

VI открытый региональный конкурс исследовательских и проектных работ школьников «Высший пилотаж»

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение средняя общеобразовательная школа №71 г. Пензы

Биология (в рамках конкурса «Авангард»)

Влияние биопрепарата «Терразот» на основе *Azotobacter chroococcum* на начальные этапы онтогенеза ветреницы лесной (*Anemone sylvestris*) в условиях школьной лаборатории

Работу выполнила:
Илюхина Александра Александровна
ученица 8а класса
МБОУ СОШ №71 г. Пензы

Научный руководитель:
Суркова Оксана Евгеньевна,
учитель биологии
МБОУ СОШ №71 г. Пензы

Пенза, 2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИИ РОДА AZOTOBACTER (обзор литературы)	5
1.1 Характеристика бактерий рода <i>Azotobacter</i>	5
1.2 Физиологические и культуральные свойства	5
1.3 Влияние факторов внешней среды на азотобактер	6
1.4 Взаимодействие бактерий рода <i>Azotobacter</i> с высшими растениями	7
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	9
2.1. Биологические и экологические характеристики ветреницы лесной (<i>Anemone sylvestris</i>) как объекта исследования	9
2.2. Схема эксперимента	10
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	12
(экспериментальная часть)	12
ВЫВОДЫ	13
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	14
ПРИЛОЖЕНИЯ	16

ВВЕДЕНИЕ

Одна из важнейших задач развития человечества – сохранение **биологического разнообразия** планеты как основы его устойчивого существования. В связи с активной хозяйственной деятельностью человека часть видов растений оказалось в уязвимом положении, состояние их популяций вызывает тревогу [21]. Одним из механизмов сохранения генофонда **редких видов** растений является их **выращивание в культуре**. Большую работу в этом направлении проводит Пензенский ботанический сад имени И.И. Спрыгина, однако его возможности ограничены, в том числе и территориально. Поэтому создание коллекций редких растений **на пришкольных участках** – очень актуальная и практически значимая задача. Наряду с сохранением генофонда, это позволяет вести и **просветительскую деятельность** среди обучающихся школ и членов их семей в виде организации экскурсий на участке редких растений пришкольной территории, способствуя, таким образом, повышению уровня экологической культуры. В нашей школе (МБОУ СОШ №71) с 2021 г. организована работа по созданию участка редких растений – получен положительный опыт в отношении тюльпана Биберштейна (*Tulipa biebersteiniana*), рябчика русского (*Fritillaria ruthenica*). Однако посев семян (плодиков) ветреницы лесной на пришкольном участке не принёс положительных результатов, несмотря на учёт абиотических факторов, необходимых для произрастания вида.

На многих сельскохозяйственных культурах показано, что одним из негативных факторов, снижающих всхожесть семян в агроценозах, является их **неудовлетворительное микробиологическое состояние** – низкая биологическая активность, присутствие патогенных бактерий, спор и мицелия болезнетворных грибов. Для оптимизации начальных этапов онтогенеза культурных растений разрабатывают биопрепараты на основе **азотофиксирующих бактерий**, содержащих как штаммы азотфиксаторов, так и продукты их жизнедеятельности. К числу таких препаратов относится «Терразот». В ряде работ показана эффективность подобных биопрепаратов при инокуляции семян культурных растений [4, 7, 8, 9, 18]. Однако работы по изучению их влияния на прорастание семян природных видов, в том числе редких, отсутствуют.

Цель работы: установить влияние препарата «Терразот» на начальные этапы онтогенеза ветреницы лесной *Anemone sylvestris* в лабораторных условиях для разработки практических рекомендаций по использованию препарата, в том числе в условиях пришкольной территории МБОУ СОШ №71 г. Пензы.

Задачи:

1. По литературным данным изучить особенности *Azotobacter chroococcum* и механизмы взаимодействия с высшими растениями и почвенной микрофлорой.
2. Освоить методы проращивания семян растений в лабораторных условиях, методы статистической обработки.
3. Определить влияние предпосевной обработки семян (плодиков) и полива проростков ветреницы лесной биопрепаратом «Терразот» на всхожесть семян (плодиков) и ростовые процессы на начальных этапах онтогенеза.
4. Дать практические рекомендации по использованию биопрепарата «Терразот».

Актуальность исследования

Низкая всхожесть семян редких растений, в том числе ветреницы лесной, препятствует успешному культивированию. Оптимизация начальных этапов онтогенеза с помощью биопрепаратов на основе азотофиксирующих бактерий облегчит создание коллекций редких

растений на пришкольных участках с целью сохранения генофонда и экологического просвещения.

Практическая значимость исследования

Результаты работы содержат практические рекомендации по использованию биопрепарата «Терразот» для оптимизации начальных этапов онтогенеза редкого растения Пензенской области ветреницы лесной. Это может способствовать более активному использованию данного вида как декоративного растения для озеленения нашего города с использованием семян, полученных в Пензенском ботаническом саду имени И.И. Спрыгина. Это значимо как для сохранения генофонда редкого вида, так и для экологического просвещения пензенцев.

