

ДОНЕЦКАЯ НАРОДНАЯ РЕСПУБЛИКА  
ДЕПАРТАМЕНТ ОБРАЗОВАНИЯ  
АДМИНИСТРАЦИИ ГОРОДСКОГО ОКРУГА МАКЕЕВКА  
МУНИЦИПАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«СТАНЦИЯ ЮНЫХ НАТУРАЛИСТОВ ГОРОДА МАКЕЕВКИ»

**АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА БАКТЕРИЙ, БЛАГОПРИЯТНО  
ВЛИЯЮЩИХ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ БАЗИЛИКА**

Выполнила: Савина Мария Владимировна, 9 класс  
Обучающаяся кружка «Юные ученые» МБУДО «СЮН»  
Научный руководитель: Федорчук Анна Михайловна  
Педагог дополнительного образования МБУДО «СЮН»

**г.Макеевка, 2025**

## Оглавление

Введение .....	3
1. Обзор литературы.....	4
2. Материалы и методы.....	6
2.1. Первичный посев микроорганизмов на среду Эшби после хранения.....	6
2.2. Выявление активных микроорганизмов-солубилизаторов калия и фосфора	6
2.3. Методики исследования влияний штаммов азотобактера на растения .....	7
2.3.1. Подготовка почвенной смеси.....	7
2.3.2. Методика исследования влияния внесения культуры <i>Azotobacter</i> на разных стадиях развития базилика .....	8
3. Результаты и обсуждение .....	10
3.1. Результаты первичного посева на среду Эшби и способность штаммов сохранять свои свойства .....	10
3.2. Изучение сохранности активностей, важных для стимулирования роста растений.....	11
3.3. Исследование роста бактерий на среде с алюмосиликатом калия (среда «Калий») .....	11
3.4. Исследование роста бактерий на среде с фосфатом кальция (среда «Фосфор») .....	13
3.5. Исследование влияния внесения культуры <i>Azotobacter</i> при предпосевной обработке семян базилика .....	16
3.6. Влияние консорциумов местных штаммов <i>Azotobacter</i> на рост и развитие растений базилика при внесении в период вегетации на разных стадиях .....	17
3.7. Влияние внесения суспензии азотобактера на морфометрические показатели растений .....	18
3.8. Результаты исследования содержания нитратов .....	20
Выводы .....	22
Список использованной литературы.....	23
Приложение 1 .....	24

## **Введение**

Исследование выполнено в рамках проекта «Поиск бактерий, полезных для роста растений» в рамках программы «Сириус.Лето: начни свой проект» и исследовательского проекта «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов». Одним из заданий проекта является поиск азотфиксирующих бактерий, обладающих комплексной активностью, например, как солюбилизаторы фосфора и калия, то есть способных преобразовывать данные элементы из нерастворимых форм, содержащихся в почве и горных породах, в доступные для растений ионы.

## **Актуальность**

Донецкая Народная Республика находится в зоне экстремального земледелия, и поиск бактерий, стимулирующих рост растений, является важной задачей. Нам было предложено изучить микроорганизмы почвы в древесных насаждениях и насаждениях плодовых культур Донецкого ботанического сада. Первичное выявление интересных штаммов микроорганизмов-азотфиксаторов необходимо как для характеристики микробиома почв, на которых произрастают интродуцированные растения и новые сорта, так и для создания новых биоудобрений. Особенный интерес представляет выделение местных штаммов, которые приспособлены к климатическим и эдафическим условиям конкретной местности.

**Цель:** Анализ биологической активности штаммов бактерий, выделенных из почв Донецкого ботанического сада, как стимуляторов роста и развития зеленных культур в условиях закрытого грунта

## **Задачи:**

1. Анализ литературных данных
2. Анализ физиологической активности имеющихся штаммов бактерий по солюбилизации фосфора и калия, разрушению целлюлозы как важных свойств бактерий, благоприятно влияющих на рост и развитие растений
3. Исследование влияния выделенных штаммов бактерий при внесении на разных стадиях развития и вегетации базилика в экспериментальном бедном грунте

## 1. Обзор литературы

Фосфор является вторым наиболее важным элементом для питания растений после азота (N). Он играет решающую роль практически во всех ключевых метаболических процессах растений, таких как фотосинтез, перенос энергии, передача сигнала, макромолекулярный биосинтез и дыхание. Он в изобилии присутствует как в органических, так и в неорганических формах в почвах. Для здорового развития растений калий (K) является третьим по значимости макроэлементом. Дефицит калия является одним из самых больших ограничений продуктивности сельского хозяйства из-за неравномерного использования удобрений. Низкий уровень калия приводит к задержке роста растений, уменьшению веса семян и урожайности целом [8].

Хорошая обеспеченность почвы фосфором и калием улучшает обмен углеводов, белков, жиров и витаминов, способствует накоплению сахаров, играющих большую роль в повышении морозоустойчивости, обеспечивает экономное расходование влаги и увеличение засухоустойчивости растений, устойчивость к грибковым заболеваниям и полеганию. Поэтому своевременное удовлетворение потребности растений в фосфоре и калии – одно из главных условий формирования их высокой урожайности, а содержание фосфора и калия относится к числу основных показателей, которые используют при оценке состояния почвенного покрова

В благоприятных почвенно-климатических условиях, при достаточной влагообеспеченности, значимую роль в питании растений играет способность почвы пополнять дефицит легкоусвояемых форм элементов питания, мобилизуя их из труднодоступных соединений [1]. Этому способствуют почвенные бактерии []

### **Солюбилизация калия и фосфора микроорганизмами**

Фосфат не может быть использован растениями, так как 95-99% его находится в нерастворимом, иммобилизованном и осажденном состоянии. Единственными растворимыми формами фосфатов, которые могут поглощать растения, являются одноосновные ( $\text{H}_2\text{PO}_4$ ) и двухосновные ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) ионы.

Ризобактерии в почве, которые способствуют росту растений, используют различные методы для использования недоступных типов фосфора и, в свою очередь, помогают сделать фосфор доступным для поглощения растениями.

Основные процессы растворения фосфатов, используемые ризобактериями, которые способствуют росту растений, следующие:

- Высвобождение химических веществ, способных образовывать комплексы или растворять минералы, таких как анионы органических кислот, протоны, гидроксильные ионы и  $\text{CO}_2$ .
- Выделение внеклеточных ферментов (биохимическая фосфатная минерализация).
- Фосфат выделяется при распаде субстрата (биологическая фосфатная минерализация).

Более 90% калия в почве находится в виде нерастворимых горных пород и силикатных минералов, а остальные 10% находятся в виде растворимых солей и в органическом веществе [8]. Алумосиликаты – группа природных и синтетических

силикатов, комплексные анионы которых содержат кремний и алюминий ( $[\text{AlSiO}_4]^-$ ,  $[\text{AlSi}_4\text{O}_{10}]^-$ ). В качестве катионов выступают  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ . Алумосиликаты входят в состав глин, являются глинообразующими минералами. Разрушение алумосиликатов происходит под влиянием разных кислот, и даже углекислоты, образуемых микроорганизмами. Это неспецифический процесс. Гидролиз силикатов под влиянием, например, углекислоты идет по следующей схеме:



Бактерии могут растворять калийную породу, поскольку они производят и выделяют органические кислоты. Таким образом, использование почвенных бактерий, способных высвобождать калий и фосфаты в почве, поможет использовать меньше минеральных удобрений, и сделать эффективное сельское хозяйство безвредным для окружающей среды. Особенно интересен поиск штаммов бактерий, обладающих с при применении солубилизирующих калий ризобактерий, стимулирующих рост растений, в качестве биоудобрения для развития сельского хозяйства [8].

Способностью к солубилизации фосфора и калия могут обладать олигонитрофильные микроорганизмы, в том числе и азотфиксирующие бактерии, такие как *Azotobacter*.

Для роста, развития и размножения растения нуждаются в правильном сочетании микроэлементов и макроэлементов. Минеральные вещества, в форме которых макроэлементы и микроэлементы содержатся в почве, всасываются через корневую систему растений. Понятно, что количество минеральных веществ зависит от множества факторов (региона, сезона, погодных условий) и зачастую их содержание может оказаться недостаточным для нормальной жизнедеятельности растений. Для удовлетворения потребностей растений в питательных веществах могут использоваться биоудобрения, содержание микроорганизмы, способные скорректировать элементный состав ризосферы. Азотфиксирующие бактерии могут быть использованы для повышения концентрации азота путем преобразования азота из атмосферы ( $\text{N}_2$ ) в ион аммония ( $\text{NH}_4^+$ ) для поглощения растениями [2].

*Azotobacter* — это род свободноживущих грамотрицательных бактерий, обитающих в почве. *Azotobacter chroococcum* был впервые выделен в чистой культуре голландским ученым М. Бейеринком в 1901 г. Для бактерий рода *Azotobacter* характерны относительно крупные клетки овальной формы, диаметром 1,0 – 2,0 мкм, плеоморфные (могут иметь разную форму - от палочковидных до кокковидных). Могут располагаться одиночно, парами или группами неправильной формы, иногда в виде цепочек разной длины. Эндоспор не образуют, но формируют цисты [7].

