

Азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter* из различных почв и их влияние на рост и развитие фасоли обыкновенной

Трофимов А.А.

биология

8 класс, МБОУ «Гимназия № 117», город Ростов-на-Дону, Ростовская область

Научный руководитель: Бозаджиев В.Ю., МБОУ «Гимназия № 117», город Ростов-на-Дону, Ростовская область

Введение

Бактерии рода *Azotobacter* играют большую роль в жизни растений и повышения плодородия почвы, однако, в Ростовской области эта группа микроорганизмов не достаточно изучена. В этом и состоит основная **проблема** данного исследования.

Актуальность работы заключается в интересе к азотфиксирующим микроорганизмам, в частности к азотобактеру, который обусловлен необходимостью перехода от химизации сельского хозяйства к биогизации, что требует современных представлений о физиологическом состоянии, адаптационных возможностях и механизмах штаммов рода *Azotobacter*. Выделение новых почвенных штаммов позволит увеличить плодородие почвы и стимулировать рост растений. Также азотобактер применяют в медицине, пищевой промышленности. Выделение почвенных штаммов- азотфиксаторов очень важно в современном мире.

Цель исследования: выявить штаммы азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter* из различных почв Ростовской области и установить способность *Azotobacter* влиять на всхожесть и рост фасоли обыкновенной.

Задачи исследования:

- собрать образцы почв с различных участков;
- провести физико-химический анализ образцов почв;
- выделить из почв азотфиксирующие бактерии;
- провести микроскопическое исследование образцов;

-получить культуральную жидкость для обработки семян фасоли обыкновенной;

-оценить влияние обработки семян фасоли обыкновенной бактерией *Azotobacter*.

Объект исследования: бактерии рода *Azotobacter* —почвенные бактерии, фиксирующие свободный атмосферный азот.

Предмет исследования: методы повышения плодородности почв.

Гипотеза исследования: бактерия *Azotobacter*, выделенная из почвы обладают микробиологической активностью на рост и развитие фасоли обыкновенной.

Новизна исследования: данная работа выполнена в гимназии впервые. Отмечено влияние *Azotobacter* на рост и развитие фасоли обыкновенной, что ранее не отмечалось в литературе.

Значение результатов исследования. Эта работа может способствовать достижению второй Цели устойчивого развития «Ликвидация голода, обеспечение продовольственной безопасности и улучшение питания и содействие устойчивому развитию сельского хозяйства», разработанных в 2015 году Генеральной ассамблеей ООН в качестве «плана достижения лучшего и более устойчивого будущего для всех».

Обзор литературы.

Азот является составляющей частью ДНК, белков, АТФ и других важнейших органических молекул [1]. Он является макроэлементом, его содержание в клетке оценивается как 1,5-3,0% сухой массы [2]. Основным источником азота для биосферы – атмосфера (азот составляет примерно 78% воздуха по объему), где он находится в виде молекул N_2 , которая из-за наличия трех ковалентных связей является инертной [3], поэтому живые организмы в основном не способны усваивать молекулярный азот [4]. Так, растения могут усваивать лишь ионы аммония и нитраты, а животные получают азот только из белков других организмов. Таким образом, наличие растворимых форм азота в почве является важным лимитирующим фактором для экосистемы. Людям необходимо по-

лучать азот с пищей, то есть для полноценного питания обязательно содержание достаточного количества азота в пищевой продукции, а значит, его растворимые формы должны в достаточном количестве содержаться в почвах, используемых для земледелия [5].

Бактерии рода *Azotobacter* относятся к свободноживущим азотфиксаторам почвы (ризобактериям) и способны, как и клубеньковые бактерии растений (ризобии), с помощью нитрогеназного комплекса фиксировать молекулярный азот воздуха, превращая его в ион аммония. Бактерии рода *Azotobacter* населяют экторизосферу (зона почвы с наружной стороны корня) и ризоплану (поверхность корневой системы) различных видов растений, используя экссудаты корневой системы для питания.

