

Муниципальное автономное образовательное учреждение «Средняя школа № 6 им. Васюковича С.В.» г. Пестово Новгородской области

Исследовательская работа на тему:

«Выделение и изучение микроорганизмов рода *Azotobacter* из почв различного назначения»

(Номинация «Прикладная клеточная биология, биотехнология, генетика и селекция»)

На региональный этап
конкурса юные исследователи
окружающей среды
ученицы 11 а класса
МАОУ «Средняя школа № 6
им. Васюковича С.В.»
Г. Пестово Новгородской области
Стрельченко Дарьи
Руководитель: Лебедева Н.Н.
Учитель биологии

г. Пестово 2025 г.

Содержание

Введение	3
1.Теоретическая часть	5
1.1 Обзор литературных источников.....	6
2.Практическая часть	
2.1.Отбор проб почвы.....	7
2.2.Подготовка почвенных проб к микробиологическому анализу.....	7
2.3.Выведение Azotobacter на среде Эшби	8
2.4.Микроскопическое исследование	10
3.Результаты	10
Заключение	12
Список используемой литературы	14

Введение

Азот является одним из важнейших элементов, необходимых для роста и развития растений. Несмотря на его обилие в атмосфере (в форме молекулярного азота N_2), растения не способны усваивать его напрямую. Ключевую роль в переводе атмосферного азота в доступные для растений формы — аммоний (NH_4^+) и нитраты (NO_3^-) — играют азотфиксирующие бактерии. Этот процесс, известный как биологическая азотфиксация, имеет огромное значение для плодородия почв и устойчивости экосистем.

В контексте современных вызовов, таких как необходимость обеспечения продовольственной безопасности и переход к устойчивому сельскому хозяйству, проблема снижения химической нагрузки на агроценозы становится особенно острой. Чрезмерное использование синтетических азотных удобрений приводит к ряду негативных последствий: загрязнению водоемов, эвтрофикации, деградации почв и увеличению выбросов парниковых газов. В связи этим все большее внимание уделяется разработке и внедрению экологически безопасных биотехнологий, среди которых использование азотфиксирующих бактерий занимает ведущее место.

Среди свободноживущих diaзотрофов особое место занимают бактерии рода *Azotobacter*. Их изучение и применение представляется высокоактуальным по нескольким причинам:

1. Экологический вклад: *Azotobacter* являются мощными деструкторами органических веществ и активными участниками круговорота азота в природе. Обогащая почву связанным азотом, они способствуют повышению ее плодородия естественным путем, снижая потребность в минеральных удобрениях.

2. Стимуляция роста растений: Помимо азотфиксации, многие штаммы *Azotobacter* продуцируют фитогормоны (например, ауксины и гиббереллины), витамины и другие биологически активные вещества, которые стимулируют прорастание семян, рост корневой системы и общее развитие растений.

3. Биоконтроль патогенов: Некоторые виды *Azotobacter* проявляют антагонистическую активность против фитопатогенных грибов и бактерий, синтезируя фунгицидные и бактерицидные соединения, что позволяет рассматривать их как потенциальный агент для биозащиты растений.

4. Биоремедиация: Способность *Azotobacter* накапливать в клетках полимеры (поли- β -гидроксibuтират) и формировать цисты делает их устойчивыми к стрессовым условиям, а также позволяет использовать их в процессах очистки загрязненных почв.

Таким образом, *Azotobacter* представляют собой не просто азотфиксаторов, а мультифункциональные микроорганизмы с большим прикладным потенциалом в "зеленом" земледелии.

Однако их численность и активность в почве могут резко снижаться под воздействием антропогенных факторов, таких как применение пестицидов, рекреационная нагрузка, загрязнение тяжелыми металлами и деградация земель. [2] Поэтому мониторинг состояния природных популяций *Azotobacter* и выделение устойчивых, активных штаммов является важной научно-практической задачей.

