

**Всероссийский конкурс юных исследователей окружающей среды
имени Б.В.Всесвятского**

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение
«Низовская средняя общеобразовательная школа»
Муромцевского муниципального района Омской области

**Тема: «Наличие азотфиксирующих бактерий как индикаторов
химического загрязнения в антропогенно изменённых почвах
окрестностей села Низовое»**

Направление «Экологический мониторинг»

Подготовили: Колченко Александр Владимирович ,01.07.2009,
д. Юдинка, ул. Центральная,16/1, обучающийся 9 класса
Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение
«Низовская средняя общеобразовательная школа»
Муромцевского муниципального района Омской области

Руководитель: Андреева Людмила Николаевна,
учитель биологии
Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение
«Низовская средняя общеобразовательная школа»
Муромцевского муниципального района Омской области,
Омская область, Муромцевский район,
с. Низовое, ул. Обелисковая, 3

Содержание

Введение	3
I. Обзор литературы... ..	4
II. Экспериментальная часть.....	5
II.1. Отбор почвенных образцов.....	5
II.2. Подготовка почвы для анализа	6
II.3. Определение механического состава почвы.....	6
II.4. Определение кислотности среды почвенной вытяжки	6
II.5. Определение почвенного дыхания.....	6
II.6. Определение содержания органических веществ.....	7
II.7. Выделение бактерий, фиксирующих атмосферный азот ...	7
II.8. Микроскопическое исследование.....	9
Заключение.....	10
Используемая литература	11
Приложение 1	12
Приложение 2.....	17

Введение

Наличие азотфиксирующих бактерий относится к методам биоиндикации. Эти бактерии используют для оценки состояния почв, так как их присутствие и уровень жизнедеятельности служат объективным показателем плодородия почвы. Химическое загрязнение ведёт к снижению численности и даже полному исчезновению бактерий этого рода, поэтому их применяют как индикаторы химического загрязнения почвы.

Azotobacter – это род свободноживущих грамотрицательных бактерий, обитающих в почве.

Экономический и экологический кризис, снижение качества продукции растениеводства, падение естественного плодородия почв обуславливают всевозрастающее внимание к биологическому земледелию, суть которого заключается в использовании потенциальных возможностей естественных экосистем, в частности микроорганизмов азотфиксаторов.

Интенсивная эксплуатация сельскохозяйственных земель сопровождается постоянным внесением минеральных удобрений, пестицидов, но многолетнее применение ведет к снижению качества продукции растениеводства, загрязнению окружающей среды, нарушению естественных механизмов восстановления почв. Поэтому в настоящее время вместо минеральных удобрений создают микробные препараты. В отличие от минеральных удобрений, они имеют ряд преимуществ: не загрязняют окружающую среду, безвредны для человека и животных, так как представляют собой штаммы естественных почвенных микроорганизмов. Место, где был произведен сбор почвенных образцов поля окрестностей с. Низовое, Муромцевского района, Омской области.

Мы решили выяснить, как влияет антропогенное воздействие и использование удобрений, для протравливания сорняков, на содержание азотфиксирующих бактерий в почвах и в каких из исследуемых мест их количество больше. Для исследования мы выбрали поля засеянные: пшеницей, овсом, горохом, рапсом, льном.

Актуальность темы обусловлена востребованностью плодородных почв, так как на плодородных почвах вырастает богатый урожай с большим количеством питательных веществ, для этого нужно исследовать азотфиксирующие бактерии, определить наиболее благоприятные условия для азотфиксаторов, поскольку вопрос о факторах загрязнения окружающей среды строит очень остро. В работе раскрывается такая функция микроорганизмов, как биоиндикация. Исследование проводилось с августа по октябрь 2023 года.

Цель исследования: изучение возможности применения свободноживущих азотфиксирующих бактерий *Azotobacter* для оценки состояния загрязнения почв

Задачи:

1. Отбор почвенных образцов.
2. Определить механический состав.
3. Определить наличие карбонатов и рН почвы.
4. Исследовать почвенное дыхание и содержание органики.
5. Посев и наблюдение за колониями бактерий.
6. Исследование образцов под микроскопом.
7. Проведение сравнительного анализа (проверка гипотезы).

