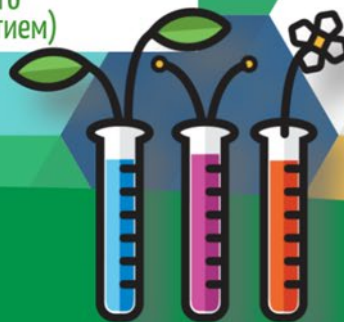


# ВСЕРОССИЙСКИЙ КОНКУРС

Юных исследователей окружающей среды  
имени Б.В. Всесвятского  
(с международным участием)



Областная государственная бюджетная нетиповая  
образовательная организация «Дворец творчества детей и молодёжи»

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение  
города Ульяновска  
«Средняя школа №48 имени Героя России Д.С. Кожемякина»

Проектная работа

## **Получение жизнеспособных колоний бактерий рода *Azotobacter* и использование культуры в качестве удобрений**

Номинация:

Прикладная клеточная биология, биотехнология, генетика и селекция

Автор: Яковлева Дарья Васильевна, 11 класс,  
обучающаяся детского объединения «Агротехнологии»

Руководитель: Вихирева Светлана Владимировна, педагог ОГБН ОО «ДТДМ»,  
учитель биологии МБОУ СШ №48 им. Героя России Д.С. Кожемякина

Место проведения исследования: город Ульяновск, ООПТ Ульяновский дендропарк,  
лаборатория экологического факультета УлГУ, Ульяновский региональный  
«Экокампус», школьная лаборатория

Сроки выполнения исследования: сентябрь 2023 г. – по настоящее время

Ульяновская область  
2024

## Оглавление

1. Введение	
1.1. Проблема и ее анализ.....	3
1.2. Обзор литературы по проблеме исследования	
1.2.1. Физиологические свойства <i>Azotobacter</i> .....	4
1.2.2. Рынок биоудобрений <i>Azotobacter</i> .....	5
2. Методики проведенных исследований	
2.1. Алгоритм проведения работ .....	6
2.2. Методика почвенных комочков .....	6
2.3. Методика выделения чистых культур азотобактера и получение суспензии.....	6
2.4. Технология получения сухого азотобактера .....	7
2.5. Микроскопическое исследование микроорганизмов .....	7
2.6. Методика определения нитрат-ионов .....	8
2.7. Методика скрининга азотфиксирующих бактерий на способность к стимулированию роста растений.....	8
3. Результаты исследований и их обсуждение	
3.1. Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов .....	9
3.2. Первичный анализ почвы .....	10
3.3. Культивирование <i>Azotobacter Chlorococcum</i> .....	11
3.4. Выделение чистых культур азотобактера и получение суспензии .....	12
3.5. Получение сухого азотобактера .....	13
3.6. Получение биологически активных капсульных удобрений на основе <i>Azotobacter</i> .....	14
3.7. Микроскопическое исследование .....	15
3.8. Скрининг азотфиксирующих бактерий на способность к стимулированию роста растений. ....	15
3.9. Биотестирование. Оценка развития и роста выращиваемых культур с использованием жидких удобрений.....	17
3.10. Биотестирование. Оценка развития и роста выращиваемых культур с использованием биологически активных капсульных удобрений. ....	18
3.11. Экономический эффект .....	20
4. Выводы .....	21
5. Заключение.....	22
6. Список использованной литературы.....	23

## 1. Введение

### 1.1. Проблема и ее анализ

Азот – один из основных элементов, необходимых для обеспечения жизнедеятельности растений. Он входит в состав всех простых и сложных белков, которые являются главной составной частью цитоплазмы растительных клеток, и в состав нуклеиновых кислот. Растениям он необходим постоянно, так как отвечает за все процессы питания. (Корчагин, 2018)

Особенно нуждаются в этом элементе молодые растения во время активного роста стеблей и листьев.

Условия азотного питания сильно влияют на рост и развитие растений. Даже на начальной стадии азотное голодание может привести к потере половины урожая. При недостатке азота рост их резко ухудшается. Особенно сильно сказывается недостаток азота на развитии листьев: они становятся мелкими, приобретают светло-зеленую окраску, преждевременно желтеют, стебли становятся тонкими и слабо ветвятся.

В основном, азот для подкормки растений вносят в виде: калиевой, натриевой селитры, аммиачных, органических и других удобрений.

Оптимизация содержания азота в почвах достигается системой севооборотов, системой обработки почвы и системой применения органических и минеральных удобрений. (Завалин, 2018)

Производство азотных минеральных удобрений является энергоемким. В развитых странах на их выпуск в среднем тратится почти треть всей энергии, потребляемой в сельскохозяйственной отрасли. Кроме этого, при внесении минеральных удобрений есть риск передозировки.

При внесении больших доз азотных удобрений глубоко затрагиваются процессы азотного метаболизма в почвах: значительно усиливается минерализация природных запасов органических азотистых соединений, в результате которой в почвах могут не использоваться избыточные количества минерального азота (преимущественно нитратов). Дополнительно минерализованный азот вместе с остаточными количествами удобрений может безвозвратно теряться вследствие денитрификации и вымывания нитратов. Последний фактор крайне нежелателен, так как может привести к нитратному загрязнению природных вод.

**Актуальность.** Присутствующий на Земле азот находится, в основном, в газообразном виде и не используется напрямую большинством живых организмов.

Организмами, способными преобразовать атмосферный азот в пригодную для использования форму в процессе биологической фиксации и сделать его полезным для живых организмов, являются азотфиксирующие бактерии.

Представители рода *Azotobacter* являются свободноживущими азотфиксаторами, в отличие от представителей рода *Rhizobium*, входящих в группу клубеньковых бактерий.

Экспериментально установлено, что азот, фиксированный микроорганизмами, на 100% усваивается растениями, в то время как азот

минеральных удобрений - всего на 50%. (Терещенко, 2003). Поэтому создание удобрений на основе микроорганизмов является актуальным.

**Альтернативные решения.** Благодаря своей способности улучшать здоровье растений посредством фиксации азота, выработки гормона роста, растворения фосфатов, борьбы с болезнями растений и восстановления здоровья почвы, *Azotobacter* является одним из лучших вариантов использования в качестве биоудобрения для экологически чистого и устойчивого растениеводства.

**Новизна идеи.** Многие микробиологические удобрения делаются на основе штаммов, выращенных в лабораторных условиях. Такие удобрения не обладают нужным набором адаптаций и характеристик.

Азотобактер вырабатывает резистентность к определенным условиям среды. Забор проб с нужного потребителю участка, выявление в данных условиях азотобактера поможет выделить полезные и устойчивые к неблагоприятным условиям среды штаммы, из которых в дальнейшем создается препарат. Это обеспечивает максимально быстрое внедрение его в экосистему.