Объект исследования: ветреница лесная (*Anemone sylvestris* L.).

Предмет исследования: семена (плодики) и проростки ветреницы лесной (*Anemone sylvestris*) при использовании биопрепарата «Терразот».

Гипотеза: предпосевная обработка семян (плодиков) ветреницы лесной и полив проростков биопрепаратом «Терразот» может повысить всхожесть семян и ускорить ростовые процессы проростков за счёт подавления патогенной микрофлоры в зоне ризосферы, выделения *Azotobacter chroococcum* стимулирующих рост веществ и нормализации азотного обмена.

ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИИ РОДА AZOTOBACTER (обзор литературы)

1.1 Характеристика бактерий рода *Azotobacter*

Azotobacter – род бактерий, живущих в почве и способных в результате процесса азотфиксации переводить газообразный азот в растворимую форму, доступную для усваивания растениями [23].

Первый представитель рода, *Azotobacter chroococcum*, был открыт и описан в 1901 году голландским микробиологом и ботаником, одним из основоположников экологической микробиологии Марином Бейеринком.

Для бактерий рода *Azotobacter* характерны относительно крупные клетки овальной формы, диаметром 1,0–2,0 мкм, плеоморфные, от палочковидных до кокковидных. Могут располагаться одиночно, парами или группами неправильной формы, иногда в виде цепочек разной длины. Эндоспор не образуют, но формируют цисты [14].

В свежих культурах клетки подвижны за счет многочисленных перитрихально расположенных жгутиков и имеют форму утолщенных палочек с овальными концами. В более поздних культурах клетки теряют подвижность, укорачиваются, принимая почти кокковидную форму и продуцируют толстый слой слизи, формирующий капсулу клетки [6].

1.2 Физиологические и культуральные свойства

Основным физиологическим свойством бактерий рода *Azotobacter* является, прежде всего, резко выраженная способность усваивать молекулярный азот наряду со связанными его формами, синтезировать широкий спектр биологически активных веществ (витамины группы В, фитогормоны) и фунгициды [10].

Размер азотонакопления штаммоспецифичен: различают активные и пассивные культуры. Большинство культур азотобактера усваивают не более 10 мг молекулярного азота на 1 г потребленного источника углерода. Фиксация азота зависит от наличия ионов молибдена, отсутствие молибдена может быть частично замещено ионами ванадия. В качестве источников азота могут использовать нитраты, ионы аммония и аминокислоты. Отдельные штаммы *Azotobacter chroococcum* фиксировали до 15 мг азота на 1 г потребленной глюкозы [12].

Источником углерода и энергии для азотобактера могут служить разнообразные органические кислоты жирного и ароматического ряда, одно- и многоатомные спирты и сахара [6].

На плотных питательных средах представители рода образуют плоские, слизистые колонии пастообразной консистенции диаметром 5-10 мм, в жидких питательных средах образуют пленки. Старение культур азотобактера сопровождается образованием пигмента, поэтому в зависимости от вида колонии могут быть окрашены в темно-коричневый, зеленый цвет или же могут быть бесцветными. Пигментообразование и интенсивность цвета зависят также от состава питательной среды и условий роста культуры [3, 12].

1.3 Влияние факторов внешней среды на азотобактер

Значение рН среды. Азотобактер чрезвычайно требователен к реакции среды. Бактерии этого рода тяготеют к нейтральным почвам и плохо переносят подкисление [6, 11, 12, 16].

Зона рН, при котором происходит развитие азотобактера, может несколько смещаться в зависимости от состава среды и других факторов. Так на связанном азоте азотобактер может расти в более кислой среде, чем на молекулярном азоте. Можно считать, что азотобактер способен развиваться на средах, имеющих диапазон рН от 4,5 до 9,0. Однако процесс азотфиксации происходит в более узком интервале 5,5-7,2 (иногда 7,7). Штаммы азотобактера, выделяемые из почв с разными значениями рН, по данным многих исследователей, по-разному реагируют на рН питательной среды [14].

Повышенная кислотность и щелочность отрицательно сказывается на интенсивности потребления энергетического материала и продуктивности азотфиксации. Физиологические и биохимические процессы протекают весьма неравномерно: чрезвычайно слабо в сильнокислой среде (рН 5,05-5,29), удовлетворительно в слабокислой и сильнощелочной (рН 5,8 и 9,12), относительно хорошо при рН 8,05-8,29 и наиболее интенсивно при 7,2-7,4 [1, 6, 12].

Уровень аэрации. Данный микроорганизм является аэробом. Аэрация способствует размножению азотобактера [11]. Вместе с тем установлено, что азотобактер может размножаться и в микроаэрофильных условиях. При слишком высоком уровне аэрации может наблюдаться уменьшение накопления биомассы.

Влажность. Азотобактер предъявляет высокие требования к влажности почвы [11, 12]. Глубина проникновения азотобактера в почву также определяется в значительной степени обеспеченностью почвы влагой [6, 12].