В свежих культурах клетки подвижны за счет многочисленных расположенных жгутиков и имеют форму утолщенных палочек с овальными концами. В более поздних культурах клетки теряют подвижность, укорачиваются, принимая почти кокковидную форму и продуцируют толстый слой слизи, формирующий капсулу клетки [7].

*Azotobacter* – аэробный организм. Аэрация, как отмечают многие исследователи, благоприятствует размножению азотобактера [6]. В отношении температуры азотобактер является типичным мезофилом. Положение оптимальной температурной точки развития может несколько меняться в зависимости от состава и pH среды. Большинство исследователей указывают, однако, на 25<sup>0</sup>-30<sup>0</sup>С как на оптимальную температурную зону развития этой бактерии. Свободноживущий азотфиксирующий *Azotobacter chroococcum* чрезвычайно чувствителен к токсичным веществам, накапливающимся в почве [6].

Среди почвенных бактерий есть виды–хемоавтотрофы, способные проявлять дополнительную активность и делать доступными для растений не только азот, но и такие важные элементы, как калий и фосфор. усваивать атмосферный азот. Разные штаммы могут проявлять активность в разной степени. Выбор наиболее активных бактерий – основа для создания биоудобрений.

## **2. Материалы и методы**

### **2.1. Первичный посев микроорганизмов на среду Эшби после хранения**

Был проведен первичный посев микроорганизмов из почвенной вытяжки на среду Эшби после хранения. Для этого сделали суспензию из колонии, хранившейся в пробирке типа Эппендорф и 50 мл. жидкой среды Эшби, дождались осаждения крупных фрагментов на дно, перенесли 1 мл полученной суспензии из флакона на поверхность твердой среды Эшби в чашке Петри и равномерно распределили ее. Чашки инкубировали при t 24-25С в течение 7 дней. Зафиксировали, ккие из штаммов продолжили свой рост после хранения.

### **2.2. Выявление активных микроорганизмов-солюбилизаторов калия и фосфора**

Для выявления штаммов, способных преобразовывать калий и фосфор из нерастворимых форм, содержащихся в почве и горных породах, в доступные для растений ионы, использовали среды «Калий» и «Фосфор» из исследовательского набора «Скрининг азотфиксирующих бактерий на способность к стимулированию роста растений». Среда «Калий» содержит источник азота – сульфат аммония (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, минеральные соли, хорошо растворимые в воде CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, и калия алюмосиликат, нерастворимый в воде. Также включает в себя глюкозу в качестве энергетического субстрата и небольшое количество солей-источников микроэлементов (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O). Также среда содержит кислотно-основный индикатор Бромкрезоловый красный, который регистрирует изменения pH от 5,2 до 6,8, изменяя свой цвет с жёлтого на пурпурный.

Пожелтение среды на возможно зарегистрировать на 5-14 день из-за выделения бактериями кислоты [5].

Среда «Фосфор» также содержит сульфат аммония, водорастворимые соли KCl, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и нерастворимый фосфат кальция Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, глюкозу в качестве энергетического субстрата и небольшое количество солей-источников микроэлементов, как и в среде «Калий». Кислотно-основным



К десяти частям кокосового волокна добавляли одну часть промышленного грунта и одну часть голубой глины, заливали полученную смесь горячей водой и перемешивали до однородного состояния. После приготовления проверили рН грунта с помощью капельного теста – кислотность составила 7, что подходит для базилика и почвенных бактерий. Мы изготавливали почвенную смесь самостоятельно по причине того, что все грунты, имеющиеся в продаже, содержат в себе минеральные удобрения (в том числе соединения фосфора) в достаточно больших количествах, а в местных природных грунтах обитает большое количество почвенных бактерий, которые могли составить конкуренцию исследуемым штаммам.



Рис. 2 Приготовление почвенной смеси

### 2.3.2. Методика исследования влияния внесения культуры *Azotobacter* на разных стадиях развития базилика

Проращивание производили в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге при температуре 23-25С, на свету. 6 чашек содержали опытные образцы (1 мл среды Эшби с изучаемыми штаммами (01-03, 01-03N, 04-06, 07-09, 13- 15, 28-30) и 9 мл воды), в 1 чашке находился контрольный образец (10 мл воды). В каждую чашку посажено было по 20 семян. Опыт проводили в 3 повторениях. Наблюдение проводили в течение 7 дней, проводили подсчет проросших семян и определяли всхожесть по формуле  $(\text{количество проросших семян}) \times 100\% / (\text{общее количество семян})$ .

Для выращивания растений подготовленный грунт распределяли по отсекам кассетных парничков для выращивания рассады в 3 повторениях. В каждый отсек мы добавляли по 1 мл суспензии исследуемых штаммов. В первой повторности растения были обработаны бактериями однократно, во второй повторности помимо обработки бактериями в почву был добавлен биогумус, в третьей повторности растения обрабатывали дважды. Парнички были оставлены для инкубации на протяжении 7 дней при комнатной температуре (22-24С) в темном месте. Увлажнение грунта проводили по необходимости.



Рис.3. Выращивание растений базилика в парничках

По истечении срока инкубации мы проводили посев семян. Для выращивания рассады использовали подсветку парников с помощью фитоламп, чтобы свет попадал на растения в течение 12 часов в день. Выращивали растения на протяжении 60 дней, регулярно фиксируя изменения. Мы измеряли такие показатели растений на стадии проростка и молодого растения: высота, количество пар листьев, длина и ширина листовая пластинки.



Рис. 4. Измерение параметров растений базилика

По окончании срока выращивания мы также измеряли длину корневой системы (см. Рис. 4) Кроме этого мы проводили исследование содержания нитратов с помощью нитратомера.

### 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1. Результаты первичного посева на среде Эшби и способность штаммов сохранять свои свойства

23 штамма почвенных бактерий рода *Azotobacter* были выделены из проб методом почвенных комочков осенью 2023 г, после этого пересеивались на свежие среды: в 2023-2024 г – 4 раза (осень-весна), в 2024-2025 г – 4 раза (сентябрь - февраль). В летний период со штаммами работа не проводилась, они хранились в закрытых пробирках со средой Эшби при 4С.

За время хранения, при одинаковых условиях, из 23 сохраненных штаммов возобновили свой рост на среде Эшби 10 образцов, принадлежащих 5 штаммам (01-03, 04-06, 07-09, 13-15, 28-30).

Для подтверждения, что сохранившиеся колонии действительно образует *Azotobacter*, мы подготовили микропрепараты, сделали фотографии и сравнили их с фотографиями прошлого года.

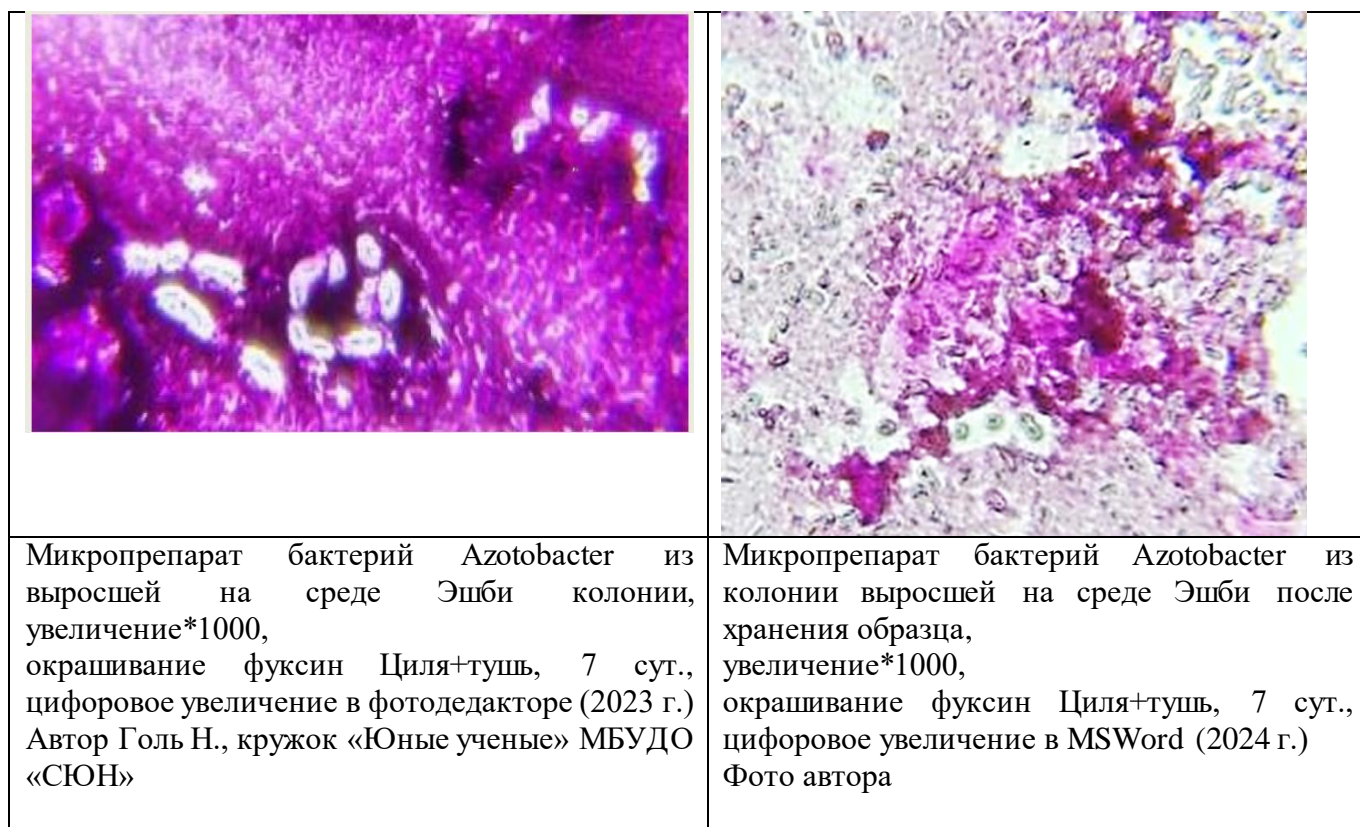


Рис. 5. Микрофотографии азотобактера – основы приготовления бактериальной суспензии-микробного удобрения

На микропрепарате, окрашенном фуксином Циля и тушью, хорошо видны относительно крупные клетки, округлые и продолговатые вокруг клеток бактерий хорошо видна неокрашенная слизистая капсула, что характерно для рода *Azotobacter* [7].