**Цель работы.** Создать биологически активные удобрения на основе *Azotobacter*.

**Задачи исследования.**

1. Изучить имеющийся опыт применения в качестве удобрений азотфиксирующих бактерий.
2. Разработать методику создания биологически активных удобрений на основе *Azotobacter*.
3. Оценить эффективность применения биоудобрений при выращивании сельскохозяйственных культур.

**Объект исследования:** биологически активные удобрения с *Azotobacter*.

**Предмет исследования:** эффективность биоудобрений, разработанных на основе местных штаммов.

**Гипотеза.** Мы предполагаем, что технология применения удобрения на основе азотобактера, взятого в природных условиях, резистентного к воздействию внешних факторов, позволит получить максимальный эффект в сравнении с другими технологиями.

**Методы исследования:** анализ литературы по проблеме исследования, эксперимент, биотестирование.

## **1.2. Обзор литературы по проблеме исследования**

### **1.2.1. Физиологические свойства *Azotobacter***

Азотобактерия – свободноживущая грамотрицательная бактерия овальной или сферической формы. Это важное биоудобрение, которое помогает повысить плодородие почвы за счет фиксации азота, что впоследствии помогает увеличить урожайность сельскохозяйственных культур посредством процесса биосинтеза биологически активных веществ для потребления растениями.

Фиксация азота входит в число наиболее важных биологических процессов и рассматривается как интересная микробная деятельность на поверхности Земли, поскольку она обеспечивает способ переработки азота и играет важную

роль в гомеостазе азота в биосфере (Wani et al, 2016). Более того, биологическая фиксация азота также помогает поддерживать плодородие почвы и повышать урожайность сельскохозяйственных культур (Вэнс и Грэм, 1995). Обнаружено, что азотобактерии являются полезными организмами для использования в качестве биоинокулянтов и для изучения процесса фиксации азота благодаря их способности быстро расти и быстро фиксировать большие количества азота. *Azotobacter* способен превращать атмосферный азот в аммиак, который, в свою очередь, поглощается и утилизируется растениями.

Известно, что помимо благотворного влияния на стимулирование роста растений *Azotobacter* также способствует подавлению патогенных заболеваний растений. В литературе имеется несколько примеров, подтверждающих важность подавления заболеваний различными видами *Azotobacter*. (Махешвари, 2012)

### 1.2.2. Рынок биоудобрений *Azotobacter*

Род *Azotobacter* использовался в качестве биоудобрения более века (Gerlach и Vogel, 1902). Сообщается, что использование штаммов *Azotobacter* в качестве биоинокулянта для широкого спектра культур (зерновые, томаты, баклажаны, морковь и сахарный тростник) приводит к повышению урожайности (Mrkovacki and Milic, 2001). Биоудобрения на основе N<sub>2</sub>-фиксирующих бактерий, таких как *Rhizobium*, *Azotobacter*, в настоящее время представляют собой крупнейший сегмент мирового рынка биоудобрений.

Мировой рынок биоудобрений, фиксирующих N<sub>2</sub>, в 2016 году оценивался в 800 миллионов долларов США, и ожидается, что к концу 2024 года он достигнет 3 миллиардов долларов США (Soumare et al., 2020), среднегодовой темп роста составит около 14,3% в течение прогнозируемого периода. Мировой рынок биоудобрений на основе *азотобактера* в 2017 году оценивался в 212,2 миллиона долларов США и ожидается, что среднегодовой темп роста составит 8,7% в период 2020–2025 годов (Mordor Intelligence Market, 2020).

Таблица 1. Мировой рынок удобрений с *Azotobacter*

Страна	Компания	Продукт
Россия	Природные ресурсы	Азотобактерин
Австралия	LLC EM Technology Mapleton Agri Biotec Pty Ltd	Ekophit TwinN
Канада	Nutri-Tech solutions	Nutri-Life Bio-P
Индия	T. Stanes & Company Limited	Nutri-Life Bio-N Symbion-N non associative type
Индия	Camson Bio Technologies Limited	CALZOTO

Индия	Gujarat State Fertilizers and Chemicals	Sardar Biofertilizers
Индия	Agri Life	Nitrofix AC Nitrofix AV
Индия	KN Biosciences	Azopower
Венгрия	PhylazonitKft	Phylazonit-M

## 2. Методики проведенных исследований

### 2.1. Алгоритм проведения работ

1. Приготовление питательной среды.
2. Культивирование *Azotobacter*.
3. Эксперимент. Биотестирование.
4. Расчет экономической эффективности использования биологически активных удобрений с применением *Azotobacter*.

### 2.2. Методика почвенных комочков

Метод почвенных комочков является наиболее удачным, так как он наиболее приближен к естественным условиям (Зенова Г.М. и др., 2002; Aquilanti L., Favilli F., Clementi F., 2004)

Накопительные культуры азотобактера получают, используя в качестве посевного материала непосредственно почву. 50 мг почвы увлажняют до пастообразного состояния и с помощью бактериологической петли раскладывают 20-25 комочков на поверхность плотной среды Эшби в чашку Петри.

Состав стандартной безазотистой питательной среды Эшби:

- 1) Карбонат кальция  $\text{CaCO}_3$  – 1 г.
- 2) Агар микробиологический – 3 г.
- 3) Глюкоза – 4 г.
- 4) Вспомогательный раствор – 200 мл.

Состав вспомогательного раствора:

- 1) Хлорид натрия  $\text{NaCl}$  – 200 мг.
- 2) Сульфат калия  $\text{K}_2\text{SO}_4$  – 100 мг.
- 3) Сульфат магния семиводный  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 200 мг.
- 4) Гидрофосфат калия  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 200 мг.
- 5) Вода дистиллированная – до 1 л.

### 2.3. Методика выделения чистых культур азотобактера и получение суспензии

Рассев петлей (метод истощающего штриха) предполагает высев бактериологической петлей из накопительной культуры на поверхность агаризованной среды в чашках Петри. На первом этапе петлей с культурой наносят ряд параллельных штрихов на агаризованной среде. Петлю стерилизуют, остужают о незасеянную часть агаризованной среды и проводят серию штрихов в направлении, перпендикулярном первым. Затем петлю вновь

стерилизуют, остужают и штрихи наносят в направлении В, а после очередной стерилизации – в направлении Г. Чашки помещают в термостат и через определенное время учитывают результаты. Обычно на штрихах А и Б вырастает большое число колоний (иногда сплошной рост), тогда как на штрихах В и Г формируются изолированные (отдельные) колонии.

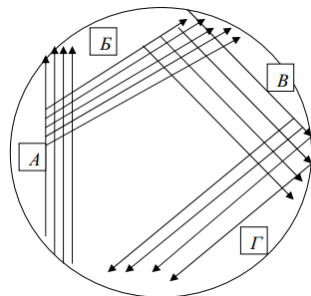


Рис. 1. Схема посева бактерий штрихами для получения изолированных колоний

Полученный посевной материал стерильно смывают с поверхности агара водой и переносят в подготовленные бутылки. Содержимое бутылок перемешивают и термостатируют при 25 - 27 °С. Препарат сохраняет свою активность в течение 2 - 3 месяцев.