Температура. В отношении температуры азотобактер является типичным мезофилом с оптимумом в 25°-30°С [6, 12]. Понижение температуры азотобактер переносит хорошо, и поэтому в зимний период, даже в северных широтах, численность его клеток заметно не уменьшается. Вегетативные клетки азотобактера не выносят высокие температуры. Даже пятиминутное прогревание культуры при 40°С приводит к гибели до 15-20% клеток, при 50°С отмирание клеток составляет до 30%. При увеличении экспозиции прогревания до 30 мин практически не оставалось жизнеспособных клеток [6]. Положение оптимальной температурной точки развития может несколько меняться в зависимости от состава и рН среды.

Минеральный состав почвы. Большое влияние на развитие азотобактера в почве и азотфиксацию оказывает минеральный состав почвы. Так, недостаток фосфора ингибирует рост и снижает жизнеспособность *Azotobacter chroococcum*. Может нарушаться структура клеточной стенки и, на примере *Azotobacter vinelandii*, было показано, что клетки становятся неспособными формировать цисты.

Отличительной особенностью бактерий рода *Azotobacter* является их высокая требовательность к наличию в среде микроэлементов. Совершенно необходим для большинства культур молибден, так как он играет ключевую роль в усвоении молекулярного азота [11].

Железо играет важную роль в процессе дыхания и фиксации молекулярного азота. Железо входит в состав многих ферментов и ферментных систем. Ферредоксин содержит 1-3% железа.

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

Соединения бора стимулируют размножение азотобактера и процесс фиксации азота [12].

Марганец может в некоторой степени заменить потребность азотобактера в магнии.

Медь необходима азотобактеру для образования пигмента.

На развитие азотобактера значительное влияние оказывает характер вносимых удобрений. Как правило, органические и фосфорные минеральные удобрения стимулируют размножение азотфиксаторов, а азотные минеральные удобрения нередко подавляют их рост.

Азотобактер достаточно требователен к условиям среды обитания, что может быть использовано для индикации агрономических качеств почв. Согласно наблюдениям свободноживущий азотфиксирующий *Azotobacter chroococcum* чрезвычайно чувствителен к токсичным веществам, накапливающимся в почве. Применение отдельных пестицидов может иметь значительный эффект на продукцию витаминов почвенной и ризосферной микрофлорой, и, следовательно, изменять взаимоотношения растение-микроорганизм. Активно исследовался характер влияния различных пестицидов на микрофлору на примере азотфиксаторов [11, 12, 18, 23].

Биологические факторы. Из биологических факторов, влияющих в почве на физиологическое состояние азотобактера, следует, прежде всего, отметить почвенные микроорганизмы и растения. Они могут влиять на жизнеспособность азотобактера в почве косвенным путем, изменяя рН, окислительно-восстановительные условия и непосредственно, вырабатывая питательные и биологически активные вещества.

Отмечено активирующее влияние целлюлозоразрушающих, маслянокислых и других почвенных микроорганизмов [11, 12, 19]. У азотобактера обнаружены бактерии-спутники, которые часто содержатся в слизи, и являются загрязнителями чистых культур (*Rhizobium radiobacter*). Обнаружен стимулирующий эффект в отношении азотобактера некоторых бактерий родов *Pseudomonas*, *Mycobacterium*. Сильными антагонистами являются *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, грибы родов *Penicillium* и *Aspergillus*. Среди почвенных микроорганизмов плесневые грибы составляют основную массу активных антагонистов. Большинство актиномицетов стимулировало развитие азотобактера [6].

Было установлено, что азотобактер способен вырабатывать фунгистатическое вещество, относящееся к группе анисомицина [3, 11]. Культура *Azotobacter chroococcum* способна продуцировать противогрибковый полиеновый антибиотик азохроомицин, активный против значительного числа фитопатогенных грибов. Показана способность задержки роста фитопатогенных бактерий и фитопатогенных грибов, некоторыми штаммами азотобактера, стимулирующих прорастание семян огурцов [4].

1.4 Взаимодействие бактерий рода *Azotobacter* с высшими растениями

Прикорневое развитие азотобактера происходит в разных климатических зонах и в ризосфере различных растений (древесные породы, плодовые деревья, кустарники и прочее). Количество в 1 г почвы от нуля до нескольких сотен миллионов клеток.

Развитие азотобактера происходит в зоне корня растений и предполагает улучшение азотного питания в почве, особенно при стимулировании размножения азотобактера. При некоторых условиях среды бактерии рода *Azotobacter* улучшают рост растения. Положительный результат можно объяснить способностью синтезировать биологически активные вещества, стимулирующие ферментативные процессы в корне и стимулировать начальные этапы синтеза азотсодержащих органических соединений, ускоряющих прорастание семян [7].

Синтез азотобактером ростовых веществ, может иметь существенное значение для растений, произрастающих в условиях недостаточной влажности. Инокуляция азотобактером улучшает развитие корневой системы и водного режима растений, повышает поглощение

минеральных элементов почвы [7]. Бактеризация семян растений огурца суспензией *Azotobacter vinelandii* стимулирует их прорастание .

