

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»

Исследовательская работа

Оценка влияния факторов окружающей среды на эффективность применения *Azotobacter* в качестве биоудобрений

Номинация:
Клеточная биология, генетика

Автор: Копачева Мирослава Николаевна, 8 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, Ульяновский региональный
«Экокампус», лаборатория экологического факультета УлГУ, школьная лаборатория
Сроки выполнения исследования: август 2024 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. Влияние определенных веществ на агрофизические показатели почвы	3
1.2.2. Влияние факторов на рост в почве бактерий рода <i>Azotobacter</i>	4
2. Методики проведенных исследований	
2.1. Методика отбора почвы для химического анализа	5
2.2. Методика подготовки водной почвенной вытяжки	6
2.3. Методика влажного органолептического способа определения гранулометрического состава почв	6
2.4. Методика проведения качественных реакций на наличие или отсутствие определенных веществ в почвах	7
2.5. Методика почвенных комочков	8
2.6. Методика приготовления среды Эшби	9
2.7. Методика выделения чистых культур азотобактера	9
3. Результаты исследований и их обсуждение	
3.1. Отбор почвы для химического анализа	10
3.2. Подготовка водной почвенной вытяжки	12
3.3. Определение гранулометрического состава почв влажным органолептическим способом	13
3.4. Проведение качественных реакций на наличие или отсутствие определенных веществ в почвах	15
3.5. Определение кислотности (рНвод) почв	16
3.6. Культивирование <i>Azotobacter Chlorococcum</i>	18
3.7. Выделение чистых культур азотобактера	20
3.8. Биотестирование	22
4. Выводы	24
5. Заключение.....	24
6. Список использованной литературы.....	25

1. Введение

1.1. Проблема и ее анализ

Проблема. Увеличение продуктивности сельскохозяйственных культур и их защита от болезней и вредителей являются центральными вопросами современной агробиологии. Биоудобрения — это удобрения, содержащие микроорганизмы, которые способны мобилизовать питательные элементы в простую и удобную для растений форму посредством биологических процессов. Они стимулируют рост растений либо путем облегчения усвоения растениями определенных питательных веществ из окружающей среды.

Актуальность. Использование биоудобрений в современной агропромышленности является перспективным направлением, способным обеспечить увеличение продуктивности растительной продукции.

Цель. Исследовать влияние факторов окружающей среды на эффективность применения *Azotobacter* в качестве биоудобрений.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи**:

1. Изучение литературы по проблеме исследования.
2. Сбор почвенных образцов и проведение физико-химического анализа почвы.
3. Культивирование *Azotobacter* на селективной питательной среде.
4. Составление технологической карты зависимости развития *Azotobacter* от внешних факторов.
5. Бiotестирование.

Гипотеза. Знания о негативном внешнем воздействии позволяют продуктивнее использовать *Azotobacter* в качестве биоудобрений.

Прогнозируемый результат. Оценка эффективности применения комплекса органических и минеральных удобрений совместно с биоудобрениями на основе *Azotobacter* для увеличения продуктивности сельскохозяйственных культур и их защиты от болезней и вредителей.

1.2. Обзор литературы по проблеме исследования

1.2.1. Влияние определенных веществ на агрофизические показатели почвы

Карбонаты. Наличие большого количества карбонатов в почве может иметь как положительные, так и отрицательные последствия.

С одной стороны, карбонаты способствуют поддержанию оптимального рН-баланса в почве, что является важным фактором для роста растений.

С другой стороны, слишком большое количество карбонатов в почве может привести к проблемам. Они снижают доступность питательных веществ для растений, что может привести к ухудшению их роста. Из-за рН-показателя, равного или большего 7, усложняется усвоение железа и марганца. [1]

Сульфат-ионы. С одной стороны, сульфат аммония в качестве азотного удобрения оказывает положительное влияние на питание азотом, что способствует накоплению сухой массы корней и надземной части растений. Сульфат магния влияет на прорастание пыльцевых зёрен.

С другой стороны, повышенные концентрации некоторых сульфатных соединений в почве могут быть опасны. Они характерны для засоленных почв, которые снижают уровень потенциального плодородия и уменьшают

доступность макро- и микроэлементов для растений. Это приводит к минеральному голоду растений, их повышенной восприимчивости к патогенам и вредителям.

Хлорид-ионы. Хлориды – это типичные загрязнители почвы. Первичными источниками хлоридов являются магматические породы, в состав которых входят хлорсодержащие минералы (содалит, хлорапатит и др.), соленосные отложения, в основном галит.

Хлор, попадая в почву, усиливает ее кислотность, ухудшает действие минеральных и органических удобрений. Но он может быть полезен, например, на торфяниках, где ускоряет разложение торфа и создает избыток азота. [1]

Уровень кислотности или реакции среды почвы – один из важнейших показателей плодородия. Питательные вещества при повышенном значении все еще присутствуют в почве, но растения их не могут поглотить, потому перестают развиваться и плодоносить. Показатель щелочности или кислотности напрямую влияет на развитие растений и способность корнями усваивать питательные вещества.

Повышенная кислотность почвы угнетает рост и развитие растений. Происходит это по причине того, что в кислых грунтах преобладает содержание растворимого алюминия и его солей, а также марганца, которые связывают щелочные минералы: кальций, магний, калий, селен и прочие, препятствуя их нормальному усвоению растениями.