Объект исследования: почва ежегодно возделываемых полей, на которой посажены культурные растения (пшеница, овес, горох, рапс, лен)

Предмет исследования: азотфиксирующие бактерии.

Гипотеза исследования: в антропогенно изменённых ландшафтах количество бактерии *Azotobacter* . зависит от степени загрязнения почвы.

I. Обзор литературы

Биомониторинг, как составная часть экологического мониторинга, представляет собой слежение за состоянием окружающей среды по биологическим показателям. К основным видам биомониторинга относятся биотестирование и биоиндикация.

Биоиндикация – это оценка состояния среды с помощью живых объектов.

Азотобактер — это род бактерий, живущих в почве и умеющих переводить газообразный азот в растворимую форму, которую уже потом могут усваивать растения. Азотобактеры — это свободноживущие азотфиксаторы, и это означает, что они фиксируют молекулярный азот из атмосферы, у них хватает собственных возможностей для фиксации атмосферного азота, для последующего включения его отдельных атомов в состав других органических веществ [1, с.28].

Азотобактер - аэробный почвенный микроорганизм, сочетающий в себе морфологию палочек и кокков. Клетки молодых культур имеет форму палочек с закругленными концами, чаще расположены попарно. Молодые клетки подвижны, вследствие наличия на ее поверхности жгутиков. Размеры клеток варьируют - 2,0-7,0x1,0-2,5 мкм. В отдельных случаях длина клеток достигает 10-12 мкм.

К основным физиологическим свойствам бактерий рода *Azotobacter* относится его резко выраженная способность усваивать азот атмосферы. Большинство штаммов усваивают не более 10 мг азота на 1 г. Потребляемого источника углерода, некоторые штаммы азотобактера способны фиксировать до 15 мг азота на 1 г глюкозы [2, с.172].

Представители рода *Azotobacter* чаще всего обитают в нейтральных и слабощелочных почвах, а также в пресноводных водоемах и солоноватоводных болотах. В литературе приводятся противоречивые

данные о присутствии азотобактеров в почвах, богатых перегноем [3, с.437]. С одной стороны, различные перегнойные вещества не всегда могут усваиваться азотобактером. Следовательно, в почвах, которые богаты перегноем, азотобактеры не размножаются. С другой стороны, если в почве присутствуют органические соединения, а также продукты распада клеток растений и животных, азотобактер будет достаточно хорошо сформирован.

Бактерии Азотобактер способны расти и осуществлять процесс фиксации азота в диапазоне рН от 4,8 до 8,5, а оптимальным для жизнедеятельности данных организмов считается диапазон рН 7,0-7,5. Кислая окружающая среда отрицательно влияет на формирование колоний. Исследования показывают [4, с.18], что из кислых почв поступают неактивные формы азотобактерий – формы, потерявшие способность к фиксации молекулярного азота.

В почвах, отличающихся более высокой увлажненностью и многообразием луговой растительности, азотобактер можно увидеть только в вегетационный период [5, с.26]. Азотобактер в торфяниках присутствует в небольших количествах. В достаточно увлажненных черноземах он развивается хорошо, и максимальное количество азотобактера образуется весной.

Азотфиксирующие бактерии имеют и уникальные свойства: кроме фиксации азота из воздуха они образуют большое количество биологически активных веществ – стимуляторов роста и витаминов, которые так необходимы для роста и развития растений [6, с.84].

Азотобактер используют и в экологическом мониторинге. Например, бактерии рода *Azotobacter* традиционно используются как индикаторы химического загрязнения почвы [7].

III. Экспериментальная часть

В рамках масштабного проекта «Охотники за микробами», учащиеся нашей школы на базе центра "Точка роста" начали культивировать азотобактеры.