#### 2.4. Технология получения сухого азотобактера

Азотобактер сухой представляет собой активную культуру высушенных клеток азотобактера в смеси. При этом используют вакуумную сушку при 30 - 35 °С и остаточном давлении 10 - 13 кПа. В 1 г сухого препарата должно содержаться не менее 0,5 млрд жизнеспособных клеток.

Высушенную культуру фасуют в полиэтиленовые пакеты по 0,4 - 2 кг. Пакеты хранят при температуре не выше +15 °С в течение не более 3 месяцев.

#### 2.5. Микроскопическое исследование микроорганизмов

Микроскопическое исследование образцов производили по методу Цилю Нильсена (Севастьянова Э.В., 2018).

1. Маркированные предметные стекла с нанесенными на них мазками диагностического материала помещают на специальный штатив так, чтобы они не касались друг друга, а их маркировка (номера) была направлена в одну сторону.

2. На фиксированный препарат накладывают полоску фильтровальной бумаги, размером немного меньше предметного стекла, но так, чтобы она закрывала мазок полностью. Фильтровальную бумагу используют для предотвращения растекания красителя по стеклу и возможного осаждения кристаллов краски на мазок.

3. На бумагу наливают раствор арболового фуксина и нагревают препарат над пламенем горелки до появления легкого облачка паров, не допуская закипания краски и высыхания бумаги. Объем красящего раствора должен быть достаточным для того, чтобы его повторно не наносить на уже разогретый мазок.

В случае высыхания мазка и повторного нанесения красителя, нагрейте мазок до появления паров повторно.

4. Мазок оставляют на 5 минут с красителем, чтобы он проник в клеточную стенку МБ и окрасил ее.

5. Пинцетом осторожно снимают фильтровальную бумагу и помещают ее в емкость с дезинфицирующим раствором

6. Осторожно смывают остатки краски слабой струей проточной воды или водой из резервуара. Вода должна быть комнатной температуры или холодной.

7. После каждой процедуры промывки, во избежание разбавления реактивов, каждое стекло аккуратно ставят пинцетом на ребро, чтобы стекли остатки воды.

8. Мазок обесцвечивают 25% раствором серной кислоты или 3% солянокислым спиртом, добиваясь визуального эффекта полного обесцвечивания. Продолжительность процедуры обесцвечивания – 3 минуты.

9. Мазок промывают проточной водой

10. Мазок докрашивают 0,3% раствором метиленового синего в течение 60 секунд.

11. Мазок промывают проточной водой

12. Мазок высушивают при комнатной температуре в вертикальном положении.

Микроскопируют с масляной иммерсией.

## 2.6. Методика определения нитрат-ионов

Определение нитритов проводилось по тест-комплекту «Нитраты». Метод определения нитрат-анионов основан на предварительном восстановлении нитрат-ионов до нитрит-ионов с последующим образованием азокрасителя в присутствии сульфаниловой кислоты и  $\alpha$ -нафтиламина.

Определение нитрат-ионов в почве проводится путём извлечения их из почвы раствором хлорида калия и последующим анализом почвенной вытяжки указанным методом.

Концентрация нитрат-ионов в анализируемой пробе определяется методом визуального сравнения окраски пробы с контрольной плёночной шкалой образцов окраски. Содержание нитрат-анионов в почве и азота нитратов в почве определяется расчетным путем исходя из концентрации нитрат-анионов в почвенной вытяжке.

## 2.7. Методика скрининга азотфиксирующих бактерий на способность к стимулированию роста растений

Таблица 2. Приготовление исследовательских планшетов для скрининга

Приготовление среды «Азот»

Название компонента	Количество
Раствор солей для среды «Азот»	200 мл
Раствор «Смесь микроэлементов»	0,5 мл
CaCO <sub>3</sub>	1 г
Агар	3 г

Глюкоза	4 г
Бромтиоловый синий	2 мл
Амфоторецин В 50х	0,5 мл

#### Приготовление среды «Фосфор»

Название компонента	Количество
Раствор солей для среды «Фосфор»	200 мл
Раствор «Смесь микроэлементов»	0,5 мл
Агар	3 г
Глюкоза	4 г
Бромфеноловый синий	2 мл
Амфоторецин В 50х	0,5 мл

#### Приготовление среды «Калий»

Название компонента	Количество
Раствор солей для среды «Калий»	200 мл
Раствор «Смесь микроэлементов»	0,5 мл
Агар	3 г
Глюкоза	4 г
Бромкрезоловый красный	2 мл
Амфоторецин В 50х	0,5 мл

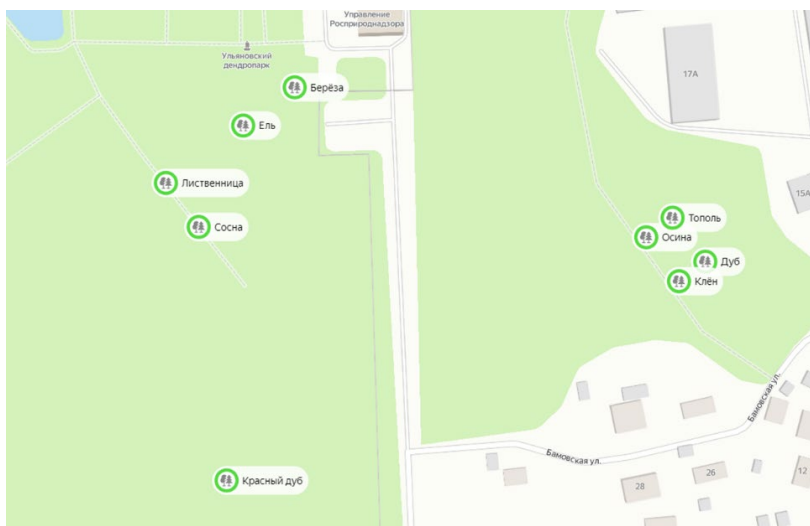
Затем необходимо высадить на планшеты со скрининговыми средами выбранные колонии бактерий. Пожелтение среды свидетельствует о выделении бактериями кислоты в ответ на недостаток питательных веществ.