Щелочная почва плохо влияет на растения. Нарушение кислотно-щелочного баланса приводит к тому, что растения отстают в развитии или даже не могут прижиться. Это отрицательно сказывается на урожайности, продолжительности цветения, вкусовых качествах плодов.

Для снижения рН необходимо нейтрализовать щелочь. Для этого используют растворы кислот и другие средства. [4]

1.2.2. Влияние факторов на рост в почве бактерий рода *Azotobacter*

Влияние влаги. Жизнедеятельность *Azotobacter* в естественной среде тесно связана с наличием влаги. Его потребность во влаге приравнивается к потребностям высших растений. Иссушение почвы оказывает губительное влияние на жизнедеятельность микроорганизма. Это обусловлено не только тем, что в данных условиях азотобактер лишен возможности потреблять воду, но и потерей ее из собственных клеток. В высушенном состоянии микроорганизмы неактивны. У них прекращаются или предельно замедляются все процессы метаболизма, происходит торможение жизнедеятельности. Степень торможения и потеря жизнеспособности зависит от уровня остаточной влажности в клетках и индивидуальных свойств культуры, которые определяются их ксероустойчивостью. Азотобактер обладает повышенной ксероустойчивостью в зоне остаточной влажности 20-30%. Обезвоживание биомассы азотобактера до 60-70% остаточной влажности существенно не сказывается на жизнеспособности. Дальнейшее обезвоживание вызывает значительное отмирание клеток. При остаточной влажности 20% и ниже, жизнеспособное состояние сохранялось только у 8,9-2,6% клеток. Этот уровень можно считать пороговым. [3]

Значение температуры. Оптимальная температура роста для большинства представителей рода *Azotobacter* составляет 28–37 °С. Однако температурный оптимум варьируется в зависимости от вида.

Значение рН среды. Азотобактер чрезвычайно чувствителен к реакции среды. Оптимальная для его развития область рН 7,2—8,2. Однако азотобактер способен развиваться и на средах с рН от 4,5 до 9,0; кислая реакция среды неблагоприятно действует на его развитие. Из кислых почв выделяются неактивные формы азотобактера, утратившие способность связывать молекулярный азот. [2]

Значение минерального состава 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 клетки становятся неспособными формировать цисты.

Отличительной особенностью бактерий рода *Azotobacter* является их высокая требовательность к наличию в среде микроэлементов. Совершенно необходим для большинства культур молибден.

Железо играет важную роль в процессе дыхания и фиксации молекулярного азота.

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.

Марганец может в некоторой степени заменить потребность азотобактера в магнии.

Медь необходима азотобактеру для образования пигмента. [5]

Значение вносимых удобрений. 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.

Источником азота для азотобактера могут служить разнообразные минеральные (соли аммония, азотной и азотистой кислот) и органические (мочевина, различные аминокислоты) соединения. Однако, если азотобактер развивается только за счет связанного в среде азота, он не выполняет своей основной функции — фиксации молекулярного азота. Азотобактер обычно фиксирует до 10—15 мг молекулярного азота на 1 г использованного источника углерода (например, глюкозы, сахарозы). Эта величина сильно колеблется в зависимости от условий выращивания культуры, состава питательной среды, ее кислотности, температуры, аэрации.

2. Методики проведенных исследований

2.1. Методика отбора почвы для химического анализа (ГОСТ 17.4.4.02-84, переиздание 2008)

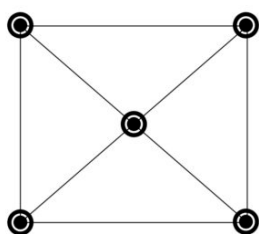
Отбор проб проводят для оценки качественного состояния почв естественного и нарушенного сложения.

Пробы почвы, в зависимости от необходимости проведения тех или иных определений, отбирают в стеклянные (пластиковые) емкости или полиэтиленовые пакеты.

Необходимым условием отбора проб почв является их предохранение от вторичного загрязнения (в том числе атмосферными осадками) на всех этапах отбора проб.

Для отбора проб почвы необходимо использовать инвентарь, изготовленный из металла (нержавеющая сталь), керамики, пластмассы и т.п. Все рабочие поверхности должны быть тщательно очищенными от загрязнений и не иметь признаков коррозии и ржавчины.

1. Разместить участок по принципу «конверта» для отбора 5 точечных проб почвы: по одной из 4 углов и 1 из центра.



Метод конверта (ГОСТ Р 58586-2019) Метод, при котором из точек контролируемой площадки берут 5 почвенных проб. При этом точки должны быть расположены так, чтобы мысленно соединенные прямыми линиями, давали рисунок запечатанного конверта.

2. Подготовить кусок чистого полиэтилена размером приблизительно 50x50 см.

3. Удалить растительный слой методом срезания или соскабливания.

4. В каждой точке с глубины 0-20 см провести отбор проб почвы массой от 0,5 до 1 кг (точечные пробы) и высыпать ее на полиэтилен.

5. Составить объединенную пробу путем смешивания 5 точечных проб, отобранных на одной пробной площадке.