Отправили образцы полученных культур и почв в Новосибирский научно-исследовательский институт, где ученые выделяют и анализируют ДНК собранных образцов, внесли в базу данных первичного учета образцы почв во «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов»

Весь эксперимент выполнялся с применением профессионального набора (прил. 1, рис.1) для поиска азотфиксирующих бактерий в соответствии с методическими рекомендациями и цифровой лабораторией Releon оборудования Точки Роста (прил. 1, рис.2)

II.1. Отбор почвенных образцов

Образцы почвы отбирались из поверхностных почвенных разрезов (прил. 1, рис. 3,4). Максимальная глубина достигала 0,4 метра.

Для исследования мы выбрали поля засеянные: пшеницей, овсом, горохом, рапсом, льном.

- 10 точек по 3 полевые повторности.

II.2. Подготовка почвы для анализа

Образцы почвы были высушены, также были убраны крупные остатки растительности, камни, мусор. Затем почвы были просеяны через сито с диаметром 1-2 мм.

II.3. Определение механического состава почвы

Определение механического состава почвы проводили по методике, представленной в методических рекомендациях «Охотник за микробами» [9, с.8]. Образцы 1,2,3,4 соответствуют тяжелому суглинку, образцы 5,6,7,8,9,10 – среднесуглинистые (прил.1, рис.5, таб. 1).

II.4. Определение кислотности среды почвенной вытяжки

Водородный показатель (рН) среды является важной химической характеристикой, от которой зависит биоразнообразие населяющей ее организмов. Простейшим способом измерения рН является использование индикаторной бумаги, с помощью которой мы проводили пробу.

Для определения кислотности почвы первым делом засыпали небольшое количество почвы в колбы. С помощью пипетки Пастера, добавили немного воды к почве и все это тщательно перемешали. Дали данной консистенции настояться примерно 10 до 20 минут и опустили туда индикаторы. После полного высыхания индикаторов, определили, что среда каждого раствора нейтральна, а соответственно и рН почвы тоже нейтральна. (прил.1, рис.6)

II.5. Определение почвенного дыхания

Взяли 3 одинаковые банки объемом 0,5 л, промаркировали. Влажную почву массой навески 150 г поместили в банки 2 и 3. Пронумеровали 3 емкости для титрования. С помощью пипетки Пастера на 5 мл перенесли в каждую емкость для титрования по 10 мл раствора NaOH 0,1 М;

Поставили открытые емкости для титрования 2 и 3 с раствором NaOH на поверхность почвы в соответствующих банках на 0,5л №2 и №3.

Открытую емкость для титрования №1 с раствором NaOH поместили на дно пустой емкости на 0,5л (контрольный).

Закрыли банки крышками и оставили на сутки при комнатной температуре (Рис.1).



Рис.1. Определение почвенного дыхания

Из банки №1 вынули емкость с раствором NaOH 0,1 М. Добавили в раствор 1 каплю раствора фенолфталеина, раствор NaOH приобрел малиновую окраску.

Разместили емкость для титрования на белой бумаге и, считая количество капель и перемешивая содержимое емкости вращательными движениями, добавляли в емкость для титрования соляную кислоту из капельницы до полного обесцвечивания раствора. С банками 2 и 3 проделали тоже. Затем провели расчеты (прил.1, рис 7, таб. 2)

II.6. Определение содержания органических веществ

В стеклянных флаконах взвесили 1 г сухой почвы. Навеску почвы залили 10 мл раствора горячей соды, закрыли крышкой, взболтали;

Оставили флаконы с почвой и раствором соды на 24 часа при комнатной температуре: в первые 12 часов флаконы перемешали 3 раза, в последние 12 часов ничего не делали.

Через 24 часа перелили небольшую часть полученного раствора из флакона в крышку от этого флакона.

Сравнили растворы в крышечках флаконов со шкалой (рис.2)

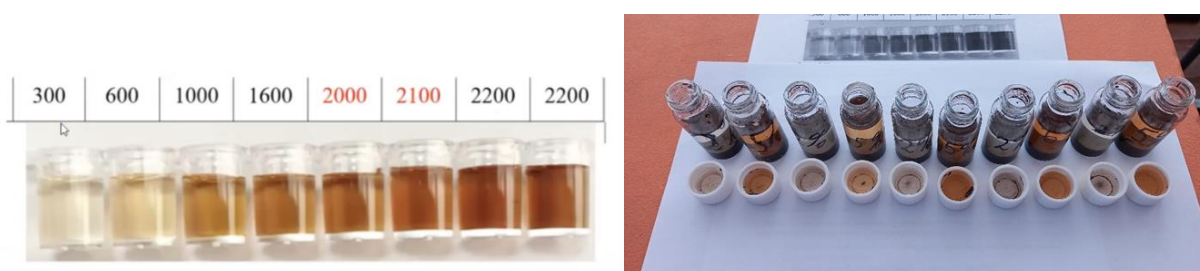


Рис.2. Содержание органических веществ

Результаты внесли в таблицу (прил.1, таб. 3)

II.7. Выделение бактерий, фиксирующих атмосферный азот

Для выявления азотобактера в почве и определения его относительного содержания пользуются методом почвенных комочков. Колонии азотобактеров растут на плотной питательной среде Эшби, которая готовилась из вспомогательного раствора – это раствор солей

хлорида натрия, сульфатов калия и магния, гидрофосфата калия и суспензии, включающей карбонат кальция, агар, глюкозу.

Из увлажненной почвы формировали комочки диаметром 3-4 мм размещали их в чашке Петри (в узлах трафарета) (прил.1, рис.8). Чашки Петри с закрытыми крышками оставили при комнатной температуре на 4 дня. По истечении этого времени вокруг комочков появились обрастания(рис.3). На 4-й день видимых изменений почти не было



Рис.3. 4-суточные культуры

7- й день стали видны разрастания в виде плёночек-наростов. Одни были буроватого цвета и светлые образования (рис.4)



Рис.4. 7-суточные культуры

На десятый день бактерии значительно расширили занимаемую поверхность почвы. На почве образцов стало чётко видно небольшие наросты, предположительно бактерии. На основании чего было сделано предположение, что это могут быть бактерии *Azotobacter agilis*, бурые образования- *Azotobacter chroococcum*. Предположение основано на том, что клетки *Azotobacter agilis* продуцируют большое количество слизи, за счёт чего колонии имеют выпуклое строение. *Azotobacter chroococcum* имеют буроватые образования (рис.5)

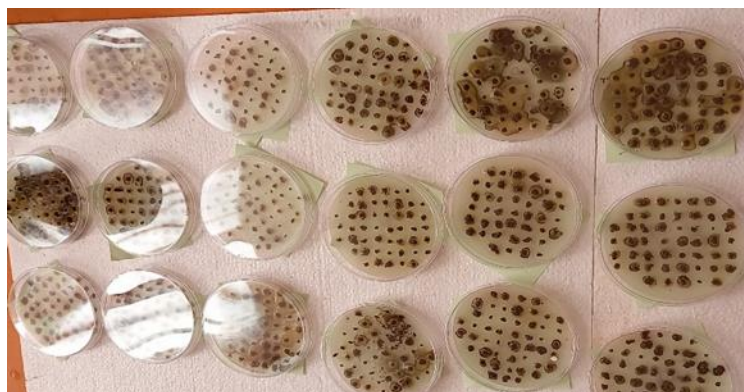


Рис.5. 10-суточные культуры

Наблюдение за ростом колоний проходило ежедневно, а сбор статистической информации на 4, 7 и 10 день согласно методике (прил.1, табл.4).

II.8. Микроскопическое исследование

Для знакомства с азотобактером из блестящих слизистых колоний был приготовлен препарат-мазок, окрашенный фуксином Циля и тушью (прил.1, рис.9) , согласно инструкции (Приложение 2). Микроскопия показала, что азотобактерии присутствуют во всех анализируемых образцах почвы (рис.6.).

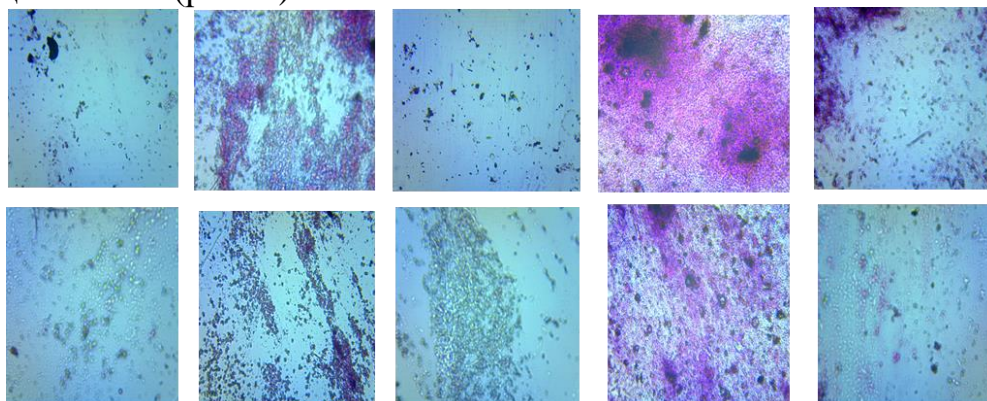


Рис.6. Снимки препаратов при x400 (водная иммерсия)

Клетки бактерий рода *Azotobacter* имеют овальную форму (окрашены в розовый цвет), располагаются одиночно, парами и неправильными скоплениями.

Мы заметили одну очень немало важную вещь: количество бактерий было разным на всех образцах почвы, что в какой – то степени может быть доказательством гипотезы.

Заключение

Результаты исследования

Проведена оценка почв на пяти разных участках. Для определения степени загрязнения был использован биоиндикатор *Azotobacter*, определенные биологические показатели роста и развития которого можно применить для диагностики загрязнения почв.

Все образцы почвы оказались нейтральными, и их pH находился в диапазоне от 6 до 7. Все почвы имели в своем составе карбонаты. Наибольшее количество органических веществ оказалось в пашнях, которые были засеянных пшеницей и горохом, наименьшее из-под льна.

Во всех образцах присутствуют азотфиксирующие бактерии. Самыми активно растущими и многочисленными оказались штаммы азотобактеров пашен из-под гороха 100% и пшеницы 85%, а из-под рапса, льна и овса около 50%. Биоиндикация почв с помощью культуры *Azotobacter* продемонстрировала снижение численности колоний культуры *Azotobacter* при увеличении загрязнения почв.

В ходе исследования мы выяснили, что наша гипотеза подтвердилась. В антропогенно изменённых ландшафтах живут бактерии *Azotobacter* и их количество зависит от степени загрязнения почвы.

Вероятнее всего, наибольшее влияние на жизнедеятельность азотфиксирующих бактерий имеют такие факторы, как наличие органических веществ и растительность, произрастающая на почвах.

Для данных почв характерен недостаток фосфора, поэтому наиболее активно азотобактерии развивались в почвах, в которые были внесены минеральные удобрения, содержащие, по мимо азота, фосфор, калий, магний, кальций.

Мы считаем, что исследованная почва пригодна для выращивания сельскохозяйственных растений, т.к. микроорганизмы, выявленные в ходе анализа, свидетельствуют о протекании в этой почве благоприятных для развития растений процессов как азотфиксация, о достаточном наличии питательных веществ.

В дальнейшем мы продолжим исследование почв нашей малой Родины с помощью Азотобактеров и планируем произвести скрининг (метод, используемый для выборочного выделения целевых видов микробов из огромного сообщества азотфиксирующих бактерий) на способность к стимулированию роста растений. Место где мы планируем исследовать почву, заказник «Аллапы», который находится в 2 километрах от нашего села.

Используемая литература

1. Игнатов В.В. Биологическая фиксация азота и азотфиксаторы // Сорос. образоват. журн. — 1998. — № 9. — С. 28–33.
2. Самсонов С.К. Невидимые земледельцы // М.: Мысль. — 1987. — 172 с.
3. Новикова Н. И. Современные представления о филогении и систематике клубеньковых бактерий // Микробиология. — 2016. — № 4. — С. 437 – 450.
4. Степанян Т. У. Использование клубеньковых бактерий в ассоциации с почвенными свободноживущими бактериями для инокуляции бобовых растений // Биолог.журн. Армении. — №3. — 2016. — С. 18 – 23.
5. Селивановская С. Ю. Микроорганизмы в круговороте биогенных элементов. Казань: Казан.ун-т, 2014. — 38 с. 26.
6. Пацко Е. В. Перспективность использования ассоциаций азотфиксирующих микроорганизмов для повышения урожайности растений // Бюл. Моск. общ.исп. прир. — 2014. — №. 2. — С. 84 – 86.
7. Пробиотики для растений: как накормить растущий мир. URL: <https://biomolecula.ru/articles/probiotiki-dlia-rastenii-kak-nakormit-rastushchii-mir>
8. Охотник за микробами. Методические рекомендации и инструкции по применению набора. Новосибирск, 2023.
9. Оказова З.П., Автаева Т.А. Использование микроорганизмов в качестве индикаторов загрязнения окружающей среды // Современные проблемы науки и образования. — 2015. — № 5.

Интернет источники

- <https://noparasites.ru/protozojnye-organizmy/azotobakter.html>
<https://ru.wikipedia.org/wiki/Азотобактер>
[https://gufo.me/dict/biology_encyclopedia/азотобактер_\(azotobacter\)](https://gufo.me/dict/biology_encyclopedia/азотобактер_(azotobacter))
<http://bio.niv.ru/doc/encyclopedia/life-of-plants/articles/5/azotobakter-azotobacter.htm>

Приложение 1



Рис.1. Набор «Охотник за микробами»



Рис.2. Цифровая лаборатория Releon

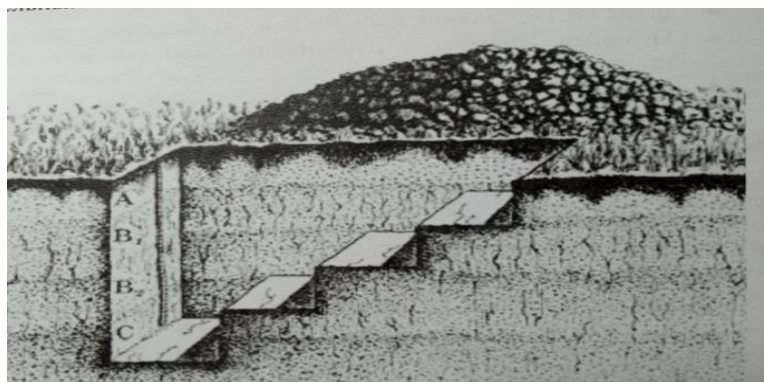


Рис.3. Почвенный разрез (схема)

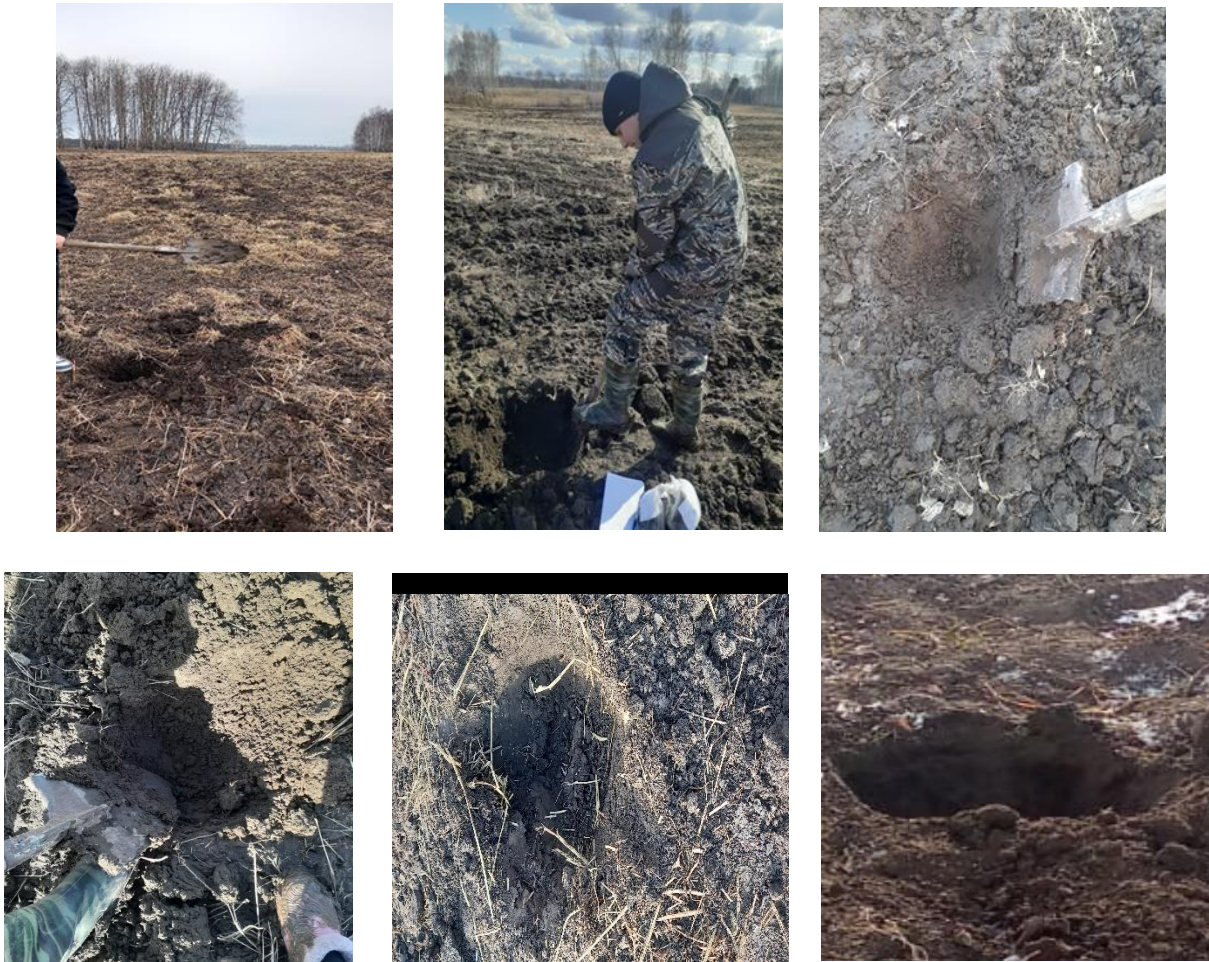


Рис.4. Почвенные разрезы



Рис.5. Определение механического состава почвы

Таблица 1. Механический состав и наличие карбонатов в почве.

№ точки	Место забора	Тип почвы	наличие карбонатов
1	Пашня пшеница	Тяжелый суглинок	да
2	Пашня пшеница	Тяжелый суглинок	да
3	Пашня овес	Тяжелый суглинок	да
4	Пашня овес	Тяжелый суглинок	да
5	Пашня горох	Средний суглинок	да
6	Пашня горох	Средний суглинок	да
7	Пашня рапс	Средний суглинок	да
8	Пашня рапс	Средний суглинок	да
9	Пашня лен	Средний суглинок	да
10	Пашня лен	Средний суглинок	да