### 3. Результаты исследования и их обсуждение.

#### 3.1 Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов

Осенью 2023 года мы приняли участие в исследовательской программе «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов», которая реализуется в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019 – 2027 годы при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Цель программы: проведение масштабных исследований с участием ведущих ученых и привлечением обучающихся для сбора образцов почв для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами и анализа данных и результатов. Было отобрано 10 площадок на особо охраняемой природной территории «Ульяновский дендропарк». Забор почв произведен методом конверта под породами деревьев, не только типичными для нашего климатического пояса: дуб черешчатый *Quercus robur*, клён остролистный *Acer platanoides*, осина обыкновенная *Populus tremula L.*, тополь чёрный *Populus nigra*, берёза бородавчатая *Betula pendula*, ель обыкновенная *Picea abies*, лиственница европейская *Larix decidua*, сосна обыкновенная *Pinus sylvestris*, липа сердцевидная *Tilia cordata*, но и интродуцированными на нашей территории: красный дуб *Quercus rubra*. (Рисунок 2)



<https://yandex.ru/maps/195/ulyanovsk/?ll=48.344872%2C54.364847&mode=usermaps&source=constructorLink&um=constructor%3A01817deced64778b0d3f098f8700f15a07e788b95e26f5e9856ac24aedd40589&z=18>

Рисунок 2. Интерактивная карта отбора почвенных образцов

### 3.2 Первичный анализ почвы

Провели первичный анализ почвы на содержание азотных соединений. Была приготовлена почвенная вытяжка для дальнейшего исследования на нитрат-ионы с помощью тест-комплекта «Крисмас». Азот присутствует во всех пробах, но больше всего в пробах, взятых под хвойными деревьями, меньше всего под интродуцентом. (Рисунок 3, 4)

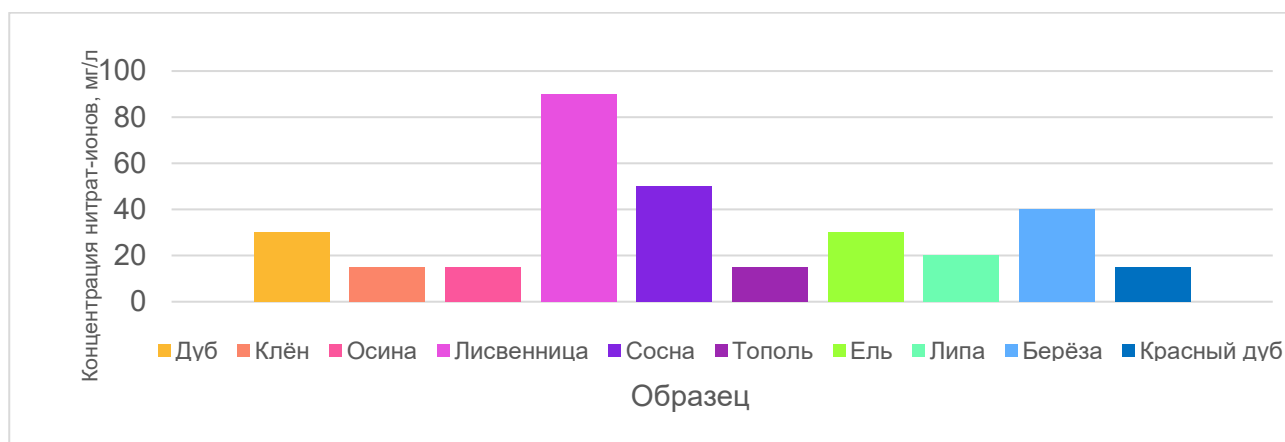


Рисунок 3. Содержание нитрат-ионов






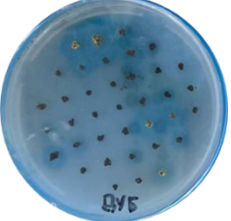

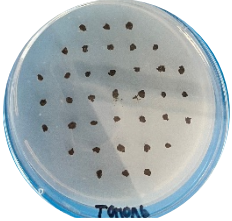
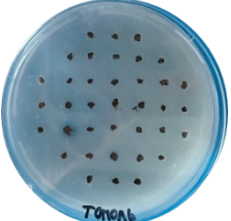
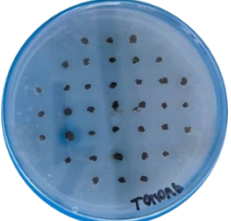








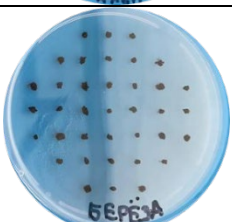
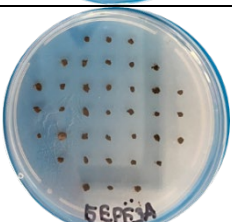

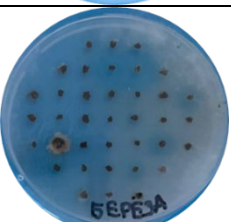



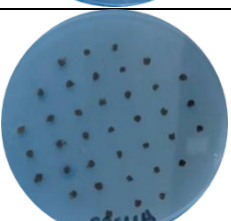
Рисунок 4. Определение содержания нитрат-ионов

### 3.3. Культивирование *Azotobacter Chlorococcum*

Получение *Azotobacter* осуществлялось методом почвенных комочков.

Наиболее распространенный и изученный *Azotobacter Chlorococcum* (обитает в почвах всех типов, кроме кислых) образует колонии с бурым, почти чёрным пигментом. (Таблица 3)

Таблица 3. Культивирование методом почвенных комочков

Образец	День			
	1 день	3 день	6 день	10 день
Дуб				
Тополь				
Осина				
Клён				
Берёза				
Сосна				

Липа				
Лиственница				
Ель				
Красный дуб				

На 3 день в образце «лиственница» обросли 28 комочков из 37, на 6 день все комочки.

В образце «ель» на 4 день оброс 1 комочек, на 6 день 3.

В образце «береза» на 6 день обросло 2 комочка, на 10 день 6 комочков.

В образце «сосна» на 6 день обросло 4 комочка, на 10 день 5 комочков.

В образце «дуб» на 6 день обросло 3 комочка, на 10 день 7 комочков.

В образцах «тополь», «осина», «клён», «липа», «красный дуб» колонии *Azotobacter* не образовались.

Культивирование бактерий осуществлялось в Биологической лаборатории «ANRO expert» при температуре +25°C и влажности 85%.

Учебно-исследовательский комплекс «ANRO EXPERT» лаборатория был получен в рамках Всероссийского проекта «Успех каждого ребёнка». Установка оснащена вмонтированной системой обеспечения микроклимата. Встроенные датчики фиксируют состояние системы и позволяют корректировать установленные параметры в автоматическом режиме. Комплекс имеет встроенную систему вентиляции и увлажнения. Благодаря отсутствию перепадов влажности и температуры внутри комплекса создаются условия, идеально подходящие для культивирования *Azotobacter*.

### 3.4. Выделение чистых культур азотобактера и получение суспензии

*Azotobacter Chlorococcum* был высеян на чистую среду Эшби методом истощающего штриха. (Рисунок 5)



Рис. 5. Высев *Azotobacter* на среду с помощью микробиологической петли

Культивирование бактерий осуществлялось в Биолоборатории «ANRO expert» при температуре +25°C и влажности 85%. На 2 день колонии начали активно размножаться. (Рисунок 5)



Рис. 6. *Azotobacter Chlorococcum* на 2 день

Полученная культура была смыта на 4 день дистиллированной водой и перенесена в стерильные бутылки.