Азотобактер является достаточно активным продуцентом индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) [7, 22], являющейся важнейшим гормоном растений, регулирующим широкий спектр физиологических реакций. Многочисленные исследования показывают, что инокуляция азотобактером повышает урожайность растений [11, 12] за счёт лучшего развития корневой системы, повышения поглощения минеральных элементов почвы и улучшение водного режима растений [7]. Дополнительной причиной интереса к этим микроорганизмам является способность синтезировать экзополисахариды, которые находят применение в пищевой промышленности. Капсульный полисахарид является хорошим адсорбентом ионов тяжелых металлов из раствора.

В эксперименте по влиянию предпосевной инокуляции семян клевера паннонского (*Trifolium pannonicum* Jacq.) различными комбинациями биоагентов, обладающих ростстимулирующими, ризогенными, антагонистическими способностями, показало, что низкое содержание азотфиксаторов в ризосфере сдерживает прорастание семян клевера [18].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Биологические и экологические характеристики ветреницы лесной (*Anemone sylvestris*) как объекта исследования

Ветреница лесная (семейство Лютиковые) – многолетнее травянистое растение с коротким (1,5-2,0 см) вертикальным или косолежащим корневищем, несущим придаточные корни; корнеотпрысковое. У взрослого растения корневище нарастает симподиально, побеги возобновления развиваются по двух- или трехлетнему типу: в первый год надземной жизни побег развивается как розеточный, образуя два зеленых листа. В точке роста к концу вегетации закладывается цветonoсный побег со своим листовым аппаратом и зачатком цветка; в это же время вегетируют побеги следующего поколения (дочерние) и заложены почки еще одного поколения (внучатые).

Листья цветоноса и розеточных побегов дланевидно-рассеченные, с долями, в свою очередь разделенными на три ромбических надрезанно-зубчатых сегмента. Листья и особенно верхняя часть цветоноса с густым войлочным опушением.

Цветок одиночный, 3,5-7,0 см в диаметре; листочки околоцветника в числе 5 (редко больше), белые, снаружи пушистые, характерна энтомофиллия. Продолжительность жизни отдельного цветка составляет 6-15 суток. Плод – многоорешек. Плодики овальные, 3-4 мм длиной с коротким носиком, опушены тонкими волосками, причем кольцо более длинных курчавых волосков расположено у основания носика. Опадающие плодики обычно соединены в пушистые комки, которые могут переноситься ветром, но, вероятно, не отлетают далеко от материнского растения. Ко времени опадения плодика зародыш семени сформирован, хотя имеет очень маленькие размеры и погружен в массу эндосперма. Хромосомное число – 16 [17].

Онтогенез ветреницы довольно хорошо изучен в природных условиях. **Семена** (плодики) ветреницы лесной имеют короткий период созревания и через 1-1,5 месяца после опадения плодиков в благоприятных условиях могут прорасти. В природе прорастающие плодики обнаруживаются в сентябре. Прорастание надземное. Проростки имеют по две плоские зеленые семядоли, вслед за которыми вскоре появляется два-три трехлопастных зеленых листа. Главный корень проростка хорошо отличим от красноватого гипокотилия. К зиме семядоли и первые листья засыхают, а на гипокотиле появляются придаточные корни. Весной точка роста сеянца формирует новую розетку из 2-3 листьев. У ювенильного растения в последующие годы идет постепенное нарастание вертикального моноподиального корневища, ежегодно образующего листовую розетку и несколько придаточных корней, выполняющих, контрактильную функцию. Главный корень отмирает на третий – пятый годы жизни растения. К этому времени листья розетки, приобретают форму, свойственную взрослым особям, однако доли их менее расчленены (имматурные растения). После перехода в генеративное состояние корневище образует цветонос и возникают боковые побеги возобновления – корневище переходит к симподиальному нарастанию. Вследствие бокового положения побегов возобновления рост корневища становится все более наклонным.

У молодых генеративных растений цветение бывает не ежегодным, корневище почти вертикальное. Более мощно развитые (средневозрастные генеративные) растения цветут ежегодно, обычно образуются по два побега возобновления у основания цветоноса, следовательно, корневище ветвится, начинается образование куста. В этот период могут возникать отпрыски на крупных корнях; обычно они оказываются на расстоянии 5-10 см от материнского растения. У стареющих растений начинается распад кустов вследствие отмирания

нижней части разветвленного корневища. К этому времени цветение становится не ежегодным или совсем прекращается, так что большинство обособившихся побегов нарастает моноподиально — это розеточные побеги, с косо и в разных положениях лежащими корневищами. Листья у таких старых вегетативных особей отличаются более короткими черешками, нередко пластинки неправильной, не типичной формы. В культуре растение зацветает на второй год жизни; генеративный период длится не более 10-12 лет. Отпрыски, возникающие на корнях генеративных особей, оказываются сильно омоложенными и переходят к цветению только после нескольких лет вегетации, что значительно увеличивает продолжительность большого жизненного цикла [17].