6. Полученную объединенную пробу массой не менее 1 кг необходимо поместить в заготовленную для нее емкость и плотно закрыть.

7. Пробу необходимо доставить в лабораторию в течение суток. До доставки пробы ее необходимо хранить в темном и прохладном месте.

2.2. Методика подготовки водной почвенной вытяжки (ГОСТ 26423-85)

Пробы почвы массой 30 г помещают в конические колбы. К пробам приливают мерным цилиндром по 150 см³ дистиллированной воды. Почву с водой тщательно перемешивают с помощью стеклянной палочки в течение 5 мин.

Для проведения анализа водную почвенную суспензию фильтруют.

2.3. Методика влажного органолептического способа определения гранулометрического состава почв

Из исследуемых образцов отбирают порции почв по 20-30 г. Слегка увлажняют почву в фарфоровой чашке небольшим количеством из промывалки. На ладонь помещают небольшую порцию почвы, раскатывают почвенную массу в шнур толщиной 5-7 мм (таблица 1). Определяют тип почвенного шнура и гранулометрический состав почвы.

Песчаная почва – бесструктурная, не обладает связностью. Супесчаная почва дает только зачатки шнура. Суглинистые почвы во влажном состоянии

раскатываются в шнур, который разламывается при сгибании в кольцо. Легкий суглинок не дает кольца, а шнур растрескивается и дробится при раскатывании. Тяжелый суглинок дает кольцо с трещинами. Глинистые почвы во влажном состоянии сильно мажутся, хорошо скатываются в длинный шнур, из которого легко можно сделать кольцо (таблица 1).

Таблица 1. Гранулометрический состав почв

№ п/п	Морфология образца при анализе (внешний вид)	Гранулометрический состав	
		признаки	название
1		Шнур не образуется	Песок
2		Зачатки шнура	Супесь
3		Шнур непрочный, распадается на части при раскатывании	Лёгкий суглинок
4		Шнур сплошной, кольцо с трещинами и переломами	Средний суглинок
5		Шнур сплошной, кольцо с трещинами	Тяжёлый суглинок
6		Шнур сплошной, кольцо без трещин	Глина

Результаты определения гранулометрического состава почвенных проб внести в таблицу 2.

Таблица 2. Гранулометрический состав почв

№ пробы	Результаты влажного определения	Изображение

2.4. Методика проведения качественных реакций на наличие или отсутствие определенных веществ в почвах

Качественные реакции используются для определения наличия или отсутствия определенных веществ в почвах, они свидетельствуют о развитии определенных почвообразовательных процессов. В качественном анализе используются легко выполнимые и простые, но при этом селективные и чувствительные химические реакции. К таким качественным реакциям относятся:

1. Качественные реакции на наличие легкорастворимых солей – хлоридов и сульфатов. Наличие в почве хлоридов и сульфатов свидетельствует о развитии процесса засоления, избыток хлоридов и сульфатов неблагоприятно воздействует на большинство растений, особенно сельскохозяйственных.

2. Качественные реакции на присутствие карбонатов. Минералы карбонаты кальция и магния накапливаются в почвах сухих природных зон. В остаточно-карбонатных почвах они имеют литогенное происхождение – наследуются от карбонатных пород.

3. Качественные реакции на наличие подвижных ионов Fe^{2+} .

Восстановление железа: $Fe^{3+} + e^- \rightarrow Fe^{2+}$ развивается в анаэробных условиях и сопровождается усилением подвижности ионов. Процессы характерны для почв в условиях избыточного переувлажнения.

Качественный анализ основан на наблюдении изменения окраски раствора, образования характерных осадков и выделении газа (таблица 4).

Таблица 3. Качественные химические реакции

Тестируемый ион/вещество	Реагент для качественной реакции	Схема качественной реакции	Наблюдаемое изменение
Хлорид-ионы (Cl^-)	раствор $AgNO_3$	$Ag^+ + Cl^- \rightarrow AgCl \downarrow$	Выпадение белого осадка
Сульфат-ионы (SO_4^{2-})	Раствор $BaCl_2$	$Ba^{2+} + SO_4^{2-} \rightarrow BaSO_4 \downarrow$	Выпадение белого осадка
Карбонаты (CO_3^{2-})	Раствор HCl	$CO_3^{2-} + H^+ \rightarrow CO_2 \uparrow + H_2O$	Выделение углекислого газа
Ионы железа (II) (Fe^{2+})	Раствор $K_3[Fe(CN)_6]$	$Fe^{2+} + K^+ + [Fe(CN)_6]^{3-} \rightarrow KFe([Fe(CN)_6])$	Выпадение синего осадка

Приготовить водные вытяжки из почвенных проб. В химический стакан берут навеску почвы массой 10 г. В стакан с навеской добавляют 25 мл дистиллированной воды. Содержимое стакана интенсивно перемешивают с помощью стеклянной палочки в течение 5 минут. Затем через фильтр на воронке фильтруют суспензию почвы в стеклянные пробирки. Для каждой пробы необходимо приготовить по 3 пробирки с фильтратом, в которых проводят соответствующие качественные реакции на присутствие ионов хлора, сульфат-ионов и ионов железа (II). При добавлении реагента соответствующей качественной реакции (таблица 4) отмечают отсутствие или появление осадка.

