ГАУДО МО «МОЦДО «Лапландия»»

Мурманская область, г. Мурманск

Детский технопарк Кванториум

Исследовательская работа

**Выделение устойчивых штаммов бактерий рода *Azotobacter* из почв разных растительных сообществ Крайнего Севера**

Автор проекта:

Кравченко Алина Витальевна, 11 класс

Научный руководитель:

Глазунова Елена Джемсовна, педагог дополнительного образования ГАУДО МО МОЦДО «Лапландия»

2020

ОГЛАВЛЕНИЕ:

|  |  |
| --- | --- |
|  | **стр.** |
| ВВЕДЕНИЕ…………………………………………………………... | **3** |
| МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ……………….………………….... | **5** |
| РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ................ | **6** |
| ВЫВОДЫ................................................................................................. | **12** |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ........................................................................................ | **12** |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ................................ | **13** |
| ПРИЛОЖЕНИЕ....................................................................................... | **14** |

**ВВЕДЕНИЕ**

Бактерии рода *Azotobacter,* как и другие виды азотфиксирующих бактерий способны ассимилировать молекулярный азот из атмосферы, переводя его в усвояемую растениями форму. Азот – один из важнейших элементов в жизни растений. Он входит в состав белков и нуклеиновых кислот, необходимых для построения клеточных структур. *Azotobacter* также способен выделять в окружающую среду биологически активные вещества: витамины и стимуляторы роста, и даже подавлять действие метаболитов фитопатогенных грибов, выделяя фунгицид анизомицин [11].

В многочисленных исследованиях доказано, что при применении микробиологических препаратов, содержащих азотфиксирующие бактерии (азотобактерин), повышалась урожайность сельскохозяйственных культур [7]. Бактерии рода *Azotobacter* способны положительно влиять на рост и развитие корневой системы и побега растений [4].

Азотобактер также используют в качестве тест-организма на плодородие почвы и оптимальный водно-тепловой режим [8], а также рекомендуется использовать его в качестве индикатора на наличие токсинов в почве [10].

На территории России не все почвы благоприятны для выращивания сельскохозяйственных культур, большая часть страны расположена в холодной климатической зоне. В почвах содержится недостаточное для роста растений количество питательных элементов, поэтому человек использует удобрения, что не только дорого, но также может привести к истощению почв. Из-за этого использование биологических методов обогащения почв является актуальным.

*Актуальность*: азотобактер имеет определенные требования к условиям среды, и климатические условия Крайнего Севера не вполне соответствуют зоне оптимума этих микроорганизмов. Выявление в данных условиях азотобактера поможет выделить устойчивые к неблагоприятным условиям среды штаммы, которые возможно будет использовать при обогащении почв северных районов.

*Проблема:* внесение искусственных удобрений в бедные почвы приводит их к еще большему истощению, тогда как микроорганизмы, способные обогащать почву азотом, в условиях холода и повышенной влажности не оказываются достаточно эффективными.

*Объект исследования* – почвы и субстраты растительных Сообществ Крайнего Севера, *предмет исследования* — наличие азотфиксирующих бактерий в этих субстратах

*Цель:* найти и выделить из почв растительных сообществ Крайнего Севера устойчивые штаммы бактерий рода *Azotobacter*.

*Задачи:*

1. Провести анализ почв и субстратов из характерных растительных сообществ Мурманской области, сравнить результаты с оптимальными для бактерий рода азотобактер.

2. Провести выделение культур почвенных микроорганизмов, не нуждающихся в источнике соединений азота, и изучить морфологию их клеток и особенности строения колоний.

*Гипотеза:* среди выделенных из почв растительных сообществ Крайнего Севера азотфиксирующих микроорганизмов рода *Azotobacter* окажутся штаммы, устойчивые к неблагоприятным условиям среды.

*Основные этапы работы:*

1. Определение вероятных мест обитания азотобактера на основе анализа литературы.

2. Отбор проб почвы и исследование её характеристик: кислотности, механического состава, наличия карбонатов.

3. Посев на безазотистую питательную среду Эшби и выращивание бактериальных колоний.

4. Оценка характеристик колоний и отбор наиболее похожих по описанию на азотобактер.

5. Окрашивание бактерий по Граму и определение вероятных представителей рода *Azotobacter*.

6. Пересадка бактерий из отобранных колоний на свежую питательную среду методом истощающего штриха

7. Определение родовой принадлежности микроорганизмов методом ПЦР.

8. Отбор штаммов, устойчивых к неблагоприятным условиям среды.

*Методы исследования:*

Теоретические:

1. Абстрагирование – выбор конкретной информации из справочной литературы.

2. Анализ и синтез информации из литературных источников и полученных результатов.

Практические:

1. Прямое наблюдение за ростом колоний

2. Сравнение образцов почвы и морфологических характеристик колоний.