Полученную суспензию будем использовать в качестве жидких удобрений.

### 3.5. Получение сухого азотобактера

Для того, чтобы увеличить срок и удобство хранения биоактивного удобрения, нужно высушить азотобактерии, превратив их в порошок.

Сушка производилась в вакуумной сушилке при 3 °С в течение 8 часов.

Получился порошок сероватого цвета, который теперь можно удобно хранить.

### 3.6. Получение биологически активных капсульных удобрений на основе *Azotobacter*

В качестве материала капсулы был выбран донный ил, или сапропель, поскольку такая оболочка абсолютна безвредна для растений, и сама может служить удобрением. Благодаря постепенному растворению удобрений внутри капсулы исключается возможность их передозировки и опасность сжигания корней растений. При этом действующее вещество равномерно растворяется при поливе и впитывается корнями растения.

Поскольку капсулы являются природным сорбентом, удерживающим полезные вещества внутри себя, удобрения не вымываются сразу и способны питать растения в течение длительного времени.

В детском объединении «Агротехнологии» наработан опыт по изготовлению и применению сапропелевых капсульных удобрений пролонгированного действия. Технология разработана инициативной группой обучающихся (руководитель команды Архипова Анастасия, педагог-наставник Вихирева С.В., научный консультант Чернышев А.В., 2019). Получена опытная партия, проведены испытания в лаборатории экологического факультета УлГУ.

Но до настоящего времени в качестве пропитки мы использовали минеральные удобрения.

В представленной работе насыщенные азотобактером сапропелевые капсулы вносили в почву в виде капсульных удобрений пролонгированного действия.

#### Технология изготовления капсульных удобрений.

1. Донный ил мы раскладывали по формочкам и давали ему высохнуть в течение 30-40 минут. Затем полученные капсулы помещаются в сушильный шкаф и выдерживаются в нём 15 минут при температуре 120°C до удаления влаги.
2. Полученные сапропелевые капсулы пропитали суспензией, содержащей азотобактер (пункт 3.4).
3. Готовые биологически активные капсульные удобрения высушили в вакуумной сушилке при 3 °C в течение 10 часов.

Капсульные удобрения использовали при проведении исследования.

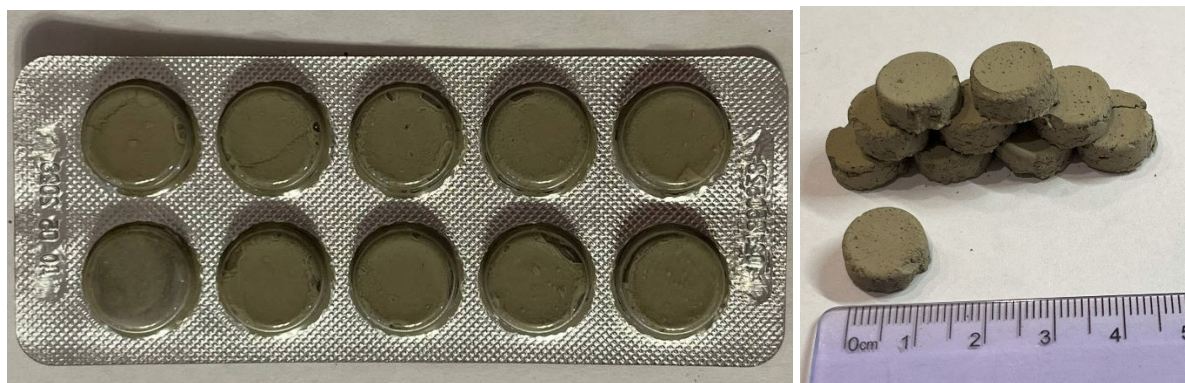


Рисунок 7. Полученные биологически активные капсульные удобрения

### 3.7. Микроскопическое исследование

Для изучения азотобактера, состоящего из блестящих слизистых колоний, был приготовлен препарат-мазок, окрашенный фуксином Циля и тушью.

Микроскопия показала, что азотобактерии присутствуют в анализируемых образцах: лиственница, сосна, ель, дуб, берёза.

Клетки бактерий рода *Azotobacter* имеют овальную форму (окрашены в розовый цвет), располагаются одиночно, парами и неправильными скоплениями. Розовый цвет свидетельствует о том, что полученные бактерии – грамотрицательные. (Рисунок 8)