Среди свободноживущих азотфиксаторов особое место занимают бактерии рода *Azotobacter*. Это грамотрицательные аэробные микроорганизмы, обитающие в почвах по всему миру. Они не только обогащают почву связанным азотом, но и способны синтезировать фитогормоны и биологически активные вещества, стимулирующие рост растений. Кроме того, некоторые штаммы *Azotobacter* обладают способностью накапливать в клетках полимерные соединения, такие как поли- β -гидроксibuтират (ПГБ), что является адаптацией к неблагоприятным условиям.

Антропогенная нагрузка, такая как использование гербицидов и пестицидов в сельском хозяйстве, а также рекреационная деятельность, может существенно влиять на численность и активность почвенной микрофлоры, в том числе и азотфиксаторов. [11]

Цель работы: выделить и сравнить количество и активность свободноживущих азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter* из почв сельскохозяйственного и рекреационного назначения.

Задачи:

1. Изучить литературные источники по морфологии, физиологии и методам культивирования бактерий рода *Azotobacter*.
2. Отобрать пробы почвы с сельскохозяйственного поля и с берега озера Большое.
3. Провести посев проб на селективную питательную среду Эшби для выделения колоний *Azotobacter*.
4. Провести микроскопическое исследование выделенных культур для идентификации морфологических признаков.
5. Исследовать способность выделенных бактерий к накоплению полимерных соединений методом цитохимического окрашивания.

1. Теоретическая часть

Бактерии — это прокариотические организмы, фундаментальное отличие которых от эукариот заключается в отсутствии оформленного ядра и мембранных органелл (митохондрий, хлоропластов). Генетический материал представлен одной кольцевой молекулой ДНК, расположенной в цитоплазме в структуре, называемой нуклеоидом. Помимо хромосомы, бактерии часто содержат плазмиды — небольшие кольцевые молекулы ДНК, которые несут гены, отвечающие за устойчивость к антибиотикам, разрушение сложных веществ и другие признаки, повышающие выживаемость в неблагоприятных условиях.

Клетка окружена цитоплазматической мембраной, основу которой составляют фосфолипиды. Снаружи от мембраны расположена клеточная стенка, придающая клетке форму и защищающая ее от осмотического шока. По строению клеточной стенки бактерии делятся на грамположительные (имеют толстый слой пептидогликана) и грамотрицательные (имеют тонкий слой пептидогликана и внешнюю мембрану). Бактерии рода *Azotobacter* являются грамотрицательными.

Многие бактерии подвижны благодаря наличию жгутиков. Также на поверхности клетки могут находиться пили — нитевидные образования, участвующие в процессе конъюгации (передачи генетического материала между клетками).

Азотфиксация — это процесс восстановления молекулярного азота атмосферы (N_2) до аммония (NH_4^+), осуществляемый специализированными ферментами (нитрогеназами) у прокариот. Этот процесс является единственным биологическим путем пополнения запасов связанного азота в почве. [6]

Симбиотические азотфиксаторы (например, *Rhizobium*) живут в тесной ассоциации с бобовыми растениями. Свободноживущие азотфиксаторы, такие как *Azotobacter*, обитают в почве независимо от растений, но часто концентрируются в зоне корней (ризосфере), где используют корневые выделения как источник углерода и энергии.

Род *Azotobacter* объединяет свободноживущие, грамотрицательные, аэробные бактерии, способные фиксировать атмосферный азот. Типичный представитель — *Azotobacter chroococcum* — был впервые выделен М. Бейеринком в 1901 году. [1]

Эти бактерии предпочитают нейтральные или слабощелочные почвы (оптимальный pH 7.0–7.5), но могут встречаться и в экстремальных условиях. Они используют различные органические соединения (углеводы, спирты, органические кислоты) в качестве источника энергии. Энергозатраты

процесса фиксации азота высоки: для фиксации 10 мкг азота требуется около 1 г глюкозы.