Известно, что бактерии рода *Azotobacter* образуют ассоциации с пектинолитическими и целлюлозоразрушающими бактериями рода *Bacillus*, потребляя продукты разложения полимеров бациллами, снабжая их фиксированным азотом, что приводит к ускорению усвоения полимеров и стимуляции азотфиксации. В связи с этим при изучении способности *A. chroococcum* непосредственно воздействовать на состояние растений более объективные данные можно получить в условиях эксперимента при культивировании растений на питательном растворе или торфе, поскольку таким образом можно вычленить взаимодействие в системе «растение – *A. chroococcum*» в чистом виде, т. е. без участия других видов почвенных бактерий.

В связи с этим нами была оценена способность *A. chroococcum*, выделенного из почвы сельскохозяйственных угодий Ростовской области (Россия), влиять на всхожесть семян и состояние проростков фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris L.*).

Исследование проводилось на примере бактерий рода *Azotobacter*, который был выбран из-за своей распространенности, изученности и простоты в культивировании. Это род грамотрицательных бактерий, обитающих преимущественно в слабокислых, нейтральных и слабощелочных почвах (рост и азотфиксация возможны в диапазоне рН от 4,8 до 8,5, оптимально – 7,0 – 7,5). Бак-

терии рода азотобактер являются свободноживущими азотофиксаторами, однако они способны жить в ассоциации с некоторыми растениями.

Материалы и методы

В качестве объектов для исследования выбрали образцы почв на различных участках Ростовской области, отличающихся по месторасположению и использованию. Были отобраны 20 образцов почв в следующих локациях:

1. 6 проб почв из трех районов Ростовской области (для удобства им были даны короткие названия, представленные в скобках) :

Район 1. г. Миллерово и его окрестности – 3 участка:

- ул. Кукушина – городская земля у дороги (Кукушина);
- ул. Маяковского, огород в городской черте (Маяковского);
- хутор Банникова-Алексеевский (пустырь на окраине поселка) (Пустырь).

Район 2. Окрестности села Большие Салы:

- садоводческое товарищество «Дружба» (огород в сельской местности) (Дружба);
- поле после уборки кукурузы у садов «Дружба» (Поле).

Район 3. Полисадник у здания гимназии № 117 в городе Ростове-на-Дону (урбанизированные земли) (Гимназия).

Методы исследования

Исследование почвы проводилось по типовым методикам, предлагаемым участникам научного волонтерского проекта «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов» [10].

Результаты и обсуждения

Согласно ГОСТ 17.4.4.02-84, почвы для исследования были отобраны методом конверта. Для исследования были выбраны 6 образцов почв, указанных выше. Таким образом, изучаемые образцы были отобраны с территорий, испытывающих разную антропогенную нагрузку и с разной историей.

1.Изучение свойств почвы

№ образца	Место взятия пробы	При скатывании	Тип почвы
-----------	--------------------	----------------	-----------

Образец № 1	с/т «Дружба», садовый участок	Образует шнур, который при сгибании не разламывается, кольцо дает несколько трещин	Тяжелый суглинок
Образец № 2	Поле после кукурузы	Образует шнур, который при сгибании не разламывается, кольцо дает несколько трещин	Тяжелый суглинок
Образец № 3	Пустырь на окраине поселка	Образует шнур, который при сгибании не разламывается, кольцо дает несколько трещин	Тяжелый суглинок
Образец № 4	Кукушина, городская земля у дороги	Образует шнур, который при сгибании не разламывается, кольцо дает несколько трещин	Тяжелый суглинок
Образец № 5	Маяковского, огород в городской черте	Образует шнур, который при сгибании не разламывается, кольцо дает несколько трещин	Тяжелый суглинок
Образец № 6	Гимназия № 117, полисадник, урбанизированная земля	Образует шнур, который при сгибании не разламывается, кольцо дает несколько трещин	Тяжелый суглинок

Опыт 2. Определение карбонатов в почве.

Во всех образцах почвы карбонаты не обнаружены.

Опыт 3. Определение кислотности почвы.

№ образца	Место взятия пробы	pH почвы
Образец № 1	с/т «Дружба», садовый участок	7,2
Образец № 2	Поле после кукурузы	7,8
Образец № 3	Пустырь на окраине поселка	7,8
Образец № 4	Кукушина, городская земля у дороги	7,8
Образец № 5	Маяковского, огород в городской черте	6,2
Образец № 6	Гимназия № 117, полисадник, урбанизированная земля	7,2

Мы выяснили, что земля в огороде в городе Миллерово оказалась слабокислой.

Опыт 4. Определение содержания нитратов.