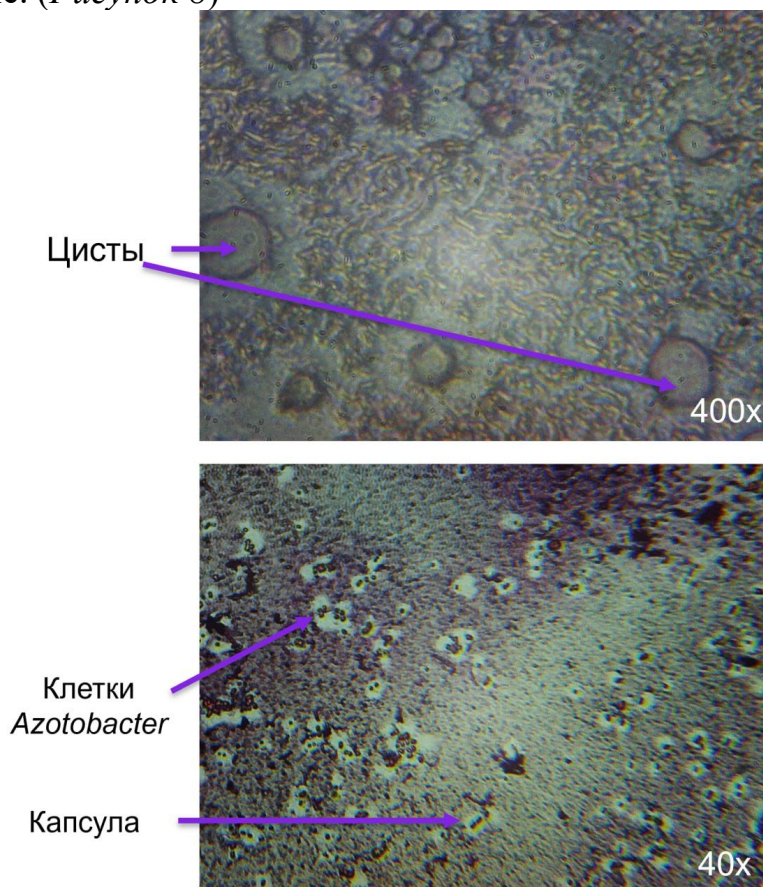


Рисунок 8. Мазок под световым микроскопом с увеличением 40х и 400х

### 3.8. Скрининг азотфиксирующих бактерий на способность к стимулированию роста растений.

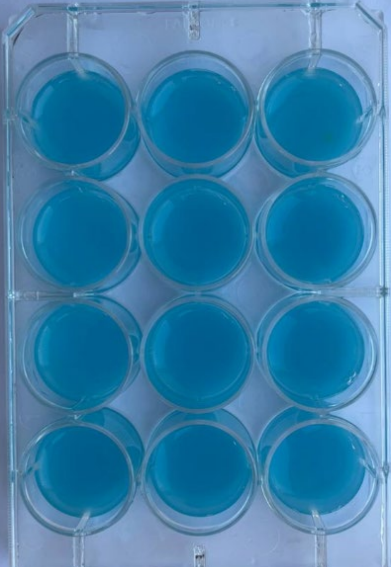
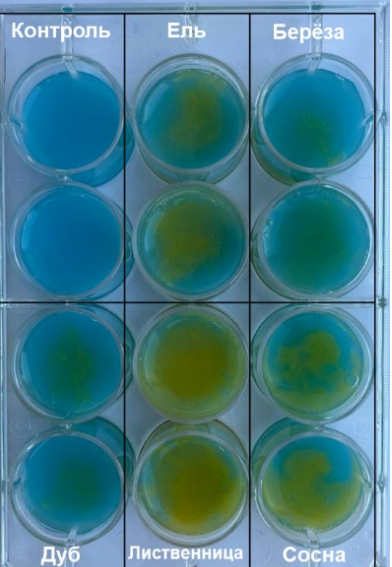
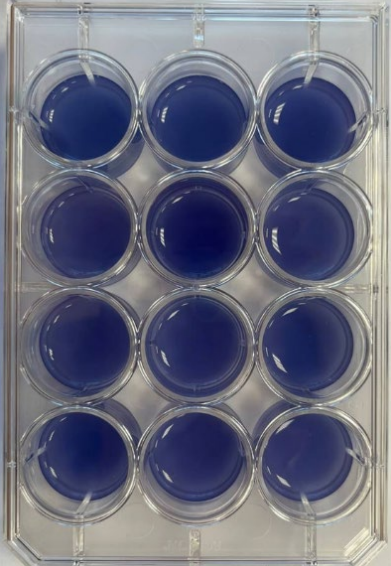
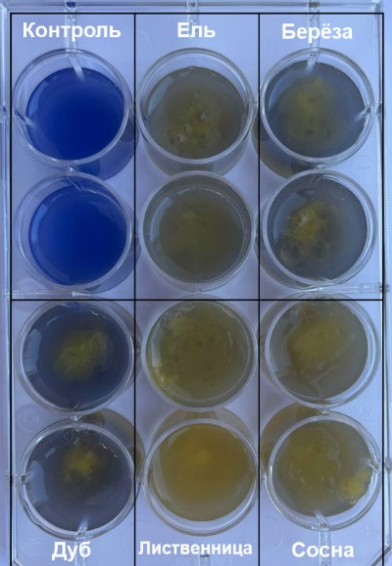
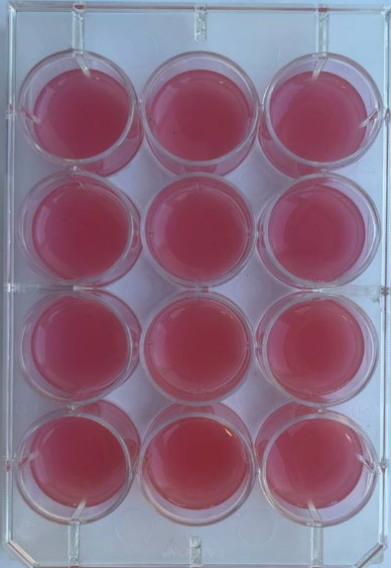
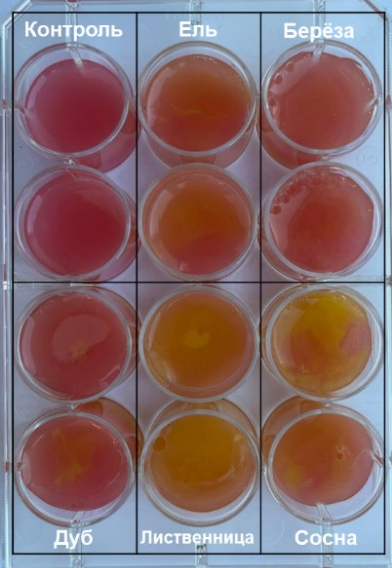
Солубилизаторы азота, фосфора и калия в биоудобрениях способны преобразовывать элементы из нерастворимых форм, содержащихся в почве, в доступные для растений ионы.

Данный скрининг направлен на выявление многофункциональных азотфиксирующих бактерий, которые потенциально могут способствовать росту растений.

Были приготовлены 3 исследовательских планшета для скрининга: азот, фосфор, калий. (Таблица 4)

Инкубация происходила в биологической лаборатории «ANRO expert» при температуре +25°C и влажности 85%.

Таблица 4. Скрининг азотфиксирующих бактерий

Планшет	Изначальный цвет	Время инкубации	Изменения
«Азот»		5 дней	
«Фосфор»		7 дней	
«Калий»		7 дней	

В планшете «Азот» произошло пожелтение среды на 5 день из-за выделения бактериями кислоты в результате активной жизнедеятельности.

В планшете «Фосфор» пожелтение среды на 7 день из-за выделения бактериями кислоты в ответ на недостаток фосфора.

В планшете «Калий» пожелтение среды на 7 день, из-за выделения бактериями кислоты в ответ на недостаток калия.

### 3.9. Биотестирование. Оценка развития и роста выращиваемых культур с использованием жидких удобрений

В качестве тест-объекта взяли 2 культуры: овёс яровой и подсолнечник однолетний. Эксперимент продолжался на протяжении 7 дней.

Культуры выращивались с добавлением суспензии *Azotobacter Chlorococcum* в почву. В качестве контроля были культуры без *Azotobacter Chlorococcum*. (Рисунок 9)



Рисунок 9. Добавление суспензии *Azotobacter Chlorococcum*

Оценка всхожести семян показала, что культуры, где добавлялся *Azotobacter*, росли быстрее и дружнее. Общее количество посаженных семян 45. На *Azotobacter* взошли 40 семян, без *Azotobacter* только 18 на 6 день. (Рисунок 10)