Azotobacter являются важными участниками микробных сообществ почвы. Однако их численность и активность могут резко снижаться под воздействием неблагоприятных факторов: засоления, загрязнения тяжелыми металлами, применения агрохимикатов, дефицита влаги и органических веществ. [7]

1.1 Обзор литературы по теме исследования.

Биологическая фиксация атмосферного азота — один из ключевых процессов поддержания плодородия почв и устойчивости экосистем. Способностью к азотфиксации обладают только прокариотические организмы — бактерии и археи, которые играют незаменимую роль в глобальном круговороте азота (Шлегель, 2019; Нетрусов, Котова, 2021).

Среди свободноживущих азотфиксаторов особый интерес представляют бактерии рода *Azotobacter*, впервые выделенные и описанные М. Бейеринком в 1901 году (Бейеринк, 1901). Это грамотрицательные, аэробные, гетеротрофные микроорганизмы, способные фиксировать молекулярный азот в нейтральных и слабощелочных почвах (Смирнов, Киприанова, 2017). Их метаболическая активность напрямую зависит от наличия доступных источников углерода, таких как глюкоза, органические кислоты и спирты (Thompson, Skerman, 2019).

Важной физиологической особенностью *Azotobacter* является способность к синтезу поли-β-гидроксибутирата (ПГБ) — запасного полимера, который позволяет бактериям выживать в условиях стресса, включая дефицит питательных веществ и воздействие токсичных соединений (Garrity et al., 2020). Этот признак часто коррелирует с общей метаболической активностью штамма и может служить биоиндикатором его устойчивости.

В агроэкосистемах *Azotobacter* рассматриваются как перспективные агенты биологизации земледелия. Они не только обогащают почву доступным азотом, но и продуцируют фитогормоны, витамины и антимикробные вещества, стимулируя рост растений и подавляя развитие фитопатогенов (Тихонович, Проворов, 2020). Внесение органических удобрений, таких как навоз или компосты, значительно повышает численность и активность азотфиксаторов за счёт увеличения содержания органического вещества в почве (Егоров, 2019; Практикум по агрохимии..., 2019).

Однако антропогенная нагрузка — применение пестицидов, загрязнение тяжёлыми металлами, рекреационное уплотнение почвы — может приводить к угнетению азотфиксирующей микрофлоры (Зенова и др., 2020). Особенно чувствительны к таким воздействиям свободноживущие

формы, включая *Azotobacter*, что делает мониторинг их состояния важной задачей экологического контроля (Клевенская, Мягков, 2018).

Для выделения и культивирования *Azotobacter* в лабораторных условиях широко применяется селективная среда Эшби, которая обеспечивает оптимальное соотношение макро- и микроэлементов при минимальном содержании связанного азота, что стимулирует процесс диазототрофии (Методическое пособие..., 2022).

Таким образом, литературные данные подтверждают высокую экологическую и агрономическую значимость бактерий рода *Azotobacter*, а также необходимость изучения их состояния в почвах, подверженных различным видам антропогенного воздействия. Это определило цель и задачи настоящего исследования.

2. Практическая часть.

2.1. Отбор проб почвы

Для проведения сравнительного анализа микробиологического состояния почв были отобраны образцы с двух контрастных по характеру антропогенной нагрузки локаций в Крестецком районе.

1. Сельскохозяйственное поле. Данный участок был выбран в качестве объекта с интенсивной агрономической нагрузкой. Ключевой особенностью данного поля является регулярное внесение органических удобрений – отходов птицефабрики. Это практикуется с целью повышения плодородия почвы. Отбор проб проводился методом «конверта»: с пяти точек по углам и в центре условного квадрата 10x10 метров были взяты образцы почвы с глубины 10-15 см. Пробы с каждой точки были смешаны для формирования агрегатного образца массой 1 кг.

2. Берег озера Большое. Данная локация представляет собой зону рекреационного назначения с высокой степенью антропогенного воздействия. Отбор проб проводился аналогичным методом «конверта» на участке площадью 10x10 метров, непосредственно прилегающем к урезу воды. Также был сформирован агрегатный образец.