№ образца	Место взятия пробы	содержание нитратов в почве
Образец № 1	с/т «Дружба», садовый участок	250
Образец № 2	Поле после кукурузы	100
Образец № 3	Пустырь на окраине поселка	100
Образец № 4	Кукушина, городская земля у дороги	100

Образец № 5	Маяковского, огород в городской черте	50
Образец № 6	Гимназия № 117, палисадник, урбанизированная земля	250

Высокое содержание нитратов в почве отмечено для огорода в садах «Дружба». Со слов владельца огорода, он использует минеральные удобрения.

Также высокое содержание нитратов отмечено в почве гимназии № 117, что можно объяснить общим комплексным загрязнением почвы в крупном городе.

Наименьшее содержание нитратов отмечено для огорода в городе Миллерово, где владельцы редко используют минеральные удобрения.

Опыт 5. Определение органического углерода в почве.

1 – с/т «Дружба» - 300 Мгр.

2 – поле после кукурузы возле с/т «Дружба» - 300 мГр

3 – х. Банниково-Александрово, пустырь на окраине – 300 мГр

4 – ул. Кукушина – 600 мГр

5 – ул. Маяковского – 300 мГр

6 – Гимназия № 117 – 1000 мГр

Установлено, что почвами с низким содержанием органического углерода (гумуса) являются почвы с огорода «Дружба», поля возле него, и огорода в городе Миллерово. Это можно объяснить полной уборкой растительных остатков осенью, что препятствует естественному восстановлению плодородия почвы.

Неожиданно низким оказалось содержание гумуса в почвах с пустыря х. Банниково-Алексеевский. Возможно это связано с частыми покосами травы на нем.

Высокое содержание органического углерода отмечено у дороги в городе Миллерово, что связано с нечастой уборкой там листового опада и декоративным покосом травы.

Высокое содержание органического углерода в почве с палисадника гимназии № 117 также связано с достаточным количеством мертвой растительной органики, которая повышает плодородие почвы.

Опыт 5. Определение «Дыхания почвы»

№	параметр	Контроль (детская питьевая вода «Спортик»)	1 (с/т «Дружба»)	2 (поле возле «Дружбы» Поле после сбора кукурузы)	3 (х.Б.-Алексеевский Пустырь на окраине поселка)	4 (Миллерово, Кукушина, городская земля, до рога)	5 (Миллерово Маяковского, Огород в городе)	6 (Гимназия № 117 палисадник)
1	Дыхание почвы	X	11,088 мгр/100 гр	11,323 мгр/100 гр	9,68 мгр/100 гр	8,213 мгр/100 гр	6,923 мгр/100 гр	6,16 мгр/100 гр

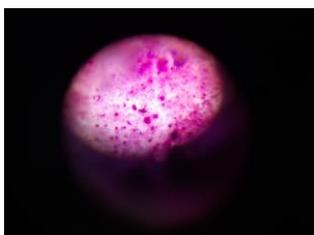
Как мы видим, наиболее «живой» оказалась почва с поля и из садового участка «Дружба», что говорит о высоком содержании микроорганизмов в этих почвах.

Почвы из района города Миллерово, менее богаты микроорганизмами, что связано с недостатками в агротехнике: внесение большого количества минеральных удобрений, осенняя уборка растительных остатков, что препятствует образованию гумуса и ведет к общему снижению её плодородия.

Наиболее «бедной» оказалась почва из палисадника Гимназии № 117, что можно объяснить общими свойствами урбанизированных почв больших городов.

2. Микробиологические исследования

Определили по атласу бактерий наиболее распространенный и хорошо изученный *Azotobacter chroococcum* (обитает в почвах всех типов, кроме кислых) образует колонии с бурым, почти чёрным пигментом. Результаты эксперимента сфотографировали (x800); зафиксировали данные наблюдений.



Результаты выявления способности бактерий к накоплению полимерных соединений

Номер образца	Место отбора образца	Способность к накоплению
1	с/т «Дружба», садовый участок	-
2	Поле после кукурузы	+
3	Пустырь на окраине поселка	+
4	Кукушина, городская земля у дороги	-
5	Маяковского, огород в городской черте	-
6	Гимназия № 117, палисадник, урбанизированная земля	-

Проведя исследование на поиск колоний Азотобактера, способных разрушать полимеры мы установили, что положительный результат показывают колонии 2- поле у садов «Дружба» и 3-пустырь в хуторе Банниково-Алексеевский.

