

ДЕПАРТАМЕНТ ОБРАЗОВАНИЯ
АДМИНИСТРАЦИИ МУНИЦИПАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ ГОРОД КРАСНОДАР
МУНИЦИПАЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «МАЛАЯ
АКАДЕМИЯ» МУНИЦИПАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ ГОРОД КРАСНОДАР
(МУ ДО «МАЛАЯ АКАДЕМИЯ»)

Исследовательская работа
**АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВ ПРЕДГОРНЫХ И
ГОРНЫХ ЗОН АПШЕРОНСКОГО РАЙОНА
КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ»**

Выполнил:
учащийся МУ ДО «Малая
академия» объединения
«Горизонты биологии»
9 класса МАОУ лицей №12
города Краснодара
Писаревский Михаил Андреевич

Научный руководитель:
педагог дополнительного
образования
МУ ДО «Малая академия»
Гниденко Елена Николаевна

г. Краснодар, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	5
1.1. Бактерии рода <i>Azotobacter</i>	5
1.2. Свойства бактерий рода <i>Azotobacter</i>	5
1.3. Морфологическая характеристика.....	6
1.4. Физиологические и культуральные свойства	6
1.5. Взаимодействие бактерий рода <i>Azotobacter</i> с высшими растениями	8
1.6. Влияние факторов внешней среды на азотобактер	8
2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	13
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	18
3.1. Характеристика почв предгорных и горных зон Гуамского ущелья.....	18
3.2. Азотфиксирующая активность исследованных образцов	20
3.3. Выделение чистых культур <i>Azotobacter</i>	21
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	23
СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ	24
Приложение 1	25
Приложение 2.....	30
Приложение 3.....	32

ВВЕДЕНИЕ

В условиях антропогенного изменения окружающей среды совершенствование методов биотестирования состояния почвы остается актуальной проблемой биологии и экологии. Известной тест-культурой для этих целей являются бактерии рода *Azotobacter*.

Интерес исследователей к роду *Azotobacter* не ослабевает с момента их обнаружения в 1901 г. В XXI веке эти бактерии становятся объектом исследований в области биотехнологии – широкий спектр уникальных соединений, синтезируемых ими, используют в самых разных областях науки и технологий.

Простая техника выделения, характерная морфология клеток позволили использовать азотобактер в качестве удобного индикатора для оценки состояния среды. Исходным положением в интерпретации результатов биотеста было утверждение, что чем выше заселенность почвы азотобактером, тем плодороднее почва (Мишустин, Шильникова, 1968), то есть обилие этих бактерий оценивалось как положительное агрономическое свойство почвы. В последующем этот показатель стали применять в экологических оценках и обилие азотобактера считают положительным свойством почвы (Свистова, Истомина, 2019; Скугорева и др., 2012, 2019).

Использование биоудобрений на основе азотобактера способствует увеличению количества и улучшению качества урожая. Бактерии рода *Azotobacter* способны колонизировать ризосферу различных растений, а также стимулировать деятельность аборигенной микрофлоры. Биологические препараты на основе азотобактера позволяют значительно снизить расход азотных удобрений. Поэтому поиск новых штаммов азотфиксирующих бактерий, проявляющих антагонистическую активность по отношению к грибным фитопатогенам, обладающих комплексом свойств, благоприятно воздействующих на растения, и перспективных с точки зрения создания биопрепаратов является актуальной задачей прикладной микробиологии.

Работа выполнена в рамках исследовательского проекта «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов, как основа новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами» при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Целью исследования является изучение азотфиксирующей активности почв предгорных и горных зон Апшеронского района Краснодарского края.

Задачи исследования:

1. Выполнить почвенные разрезы и сбор почвенных образцов в Гуамском ущелье и его окрестностях;
2. Определить механический и химический состав почвы;
3. Выполнить микробиологическое исследование образцов почв предгорных и горных зон Апшеронского района Краснодарского края на наличие азотфиксирующей активности;
4. Заполнить электронную базу данных «Всероссийского атласа почвенных микроорганизмов»;
5. Отправить образцы почвы для дальнейшего исследования в Институт химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ СО РАН) (г. Новосибирск).

Объект исследования: почвы предгорных и горных зон Апшеронского района Краснодарского края.

Предмет исследования: азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter*.

Гипотеза: Следует предположить, что в почвах Гуамского ущелья можно встретить штаммы азотфиксирующих бактерий, которые обладают разной микробиологической активностью.

Практическая значимость: Выделенные штаммы *Azotobacter* в ходе выполнения проекта будут использованы для поиска новых штаммов азотфиксирующих бактерий, продуцентов антибиотиков и продуцентов протеаз.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Бактерии рода *Azotobacter*

Систематическое положение бактерий рода *Azotobacter* по Берджи (1997):

Отдел *Gracilicutes*

Класс *Scotobacteria*

Семейство *Azotobacteriaceae*

Род *Azotobacter*

Типовой вид: *Azotobacterchroococcum*

Позднее бактерии были перенесены в семейство *Pseudomonadaceae* на основании изучения нуклеотидных последовательностей.

Современное систематическое положение:

Домен *Bacteria*

Тип *Proteobacteria*

Класс *Gammaproteobacteria*

Порядок *Pseudomodales*

Семейство *Pseudomonadaceae*

Подсемейство *Azotobactergroup*

Род *Azotobacter*

Вид *Azotobacter chroococcum* (Catalogue of Life, 2015).

1.2. Свойства 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 (Шлегель, 1987).

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

Представители рода обитают в нейтральных и слабощелочных почвах, воде и в ассоциации с некоторыми растениями (Tejera N. et al., 2005).

Бактерии род *Azotobacter* являются эффективным стимулятором разных видов растений, что объясняется их способностью фиксировать молекулярный азот; синтезировать витамины и гормоны роста; проявлять биоконтролирующую активность фитопатогенов за счет продуцирования антибиотиков, способностью некоторых штаммов азотобактер мобилизовывать труднорастворимые соединения фосфора, улучшая фосфорное питание растений, а также ослаблять действие на прорастающие семена неблагоприятных факторов.

1.3. Морфологическая характеристика

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 (Определитель бактерий Берджи, 1997).

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 (Baillie A. et al., 1962; Колешко О.И., 1981).

1.4. 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 (Мишке И.В., 1988).

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 (Мишустин Е.Н., Шильникова В.К., 1968).

Способны расти в диапазоне рН от 4,8 до 8,5. Оптимум рН для роста и фиксации азота 7,0 – 7,5. (Определитель бактерий Берджи, 1997).

Источником углерода и энергии для азотобактера могут служить разнообразные органические кислоты жирного и ароматического ряда, одно- и многоатомные спирты и сахара (Колешко О.И., 1981).