Все отобранные пробы были доставлены в кабинет биологии.

2.2. Подготовка почвенных проб к микробиологическому анализу

Подготовка проб проводилась в условиях кабинета биологии с соблюдением правил асептики для минимизации контаминации.

1. Предварительная обработка:

· Пробы почвы из каждого пакета были рассыпаны тонким слоем на чистые листы пергаментной бумаги.

- Почва оставлена для воздушной сушки на 48 часов в хорошо проветриваемом помещении при комнатной температуре, защищенном от прямых солнечных лучей. Это позволило остановить активный рост микроорганизмов и стабилизировать образцы.

2. Удаление механических примесей:

- После просушки из образцов вручную, с помощью пинцета, были удалены крупные посторонние включения: камни, остатки растительности (корни, трава), а также заметные глазу фрагменты мусора.

- Важное наблюдение: В образце с сельскохозяйственного поля визуально отмечалось наличие мелких органических частиц, предположительно – остатков птичьего помета, что подтверждает факт внесения отходов птицефабрики.

3. Просеивание:

- Для получения однородной фракции и удаления мелких камешков и комков, высушенная и очищенная почва была просеяна через стерильное сито с диаметром ячеек 2 мм.

- Просеянная, однородная почва использовалась для последующих этапов работы.

4. Приготовление почвенной пасты:

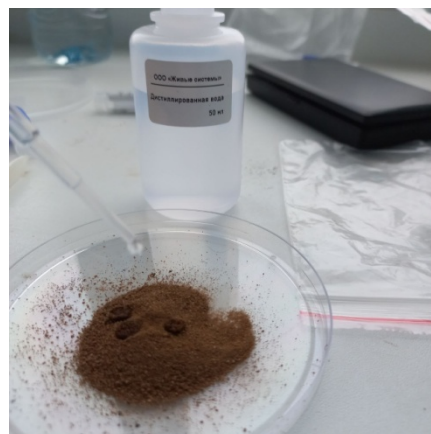
- Для посева на питательную среду необходимо было создать оптимальные условия для роста микроорганизмов.

Для этого:

- В стерильную чашку Петри была взвешена на электронных весах порция почвы массой 3 грамма.

- С помощью стерильной пипетки Пастера к навеске почвы по каплям добавлялась дистиллированная вода.

- Содержимое тщательно перемешивалось стерильной зубочисткой до образования однородной пастообразной консистенции. Важно было не переувлажнить пробу, чтобы паста не растекалась.



Полученная паста использовалась для непосредственного посева на питательную среду Эшби методом размещения почвенных комочков. Данная методика подготовки обеспечила стандартные условия для последующего сравнительного анализа микробиоты двух типов почв.

1. Сельскохозяйственное поле, занятое злаковыми культурами, с регулярным внесением минеральных удобрений.

2. Берег озера Большое — зона рекреационного назначения с высокой

антропогенной нагрузкой.

2.3. Выделение Azotobacter на среде Эшби

Для селективного выделения бактерий рода *Azotobacter* использовалась питательная среда Эшби. Посев проводился методом почвенных комочков, который позволяет сохранить естественные ассоциации микроорганизмов и обеспечить доступ питательных веществ к аутохтонной микрофлоре.

Приготовление среды включало несколько этапов:

1. Приготовление базового солевого раствора: растворяли неорганические соли (K_2SO_4 , K_2HPO_4 , $NaCl$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) в дистиллированной воде.

