

Республика Марий Эл  
Муниципальное учреждение «Отдел Образования»  
администрации городского округа «город Волжск»  
МУДО «Волжский экологический центр»

**Поиск азотфиксирующих микроорганизмов в почве  
под нитрофильным растением малины садовой и  
определение почвенно-экологических условий ее  
произрастания**

Выполнили:

Данилова Анастасия Анатольевна,  
Мельникова Анастасия Андреевна,  
ученицы 10 класса, в рамках проекта  
«Всероссийский атлас почвенных  
микроорганизмов».

МУДО «Волжский экологический  
центр»

Руководитель: Мичукова М. В., п.д.о.  
МУДО «ВЭЦ», к.б.н.

Волжск  
2023

## Содержание

Введение.....	3
1.Обзор литературы.....	5
1.1. Экологические и биологические особенности малины обыкновенной.....	5
1.2.Биологическая азотфиксация и ее роль в природе.....	6
1.3. Роль микроорганизмов в питании растений.....	7
2. Материалы и методы исследований.....	9
3.Результаты исследований.....	11
3.1. Геоботаническое описание исследованных участков.....	11
3.2.Морфологическое описание почвенных образцов.....	12
3.3. Результаты лабораторных исследований образцов почв.....	12
Выводы.....	17
Список литературы.....	18

## **Введение**

Малина обыкновенная является индикатором высокого содержания азота в почве, растением — нитрофилом. В естественных условиях она особенно пышно разрастается на вырубках из-за полного доступа света и богатства почвы азотистыми веществами, которые образуются на вырубках из-за интенсивного перегнивания здесь лесной подстилки, лежащих на земле веточек с листьями и хвоей, оставшихся в почве корней срубленных деревьев и разнообразных других остатков.

В приусадебных хозяйствах малина в течение ряда лет часто произрастает на одном и том же месте. Наша гипотеза состоит в том, что под растением, требовательном к содержанию азота в почве, можно обнаружить азотфиксирующие бактерии в большем количестве, чем в почве на ближайшем к малине участке с другими с/х культурами.

Азотфиксирующие бактерии связывают до нескольких кг азота на 1 га в год. Биологическая азотфиксация способна обеспечить повышение плодородия почв, что позволит решить вторую цель устойчивого развития, : ликвидацию голода, обеспечение продовольственной безопасности и улучшение питания и содействие устойчивому развитию сельского хозяйства.

**Цель работы** - определить степень заселенности азотфиксирующими бактериями почв на двух участках приусадебного хозяйства: под малиной и без нее и определить почвенно-экологические условия ее произрастания.

### **Задачи:**

1. Сделать частичное геоботаническое описание участка, многолетнего произрастания малины садовой в приусадебном хозяйстве в с. Помары.
2. Провести первичное описание морфологических признаков почв на участках с малиной и без нее, отобрать образцы почв.
3. Определить кислотность, содержание гумуса, нитратов и каталазную активность образцов почв.
4. Выделить бактерии, фиксирующие атмосферный азот, определить общее количество обрастаний в % в почвенных образцах на исследуемых участках.

***Практическая значимость:*** полученные в ходе исследования данные могут быть учтены при планировании посадок сельскохозяйственных культур на данном участке и в учебных целях. Все образцы почв и бактериальные образцы, взятые с посевов на среду Эшби, внесены в реестр Всероссийского Атласа почвенных микроорганизмов для поиска штаммов азотфиксаторов, устойчивых к дефицитным (стрессовым) условиям, который будет проведен учеными Новосибирского ГУ.