Наличие карбонатов проверяют в сухой почвенной пробе. Для этого помещают небольшое количество почвы в фарфоровую чашку и капают на нее из пипетки 10 %-ным раствором HCl . Вскипание почвы (выделение пузырьков углекислого газа) свидетельствует о присутствии карбонатов в почве.

Результаты наблюдений вносят в таблицу 4 с указанием наличия (+) или отсутствия (-) тестируемого иона/вещества.

Таблица 4. Результат качественной реакции

№ пробы	Хлорид-ионы (Cl^-)	Сульфат-ионы (SO_4^{2-})	Карбонаты (CO_3^{2-})	Ионы железа (II) (Fe^{2+})
---------	------------------------	------------------------------	---------------------------	--------------------------------

2.5. 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.

Вспомогательный раствор солей готовят один раз и используют для создания сред в течение всего исследования.

1. В мерную колбу объемом 1 литр налить 300–400 мл воды;
2. Высыпать в колбу с водой всё содержимое флаконов с NaCl, K₂SO₄, MgSO₄*7H₂O и K₂HPO₄ и перемешать смесь;
3. Довести объем раствора до отметки «1 литр» и проконтролировать, что все соли полностью растворились (об этом свидетельствует отсутствие осадка на дне колбы).

2.6. Методика приготовления среды Эшби (200 мл)

Если в вашей лаборатории нет аналитических весов, то для подготовки навесок вы можете использовать бытовые (кухонные) весы.

1. На весах подготовить навески:
 - a. 1 г CaCO₃;
 - b. 3 г агара;
 - c. 4 г глюкозы.
2. В химический стакан налить 200 мл вспомогательного раствора.
3. В стакан с раствором перенести навески CaCO₃, агара и глюкозы.
4. Смесь в стакане перемешать до состояния однородной взвеси.
5. Смесь вскипятить на плите или в микроволновой печи до максимального растворения компонентов (часть взвеси не растворится, однако большая часть компонентов должна перейти в раствор).
6. Смесь охладить до 50–60 °С и заполнить ею чашки Петри (средой заполняется часть чашки Петри с меньшим диаметром) так, чтобы смесь полностью покрывала дно (должно уйти ~20 мл на одну чашку).

Если смесь успела охладиться и застыть в стакане, то вы можете повторно растопить её на плитке или в микроволновой печи.

2.7. Методика выделения чистых культур и получение суспензии *Azotobacter*

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.

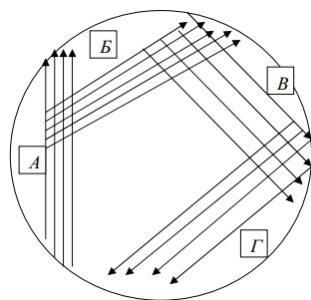


Рис. 1. Схема рассева бактерий штрихами для получения изолированных колоний

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.

3. Результаты исследования и их обсуждение

3.1. Отбор почвы для химического анализа

Сбор почвенных образцов мы проводили на территории Ботанического сада Регионального центра естественнонаучного образования и экологического воспитания «Экокампус».


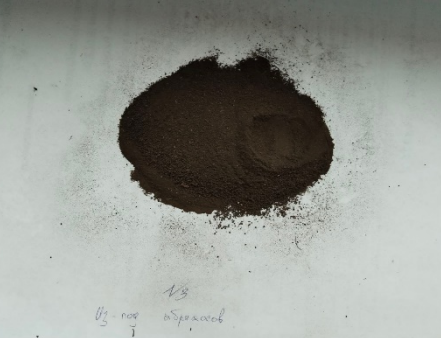

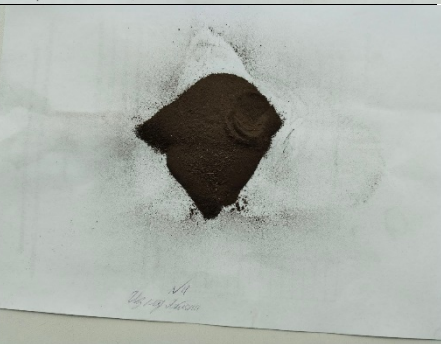



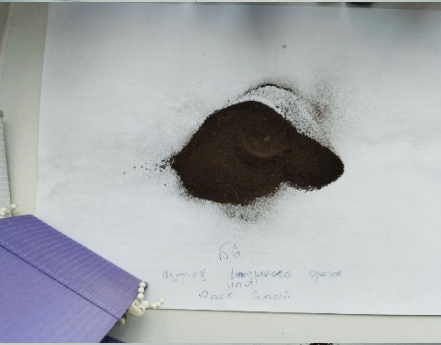


Зональными почвами для данной территории являются черноземы. Основной фонд составляют слабоподзоленные среднемощные слабогумусные суглинистые почвы.






Забор почв произведен под различными культурами, с дополнительным внесением удобрений и без внесения.

Почвенные образцы собраны с 10 пробных площадок. Прикопку делали на глубину до 15 см, расстояние между точками забора составило 1 м. Форма рельефа и степень антропогенной нагрузки оставались неизменными.