Сезонный ритм развития ветреницы изучен как в природе, так и в культуре. Весенняя вегетация растения начинается сразу после схода снега. Цветение в условиях лесостепи с 15 мая по 5 июня; плодоношение с 21 июня по 3 июля; отмирание листьев на цветоносах – около 20 июня; полное усыхание генеративных побегов – к 22 августа. В культуре (Пензенский ботанический сад) отмечено практически ежегодное вторичное цветение в августе – сентябре.

Местообитания растения в пределах его обширного ареала разнообразны: светлые сосновые леса и осветленные нагорные дубравы, сухие луга, степи, горные открытые склоны и кустарники; растение, по-видимому, тяготеет к легким песчаным или известковым почвам. По сравнению с лесными видами ветрениц оно обладает большей устойчивостью к сухости почвы и воздуха, к солнечному нагреву. В Нечерноземной полосе отмечается приуроченность к известковым почвам. Фитоценотические связи еще менее ясны: растение встречается в самых различных фитоценозах, но доминирующей роли нигде не играет, являясь ассектатором в различных ценозах.

В Пензенской области встречается на сухих открытых или слабо затененных склонах, по опушкам лесов, в кустарниковых и луговых степях. Мезофит, использующий преимущественно весеннюю влагу, неустойчив к вытаптыванию. Размножается семенами и вегетативно – корневыми отпрысками. Цветет в мае – июне [21].

Ветреница лесная в Пензенской области – редкое растение (категория 3). Лимитирующими факторами являются сукцессионные смены светлых лесов на леса теневого типа, вырубка лесов, распашка земель, рекреационная нагрузка в окрестностях городов, сбор растений. Среди необходимых мер охраны называются не только введение заповедного режима в местах произрастания (ГПЗ «Приволжская лесостепь» на участках «Кунчеровская лесостепь», «Попереченская степь», «Островцовская лесостепь», памятник природы «Урочище Лысая гора»), но и более широкое введение вида в культуру в связи с высокими декоративными свойствами вида.

2.2. Схема эксперимента

Исследования проводились в лабораторных условиях МБОУ СОШ №71 г. Пензы осенью 2023 года. Посевной материал (плодики ветреницы лесной осенней генерации 2023 года) были предоставлены Пензенским ботаническим садом имени И.И. Спрыгина.

Проращивание семян производили в контейнерах объемом около 750 мл (138x102x85 мм), на 2/3 заполненных смесью из чернозема и грунта марки «Наша дача. Цветочная поляна» (торф низинный, торф верховой, песок, известняковая (доломитовая мука), комплексное минеральное удобрение Азофоска с содержанием макроэлементов: N – 300, P – 30, K – 350 мг/л; pH 5,5-6,5) и увлажнили до величины 70-80% от полной влагоемкости.

Эксперимент проводили в 4-х вариантах и в 4-х биологических повторностях (по 24 семени (плодика) в каждой).

Варианты эксперимента:

1. Контроль («Вода + вода») – замачивание семян (плодиков) в дистиллированной воде на сутки, полив прорастающих семян дистиллированной водой раз в 3 дня.

2. Вариант «Терразот +Терразот» – замачивание семян (плодиков) в биопрепарате «Терразот» (10 мл препарата + 10 мл воды) и полив прорастающих семян биопрепаратом «Терразот» в концентрации, рекомендуемой производителем.

3. Вариант «Вода + Терразот» – замачивание семян (плодиков) в дистиллированной воде, полив прорастающих семян биопрепаратом «Терразот» в концентрации, рекомендуемой производителем.

4. Вариант «Терразот + вода» – замачивание семян (плодиков) в биопрепарате «Терразот» (10 мл препарата + 10 мл воды) и полив прорастающих семян водой.

Посев замоченных семян был произведен 10.10.2023 на глубину 0,5 см. Выращивали при температуре 20°C и естественном освещении.

Биопрепарат «Терразот» – культура ассоциативного азотофиксатора *Azotobacter chroococcum* в концентрации на момент окончания срока хранения 1×10^6 КОЕ/мл м культуральная жидкость, состав которой производителем не указан. Производитель: «Защита АгроСоюз», г. Курск.

Результаты измерений статистически обработаны. **Статистическая обработка** результатов опытов заключалась в определении среднего арифметического (меди) и ошибки репрезентативности.

Для расчётов использовали следующие формулы:

$$M = \frac{\sum a}{n} ; \quad \sigma = \sqrt{\frac{\sum (a - M)^2}{n}} ; \quad m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} .$$

где M – среднее арифметическое; a – отдельное измерение; $\sum a$ – сумма отдельных измерений; n – число измерений; σ – среднее квадратичное отклонение; m – ошибка среднего.

Достоверность различий между медиями оценивалась по критерию Стьюдента при 5%-ном уровне существенности.