## 1. Обзор литературы

### 1.1. Экологические и биологические особенности малины обыкновенной.

**Мали́на обыкнове́нная** (лат. *Rúbus idáeus*) — полукустарник; вид рода Рубус семейства Розовые (*Rosaceae*). Обитает малина обыкновенная на богатых влажных почвах, плохо переносит засуху и сильные морозы. Малина обыкновенная – растение лесной зоны, растёт она, главным образом, по лесным опушкам, вырубкам, буреломам, на гарях и солнечных каменистых склонах. По берегам рек, пойменным лесам, тенистым и сырым оврагам проникает в лесостепную и степную зоны. В горах (Саяны, Кавказ) нередко поднимается до верхней границы леса. Растение пластично – хорошо приспосабливается к различным природно–климатическим условиям. Часто разводится в садах. Малина обыкновенная — листопадный полукустарник с многолетним корневищем, из которого развиваются двухгодичные надземные стебли высотой 1,5—2,5м. Корневище извилистое, деревянистое, с множественными придаточными корнями, образующими мощную разветвлённую систему. Стебли прямостоячие. Побеги первого года травянистые, зелёные с сизым налётом, сочные, покрыты тонкими, обычно частыми миниатюрными шипами. На второй год побеги деревенеют и приобретают коричневый цвет, сразу после плодоношения засыхают, но из того же корня на следующий год вырастают новые стебли. Листья овальные, очерёдные, черешковые, сложные, с 3—7 яйцевидными листочками, сверху тёмно-зелёные, снизу беловатые, опушены мелкими волосками. Цветки белые, около 1 см в поперечнике, собраны в небольшие кистевидные соцветия, располагаются на верхушках стеблей или в пазухах листьев. Лепестки короче долей чашечки. В средней полосе России малина цветёт с июня по июль, иногда вплоть до августа. Плоды представляют собой небольшие волосистые костянки, сросшиеся на цветоложе в сложный плод (Казаков, 1980)

**Систематическое положение** (Маевский, 2006)

Царство: Растения - *Plantae*

Отдел: Цветковые - *Magnoliophyta*

Класс: Двудольные- *Dicotyledones*

Порядок: Розоцветные-*Rosales*

Семейство: Розовые -*Rosaceae*

Род: Рубус-*Rubus*

Вид: Малина-*Rubus idaeus*

**Основной участок распространения** охватывает лесную и прилегающие районы лесостепной зоны европейской части России, Урал и Западную Сибирь. Северная граница ареала малины обыкновенной начинается на Кольском полуострове и проходит в широтном направлении по северу европейской части России. На Кавказе малина обыкновенная представлена особой разновидностью – *Rubus idaeus* var. *buschii* Rosan., которая отличается густоволосистыми побегами и более крупными плодами. На большей части территории Дальнего Востока, Восточной и Средней Сибири встречается близкий вид – малина сахалинская – *Rubus sachalinensis* Levl. (*R. idaeus* var. *melanolasius* Focke), которая отличается густо щетинистыми и обильно железистыми цветоносами и цветоножками, а также всегда тройчатыми листьями. В западной части этого ареала малина представлена особым подвидом – *Rubus sachalinensis* subsp. *sibiricus* (Kom.) Sinjkova . На гольцах Приморья, Приамурья, Сахалина и Забайкалья растет Малина Комарова – *Rubus komarovii* Nakai, которая близка к малине сахалинской, отличаясь от нее более мелкими долями листьев, опушенными только снизу по жилкам. Все эти виды практически используются населением вместо малины обыкновенной (Петров, 1991).

Малина является биоиндикатором очень высокого плодородия почв в лесах и высокого содержания азота.

## **1.2. Биологическая азотфиксация и ее роль в природе**

Биологическая азотфиксация-фиксация молекулярного атмосферного азота, **диазотрофия**. Процесс восстановления молекулы азота и включения её в состав своей биомассы прокариотными микроорганизмами. Важнейший источник азота в биологическом круговороте. В наземных экосистемах азотфиксаторы локализуются в основном в почве.

Различают три типа азотфиксации:

1. Свободноживущими бактериями самых разнообразных таксономических групп.
2. Ассоциативная азотфиксация бактериями, находящимися в тесной связи с растениями (в прикорневой зоне или на поверхности листьев) и использующими их (растений) выделения (корневые выделения составляют до 30 % продукции фотосинтеза) как источник органического вещества. Азотфиксаторы живут в кишечнике многих животных (жвачные, грызуны, термиты) и человека (род *Escherichia*).
3. Симбиотическая. Наиболее известен симбиоз клубеньковых бактерий (сем. *Rhizobiaceae*) с бобовыми растениями. Обычно происходит корневое заражение, но известны растения, образующие клубеньки на стеблях и листьях.