По внешним характеристикам часть колоний, выросших на твердой среде Эшби после пересеивания, отвечали описанию колоний *Azotobacter*: это плоские колонии округлой формы, белой или молочно-белой окраски, с глянцевой

поверхностью, слизистые, пастообразной консистенции, часть колоний быстро накапливает темный водорастворимый пигмент меланин, что указывает на *Azotobacter chroococcum*. Первоначально колонии вырастают диаметром 5мм, после чего начинают обильное выделение слизи, которая покрывает колонии и растекается по поверхности среды. Почти во всех чашках на 7 сутки образовался «бактериальный газон», микроорганизмы обильно размножились во всем объеме суспензии.

Мы сравнили обрастание на чашках Петри с материалами прошлого года (см. Таб. Приложения) и выяснили, что рост колоний штаммов мы 01-03, 04-06 и 07-09 после хранения стал активнее (бактериальный газон покрывает большую площадь: по визуальной оценке она увеличилась вдвое), пигмент вырабатывается активнее, что говорит о более быстром развитии колоний. Рост и развитие колоний штаммов 13-15 и 28-30 стали медленнее.

Это говорит о том, что способность к более или менее быстрому размножению были у бактериальных клеток, которые дали начало новым колониям. Мы пришли к заключению, что более стойкими при хранении являются штаммы 01-03, 04-06 и 07-09.

### **3.2. Изучение сохранности активностей, важных для стимулирования роста растений**

Сохраненные штаммы были ценны тем, что имели активности, важные для стимулирования роста и развития растений – способности к солибилизации, то есть переводу из нерастворимой формы в растворимую солей калия и фосфора, а также к разложению целлюлозы. Но, поскольку во время хранения могли выжить бактерии, хуже проявляющие эту активность или даже ее утратившие, было принято решение провести скрининг активностей перед началом основного эксперимента.

### **3.3 Исследование роста бактерий на среде с алюмосиликатом калия (среда «Калий»)**

В тестовой среде калий, жизненно необходимый бактериям для существования, находится в нерастворимой в воде форме алюмосиликата. Рост колонии будет доказывать, что бактерии способны высвободить этот элемент и использовать его для жизнедеятельности. Ионы калия высвобождаются под действием кислот, выделяемых бактериями. У всех 23 штаммов *Azotobacter* эта активность была зафиксирована при скрининге в 2023-2024 г. Мы повторили скрининг с сохранившимися штаммами – выращивали каждый штамм изолированно в лунке планшета в среде с алюмосиликатом и кислотно-основным индикатором. Данные анализировали, присваивая баллы по шкале от 3 (+++) – максимальная выраженность реакций до 0 баллов (–) – минимальная выраженность реакций.

Результаты представлены в Таблице.

На 3 сутки 2 экспериментальные лунки приобрели желто-розовую окраску, 1 не изменили цвет, остальные – приобрели желтую окраску (см. Таблицу), на 7 день колонии достигли 8 мм в диаметре, чего не наблюдалось в эксперименте прошлого года.

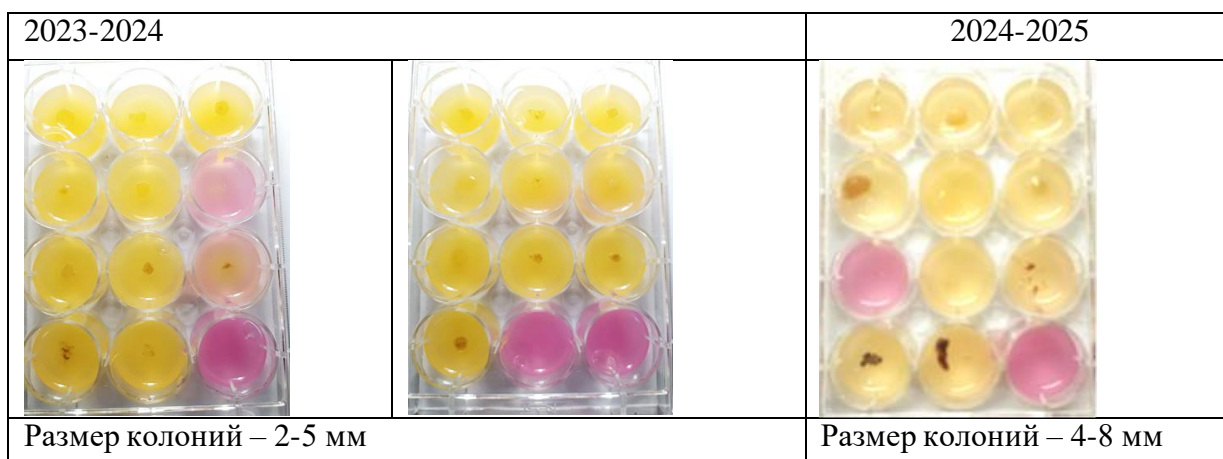


Рис. 6. Изменение окраски среды «Калий» под действием метаболитов бактерий

За это же время колонии достигли размеров 5-6 мм в диаметре. Поскольку для жизнедеятельности бактерий калий является необходимым элементом, мы можем заключить, что активно делящиеся бактерии в растущих колониях получали калий из алюмосиликата, то есть обладают способностью к его солюбилизации.

Таблица 3.

Активность разных штаммов бактерий-в среде с алюмосиликатом калия

№ п/п	Штамм, условное обозначение		Изменение окраски на скрининговой среде «Калий» на 3 -7 сутки		Устойчивость к заражению плесенью
	2023-2024	2024-2025	2023-2024	2024-2025	
1	01-03/1	01-03/1	+++	+++	
2	01-03/2	01-03/N4-1	+++	+++	
3	01-03/3	*	+++	*	*
4	01-03/4	01-03/N4-2	+++	+++	
5	04-06/1	04-06/1	+++	+++	
6	04-06/2	04-06/2	+++	+++	
7	07-09/1	07-09/1	++	+++	
8	07-09/2	07-09/2	+++	зар	
9	07-09/3	*	+++	*	*
10	10-12/1		++		
11	10-12/2		+++		
12	13-15/1	13-15/1	+++	+++	
13	13-15/2	13-15/2	+++	+++	
14	16-18/1	*	+++		*
15	16-18/2		+++		
16	19-21/1		+++		
17	19-21/2		+++		
18	22-24/1		+++		
19	22-24/2				
20	25-27/1				
21	25-27/2		+++		
22	28-30/1	28-30/1	+++	+++	
23	28-30/2	*	+++	*	*

Примечание \* - штамм не выжил при хранении

После хранения мы повторно проверили активность и выяснили что активность осталась высокой у всех штаммов. 07-09/1 стал активнее, а 07-09/2 был подвергнут заражению.

### 3.4. Исследование роста бактерий на среде с фосфатом кальция (среда «Фосфор»)

В ходе наблюдения на 3 сутки культивации мы отметили, что колонии бактерий достигли размера ~ 4-5 мм, и в некоторых лунках отмечено изменение окраски среды, что свидетельствовало об активности бактерий (см. Рис. 4.).

