

АУ ДО РА «РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ»
ДЕТСКИЙ ТЕХНОПАРК КВАНТОРИУМ 04
Республика Алтай

**АЗОТОФИКСИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОТЫ
ЮЖНОГО СКЛОНА ГОРЫ ТУГАЯ ГОРОДА ГОРНО-АЛТАЙСКА**

Выполнили:

Афанасьева Варвара Сергеевна,
Прасоль Екатерина Андреевна,
Гончарова Екатерина Денисовна
обучающиеся т.о «7СОТ:
Биопроектирование»

Руководитель: Малкова А.Н, к.б.н,
педагог дополнительного
образования

АУ ДО РА «Республиканский центр
дополнительного образования»

Горно-Алтайск, 2021

СОДЕРЖАНИЕ:

Введение	3
Глава 1 Знакомство с объектом исследования и условиями его обитания	4
1.1. Азотофиксирующие бактерии – общая характеристика	4
1.2. Физико-географические особенности г. Горно-Алтайска	6
Глава 2 Методика исследования	7
Глава 3 Результаты исследования почвенных проб модельных участков низкогорья Горного Алтая	9
Выводы	12
Литература	13
Приложение	14

ВВЕДЕНИЕ

Специальных исследований содержания азотфиксирующих бактерий в почвах Горного Алтая ранее не проводилось. Алтай отличается большим разнообразием почв, и их перераспределение связано с высотной поясностью. Высотные почвенные пояса в природных комплексах Горного Алтая выражены различно, их можно проследить по аналогичной поясности растительности [1]. Наибольший интерес в изучении азотфиксирующих бактерий *Azotobacter*, являющихся основными природными стимуляторами здорового роста и развития растений, представляют низкогорные высотные пояса, где сосредоточены основные площади земель, используемых аграрным сельским хозяйством республики.

Цель нашей работы - изучение специфики распространения и экологической приуроченности азотфиксирующих бактерий в почвенном покрове низкогорий Алтая на примере модельных участков, расположенных на территории эколого-биологического отдела АУ ДО РА «Республиканский центр дополнительного образования».

Задачи:

1. Изучить литературу на тему особенности биологии и практической значимости азотфиксирующих бактерий.
2. Изучить методику исследования азотфиксирующих бактерий.
3. Определиться с модельными биотопами и провести сбор первичного материала.
4. Провести посевы для обнаружения и определения видовой принадлежности колоний азотфиксирующих бактерий.
5. Сделать выводы по распределению азотфиксирующих бактерий в разных почвенных условиях.

Гипотеза: Мы считаем, что анализ присутствия и распределения *Azotobacter* в почвах низкогорий Алтая даст ценную информацию о свойствах плодородного слоя и может иметь существенное значение для повышения эффективности сельского хозяйства республики.

Исследовательская работа проводилась в период с ноября 2020 по апрель 2021 года. Часть результатов исследования были представлены на Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» в г. Новосибирске. Исследовательская работа является частью Общероссийского сетевого школьного проекта «Охотник за микробами», в рамках которого получила признание от руководителей данного проекта.

ГЛАВА 1. ЗНАКОМСТВО С ОБЪЕКТОМ ИССЛЕДОВАНИЯ И УСЛОВИЯМИ ЕГО ОБИТАНИЯ

1.1. АЗОТОФИКСИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ

Азотификация – это процесс перевода молекулярного азота из атмосферы (N_2) в восстановленную растворимую форму. Растворимые соединения азота доступны для усваивания растениями, а почва, насыщенная такими соединениями, считается более плодородной. Содержание и соотношение растворимых форм азота в почве постоянно изменяются в результате их усвоения растениями, сбором урожая, а также вследствие эрозии¹, вымывания и денитрификации². Описанные процессы относят соединения азота к одному из главных и дефицитных элементов питания естественных и сельскохозяйственных экосистем, а азотификсаторы играют важную роль в круговороте азота в природе и в биосфере в целом.

Азотификацию способны осуществлять прокариоты (одноклеточные живые организмы, не обладающие оформленным клеточным ядром и другими внутренними мембранными органоидами), тогда как у эукариот (живые организмы, клетки которых имеют ядро) отсутствуют гены, ответственные за данный процесс. Наиболее известные азотификсирющие симбиотические бактерии – *Rhizobium* sp. В симбиоз бактерии вступают с представителями семейства бобовых, крапивных, канаплёвых. В результате почва в пределах корневой системы растений обогащается азотом, легко усваиваемым растениями и, если особенно говорить о бобовых культурах, то следствием симбиоза является увеличение содержания на посевной площади высококачественного легкоусвояемого белка. *Rhizobium* sp. используются в производстве биологических удобрений для бобовых растений.

Azotobacter – это род свободноживущих грамотрицательных бактерий, обитающих в почве. *Azotobacter chroococcum* был впервые выделен в чистой культуре голландским ученым М. Бейеринком в 1901 году.

Представители рода *Azotobacter* чаще всего обитают в нейтральных и слабощелочных почвах, а также в пресноводных водоемах и солоноватоводных болотах. Однако, некоторые представители *Azotobacter* были обнаружены и в экстремальных условиях: в почвах северного и южного полярного и антарктического региона. *Azotobacter* нередко образуют симбиотическую связь с растениями и живут в ризосфере – узком слое почвы, прилегающем к корням растений толщиной около 2-5 мм. Представители данного рода получают энергию в ходе окислительно-восстановительных реакций, используя углеводы, спирты и соли органических кислот. Азотификсаторы способны фиксировать по крайней мере 10 микрограмм азота на 1 грамм потребленной глюкозы. Бактерии *Azotobacter* способны расти и осуществлять процесс фиксации азота в

¹ Эрозия- разрушение горных пород поверхностными водными потоками, ветром и т.д., включающие в себя отрыв и вынос обломков материала.

² Денитрификация - восстановление нитрата, в результате азот возвращается в атмосферу и становится недоступным большинству организмов.

диапазоне рН от 4,8 до 8,5, а оптимальным для жизнедеятельности данных организмов считается диапазон рН 7,0-7,5.

Дефицит питательных элементов, засоление почв, наличие тяжелых металлов, биоциды, органическая влажность и сочетание всех вышеперечисленных неблагоприятных условий может приводить к исчезновению популяции азотфиксаторов и изменению микробиоценоза почвы. Задача поиска штаммов азотфиксаторов, устойчивых к дефицитным условиям, является очень актуальной. Современные исследователи регулярно находят и описывают новые азотфиксирующие бактерии, однако их внедрение в сельское хозяйство затрудняется низкой азотфиксирующей активностью в стрессовых условиях [2].

1.2. ФИЗИКО - ГЕОГРАФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ г. ГОРНО-АЛТАЙСКА

Город Горно-Алтайск расположен в низкогорьях Алтая (85° 65' в.д., 51° 49' с.ш.) среди хребтов горы Иолго на стыке двух физико-географических провинций: северной и северо-восточной. Он имеет вытянутый характер размещения жилых построек в основном по долинам рек Майма, Улалушка и Каяс. Такие особенности города оставляют отпечаток и на типе жилой застройки: здесь преобладает одноэтажная застройка, многоэтажная расположена только в самом центре города. Через центр города проходят две крупные автомагистрали по проспекту Коммунистический и улице Чорос-Гуркина.

Климатические особенности города в значительной степени определяются своеобразием горного рельефа. Горы сильно снижают скорость ветра и направляют его вдоль долины. Кроме того, в Горно-Алтайске наблюдается суточная смена горно-долинных ветров. Сезоны в течение года сменяются скачкообразно. Самый холодный месяц – январь, средняя температура - 15,9⁰С, минимальная -49⁰С. Среднегодовая температура воздуха +1⁰С. Осадков в городе в среднем выпадает 726 мм в год [3].

ГЛАВА 2. МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Пробы почвенной микробиоты взяты 15 ноября 2020г. в шести местообитаниях, в каждом из которых материал собирали на глубине 20, 40 и 70 см.