Первые diazотрофные бактерии были выделены С. Н. Виноградским в 1898 году и названы в честь Луи Пастера *Clostridium pasterianum*. В 1901 году Бейеринк выделил первый аэробный азотфиксатор *Azotobacter chroococcum*. С. П. Костычев в 1926 году на примере азотобактера и растений табака показал существование ассоциативной азотфиксации. Биологическая фиксация азота отвечает за восстановление азота в окружающей среде. Определенные бактерии осуществляют фиксацию молекулярного азота (N<sub>2</sub>) в биодоступные комплексы для потребления клетками.

### **1.3. Роль микроорганизмов в питании растений**

Микроорганизмы играют важную роль в почвообразовании. В результате деятельности микрофлоры почвы происходит превращение перегноя в минеральные вещества, которые способны поглощать корни растений, они поглощают азот из воздуха с последующим синтезом азотных соединений, и, таким образом обогащают почву. Основными источниками азота в питании растений служат соли азотной кислоты и соли аммония. Азотсодержащие соединения, которые хорошо растворяются в воде усваиваются растениями. Речь идет о таких соединениях, как мочевина, аминокислоты, аспарагин. Стоит отметить, что значение разных групп микроорганизмов в ходе азотфиксации в почве исследовано недостаточно. Но способность клубеньковых бактерий в

сочетании с бобовыми витаминизировать почву достаточно хорошо известна. Однако в масштабе биосферы они не имеют большого значения, так как даже в агробиогеоценозах в данное время бобовые растения занимают немного места (Гурьев, 2012). Кроме того, недостаточно изучена деятельность свободноживущих азотфиксирующих микроорганизмов в почве, а вопрос о ее масштабах является дискуссионным. Опираясь на проведенные лабораторные исследования, а также на сведения, полученные для чистых культур микроорганизмов, ученые утверждают, что свободноживущие азотфиксаторы связывают не больше 3-5 кг N на гектар в год в почвах умеренной зоны.

## 2. Материалы и методы исследований

Исследования проводились в период с 19.10.22г. по 30.01.2023г. Было отобрано 2 образца почв на территории приусадебного хозяйства в с. Помары.

На каждом участке было проведено частичное геоботаническое описание, описаны морфологические признаки почв: цвет, гранулометрический состав, структура (Практикум..., 1987, Нуреев, 2014).

-актуальную кислотность определяли в водной вытяжке при помощи рН метра.

-каталазную активность – газометрическим способом.

-содержание гумуса определялось путем сжигания органического вещества в муфельной печи.

-содержание нитратов в почве при помощи индикаторной тест-полоски и колориметрической шкалы.

-выявление азотофиксирующих бактерий проводилось методом посева почвенных комочков на среде Эшби.

Каталазная активность, относится к интегральным биологическим показателям почв и отвечает за разложение перекиси водорода. Ее роль в почвенно-поглощающем комплексе заключается в разрушении перекисных соединений, образующихся в дыхании микроорганизмов и процессе преобразования органических остатков растительности(Обзор. Оценка..., 2018).



Рис. 1. Определение каталазной активности



Рис. 2. Подготовка образцов почв к анализу



**Рис. 3. Метод почвенных комочков на среде Эшби**

Для выявления азотфиксирующих бактерий в почве и определения их относительного содержания использовался метод почвенных комочков. Колонии азотфиксирующих бактерий выращивали на плотной питательной среде Эшби, которая готовилась из вспомогательного раствора – это раствор солей хлорида натрия, сульфатов калия и магния, гидрофостфата калия и суспензии, включающей карбонат кальция, агар, глюкозу. Из увлажненной почвы формировали комочки диаметром 3-4 мм и размещали их в чашке Петри (в узлах трафарета). Чашки Петри с закрытыми крышками оставляли при комнатной температуре на 10 -20 суток. Контроль обрастаний проводился через 4, 7 и 10 суток. Наблюдение в отдельных образцах проводилось в период до 20 суток. Наличие азотфиксирующих бактерий фиксировалось по появлению обрастаний вокруг почвенных комочков или под ними, а также появлению прозрачности среды Эшби и образованию обрастаний под почвенными комочками. Фиксация результатов роста колоний осуществлялась на 4, 8 и 10 и 20 сутки.