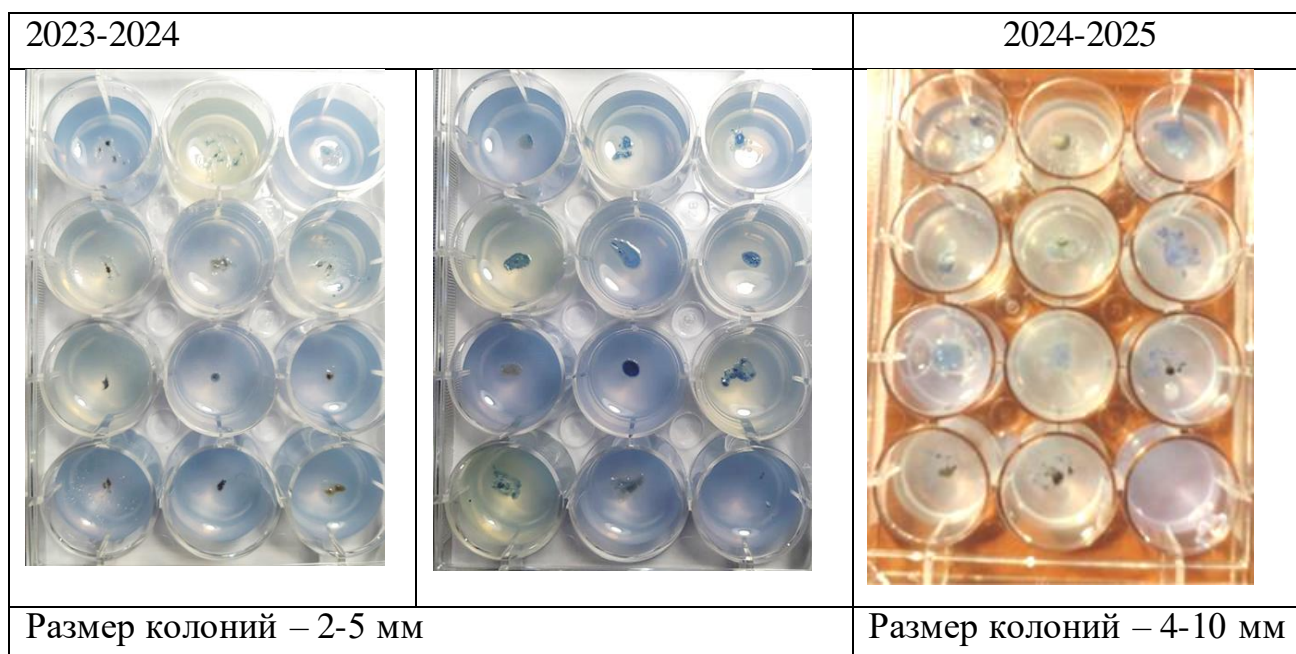


Рис. 7. Изменение окраски среды «Фосфор» под действием метаболитов бактерий

Проанализировали данные, присваивая баллы – 3 балла (+++) – максимальная выраженность реакции, 0 баллов (–) – минимальная выраженность. Всего выделили 23 разных штамма, 1 лунку (нижний левый угол - контроль) оставили с чистой средой. Результаты наблюдений представлены в Таблице 3.

Таблица 4.  
Активность разных штаммов бактерий-азотфиксаторов в среде с  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  «Фосфор»

№ п/п	Штамм, условное обозначение		Изменение окраски на скрининговой среде «Фосфор» на 3-7 сутки		Устойчивость к заражению плесенью
	2023-2024	2024-2025	2023-2024	2024-2025	
1	01-03/1	01-03/1	++	++	
2	01-03/2	01-03/N4-1	++	+++	
3	01-03/3	*	+	*	*
4	01-03/4	01-03/N4-2	-	+	

5	04-06/1	04-06/1	+	+++	
6	04-06/2	04-06/2	++	+	
7	07-09/1	07-09/1	+++	++	
8	07-09/2	07-09/2	-	+++	
9	07-09/3	*	+	*	*
10	10-12/1		+		
11	10-12/2		+++		
12	13-15/1	13-15/1	-	++	
13	13-15/2	13-15/2	++	+++	
14	16-18/1	*	-	*	*
15	16-18/2		+		
16	19-21/1		++		
17	19-21/2		-		
18	22-24/1		+		
19	22-24/2		++		
20	25-27/1		+++		
21	25-27/2		+++		
22	28-30/1	28-30/1	++	+++	
23	28-30/2	*	-	*	*

Штаммы, способные к солюбилизации фосфора отмечены на каждом из исследованных участков, однако, по сравнению со средой «Калий» степень выраженности реакции отличается для штаммов как для каждой средней пробы почвы, так и между пробами.

Активность практически всех штампов возросла, но были и те, у кого активность стала меньше. 13-15/2 и 28-30 проявили наивысшую активность.

Таблица 5.  
Активность разных штаммов бактерий в среде с карбоксиметилцеллюлозой

№ п/п	Штамм, условное обозначение		Изменение окраски на скрининговой среде «Калий» на 3 -7 сутки		Устойчивость к заражению плесенью
	2023-2024	2024-2025	2023-2024	2024-2025	
1	01-03/1	01-03/1	+	++	
2	01-03/2	01-03/N4-1	+	++	
3	01-03/3	*	+	*	*
4	01-03/4	01-03/N4-2	+	++	
5	04-06/1	04-06/1	+	++	
6	04-06/2	04-06/2	+	++	
7	07-09/1	07-09/1	+++	+++	
8	07-09/2	07-09/2	+++	+++	
9	07-09/3	*	+++	*	*
10	10-12/1		++		
11	10-12/2		++		
12	13-15/1	13-15/1	+	++	
13	13-15/2	13-15/2	+	+++	

14	16-18/1	*	++		*
15	16-18/2		++		
16	19-21/1		зар		
17	19-21/2		зар		
18	22-24/1		зар		
19	22-24/2		зар		
20	25-27/1		+		
21	25-27/2		+		
22	28-30/1	28-30/1	+++	+++	
23	28-30/2	*	+++	*	*

Активность штаммов возросла. Активность штаммов 01-03 01-03 N4-2 оказалась наивысшей.

Всего штаммов, активных на обеих средах (получивших 3 и 2 балла в каждой) обнаружено 9 (см. Таблицу 6).

Таблица 6  
Штаммы с комплексной активностью

№ п/п	Штамм	2023-2024 г (активность штаммов Azotobacter, выделенных из почв ДБС)			2024-2025 г (активность штаммов Azotobacter, выделенных в 2023 г, после периода хранения на среде Эшби с мая по октябрь 2024 г.		
		Активные штаммы на среде «Фосфор»	Активные штаммы на среде «Калий»	Активные штаммы на среде «Целлюлоза»	Активные штаммы на среде «Фосфор»	Активные штаммы на среде «Калий»	Активные штаммы на среде «Целлюлоза»
1	01-03/1	++	+++	++	+++**	++	+++
2	01-03/2	++	+++	++	+++	+++	+++
3	04-06/2	++	+++	++	++**	+++	++
4	07-09/1	+++	++	+++	+++**	++	++
5	10-12/2	+++	+++	+++	*		
6	13-15/2	++	+++	++	+++	+++	+++
7	19-21/1	++	+++	+++	*		
8	25-27/2	+++	+++	++	*		
9	28-30/1	++	+++	+++	+++	+++	++

Примечание \* - штамм не выжил после пересыхания \*\* - штаммы отказались неустойчивы к заражению плесенью, на 10 сутки отмечен рост плесневых грибов в лунке

Таким образом, мы видим, что все штаммы сохранили активность по трем направлениям, но выражена она в разной степени, и только часть штаммов показывают устойчивость своих характеристик.

### 3.5. Исследование влияния внесения культуры *Azotobacter* при предпосевной обработке семян базилика

Исследования влияния местных штаммов почвенных микроорганизмов проводились в трёх повторениях, по 20 семян для каждого штамма. Всхожесть считали как долю проросших семян на протяжении 5-7 дней согласно методике. Контроль поливали водой, к опытным образцам добавили 1 мл бактериальной суспензии на жидкой среде Эшби.

Бактерии размножились, образовали бактериальную пленку на поверхности фильтровальной бумаги. Бактериальная слизь заметно удерживала влагу по сравнению с контрольным образцом, полив требовался гораздо реже. Результаты исследования представлены в Таблице №7.

Таблица 7  
Всхожесть семян базилика и влияние на нее бактерий

Штамм	Всхожесть, %						
	01-03	01-03 N4-1	04-06	07-09/1	13-15/ 2	28-30	контр
Опытные посадки							
Базилик 1	80%	85%	65%	60%	90 %	75%	65%
Базилик 2	90 %	90 %	65%	80%	100%	85%	85%
Базилик 3	85%	85%	-	75%	70%	75 %	75%
<b>Среднее</b>	<b>85%</b>	<b>87%</b>	<b>65%</b>	<b>72%</b>	<b>87%</b>	<b>78%</b>	<b>75%</b>

Мы пришли к заключению, что 4 штамма: 01-03, 01-03N4, 13-15/2 положительно влияют на всхожесть семян базилика – она увеличивается на 10-12%,. и штамм 28-30 влияет незначительно. В присутствии штамма 04-06 всхожесть семян ниже на 10 %, 07-09 оказывает незначительное негативное воздействие - всхожесть ниже на 3%. Наглядно результаты представлены на Рис.8.