2. Описание внешнего вида колоний и окрашенных по Граму препаратов микроорганизмов.

4. Окрашивание препаратов бактерий по Граму.

5. Микроскопирование.

6. Микрофотосъёмка.

7. Агрохимический анализ почвы.

8. Визуализация данных в виде таблиц.

**МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ**

Отбор почвенных проб осуществлялся согласно ГОСТ 17.4.4.02-2017. На однородном рельефе выбранных растительных сообществ были заложены пробные площадки площадью 100 м2. На пробных площадках были отобраны точечные пробы методом конверта. Точечные пробы отбирались ножом, простерилизованным спиртом, послойно с глубины от 10 до 15 см и составляли по 200 г каждая, в итоге были получены объединенные пробы массой по 1 кг.

Исключение составил образец №1, который представлял собой моховые куртины массой около 100 г и был взят с выхода скальных пород, и образец №5, который состоял из неразложившегося торфа, точечные пробы для объединённой пробы которого также были взяты методом квадрата.

Образцы почвы и субстрата были помещены в стерильные герметичные контейнеры, доставлены в лабораторию и доводились до воздушно-сухого состояния.

Из образцов почвы отбиралась средняя лабораторная проба методом квартования [9], которая использовалась для проведения простейшего агрохимического анализа и посева на питательную среду.

Содержание карбонатов в почве определялось при помощи раствора соляной кислоты. Механический состав почвы определялся с помощью метода скатывания. Кислотность почвенных образцов определялась потенциометрическим измерением pH солевых вытяжек.

Посев почвенных образцов на питательную среду осуществлялся по общепринятой методике. Комочки почвы диаметром 3-4 мм размещались на поверхности питательной среды в узлах решётки 1×1 см.

В исследовании использовалась стандартная безазотистая питательная среда Эшби следующего состава:

1) Карбонат кальция CaCO3 – 1 г.

2) Агар микробиологический – 3 г.

3) Глюкоза – 4 г.

4) Вспомогательный раствор – 200 мл.

Состав вспомогательного раствора:

1) Хлорид натрия NaCl – 200 мг.

2) Сульфат калия K2SO4 – 100 мг.

3) Сульфат магния семиводный MgSO4\*7H2O – 200 мг.

4) Гидрофосфат калия K2HPO4 – 200 мг.

5) Вода дистиллированная – до 1 л.

Культивирование бактерий осуществлялось в термостате при температуре +20°C.

Готовились фиксированные препараты микроорганизмов и окрашивались по Граму красителями генциановым фиолетовым и фуксином по общепринятой методике.

Микроскопирование препаратов и микрофотосъёмка осуществлялись на микроскопе Leica при увеличении ×1000 с использованием иммерсионного масла.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

*Среда обитания Azotobacter:*

Азотобактер – свободноживущая грамотрицательная бактерия, обитающая в почве, которая, однако не является единственной азотфиксирующей бактерией. Есть и другие азотфиксаторы, например, бактерии рода *Rhisobium*, являющиеся симбионтами и обитающие в ризосфере. Также способны фиксировать атмосферный азот некоторые дрожжи, актиномицеты, прототрофы и животные фотогетеротрофы. Азотобактер можно обнаружить в сложном микробоценозе лишайников, на листьях рдеста, стрелолиста и др. водных растений, выделить из мицелия эктомикоризных грибов [11].

*Требования к условиям среды:*

Бактерии рода *Azotobacter* для роста и развития требуют определенных условий среды (влажность, температура, кислотность почвы, наличие в ней микроэлементов). В почвах при pH меньше 5,8 (кислая среда) азотобактер отсутствует, либо не способен ассимилировать атмосферный азот. Оптимальной кислотностью для размножения и усваивания азота считается 6,1–7,1 pH, а для развития в кислотной среде он требует легкоусвояемых азотистых соединений [5].

Азотобактер – аэробный микроаэрофильный организм, хорошо развивается в условиях аэрации, но при высоких концентрациях кислорода существенно понижается его способность к размножению и азотфиксации. Мезофил, то есть оптимальная температура для жизнедеятельности бактерий этого рода составляет 25-30°C [6].

Микроорганизмы рода *Azotobacter* хорошо развиваются в почве, обеспеченной запасами органических веществ и доступными соединениями фосфора. Азотобактер также чувствителен к наличию соединений кальция и молибдена [11]. Представители рода чувствительны к недостатку влаги. Азотобактер является наиболее влаголюбивым микроорганизмом, его оптимальные условия увлажнения субстрата находятся в пределах 40-80 % полной полевой влагоемкости. Однако при постоянном переливе почв бактерии погибают [10].

Исходя из вышесказанного, нами было решено попытаться выделить штаммы бактерий рода *Azotobacter* из почв типичных растительных сообществ Крайнего Севера, в том числе верховых и низовых болот, приморского луга, рудеральных городских сообществ.

*Географическое описание местности и почв:*

Отбор почв производился в сентябре 2020 г в городе Мурманске и его ближайших окрестностях.

Для территории Мурманской области характерны четвертичные отложения: морские; пески, галечники, суглинки, глины. На территории преобладают подзолы пропитанно-иллювиально-гумусовые маломощные (лесотундровые), есть торфяно-болотные почвы со сфагновым торфом. Подземные воды на территории исследования имеют общую минерализацию 0,15 г/л, глубина залегания подземных вод — 27,6 м, в воде содержатся ионы кальция. Среднемесячное количество осадков в сентябре: 58 мм. Средняя температура воздуха: 5°C [2].

На основе требований *Azotobacter* к среде обитания были выбраны места, по некоторым характеристикам не соответствующие оптимальным условиям среды. Места отбора почв и их основные характеристики представлены в таблице 1.

Таблица 1

Описание мест взятия образцов почв и их характеристика

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Номер образца | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. |
| Биоценоз | Редкий березняк, зелёные мхи на выходах скальных пород | Густой ивняк с ярусом полевого хвоща. | Густой ивняк с ярусом крапивы | Низовое болото | Верховое болото | Приморский луг |
| Местоположение | Западный берег Семеновского озера | Западный берег Семеновского озера | Западный берег Семеновского озера | Южный берег Семеновского озера | Левый берег реки Грязной | Эстуарий реки Грязной |
| Карбонаты | - | - | - | - | - | - |
| Механический состав почвы | Мох с камня, почва отсутствует | Средний суглинок | Легкий суглинок | Супесь | Торф, почва отсутствует | Тяжелый суглинок |
| Влажность | Умеренная | Умеренная | Умеренная | Избыточная | Избыточная | Избыточная |
| Кислотность | pH=6.0 | pH=6.0 | pH=5.9 | pH=6.3 | pH=3.8 | pH=4.37 |
| Температура воздуха на момент взятия образца | +11° | +11° | +11° | +9° | +5° | +4° |

Как видно из представленной таблицы, для образцов почвы характерна умеренная или избыточная увлажнённость и слабокислая (менее 6 единиц pH) кислая (менее 5 единиц pH) или сильнокислая (менее 4 единиц pH) реакция среды. Механический состав почв также варьирует от супеси до тяжёлого суглинка.

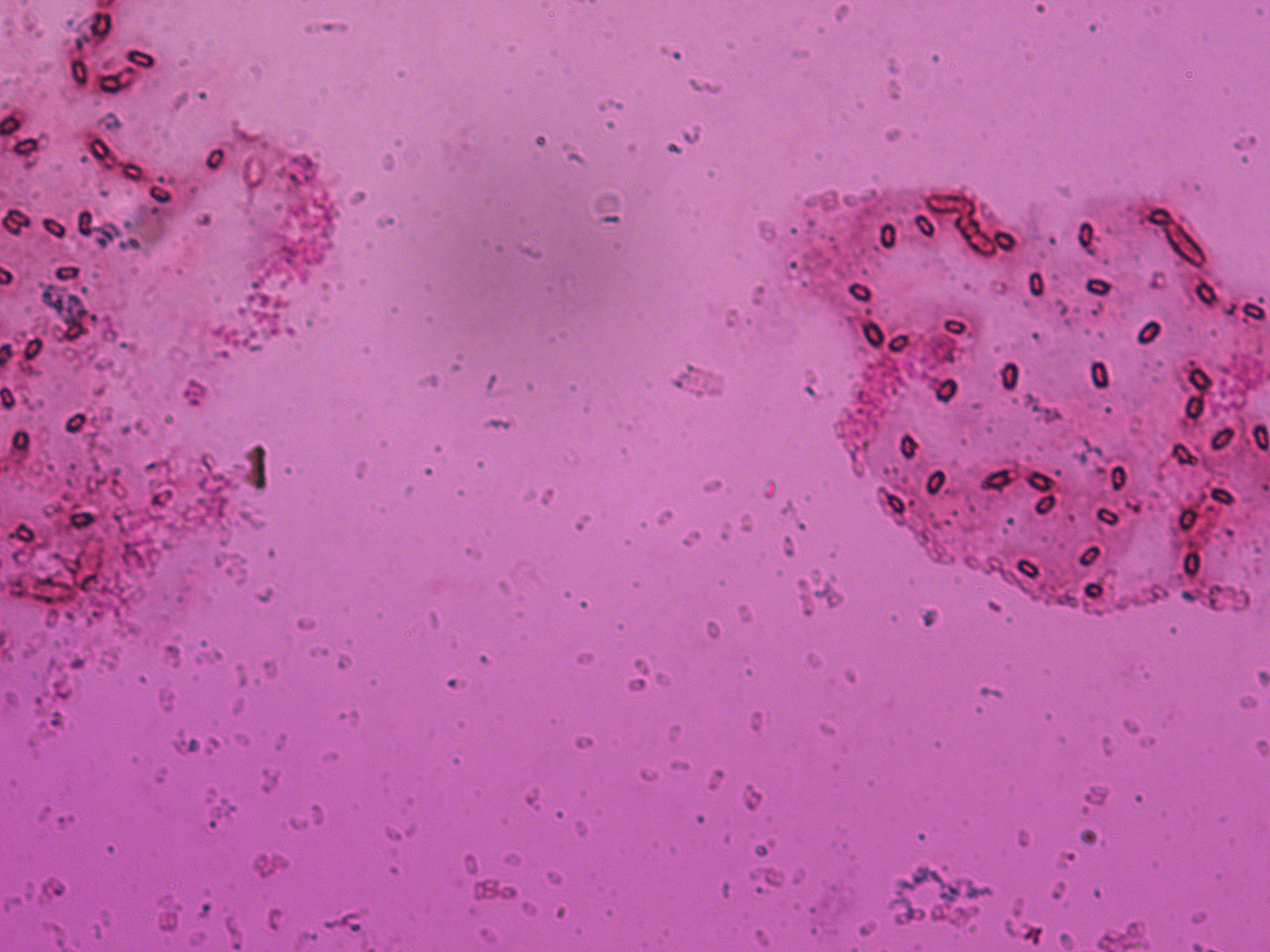
Таким образом практически все образцы лежат вне оптимальных значений pH для бактерий рода азотобактер. В трёх образцах, возможно, недостаточное для данных микроорганизмов содержание влаги. Интерес представляет также почва приморского луга, подвергаемая периодическим заливаниям морской водой, вследствие чего содержащая избыточное количество солей.