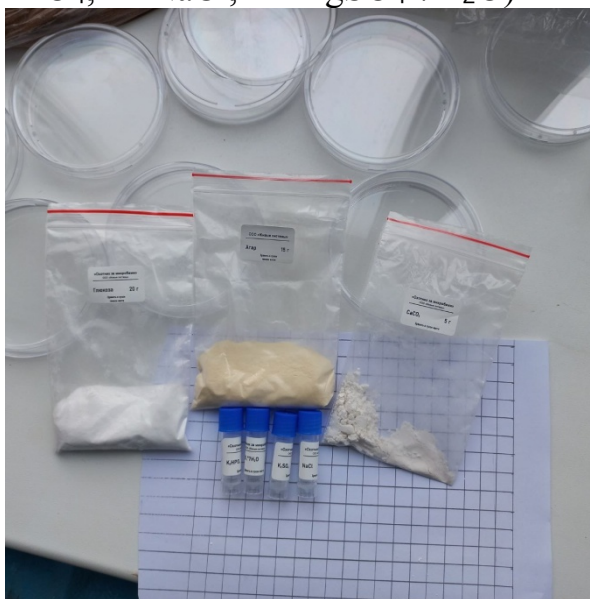
2. Приготовление полной среды: к базовому раствору добавляли $CaCO_3$ (для буферизации), агар (для затвердевания) и глюкозу (источник углерода). Смесь нагревали до полного растворения компонентов.

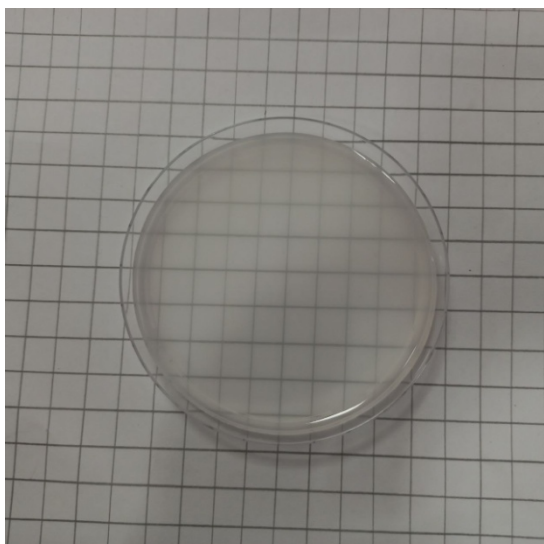
3. Разлив и застывание: расплавленную среду разливали в чашки Петри и оставляли для застывания.

После полной готовности питательной среды мы занялись посевом, для этого подготовили трафарет: на белый лист бумаги был нанесен контур чашки Петри, а внутри контура размечена сетка с 49 равномерно распределенными точками (7×7),

которые служили ориентирами для размещения почвенных комочков.

Из подготовленной почвенной пасты с помощью стерильной зубочистки отбирались небольшие порции почвы. Аккуратно сформированы комочки диаметром 3-4 мм. Для каждого образца было подготовлено по 40-50 комочков.





Чашка Петри с застывшей средой Эшби размещалась на подготовленном трафарете. Строго в соответствии с размеченными точками на поверхность агаризованной среды размещались почвенные комочки. Для каждого образца использовалось по 3 чашки Петри (параллельные повторности).

Комочки размещались таким образом, чтобы они не соприкасались друг с другом и со стенками чашки. Расстояние

между комочками составляло 1 см.

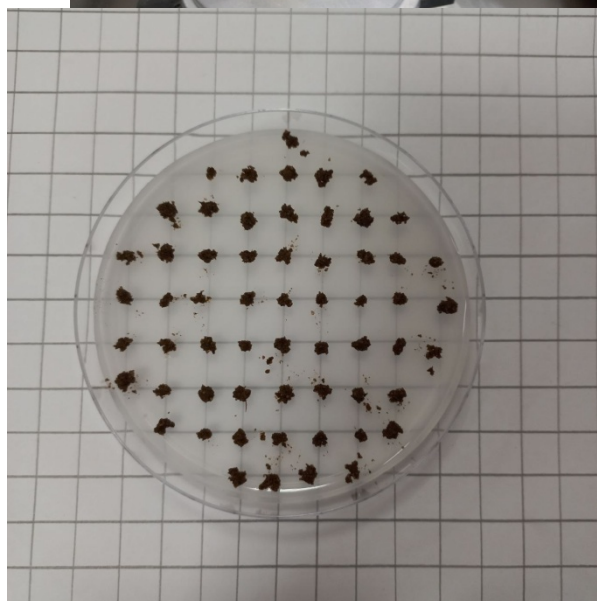
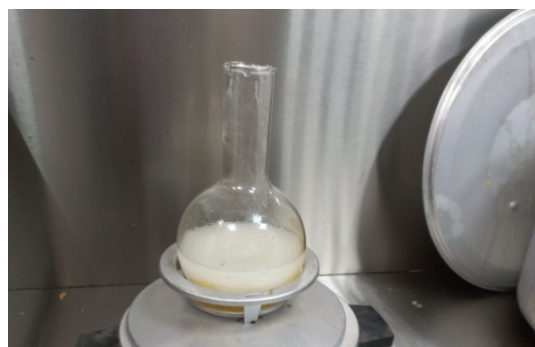
После посева чашки Петри закрывались крышками. Для создания влажной камеры чашки помещались под колпаки, изготовленные из обрезанных пластиковых бутылок. Инкубация проводилась при комнатной температуре (22-25°C) в течение 7-10 дней.

В качестве контроля использовалась чашка Петри со средой Эшби без внесения почвенных комочков. Отсутствие роста на контрольной чашке подтвердило стерильность питательной среды и условий проведения эксперимента.

2.4. Микроскопическое

исследование

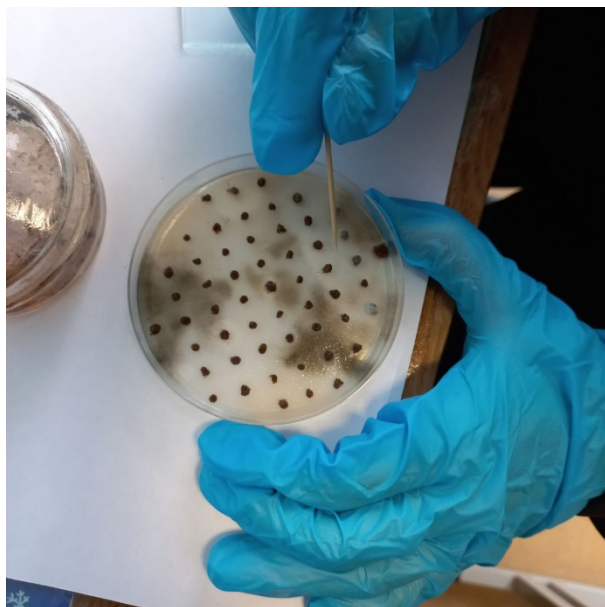
Через 7 дней после посева проводили микроскопию выросших колоний. Препараты готовили методом «раздавленной капли» и окрашивали фуксином Циля и тушью для создания негативного контраста. Микроскопию проводили с использованием иммерсионного объектива (увеличение $\times 1000$). Идентификацию *Azotobacter* проводили на основе морфологических признаков: крупные овальные или палочковидные клетки, расположенные одиночно, парами или скоплениями.



Способность бактерий накапливать поли-β-гидроксибутират исследовали с помощью цитохимического окрашивания Суданом черным В. Биомассу из колоний фиксировали на предметном стекле, окрашивали в течение 15 минут, затем промывали изопропанолом. О наличии полимеров судили по появлению интенсивного синего окрашивания клеток при микроскопии.

3. Результаты

Рост колоний на среде Эшби. На 3–4 день инкубации вокруг комочков почвы с обоих участков появились зоны обрастания. К 7-му дню



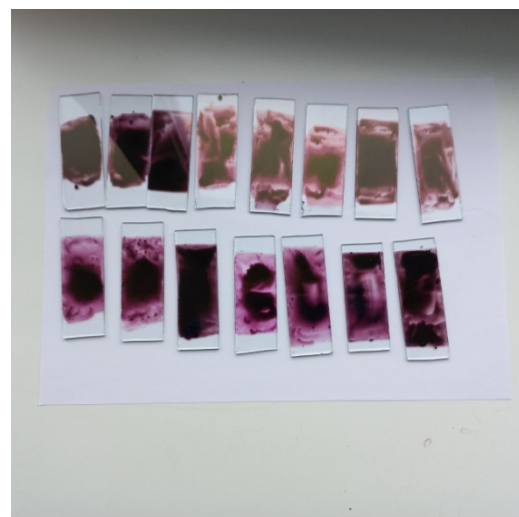
эксперимента колонии, выросшие из образца сельскохозяйственного поля, были более многочисленными и крупными. Они имели слизистую консистенцию и характерную

пигментацию, соответствующую описанию *Azotobacter chroococcum*

(бурый, почти черный пигмент). Колонии из пробы берега озера были менее многочисленными и мелкими.

Микроскопический анализ. При микроскопии препаратов, полученных из колоний сельхозполя, было визуализировано значительное количество крупных овальных клеток, соответствующих морфологии *Azotobacter*. Клетки располагались одиночно и скоплениями. В препаратах из проб берега озера количество подобных клеток было существенно ниже.

Выявление полимеров. Окрашивание Суданом черным В показало, что штаммы, выделенные из сельскохозяйственного поля, активно накапливали поли-β-гидроксибутират, о чем свидетельствовало интенсивное голубое окрашивание цитоплазмы. Это может указывать на их хорошую адаптацию и метаболическую активность. В образцах с берега озера реакция была слабее.



Полученные результаты свидетельствуют о том, что численность и активность свободноживущих азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter* в почве сельскохозяйственного поля выше, чем в почве рекреационной зоны.

Это можно объяснить следующими факторами:

1. Внесение удобрений: Несмотря на то что *Azotobacter* способны к самостоятельной фиксации азота, наличие в почве легкоусвояемых минеральных соединений может стимулировать их рост и метаболизм.

2. Антропогенная нагрузка: Берег озера Большое испытывает высокую рекреационную нагрузку (уплотнение почвы, механические повреждения), а также, вероятно, попадание гербицидов с adjacentного поля. Эти факторы создают стрессовые условия, угнетающие развитие азотфиксаторов.

3. Различие в органическом веществе: В агроценозе регулярно вносится органическое вещество (остатки урожая, возможное внесение органических удобрений), которое служит источником энергии для гетеротрофных бактерий, к которым относится *Azotobacter*.

Заключение

Проведенное исследование позволило достичь поставленной цели и решить все обозначенные задачи, связанные с выделением и сравнительным изучением микроорганизмов рода *Azotobacter* из почв различного функционального назначения.

В ходе работы была успешно освоена и применена методика выделения азотфиксирующих бактерий на селективной питательной среде Эшби. Сравнительный анализ почвенных проб выявил существенные различия в количестве и развитии колоний *Azotobacter*. Наибольшая численность и активность данных микроорганизмов была зафиксирована в образце, отобранном с сельскохозяйственного поля. Это проявлялось в более раннем появлении зон обрастания, большем количестве и размере колоний, а также в характерной для *Azotobacter chroococcum* слизистой консистенции и пигментации.

Ключевым фактором, объясняющим столь значительное превосходство агроценоза, является систематическое внесение в почву органических удобрений – отходов птицефабрики. Эти отходы, богатые азотсодержащими соединениями и органическим веществом, создают исключительно благоприятные условия для развития гетеротрофных бактерий, к которым относится *Azotobacter*. Органика служит для них readily available источником углерода и энергии, что стимулирует не только рост, но и метаболическую активность, включая процесс азотфиксации.

Микроскопический анализ подтвердил принадлежность выделенных из данного образца культур к роду *Azotobacter* по морфологическим

признакам: были идентифицированы крупные овальные клетки, расположенные одиночно и скоплениями.

Цитохимическое исследование с окрашиванием Суданом черным В продемонстрировало способность штаммов из сельскохозяйственной почвы к активному накоплению поли- β -гидроксибутирата. Этот признак не только является адаптацией к возможным колебаниям условий, но и косвенно свидетельствует о хорошем энергетическом статусе и высокой метаболической активности бактерий в данной среде.

В противоположность этому, проба, взятая с берега озера Большое, показала значительно более низкие количественные и качественные показатели развития *Azotobacter*. Это позволяет сделать вывод о негативном влиянии на почвенную микрофлору рекреационной нагрузки (уплотнение почвы, механическое воздействие) и, вероятно, косвенного воздействия агрохимикатов.

Основной вывод работы: Систематическое внесение органических удобрений (отходов птицефабрики) в почву сельскохозяйственного поля создает оптимальные трофические условия, которые стимулируют развитие высокоактивных популяций свободноживущих азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter*. В то же время, комплексная антропогенная нагрузка в рекреационной зоне подавляет развитие этих полезных микроорганизмов.

Практическая значимость работы заключается в следующем:

1. Подтверждена эффективность использования органических отходов птицеводства как средства повышения биологической активности и, как следствие, потенциального плодородия почв.

2. Выделенные из обогащенной почвы активные штаммы *Azotobacter* представляют особую ценность. Они адаптированы к местным условиям и могут быть использованы для дальнейших исследований с целью создания на их основе эффективного бактериального удобрения или био-препарата для сельского хозяйства региона.

3. Работа демонстрирует возможность и важность проведения мониторинговых исследований состояния почвенной микробиоты даже в условиях школьной лаборатории для оценки антропогенного воздействия на экосистемы.

Перспективы дальнейших исследований видятся в углубленном изучении выделенных штаммов *Azotobacter*: определении их азотфиксирующей активности, тестировании антагонистических свойств против фитопатогенов, а также в постановке полевого эксперимента по интродукции этих штаммов на другие типы почв для оценки их эффективности.

Список используемой литературы.

1. Бейеринк М.В. О фиксации свободного азота в почве // Избранные труды по микробиологии. - М.: Изд-во АН СССР, 1901. - С. 125-135.
2. Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. - М.: Издательство Московского университета, 2019. - 256 с.
3. Зенова Г.М., Степанов А.Л., Лихачева А.А. Почвенная микробиология. - М.: Издательство МГУ, 2020. - 320 с.
4. Клебенская И.Л., Мягков В.В. Методы выделения и изучения азотфиксирующих микроорганизмов // Микробиология почв. - 2018. - № 4. - С. 45-52.
5. Методическое пособие "Охотник за микробами: исследование бактерий" - М.: Биолaborатория, 2022. - 48 с.
6. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология. - М.: Академия, 2021. - 384 с.

7. Практикум по агрохимии и почвоведению / под ред. В.Г. Минеева. - М.: КолосС, 2019. - 280 с.
8. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Azotobacter*. - Киев: Наукова думка, 2017. - 168 с.
9. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Сельскохозяйственная микробиология. - СПб.: Издательство Лань, 2020. - 432 с.
10. Шлегель Г. Общая микробиология. - М.: Мир, 2019. - 567 с.
11. Официальный сайт Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии" [Электронный ресурс]. URL: <http://www.arriam.ru> (дата обращения: 15.05.2024).
12. Электронная база данных "Биология почв" [Электронный ресурс]. URL: <http://www.soilbiology.ru> (дата обращения: 18.05.2024).
13. Петров А.С., Волкова И.М. Руководство к практическим занятиям по почвоведению. - Новосибирск: Наука, 2022. - 198 с.
14. Крестьянников А.Ю. Анализ почвенных образцов в полевых условиях. - М.: Агропромиздат, 2021. - 144 с.