B. // *J. Bacteriol.* Oxygen taxis and proton motive force in *Azospirillum brasilense*. 1996 - c. 5199–5200.

50) Zhulin, I.B. Motility, chemokinesis and methylation-independent chemotaxis in *Azospirillum brasilense* / I.B. Zhulin, J.P. Armitage // *J. Bacteriol.* 1993. - c. 952–953.