3.Изучение влияния *A. chroococcum* на прорастание, рост и развитие растений

По плану нашего эксперимента с *Azotobacter chroococcum* Beijer был заложен опыт по прорастанию и развитию семян фасоли обыкновенной (сорт красный).

Для наблюдения за влиянием азотобактера на скорость прорастания и развития растений, мы взяли семена фасоли.

Предварительно до эксперимента сухие семена фасоли поместили в кусочки марли, смочили водой и оставили для набухания на одни сутки.

Набухшие семена фасоли посадили по 10 штук в три горшка:

- контроль: 10 набухших семян без обработки;
- вариант 1: 10 набухших семян обработаны культурой Азотобактер;
- вариант 2: 10 набухших семян обработаны культурой Азотобактер + в землю внесена культура Азотобактер с водой.

Для контроля несколько семян фасоли оставлены без обработки. Прочие обработаны полученным азотобактером.

Почва, смесь торфа, песка и керамзитовой крошки, была куплена в магазине для садоводов и предназначена для рассады. В каждый горшок помещено по 100 грамм почвы.

В процессе эксперимента земля регулярно увлажнялась путем полива 25 мЛ воды.

В процессе эксперимента проводилось по два наблюдения в одно и то же время (5.00 и 17.00 часов).

На 21 день после начала эксперимента, когда растения вступили в фазу 3 листа, проведено сравнение экспериментальных и контрольных образцов.

Результаты опыта

Вар.	показ	общее		корень		стебель		лист		растения	
		длина	вес	длина	вес	длина	вес	кол-во	вес	Кол. Прор.	% Прор
контр	сред	32,8857 1	1,44142 9	8,94285 7	0,34428 6	24,3142 9	0,63857 1	3	0,48571 4	7	70
	сум-ма	230,2	10,09	62,6	2,41	170,2	4,47	21	3,4		
1	сред	38,78	1,42	9,8	0,314	30,3	0,702	3,2	0,436	5	50
	сум-ма	193,9	7,1	49	1,57	151,5	3,51	16	2,18		
2	сред	40,7125	1,66125	11,2125	0,51333 3	30,0571 4	0,71375	3,12 5	0,48375	8	80
	сум-ма	325,7	13,29	89,7	3,08	210,4	5,71	25	3,87		

Результаты опыта показывают, что Вариант 1 показал наименьшую всхожесть семян (50%). Наибольшая всхожесть семян отмечена в Варианте 2 (80%).

Растения в Варианте 2 показали наивысшие показатели по общей длине растений и общей биомассе (урожайность), по длине и биомассе корней, по биомассе листьев.

Растения в Варианте 1 показали наивысшие результаты по показателям: средняя длина стебля и среднее количество листьев. Однако, растения в Варианте 2 по этим показателям продемонстрировали близкие, хотя и более низкие значения.

Общим выводом по данному опыту можно считать следующий:

1. Результаты опыта показали, что *Azotobacter chroococcum* Beijer. оказывает влияние и на бобовые растения, что уточняет ранее известные данные [11].
2. Результаты опыта (Вариант 1-всхожесть 50 %) подтвердили, что *Azotobacter chroococcum* Beijer может оказывать ингибирующее влияние на прорастание семян фасоли обыкновенной. Однако, однозначно это пока нельзя утверждать, так-так имеются противоречия с результатом опыта в Варианте 2 (всхожесть 80 %). Возможно, в Варианте 2 имеет место влияние *Azotobacter chroococcum* Beijer, который был внесен в почву с поливом.
3. Результаты опыта подтвердили, что *Azotobacter chroococcum* Beijer оказывает стимулирующее влияние на развитие проростков фасоли обыкновенной.
4. Результаты опыта показали, что внесение *Azotobacter chroococcum* Beijer в почву при посадке фасоли обыкновенной ведет к увеличению всхожести на 10 % и общей урожайности на 141,45 % по сравнению с Контролем.

