

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК
КАФЕДРА БИОТЕХНОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

**ЭПИФИТНАЯ МИКРОФЛОРА РЕДКИХ
ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ – ГИНКГО И
МЕТАСЕКВОЙЯ**

Выпускная квалификационная работа

обучающегося по направлению подготовки

19.03.01 Биотехнология

очной формы обучения,

группы 07001316

Поклад Татьяны Анатольевны

Научный руководитель
профессор кафедры биотехнологии и
микробиологии, к.б.н. Сиротин А.А.

БЕЛГОРОД 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. Эпифитная микрофлора растений.	7
1.2. Взаимоотношения микроорганизмов с растениями.	8
1.3. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы.	14
1.4. Взаимоотношения между микроорганизмами.	17
1.5. Эпифитные микроорганизмы на поверхности растений.	19
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	20
2.1. Методика смывов с поверхности растений.....	20
2.2. Методика разведения.	21
2.3. Методика приготовления необходимых питательных сред.....	22
2.4. Методика количественного учета микроорганизмов на поверхности листьев.	23
2.5. Методика выделения в чистую культуру бактерий.	25
2.6. Методика статистической обработки.....	26
ГЛАВА 3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЭПИФИТНОЙ МИКРОФЛОРЫ ГИНКГО И МЕТАСЕКВОЙИ В ДИНАМИКЕ ПО СЕЗОНАМ	27
3.1. Приготовление необходимых питательных сред.	28
3.2. Постановка эксперимента.	29
3.3. Анализ эпифитной микрофлоры растений гинкго и метасеквойи в динамике по сезонам.....	30

3.4. Статистическая обработка цифровых данных.	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ	50
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.	52
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	56

ВВЕДЕНИЕ

Изучение взаимоотношения микроорганизмов и высших растений – это одна из главных проблем микробиологии. Так, исследуя разные стороны таких взаимоотношений, был выдвинут на одно из первых мест вопрос о том, как влияют микроорганизмы на разные виды растений через вещества, которые они выделяют. К настоящему времени доказано положительное влияние многих корневых и почвенных микроорганизмов - стимуляторов, которые благодаря продуктам жизнедеятельности улучшают рост растений [4, 13]. Также относительно мало было исследовано, как влияют на рост и урожай растений основные виды микрофлоры филлосферы, хотя в течение всего вегетационного периода, она находится в теснейшем контакте с растением. Так, многие стороны взаимоотношений эпифитных микроорганизмов с растениями далеко не полностью изучены. К ним могут относиться такие факторы, которые определяют, как происходит формирование на поверхности растений полезных микробиоценозов, и условия, оказывающие свое влияние на взаимосвязь микроорганизмов с растениями.

Исследована всего лишь малая часть таких очень важных вопросов: каким образом происходит формирование микробиоценозов нормальной микрофлоры поверхности растений в зависимости от физиологического состояния последних, от взаимоотношений микроорганизмов в биоценозах, а также какую роль играют пестициды во взаимоотношениях микроорганизмов с высшими растениями и, как бороться с заболеваниями хвойных деревьев, которые вызывают фитопатогенные грибы, что приводит к ослаблению взрослых растений. Они могут создавать большую опасность, особенно для семян, ввиду их особенностей (физиологических и анатомических) [14, 29].

В процессе индивидуального развития древесные виды постоянно подвергаются воздействию абиотических и биотических факторов окружающей среды. Эти воздействия иногда носят неблагоприятный для

растений характер и могут служить причиной возникновения различных заболеваний. Абиотические воздействия чаще всего приводят к неинфекционным заболеваниям, в то время как биотические факторы могут вызывать болезни инфекционного характера. В большинстве случаев за данный процесс ответственны грибные организмы, которые могут поражать корневую часть, стволы, листовой аппарат и семена деревьев.

При условиях, благоприятных для протекания заболевания, могут возникать эпифитотии. Воздействие инфекций на взрослые деревья проявляется в меньшей степени, однако они ослабляются и становятся более восприимчивыми к повреждению иными стрессами, так как при этом возникают площади риска.

Следовательно, следует расширять и углублять изучение состава эпифитной микрофлоры и взаимоотношений микроорганизмов с растениями, так как древесные растения имеют довольно большое разнообразие болезней, поэтому необходимо выявить видовой состав фитопатогенных грибов, чтобы на практической основе направленно регулировать эффективность борьбы с заболеваниями.

В связи с актуальностью проблемы нами определена тема выпускной квалификационной работы: «Эпифитная микрофлора редких интродуцированных древесных растений – Гинкго и Метасеквойя».

Цель исследования: изучить количественный и качественный состав эпифитных микроорганизмов, которые встречаются на изучаемых нами древесных растениях.

Объект исследования: эпифитные микроорганизмы растений-интродуцентов.

Исходя из цели, мы определили такие задачи исследования:

- Изучить биологическую, методическую и специальную литературу по данной теме;

- Определить количественный состав бактерий и грибов на поверхности листьев исследуемых растений;
- Выделить в чистую культуру и определить выявленные микроорганизмы с точностью до рода;
- Провести статистическую обработку полученных результатов исследования.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эпифитная микрофлора растений.

Эпифитная микрофлора – микрофлора, которая находится на поверхности растений. Это могут быть молочнокислые стрептококки и палочки, травяная палочка, картофельная и сенная бациллы, дрожжи, актиномицеты, плесени и др.

Бактерии-возбудители могут колонизировать поверхность здоровых листьев, питаясь ими. Эпифитные бактерии, находясь на поверхности растений, имеют способность размножаться, но могут быть удалены путем химической дезинфекции или промывкой с поверхности листьев. Так, существуют ризобактерии, ассоциированные с корнями, а бактерии связанные с листьями – филлобактерии. И те, и другие требуют тщательного изучения, так как они оказывают существенное влияние на растительный организм [37].

По своему качественному составу эпифитная микрофлора довольно однообразна и самым распространенным представителем её может быть *Pseudomonas herbicola aurum* - граммотрицательные короткие подвижные палочки, которые образуют колонии золотистого цвета на мясо-пептонном агаре (МПА); *Pseudomonas fluorescens* - полиморфные граммотрицательные палочки с полярными жгутиками, которые дают флуоресценцию на МПБ (мясо-пептонный бульон) и МПА. Нечасто можно встретить споровые бактерии таких видов, как *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus vulgatus*, а также бесспорные, к которым относятся молочнокислые бактерии *E. coli*, еще реже встречаются плесневые и дрожжевые грибы. Молочнокислые бактерии и сахаромицеты (дикие дрожжи рода *Saccharomyces*) – это основные антагонисты гнилостных микроорганизмов - родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Actinomyces* и плесневых грибов [22].

Нормальная микрофлора включает в себя не только полезные штаммы микробов, но и патогенные. Однако, когда условия внешней среды подвержены резким изменениям, то изменяется и сам состав микробов. Подавление

естественных антагонистов происходит при применении "горячих" промываний сильными струями воды, применением антибактериальных средств, препаратов с высоким содержанием меди и других тяжелых металлов. Резкие перепады влажности и температуры также приводят к подавлению микрофлоры в целом. Именно поэтому, большинство заболеваний проявляется в межсезонье [16].

Многие эпифитные микроорганизмы являются антагонистами фитопатогенных и гнилостных бактерий и грибов, тем самым, предохраняя растения от заболеваний [2, 25].

1.2. Взаимоотношения микроорганизмов с растениями.

Высшие растения и микроорганизмы тесно взаимосвязаны в природных условиях, между ними существуют различные формы взаимоотношений и взаимного влияния [24].

Наземные части растений (листья и стебли) имеют свою микрофлору. На них приспособились существовать особые виды микробов, например: *Bacterium herbicola*, которая обладает желтым пигментом, флюоресцирующие и молочнокислые бактерии, плесени, дрожжи. Их пищей служат некоторые вещества, которые, в свою очередь, выделяются растениями на поверхность эпидермиса [1, 16].

Эти эпифитные микроорганизмы размножаются на семенах, которые при правильном хранении обладают нормальной всхожестью, и имеют определенный для данной культуры состав эпифитной микрофлоры, так что по ней можно определить о посевных качествах семян [1].

Ризосферная и эпифитная микрофлора существует на поверхности растительных покровов за счет выделений клеток растений. В отличие от них паразитарные микроорганизмы нарушают целостность покровов, внедряются в организм и вызывают его заболевание [27].

Между грибами и корнями растений также имеются особые симбиотические взаимоотношения. У подавляющего большинства

растений - древесных, злаковых и других - на корнях формируется микориза. Микориза (грибокорень) представляет собой грибной мицелий, который способен развиваться на корнях растения, вступая во взаимодействие с ними. Микоризообразующие грибы имеются среди базидиальных грибов, фикомицетов и аскомицетов [13].

Микориза - распространенное явление, и такой симбиоз имеет важное значение в жизни растения и гриба, представляя собой микотрофный тип питания [16].

Микоризу можно разделить на два типа: наружная (экто -) и внутренняя (эндо -). Микориза первого типа способна окутывать корень плотным чехлом мицелия, проникающего именно в сам корень, но не на большую глубину, попадая в межклетники коровой паренхимы. Таким образом, во все стороны почвы способна отходить густая сеть гиф мицелия от грибного чехла, вследствие чего корневые волоски отмирают, а поглотительная способность корня возрастает [11, 13].

Во втором типе микориз невозможно, чтобы корни были сплошную оплетены мицелием. Способна только часть гиф выходить в почву, поэтому в этом случае волоски корней сохраняются. Между клетками коровой паренхимы размещен мицелий эндомикоризы. Он способен проникать внутрь клеток, образуя тем самым в них клубки гиф. Но при этом клетки корня постепенно переваривают мицелий, который проник к ним, благодаря чему и остаются живыми. Бывает еще редкий случай, в котором можно наблюдать и экто-эндотрофную микоризу, что дает право на существование третьего типа, который одновременно совмещает в себе признаки, относящиеся к обеим формам микоризы [12, 35].

Столь многообразно значение микоризного симбиоза высшего растения и грибного мицелия, который увеличивает рабочую поверхность корня, вследствие чего усиливает всасывание питательных веществ и воды. За счет этого происходит усиление питания растения, т.к. идет растворение труднорастворимых неорганических и органических

соединений, и растение способно получать при минерализации органических остатков азотистое питание в виде аммония. Особенно большое значение имеет снабжение растения витаминами, ростовыми веществами [36].

Основное значение высшего растения для гриба заключается в снабжении его глюкозой и специальными метаболитами корневой системы. Энергия, заложенная в глюкозе, дает возможность грибу усваивать труднорастворимые соединения фосфора и разлагать органические вещества, например торф [24].

Особенно тесная взаимосвязь с грибом существует у орхидных растений. Микориза у орхидей эндотрофная. Прорастание семян орхидных растений без микоризы происходит с трудом или совсем не происходит. Оказалось, что у этих растений очень низкий уровень синтеза витаминов: никотиновой кислоты (PP), витамина В₁ и др. Когда эти витамины прибавляли к семенам, то они быстрее проросли. Тропические орхидеи хорошо растут в стерильных условиях без гриба, но при наличии витаминов. Выявившееся значение витаминов для орхидных открывает новую сторону микоризного питания [26, 35].