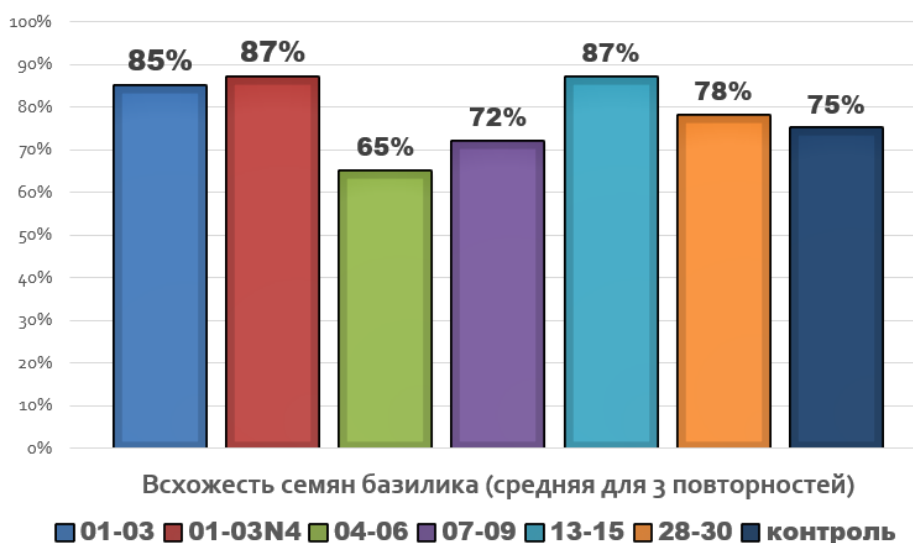


Рис.8 Средняя всхожесть семян базилика при обработке суспензиями местных штаммов азотобактера

### 3.6. Влияние консорциумов местных штаммов *Azotobacter* на рост и развитие растений базилика при внесении в период вегетации на разных стадиях

#### *Выживаемость проростков*

В ходе исследования мы выяснили, что разные штаммы неодинаково влияют на выживаемость ростков. К концу 3 недели в контроле сохранилось менее 15% проростков, в ёмкостях со штаммами 01-03 и 28-30 – более 40 %, в ёмкостях со штаммами 07-09 и 13-15 – более 50%.

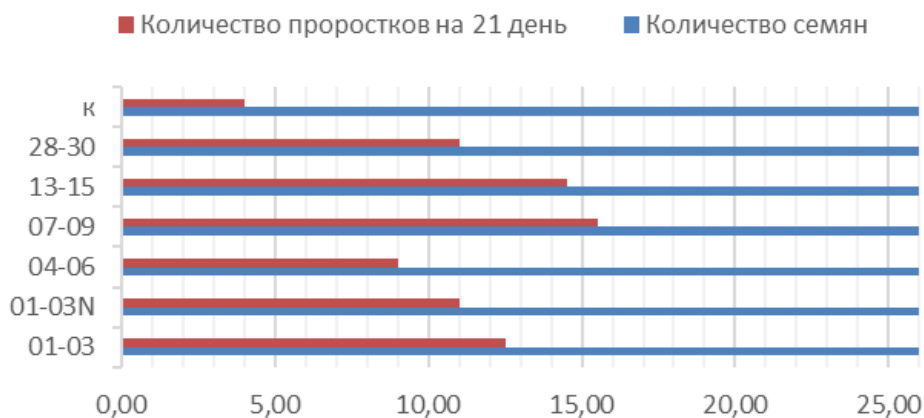


Рис. 9 Выживаемость проростков базилика в контроле и при обработке суспензией местных штаммов азотобактера

Следовательно, наиболее выраженное влияние оказывают штаммы 07-09 и 13-15.

Также мы провели эксперимент по влиянию разных режимов обработки на выживаемость ростков. Результаты представлены в виде гистограммы (Рис. 7). Наилучшие показатели у растений – при двукратной обработке.

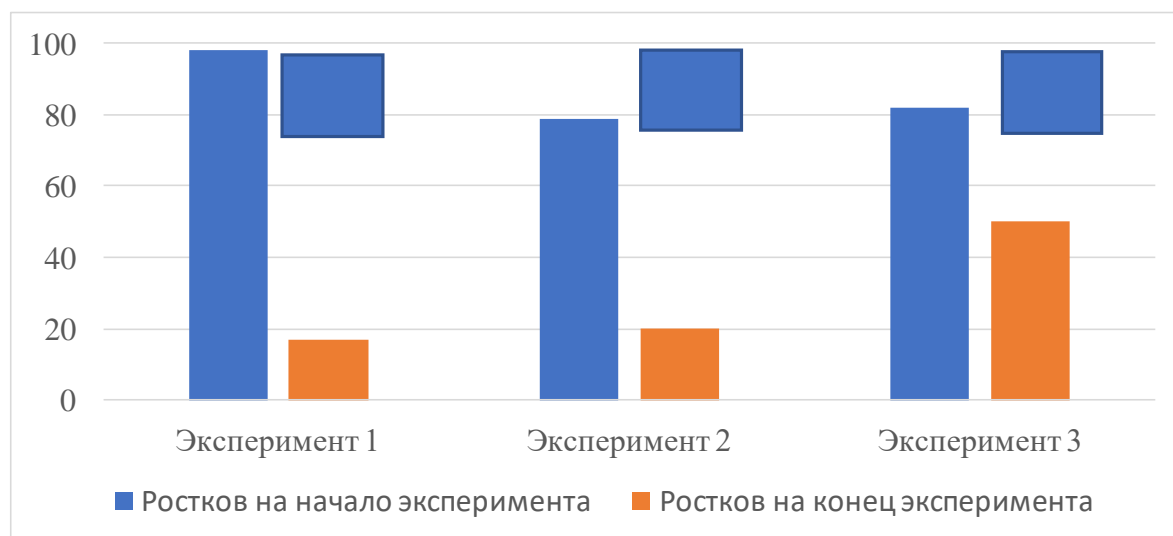


Рис.10 Выживаемость ростков при разных режимах обработки бактериальной суспензией

*Эксперимент 1: изучение влияния азотобактера на развитие растений базилика при однократной обработке, Эксперимент 2: Изучение влияния азотобактера на развитие растений базилика при однократной обработке с добавлением биогумуса, Эксперимент 3: Изучение влияния азотобактера на развитие растений базилика при двукратной обработке*

### 3.7. Влияние внесения суспензии азотобактера на морфометрические показатели растений

На 35-й день эксперимента мы выполнили измерения высоты растений во всех трёх повторностях. Данные по первой повторности отражены на рисунке 2, по третьей — на рисунке 3. Средний показатель высоты ростков составил около 7,3 см. Наиболее высокие ростки были у растений, обработанных штаммами 04-06, 13-15 и 28-30.

Наблюдения за развитием растений мы продолжили и на более поздних этапах. На 45-й день были проведены комплексные измерения: зафиксирована высота растений, определены длина и ширина листовая пластинки, подсчитано количество пар листьев, проанализирована их форма. В ходе анализа мы рассчитали соотношение длины и ширины листовой пластинки. Выяснилось, что в среднем длина листа превосходила его ширину не более чем вдвое. Подобное соотношение параметров свидетельствует о яйцевидной форме листа, которая является типичной для базилика.

Длина побега была наибольшей у растений, обработанных однократно, наименьшая – у растений, обработанных однократно с добавлением биогадуса. При этом средние размеры листовых пластинок были не меньше, чем при однократной обработке. Растения, обработанные двукратно, были выше за счет увеличения длины гипокотилия (растения «вытянулись»), но площадь листьев в целом была меньше.

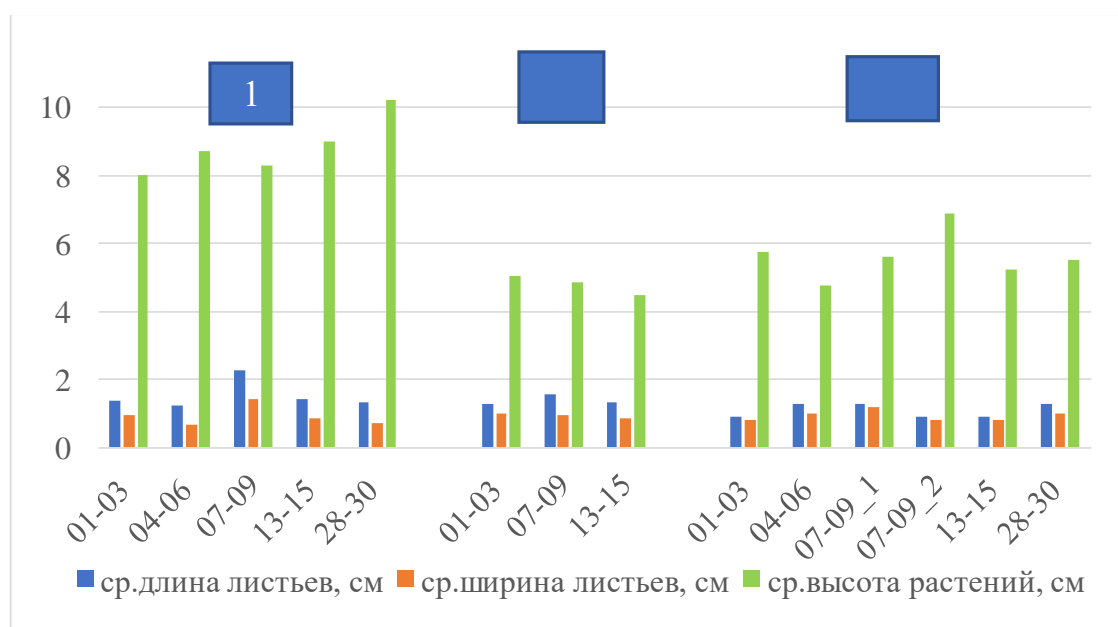


Рис.11 Длина растений и размеры листьев на 45 день эксперимента

*Примечание: Эксперимент 1: изучение влияния азотобактера на развитие растений базилика при однократной обработке, Эксперимент 2: Изучение влияния азотобактера на развитие растений базилика при однократной обработке с добавлением биогадуса, Эксперимент 3: Изучение влияния азотобактера на развитие растений базилика при двукратной обработке*

На 60 день эксперимент закончили, растения изъяли из грунта, провели замеры длины и взвешивание. Получили следующие результаты: по длине стебля и корней лучшие результаты показал первый и третий эксперимент при обработке

штаммом 07-09. Вес стеблей был больше в эксперименте 2 при обработке штаммами 13-15 и 07-09, а вес корней преобладал в эксперименте 3, также у растений, обработанных штаммами 07-09 и 13-15. Самые худшие результаты по весу корней показал эксперимент 1 – все растения погибли, кроме обработанных штаммами 07-09 и 13-15, а у оставшихся при самом большом весе надземной части корни были очень слабо развиты.