Математическую обработку и представление данных в виде диаграмм выполняли с применением программы Microsoft Excel.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ (экспериментальная часть)

В результате эксперимента по проращиванию семян (плодиков) ветреницы лесной установили, что прорастание надземное – эпикотиль трогается в рост и выносит на поверхность 2 семядольных листа. Семена прорастают без стратификации.

Замачивание семян (плодиков) ветреницы лесной в препарате «Терразот» ускоряет их прорастание. Во всех трёх опытных вариантах проростки появились на 13 день после посева – 23 октября. В контроле – на 3 дня позже – 26 октября.

Таблица 1. Всхожесть семян (плодиков) ветреницы лесной

Варианты опытов	23.10	26.10	9.11	13.11
1. Контроль (вода+вода)	0,0±0,0	25,3±7,9	56,3±2,8	56,3±2,8
2. Терразот+Терразот	19,5±6,1	62,5±4,5	64,8±5,2	65,8±6,1
3. Терразот+вода	7,0±3,4	36,5±6,0	57,0±1,0	57,0±1,0
4. Вода+Терразот	4,0±1,6	22,8±2,8	47,0±3,4	47,0±3,4

В контрольном варианте прорастание плодиков ветреницы лесной растянутое – около 2 недель с момента появления первых проростков: на 16 день после посева всхожесть составила около 25%, спустя месяц – около 56%. Обработка плодиков препаратом азотобактера повышает дружность всходов: в варианте «Терразот+Терразот» уже на третий день с момента появления первых всходов всхожесть составила около 63%. В варианте «Терразот+вода» этот эффект был менее выражен, а в варианте «Вода+Терразот» – отсутствовал.

Наблюдаемый эффект стимулирования прорастания ветреницы лесной при замачивании в препарате азотобактера может быть связан в первую очередь с формированием на поверхности плодика, а в дальнейшем – на поверхности корневой системы – в зоне ризосферы – благоприятной почвенной микрофлоры как из самого азотобактера, так и из ассоциированных с ним бактерий. Эта прикорневая микрофлора конкурирует с гнилостными, болезнетворными микроорганизмами, повышая иммунитет самой уязвимой стадии развития растений. Кроме того, эти азотофиксаторы и связанные с ними микроорганизмы, обеспечивающие «конвейер» азотного почвенного цикла, могут выделять биологически активные вещества, способствующие росту проростка. Определённую положительную роль может играть и дополнительная азотная подкормка в виде аммонийных ионов, но в целом в семени присутствует запас питательных веществ, в том числе азотосодержащих, для обеспечения потребностей растения азотом в начальный этап жизни.

В целом итоговая всхожесть плодиков ветреницы лесной спустя месяц после посева в вариантах «Терразот+Терразот», «Терразот+вода» и «Вода+Терразот» достоверно не отличалась от контроля, но различия в скорости прорастания и дружности всходов в природных условиях могут играть огромное значение для приживаемости проростков, повышения их конкурентоспособности.

Для практического использования можно порекомендовать вариант с замачиванием семян биопрепаратом «Терразот» и последующим поливом раз в 3 дня. Наименее эффективен опытный вариант «Вода+Терразот», то есть полив препаратом азотобактера каждые 3 дня без замачивания в нём семян. Видимо, это связано с тем, что положительное влияние препарат оказывает,

находясь непосредственно в зоне ризосферы, чего невозможно добиться поливом, так как она формируется в тот момент, когда трогается в рост главный корень, начинается его ветвление. В почве (или в почвогрунте, как в условиях нашего эксперимента) уже существует собственная автохтонная микрофлора, с которой вынуждены конкурировать привносимые в неё с препаратом бактерии азотобактера. Скорее всего, их конкурентоспособность низкая, так как в естественных условиях бактерии образуют определённые сообщества, связанные трофическими взаимоотношениями.

Результаты морфометрии проростков приведены в таблице 2.

Таблица 2. Морфометрия проростков ветреницы лесной

Признаки	Контроль (вода+вода)	Терразот+ Терразот	Терразот+ вода	Вода+ Терразот
Длина корня, см	1,2±0,2	1,4±0,1	1,2±0,2	1,3±0,2
Длина листа (с черешком), см	2,3±0,1	1,8±0,1*	2,2±0,1	1,7±0,2*
Длина листовой пластинки, мм	1,7±0,2	2,0±0,3	1,8±0,2	1,6±0,7
Ширина листовой пластинки, мм	1,6±0,1	1,8±0,7	1,6±0,2	1,7±0,7
Количество листьев (семядольных и настоящих)	2,2±0,1	2,2±0,1	1,7±0,1	1,9±0,1

* – указатель достоверности сравниваемых параметров при 5%-ном уровне существенности.