У древесных пород различают разные степени микотрофности. По этому признаку выделили три группы растений: высокомикотрофные, немикотрофные и микотрофные в слабой степени, т. е. промежуточный между первой и второй группами.

К высокомикотрофным породам относят: сосну, дуб, лиственницу, ель, бук, пихту, граб и др.

К противоположной немикотрофной группе пород относятся: породы семейства бобовых, бересклеты, ясени и многие кустарники.

К третьей, микотрофной в слабой степени, группе пород, занимающей промежуточное положение, относят: грушу, березу, яблоню, вяз, иву, рябину, клен, ольху, лещину, тополь, липу, осину, черемуху. В лесных условиях эти

породы имеют эндотрофные микоризы, а в других условиях их не образуют, развиваясь нормально без микоризы.

К классу базидиомицетов чаще всего относятся грибы микоризы, главным образом это гименомицеты, иногда гастеромицеты. В том числе многие съедобные грибы выступают активными симбионтами, которыми являются широко известные подосиновики и подберезовики [14].

При полезащитных лесонасаждениях в степных районах рекомендуется применять искусственную микоризацию путем внесения в лунку с семенами лесной почвы, богатой микоризой [14, 35].

Микотрофный способ питания имеется у некоторых однолетних сельскохозяйственных растений, например твердой пшеницы, проса. Но бесспорных доказательств, что грибы при этом играют важную роль в питании растений, еще нет [19].

Микроорганизмы вырабатывают особые физиологически активные вещества. Сюда относятся различные факторы роста, витамины, ферменты, ауксины, антибиотики, гиббереллины, некоторые аминокислоты. Растения сами могут образовывать их, но не всегда в достаточном количестве. Так, ауксины (стимуляторы роста) синтезируются самими растениями. Тем не менее, дополнительное внесение стимуляторов оказывает большое влияние на растения. Гетероауксины в настоящее время получают синтетически, но в естественных условиях растения получают их дополнительно от микроорганизмов ризосферы [6, 7].

Биотические вещества образуются бактериями, грибами, дрожжами, актиномицетами, водорослями. По способности образовывать биотические вещества микробы можно разделить на две группы. Одни образуют все необходимые для роста вещества сами и поэтому могут развиваться на синтетических средах без витаминов. Сюда относятся хемосинтезирующие бактерии, например нитрификаторы и сульфификаторы (*Thiobacillus thiooxydans* и др). Энергично образует витамины группа бактерий, не

усваивающих углекислоту, но развивающихся на синтетических средах, не содержащих витаминов, как, например, большинство почвенных бактерий: *Azotobacter*, клубеньковые бактерии, *Pseudomonas* и др. Избыток витаминов они выделяют в почву. Физиологически активные вещества могут находиться в адсорбированном состоянии длительное время, до 50-60 дней, не теряя активности. Часто корни испытывают недостаток витаминов, которые им поставляются эндотрофной микоризой и микрофлорой ризосферы [8, 20].

Среди почвенных микробов особенно много образующих антибиотические вещества. В растениеводстве установлено, что под влиянием различных антибиотиков лучше прорастают семена, усиливается рост корней. Они очень перспективны для лечения некоторых бактериальных и грибных болезней растений. Они не ядовиты для человека и животных, поэтому имеют преимущество перед химическими средствами и могут оказывать не только антибиотическое, но и стимулирующее действие. Эффективность их действия в растениеводстве еще слабо изучена [21, 34].

Гиббереллины выделены впервые из гриба - *аскомицета Gibberella fujikuroi*. Теперь такие вещества найдены и у микроорганизмов, актиномицетов и дрожжей. Они увеличивают во много раз вегетативную массу растений. В минимальных количествах, измеряемых микрограммами, гиббереллиновая кислота увеличивает высоту капусты, кукурузы, размеры плодов томатов, картофеля, гороха и др. в несколько раз [6].

Здесь необходимо также отметить, что найдены в последнее время микроорганизмы - сильные антагонисты насекомых - вредителей сельскохозяйственных культур и лесов. Например, найдена бактерия *Bac. thuringiensis var. dendrolimus*, выделенная из вредителей хвойных лесов - гусениц сибирского шелкопряда. Эта бактерия является основой препарата Дендробациллин, который служит для защиты леса от сибирского

шелкопряда. Препарат является наиболее эффективным, если культурами этих бактерий обрабатывать лес путем опрыскивания с самолетов, тогда будет уничтожено до 95% куколок шелкопряда и гусениц. Нужно продолжать искать подобные микроорганизмы, так как это приведет к открытию новых способов уничтожения других вредителей сельскохозяйственных растений [9].

Например, древесные хвойные растения гинкго и метасеквойя являются редкими и интродуцированными. Интродуценты (интродуцированные растения) – это растения, которые были переселены в местность, где они раньше не существовали, поэтому им нужно уделять особое внимание. Хвойные растения выделяют особые летучие вещества, которые подавляют развитие многих вредных бактерий не только в лесу, но и в его окрестностях. Эти вещества называются фитонцидами. Они обладают свойством обеззараживать воздух, т.е. губительно действуют на микроорганизмы, а также обладают способностью проникать через легкие и кожу в организм человека. Фитонциды благоприятно воздействуют на процесс кровообращения в мозгу, иммунную и нервную системы, состояние печени, бактерицидную активность кожи, а так же нормализуют сердечный ритм и артериальное давление и участвуют в обмене веществ. Поэтому необходимо сохранять и изучать хвойные растения. Например, следить за развитием растения и его реакцией на окружающую среду, температуру, вредителей и микроорганизмов, которые поселились на его эпифитной микрофлоре. Таким образом, благодаря этим исследованиям можно избежать гибели редких хвойных растений и их заболеваний [14, 20, 29].

Так же, благодаря изучению эпифитной микрофлоры, можно создать более благоприятные условия существования отдельных видов редких растений и можно будет избежать исчезновения таких растений как гинкго и метасеквойя. Даже возможно, что постепенно возобновится их численность и тогда Красная книга им не понадобится. Из этого следует, что исследование эпифитной микрофлоры необходимо, ведь благодаря этому данные виды

будут исключены из списка редких и они смогут использоваться людьми в полном объеме. Так, гинкго билоба, как лекарственное растение, можно использовать в медицине, имея широкий спектр действия. Метасеквойя глибтостробусовая, в свою очередь, отлично подходит для строительства, так как она является родственником американской гигантской секвойи и имеет высоту в 35-40 метров, и ширину ствола в 2-2,5 метра. Раньше она и использовалась для строительства, а сейчас является только декоративным деревом. Но не все еще потеряно, главное, уделять больше внимания развитию растительного мира и микроорганизмам, которые оказывают, как патогенное влияние на растения, что приводит к заболеванию и гибели, так и полезное, которое поддерживает благоприятную микрофлору растений и препятствуют возникновению вредителей, блокируя патогенные микроорганизмы [15, 23, 37].

1.3. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы.

Перемена погодных условий оказывает непосредственное влияние на жизнь и развитие микроорганизмов. Химические, физические и биологические факторы окружающей среды способны как ускорять, так и подавлять формирование микробов, а также оказывают непосредственное изменение их свойств, что в конечном итоге приводит к гибели микроорганизмов

К факторам среды, которые оказывают более ощутимый процесс на микроорганизмы, относят: кислотность и химический состав среды, влажность, температуру, воздействие света и других физических факторов [10].

Так, развитие и жизнедеятельность микроорганизмов может происходить только в такой среде, в которой находится определенное количество содержания влаги. Она является необходимым источником для полноценной жизни микроорганизмов и протеканию в ней таких процессов, как обмен веществ, который способствует поддержанию нормального

осмотического давления в микробной клетке, чтобы сохранить ее жизнеспособность. Но не у всех микроорганизмов потребность во влаге одинакова. Бактерии в основном являются влаголюбивыми, поэтому, если влажность среды меньше 20 %, то их рост прекращается, у плесневых грибов - если ниже 15%, а в случае, когда влажность воздуха значительна, то процент еще ниже [38].

Однако существуют и такие микробы, которые довольно устойчивы к высушиванию, сюда относятся некоторые дрожжи и бактерии. Они способны сохраняться в высушенном состоянии около месяца и даже более, а споры плесневых грибов и бактерий в таком же состоянии способны сохранить свою жизнеспособность на протяжении десятков и иногда даже сотни лет [35].

В развитии микроорганизмов играет роль еще один очень важный фактор как температура. Каждый микроорганизм имеет свой температурный режим максимума, оптимума и минимума. По этим данным микроорганизмы можно разделить на три группы:

- 1) Термофилы - это такие микроорганизмы, которые хорошо растут при довольно высоких температурах, имея оптимум роста 50-65 °С, при этом обладают максимумом — более 70 °С;
- 2) Мезофилы – это такие микроорганизмы, у которых можно наблюдать оптимум роста при 25-35 °С, при 50-60 °С – максимум, а при 5-10 °С – минимум;
- 3) Психрофилы – это микроорганизмы, которые, имея низкую температуру, очень хорошо растут, при этом их минимум – -10-0 °С, а оптимум – 10-15 °С;

При воздействии температуры ниже 0 °С было установлено, что большинство микроорганизмов в таких условиях впадают в некое состояние, похожее на угнетение, но при этом они сохраняют свою жизнеспособность и могут продолжить дальше свое развитие при повышении температуры [20, 38].

Когда на микроорганизмы будет оказано воздействие высоких температур, которые превышают норму допустимого максимума выносливости микроорганизмов, это приведет их к гибели. Бактерии, которые не обладают способностью образовывать споры, при нагревании во влажной среде до 60-70 °С погибают через 15-30 мин, до 80-100 °С — погибают через несколько секунд или минут. Значительно выше термоустойчивость у спор бактерий. Они могут выдержать температуру 100 °С на протяжении 1-6 ч, а при температуре 120-130 °С во влажной среде споры бактерий погибают через 20-30 мин. Споры плесеней в данных условиях менее термостойки [7, 38].

Жизнедеятельность микроорганизмов зависит от концентрации водородных или гидроксильных ионов в субстрате, на котором они развиваются. Для большинства бактерий наиболее благоприятна нейтральная (рН около 7) или слабощелочная среда. Плесневые грибы и дрожжи хорошо растут при слабокислой реакции среды. Высокая кислотность среды (рН ниже 4,0) препятствует развитию бактерий, однако плесени могут продолжать расти и в более кислой среде.

Повышение содержания растворенных веществ (соли или сахара) в питательной среде сказывается на величине осмотического давления внутри микроорганизмов, вызывает их обезвоживание. При повышении концентрации поваренной соли в субстрате более 3-4 % размножение многих, в том числе гнилостных, микроорганизмов замедляется, при концентрации более 7-12% — прекращается.