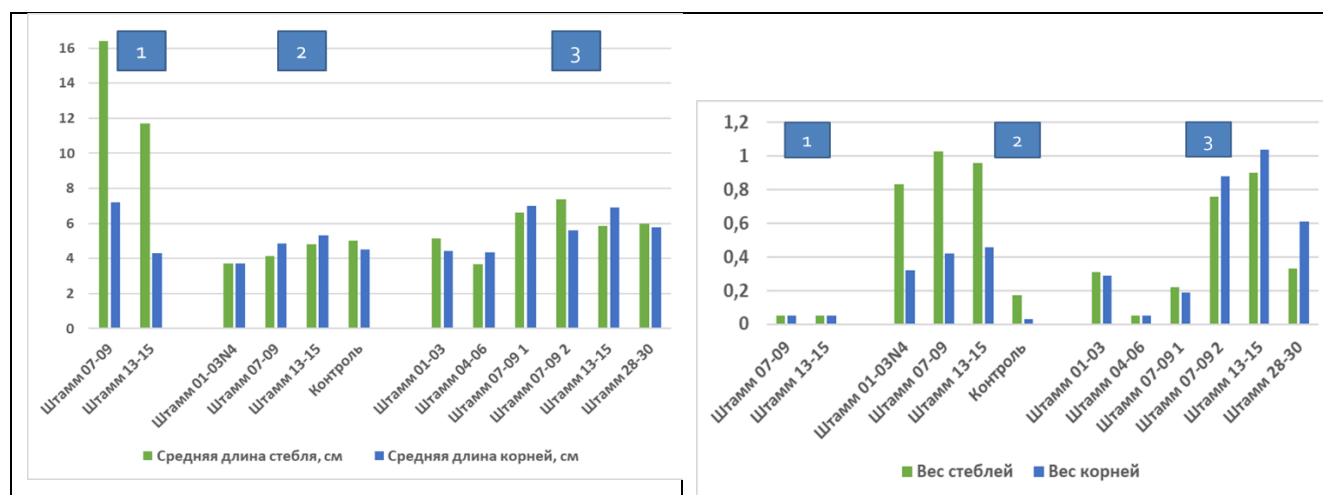


Рис.12 Длина и вес растений на 60 день эксперимента

*Примечание: Эксперимент 1: изучение влияния азотобактера на развитие растений базилика при однократной обработке, Эксперимент 2: Изучение влияния азотобактера на развитие растений базилика при однократной обработке с добавлением биогумуса, Эксперимент 3: Изучение влияния азотобактера на развитие растений базилика при двукратной обработке*

При изучении влияния азотобактера на развитие растений базилика при однократной обработке мы наблюдали такие особенности: у проростков длинный гипокотиль, длинные междоузлия, листовые пластинки нормальной формы и окраски, сформировались 4 пары настоящих листьев, начали расти листья из пазух (см. Рис.). Корневая система развита очень слабо. Растений выжило всего 2.



Рис. 13 Растения, однократно обработанные азотобактером на ранних стадиях развития

При изучении влияния азотобактера на развитие растений при однократной обработке с добавлением биогумуса мы наблюдали такие особенности: гипокотиль относительно короткий, междоузлия сближены, листовые пластинки нормальной

формы и окраски, сформировались 2 пары настоящих листьев (см. Рис.). У растений, выращенных в присутствии штаммов 07-09 и 13-15 корневая система развита лучше, чем в контрольном образце. Растений выжило 6.



Рис. 14 Растения, однократно обработанные азотобактером на ранних стадиях развития и дополнительно обработанные биогуомусом с 35 дня эксперимента

При изучении влияния азотобактера на развитие растений при двукратной обработке мы наблюдали такие особенности: гипокотили длинные, листовые пластинки мелкие, нарушенных пропорций - соотношение длины к ширине 1,3 и меньше, наблюдается выраженный хлороз – нарушение синтеза хлорофилла, сформировались 1 пара настоящих листьев, корневая система развита очень хорошо, наблюдается большое количество придаточных корней на гипокотиле (см. Рис.). Особенно это выражено у растений, обработанных штаммами 07-09, 13-15 и



Рис. 15 Растения, двукратно обработанные суспензией азотобактера

Во втором эксперименте мы выяснили, что биогуомус способен стимулировать рост и развитие корневой системы растения. Во второй повторности длина корней некоторых растений превысила длину стеблей. Это говорит о том, что биогуомус способен стимулировать рост и развитие корневой системы растения, особенно при совместной обработке с азотобактером.

### **3.8. Результаты исследования содержания нитратов**

Также мы выясняли уровень содержания нитратов в растениях. Для этого мы аккуратно извлекали растение из почвы и очищали его от остатков земли. Затем

измельчали, перетирая до кашицеобразного состояния. После этого измеряли содержание нитратов при помощи нитрат-тестера. Результаты представлены в Таблице 8.

Таблица 8  
Содержание нитратов в растениях базилика, обработанных бактериальной суспензией азотобактера

Штамм	Содержание нитратов, мг/кг	Штамм	Содержание нитратов, мг/кг	Штамм	Содержание нитратов, мг/кг
01-03N4	3400	01-03	2500	07-09	3500
13-15	1500	04-06	2100	13-15	5000
07-09	2800	07-09	3400		
Контроль	1600	07-09 2	4000		
-	-	13-15	5800		
-	-	28-30	7400		

Мы выяснили, что уровень содержания нитратов в растениях варьировался от 1500 (штамм 13-15, вторая повторность) при норме в 2000, до 5000-7400 (опасный уровень). Повышенное содержание нитратов говорит об активной выработке азота бактериями. Штаммы, проявившие наибольшую активность по стимулированию роста растений, также вызвали и повышение уровня нитратов в тканях растений. Из этого можно сделать заключение, что при использовании бактериальных удобрений на основе азотобактера этот параметр необходимо контролировать и подбирать режим обработок.

## **Выводы**

1. В ходе работы было выявлено 6 штаммов с комплексной активностью по солюбилизации калия и фосфора, а также способностью разлагать целлюлозу.
2. 4 штамма 01-03, 01-03N4, 13-15 и 28-30 положительно влияют на всхожесть семян базилика, а штаммы 04-06 и 07-09 ее уменьшают.
3. 2 штамма - 07-09 и 13-15 показали способность к стимуляции развития растений и повышению их устойчивости к негативным факторам, однако их высокая концентрация стимулирует корнеобразование и рост корней в ущерб развитию надземной части. Необходимо опытным путем подбирать концентрации удобрений для максимального эффекта.
4. При выращивании растений базилика в присутствии активных штаммов повышается уровень нитратов, что негативно влияет на потребительские свойства.











## Список использованной литературы

1. Гаевая Э.А. Изменение фосфорно-калийного режима черноземов обыкновенных в длительном опыте Ростовской области / Э.А. Гаевая, И.Н. Ильинская, О.С. Безуглова, Е.Н. Нежинская // Электронный научно-производственный журнал «АгроЭкоИнфо» URL: [https://agroecoinfo.ru/STATYI/2022/2/st\\_202.pdf](https://agroecoinfo.ru/STATYI/2022/2/st_202.pdf)
2. Зенова Г. М., Степанов А. Л., Лихачева А. А. и др. Практикум по биологии почв. — М., 2002. 120 с.
3. Сыщиков Д.В., Сыщикова О.В. Влияние коллекционных древесных насаждений ГУ «Донецкий ботанический сад» на агрохимические показатели почв // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. 2017. №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-kollektsionnyh-drevesnyh-nasazhdeniy-gu-donetskiy-botanicheskiy-sad-na-agrohimicheskie-pokazateli-pochv> (дата обращения: 01.02.2024).
4. Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов. Методические рекомендации к базовому исследовательскому набору: получение и анализ азотфиксирующих бактерий. Новосибирск, 2022 [Электронный ресурс].
5. Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов. Методические рекомендации к у б. исследовательскому набору: «Скрининг азотфиксирующих бактерий на способность к стимулированию роста растений». Новосибирск, 2022 [Электронный ресурс].
6. Исследования, разработки и практические мероприятия по применению препаратов на основе эффективных микроорганизмов. <https://apknet.ru/metodiki-laboratornyx-issledovaniy/?ysclid=lsereokyuf56391511>
7. Определитель бактерий Берджи. Т. 2: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоула, Крига Н., Снита П. и др. М.: Мир, 1997. 368 с.
8. Ризобактерии, стимулирующие рост растений (PGPR)  
URL: <https://microbiologynote.com/ru/стимулирующие-рост-растений-ризобактерии-pgpr/>
9. Микробные земледобрительные препараты, их применение в земледелии и влияние на урожайность сельскохозяйственных растений : <https://studfile.net/preview/16471693/page:2/>