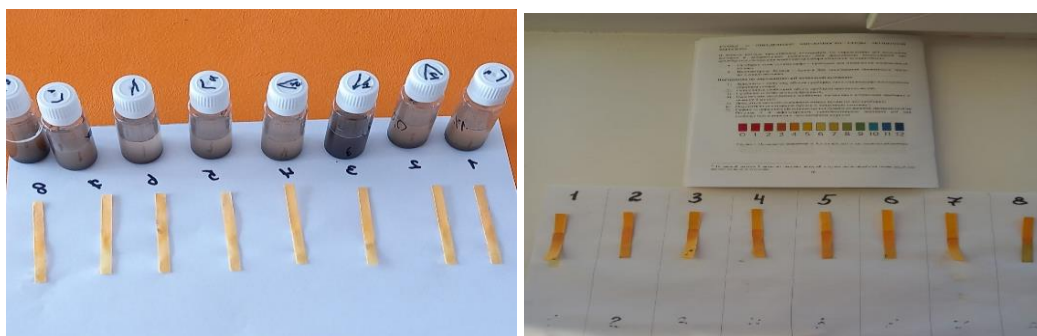


Рис. 6. Определение pH почвенных вытяжек

Таблица 2. Результаты расчетов почвенного дыхания

№ точки	Место забора	Количество CO ₂
1	Пашня пшеница	3,08 мг/100г
2	Пашня пшеница	3,33 мг/100г
3	Пашня овес	3,33 мг/100г
4	Пашня овес	3,33 мг/100г
5	Пашня горох	3,08 мг/100г
6	Пашня горох	3,33 мг/100г
7	Пашня рапс	3,33 мг/100г
8	Пашня рапс	3,08 мг/100г
9	Пашня лен	3,08 мг/100г
10	Пашня лен	3,33 мг/100г



Рис.7. Определение почвенного дыхания

Таблица 3. Результаты содержания органики

Место отбора проб	Количество органических веществ	
	Сода 2%	Сода 5%
Пашня пшеница	1600	2200
Пашня овес	1000	2000
Пашня горох	1600	2200
Пашня рапс	1000	2000
Пашня лен	1000	1600

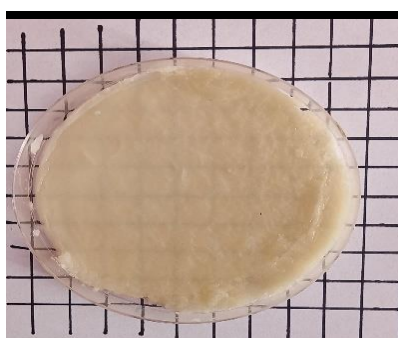


Рис. 8. Процедура посева

Таблица 4. Результаты статистической обработки

№ точки	Место забора	Количество обростаний		
		4 день	7 день	10 день
1	Пашня пшеница	45%	60%	85%
2	Пашня пшеница	40%	60%	80%
3	Пашня овес	51%	51%	51%
4	Пашня овес	51%	59%	59%
5	Пашня горох	45%	65%	100%
6	Пашня горох	45%	65%	100%
7	Пашня рапс	39%	42%	42%
8	Пашня рапс	45%	50%	50%
9	Пашня лен	48%	52%	52%
10	Пашня лен	40%	43%	43%



Рис. 9. Препарат-мазок, окрашенный фуксином Циля и тушью.

Инструкция по микроскопическому исследованию колоний бактерий

Azotobacter

- 1) Протрите предметное стекло спиртовой салфеткой для удаления загрязнений и жирового слоя;
- 2) В чашках Петри, засеянных 6-7 дней назад, выберите несколько колоний («обрастаний») с разной окраской;
- 3) Отберите пробу от заинтересовавших вас колоний для микроскопического исследования: с помощью зубочистки зачерпните небольшое количество биомассы;
- 5) Отобранный образец колоний перенесите на предметное стекло: размажьте по центральной части предметного стекла биомассу с поверхности зубочистки.
- 7) С помощью пипетки Пастера на предметное стекло в центр площади, покрытой образцом, нанесите каплю фуксина Циля;
- 8) В тоже место, что и фуксин Циля, с помощью пипетки Пастера, нанесите каплю туши;
- 9) Зубочисткой перемешайте красители и биомассу, находящиеся на стекле, до равномерного тонкого слоя грязно-розового цвета;
- 10) Получившийся в пункте 9 препарат высушите на воздухе;
- 11) На препарат нанесите каплю воды и изучите полученный препарат с помощью светового микроскопа.