С целью проверки достоверности результата опыта было проведено микробиологическое исследование на наличие микробов *Azotobacter chroococcum* Beijer. в чашки Петри было посеяно по 20 комочков почвы по стандартной методике «Охотники за микробами». На четвертый день было проведено изучение образцов почвы. Результаты опыта следующие:

Контроль - обрастаний *Azotobacter chroococcum* Beijer. – 0, комочки посеянные плесенью – 8;

1 вариант - обрастаний *Azotobacter chroococcum* Beijer. – 2 (10%), комочки посеянные плесенью – 2;

2 вариант - обрастаний *Azotobacter chroococcum* Beijer. – 20 (100%), комочки посеянные плесенью – 0;

Общим выводом по данному опыту можно считать следующий: для достижения повышения урожайности фасоли обыкновенной необходимо вносить культуру *Azotobacter chroococcum* Beijer непосредственно в почву.

Выводы

1. собранные образцы почвы относятся к тяжело суглинистым безкарбонатным;
2. земля в огороде в городе Миллерово оказалась слабокислой;
3. высокое содержание нитратов в почве отмечено для огорода в садах «Дружба» и палисадника Гимназии № 117;
4. что почвами с низким содержанием органического углерода (гумуса) являются почвы с огорода «Дружба», поля возле него, и огорода в городе Миллерово;
5. наиболее «живой» оказалась почва с поля и из садового участка «Дружба», что говорит о высоком содержании микроорганизмов в этих почвах;
6. все почвенные образцы содержали *Azotobacter chroococcum*;
7. колоний *Azotobacter chroococcum* № 2- поле у садов «Дружба» и № 3- пустырь в хуторе Банниково-Алексеевский показали способность к накоплению полимерных соединений;
8. *Azotobacter chroococcum* Beijer. оказывает влияние и на бобовые растения, что уточняет ранее известные данные;
9. результаты опыта подтвердили, что *Azotobacter chroococcum* Beijer может оказывать ингибирующее влияние на прорастание семян фасоли обыкновенной. Однако, однозначно это пока нельзя утверждать, так как имеются противоречия с результатом опыта в Варианте 2 (всхо-

жесть 80 %). Возможно, в Варианте 2 имеет место влияние *Azotobacter chroococcum* Beijer, который был внесен в почву с поливом;

10. результаты опыта подтвердили, что *Azotobacter chroococcum* Beijer оказывает стимулирующее влияние на развитие проростков фасоли обыкновенной;

11. результаты опыта показали, что внесение *Azotobacter chroococcum* Beijer в почву при посадке фасоли обыкновенной ведет к увеличению всхожести на 10 % и общей урожайности на 141,45 % по сравнению с Контролем.

Гипотеза исследования подтверждена.

Список литературы

1. Чернова Н. М. , Былова А. М. Общая экология. : Дрофа, 2004. – 416 с.
2. Биология. 10-11 классы: учеб. для общеобразоват. организаций: углубл. уровень: в 2. ч., ч. 1/ [П. М. Бородин, Л. В. Высоцкая, Г. М. Дымшиц и др.] под ред. В. К. Шумного и Г. М. Дымшица. – М. : Просвещение, 2014. – 303 с.
3. Биология: в 3-х т. Т. 1.: Пер. с англ./ [Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор] под ред. Р. Сопера. – М.: Мир, 1993. – 368 с., ил.
4. Азотистые удобрения [Электронный ресурс]: Википедия. Свободная энциклопедия. – URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Азотистые_удобрения (дата обращения: 10.01.2021).
5. Бактериальные удобрения [Электронный ресурс]: Википедия. Свободная энциклопедия. – URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Бактериальные_удобрения (дата обращения: 10.01.2021).
6. Виноградский С.Н. Об усвоении свободного азота атмосферы микробами // Архив биологических наук. 1895. Т. 3. Вып. 4.

7. Красильников М.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения, Изд. АН СССР, М. 1958, 463 с.
8. Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв, М. ИКЦ, «Академкнига», 2002, 282 с.
9. Логинов О.Н. Бактерии *Pseudomonas* и *Azotobacter* как объекты сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Наука, 2005, - 166 с.
10. Методические рекомендации и инструкции по применению набора «Охотник за микробами»
11. Ерофеева Е. А., Речкин А. И., Савинов А. Б. Всхожесть семян и состояние проростков пшеницы *Triticum aestivum* в условиях воздействия на них суспензии клеток *Azotobacter chroococcum* // Принципы экологии. 2019. Т. 8. № 2. С. 4–11.