Таблица 5. Забор почвенных образцов

№	Описание	Сбор материала	Образец почвы
1	Внесен органический микс под овощные культуры		
2	Компост		

3	Абрикос обыкновенный		 <p>1/3 1/2 - топ Абрикос</p>
4	Яблоня садовая		 <p>1/4 Яблоня</p>
5	Конский каштан обыкновенный		 <p>1/5 1/2 топ Каштан</p>
6	Манжурский орех, или орех серый		 <p>1/6 1/2 топ Манжурский орех Серый орех</p>
7	Вазон 1 с цветочными культурами		 <p>Вазон</p>

8	Вазон 2 с цветочными культурами		
9	Береза бородавчатая		
10	Сосна обыкновенная		

3.2 Подготовка водной почвенной вытяжки



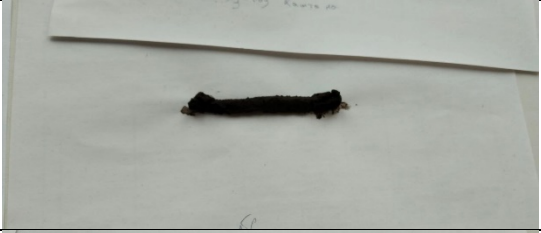
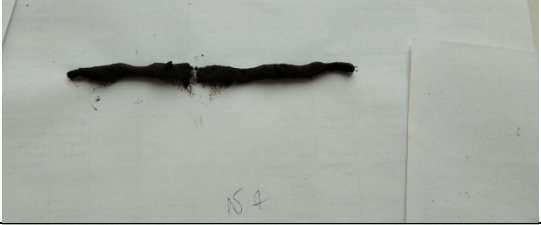





Рис.2-5. Почвенная вытяжка

3.3. Определение гранулометрического состава почв влажным органолептическим способом

Таблица 6. Гранулометрический состав почв

№ пробы	Результаты влажного определения	Изображение
1	Средний суглинок	
2	Легкий суглинок	
3	Легкий суглинок	
4	Тяжелый суглинок	
5	Легкий суглинок	

6	Средний суглинок	
7	Средний суглинок	
8	Тяжелый суглинок	
9	Супесь	
10	Тяжелый суглинок	

3.4. Проведение качественных реакций на наличие или отсутствие определенных веществ в почвах



Рис.6-7. Определение наличия хлорид-ионов

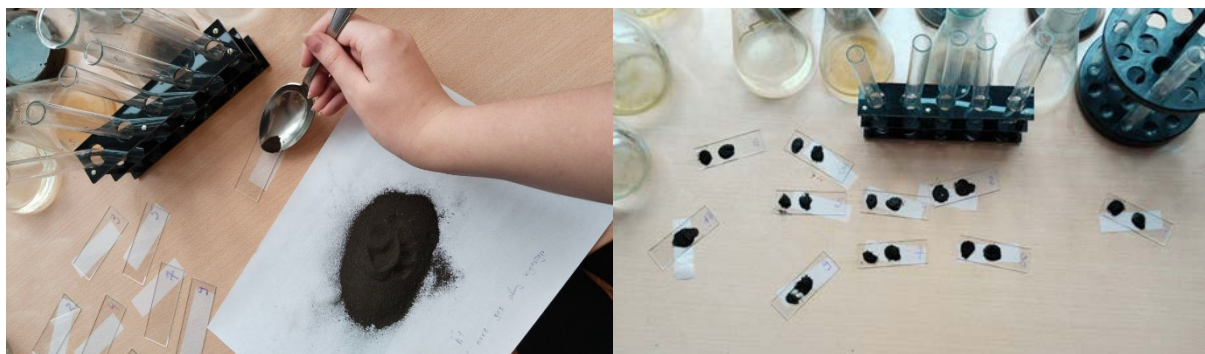


Рис.8-9. Определение наличия сульфат-ионов




Рис.10-11. Определение наличия карбонатов





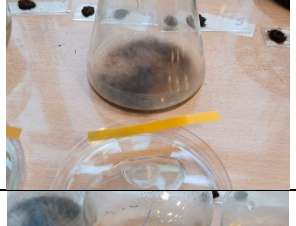
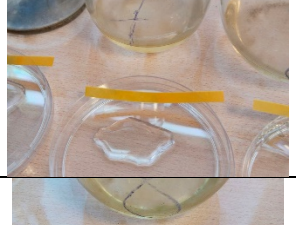



Таблица 7. Качественные реакции

№ пробы	Хлорид-ионы (Cl^-)	Сульфат-ионы (SO_4^{2-})	Карбонаты (CO_3^{2-})
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	+
7	-	-	+
8	-	-	-
9	+	-	-
10	-	-	+

3.5. Определение кислотности ($\text{pH}_{\text{вод}}$) почв

Таблица 8. Кислотность почв

№ пробы	Показатель pH	Название по уровню кислотности/щелочности	Изображение
1	6,5	нейтральная	

2	5	сильнокислая	
3	6,5	нейтральная	
4	6,5	нейтральная	
5	6	слабокислая	
6	6,4	слабокислая	
7	6,5	нейтральная	
8	6,5	нейтральная	
9	6,5	нейтральная	
10	6	слабокислая	

3.6. Культивирование *Azotobacter Chlorococcum*

Получение *Azotobacter* осуществлялось методом почвенных комочков.