Было установлено, что азотобактер способен вырабатывать фунгистатическое вещество, относящееся к группе анисомицина (Мишустин Е.Н., 1972). Культура *Azotobacter chroococcum* способна продуцировать противогрибковый полиеновый антибиотик азохроомицин, активный против значительного числа фитопатогенных грибов.

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 (Блинков Г.К., 1959; Зайцева Г.Н., 1965; Мишустин Е.Н., Шильникова В.К., 1968).

1.5. 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 (Кравченко Л.В., Леонова Е.И., 1993; ZahirZ. A. et al., 2004).

Как уже было упомянуто, азотобактер обладают фунгистатическим действием и продуцирует антибиотические вещества. Показана способность задержки роста фитопатогенных бактерий и фитопатогенных грибов, некоторыми штаммами азотобактера, стимулирующих прорастание семян огурцов (Антипчук А.Ф. и др., 1985).

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 (Кравченко Л.В., Леонова Е.И., 1993).

1.6. Влияние факторов внешней среды на азотобактер

Значение pH среды. Азотобактер чрезвычайно требователен к реакции среды. Бактерии этого рода тяготеют к нейтральным почвам и плохо переносят

подкисление (Мишустин Е.Н., Шильникова В.К., 1968; Мишустин Е.Н., 1975; Колешко О.И., 1981).

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 (Мишустин Е.Н., 1975, Колешко О.И., 1981).

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 (Мишустин, Шильникова, 1968; Колешко, 1981; Дарзник Ю.О., 1982).

Уровень аэрации. Рассматривая кислородный режим, необходимый азотобактеру, следует отметить, что данный микроорганизм является аэробом. Аэрация, как отмечают многие исследователи, благоприятствует размножению азотобактера (Мишустин Е.Н., Шильникова В.К., 1968). Вместе с тем установлено, что азотобактер может размножаться и в микроаэрофильных условиях. При слишком высоком уровне аэрации может наблюдаться уменьшение накопления биомассы.

Влажность. Азотобактер является организмом, предъявляющим высокие требования к влажности почвы. Большая влаголюбивость азотобактера отмечается во многих исследованиях (Мишустин Е.Н., Шильникова В.К., 1968; Мишустин Е.Н., 1975). Это делает понятным зависимость во многих случаях динамики численности азотобактера в почве от ее влажности. Глубина

проникновения азотобактера в почву также определяется в значительной степени обеспеченностью почвы влагой (Мишустин Е.Н., Шильникова В.К., 1968; Колешко О.И., 1981).

Температура. В отношении температуры азотобактер является типичным мезофилом. Положение оптимальной температурной точки развития может несколько меняться в зависимости от состава и рН среды. Большинство исследователей указывают, однако, на 25⁰-30⁰ С как на оптимальную температурную зону развития этой бактерии (Мишустин Е.Н., Шильникова В.К., 1968; Колешко О.И., 1981). 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 (Мишустин, Шильникова, 1968). По данным О. И. Колешко (1981) даже пятиминутное прогревание культуры при 40⁰ С приводит к гибели до 15-20% клеток, при 50⁰С отмирание клеток составляет до 30%. При увеличении экспозиции прогревания до 30 мин практически не оставалось жизнеспособных клеток.

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 (Tsai J.C. et al, 1979).

Отличительной особенностью бактерий рода *Azotobacter* является их высокая требовательность к наличию в среде микроэлементов. Совершенно необходим для большинства культур молибден (Мишустин Е. Н., Шильникова В.К., 1968).

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. Но он не является жизненно необходимым элементом для азотобактера (Мишустин Е. Н., Шильникова В. К., 1968).

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.

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 (Мишустин Е. Н., Шильникова В. К., 1968, Мишустин Е. Н., 1975; Умаров М. М., 1986). 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 (Колешко О.И., 1981).

Азотобактер достаточно требователен к условиям среды обитания, что может быть использовано для индикации агрономических качеств почв (Мишустин, Шильникова, 1968; Мишустин, 1972; Умаров, 1986; Самсонов, 1987; Шлегель 1987). 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. (Gomez et al, 1999). Активно исследовался характер влияния различных пестицидов на микрофлору на примере азотфиксаторов (Kanungo et al., 1995; Patnaik et al., 1995, Gomez et al., 1999).

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поскольку идеальной средой обитания для представителей *Azotobacter* является влажная почва с рН близким к нейтральному значению (значение рН для нейтральных растворов равно 7), а также хорошим доступом воздуха и наличием солей кальция, фосфора и калия, а оптимальной температурой роста бактерий *Azotobacter* является 25-30° С, то было проанализировано, в каких близлежащих почвенных объектах вероятнее всего можно встретить *Azotobacter*.

Материал был собран в предгорных и горных зонах Апшеронского района Краснодарского края, преимущественно в Гуамском ущелье и его окрестностях в пределах координат 44.23° с.ш. и 39.87° в.д. (Приложение 1):

1. Глухой буково-грабовый лес;
2. Луговое разнотравье;
3. Самшитовая роща;
4. Пойменная терраса русла реки Курджипс;
5. Верхний слой почвенного покрова у подножья скал ущелья Гуама;
6. Каменистая почва в горной местности;
7. Глинистая почва, устье ручья;
8. Алебастровая балка, твердая красная глина.

Следуя методическим рекомендациям Зенова Г.М. и др. (2002), был проведен отбор проб почв с применением поверхностных почвенных разрезов в различных ландшафтных зонах Гуамского ущелья (глубиной до 50 см) (рис. 1, приложение 1).

В лабораторном блокноте фиксировались координаты отборов почвенных проб, проставлялись даты, описывалось местоположение взятия образца, характеристика механического и химического состава. Фотографировались почвенные разрезы, местность, в которой сделан почвенный разрез так, чтобы были видны растительность и рельеф. Разрезу

присваивался номер, указывались GPS-координаты. Образцы почвы паковались в zip-lock пакеты.



Рисунок 1 – Отбор почвенных образцов

Для определения гранулометрического состава почвы в полевых условиях насыпалась примерно одна столовая ложка почвы в ладонь. С помощью пипетки Пастера к почве подливалась вода и тщательно перемешивалась с почвой до получения как можно более вязкого «теста». Из полученного «теста» скатывался шарик диаметром 2-3 см, растягивался в жгут и соединялся в колечко. Результаты соотносились с данными таблицы и делались выводы о механическом составе исследуемой почвы (рис. 2).

Если почва глинистая - шнур при сгибании в кольцо не ломается и не растрескивается. Шнур из суглинистой почвы при сгибании в кольцо разламывается. При этом выделяются три разновидности: тяжелый суглинок - кольцо с трещинами, средний - кольцо при свертывании распадается, легкий суглинок - шнур дробится при раскатывании. Из супесчаной почвы можно

получить только непрочный, легко рассыпающийся шарик, шнур из которого сразу же распадается на фрагменты. Из песчаной почвы шнур приготовить нельзя.



Рисунок 2 – Определение гранулометрического состава почвы и рН

Для качественного определения карбонатов в почве использовался 0,1 раствор HCl. С помощью пипетки Пастера наносилось несколько капель кислоты на почву (рис 3). Если в почве находилось значительное количество карбонатов, то на срезе наблюдалось вспенивание. Карбонаты способны реагировать с соляной кислотой по следующей реакции: $\text{CO}_3^{2-} + 2\text{H}^+ = \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$. В результате реакции выделяется углекислый газ, который и обуславливает вспенивание.

3.



Рисунок 3 – Определение карбонатов в почве

Провели микробиологическое исследование почвенных образцов.

Для выполнения посева и контролирования роста колоний бактерий *Azotobacter* были подготовлены трафареты для чашки Петри, подготовлен вспомогательный раствор солей (в колбу, объемом 1 литр налили 300-400 мл воды, всыпали в колбу с водой: NaCl, K₂SO₄, MgSO₄*7H₂O и K₂HPO₄ и перемешали смесь до полного растворения).

Также для исследования была подготовлена среда Эшби (200 мл):

- 1 г CaCO₃;
- 3 г Агара; 1
- 4 г глюкозы;

В 200 мл вспомогательного раствора перенесли CaCO₃, Агар и глюкозу, смесь в стакане перемешали до состояния однородной взвеси. Смесь вскипятили на плите до максимального растворения компонентов (часть взвеси не растворилась, однако большая часть компонентов перешла в раствор). Смесь охладили до 50-60°C и заполнили ей чашки Петри, так, чтобы смесь полностью покрывала дно.

Далее подготовили почву для анализа:

- 1) Образцы почвы высушили убрали крупные остатки растительности, камни, мусор. Просеяли почву через сито с диаметром ячеек 1-2 мм.
- 2) Перенесли примерно 3 грамма почвы в пустую чашку Петри.
- 3) К почве с помощью пипетки Пастера по каплям добавляли дистиллированную воду до получения пастообразной массы;
- 4) Увлажненную почву (полученную пасту) тщательно перемешали с помощью зубочистки.

Провели посев (рис. 4):

- 1) Из увлажненной почвы отделили 50 комочков диаметром примерно 3-4 мм.
- 2) Чашку Петри, заполненную застывшей средой, разместили на трафарете, совместив края чашки с контуром трафарета.
- 3) В чашке Петри в углах трафарета, при помощи зубочисток разместили

подготовленные комочки земли.

4) Чашки Петри накрыли крышками и оставить на 3-4 дня при комнатной температуре. Поскольку желательно хранить чашки Петри во влажной атмосфере. Для создания более влажной среды чашки накрывали пищевой пленкой.



Рисунок 4 – Микробиологическое исследование почвенных образцов

Результаты прорастания штаммов *Azotobacter* регистрировали на 4 и 7 день в виде белесо-прозрачных обрастаний вокруг почвенных комочков. Данные фиксировались в лабораторном журнале и заносились в таблицу (приложение 2).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Характеристика почв предгорных и горных зон Гуамского ущелья

Апшеронский район расположен в предгорной части Краснодарского края. Более 80% всей территории занимают леса. С учетом рельефа местности и расположения в горной системе Северо-Западного Кавказа все леса Апшеронского района отнесены к категории горные леса.

Гуамское ущелье относится к памятнику природы регионального значения Краснодарского края, расположено в муниципальном образовании Апшеронский район, на территории Нижегородского и Мезмайского сельских поселений, от пос. Гуамка до пос. Мезмай по реке Курджипс.

По результатам исследованных почвенных образцов (14 экземпляров) было выявлено, что в Гуамском ущелье преобладают следующие виды почв:

- Бурые горно-лесные;
- Серые горно-лесные;
- Горные дерново-карбонатные;
- Горно-лугово-лесная;
- Желтозёмы.

Бурые лесные почвы образуются под лесными массивами, состоящими из широколиственных пород деревьев (в данном случае бука, граба, дуба). Важным фактором, предопределившим образование бурых грунтов, является изобилие влаги, преимущественно характерное для таких климатических условий, при которых количество выпадающих осадков существенно превышает количество испарений в данной местности, что характерно для горной местности Гуамского ущелья. Данные разновидности почв характеризуют хорошие дренажные свойства, что обусловило их стабильное насыщение водой.

При выполнении почвенных разрезов было выделено три горизонта:

- Первый горизонт – уровень лесной подстилки. Поверхностный небольшой слой, толщиной до 5 см, состоящий из не полностью разложившихся биоматериалов древесного и травянистого материалов.

- Второй горизонт – богатый гумусом слой, количество которого составляет примерно 6-10 %, имеющий мощность от 10 до 20 см.

- Третий горизонт – переходный, метаморфический оглиненный горизонт толщиной 20-25 см. Ниже располагается материнская порода, представленная в виде каменисто-щебневых суглинистых образований.

Бурая лесная почва проявляет кислую и слабокислую реакцию (образец № 3, 6; приложение 2). Цвет почвы, особенно в подгумусных слоях бурый и желтовато-бурый.

Серые лесные почвы распространены в среднем поясе низких гор на плоских и полого-наклонных водоразделах и террасах рек (образцы № 4, 5, 9, 12), 350 - 750 м над у.м. Материнскими породами являются карбонатные, иногда гипсоносные глины, в виде делювия и пролювия.

Светло-серые лесные: гумусовый горизонт маломощный (5-10 см), светло-серого цвета, как и гумусово-элювиальный, отличающийся сланцеватой или плитчатой структурой; иллювиальный горизонт хорошо выражен, очень плотного сложения (образец № 13).

Темно-серые лесные и горно-лесные почвы занимают предгорную и горные зоны, и граничат с черноземами, серыми, а также бурыми горно-лесными почвами.

Дерново-карбонатные почвы встречаются в горных и предгорных районах среди серых и бурых лесных почв, а так же в лесостепной зоне. Реакция среды от 7,1 до 8,6, содержание гумуса до 8 % (образец №2, приложение 2). Распространены на элювиальных и делювиальных карбонатных образованиях, под лесами из дуба, кизила, клена, орешника.

Горно-лугово-лесные почвы распространены широкой полосой в местах контакта субальпийской и лесной растительности. Лесная подстилка небольшой мощности, быстро разлагается, почвы маломощные, гумусовый

горизонт хорошо выражен, темноокрашен, мелкозернистый (образцы № 7, 10, 11). Нижний горизонт этих почв почвы обычно щебнистый.

Горно-луговые почвы и светлые с бурым оттенком, содержат большое количество перегноя; в сухом виде рыхлые и легкие (образец № 1).

Желтоземы по механическому составу преимущественно глинистые или суглинистые (образец № 8). Образуются преимущественно на материнских породах из глинистых сланцев, имеют кислую реакцию, содержание гумуса невысокое. Жёлтая окраска обусловлена наличием гидратов окиси железа.

3.2. Азотфиксирующая активность исследованных образцов

Результаты исследований показали, что все почвенные образцы предгорных и горных зон Гуамского ущелья проявили азотфиксирующую активность (приложение 3). Были выявлены как максимальные показатели: обрастание комочков почвы бактериями рода *Azotobacter* 100% – образец № 2 (дерново-карбонатные почвы), образец № 8 (желтоземы), так и минимальные 1% – образец № 12 (светло-серая лесная почва) (таблица 1).

Таблица 1 – Показатели азотфиксации почвенных образцов

№ п/п/	Тип почвы	Обрастание колониями азотобактер, %	Номер почвенного образца
1	желтоземы	100	8
2	дерново-карбонатные	100	2.1, 2.2
3	горно-луговая	68-100	1, 5
4	горно-лугово-лесная	72-98	10, 11
5	бурая лесная	22-24	3, 6
6	серая лесная	10-24	4, 9, 12
7	светлая серая лесная	2	13
8	искусственно-насыпная	16-36	7

Из таблицы видно, что наиболее обедненная почва была обнаружена в образце № 13, собранного на Алебастровой балке (светлая серая лесная почва),

что является очевидным, т.к. почва очень плотного сложения, с большим количеством сланцеватых образований гипса, алебастра и минимальным количеством гумусового слоя.

Несмотря на то, что каменисто-песчаная почва на железнодорожном полотне узкоколейной дороги Гуамского ущелья является искусственно-насыпной (образец № 7), в ней были обнаружены колонии рода *Azotobacter* со степенью обрастания в пределах 16-36%. Это говорит о благоприятном микроклимате Гуамского ущелья, который позволяет азотобактер заселять новые места обитания.

3.3. Выделение чистых культур *Azotobacter*

Культивирование штаммов *Azotobacter* проводили на плотной питательной среде Эшби с нейтральным значением pH, предварительно приготовив фиксированный препарат для подтверждения чистоты выделенной культуры и изучения морфологии клеток (рис. 5).

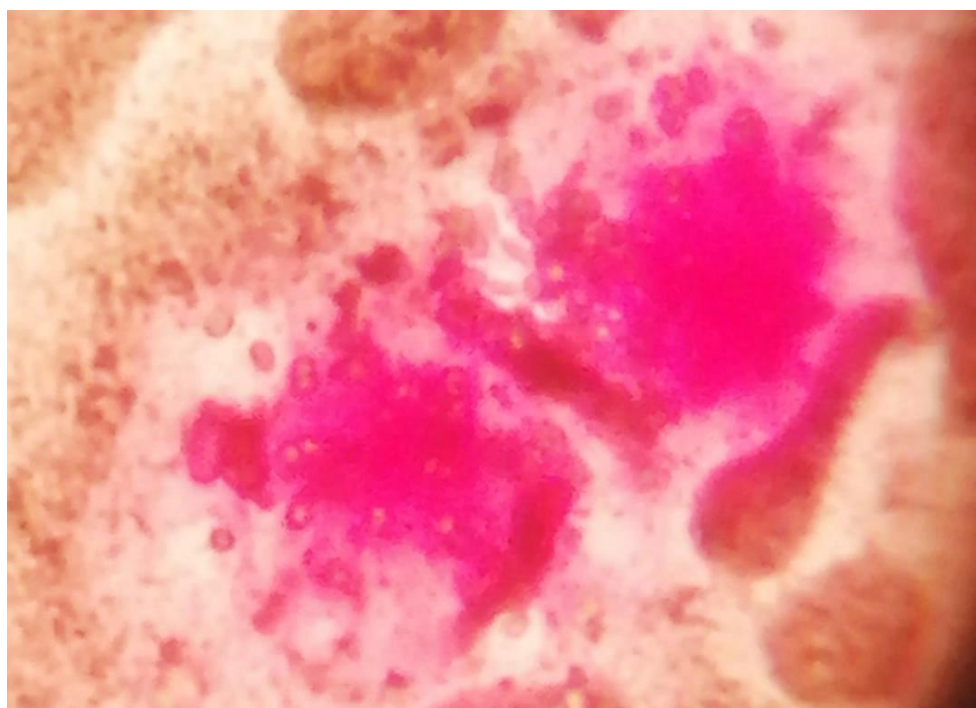


Рисунок 5 – *Azotobacter* под световым микроскопом
(масляная иммерсия, увеличение x1000) (авторское фото)

Розовый цвет свидетельствует о том, что полученные бактерии – грамотрицательные.

Изолированные колонии рассевали точечно по трафарету (50 точек). После культивирования в течение 2-4 суток при комнатной температуре фиксировали полученный результат (рис. 6). Затем для дальнейшей верификации и выделения чистых культур *Azotobacter* бактериальные образцы отправлялись в Институт химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ СО РАН) (г. Новосибирск).



Рисунок 6 – Чистая культура *Azotobacter*

Все результаты исследований заносились в электронную федеральную сетевую базу данных «Всероссийского атласа почвенных микроорганизмов».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения исследовательской работы были выполнены почвенные разрезы в горных и предгорных зонах Апшеронского района Краснодарского края (в частности Гуамском ущелье), собраны 14 почвенных образцов, по результатам которых:

1. Определен механический и химический состав почв, выявлены типы почв, характерные для Гуамского ущелья: бурые горно-лесные; серые горно-лесные; горные дерново-карбонатные; горно-лугово-лесные; желтозёмы.

2. Выполнено микробиологическое исследование образцов почв на наличие азотфиксирующей активности. Выявлено, что во всех анализируемых образцах присутствуют бактерии рода *Azotobacter*.

Результаты микробиологических исследований показали, что максимально насыщена почва азотфиксирующими бактериями желтоземного и дерново-карбонатного типа. Минимальные показатели были отмечены в светло-серой гипсоносной лесной почве, на Алебастровой балке.

Также следует отметить, что бактерии рода *Azotobacter* тяготеют к нейтральным почвам и плохо переносят подкисление. Оптимум pH для роста и фиксации азота составляет 7,0 – 7,5.

3. Все результаты занесены в электронную федеральную сетевую базу данных «Всероссийского атласа почвенных микроорганизмов».

4. В рамках научного волонтерства, для дальнейшей верификации и выделения чистых культур *Azotobacter* почвенные и бактериальные образцы были отправлены в Институт химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ СО РАН) (г. Новосибирск).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Блинков Г.К. Азотобактер и его значение для высших растений. Томск, 2009. 123 с.
2. Вальков, В.Ф. Почвы Краснодарского края, их использование и охрана / В.Ф. Вальков, Ю.А. Штомпель, И.Т. Трубилин, Н.С. Котляров, Г.М. Соляник. – Учебное пособие для студентов высших учебных заведений. Изд-во СКНЦ ВШ Ростов-на Дону, 1996. – 192 с.
3. Зенова Г.М., Степанов А.Л., Лихачева А.А. и др. Практикум по биологии почв. М., 2002. 120 с.
4. Игнатов В.В. Биологическая фиксация азота и азотфиксаторы // Сорос. образоват. журн. — 1998. — № 9. — С. 28–33.
5. Пискунов А.С. Методы агрохимических исследований/ А.С.Пискунов – М.: КолосС, 2004. – 312 с.
6. Селивановская С. Ю. Микроорганизмы в круговороте биогенных элементов. Казань: Казан.ун–т, 2014. – 38 с. 26.
7. Современная микробиология. Прокариоты / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005. 1152 с.
8. Пацко Е. В. Перспективность использования ассоциаций азотфиксирующих микроорганизмов для повышения урожайности растений // Бюл. Моск. общ.исп. прир. – 2014. – №. 2. – С. 84 – 86.
9. Чевердин Ю.И, Гармашова Л.В. Развитие микроорганизмов, связанных с циклом азота в сезонно переувлажненных почвах // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2018. №6.
10. Трифонова Т.А., О.Н. Сахно, О.Н. Забелина, И.Д. Феоктистова Сравнительная оценка состояния городских почв по их биологической активности // Вестн. Моск. Ун-та. сер. 17. Почвоведение. 2014. №3. С. 23-27.
11. Охотник за микробами. Методические рекомендации и инструкции по применению набора. Новосибирск, 2020.



Рисунок 1 – Луговое разнотравье Апшеронский р-н, окр. хутора Гуамка



Рисунок 2 – Место сбора почвенного образца № 1



Рисунок 2 – Глухой буково-грабовый лес окр. хутора Гуамка



Рисунок 3 – Место сбора почвенного образца № 2



Рисунок 4 – Место сбора почвенного образца № 5



Рисунок 5 – Глинисто-песчаный участок, впадающий в русло реки Курджипис (образец № 5)



Рисунок 6 – Буково-грабовый лес (хвойная подстилка), образец №6



Рисунок 7 – Место сбора почвенного образца №6



Рисунок 8 – Верхний слой почвенного покрова в расщелине скалы.
Почва ярко-рыжая (образец №8)



Рисунок 9 – Сухое русло ручья. Глинистая стенка русла (образец №9)

**ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЧВЕННЫХ ОБРАЗЦОВ АПШЕРОНСКОГО РАЙОНА
(Гуамское ущелье, п. Мезмай, 2022)**

№	№ образца	№ образца в базе данных	Дата	Координаты сбора	Место сбора (географическая привязка)	Характеристика места сбора	Глубина, см	pH	Тип почвы	Азотфиксирующая активность
1	Об. №1		15.08.2022	44.239413; 39.697036	Апшеронский р-н, хутор Гуамка	Луговое разнотравье	15 см	5	Горно-луговая почва	4 день – 82% 7 день – 98%
2	Об. №2.1	22П-Д0268	15.08.2022	44.290954; 39.894921	Апшеронский район, хутор Гуамка	Глухой буково-грабовый лес	17 см	6	Дерново-карбонатная	4 день – 100%
3	Об. №2.2	22П-Д0260	15.08.2022	44.230954; 39.894921	Апшеронский р-н, хутор Гуамка	Глухой буково-грабовый лес	10 см	7	Дерново-карбонатная	4 день – 100%
4	Об. №3	22П-Д0262	16.08.2022	44.222235; 39.878372	Апшеронский р-н, хутор Гуамка	Самшитовая роща	13 см	4	Бурая лесная	4 день – 12% 7 день – 24%
5	Об. №4	22П-Д0267	16.08.2022	44.256915; 39.917369	Апшеронский р-н, хутор Гуамка	Глинисто-песчаный участок, впадающий в русло реки Курджипис	15 см	5	Серая лесная	4 день – 12% 7 день – 24%
6	Об. №5		16.08.2022	44.249312; 39.917237	Апшеронский р-н, хутор Гуамка	Глинистая почва на свободной местности (лужайка)	10 см	4.5	Горно-луговая почва	4 день – 52% 7 день – 68%
7	Об. №6	22П-Д0265	16.08.2022	44.259001; 39.918610	Апшеронский р-н, хутор Гуамка	Буково-грабовый лес.	15 см	3.5	Бурая лесная	4 день – 8% 7 день – 22%

						Почву брал под пихтой				
8	Об. №7	22П-Д0259	17.08.2022	44.214929; 39.915476	Апшеронский р-н, хутор Гуамка	Легкая, каменистая, на ж/д полотне узкоколейки (действующая)	8 см		Искусственно-насыпная	4 день – 1% 7 день – 16-36%
9	Об. №8	22П-Д0271	17.08.2022	44.209530; 39.922686	Апшеронский р-н, хутор Гуамка	Верхний слой почвенного покрова у подножья скалы. Почва ярко-рыжая	8 см	5	Желтоземы	4 день - 100%
10	Об. №9	22П-Д0269	17.08.2022	44.205224; 39.936247	Апшеронский р-н, хутор Гуамка	Русло ручья. Глинистая стенка русла	8 см	4	Серая лесная	4 день – 10% 7 день – 22%
11	Об. №10	22П-Д0270	18.08.2022	44.184618; 39.969135	Апшеронский р-н, хутор Гуамка	Каменистая почва в горной местности	9 см		Горно-лугово-лесная	4 день -76% 7 день – 98%
12	Об. №11	22П-Д0263	18.08.2022	44.173373; 39.972040	Апшеронский р-н, хутор Гуамка	Каменисто-глинистая почва на отвесной скале	10 см	6	Горно-лугово-лесная	4 день – 54% 7 день – 72%
13	Об. №12	22П-Д0264	19.08.2022	44.205026; 39.900670	Апшеронский р-н, хутор Гуамка	Глинистая почва, устье ручья. Рядом с алебастровой балкой	8 см	5.5	Серая лесная	4 день – 10% 7 день – 22%
14	Об. №13	22П-Д0266	19.08.2022	44.314820; 39.840175	Апшеронский р-н, хутор Гуамка	Алебастровая балка, твердая красная глина	5 см	4	Светло-серая лесная	4 день – 1% 7 день – 2%



Рисунок 1 – Приготовление среды Эшби



Рисунок 2 – Количество обростаний азотобактер (образец №1)



Рисунок 2 – Количество обрастаний азотобактер (образец №2)

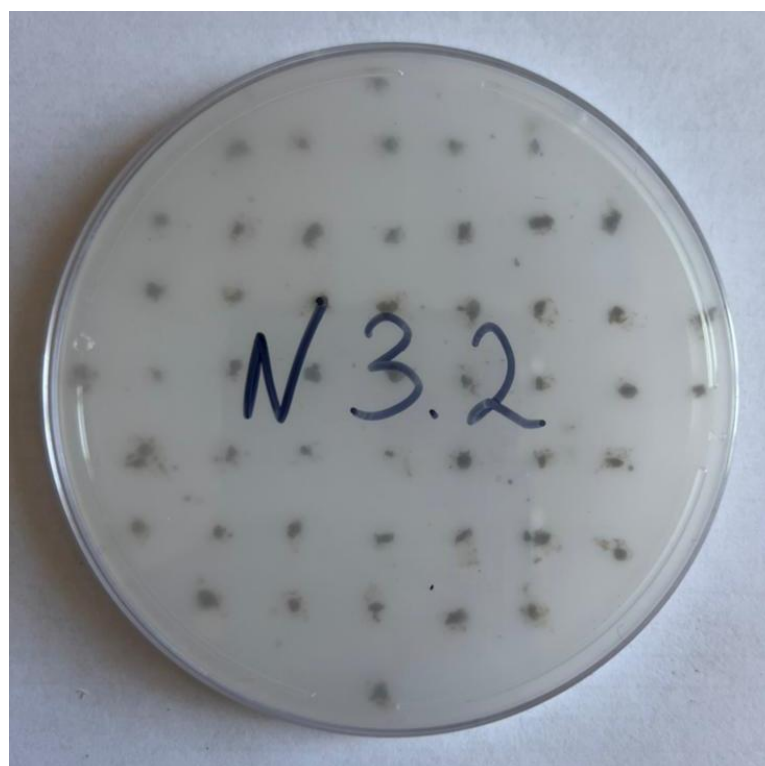


Рисунок 3 – Количество обрастаний азотобактер (образец №3)

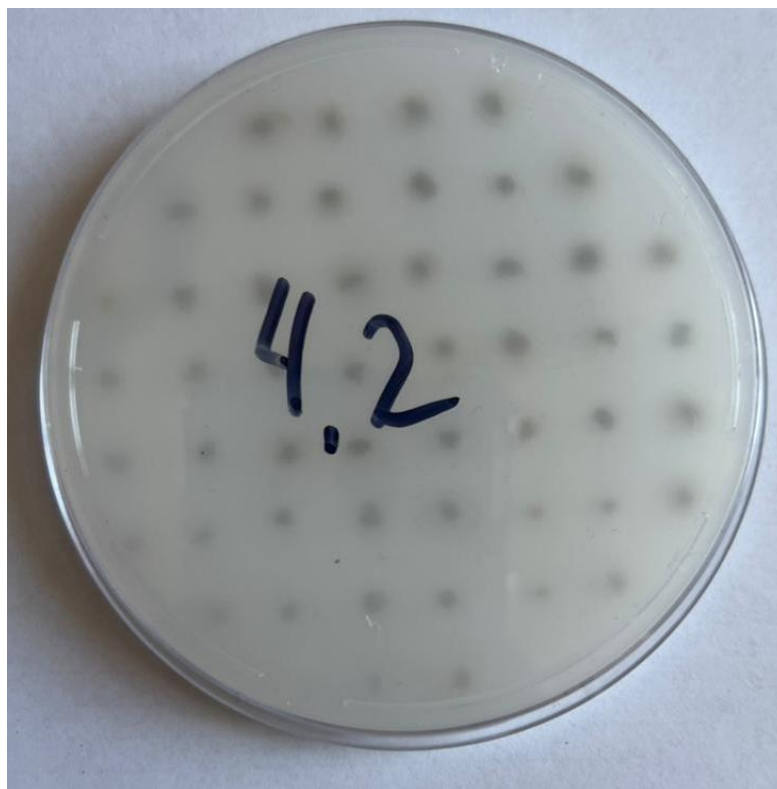


Рисунок 4 – Количество обростаний азотобактер (образец №4)



Рисунок 5 – Количество обростаний азотобактер (образец №5)

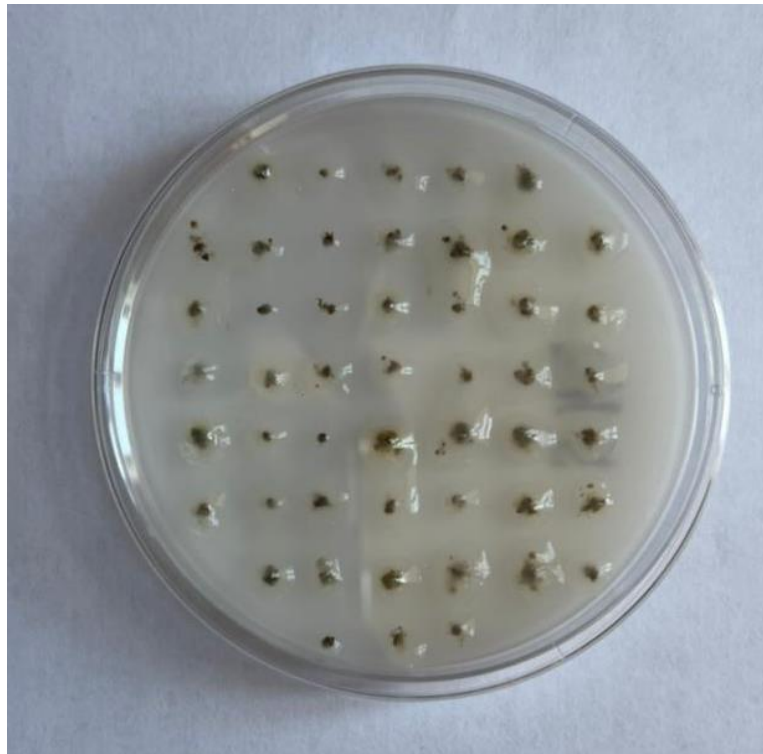


Рисунок 6 – Количество обростаний азотобактер (образец №6)

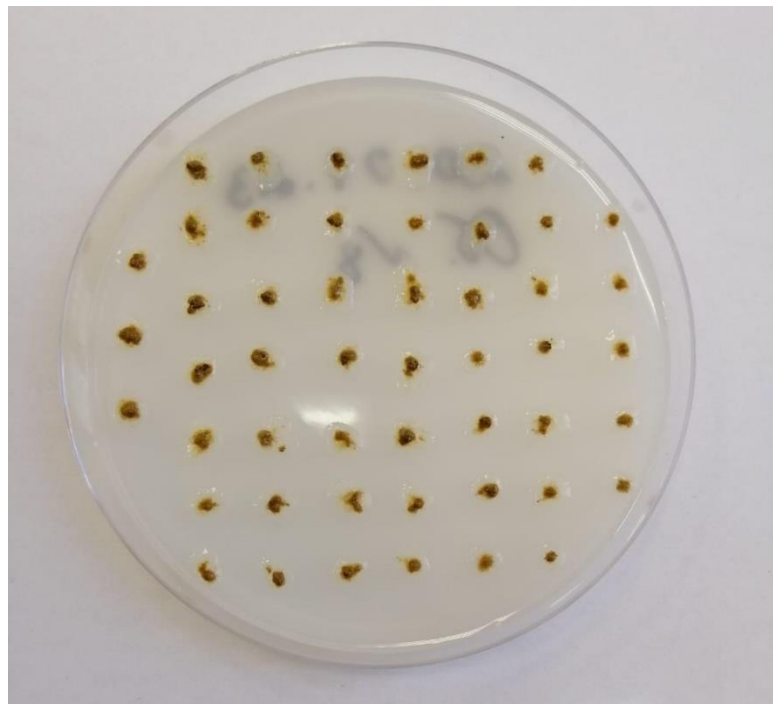


Рисунок 7 – Количество обростаний азотобактер (образец №7)

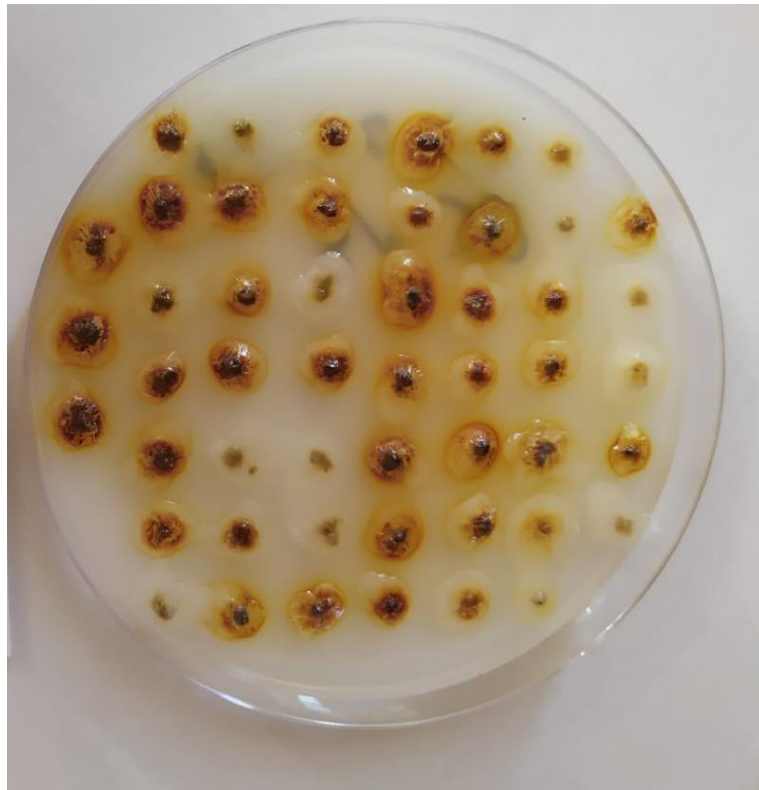


Рисунок 8 – Количество обрастаний азотобактер (образец №8)

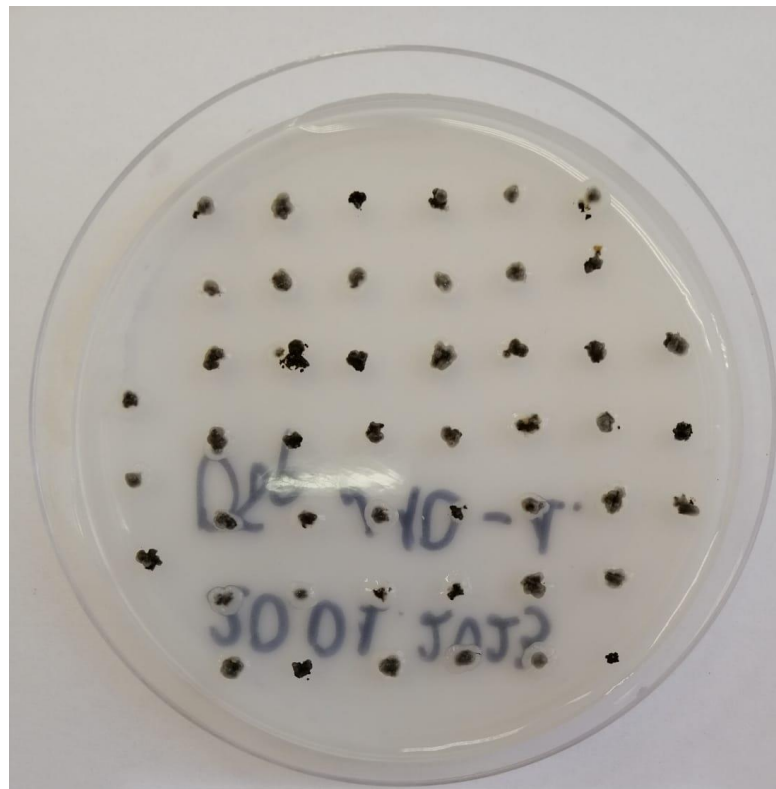


Рисунок 9 – Количество обрастаний азотобактер (образец №9)



Рисунок 10 – Количество обрастаний азотобактер (образец №10)

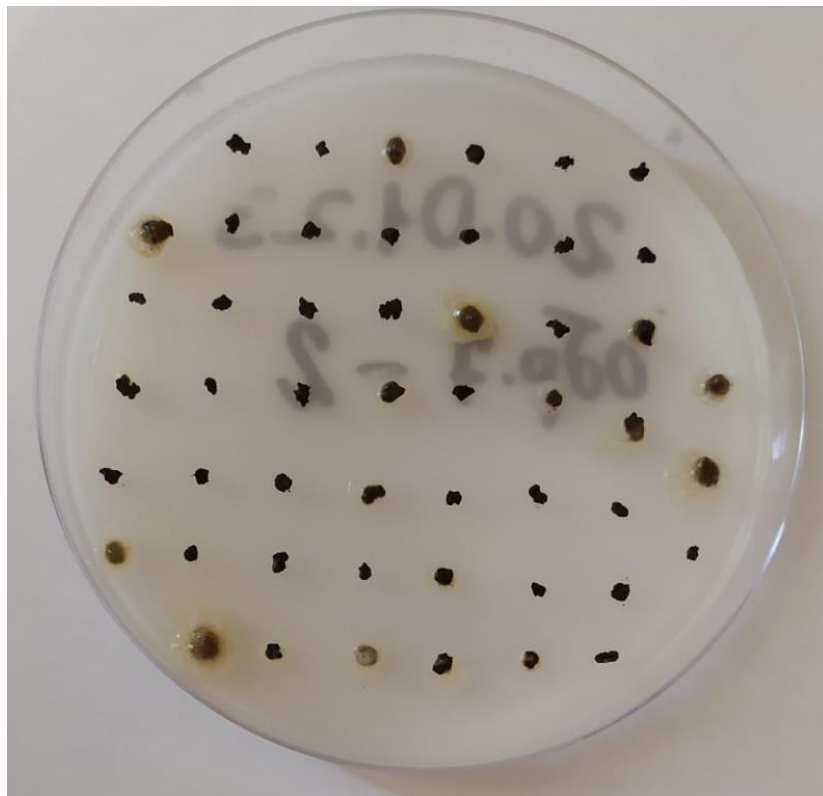


Рисунок 11 – Количество обрастаний азотобактер (образец №12)

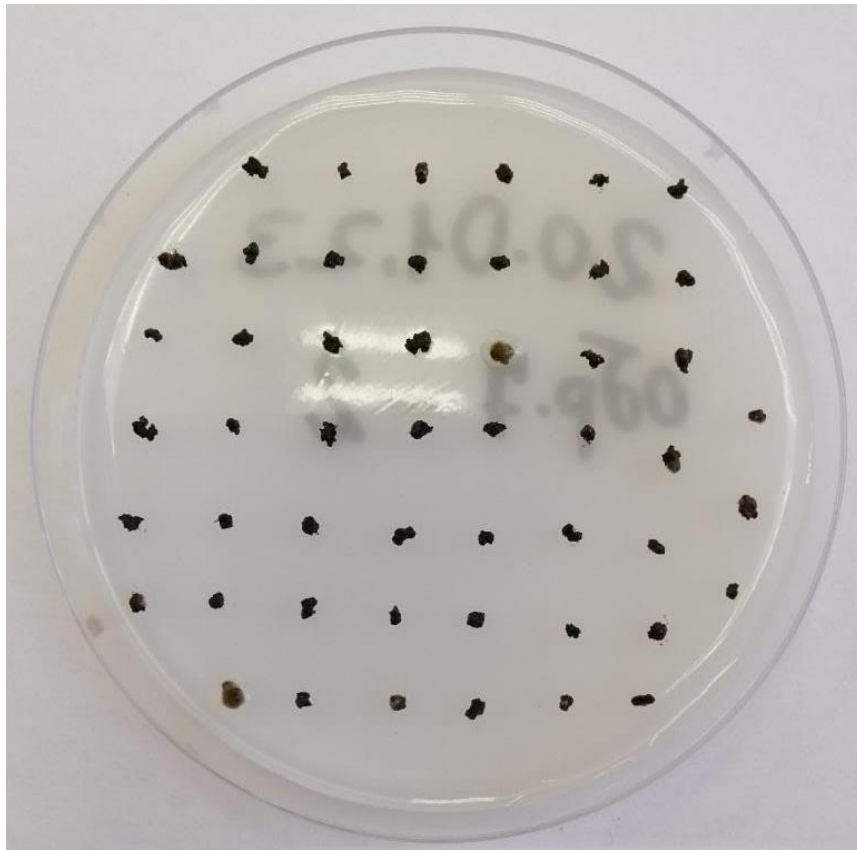


Рисунок 12 – Количество обрастаний азотобактер (образец №13)

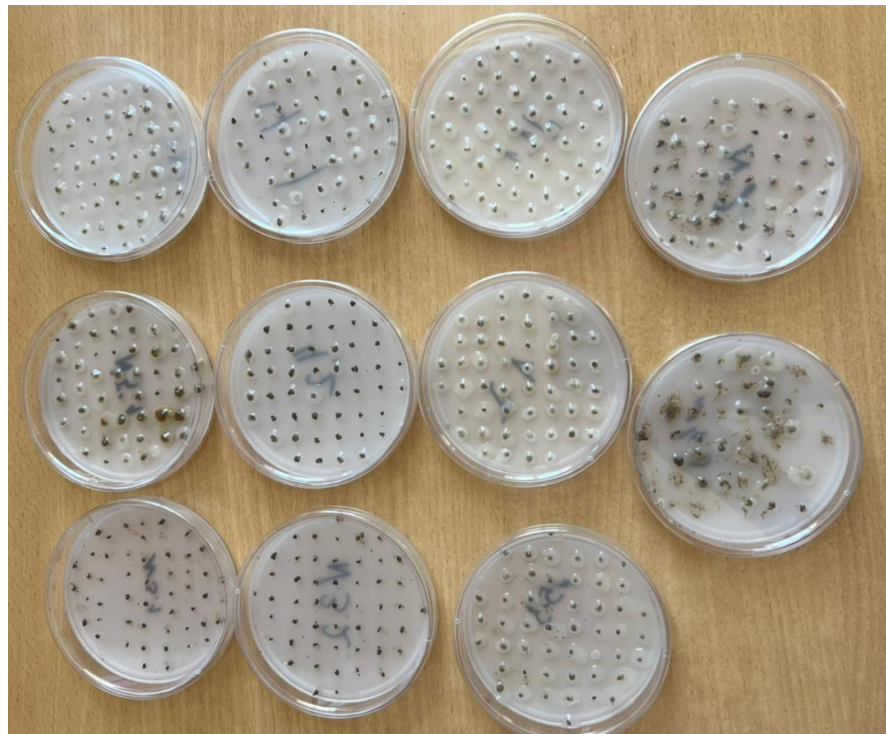


Рисунок 13 – Азотфиксирующая активность азотобактер на питательной среде Эшби