**Обоснование выбора методов исследований.** Полевые исследования почв пробных площадей, анализы образцов почв проведены по общепринятым руководствам, изложенным в работах: Е.В. Аринушкиной (1970), И.С. Кауричева (1980), Г.И. Махониной (2008), В.Д. Луганской (2011).

### 3. Результаты исследований

#### 3.1. Геоботаническое описание исследованных участков

**Образец №1**(под малиной) был взят на участке, где в течение более 30 лет произрастала малина садовая. В травянистом ярусе участка произрастали: пырей ползучий, крапива двудомная, пустырник, будра плющевидная, местами родиола розовая, земляника. **Образец №2**(без малины) был отобран в 3 м от участка с малиной на грядке, где в этот сезон произрастала морковь. По гранулометрическому составу почвы на участках относятся к среднему суглинку. Тип почв окультуренная дерново-подзолистая.



**Рис. 4. Участок с малиной (образец №1)**



**Рис. 5. Место отбора образца №2 на грядке из-под моркови.**

### 3.2. Морфологическое описание почвенных образцов

Описание морфологических признаков образцов почв приведено в таблице 1.

**Таблица 1. Описание морфологических признаков образцов почв.**

№ образца	Цвет	Структура	Грануло-метрический состав	Влажность	Новообразования	Тип почвы
№1(ПМ)	Светло-бурый	комковатая	Средний суглинок	Свежая	Корни, кремнеземная присыпка	Дерновоподзолистая суглинистая
№2(БМ)	Светло-бурый	комковатая	Средний суглинок	Свежая	Корни, кремнеземная присыпка	Дерновоподзолистая суглинистая



Рис.6 Образец почвы под малиной



Рис. 7. Образец почвы с грядки из под моркови

### 3.3. Результаты лабораторных исследований образцов почв

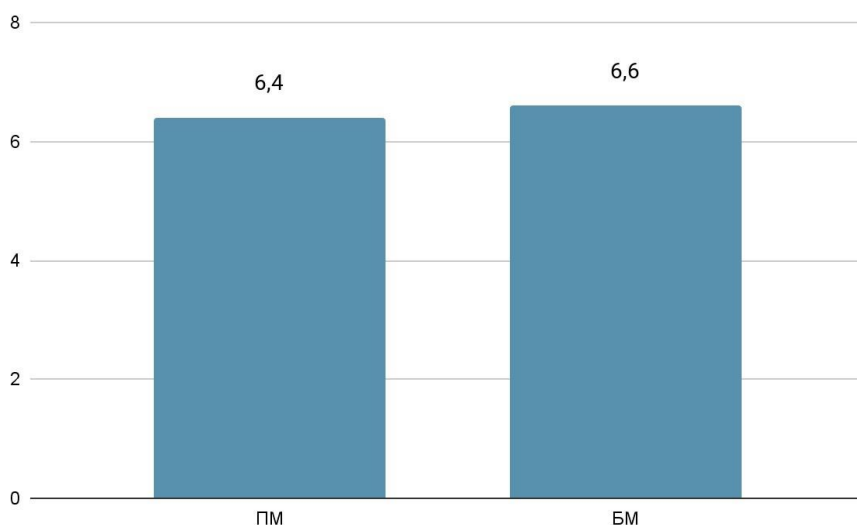
Выбор данных участков для исследований был обусловлен тем, что малина садовая является растением — нитрофилом, и как следствие в почве под ней могут быть обнаружены бактерии азотфиксаторы.

Результаты лабораторных исследований приведены в таблице 2.

**Таблица 2. Результаты лабораторных исследований образцов почв, взятых на сельскохозяйственном участке под многолетними посадками малины садовой и без нее**