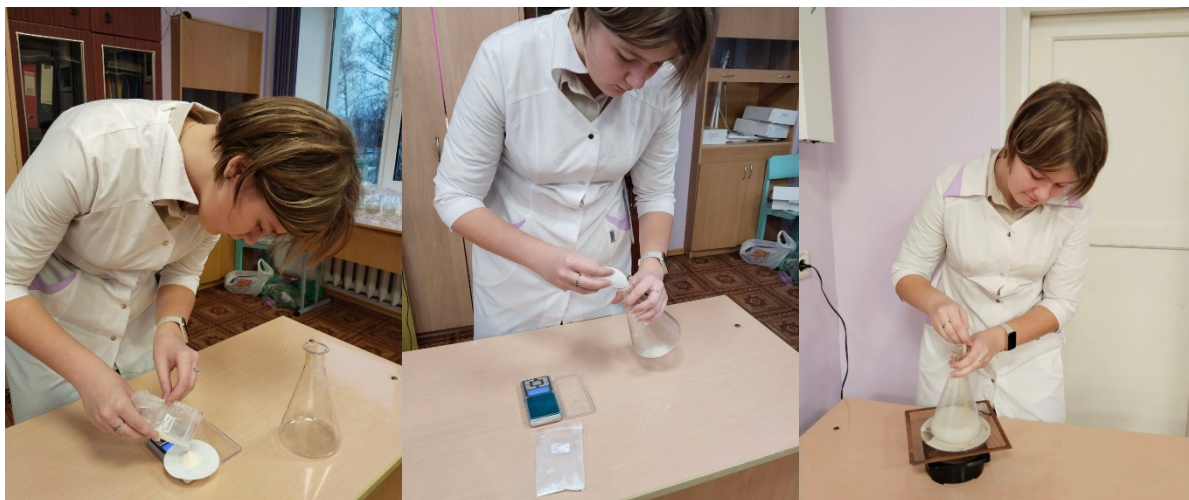


Рис.12-14. Подготовка среды Эшби (200 мл)

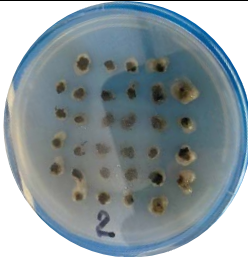
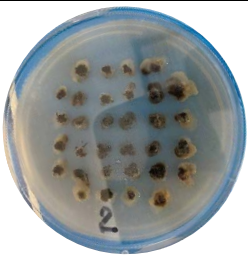
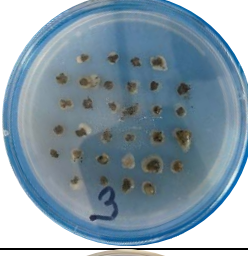
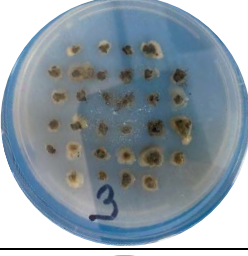
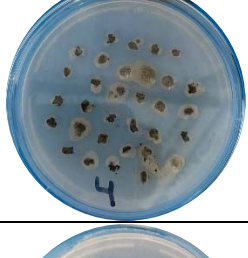
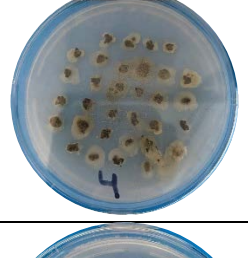
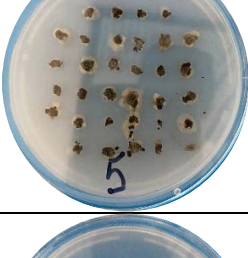
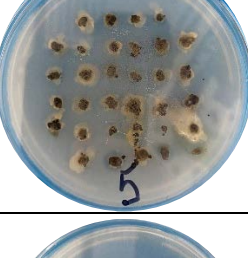
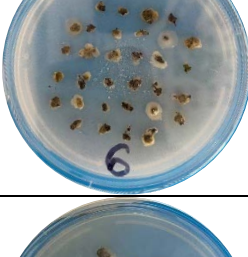
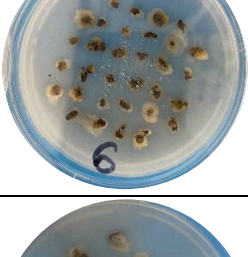
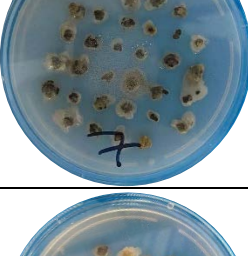
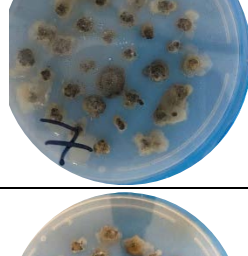
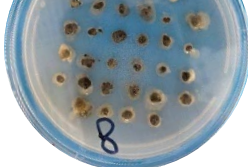
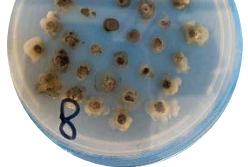