Некоторые микроорганизмы нуждаются для своего развития в высоких концентрациях соли (20 % и выше). Их называют солелюбивыми, или галофилами [8, 21].

Некоторым микроорганизмам свет необходим для нормального развития, но для большинства из них он губителен. Ультрафиолетовые лучи солнца обладают бактерицидным действием, т. е. при определенных дозах облучения приводят к гибели микроорганизмов. Бактерицидные свойства

ультрафиолетовых лучей ртутно-кварцевых ламп используют для дезинфекции воздуха, воды, некоторых пищевых продуктов.

Инфракрасные лучи тоже могут вызвать гибель микробов за счет теплового воздействия. Воздействие этих лучей применяют при тепловой обработке продуктов. Негативное воздействие на микроорганизмы могут оказывать электромагнитные поля, ионизирующие излучения и другие физические факторы среды [33].

1.4. Взаимоотношения между микроорганизмами.

Микроорганизмы в природе сталкиваются с влиянием различных биотических факторов. При симбиозе (совместном существовании) различают ассоциативные (благоприятствующие) и антагонистические (конкурентные) взаимоотношения.

Ассоциативные формы симбиоза широко распространены в природе. Именно на них основан круговорот веществ в природе. К ассоциативным формам симбиоза относятся метабиоз, мутуализм, синергизм и комменсализм [4].

Метабиоз – такая форма симбиоза, когда создаются условия для последовательного развития одних микроорганизмов за счет продуктов жизнедеятельности других.

Мутуализм – это взаимовыгодные отношения между микроорганизмов разных видов. Примером таких взаимоотношений является то, что создать необходимые благоприятные окислительно-восстановительные условия для анаэробов способны аэробы, обладая свойством поглощения кислорода.

Сателлизм – это, когда один вид микроорганизмов способен своим влиянием оказать увеличение роста другого организма.

Комменсализм – форма сожительства, когда один организм живет за счет другого, не причиняя ему вреда [35].

Антагонистические формы симбиоза. К ним относятся такие формы симбиоза, как антибиоз, паразитизм, хищничество.

Антагонизм – такой тип взаимоотношений, когда один организм подавляет или прекращает развитие другого в основном за счет продуктов его жизнедеятельности. Молочнокислые бактерии, например, выделяя молочную кислоту, создают кислую реакцию среды, препятствующую развитию гнилостных бактерий.

Антибиоз – связан со способностью одного вида микроорганизмов выделять в окружающую среду специфические вещества, угнетающие жизнедеятельность других, – антибиотики. Они обладают либо широким спектром действия в отношении ряда микроорганизмов, либо избирательным действием к одному из них [20].

Паразитизм – это такой тип взаимоотношений, при котором совместное существование одному из симбионтов приносит выгоду, а другому причиняет вред. Примерами могут служить болезнетворные микроорганизмы и вирусы, являющиеся возбудителями инфекционных заболеваний.

Хищничество – это внеклеточный паразитизм. Хищные бактерии образуют подвижную колонию – сетку, улавливающую крупные бактериальные клетки других видов, которые лизируются (разрушаются) и используются ими внутри колонии, а остатки выбрасываются. Хищные бактерии обитают в илах водоемов [9, 20].

Во многих случаях губительное действие микробов-антагонистов связано с выделением специфических биологически активных химических веществ – антибиотиков. Продуцентами антибиотиков являются некоторые грибы, а также бактерии, чаще актиномицеты.

Характер действия антибиотических веществ на клетки разнообразен. Одни из них задерживают рост и развитие микроорганизмов, другие вызывают их к летальному исходу [10].

Ведутся также исследования по использованию специального антибиотика – низина. Продуцентами низина являются молочнокислые стрептококки. Низин является ингибитором роста стафилококков, многих

стрептококков и анаэробных термостойких споровых бактерий рода *Clostridium*.

Антибиотические вещества вырабатываются не только микроорганизмами, но также растениями и животными.

Фитонциды – антибиотические вещества растительного происхождения. Химическая природа фитонцидов разнообразна. Антимикробным действием обладают многие вещества, находящиеся в растениях: эфирные масла, гликозиды, антоцианы, дубильные вещества и многие другие соединения [33].

1.5. Эпифитные микроорганизмы на поверхности растений.

Значимым принципом в ограничении фитопатогенов на древесных растениях является эпифитная микрофлора, которая на протяжении долго времени формируется в конкретных условиях их роста и развития [14].

На поверхности растений могут развиваться различные эпифитные микроорганизмы. Они являются естественной микрофлорой. Эпифитная микрофлора представлена как типичными характерными для данного вида растений микроорганизмами, так и случайными. Источником типичной эпифитной микрофлоры служат растения, семена, растительные остатки и почва.

Случайные микроорганизмы могут быть занесены ветром, водой, насекомыми, птицами. В их составе можно обнаружить фитопатогенные и патогенные для человека и животных микроорганизмы [4, 13].

Типичные эпифиты существуют на здоровых растениях как олиготрофы, за счет незначительных количеств питательных веществ, постоянно выделяющихся на поверхность органов растений, - продуктов экзосмоса. Из-за нехватки питательных веществ они могут находиться в неактивном состоянии. Эпифитные микроорганизмы имеют устойчивость к фитонцидам, могут переносить колебания влажности, температуры. Известно, что многие эпифиты вырабатывают биологически активные

вещества и существенно влияют на продуктивность растений. Бактерии рода *Pseudomonas*, которые обитают на поверхности филлосферы многих древесных культур, способны синтезировать стимуляторы роста растений, это ауксин, гиббериллин и цитотоксин [9].

Некоторые бактерии известны, как продуценты витаминов. Примером могут послужить молочнокислые бактерии, распространенные эпифиты, синтезирующие витамин группы В. Эпифиты обладают антагонистическими свойствами к ряду фитопатогенных грибов и бактерий благодаря синтезу антибиотиков [35].

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Из поставленной нами задачи было проведено исследование нормальной микрофлоры редких древесных растений Семейства Гинкговые (*Ginkgoaceae*) и Семейства Кипарисовые (*Cupressaceae*), на примере листьев гинкго билоба (*Ginkgo biloba*) и метасеквойи глибтостробусовой (*Metasequoia glyptostroboides*). В ходе исследования была изучена микрофлора поверхности испытуемых листьев растений, а так же проанализирована динамика, количественный и видовой состав микроорганизмов данных растений.

Чтобы выделить и определить численность эпифитных микроорганизмов с образцов, был использован метод смыва с поверхности листьев растений. Для изучения состава эпифитной микрофлоры исследуемых листьев, понадобились следующие среды: Чапека, Левина и МПА. Распознавание культур проводилось по определителям бактерий и актиномицетов Красильникова (1949) и Берджи (1957).

2.1. Методика смывов с поверхности растений.

Методом смывов осуществляли забор проб с поверхностей различных объектов. Для исследования твердых поверхностей при отборе проб этот

метод является основным. Взятие смывов производят стерильными марлевыми салфетками, которые имеют размер 5x5 см, или вмонтированными в пробирки ватными тампонами на палочках. Для их увлажнения нужно добавить 2,0 мл стерильного физиологического раствора в пробирки с тампонами. Если нужно использовать салфетки, то этот же раствор, в таком же количестве разливают в пустые стерильные пробирки. После чего стерильным пинцетом захватывают салфетку и погружают в пробирки с данным раствором и производят смывы с исследуемого объекта. После процедуры нужно поместить в ту же пробирку использованную салфетку.

Если контроль производят с объектов, имеющих большую поверхность, то смыв делают в нескольких местах, общей площадью равной в 100-200 см², а при контроле, производимых с мелких объектов, смыв делают со всей поверхности.

Очень важно учитывать и площадь исследуемого объекта, она нужна для подсчета выросших колоний в см² [32].

2.2. Методика разведения.

Для определения численности бактерий сначала готовят суспензии, содержащие разные концентрации в 1 мл. Нужно взять навеску в 1 г. стерильной алюминиевой чайной ложечкой или фарфоровым шпателем на стерильное часовое стекло, но для начала все это обжигают в пламени горелки или фламбируют горящим спиртом, а часовое стекло еще и накрывают другим стерильным часовым стеклом, чтобы бактерии из воздуха не попали туда при взвешивании. Соблюдая условия асептики, навеску вносят в первую колбу на 250 мл с 99 мл стерильной воды. Осторожно, чтобы не намочить пробку, смесь перемешивают в течение 5 мин. Отбирают 1 мл суспензии стерильной пипеткой, в отобранном объеме должно содержаться 0,1 г материала, и переносят в пробирку, в которой уже находится 9 мл стерильной водопроводной воды. Нужно максимально смыть

клетки со стенок пипетки, для этого ее неоднократно промывают водой в пробирке. Другой стерильной пипеткой берут из первой колбы еще 1 мл суспензии и помещают во вторую колбу, тоже содержащую 99 мл стерильной водопроводной воды. Пипетку промывают, как и в первом случае. Пробирку и вторую колбу взбалтывают в течение 1 мин. В пробирке приобретают концентрацию клеток 0,01 г, во 2-ой колбе 0,001 г.

Аналогично новыми обеззараженными пипетками переносят по 1 мл суспензии из 2-ой колбы во вторую пробирку с 9 мл и в третью колбу с 99 мл стерильной водопроводной воды и подготавливают новые суспензии, включающие в соответствии с этим в 1 мл 0,0001 г и 0,00001 г.

С целью установления числа живых клеток, которые содержатся в 1 мл суспензии каждого разведения, берут 1 мл суспензии из каждого разведения и перемещают в обеззараженные чашки Петри, применяя каждый раз новую обеззараженную пипетку (правильнее пипетку Мора).

2.3. Методика приготовления необходимых питательных сред.

В термостате на питательных средах культивируют разнообразные виды микроорганизмов. Они способны потреблять как органические, так и неорганические вещества с целью своего питания, по этой причине среды бывают разнообразные, их применяют с целью выращивания микроорганизмов.

Согласно собственной консистенции среды бывают двух видов: жидкие и твердые. Согласно своему составу - минеральные (только растворы), белковые и безбелковые. Согласно происхождению среды разделяют на: искусственные и натуральные (естественные). По предназначению среды подразделяют на: особые (специальные), диагностические и элективные [5].

Натуральными обычно называют среды, состоящие из продуктов животного и растительного происхождения, обладающими непростой химической структурой. Среда искусственного происхождения разделяют на синтетические и полусинтетические. Большинство полусинтетических

питательных сред имеют состав, к которому относятся как разнообразные добавки, представленных в виде солей, включающих компоненты питания микроорганизмов, так и естественные компоненты.

Среда МПА (мясо-пептонный агар) – является основной питательной средой, которая используется для бактериологических анализов в микробиологических лабораториях. Его применяют так же как в варианте «обычного агара», и таким же образом в варианте прибавления углеводов, подготавливая непростые дифференциально-диагностические среды.

Чтобы приготовить данную среду нужно: в 1000 мл очищенной воды (дистиллированной) разжигить 50 грамм уже готового порошка. В случае, если потребуется меньшее количество среды, то требуется рассчитать необходимое количество пропорцией. Далее разогревают смесь вплоть до абсолютного растворения и кипятят в течение 3 минут, после чего стерилизуют автоклавированием при 121°C, на протяжении 15 минут.

Среда Левина является одной из дифференциально-диагностических сред. Целью ее предназначения является выделение и дифференциация болезнетворных и условно патогенных энтеробактерий, а так же выделение стафилококков. Приготовление данной среды производится по аналогии МПА.

Среда Чапека является полусинтетической средой, у которой единственным источником азота является нитрат натрия и ее цель - культивирование грибов. На ней очень хорошо растут практически все сапрофитные аспергиллы, которые образуют типичный мицелий и конидии.

2.4. Методика количественного учета микроорганизмов на поверхности листьев.

Колонии микроорганизмов подсчитывают как правило посредством 2 дней, колонии грибов и дрожжей посредством 5-7 дней. Удобнее всего подсчитывать колонии при помощи лупы, при этом чашки Петри открывать нельзя. Чтобы не запутаться, нужно отмечать на наружной стороне дна

чашки уже посчитанную колонию маркером. Крупные колонии в малом количестве подсчитывают по всей поверхности чашки, а если большое количество, то дно чашки следует разделить на несколько парных секций, например, 4, 6 и т.д. В таком случае подсчет проводят в 2-3 секторах, после чего рассчитывают среднее арифметическое для одного сектора и умножают на количество секторов.

Так же можно подсчитать количество колоний в каждом секторе и вычислить их сумму. Для очень мелких и в большом количестве колоний необходимо воспользоваться счетным аппаратом Вольфхюгеля, чтобы получить как можно точнее результаты. Данный аппарат состоит из черной доски и стеклянной пластинки, которая разделена на небольшие квадратики, имеющие площадь 1 см^2 . На эту доску вверх дном ставят чашки Петри, после чего их покрывают стеклянной пластинкой. Далее просто остается подсчитать в квадратиках по диагонали количество колоний. После подсчета рассчитывают среднее арифметическое на один квадратик и пересчитывают на площадь всей чашки Петри, применяя простую формулу $S = \pi r^2$.

Для простого, быстрого и точного подсчета колоний в чашках Петри используется полуавтоматический счетчик. Оператор с помощью ручки (маркера, фломастера) отмечает колонии, а датчик давления выводит их на дисплей, сопровождая каждое прикосновение звуковым сигналом [18, 28, 31].

Расчет численности микроорганизмов на единицу площади листовой поверхности.

По результатам посева верхних разведений смыва пересчитать количество микроорганизмов по формуле:

- для нахождения площади хвои метасеквойи используется формула:

$S = 2l \times \sqrt{(a^2 + b^2)}$, где S - площадь поверхности; l - длина хвои; a - ширина хвои; b - толщина хвои [18];

- Площадь листовой поверхности гинкго определялась по компьютерной программе **lp_square50**.

2.5. Методика выделения в чистую культуру бактерий.

Культура микроорганизмов, которая состоит из клеток одного вида, называется чистой культурой. Для ее получения нужно клетки данного вида отделить от клеток другого вида так, чтобы возможность попадания посторонних микроорганизмов была полностью исключена. Чтобы получить чистую культуру, необходимо осуществить несколько этапов ее выделения. Для начала нужно получить накопительную культуру, а затем выделить ее в чистую культуру. Но это еще не все, необходимо обязательно проверить выделенную культуру на ее чистоту [3].

Накопительная культура – это такая культура бактерий, в которой один определенный вид микроорганизмов имеет непосредственное преимущество над другими видами. В своем развитии различные микроорганизмы требуют разнообразные источники питания, поэтому необходимо создать элективные условия для необходимой им среды. Получение накопительной культуры определяют согласно возникновению отличительных свойств формирования выделяемых микроорганизмов – замутнение среды, в некоторых случаях сопровождающееся пигментацией, возникновение пленки, выпадение осадка, акцентирование газов. Когда была достигнута цель получения накопительной культуры, можно смело приступать к получению необходимой чистой культуры. Ее можно выделить или из отдельной колонии микроорганизма, или одной клетки [5, 31].

С целью извлечения отдельных колоний, следует уже после проделанного посева чашки Петри дном вверх разместить в термостате, выдерживая при этом данные чашки около 5-7 дней, так как миксомицеты растут еще дольше микроорганизмов. После того, как на среде выросли отдельные колонии необходимого вида, их нужно отвить петлей на поверхность «косой» среды, находящейся в пробирке. Все это делают на

стерильной рабочей поверхности, которую заранее обработали спиртом. Отвивку проводят, придерживаясь всех без исключения принципов стерильности, над пламенем горелки стерильной петлей, которую обработали этим же пламенем. Далее нужно внимательно проверить чистоту полученной чистой культуры [20, 32].

2.6. Методика статистической обработки.

Моисейченко [17] предложил метод разностной обработки данных. Из чего следует, что достоверность опыта увеличивается, если возрастает между числами степень отличия, так как опытный и контрольный образцы, при обычном размещении, никак не находятся в зависимости с повторностью и обладают одинаковыми признаками плодородия почвы. Данный метод обладает значительной отдачей и подтвержден благодаря применению образцов с кукурузными гибридами, предположив, что опыт размещен особым тройным методом.

Так, вычисляют среднее арифметическое значение по всем повторностям (x_{cp}). После находят (d) – разность между гибридами, ее можно вычислить согласно повторениям. С наибольшего вычисляют наименьшее количество, а после находят среднее арифметическое разности (d_{cp}). Для этого суммируют все без исключения повторности, а после, полученную сумму делят на количество всех повторностей. $(d-d_{cp})$ – рассчитывают отклонение между каждой разностью и средним значением. После чего данные отклонения возводятся в квадрат и суммируют $(\sum(d - d_{cp})^2)$, а полученные суммы используют для нахождения ошибки разности (Sd), по следующим формулам:

$$Sd(1-2) = \frac{\sqrt{\sum(d - \bar{d})^2}}{n(n-1)}$$

Далее вычисляют фактический критерий Стьюдента:

$$t(1-2) = \frac{(x_{2cp} - x_{1cp})}{Sd_{(1-2)}}$$

Теоретическое значение критерия Стьюдента смотрят в специальной таблице по числу степеней свободы, которое вычисляют по формуле:

$$V=(n_1-1)+(n_2-1)$$

Сравнивают фактический критерий с теоретическим и делают заключение на основе следующих правил: если фактический критерий Стьюдента равен теоретическому или больше него, то это означает, что разность между данными вариантами существенна на определенном уровне вероятности ($p=0,05$; $0,1$ и $0,001$).

ГЛАВА 3. СОБСТВЕННЫЕ ИСЛЕДОВАНИЯ. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЭПИФИТНОЙ МИКРОФЛОРЫ ГИНКГО И МЕТАСЕКВОЙИ В ДИНАМИКЕ ПО СЕЗОНАМ

Из поставленной нами задачи провели исследование нормальной микрофлоры редких древесных растений Семейства Гинкговые (*Ginkgoaceae*) и Семейства Кипарисовые (*Cupressaceae*), на примере листьев гинкго билоба
(*Ginkgo biloba*) и метасеквойи глибтостробусовой (*Metasequoia glyptostroboides*).



Рис.3.1. Внешний вид растения метасеюйи глиптостробусовой (*Metasequoia glyptostroboides*).



Рис.3.2. Внешний вид растения Гинкго билоба (*Ginkgo biloba*).

3.1. Приготовление необходимых питательных сред.

Для выполнения нашего исследования были приготовлены 3 питательных среды. МПА (мясо-пептонный агар) – является питательной средой для обнаружения факультативно-анаэробных и мезофильных аэробных микроорганизмов); Левина – является селективной средой для обнаружения БГКП (бактерий группы кишечной палочки); Чапека - является полусинтетической средой с нитратом натрия в качестве единственного источника азота, используются для культивирования грибов.



Рис.3.3. Питательные среды МПА, Левина, Чапека.

Чтобы приготовить данные среды требуется для каждой среды сначала рассчитать необходимое количество пропорцией, зная, что для приготовления 1 литра среды требуется 50 г. порошка. Из этого следует: в 304 мл очищенной воды (дистиллированной) разжижить 15,2 грамм уже готового порошка. Далее разогрели смесь вплоть до абсолютного растворения и кипятили в течение 3 минут, после чего стерилизовали автоклавированием при 121°C, на протяжении 15 минут.

Теперь наши готовые и стерильные питательные среды разлили в заранее подготовленные и простерилизованные чашки Петри, распределяя по их дну равномерно среду, слегка покачивая чашки, и оставили стоять на ровной поверхности до полного застывания.

3.2. Постановка эксперимента.

Чтобы выделить и определить численность эпифитных микроорганизмов с образцов, поставили эксперимент.

Подготовили 150 мл дистиллированной воды и 2 бюкса, в которые налили по 5 мл этой воды. Затем стерильной ватой, держащую стерильным пинцетом, и поочередно произвели смыв с исследуемых объектов (гинкго и метасеквойи), обязательно над воронкой. Использованную вату оставили в

бюксе. Затем, согласно методике, сделали разведение. Подготовили 12 пробирок, налив в каждую по 9 мл стерильной (проавтоклавированной) воды. Из первого бюкса добавили 1 мл раствора в первую пробирку и хорошо перемешали. Следом, из этой же пробирки отобрали 1 мл полученного раствора и добавили во вторую пробирку, после чего тоже хорошо перемешали. Продолжала работать в данной последовательности до шестого разведения. По окончании были получены следующие разведения: в 6 пробирке 1:1000000, в 5 пробирке 1: 100000, в 4 пробирке 1:10000.

После проделанной работы отобрали 0,2 мл полученного раствора стерильным шприцом из 6 пробирки и посеяли на 4 чашки Петри со средой МПА. Получилось разведение 1:1000000. Далее отбираем такой же объем другим стерильным шприцом из 5 пробирки и посеяли так же по 4 чашки на среды МПА и Левина (разведение 1:100000). Таким же методом производим посев на среды МПА, Левина и Чапека из остальных пробирок 4 (1:10000), 3 (1:1000), 2 (1:100) и 1(1:10), по 4 чашки на каждую среду каждого разведения. Идентичную работу проделали с разведением 2-го образца растения.

Все засеянные 72 чашки Петри разместили в термостате, имеющим, в данном случае, постоянную температуру 28°C, с продолжительностью в три дня. После прошедших трех суток определилось количество колоний, которые выросли на питательных средах. Количество выросших колоний представлено в приложении 1. Количественное определение эпифитной микрофлоры растений (КОЕ/см²), первичный количественный учет микрофлоры (колоний на 1 чашку), а также площадь исследуемых объектов представлены в таблицах.

3.3. Анализ эпифитной микрофлоры растений гинкго и метасеквойи в динамике по сезонам.

Таблица 1.

Определение средней площади листовой поверхности растений при смыве эпифитной микрофлоры (см²).

Сезоны	Растения	
	Гинкго	Метасеквойя
Весна	38,73	24,94
Лето	49,63	30,24
Осень	46,87	21,10

Анализ эпифитной микрофлоры растения гинкго в динамике по сезонам.

Таблица 2.

Количественное определение эпифитной микрофлоры растения гинкго, весна (тыс. КОЕ/см²).

Повторности	КМАиФАНМ	БГКП	Грибы
1	69713,4	818,5	126,5
2	61451,1	834	151,1
3	59901,9	728,1	133
4	63516,7	681,6	107
Среднее	63645,8	765,6	129,4

Таблица 3.

Количественное определение эпифитной микрофлоры растения гинкго, лето (тыс. КОЕ/см²).

Повторности	КМАиФАНМ	БГКП	Грибы
1	78,6	543,5	0,4
2	120,9	483,6	0,5
3	110,8	573,7	0,7
4	137	987,3	0,5
Среднее	111,8	647	0,5

Таблица 4.

Количественное определение эпифитной микрофлоры растения гинкго, осень (тыс. КОЕ/см²).

Повторности	КМАиФАНМ	БГКП	Грибы
1	117,3	92,8	0,8
2	139,7	112	0,6
3	122,7	104,5	0,8
4	135,5	83,2	0,7
Среднее	128,8	98,1	0,7

Для наглядности рассмотрим полученные данные на графиках, чтобы лучше понять, в какое время года поверхность растения гинкго имеет наибольшее количество микроорганизмов (КМАиФАНМ, БГКП и грибов).

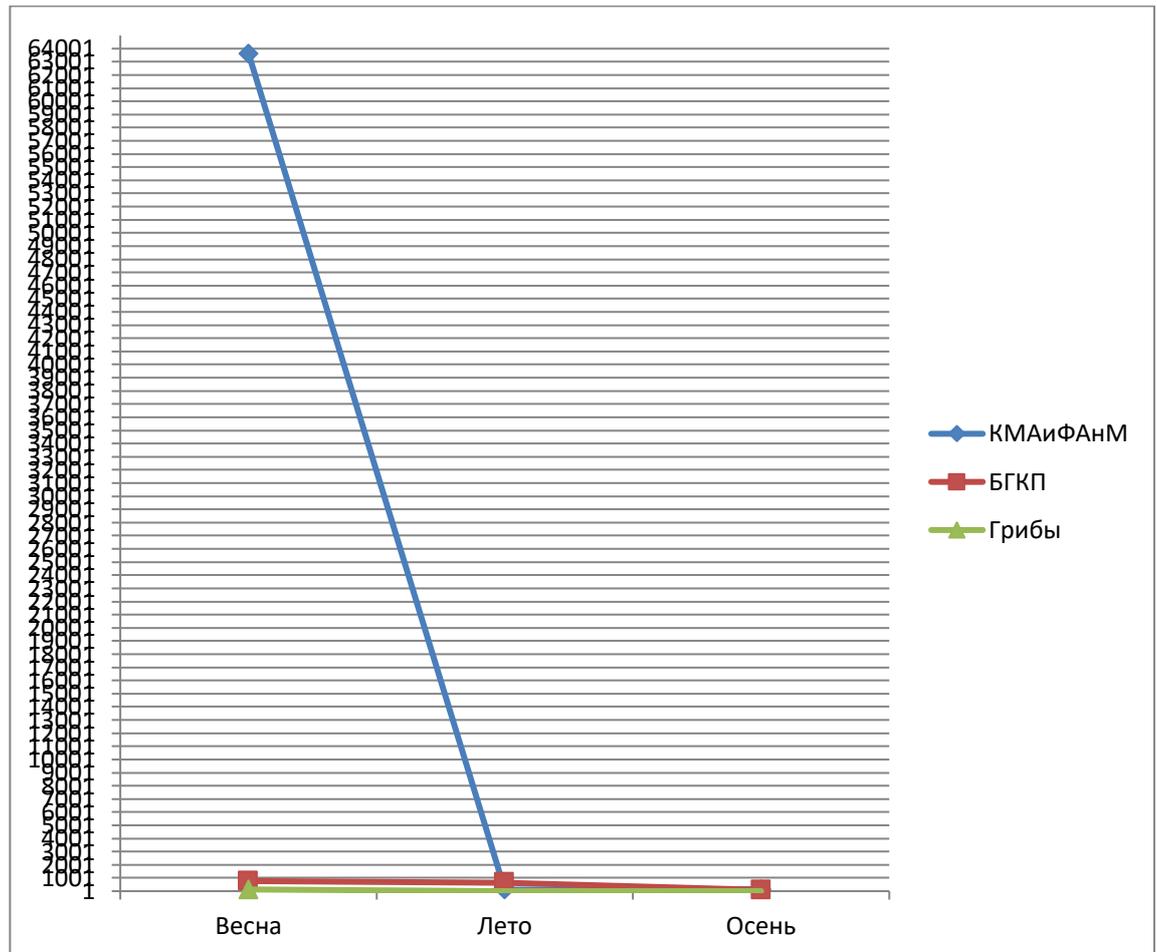


Рис.3.4. Количество эпифитных микроорганизмов по группам растения гинкго по сезонам (весна, лето и осень), тыс. КОЕ/см².

Из представленных данных видно, что в эксперименте, который был поставлен весной, основная масса микроорганизмов представлена КМАиФАНМ., количество колоний, выросших на питательных средах, значительно превосходит от результатов эксперимента, поставленного летом. В составе летней эпифитной микрофлоры максимальное количество представлено БГКП. Рост плесневых грибов во всех сезонах незначительный. Скорее всего, такое разнообразие состава эпифитной микрофлоры гинкго связано, во-первых, с выделением хвойными растениями особых летучих веществ – фитонцидов, которые убивают или подавляют рост и развитие бактерий, микроскопических грибов и простейших [14]. Во-вторых - с погодными условиями, т.к. в разные времена года температура изменяется существенно, а также влажность, давление и т.д., которые оказывают

влияние на рост и развитие микроорганизмов, как благоприятное, так и пагубное [7, 20, 38].

Анализ эпифитной микрофлоры растения метасеквойя в динамике по сезонам.

Таблица 5.

Количественное определение эпифитной микрофлоры растения метасеквойи, весна (тыс. КОЕ/см²).

Повторности	КМАиФАНМ	БГКП	Грибы
1	19466,7	13893,3	164,4
2	18263,8	10124,3	192,5
3	17722,3	10966,3	206,5
4	19085,8	12409,8	174,4
Среднее	18634,7	11848,4	184,4

Таблица 6.

Количественное определение эпифитной микрофлоры растения метасеквойи, лето (тыс. КОЕ/см²).

Повторности	КМАиФАНМ	БГКП	Грибы
1	4133,6	6349,2	340,6
2	4513,9	5886,2	451,4
3	5059,5	6564,2	494,4
4	4398,1	5191,8	443,1
Среднее	4526,3	5997,9	432,4

Таблица 7.

Количественное определение эпифитной микрофлоры растения метасеквойи, осень (тыс. КОЕ/см²).

Повторности	КМАиФАНМ	БГКП	Грибы
1	917,1	124,9	91,7
2	957,3	121,6	92,7
3	943,1	119,9	60,2
4	1021,3	117,3	65,9
Среднее	959,7	121	77,6

Рассмотрим представленные данные по метасеквойе на графиках.

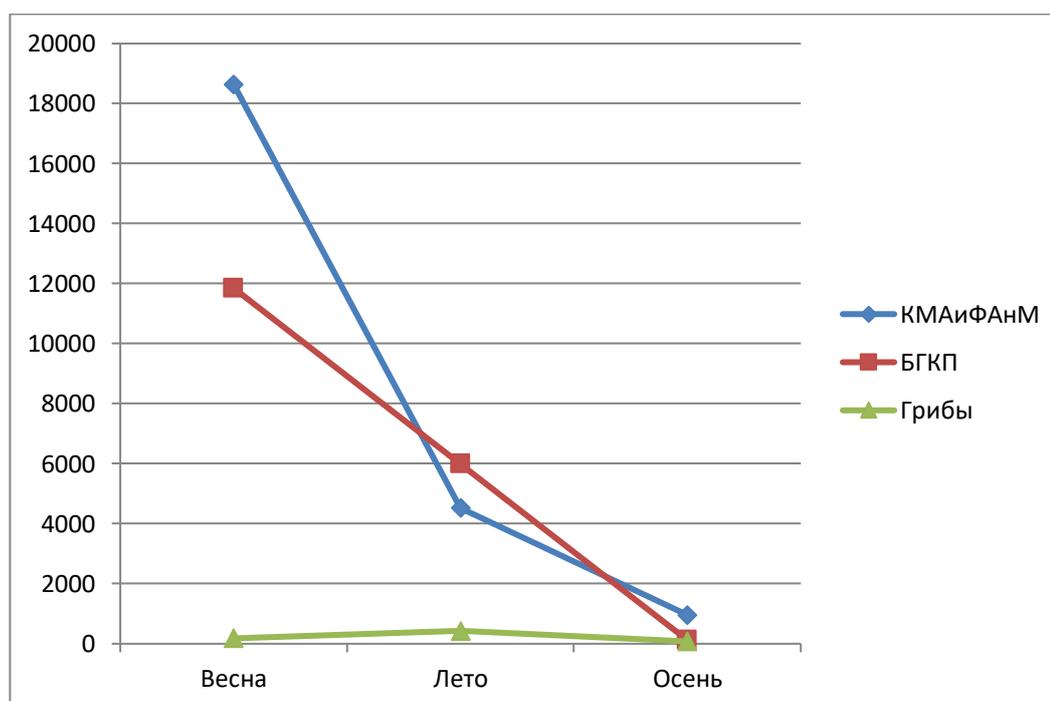


Рис.3.5. Количество эпифитных микроорганизмов по группам растения метасеквойя по сезонам (весна, лето и осень), тыс. КОЕ/см².

Из представленных данных по второму исследованному виду растения метасеквойя, видно, что в этом эксперименте, как и в случае гинкго, весной преобладают микроорганизмы КМАиФАНМ. Летом наибольшее количество представлены БГКП, как и в случае с гинкго. В составе микрофлоры метасеквойи, как и в гинкго, наблюдали маленький рост плесневых грибов.

Это, в первую очередь, связано с выделением хвойного растения особых летучих веществ – фитонцидов, которые убивают или подавляют рост и развитие бактерий, микроскопических грибов и простейших [14]. Во-вторых, с погодными условиями, т.к. в разные времена года преобладает разная температура, влажность, давление и т.д., которые оказывают влияние на рост и развитие микроорганизмов, как благоприятные, так и пагубные [7, 20, 38].

Из этого всего следует вывод, что наибольшее влияние на рост и развитие эпифитных микроорганизмов растений гинкго и метасеквойи оказывают летучие вещества - фитонциды и погодные условия, которые при одинаковом воздействии влекут за собой разные последствия. Поэтому выявлены аналогичные результаты: в весеннем сезоне. По средним значениям наибольшее количество эпифитных микроорганизмов представлено КМАиФАНМ (18634,7), в летнем БГКП (5997,9), в осеннем КМАиФАНМ (959,7).

3.4. Статистическая обработка цифровых данных.

Таблица 8.

Численность бактерий (КМАиФАНМ), весна (тыс. КОЕ/см²).

Повт.	Гинкго	Метасеквойя	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	69713,4	19466,7	50246,7	5260,6	27673912,4
2	61451,1	18263,8	43087,3	-1898,8	3605441,4
3	59901,9	17722,3	42179,6	-2806,5	7876442,3
4	63516,7	19085,8	44430,9	-555,2	308413,6
	X _{2cp} = 63645,8	X _{1cp} = 18634,7	Dcp = 44986,1	Σ = 0,1	Σ(d – dcp) ² =39464209, 6

1) Разность d между растениями вычисляем по повторениям.

2) Определяем среднее арифметическое разности.

3) Вычисляем отклонение d-dcp.

Эти отклонения возводим в квадрат и суммируем, а их сумму используем для вычисления ошибок разностей (sd) по формуле:

$$S_{d(1-2)} = \sqrt{\frac{\sum (d - \bar{d})^2}{n(n-1)}}; \quad S_{d(1-2)} = 1813,5$$

4) Вычисляем критерий Стьюдента фактический:

$$T_{(1-2)} = \frac{(x_{2cp} - x_{1cp})}{S_{d(1-2)}};$$

$$T_{(1-2)} = 24,8$$

5) Определяем критерий Стьюдента теоретический. Теоретический критерий нужно взять из таблицы по числу степеней свободы, которое вычисляем по формуле: $v = (n_1 - 1) + (n_2 - 1)$; $v = (4-1) + (4-1) = 6$.

Сравниваем фактический критерий с теоретическим и делаем заключение на основе следующих правил: если фактический критерий Стьюдента равен теоретическому или больше него, то это означает, что разность между данными вариантами существенна на определенном уровне вероятности ($p=0,05$; $0,1$ и $0,001$).

Таким образом, T_{st} при $v = (4-1) + (4-1) = 6$, $T_{st}=5,96$, а $T_{(1-2)} = 24,8$. То есть, $T_{(1-2)} > T_{st}$, следовательно, полученные различия считаются достоверными на уровне вероятности $p=0,001$.

Аналогично вычисляем остальные критерии Стьюдента:

Таблица 9.

Численность бактерий (КМАиФАнМ), лето (тыс. КОЕ/см²).

Повт.	Гинкго	Метасеквойя	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	78,6	4133,6	4055	-369,5	136510,3
2	120,9	4513,9	4393	-21,5	462,3
3	110,8	5059,5	4948,7	534,2	285369,6
4	137	4398,1	4261,1	-153,4	23531,6
	X _{2cp} = 111,8	X _{1cp} = 4526,3	Dcp = 4414,5	Σ = -10,2	Σ(d - dcp) ² =778269,5

$$Sd_{(1-2)}=254,67$$

$$T_{(1-2)} = 17,33$$

T_{st}=5,96, то есть, T₍₁₋₂₎ > T_{st}, следовательно, полученные различия считаются достоверными, при уровне значимости p=0,001.

Таблица 10.

Численность бактерий (КМАиФАнМ), осень (КОЕ/см²).

Повт.	Гинкго	Метасеквойя	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	117,3	917,1	799,8	-31,1	967,2
2	139,7	957,3	817,6	-13,3	176,9
3	122,7	943,1	820,4	-10,5	110,3
4	135,5	1021,3	885,8	54,9	3014
	X _{2cp} = 128,8	X _{1cp} = 959,7	Dcp = 830,9	Σ = 0	Σ(d - dcp) ² =4268,4

$$Sd_{(1-2)}=18,86$$

$$T_{(1-2)}=44,06$$

$T_{st}=5,96$, то есть, $T_{(1-2)} > T_{st}$, следовательно, полученные различия считаются достоверными, при уровне значимости $p=0,001$.

Таблица 11.

Численность бактерий (БГКП), весна (тыс. КОЕ/см²).

Повт.	Гинкго	Метасеквойя	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	818,5	13893,3	13074,8	1992	3968064
2	834	10124,3	9290,3	-1792,5	3213056,3
3	728,1	10966,3	10238,2	-844,6	713349,2
4	681,6	12409,8	11728,2	645,4	416541,2
	$X_{2cp} =$ 765,6	$X_{1cp} =$ 11848,4	$Dcp =$ 11082,8	$\Sigma = 0,8$	$\Sigma(d - dcp)^2$ =8311010,7

$$Sd_{(1-2)}=832,22$$

$$T_{(1-2)}=13,32$$

$T_{st}=5,96$, то есть, $T_{(1-2)} > T_{st}$, следовательно, полученные различия считаются достоверными, при уровне значимости $p=0,001$.

Таблица 12.

Численность бактерий (БГКП), лето (тыс. КОЕ/см²).

Повт.	Гинкго	Метасеквойя	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	543,5	6349,2	5805,7	454,8	206843,1
2	483,6	5886,2	5402,6	51,7	2672,9
3	573,7	6564,2	5990,5	639,6	409088,2
4	987,3	5191,8	4204,5	-1146,4	1314233
	X _{2cp} = 647	X _{1cp} = 5997,9	Dcp = 5350,9	Σ = -0,3	Σ(d - dcp) ² =1932837,2

$$Sd_{(1-2)}=401,34$$

$$T_{(1-2)}=13,33$$

T_{st}=5,96, то есть, T₍₁₋₂₎ > T_{st}, следовательно, полученные различия считаются достоверными, при уровне значимости p=0,001.

Таблица 13.

Численность бактерий (БГКП), осень (тыс. КОЕ/см²).

Повт.	Гинкго	Метасеквойя	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	92,8	124,9	32,1	9,3	86,5
2	112	121,6	9,6	-13,2	174,3
3	104,5	119,9	15,4	-7,4	54,8
4	83,2	117,3	34,1	11,3	127,7
	X _{2cp} = 98,1	X _{1cp} =121	Dcp = 22,8	Σ = 0	Σ(d - dcp) ² =443,3

$$Sd_{(1-2)}=6,08$$

$$T_{(1-2)}=3,75$$

$T_{st}=5,96$, то есть, $T_{(1-2)} > T_{st}$, следовательно, полученные различия считаются достоверными, при уровне значимости $p=0,01$.

Таблица 14.

Численность бактерий (грибы), весна (тыс. КОЕ/см²).

Повт.	Гинкго	Метасеквойя	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	126,5	164,4	37,9	-17,2	295,8
2	151,1	192,5	41,4	-13,4	179,6
3	133	206,5	73,5	18,4	338,6
4	107	174,4	67,4	12,3	151,3
	$X_{2cp} =$ 129,4	$X_{1cp} = 184,4$	$Dcp = 55,1$	$\Sigma = 0,1$	$\Sigma(d - dcp)^2$ =965,3

$$Sd_{(1-2)}=8,97$$

$$T_{(1-2)}=6,13$$

$T_{st}=5,96$, то есть, $T_{(1-2)} > T_{st}$, следовательно, полученные различия считаются достоверными, при уровне значимости $p=0,001$.

Таблица 15.

Численность бактерий (грибы), лето (тыс. КОЕ/см²).

Повт.	Гинкго	Метасеквойя	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	0,4	340,6	340,2	-91,7	8408,9
2	0,5	451,4	450,9	19	361
3	0,7	494,4	493,7	61,8	3819,3
4	0,5	443,1	442,6	10,7	114,5
	X _{2cp} = 0,5	X _{1cp} = 432,4	Dcp = 431,9	∑ = -0,2	∑(d - dcp) ² =12703,7

$$Sd_{(1-2)}=32,54$$

$$T_{(1-2)}=13,27$$

T_{st}=5,96, то есть, T₍₁₋₂₎ > T_{st}, следовательно, полученные различия считаются достоверными, при уровне значимости p=0,001.

Таблица 16.

Численность бактерий (грибы), осень (тыс. КОЕ/см²).

Повт.	Гинкго	Метасеквойя	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	0,8	91,7	90,9	14	196
2	0,6	92,7	92,1	15,2	231,1
3	0,8	60,2	59,4	-17,5	306,3
4	0,7	65,9	65,2	-11,7	136,9
	X _{2cp} = 0,7	X _{1cp} = 77,6	Dcp = 76,9	∑ = 0	∑(d - dcp) ² =870,3

$$Sd_{(1-2)}=8,52$$

$$T_{(1-2)}=9,03$$

$T_{st}=5,96$, то есть, $T_{(1-2)} > T_{st}$, следовательно, полученные различия считаются достоверными, при уровне значимости $p=0,001$.

Исходя из проведенной статистической обработки, можно сделать вывод, что все различия в результатах анализов оказались достоверными, следовательно, разность между вариантами существенна, отмеченные изменения в количественном составе эпифитной микрофлоры являются статистически доказанными.

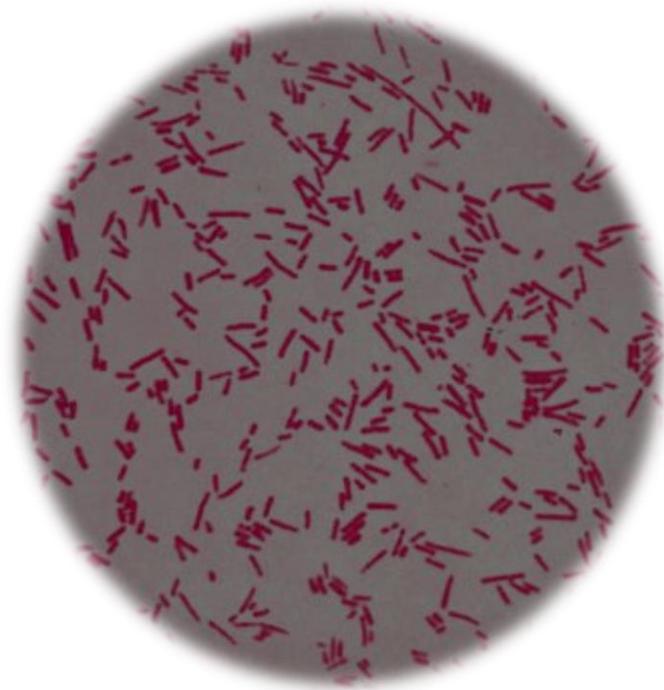
Определение эпифитных микроорганизмов с точностью до рода.

Колонии микроорганизмов окрашивали метиленовым синим. Выявили микробы на поверхности чашек Петри, сделали фотографии. Обнаружили рост бактерий, представленных одиночными клетками, но наблюдались и их скопления в виде микроколоний, это указывает на рост бактерий. Бактериальное разнообразие представлено многочисленными дугообразными и прямыми палочками, имеющее разный размер, а также кокками, как одиночными, так и цепочками.

По родовому составу распространены такие представители бактерий-космополитов, как: *Pseudomonas sp*, *Escherichia sp*, *Agrobacterium sp*, *Enterococcus sp*.



Рис.3.6. Колонии рода *Pseudomonas* на среде МПА из микрофлоры



гинкго.

Рис.3.7. Микропрепарат. Род *Pseudomonas* sp. из микрофлоры гинкго (X600).



Рис. 3.8. Колонии рода *Enterococcus* sp., на среде МПА из микрофлоры метасеквойи.

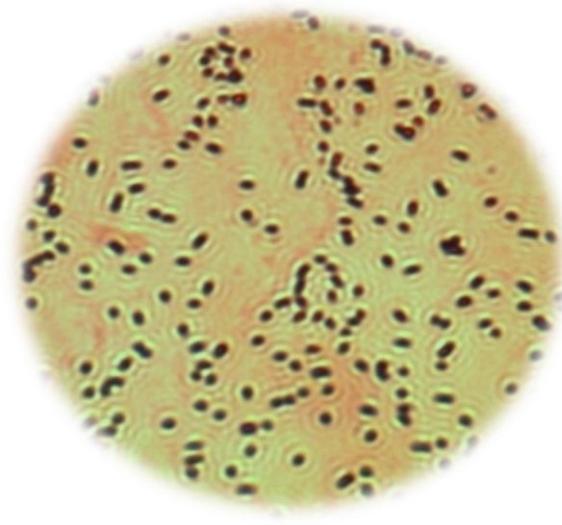


Рис. 3.9. Микропрепарат. Род *Enterococcus* sp. из микрофлоры метасеквойи (X1000).



Рис.3.10. Колонии рода *Escherichia* на среде Левина из микрофлоры ГИНКГО.

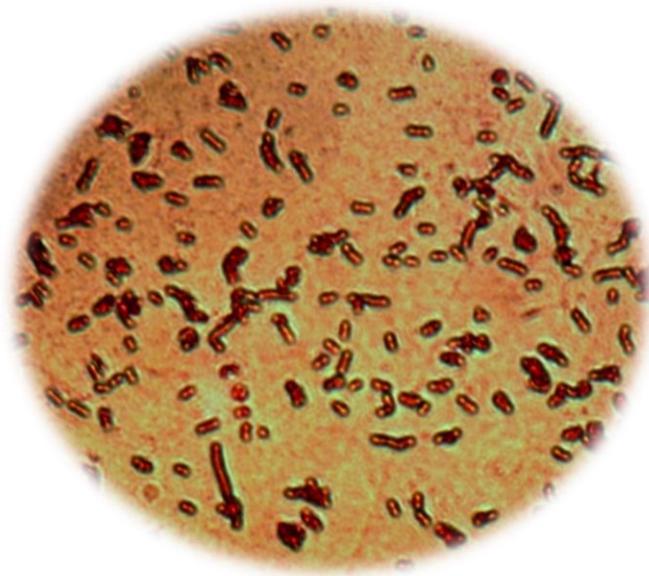


Рис.11. Микропрепарат. Род *Escherichia* из микрофлоры гинкго (X1000).

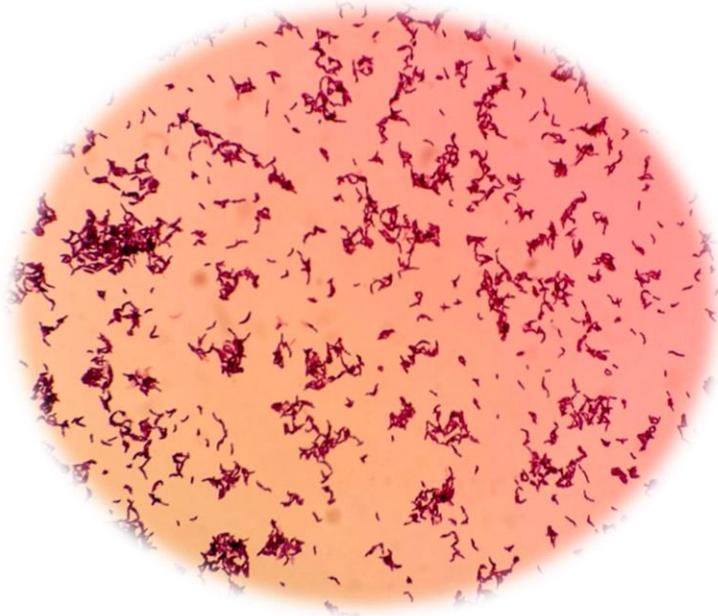


Рис.3.12. Колонии рода *Agrobacterium* на среде Чапека, из микрофлоры метасеквойи.

Рис.3.13. Микропрепарат. Род *Agrobacterium*. из микрофлоры метасеквойи. (X600)

Из всех колоний грибов, выросших на чашках Петри, мы определили принадлежность к Роду *Aspergillus* и *Candida* – дрожжеподобные грибы. Характер роста колоний гриба на чашках представлен в фотографиях.



Рис.3.14. Колонии мицелиальных грибов рода *Aspergillus* на среде Чапека из микрофлоры гинкго.



Рис.3.15. Микропрепарат. Грибы рода *Aspergillus* из микрофлоры гинкго (X600).

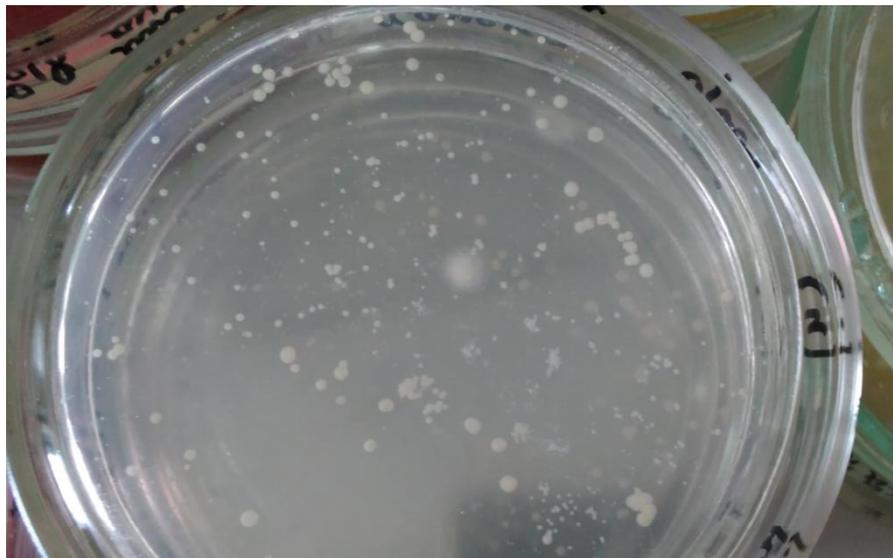


Рис.3.16. Колонии дрожжеподобных грибов рода *Candida* на среде Чапека из микрофлоры метасеквойи.

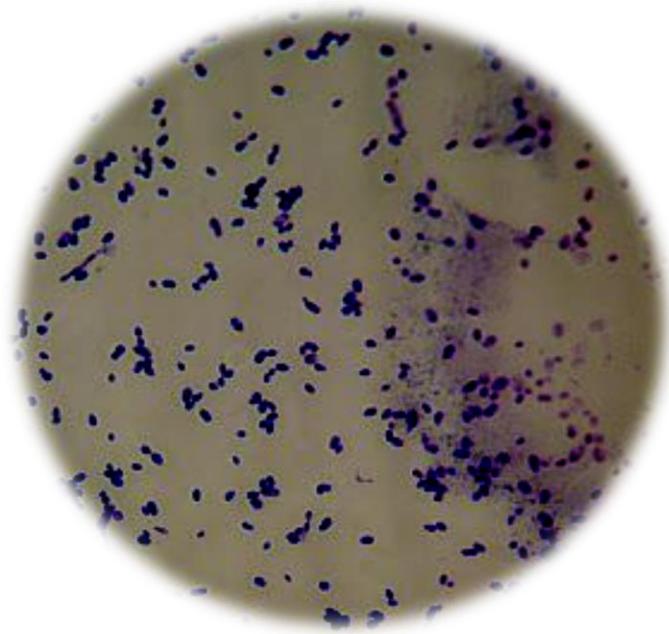


Рис.3.17. Микропрепарат. Дрожжеподобные грибы рода *Candida* из микрофлоры метасеквойи (X1000).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Микрофлора поверхности листьев хорошо изучена, но её характеристики настолько изменчивы под влиянием различных факторов, что исследование количественного и качественного состава остается актуальным постоянно. Она оказывает влияние на рост и развитие растений, а также существенно влияет на жизнь и деятельность растений, так как находится в теснейшем контакте с растениями в течение всего вегетационного периода. К настоящему времени доказано положительное влияние многих микробов-эпифитов и почвенных микроорганизмов. В полной мере не изучены многие стороны взаимоотношений эпифитных микроорганизмов с растениями.

Количество микроорганизмов в микронаселении, контактирующим с растениями, значительно меняется в течение вегетационного периода по фазам развития растений, а также зависит от их вида. Качественный состав бактерий, преобладающих на поверхности растений, в течение вегетационного периода изменяется мало. Отличия у исследуемых растений в различные периоды обнаруживаются, главным образом, в количественном соотношении между отдельными группами микроорганизмов, а не в их качественном составе.

Выводы:

- Определили количество микроорганизмов, встречающихся на поверхности исследуемых растений. По средним значениям наибольшее количество эпифитных микроорганизмов представлено: в весеннем сезоне на листьях гинкго КМАиФАНМ (18634,7), в летнем на

хвое метасеквойи БГКП (5997,9), в осеннем на листьях гинкго КМАиФАНМ (959,7).

- Установили, что обсемененность микроорганизмами, в проведенных исследованиях в разные сезоны года (весна, лето и осень) изменяется в количественном отношении не радикально, но существенно, что доказано статистической обработкой цифровых данных. Так, неочевидная на глаз разница в численности грибов на листьях гинкго между весенним и летним анализами (129,4 и 184,4 КОЕ/см²) объективно существенна на самом высоком уровне вероятности ($p=0,001$).
- В составе эпифитной микрофлоры обнаружены бактерии следующих родов: *Agrobacterium sp.*, *Enterococcus sp.*, *Escherichia sp.* и *Pseudomonas sp.*, по сезонам года качественный состав микрофлоры существенно не изменялся.
- Обнаружены в составе эпифитной микрофлоры дрожжеподобные грибки, представленные только одним родом *Candida sp.*- и мицелиальные грибы рода *Aspergillus sp.*
- Проведенная статистическая обработка показала, что различия всех сравниваемых цифровых характеристик эпифитной микрофлоры статистически значима.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Богорад В.Д. Краткий словарь биологических терминов/В.Д. Богорад//М. – 1963.
2. Бухар М.И. Популярно о микробиологии./М.И. Бухар//М. – 2012. – 218с.
3. Виноградский С.Н. Микробиология почвы./С.Н. Виноградский//М. – 1952 – 897 с.
4. Возняковская Ю.М. Эпифитная микрофлора растений /Ю. М. Возняковская/ Использование микроорганизмов в сельском хозяйстве//М. – 1962, – 100-113 с.

5. Воробьев А.А., Кривошеин Ю.С., Быков А.С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии/ А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин, А.С. Быков//М. – 2001. – 224с.
6. Гамбург К.З.Биохимия ауксина и его действие на клетки растений./ К.З. Гамбург//Н. – 1976. – 272 с.
7. Генкель П.А. Микробиология с основами вирусологии/П.А. Генкель//М., – 1974.–396 с.
8. Гуняженко И.В. Физиология растений с основами биохимии/ И.В. Гудняженко//М.– 1985. – 207 с.
9. ДемченкоЕ.В. Влияние сельскохозяйственной культуры и эколого-географической зоны произрастания на состав эпифитной микрофлоры зерна/Е.В.Демченко/ Успехи современного естествознания// М. – 2004. –т.7. – 95-96 с.
10. Ждан-Пушкина С.М. Основы роста культур микроорганизмов/ Учебное пособие/ С.М. Ждан-Пушкина//Л.– 1983.– 188 с.
11. Жуков А.М. Научно-методическое пособие по диагностике грибных болезней лесных деревьев и кустарников/А.М. Жуков, П.В. Гордиенко//М. – 2001. – 70 с.
12. Коноплева В.И., Гусева Т.М. Методические рекомендации к проведению практических занятий по дисциплине «Основы микробиологии и иммунологии» для студентов факультета среднего профессионального образования/ В.И Коноплева, Т.М. Гусева//Р. – 2013. - 67 с.
13. Красильников Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения/Н.А. Красильников//. – М.– 1958. – 462 с.
14. Лобанов Н.В. Микотрофность древесных растений./Н.В. Лобанов//М. – 1971. — 216 с.
15. Мирчинк Т.Г. Почвенная микробиология/Т.Г. Мирчинк//М. – 1977. – 220 с.
16. Мишустин Е.Н., Емцов В.Т. Микробиология./Е.Н. Мишустин, В.Т.Емцов//М. – 1987. – 320 с.

17. Моисейченко В.Ф., Трифонова М.Ф., Заверюха А.Ф., Ещенко В.Е. Основы научных исследований в агрономии/ В.Ф. Моисейченко, М.Ф. Трифонова, А.Ф. Заверюха, В.Е. Ещенко//М. – 1996 – 336 с.
18. Молчанов А.А., Смирнов В.В. Методика изучения прироста древесных растений./А.А. Молчанов, В.В. Смирнов//М. – 1967. – 95 с.
19. Нам Ким Ден. Миксотрофное питание растений/ Нам Ким Ден/ Международной с/х журнал – № 3. – 2015 – 35-41 с.
20. Нетрусов А.И. Экология микроорганизмов/А.И. Нетрусов//М.– 2004. – 272 с.
21. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Общая микробиологи/А.И. Нетрусов, И.Б. Котова//М.– 2007. – 288 с.
22. Новикова Н.С. Бактериальная флора надземных органов растений/Н.С.Новикова//К. – 1963. – 88 с.
23. Падей Н.Н. Краткий определитель вредителей леса/Н.Н. Падей/Лесная промышленность//М. – 1979. – 240 с.
24. Пасечник В.В. Биология. Бактерии, грибы растения/В.В. Пасечник/Учебник//М. – 1997 – 65 с.
25. Петренко М.Б. Изучение микрофлоры, сопутствующей развитию гороха./ М.Б. Петренко//Микробиологические и биохимические исследования почв. М. – 1971 – 61–63с.
26. Посыпанов Г.С. Растениеводство./Г.С. Посыпанов//М. – 2007 – 612 с.
27. Руссель С. Микроорганизмы и жизнь растений – основа жизни с растениями. – М.–1990. – 27-28 с.
28. Сакович Г.С., Безматерных М.А. Физиология и количественный учет микроорганизмов/Г.С. Сакович, М.А. Безматерных//М. – 2015. – 40 с.
29. Сенашова В.А. Эпифитная микрофлора и заболевания хвои у древесных видов средней Сибири./В.А. Сенашова//К. – №6 – 2009 – 84-87 с.

30. Сидоренко О.Д., Борисенко Е.Г., Ванькова А.А. /Микробиология./О.Д. Сидоренко//Учебник для агротехнологов. М. – 2005. – 287 с.
31. Сиротин А.А. Практикум по микробиологии/ А.А. Сиротин//Б. – 2007 – 80 с.
32. Теппер Е.З. Практикум по микробиологии./Е.З. Теппер//Учебное пособие для вузов. М. – 2004. – 256 с.
33. Шевченко С.В. Лесная фитопатология / С.В. Шевченко//Л. – 1978. – 320
34. Austin B., Goodfellow M. *Pseudomonas mesophillica*, a new species of pink bacteria and selected from leaf surfaces //Int. Syst. Bacteriol – 1979 – Vol. 29, № 4. – 373–378 p.
35. Gershman MD, Kennedy DJ, Noble-Wang J, et al. (2008). \"Multistate outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bloodstream infection after exposure to contaminated heparinized saline flush prepared by a compounding pharmacy\". Clin Infect Dis 47 (11): 1372–1379
36. Smith, R.S. Diseases of Pacific coast conifers / R.S. Smith, R.F. Scharpf. - USDA Forest Service, 1993. - 133 p.
37. Singlair Wayne, A. Diseases of trees and shrubs / A. Singlair Wayne, H. Lyon Howard. - New York: Cornell university Press, Sage House, 2005. - 660 p.
38. George, N. Agrios Plant Pathology, fourth edition / N. George // Department of Plant pathology university of Florida. - 1997. - 635 p.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1.

Таблица 1.

Количественная характеристика эпифитной микрофлоры Семейства

Гинкговые (гинкго), весна.

Среда	Степень разведения	1	2	3	4	Среднее
Чапека	0,01	115(8)	98(11)	76(7)	121(7)	102,5
	0,001	96(2)	127	83(1)	105(2)	102,5
	0,0001	98(16)	117(12)	103(19)	83(12)	100,25
Левина	0,001	716	972	824	1092	900
	0,0001	634	646	564	528	593

	0,00001	508	575	460	527	517,5
МПА	0,0001	788	948	837	1036	902,25
	0,00001	564	828	667	634	673,25
	0,000001	540	476	464	492	493

Приложение 2.

Таблица 2.

Среда	Степень разведения	1	2	3	4	Среднее
Чапека	0,01	127(8)	111(6)	94(5)	108(7)	110
	0,001	97(4)	89(4)	102(5)	113(3)	100,25
	0,0001	82(8)	96(13)	103(11)	87(9)	92
Левина	0,001	1064	937	758	834	898,25
	0,0001	805	689	733	781	752

	0,00001	693	505	547	619	591
МПА	0,0001	941	1005	1053	987	996,5
	0,00001	971	911	884	952	929,5
	0,000001	751	643	774	586	688,5

Количественная характеристика эпифитной микрофлоры Семейства

Кипарисовые (метасеквойя), весна.

Приложение 3.

Таблица 3.

Количественная характеристика эпифитной микрофлоры Семейства

Гинкговые (гинкго), лето.

Среда	Степень разведения	1	2	3	4	Среднее
Чапека	0,01	39	49	68	45	50,25
	0,001	678	607	789	977	762,75
	0,0001	239	205	257	141	210,5

Левина	0,001	586	221	236	229	318
	0,0001	65	17	78	73	58,25
	0,00001	54	48	57	98	64,25
МПА	0,0001	78	120	110	137	111,25
	0,00001	520	705	539	687	612,75
	0,000001	207	182	263	275	231,75

Приложение 4.

Таблица 4.

Количественная характеристика эпифитной микрофлоры Семейства

Кипарисовые (метасеквойя), лето.

Среда	Степень разведения	1	2	3	4	Среднее
Чапка	0,01	472	433	306	457	417
	0,001	404	387	208	398	349,25
	0,0001	206	273	299	268	261,5

Левина	0,001	487	508	393	497	471,25
	0,0001	437	406	363	307	378,25
	0,00001	384	356	397	314	362,75
МПА	0,0001	448	383	361	392	396
	0,00001	250	273	306	266	273,75
	0,000001	205	187	109	198	174,75

Приложение 5.

Таблица 5.

Количественная характеристика эпифитной микрофлоры Семейства

Гинкговые (гинкго), осень.

Среда	Степень разведения	1	2	3	4	Среднее
Чапека	0,01	72	53	79	66	67,5
	0,001	673	694	748	795	727,5
	0,0001	105	257	231	268	215,25

Левина	0,001	248	229	254	365	274
	0,0001	87	105	98	78	92
	0,00001	61	57	65	89	68
МПА	0,0001	110	131	115	127	120,75
	0,00001	679	594	632	653	639,5
	0,000001	269	274	205	298	261,5

Приложение 6.

Таблица 6.

Количественная характеристика эпифитной микрофлоры Семейства

Кипарисовые (метасеквойя), осень.

Среда	Степень разведения	1	2	3	4	Среднее
Чапека	0,01	407	479	452	459	449,25
	0,001	387	391	354	378	377,5

	0,0001	313	290	267	281	287,75
Левина	0,001	527	513	506	495	510,25
	0,0001	416	478	454	436	446
	0,00001	389	354	367	343	363,25
МПА	0,0001	387	404	398	431	405
	0,00001	367	325	297	369	339,5
	0,000001	215	279	235	283	253

Приложение 7.

Таблица 7.

Критические значения t-критерия Стьюдента [17].

Число степеней свободы	Уровень значимости			Число степеней свободы	Уровень значимости		
	0,05	0,01	0,001		0,05	0,01	0,001
1	12,71	63,66	—	18	2,10	2,88	3,92
2	4,30	9,93	31,60	19	2,09	2,86	3,88
3	3,18	5,84	12,94	20	2,09	2,85	3,85
4	2,78	4,60	8,61	21	2,08	2,83	3,82
5	2,57	4,03	6,86	22	2,07	2,82	3,79
6	2,45	3,71	5,96	23	2,07	2,81	3,77
7	2,37	3,50	5,41	24	2,06	2,80	3,75
8	2,31	3,36	5,04	25	2,06	2,79	3,73
9	2,26	3,25	4,78	26	2,06	2,78	3,71
10	2,23	3,17	4,59	27	2,05	2,77	3,69
11	2,20	3,11	4,44	28	2,05	2,76	3,67
12	2,18	3,06	4,32	29	2,05	2,76	3,66
13	2,16	3,01	4,22	30	2,04	2,75	3,65
14	2,15	2,98	4,14	50	2,01	2,68	3,50
15	2,13	2,95	4,07	100	1,98	2,63	3,39
16	2,12	2,92	4,02				
17	2,11	2,90	3,97				