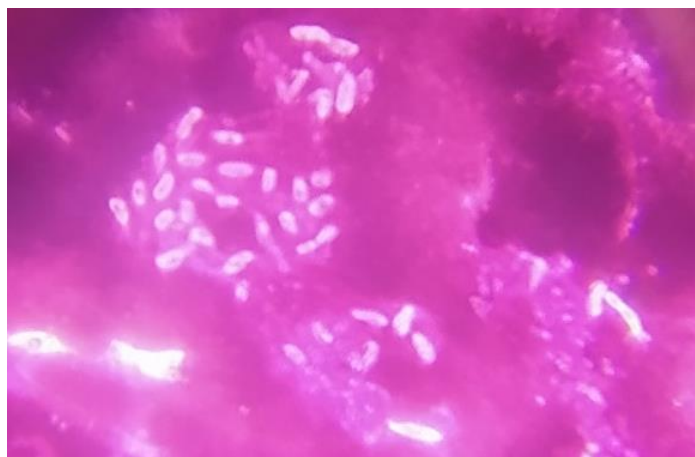
Приложение 1

Сравнение внешнего вида колоний («бактериального газона») *Azotobacter*,  
выделенных из почв Донецкого ботанического сада

Таблица 9

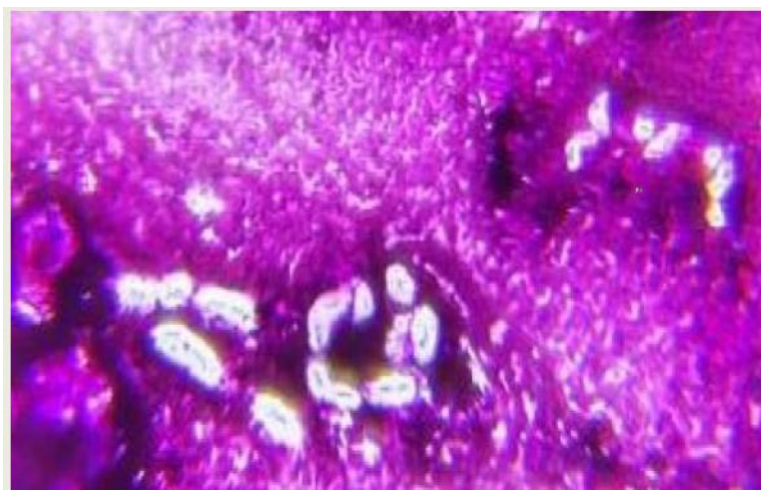
<b>Места первичного отбора почв</b>				
Участок с тяжелым суглинком, перекопанный  Гумусовый горизонт (более 25 см)	Участок с тяжелым суглинком под паром  Гумусовый горизонт (более 25 см)	Участок с произрастающими дубами  Гумусовый горизонт (более 25 см)	Участок к саду косточковых культур  Гумусовый горизонт (более 25 см)	Участок с ельником, ед. разных видов  Гумусовый горизонт (более 25 см)
<b>Условные обозначения штаммов</b>				
<i>01-03</i>	<i>04-06</i>	<i>07-09</i>	<i>13-15</i>	<i>28-30</i>
<b>Штаммы <i>Azotobacter</i>, выделенные непосредственно из почв, внешний вид на среде Эшби, посев методом суспензии (сбор образцов сентябрь 2023, инокуляция январь 2024 г.), 7 суток инкубирования</b>				
				
<b>Штаммы <i>Azotobacter</i>, инокулированные на среду Эшби после хранения, посев методом суспензии (хранение май-октябрь 2024, инокуляция октябрь 2024 г.), 7 суток инкубирования</b>				
				

Микропрепарат почвенных бактерий (окраска тушью и фуксином Циля, \*400



Микропрепарат бактерий *Azotobacter* (2023 г) из выросшей колонии, увеличение \*400, окраска фуксин Циля+тушь, 7 сут.

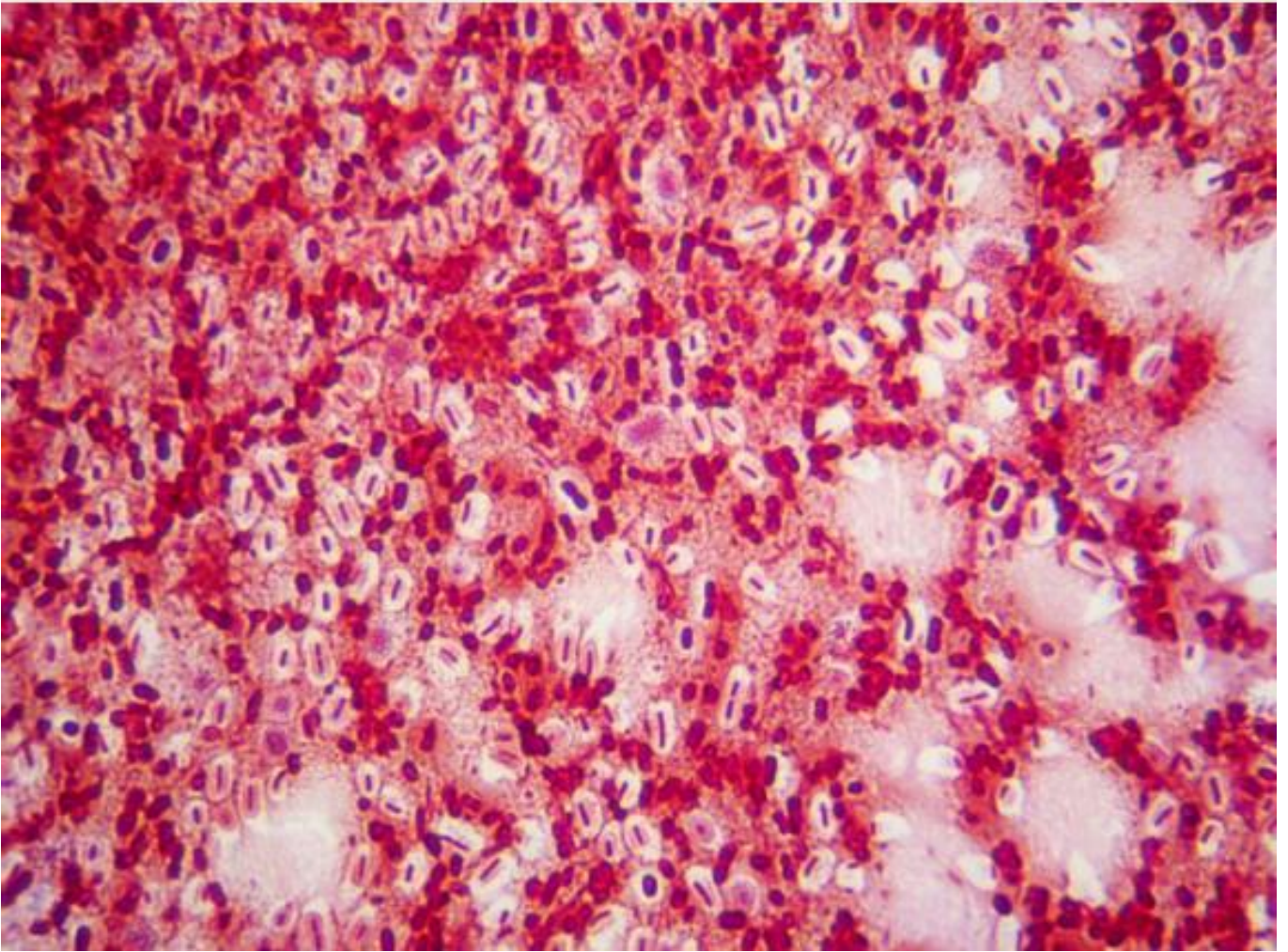
*Микроскоп Microlab, \*400, фотосъемку проводили с помощью камеры смартфона Redmi. Дополнительную обработку и цифровое увеличение изображения проводили в графическом редакторе Gimp*



Микропрепарат бактерий *Azotobacter* из выросшей колонии, увеличение \*1000, фуксин Циля+тушь, 7 сут. (2023 г.)

*Микроскоп Microlab, \*1000, фотосъемку проводили с помощью камеры смартфона Redmi. Дополнительную обработку и цифровое увеличение изображения проводили в графическом редакторе Gimp*

*Фото выполнены обучающимся кружка «Юные ученые» МБУДО «СЮН» Голь Н., 2023 г.*

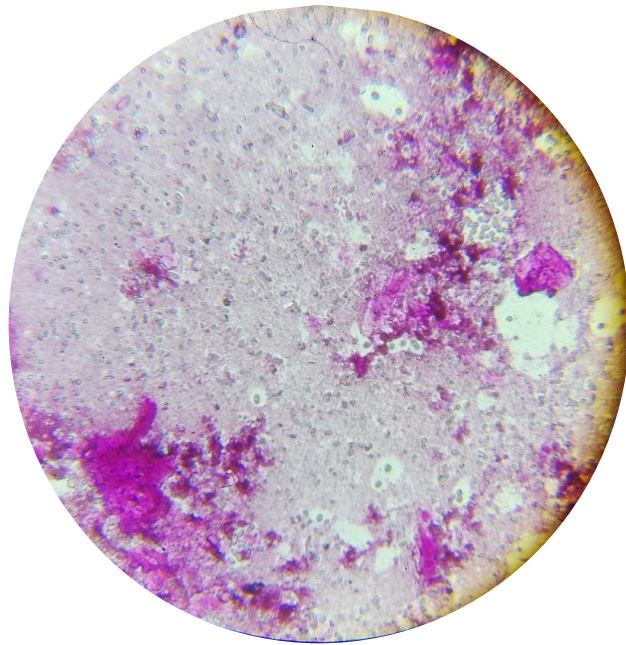


Микропрепарат бактерий *Azotobacter* из выросшей колонии, увеличение\*1000, масляная иммерсия, фуксин Циля+тушь, 7 сут.