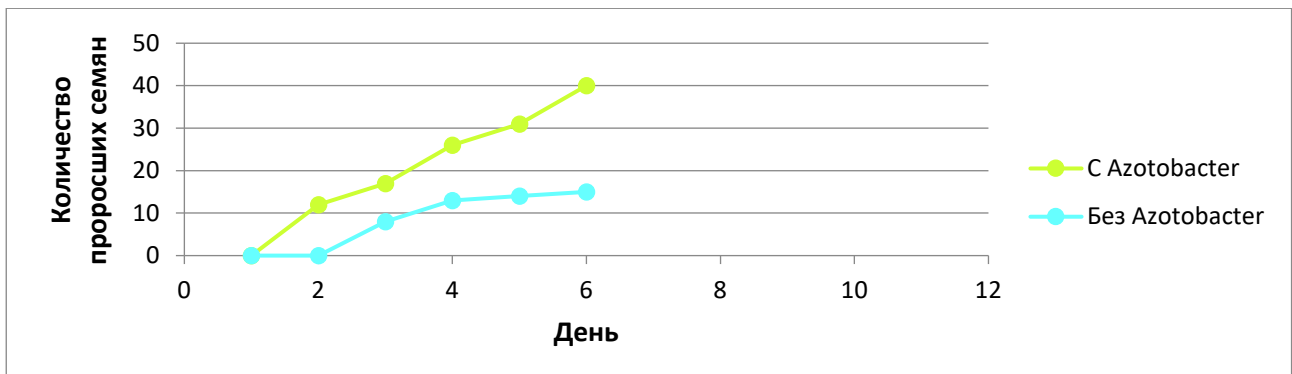


Рисунок 10. Энергия прорастания семян

Морфобиометрические показатели: длина высаженных культур с *Azotobacter* в 2,5 – 4 раза больше, чем культур без *Azotobacter* (Рисунок 11, 12)

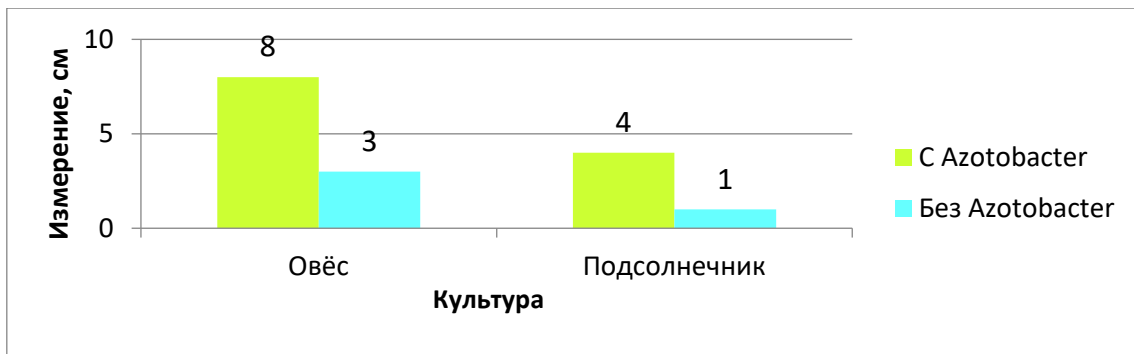


Рисунок 11. Морфобиометрические показатели



Рисунок 12. Результаты биотестирования

### 3.10. Биотестирование. Оценка развития и роста выращиваемых культур с использованием биологически активных капсульных удобрений

В качестве тест-объекта взяли 2 культуры: горчица листовая Прима и рожь озимая. Эксперимент продолжался на протяжении 10 дней.

Культуры выращивались с добавлением биологически активных капсульных удобрений на основе *Azotobacter* в почву. В качестве контроля были культуры без капсульных удобрений.

Оценка всхожести семян показала, что культуры, где добавлялся *Azotobacter*, росли быстрее и дружнее. Общее количество посаженных семян 45. На *Azotobacter* взошли 40 семян, без *Azotobacter* только 18 на 6 день. (Рисунок 13)

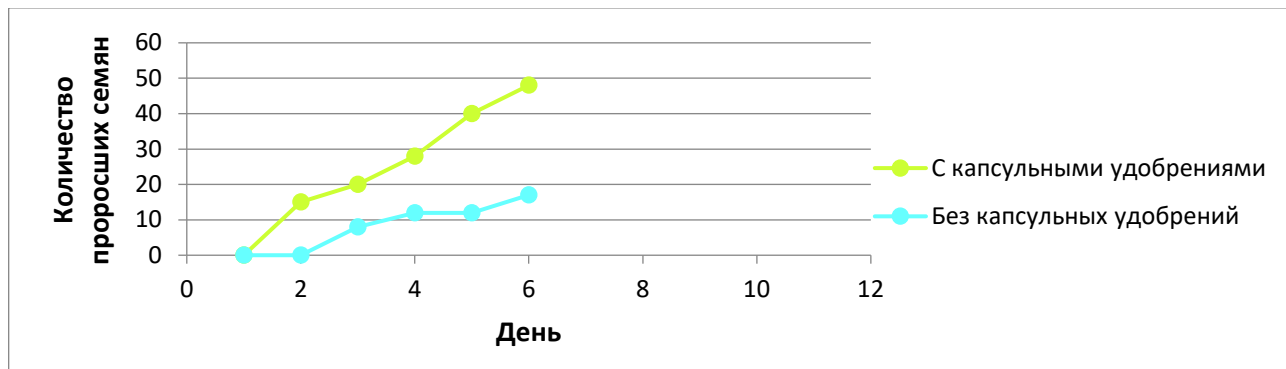


Рисунок 13. Энергия прорастания семян

Морфобиометрические показатели: длина высаженных культур с *Azotobacter* в 1,5 раза больше, чем культур без *Azotobacter*. При одинаковом количестве семян, растения с капсульными удобрениями росли дружнее. (Рисунок 14, 15)

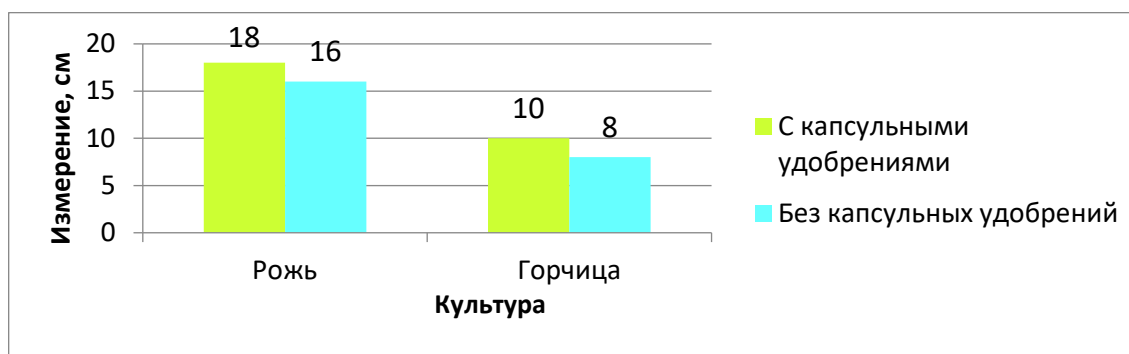


Рисунок 14. Морфобиометрические показатели



Рисунок 15. Результаты биотестирования

### 3.11. Экономический эффект

Общие затраты составили 882 рубля. (Таблица 4)