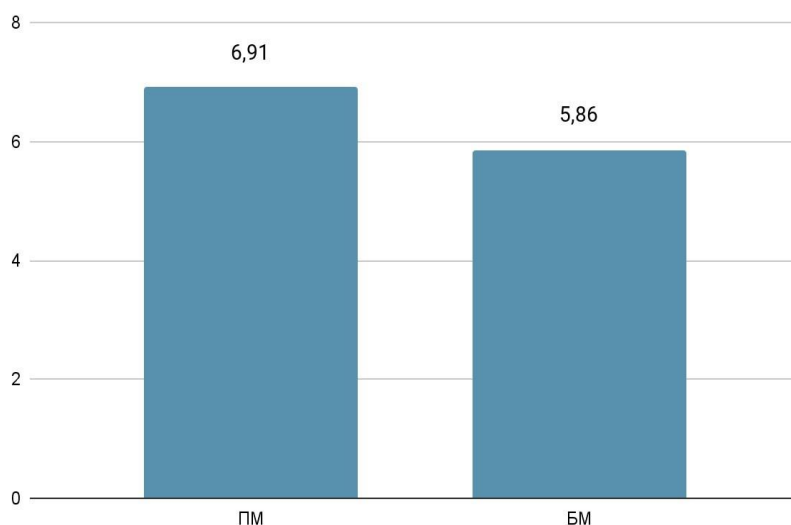
Показатель	Образец №1(ПМ)	Образец №2(БМ)	Примечания		
Кислотность	6,4	6,6	Почвы близки к нейтральным		
Содержание гумуса, %	6,91	5,86	Содержание гумуса в почве под малиной несколько выше, чем рядом на грядках из под моркови.		
Каталазная активность, мгО <sub>2</sub> /г	3,8	2,1	Каталазная оказалась активность выше в в почве под малиной		
Количество образцов азотфиксирующих бактерий	4 сутки	2,5	100	Обрастания азотфиксирующих бактерий активно и на всех почвенных комочках стали появляться в образце почвы, взятой не под малиной, на грядке из под моркови. Это были выпуклые округлые колонии с ровными и кружевными краями, в последствии потемневшие от кремового до темно-коричневого, почти черного цвета. В образцах, взятых под малиной 4 бактериальных обрастания были с ровными и кружевными краями, молочного цвета, которые затем приобрели кремовый оттенок. Под 18 почвенными комочками появилась прозрачность среды Эшби (выедание кальция)	
	7 сутки	11			100
	10 сутки	37			100

Результаты исследований показали, что почвы на обоих участках были нейтральными.

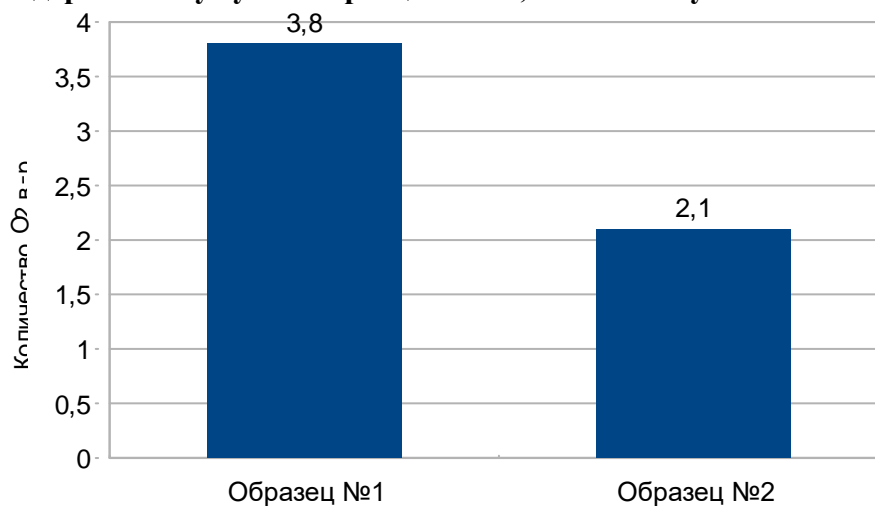


**Рис.8. Кислотность почв в образцах почв, взятых на участках в с. Помары**

Содержание гумуса в 1,2 выше в почве под малиной, чем рядом на грядках из под моркови. Каталазная активность оказалась выше в почве под малиной. Содержание нитратов, как и ожидалось выше под нитрофильным растением малиной.

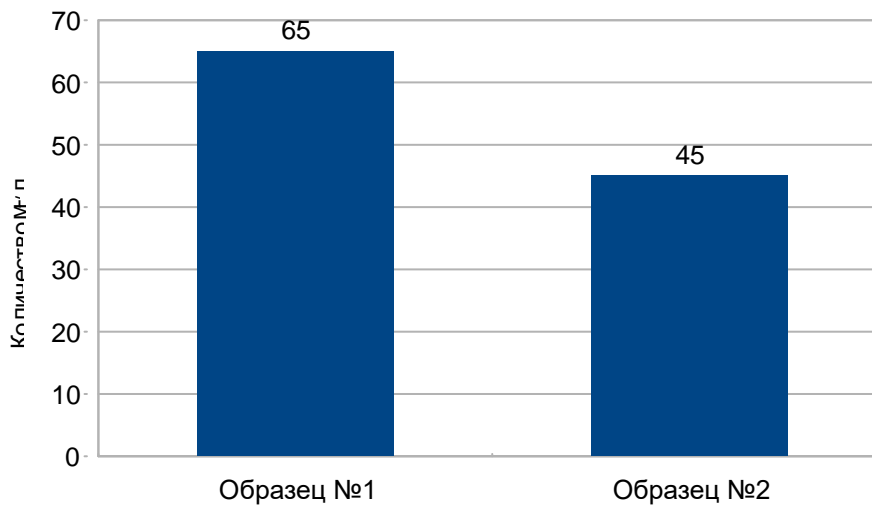


**Рис. 9. Содержание гумуса в образцах почв, взятых на участках в с. Помары**

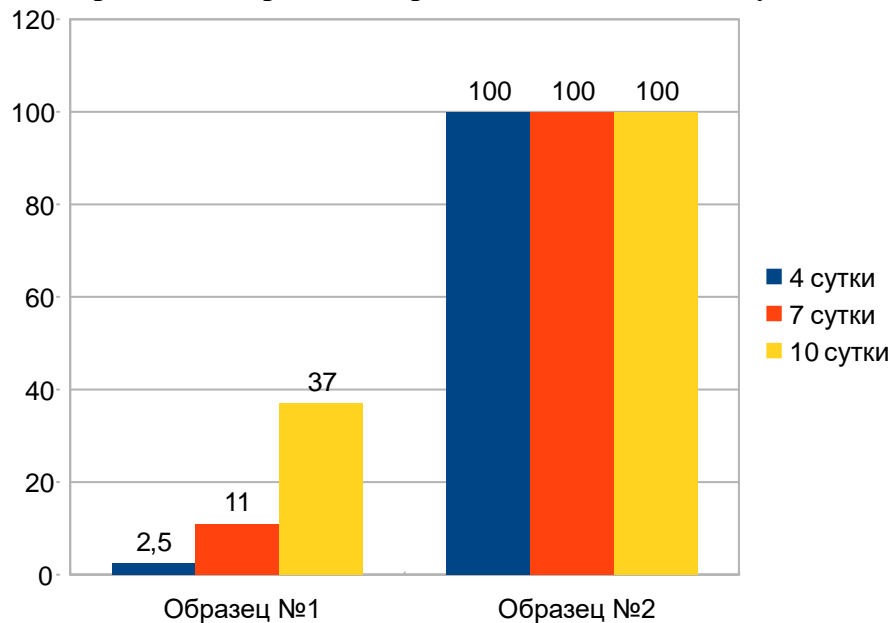


**Рис. 10 Каталазная активность в образцах почв, взятых на участках в с. Помары**

Содержание нитратов, как и ожидалось выше под нитрофильным растением- малиной.



**Рис.11** Содержание нитратов в образцах почв, взятых на участках в с. Помары

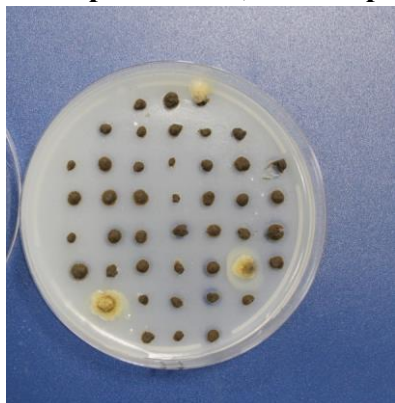


**Рис. 12.** Количество обрастаний азотофиксирующих бактерий в образцах почв в %

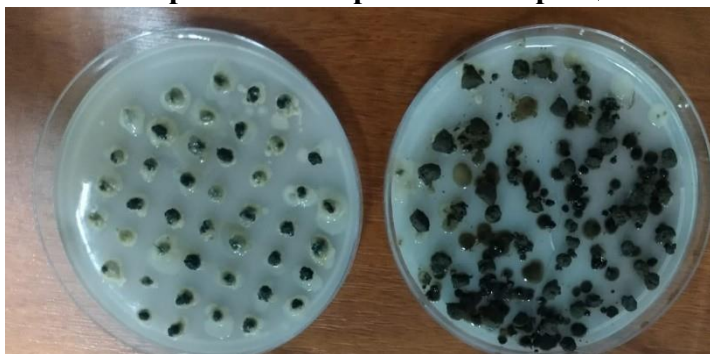
Микробиологический анализ показал, что обрастания азотфиксирующих бактерий активно стали появляться на всех почвенных комочках в образце №2, взятой не под малиной, а на грядке из под моркови. В образцах, взятых под малиной 4 бактериальных обрастания были с ровными и кружевными краями, молочного цвета, которые затем приобрели кремовый оттенок. Под 18 почвенными комочками появилась прозрачность среды Эшби. ( выедание кальция).



**Рис. 13. Образцы ПМ, 1 повторность (7 сутки опыта)**



**Рис. 14 Бактериальные обрастания образца ПМ на 10 сутки (2 повторность)**



**Рис. 15. Обрастания в образцах БМ на пахотной почве (без малины)**

В целом почвенно-экологические условия на участке под малиной оказались лучше по всем исследуемым показателям, кроме количества азотфиксирующих бактерий. Интенсивность деятельности азотофиксирующих бактерий была значительно выше в пахотной почве с грядки из под моркови. Причем характер бактериальных обрастаний говорит о наличии в пахотной почве бактерий *Azotobakter chroococcum* (рис.16), который образует колонии с бурым, почти черным пигментом.



**Рис.16. Колонии *Azotobakter chroococcum***

При изучении литературы по данному вопросу нами были встречены результаты исследований Даниловой А.А. в статье «Вопросы интерпретации результатов биотеста с применением бактерий рода AZOTOBACTER», где в исследованиях интенсивность роста внесённой живой культуры азотобактера была выше именно в более нарушенных пахотных почвах, по сравнению с естественными фитоценозами. Таким образом, гипотеза о большем количестве азотфиксирующих бактерий в почве под малиной результатами наших исследований не подтвердилась.

## **Выводы**

1. Почвы на с/х участках в с.Помары относятся к дерново-подзолистым средне-суглинистым по гранулометрическому составу.

2. По кислотности оба исследуемых участка в с.Помары относятся к нейтральным.

3. Содержание гумуса в 1,2 выше в почве под малиной, чем на грядках из под моркови.

4. Каталазная активность почвы, взятой на необрабатываемом участке под малиной выше, чем на участке без нее.

5 Содержание нитратов выше в почве под малиной на 30 %, чем в почве без нее.

6 Почвенно-экологические условия на участке под малиной оказались лучше по всем исследуемым показателям, кроме кол-ва азотфиксирующих бактерий.

7 Интенсивность деятельности азотфиксирующих бактерий была значительно выше в пахотной почве с грядки из под моркови. В ней обнаружены штаммы бактерий *Azotobacter chroococcum*.

8. Гипотеза о большом количестве азотфиксирующих бактерий в почве не подтвердилась

## **Список литературы**

1. Алексеева, А.А., Общие принципы биодиагностических исследований агрогенно-измененных почв, Красноярск, Россия [Электронный ресурс], URL: <https://studylib.ru/doc/2105233/alekseeva-a.a.--fomina-n.v.-obshhie-principy> (Дата обращения: 20.12.2022)
2. Аринушкина, Е.В. Руководство по химическому анализу почв /Е.В. Аринушкина, изд-во МУ, 1970. - 488 с.
3. Ахмерова, А.Р. Биохимические основы фиксации атмосферного азота, роль азотофиксирующих бактерий в биогенной миграции атомов, /А.Р. Ахмерова - бакалаврская работа(рукопись) ФГБОУ ВО «Пезенский ГУ», Пенза. – 2018. – 52с.

4. Богатырев, Л.Г. Почвоведение. Учеб. для ун-тов. / Л.Г. Богатырев, В.Д. Васильевская, А.С. Владыченский и др В 2 ч., Типы почв, их география и использование, Высш.шк.,1988. -368 с.
5. Воскресенская, О.Л. Организм и среда: факториальная экология: Учебное пособие /О.Л. Воскресенская, Е.А. Скочилова, Т.И. Копылова, Е.А. Алябышева. Мар. гос. ун-т.-Йошкар-Ола, 2005. 175 с.: ил.- С.65-66.
6. Газизуллин, А.Х. Почвенно-экологические условия формирования лесов Среднего Поволжья. / А.Х. Газизуллин. Т.1: Почвы лесов Среднего Поволжья, их генезис, систематика и лесорастительные свойства: Научное издание. -Казань: РИЦ «Школа», 2005. -496с.
7. Газизуллин, А.Х. Региональные особенности почвообразования и почвы лесов центральной части Среднего Поволжья. /А.Х. Газизуллин. //«Лесной журнал». - 2006. - №5. - С.7-14.
8. Гурьев, Г. П. К вопросу о симбиотической азотфиксации в условиях Орловской области / Г. П. Гурьев // Зернобобовые и крупяные культуры. – 2012. № 2. – С. 66 – 71.
9. Данилова А.А. Вопросы интерпретации результатов биотеста с применением бактерий рода AZOTOBACTER /А.А. Данилова, А.А. Петров // Почвы и окружающая среда, Том 4 №3, 2021. - С.1-5.
- 10.Звягинцев, Д.Г. Биологическая активность почв и шкалы для оценки некоторых ее показателей / Д.Г.Звягинцев // Почвоведение, 1978 — № 6.- С.48-54.
- 11.Кауричева, И.С. Практикум по почвоведению / И.С. Кауричева. Колос,1980- 272 с.
- 12.Казаков, И.В. Малина / И.В. Казаков, В.В. Кичина/ М: Россельхозиздат, 1980, - 105с.
- 13.Касарина, Н.П. Влияние различных растительных сообществ на агрохимические свойства почвы [Электронный ресурс], URL: <https://schoolscience.ru/5/1/34302> , 2022. - Дата обращения: 21.12.2022).
- 14.Комиссарова, Т.С. Полевая геоэкология для школьников / Т.С. Комиссарова. СПб.: ЛГУ им. А. С. Пушкина, 2010. - 296 с.

15. Луганская, В.Д. Химический анализ почв: методические указания к проведению лабораторных занятий / В.Д. Луганская, Екатеринбург: УГЛУ, 2011. -29с.
16. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части России / П.Ф. Маевский. 10-е изд. Москва: Товарищество научных изданий КМК. 2006. 600с
17. Махонина, Г.И. Руководство к большому практикуму: современные методы физико-химического анализа почв/ Г.И. Махонина Валдайских - Екатеринбург: УГУ им. А.М. Горького, 2008. - 111 с.
18. Новиков, В.С., Популярный атлас-определитель. Дикорастущие растения, / В.С.Новиков, И.А. Губанов. М.: Дрофа, 2002. -416 с.
19. Обзор. Оценка уровня загрязнения почв по интегральным биологическим показателям //Методическое и информационное обеспечение Общественного мониторинга окружающей среды силами учащихся и педагогов образовательных организаций России// М, 2018.- С.70-80
20. Петров, В.В. Растительный мир нашей родины /В.В. Петров— М.: Просвещение, 1991, - 207с.
21. Почва как биогенная система /[Электронный ресурс], URL:
22. <http://belagrobiznes.ru/agroekologiya/funktsii-agroekosistem/521-otsenkabiologicheskoy-aktivnosti-pochvy> 2022. - Дата обращения: 29.11.2022).
23. Хорецкая, Н. С. Определение азотобактеров в почвах разного происхождения /Н. С.Хорецкая, А. Д. Пырэу. Иваново, 2021 [Электронный ресурс], URL: <https://docs.yandex.ru/docs/view?tm=1671613112&tld=ru&lang=ru&name=Норецкая-N.S.-Пуреу-A.D.-Ivanovskayaoblas.pdf&text> (рукопись) Дата обращения: 21.12.2022).