Описание участков, а также почвенного среза приводится в видеоотчёте: <https://youtu.be/SL5rEPBCxss>.

На данный момент исследовано четыре местообитания: аллея хвойных растений, учебно-опытный участок, участок для сенокошения, посадки мелколиственных пород деревьев. Для каждого из четырех исследованных участков получены пробы на трех глубинных уровнях.

Как проводить сбор и анализ почвенных образцов приводим в приложении. Это свод этапов сбора и записи почвенных проб для дальнейшего исследования в лаборатории.

Для выполнения лабораторных работ потребуются компоненты, которые представлены в наборе «Охотник за микробами»:

- Чашка Петри – емкость для посева колоний;
- Соли для приготовления среды Эшби = K_2SO_4 , K_2HPO_4 , $NaCl$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCO_3$;
- Органические компоненты среды Эшби – агар и глюкоза;
- Пипетка Пастера
- Зубочистки – вспомогательный инструмент для распределения комочков земли.

Мы проверили также на ши почвы на карбонаты с помощью перекиси водорода и кислотность почв pH с помощью лакмусовой бумаги и электродов набора «Экологический патруль».

Для того чтобы произвести посев бактерий методом комочков, необходимо предварительно нарисовать схему на листах бумаги:

- 1) возьмём белый лист бумаги и обведём на нем контур чашки Петри (части с меньшим диаметром);
- 2) нарисуем в контуре чашки Петри трафарет «клеточки 10x10 мм».

Подготовка почвы для анализа:

- 1) Образцы почвы высушить, убрать крупные остатки растительности, камни, мусор;
- 2) Перенести ~3 грамма почвы пустую чашку Петри или любую другую емкость с бортиком;
- 3) К почве с помощью пипетки Пастера по каплям добавлять дистиллированную воду до получения пастообразной массы;
- 4) Увлажненную почву (полученную пасту) тщательно перемешать с помощью зубочистки;

Посев:

- 1) Из увлажненной почвы отделить 40-50 комочком диаметром ~3-4 мм;
- 2) Чашку Петри, заполненную застывшей средой, разместить на трафарете, совместив края чашки с контуром трафарета;

3) В чашке Петри в узлах трафарета разместите подготовленные комочки земли так, как показано в методичке.

4) Чашки Петри накрыть крышками и оставить на 3-4 дня при комнатной температуре.

Желательно хранить чашки Петри во влажной атмосфере. Для создания более влажной среды можно накрыть чашки «колпочками» из пластиковых бутылок.

Наблюдаемые эффекты:

- 1) Через 3-4 дня после посева вокруг комочков должны появиться обрастания;
- 2) Проверять рост колоний бактерий каждые три дня и фотографировать;
- 3) Через 10 дней можно приступить к микроскопическим исследованиям.

В общей сложности проведено 36 посевов (фото смотрите в приложении).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЧВЕННЫХ ПРОБ МОДЕЛЬНЫХ УЧАСТКОВ НИЗКОГОРЬЯ ГОРНОГО АЛТАЯ

Для каждого из четырех исследованных участков получены пробы на трех глубинных уровнях в трехкратной повторности.

Таблица 1

Характеристика шести ключевых участков, где взяты пробы

Типовые ландшафты	Естественные урочища низкогорий Алтая			Антропогенные площадки в условиях низкогорий Алтая	
	Плодовый сад	Хвойные лесопосадки	Мелколиственные лесопосадки	Покося	Учебно-опытный отдел
Название точек сбора проб	Посадки плодовых сортов яблонь и груш	Лесопосадки сибирского кедра, лиственницы, пихты, ели	Плодовый сад, тополь, ива, берёза повислая	разнотравно - дерновинно-злаковые растения	Овощные культуры для кормления животных живого уголка (в основном морковь, капуста)

Мы изначально проверили почву на карбонаты. В наших пробах они не обнаружены.

Затем мы провели исследование проб на кислотность - показатель рН. И пришли к выводу, что показатель рН плодового сада понижается в кислую сторону и скорее всего зависит от того, что уже зафиксирован опад груш и яблонь. И началось брожение плодов. Участок хвойных лесопосадок в верхних слоях имеет также показатель рН ближе к кислому. Анализ рН с помощью лакмусовых индикаторов и датчика совпадают.

Таблица 2

Оценка рН среды проб почв ключевых участков исследования

Глубина сбора пробы (см)	Плодовый сад	Хвойные лесопосадки	Мелколиственные лесопосадки	Покося	Учебно-опытный отдел
20	5	5	6	5	7
40	6	8	7	6	8
70	6	8	7	7	8

Мы провели посев и микробиологические исследования согласно предложенной методике. В результате в общей сложности проведено 36 посевов с целью определения содержания азотфиксирующих бактерий.

По результатам посевов и наблюдения за ростом колоний бактерий во всех местообитаниях, но не во всех пробах, выявлено обрастание комочков земли (приложение).

В почвах всех исследованных участков, кроме аллеи хвойных пород, в бактериологических посевах обнаружены колонии *Azotobacter agilis*. В почвах аллеи хвойных деревьев и посадок мелколиственных пород обнаружены колонии *A. vinelandii*. В почвах посадок мелколиственных пород, кроме того, обнаружены колонии *A. chroococcum*. В посевах из места обитания хвойных деревьев удалось обнаружить колонии бактерий только в одной пробе на глубине 70 см (*A. vinelandii* 100% обрастание). Здесь скудное содержание азотфиксирующих бактерий, по нашему мнению, может быть связано с присутствием в почве смолистых веществ и фитонцидов хвойных пород. В посевах проб из учебно-опытного участка колонии *A. agilis* присутствовали в двух из трёх повторностях на глубине 40 см. Обрастание 100%. На участке сонокоса, с плотным дерновым слоем колонии *A. agilis* также обнаружены только в пробе на глубине 70 см. Видимо в данных условиях сказывается фактор сильного уплотнения верхних слоёв почвы. В чашках Петри с пробами из лесопосадок мелколиственных пород деревьев обрастание комочков земли составило от 80 до 100%. *A. vinelandii* в пробе на глубине 20 см представлены двумя колониями. В пробах взятых на глубине 40 см разрастание колоний *A. agilis* и *A. chroococcum* проявилось в соотношении 1:1, общее обрастание 100%.

Таблица 3

Видовая принадлежность колоний *Azotobacter*

Название точек сбора проб	Плодовый сад	Хвойные лесопосадки	Мелколиственные лесопосадки	Покосы	Учебно-опытный отдел
Вид <i>Azotobacter</i>	<i>A. agilis</i>	<i>A. vinelandii</i>	<i>A. vinelandii</i> <i>A. chroococcum</i> <i>A. agilis</i>	<i>A. agilis</i>	<i>A. agilis</i>

Таблица 4.

Степень обрастания среды в чашках Петри (в %)

Название точек сбора проб	Плодовый сад	Хвойные лесопосадки	Мелколиственные лесопосадки	Покосы	Учебно-опытный отдел
Глубина обнаружения					
20 см.			80-100%		
40 см.	60-70%		100%		100%
70 см.		100%		100%	

Таким образом, при изучении распространения аэробных бактерий *Azotobacter* в изученных слоях почв в условиях низкогорного пояса Алтая прослеживается зависимость видового состава и частоты их встречаемости от наличия смолистых веществ хвойных деревьев и степени плотности дерновины.

ВЫВОДЫ

1. На наличие *Azotobacter* исследовано пять местообитаний: аллея хвойных, посадки мелколиственных деревьев, учебно-опытный участок, покосы, плодовый сад.
2. Для каждого из пяти участков получены пробы на трех уровнях глубины в троекратной повторности. В общей сложности проведен 51 посев.
3. Нами обнаружены колонии трёх видов азотфиксирующих бактерий: *Azotobacter vinelandii*, *A. chroococcum*, *A. agilis*.
4. Почва в аллее хвойных содержит азотфиксирующие бактерии только на большой глубине, что может быть связано с отсутствием травянистой почвопокровной растительности.
5. В пробе взятой на участке, используемой для покоса выявлена аналогичная картина, но связана она с высокой уплотнённостью верхних слоёв почвы.
6. На распределение *Azotobacter* в средних слоях на учебно-опытном участке повлияли недавние работы по подготовке почвы к зиме и её распашке.
7. Наиболее богатыми азотистыми бактериями оказались пробы посадок мелколиственных пород, где земля не подвергалась механическому воздействию и за счёт корневой системы достаточно аэрируема и не так уплотнена.

ЛИТЕРАТУРА

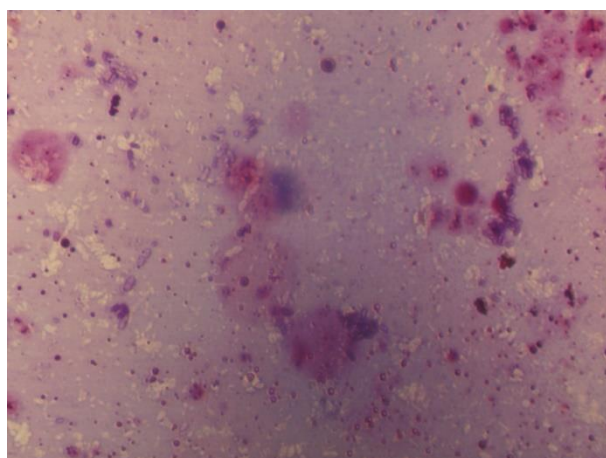
1. Горный Алтай / Под редакцией В.С. Ревякина. [текст] – Томск: Томский университет, 1971 – 250 с.
2. Охотник за микробами / методические рекомендации и инструкции по применению набора. – Новосибирск, 2020. – 30 с.
3. Маринин А.М., Самойлова Г.С. Физическая география Горного Алтая: Учебное пособие по спецкурсу. - Барнаул: БГПИ, 1987. - 110 с.

Посевы в чашки Петри

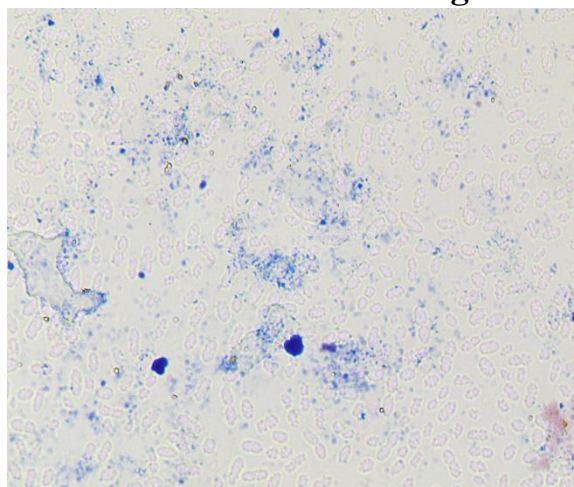


Виды азотфиксирующих бактерий под микроскопом

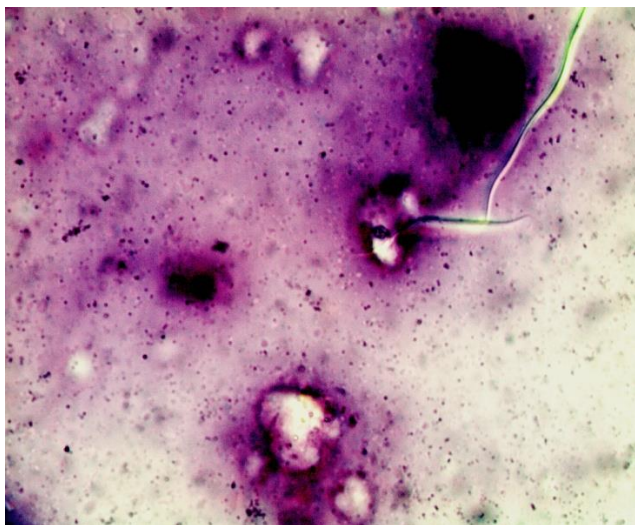
Azotobacter chroococcum



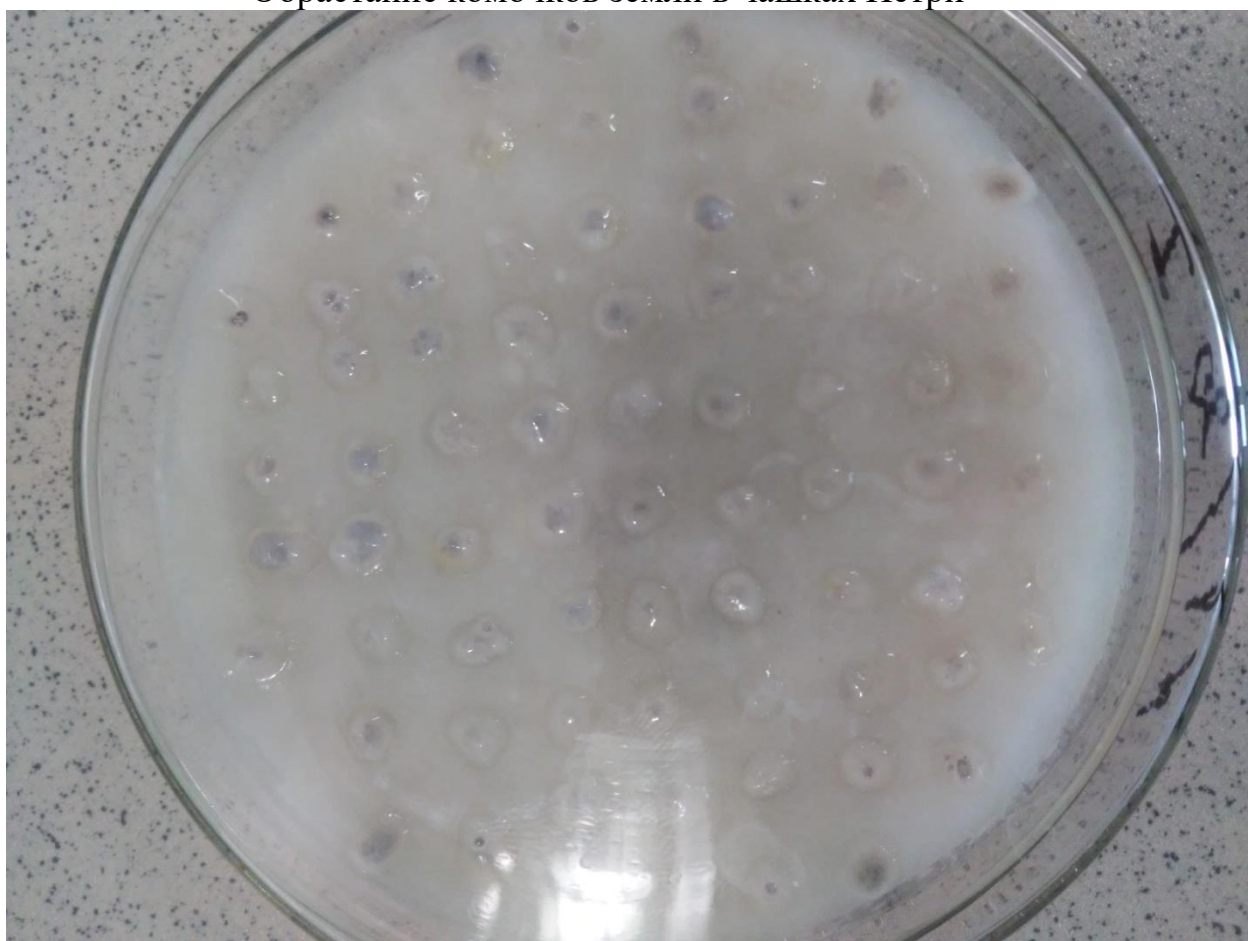
Azotobacter agilis



Azotobacter vinelandii



Обрастание комочков земли в чашках Петри



Наша команда