Таблица 4. Экономический эффект

№ п/п	Цена	Количество	Источник/ ресурсное обеспечение
Учебно-исследовательский комплекс «ANRO EXPERT» лаборатория	198 693 Р	1	<a href="https://anrotech.ru/product/anro-expert/">https://anrotech.ru/product/anro-expert/</a> получено в рамках Всероссийского проекта «Успех каждого ребёнка»
Питательная среда Эшби	-	-	Получено в рамках проекта «Всероссийский Атлас почвенных микроорганизмов»
Чашки Петри	25Р	6	150Р Получено в рамках проекта «Всероссийский Атлас почвенных микроорганизмов»
Микробиологическая петля	16Р	1	В наличии

Спиртовка	182₽	1	<a href="https://ufa.pulscen.ru/products/spirtovka_s_kolpachkom_150_ml_86296684">https://ufa.pulscen.ru/products/spirtovka_s_kolpachkom_150_ml_86296684</a>
Стерильная бутылка	-	-	В наличии
Грунт	196₽	1	<a href="https://www.vseinstrumenti.ru/product/grunt-terra-vita-zhivaya-zemlya-universalnyj-10-l-4601104000642-4495008/">https://www.vseinstrumenti.ru/product/grunt-terra-vita-zhivaya-zemlya-universalnyj-10-l-4601104000642-4495008/</a>
Семена овса	27₽	1	<a href="https://zel-ugolok.ru/oves">https://zel-ugolok.ru/oves</a>
Семена подсолнечника	19₽	1	<a href="https://semena.ru/catalog/semena/ovoshchi/ovosi_podsolnechnik/podsolnechnik-gryzunchik/">https://semena.ru/catalog/semena/ovoshchi/ovosi_podsolnechnik/podsolnechnik-gryzunchik/</a>
Семена горчицы	31₽	1	<a href="https://www.ncsemena.ru/shop/semena/pryanye_travy/gorchitsa/gorchitsa_listovaya_prima_seriya_urozhay_na_okne-id683784/">https://www.ncsemena.ru/shop/semena/pryanye_travy/gorchitsa/gorchitsa_listovaya_prima_seriya_urozhay_na_okne-id683784/</a>
Семена ржи	28₽	1	<a href="https://zel-ugolok.ru/rozh">https://zel-ugolok.ru/rozh</a>
Сапропель	220₽	1	<a href="https://garden-zoo.ru/products/udobrenie-florizel-sapropel-2kg-10">https://garden-zoo.ru/products/udobrenie-florizel-sapropel-2kg-10</a>
Пластиковые контейнеры для микрозелени	13₽	4	52₽
			<b>Итого: 882 ₽</b>

Производство удобрений из *Azotobacter* очень выгодно и малозатратно, не требует большого количества ресурсов. Из минусов можно выделить, что срок таких удобрений довольно ограничен. Высушенные бактерии хранятся 4 месяца, суспензия 3 месяца.

#### 4. Выводы

В результате проделанной работы были созданы биологически активные удобрения на основе *Azotobacter Chlorococcum* в жидкой и капсульной формах. *Azotobacter Chlorococcum* был получен из образца почвы «лиственница», так как этот образец проявил наибольшую активность при проведении исследования методом почвенных комочков. Эксперимент доказал не только возможность, но и эффективность использования биологически активных удобрений при выращивании сельскохозяйственной продукции. Таким образом, цель достигнута.

1. Проанализировав имеющийся опыт использования азотфиксирующих бактерий в качестве удобрений, мы пришли к выводу, что в России уделяется недостаточное внимание удобрениям на основе *Azotobacter*.

Условия азотного питания сильно влияют на рост и развитие растений. Обилие азота в атмосфере может стать полезным для живых организмов, когда он преобразуется в пригодную для использования форму в процессе биологической фиксации. Такие удобрения возможно эффективно применять в сельском хозяйстве.

2. Разработана уникальная технология приготовления биологически активных удобрений пролонгированного действия из сапропелевых капсул и азотобактера. Биологически активные удобрения необходимо хранить в строго определённых условиях 3-4 месяца, не допуская резких перепадов температур и влажности, из-за чего они могут снизить свою эффективность.

Создание таких удобрений малозатратно, что подтверждается расчетом экономического эффекта (882 Р).

3. Эффективность применения удобрений доказана с помощью биотестирования. Морфобиометрические показатели высаженных культур с *Azotobacter* в 1,5 – 4 раза выше, чем культур без *Azotobacter*. Культуры, где добавлялся *Azotobacter*, росли быстрее и дружнее. Всхожесть семян при выращивании с биологически активными капсульными удобрениями выше в 4 раза, чем без капсульных удобрений. Всхожесть семян с добавлением суспензии в 3 раза выше, чем без нее.

## 5. Заключение

Биоудобрения высокоэффективны, легкоусвояемы растениями, так как являются естественным компонентом природных экосистем.

*Азотобактер* способствует выработке гормона роста, растворению фосфатов, борьбе с болезнями растений и восстановлению здоровья почвы. Поэтому биологически активные удобрения являются лучшими для экологически чистого и устойчивого растениеводства.

Изучаемый *Azotobacter Chlorococcum* способен переводить не только азот в легкоусвояемую форму, но и фосфор и калий.

Эксперимент показал, что высокое содержание азотных соединений в почве свидетельствует о наличии азотобактера.

Результаты работы опубликованы в Международном научном журнале для школьников «Юный ученый» (№ 76, февраль 2024 г.). (Рисунок 12)



Рисунок 12. Свидетельство о публикации

## 6. Список использованной литературы

1. Завалин, А. А. Азот в агросистеме на черноземных почвах / А. А. Завалин, О. А. Соколов, Н. Я. Шмырева. – М.: РАН, 2018. – 180 с.
2. Зенова, Г. М. Практикум по биологии почв / Г. М. Зенова, А. Л. Степанов, А. А. Лихачева. – М., 2002. – 120 с.
3. Корчагин, А. А. Система удобрений : учеб. пособие / А. А. Корчагин, М. А. Мазиров, Н. А. Комарова ; Владим. гос. ун-т им. А. Г. и Н. Г. Столетовых. – Владимир : Изд-во ВлГУ, 2018. – 116 с.
4. Севастьянова, Э. В. Выявление микобактерий методом микроскопии препаратов, окрашенных по цилю-нильсену / Э. В. Севастьянова, Е. Е. Ларионова, И. Ю. Андриевская. ФГБНУ "ЦНИИТ", 2018. – 9 с.
5. Терещенко, Н.И. Биодобрения на основе микроорганизмов // Учебное пособие. - Томск: Томский государственный университет, 2003 - 60 с.
6. Учебно-методический комплекс // дисциплина «Система оптимизации минерального питания». – КАУ, Астана, 2016.
7. Gerlach, M., and Vogel, I. (1902). Stickstoffsammeln bakterien. Z. Bakterien II 8:669.
8. Mrkovacki, N., and Milic, V. (2001). Use of Azotobacter chroococum as potentially useful in agricultural application. Ann. Microbiol. 51, 145–158.
9. Soumare, A., Diedhiou, A. G., Thuita, M., and Hafidi, M. (2020). Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture.