

Азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter* из различных почв и их влияние на рост и пшеницы мягкой

Миронов А.В.

9 класс, МБОУ «Гимназия № 117», Ростов-на-Дону

Научный руководитель: Бозаджиев В.Ю., учитель биологии, МБОУ «Гимназия № 117», Ростов-на-Дону

Введение

Повышение урожайности сельскохозяйственных культур в значительной степени зависит от обеспечения их элементами минерального питания, и в первую очередь азотными соединениями. Источником экологически чистого биологического азота в почве являются микроорганизмы, которые способны фиксировать молекулярный азот атмосферы [1].

Использование в практике земледелия биологических препаратов, созданных на основе азотфиксирующих микроорганизмов, является одним их технологических приемов повышения урожайности культурных растений [2].

Почвенные микроорганизмы, принадлежащие к роду *Azotobacter*, характеризуются рядом положительных эффектов, среди которых определяющим являются способность к фиксации молекулярного азота, синтез соединений гормональной природы, витаминов, антибиотических веществ [1]. Следовательно, исследования возможностей использования этой группы микроорганизмов в практике растениеводства и биологического земледелия являются перспективными.

Таким образом, 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 бактериям рода *Azotobacter*, 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 меди-

цине, пищевой промышленности. Выделение почвенных штаммов - азотфиксаторов очень важно в современном мире.

Цель исследования: выявить штаммы азотофиксирующих бактерий рода *Azotobacter* из различных почв Ростовской области и установить способность *Azotobacter* влиять на всхожесть и развитие пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.).

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 пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.);
- оценить влияние обработки семян пшеницы мягкой 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 и стимулируют рост и развитие пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.).

Новизна исследования: анализ штаммов азотофиксирующих бактерий рода *Azotobacter* из различных почв Ростовской области на предмет их влияния на рост и развитие пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) проводится впервые. Впервые предложен дешевый, экономичный и экологический безопасный способ внесения культуры *Azotobacter chroococcum* в почву.

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».

Наша работа является частью большого проекта, запущенного ИХБФМ СО РАН в рамках изучения азотофиксирующих бактерий Российской Федерации. Провести серьезные микробиологические исследования в рамках школьного проекта не представляется возможным, поэтому оценка собранных образцов почвы Ростовской области будет произведена с использованием научных методов в лабораторию ИХБФМ СО РАН для дальнейшего изучения.

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.

Экссудаты из корней растений - это жидкости, выделяемые через корни растений. Эти выделения влияют на ризосферу вокруг корней, подавляя вредные микробы и способствуя росту собственных и родственных растений. Корневая система растений может вырасти сложной из-за разнообразия видов и микроорганизмов, существующих в обычной почве.

В обмен растение получает азот в виде доступных для усвоения соединений, улучшается фосфорное питание растений благодаря растворению труднодоступных почвенных фосфатов в процессе жизнедеятельности ризобактерий, фитогормоны, вырабатываемые ризобактериями, стимулируют рост растений, бактерии рода *Azotobacter* подавляют развитие фитопатогенных грибов и бактерий.

Способность разных штаммов *Azotobacter chroococcum* Beijer. влиять на прорастание семян и развитие проростков различных видов растений изучена недостаточно. Хотя в настоящее время этому вопросу уделяется значительное внимание в связи с поиском эффективных штаммов этого вида с целью использования их для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. Имеются сведения о том, что некоторые штаммы *A. chroococcum* способны вступать в симбиотические отношения с пшеницей мягкой (*Triticum aestivum* L.).

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 рост и развитие пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.).

Материалы исследования.

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

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.

В настоящем исследовании образцы почвы и колоний азотобактера использовались методы, предлагаемые в методичке «Охотники за микробами», разработанной сотрудниками Фонда «Образование», ООО «Живые системы» и сотрудниками Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и Новосибирского государственного университета [3].

Результаты и обсуждения

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

Начальным этапом исследования явился анализ физико-химический почвенных образцов. Их результат представлен в таблице 1.

№ образца	Место взятия пробы	Тип почвы	pH почвы	содержание нитратов в почве	Дыхание почвы	способности бактерий к накоплению полимерных соединений
Образец № 1	с/т «Дружба», садовый участок	Тяжелый суглинок	7,2	250	11,088 мгр/100	-

					гр	
Образец № 2	Поле после кукурузы	Тяжелый суглинок	7,8	100	11,323 мгр/100 гр	+
Образец № 3	Пустырь на окраине поселка	Тяжелый суглинок	7,8	100	9,68 мгр/100 гр	+
Образец № 4	ул. Кукушина, городская земля у дороги	Тяжелый суглинок	7,8	100	8,213 мгр/100 гр	-
Образец № 5	ул. Маяковского, огород в городской черте	Тяжелый суглинок	6,2	50	6,923 мгр/100 гр	-
Образец № 6	Гимназия № 117, палисадник, урбанизированная земля	Тяжелый суглинок	7,2	250	6,16 мгр/100 гр	-

Результат опыта.

Тип почвы во всех образцах –тяжелый суглинок.

Во всех образцах почвы карбонаты не обнаружены.

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

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 полисадника гимназии № 117 также связано с достаточным количеством мертвой растительной органики, которая повышает плодородие почвы.

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.

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.

2.Микробиологическое исследование почвы

Культивирование азотфиксирующих бактерий проводили традиционным методом обростания комочков на среде Эшби.

Приготовление вспомогательного раствора

В мерную колбу на 1л налили дистиллированной воды 400мл, высыпали в колбу с водой соли NaCl, K₂SO₄, MgSO₄*7H₂O и K₂HPO₄ и перемешали до полного отсутствия осадка на дне колбы. Довели объём раствора до отметки 1л.

Приготовление среды Эшби.

На весах подготовили навески: CaCO₃-1г, Агара-3г, глюкозы-4г. В химический стакан налили 200мл вспомогательного раствора, перенесли туда все навески. Смесь перемешали до состояния однородной взвеси. Смесь вскипятили на плите, охладили до 50°C и заполнили ею чашки Петри.

Увлажнённую почву с помощью одноразовых зубочисток комочками диаметром 3-4 мм по 50 комочков перенесли в каждую чашку с питательной средой. Работу проводили возле горящих спиртовок. Чашки Петри накрыли крышками и убрали в шкаф при комнатной температуре.

Провели наблюдение за ростом колоний на 3, 7 и 10 день после посева.

Микроскопическое исследование бактерий проводили с окрашиванием фуксином Циля и тушью, при увеличении x400 с водной иммерсией.

Протёрли предметные стёкла спиртовой салфеткой для удаления загрязнений и жирового слоя. Прокалили микробиологические петли над спиртовкой, нанесли на стёкла небольшое количество биомассы, с помощью пипетки Пастера добавили по капельке фуксина Циля и туши, перемешали красители и биомассу до равномерного тонкого слоя грязно - розового цвета. Получившийся препарат высушили на воздухе. На препарат нанесли каплю воды и изучили с помощью микроскопа при увеличении x400.

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. Клетки бактерий рода *Azotobacter* относительно крупные (1–2 мкм в диаметре) и, имеют овальную форму. На микроскопических препаратах клетки располагаются одиночно, парами, неправильными скоплениями. Результаты эксперимента сфотографировали (x800); зафиксировали данные наблюдений.

Исследование способности бактерий к накоплению полимерных соединений проводили с окрашиванием суданом чёрным.

На предметных стёклах маркером нарисовали круги, перевернули стёкла, с помощью пипетки Пастера нанесли в центр каждого круга по капле дистиллированной воды, микробиологической петлёй перенесли небольшое количество биомассы с 4 колоний каждого образца почвы, разболтали колонии в воде. Капли подсушили на воздухе до полного исчезновения влаги, зафиксировали препарат с помощью пламени спиртовки. После остывания стекла на каждое пятно нанесли каплю судана чёрного и оставили на 15 минут при комнатной температуре. После высыхания промыли пятна изопропанолом. Проанализировали интенсивность окраски пятен, если после промывки стекла бактерии окрасились в голубой цвет, значит они способны активно накапливать полимеров в своих клетках.

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

Бактерии рода *Azotobacter* населяют экторизосферу (зона почвы с наружной стороны корня) и ризоплану (поверхность корневой системы) различных видов небобовых растений [1], используя экссудаты корневой системы для питания. В обмен растение получает азот в виде доступных для усвоения соединений, улучшается фосфорное питание растений благодаря растворению труднодоступных почвенных фосфатов в процессе жизнедеятельности ризобактерий, фитогормоны, вырабатываемые ризобактериями, стимулируют рост растений, бактерии рода *Azotobacter* подавляют развитие фитопатогенных грибов и бактерий [2]. Способность разных штаммов *Azotobacter chroococcum* Beijer. влиять на прорастание семян и развитие проростков различных видов растений изучена недостаточно [2]. Хотя в настоящее время этому вопросу уделяется значительное внимание в связи с поиском эффективных штаммов этого вида с целью использования их для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур [2]. Имеются сведения о том, что некоторые штаммы *A. chroococcum* способны вступать в симбиотические отношения с пшеницей мягкой (*Triticum aestivum* L.) [2].

По плану нашего эксперимента с *Azotobacter chroococcum* Beijer был заложен опыт по его влиянию на прорастание семян пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.). Результаты исследования представлены в таблице 2.

вариант	Всхожесть семян	Ср.длина стеля	Ср.длина корня	Ср.масса проростка
Контроль	90%	8,7 см	12,3 см	0,16 гр
Семена обработаны бактериями рода <i>Azotobacter</i>	100%	9,9 см (+ 13,5%)	13,2 см (+ 7%)	0.23 гр. (+ 54,3%)

Следующим этапом исследования стало изучение влияния бактерий рода *Azotobacter* на развитие растений. Для этого мы использовали семена пшеницы.

Предварительно, до эксперимента, сухие семена пшеницы поместили в кусочек марли, смочили водой и оставили для набухания на два часа.