Анализ морфометрических параметров проростков ветреницы, выросших в разных вариантах эксперимента, не позволяет сделать какие-то однозначные выводы о влиянии обработки азотобактером на ростовые процессы. По средней длине корня 3-х недельные проростки ветреницы лесной в контрольном и опытных вариантах достоверно не отличались (длина корня варьировала от 1,2 до 1,4 см). Длина листа в вариантах «Терразот+Терразот» и «Вода+Терразот» была на 26–22% меньше, чем в контроле, что можно оценивать как более сбалансированное развитие надземной и подземной сферы проростков.

Таким образом, по результатам эксперимента мы рекомендуем использовать биопрепарат «Терразот» для ускорения прорастания семян (плодиков) ветреницы лесной путём инокуляции семян (плодиков), которая достигается их замачиванием (на 100 семян – 10 мл препарата и 10 мл дистиллированной воды) на сутки с последующим поливом.

Эксперимент по формированию коллекции редких растений на пришкольном участке МБОУ СОШ №71 (включение в состав коллекции ветреницы лесной) будет продолжен весной 2024 г. с учётом полученных результатов.

ВЫВОДЫ

1. По литературным данным изучена биология и экология азотфиксаторов рода *Azotobacter*, установлено положительное влияние на рост и развитие высших растений путём оптимизации почвенной микробиоты (подавления активности болезнетворных микроорганизмов) и выделения биологически активных веществ (гормонов), стимулирующих физиологические процессы.

2. Освоены методы определения лабораторной всхожести семян, методы статистической обработки.

3. Установлено положительное влияние предпосевной обработки семян (плодиков) ветреницы лесной и полива проростков биопрепаратом «Терразот» на скорость прорастания и дружность всходов.

4. Даны практические рекомендации по использованию биопрепарата «Терразот» для ветреницы лесной. Наиболее экономичным и эффективным является замачивание семян в препарате на сутки с последующим поливом 1 раз в 3 дня (при температуре воздуха 20°C).

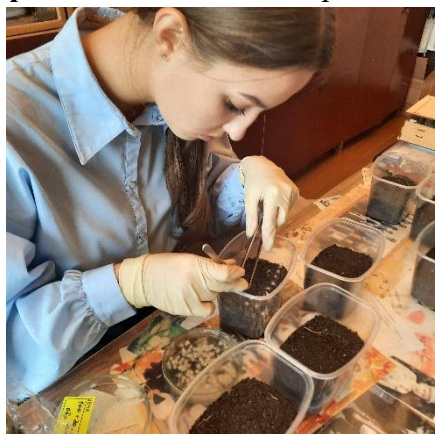
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дарзник Ю.О. О скорости размножения клеток азотобактера// Микробиология. 1982. Т. 30, № 6. С. 1042 – 1044.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Колос, 1985. 416 с.
3. Зайцева Г.Н. Биохимия азотобактера. М.: Наука, 1965. 304 с.
4. Закирьяева С.И. Антифунгальная активность рода *Azotobacter* по отношению к фитопатогенным грибам // *Universum: химия и биология*. 2021. № 1-2 (79). С. 11-13
5. Зенова Г.М., Степанов А.Л., Лихачева А.А. и др. Практикум по биологии почв. М., 2002. 120 с.
6. Колешко О.И. Азотфиксирующие бактерии (физиология развития). Минск, 1981. 109 с.
7. Кравченко Л.В., Леонова Е.И. Использование триптофана корневых экзометаболитов при биосинтезе индолил-3 -уксусной кислоты ассоциативными бактериями// Микробиология. 1993. Т.62. Вып. 3. С. 453-459.
8. Курдиш И.К., Бега З.Т., Гордиенко А.С., Дырченко Д.И. Влияние *Azotobacter vinelandii* на прорастание семян растений и адгезия этих бактерий к корням огурцов // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т.44, №4 С. 47
9. Логинов Я.О., Мелентьев А.И., Логинов О.Н., Силищев Н.Н., Гатауллин А.Г., Дубинина О.Н., Хуснаризанова Р.Ф., Черняева Н.Ю. Влияние бактерий *Azotobacter vinelandii* ИБ-1 и препарата «Азопол» на его основе на макроорганизм // Токсикологический вестник. 2008. № 3 (90). С. 41-43.
10. Мишке И.В. Микробные фитогормоны в растениеводстве. Рига, 1988. 152 с.
11. Мишустин Е.Н. Ассоциации почвенных микроорганизмов. М.: Наука, 1975. 108 с.
12. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. Биологическая фиксация атмосферного азота. М.: Наука, 1968. 306 с.
13. Никитенко Г.Ф. Опытное дело в полеводстве. Москва: Россельхозиздат, 1982. – 190с.
14. Определитель бактерий Берджи. Т. 2: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоула, Крига Н., Снита П. и др. М.: Мир, 1997. 368 с.
15. Пискунов А.С. Методы агрохимических исследований. М.: КолосС, 2004. 312 с.
16. Современная микробиология. Прокариоты / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005. 1152 с.
17. Старостенкова М.М. Род Ветреница. Биологическая флора московской области. / Под ред. Работнова Т.А. Выпуск 3. М.: Изд-во Московского университета, 1976. С. 119-138
18. Степанов П.Д. Влияние предпосевной инокуляции семян клевера паннонского на развитие азотобактера в почве // Знания молодых – будущее России. Сборник статей XXI Международной студенческой научной конференции. Киров, 2023. С. 218-221.
19. Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация. М.: Наука, 1986. 133 с.