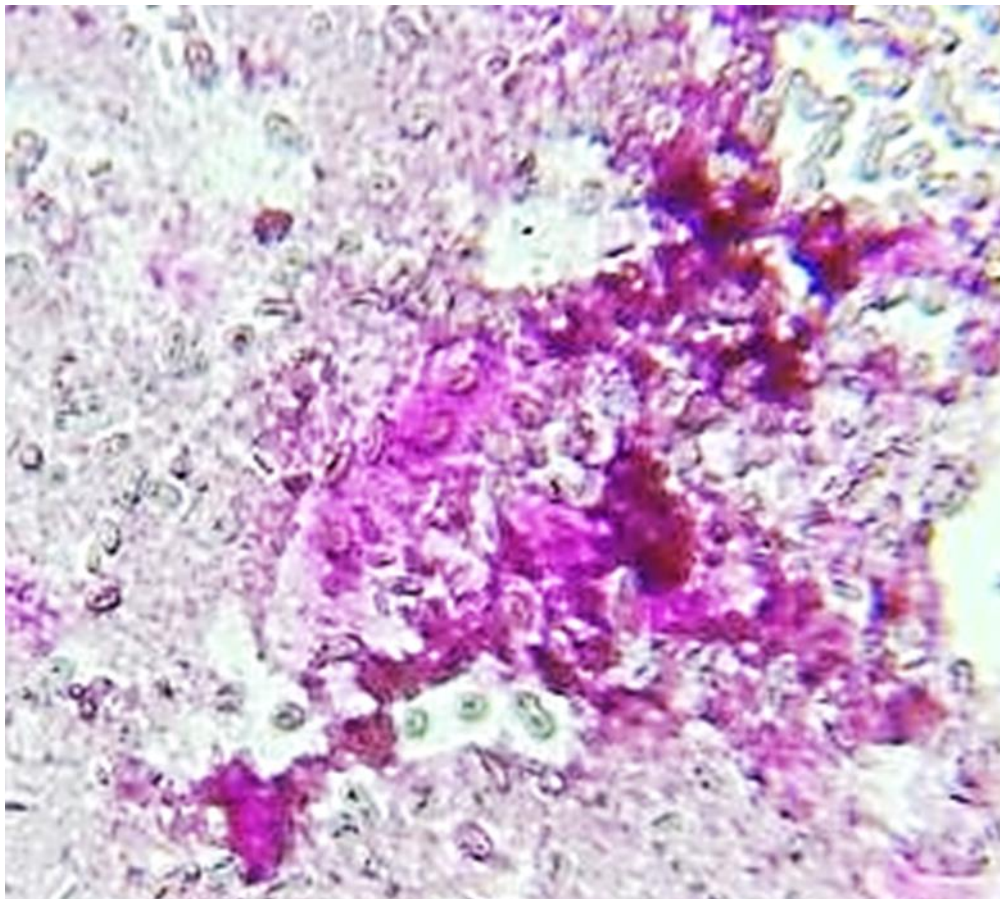
Хорошо заметен плеiotропизм и наличие разновозрастных клеток(бактерии имеют разную форму от кокков до палочек, некоторые особи делятся, некоторые образуют цисты, окрашенные в ярко-розовый цвет)

*Фотосъемку осуществляли при помощи фотокамеры CanonPowerShotA 640, установленной на микроскоп CarlZeissPrimoStar. \*1000, дополнительную обработку фотоснимков проводили в программах AxioVisionRel. 4.7 и AdobePhotoshopCS5*

*Увеличение 1000, масляная иммерсия Автор фото: Губин А.И., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории проблем биоинвазии защиты растений, ФГБНУ «Донецкий ботанический сад».*

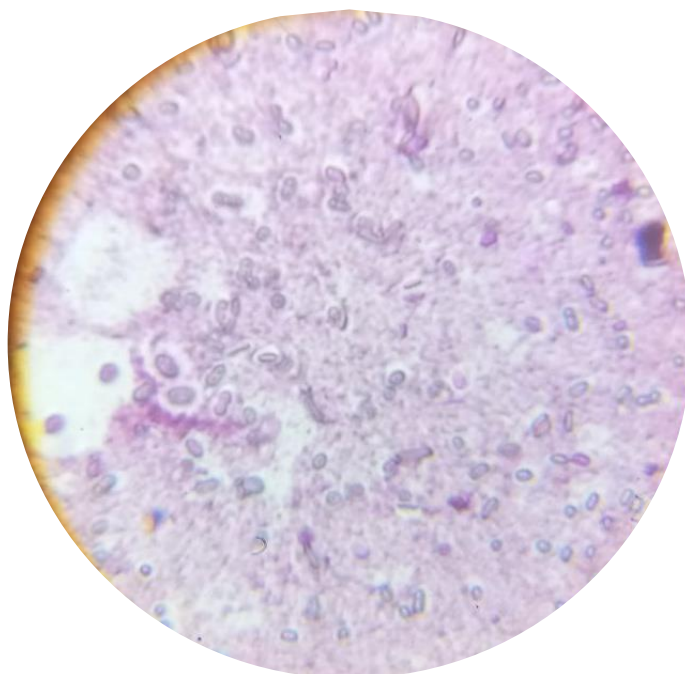


Микроскоп Microlab, \*1000, фотосъемку проводили с помощью камеры смартфона

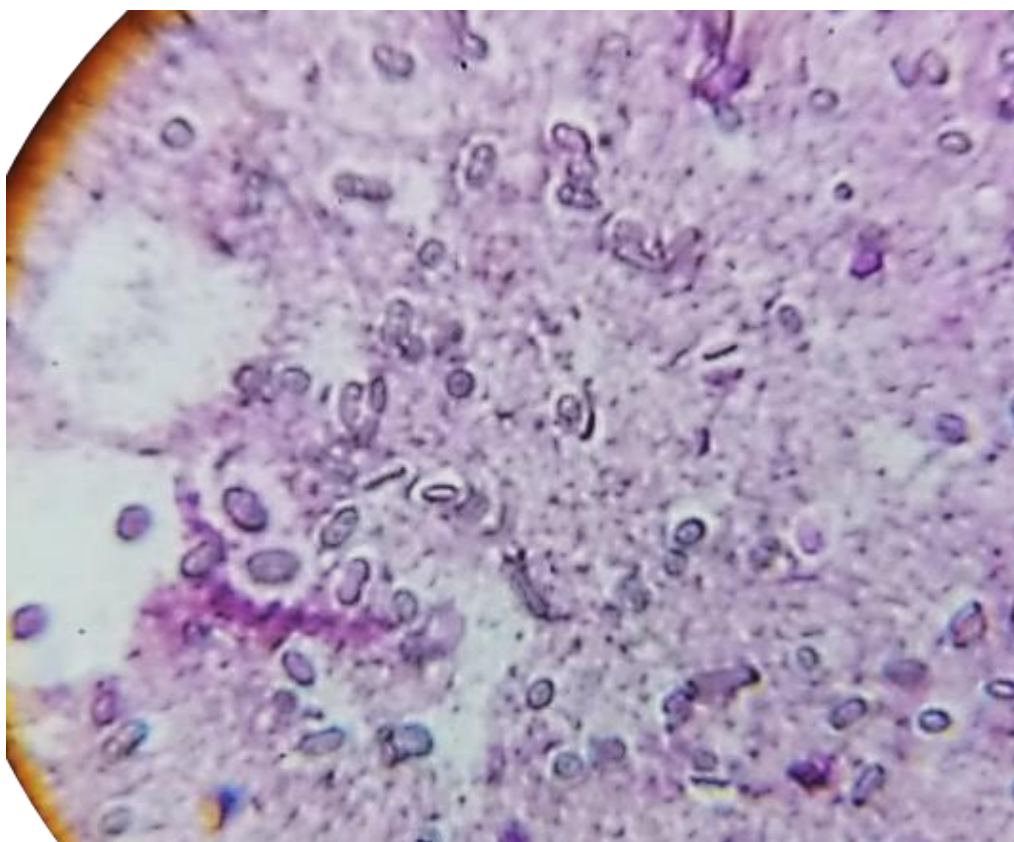


Дополнительную обработку и цифровое увеличение изображения проводили в Word

*Фото выполнены автором, 2025 г.*



Микропрепарат бактерий *Azotobacter* из выросшей колонии, увеличение\*1000, фуксин Циля+тушь, 7 сут.



*Микроскоп Microlab, \*400, фотосъемку проводили с помощью камеры смартфона  
Дополнительную обработку и цифровое увеличение изображения проводили в  
графическом редакторе Gimp  
Фото выполнены автором, 2025 г.*



Выращивание растений в парничках на ранних стадиях (вверху) и в горшках (внизу)