Набухшие семена пшеницы посадили по 10 штук в четыре 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;
- вариант 3: 10 набухших семян обработаны культурой *Азотобактер* + в землю внесена культура *Азотобактер* на полосках бумажной салфетки.

Для контроля несколько семян пшеницы 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 тоже время (5.00 и 17.00 часов).

На 14 день после начала эксперимента проведено сравнение экспериментальных и контрольных образцов.

Результаты опыта

Вар.	показ	общее		корень		стебель		растения	
		длина	вес	длина	вес	длина	вес	Кол. Прор.	% Прор
контр	сред	47,3	1,34	23,5	0,6	21,3	0,75	7	70
	сумма	467,2	13,09	229,6	5,7	205,2	7,47		
1	сред	49,5	1,42	27,3	0,7	24,7	0,87	5	50
	сумма	489,5	14,1	265,3	6,8	237,5	8,71		
2	сред	53,7	1,8	29,1	0,85	25,5	0,98	8	80
	сумма	538,5	18,29	281,5	7,9	249,4	9,87		

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.

Общим выводом по данному опыту можно считать следующий:

Результаты опыта показали, что *Azotobacter chroococcum* Beijer. оказывает влияние и на прорастание и развитие семян пшеницы мягкой, что уточняет ранее известные данные (Ерофеева, 2019).

Результаты опыта подтвердили, что *Azotobacter chroococcum* Beijer оказывает стимулирующее влияние на развитие проростков пшеницы мягкой, но угнетает прорастание семян пшеницы.

Результаты опыта показали, что внесение *Azotobacter chroococcum* Beijer в почву при посадке пшеницы мягкой ведет к увеличению всхожести на 10 % и увеличению зеленой массы на 137,5 % по сравнению с Контролем.

С целью проверки достоверности результата опыта было проведено микробиологическое исследование на наличие микробов *Azotobacter chroococcum* Beijer. в чашки Петри было высеяно по 20 комочков почвы по стандартной методике «Охотники за микробами».

На четвертый день было проведено изучение образцов почвы. Результаты опыта следующие:

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

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

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

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

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

Мы рекомендуем для этого использовать пропитанные культурой *Azotobacter chroococcum* и высушенные полоски из материал, из которого изготавливают бумажные салфетки. Это не дорогой материал из чистой целлюлозы, который разлагается без остатков в почве. Внесение в почву культуры *Azotobacter chroococcum* в такой форме значительно дешевле, чем внесение его в виде полива.

Выводы

Собранные образцы почвы относятся к тяжело суглинистым безкарбонатным;

земля в огороде в городе Миллерово оказалась слабокислой;

Высокое содержание нитратов в почве отмечено для огорода в садах «Дружба» и палисадника Гимназии № 117;

Почвами с низким содержанием органического углерода (гумуса) являются почвы с огорода «Дружба», поля возле него, и огорода в городе Миллерово;

Наиболее «живой» оказалась почва с поля и из садового участка «Дружба», что говорит о высоком содержании микроорганизмов в этих почвах;

Все почвенные образцы содержали *Azotobacter chroococcum*;

Колоний *Azotobacter chroococcum* № 2- поле у садов «Дружба» и № 3-пустырь в хуторе Банниково-Алексеевский показали способность к накоплению полимерных соединений;

Azotobacter chroococcum Beijer. Оказывает стимулирующее влияние на рост и развитие проростков пшеницы мягкой, но угнетает их прорастание, что уточняет ранее известные данные;

Результаты опыта подтвердили, что *Azotobacter chroococcum* Beijer оказывает стимулирующее влияние на развитие проростков пшеницы мягкой;

Результаты опыта показали, что внесение *Azotobacter chroococcum* Beijer в почву при посадке пшеницы мягкой ведет к увеличению всхожести на 10 % и общей урожайности на 137,5 % по сравнению с Контролем.

Бактерии *Azotobacter chroococcum* Beijer. стимулирует рост и развитие проростков пшеницы мягкой. Гипотеза исследования подтверждена.

Рекомендации

Мы рекомендуем для этого использовать пропитанные культурой *Azotobacter chroococcum* и высушенные полоски из материал, из которого изготавливают бумажные салфетки. Это не дорогой материал, который разлагается без остатков в почве. Внесение в почву культуры *Azotobacter chroococcum* в такой форме значительно дешевле, чем внесение в виде полива.

Литература

1. Карпушенко Н.А., Минаева О.М. Влияние ризосферных бактерий *Azotobacter* на рост и развитие пшеницы в полевых условиях // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии. В.1, 2004 год URL: http://teleconf.ru/index2.php?option=com_content&task=view&id=549&pop=1&page=0&Itemid=29 (дата обращения: 09.02.2024).
2. Кириченко Е. В., Коць С. Я. Использование *Azotobacter chroococcum* для создания комплексных биологических препаратов // *Biotechnol. acta.* 2011. №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/ispolzovanie-azotobacter-chroococcum-dlya-sozdaniya-kompleksnyh-biologicheskikh-preparatov> (дата обращения: 09.02.2024).
3. Методические рекомендации и инструкции по применению набора «Охотник за микробами» - ООО «Живые системы», 2022 – 34 с.