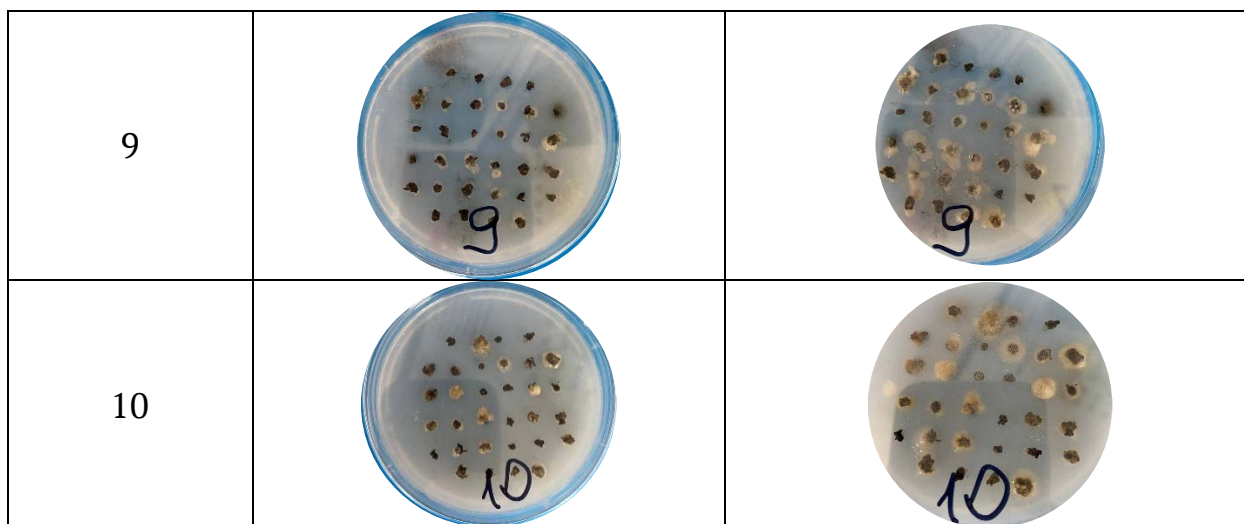
Рис.15-16. Культивирование *Azotobacter Chlorococcum*

Наиболее распространенный и изученный *Azotobacter Chlorococcum* образует колонии с бурым, почти чёрным пигментом. (Таблица 9)

Таблица 9. Культивирование методом почвенных комочков

Образец	День 6	День 8
1		

2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		



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

3.7. Выделение чистых культур и получение суспензии *Azotobacter Chlorococcum* был высеян на чистую среду Эшби методом истощающего штриха.



Рис.17. Высев *Azotobacter* на среду с помощью микробиологической петли

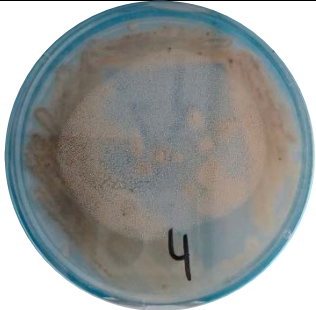
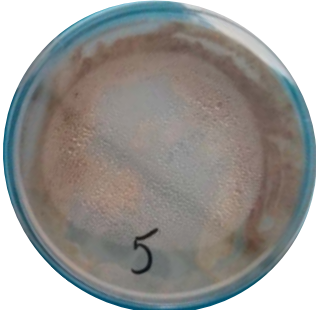


Полученная культура была смыта на 4 день дистиллированной водой и перенесена в стерильные бутылки для использования в биотестировании.


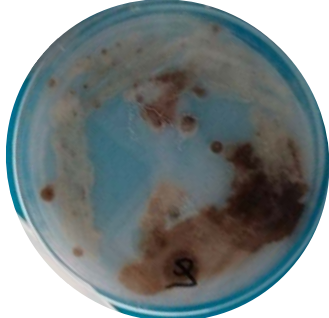



Рис.18. Получение суспензии *Azotobacter*

Таблица 10. Технологическая карта «Выделение чистой культуры *Azotobacter*»

№	Описание	Тип почвы	Хлорид-ионы (Cl ⁻)	Сульфат-ионы (SO ₄ ²⁻)	Карбонаты (CO ₃ ²⁻)	Уровень кислотности, показатель pH	Культивирование <i>Azotobacter Chlorococcum</i>		Выделение чистой культуры <i>Azotobacter</i>
							День 6	День 8	
1	Овощные культуры, органический микс	Средний суглинок	-	-	-	нейтральная; 6,5	21 колония	31 колония	
2	Компост	Легкий суглинок	+	-	-	сильнокислая; 5	18 колоний	25 колоний	
3	Абрикос обыкновенный	Легкий суглинок	-	-	-	нейтральная; 6,5	19 колоний	20 колоний	

4	Яблоня садовая	Тяжелый суглинок	-	-	-	нейтральная; 6,5	20 колоний	25 колоний	
5	Конский каштан обыкновенный	Легкий суглинок	-	-	+	слабокислая; 6	12 колоний	17 колоний	
6	Маньчжурский орех, или орех серый	Средний суглинок	-	-	+	слабокислая; 6,4	14 колоний	18 колоний	
7	Вазон 1 с цветочными культурами	Средний суглинок	-	-	-	нейтральная; 6,5	25 колоний	29 колоний	

8	Вазон 2 с цветочными культурами	Тяжелый суглинок	-	-	-	нейтральная; 6,5	23 колонии	29 колоний	
9	Береза бородавчатая	Супесь	+	-	-	нейтральная; 6,5	20 колоний	21 колония	
10	Сосна обыкновенная	Тяжелый суглинок	-	-	+	слабокислая; 6	15 колоний	16 колоний	

3.8. Биотестирование. Оценка развития и роста выращиваемых культур с использованием суспензии *Azotobacter*

В качестве тест-объекта взяли распространенную сельскохозяйственную культуру пшеницу посевную (озимую). Эксперимент продолжался на протяжении 7 дней.

Культуры выращивались с добавлением суспензии *Azotobacter Chlorococcum* в почву.

Таблица 11. Технологическая карта «Результаты биотестирования»



Результаты биотестирования (оценка всхожести семян и морфобиометрические показатели) подтвердили предположение о влиянии негативных внешних факторов на снижение эффективности применения *Azotobacter* в качестве биоудобрений.

4. Выводы

В результате проделанной работы исследовано влияние факторов окружающей среды на эффективность применения *Azotobacter* в качестве биоудобрений.

Проведенный физико-химический анализ почвы и получение чистой культуры *Azotobacter* позволили определить зависимость развития *Azotobacter* от внешних факторов.

Выявлена зависимость развития *Azotobacter* от уровня кислотности/щелочности, от хлорид-ионов, сульфат-ионов и карбонатов. Лучше всего колонии *Azotobacter* разрослись, где были отрицательные хлорид-ионы, сульфат-ионы, карбонаты и нейтральная рН, это образцы под №1 ,8, 9. Хуже всех проросли образцы под №5 ,6, 10, на это повлияло рН, слабокислая среда, так же в данных образцах были выявлены карбонаты, в других образцах их не было, это означает, что карбонаты плохо влияют на рост *Azotobacter*. Тип почвы не играет важную роль, следовательно, *Azotobacter* может хорошо расти в разных видах почв.

Полученные результаты оформлены в виде технологической карты.

Результаты биотестирования (оценка всхожести семян и морфобиометрические показатели) подтвердили предположение о влиянии негативных внешних факторов на снижение эффективности применения *Azotobacter* в качестве биоудобрений.

Дана оценка эффективности применения комплекса органических и минеральных удобрений совместно с биоудобрениями на основе *Azotobacter*. Для увеличения продуктивности сельскохозяйственных культур и их защиты от болезней и вредителей при наличии в кислой почве хлоридов, сульфатов или карбонатов необходимо дополнительное внесение органических и минеральных удобрений.

Гипотеза «Знания о негативном внешнем воздействии позволяют продуктивнее использовать *Azotobacter* в качестве биоудобрений» подтверждена.

5. Заключение

Факторы окружающей среды, такие как засуха, засоление почвы, экстремальные температуры, тяжелые металлы, представляют собой серьезные сельскохозяйственные проблемы, вызывающие стресс у растений и приводящие к значительным потерям урожая во всем мире. Одной из стратегий повышения стрессоустойчивости растений может быть внедрение *Azotobacter*. Многочисленные исследования показали, что стимулирующие рост растений бактерии являются относительно простой и недорогой альтернативной стратегией и благотворно влияют на показатели роста, биомассу и содержание хлорофилла в условиях стресса.

Перспективы. Анализ биологического эффекта бактерий, благоприятно влияющих на рост и развитие сельскохозяйственных растений.

6. Список использованной литературы:

1. Баданова, М. А. Азотофиксирующая динамика в почвах разного уровня антропогенного воздействия / М. А. Баданова, М. В. Лабутина // Рациональное природопользование - основа устойчивого развития : Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Грозный, 22–23 сентября 2020 года. – Грозный: Чеченский государственный педагогический университет, ИП Овчинников Михаил Артурович (Типография Алеф), 2020. – С. 165-169. – EDN RUPTFR.
2. Киракосян, А.В.; Мелконян, Ж.С.; Ананян, Л.Г. Влияние pH среды на развитие экологических форм *Azotobacter chroococcum* // Вопросы микробиологии, 1964. – URL: <https://arar.sci.am/dlibra/publication/149803#info>.
3. Колешко, О.И. Азотфиксирующие бактерии. Физиология развития. Минск: Издательство БГУ им. В. И. Ленина, 1981.
4. Куаталиева Д. Т. Активность микроорганизмов рода *Azotobacter* в почвах города Астрахани // Научно-методический электронный журнал «Концепт». – 2017. – Т. 39. – С. 3876–3880. – URL: <http://e-koncept.ru/2017/971102.htm>.
5. Скодтаева, О. А. Влияние факторов среды на азотфиксирующую и фунгицидную способность азотобактера / О. А. Скодтаева // Научное обеспечение сельского хозяйства горных и предгорных территорий : МАТЕРИАЛЫ II ВСЕРОССИЙСКОЙ СТУДЕНЧЕСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ, Владикавказ, 25 ноября 2021 года. Том Часть 1. – Владикавказ: Горский государственный аграрный университет, 2021. – С. 13-15. – EDN XHUBXY.