20. Федина М.А. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. М., 1985. – 267 с.
21. Чистякова А.А. Горбушина Т.В. Ветреница лесная. Красная книга Пензенской области. Пенза, 2013. С. 184.
22. Шарма П.К., Чахал В.П. Влияние акцепторов аминокрупп на образование азотобактером ИУК из триптофана // Микробиология. 1986. Т.55. Вып.5. С. 1040-1043.
23. Шлегель Г. Микробиология. М.: Мир, 1987. 403 с.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Этапы проведения эксперимента



Приложение 2. Проростки ветреницы лесной



Контроль («Вода + вода»)



Вариант «Терразот + Терразот»



Вариант «Вода + Терразот»



Вариант «Терразот + вода»

РЕЦЕНЗИЯ

на работу ученицы 8а класса МБОУ СОШ №71 г. Пензы
Илюхиной Александры Александровны
«Влияние биопрепарата «Терразот» на основе *Azotobacter chroococcum* на
начальные этапы онтогенеза ветреницы лесной (*Anemone sylvestris*) в
условиях школьной лаборатории»

Работа представляет собой результат научно-исследовательской работы ученицы 8а класса Александры Илюхиной, выполненной под руководством учителя биологии высшей категории Сурковой Оксаны Евгеньевны.

Данное исследование посвящено одной из актуальнейших тем – сохранению редких видов растений в условиях культуры. Эта работа – один из шагов к достижению очень значимой цели – созданию на пришкольном участке МБОУ СОШ №71 коллекции редких растений, которое было начато 2 года назад и уже имеет положительные результаты. Важность такой работы трудно переоценить. Территория школы является центром культурной и общественной жизни микрорайона «Северная поляна», поэтому коллекция редких растений может оказать значительное влияние на уровень экологической культуры учащихся и членов их семей.

Работа Александры Илюхиной направлена на включение в коллекцию редкого вида растений Пензенской области ветреницы лесной *Anemone sylvestris*. Посев семян, полученных из Пензенского ботанического сада в 2021 и 2022 гг., на делянки пришкольного участка оказался нерезультативным, несмотря на то, что в лабораторных условиях семена показывали довольно высокую всхожесть. Для выявления возможных причин этого и оптимизации начальных этапов онтогенеза проростков ветреницы лесной, автор работы и её научный руководитель решили оценить возможность использования бактериального биопрепарата «Терразот». Как известно, в природных сообществах растения включены в сложный комплекс взаимоотношений с различными живыми организмами, среди которых важную роль играют почвенные бактерии – азотфиксаторы. Низкая биологическая активность почвогрунтов пришкольного участка может быть причиной угнетения проростков – самой уязвимой стадии жизненного цикла растений, а биопрепарат на основе азотфиксирующих бактерий может оказать благоприятное действие на процесс прорастания.

Работа содержит ~~информативный~~ для школьной работы обзор литературы по вопросам влияния азотфиксаторов рода *Azotobacter* на

продуктивность высших растений и раскрывает разнообразные механизмы такого действия.

Грамотно написана глава, характеризующая объект исследования и описывающая схему эксперимента. Он организован по всем требованиям, предъявляемым к подобным работам. Контроль подобран так, что сравнение опытных вариантов корректное.

Для подтверждения данного предположения Александра Илюхина организовала лабораторный эксперимент в 4-х вариантах, один из которых был контрольным. Сравнивалась предпосевная обработка семян ветреницы, полив биопрепаратом проростков и сочетание этих агротехнических приёмов на всхожесть семян и рост проростков ветреницы. Каждый вариант был представлен в 4 биологических повторностях, что позволило провести статистическую обработку полученных данных и сформулировать достоверные обоснованные выводы.

Эксперимент позволил выявить стимулирующее действие предпосевной обработки семян на дружность всходов в сочетании с поливом биопрепаратом «Терразот». Рассуждения автора о причинах стимулирующего влияния обоснованы.

Большую ценность работе придают практические рекомендации, разработанные автором по итогам эксперимента.

Очень важно продолжить эксперимент в полевых условиях, чтобы проследить, проявятся ли выявленные в лабораторных условиях закономерности и поможет ли биопрепарат «Терразот» успешно интродуцировать на пришкольном участке это редкое и весьма декоративное растение. Таким образом, тема очень перспективна.

Таким образом, работа Александры Илюхиной представляет собой результат законченного исследования, организованного с соблюдением принятых в исследованиях такого рода методов. Выводы логичны, базируются на обработке значительного объёма фактического материала, их достоверность не вызывает сомнений. Работа заслуживает внимательного прочтения и высокой оценки.

Кандидат биологических наук,
доцент кафедры ОБиБ ПГУ



Фатюхина Ю.А.