*Культивирование почвенных микроорганизмов на среде Эшби:*

Через 6 дней после посева на питательную среду чашки Петри были исследованы. Вокруг комочков грунта выросли молочно-белые колонии. Все образцы густо поросли мицелием, прозрачная среда приобрела песочно-желтый цвет. У образца 2 среда потемнела до коричневой, у образца 3 среда местами приняла красный цвет. Это могло быть вызвано выделениями как плесени, так и бактерий.

Были отобраны наименее обросшие мицелием колонии и пересажены на свежую среду методом истощающего штриха. Чашки Петри с микроорганизмами выдерживались при температуре +20°C. Характеристики выросших колоний представлены в Приложении. Все колонии имели сходные характеристики: прозрачные, круглые или овальные, однородные или зернистые, пастообразной консистенции, с ровным краем и выпуклым профилем.

Были приготовлены фиксированные препараты выросших микроорганизмов и произведено их окрашивание по Граму. Азотобактер – грамотрицательная бактерия, чаще всего имеющая овальную форму, но есть и другие формы, от шарообразной от сферической. Клетки располагаются одиночно, парами либо неправильными скоплениями. в неблагоприятных условиях формируют цисты [1]. Один из «кандидатов» в азотобактеры представлен на рис. 1. Эти бактерии, располагающиеся в центре снимка, были выделены из колонии № 5 из образца почвы № 3.

Рис. 1. Микропрепарат грамотрицательных бактерий из колонии № 5 из образца почвы № 3

На основании окрашивания по Граму и последующего микроскопирования определили вероятные образцы с азотобактером. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Особенности строения выделенных микроорганизмов

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Образец | № колонии | Особенности строения |
| 1 | 1 | Грам + и – |
| **4** | Грам – |
| 2 | **3** | Преобладает Грам –, но есть и + |
| 6 | Грам + |
| 11 | Грам + |
| 14\* | Преобладает Грам +, но есть и – |
| 3 | **2** | Грам + и Грам – |
| **5.1** | Грам –, клетки с толстыми оболочками |
| 5.2 | Преобладает Грам +, есть Грам – |
| **12\*** | Грам – |
| 4 | **10.1** | Грам – бактерии, есть много крупных эукариотических клеток, по форме напоминающих дрожжи |
| **10.2** | Грам –- бактерии и аналогичные дрожжевидные клетки |
| 13.1 | Грам – бактерии палочковидной формы |
| 13.2 | Мелкие клетки Грам + преобладает, есть Грам – |
| 5 | 7 | Мелкие Грам – бактериий круглой формы |
| 8 | Мелкие бактерии Грам – |
| 6 | **9** | Грам – |

Номера колоний, образованных предположительно бактериями рода азотобактер, выделены жирным шрифтом. Как видно, похожие по морфологии клеток и колоний на *Azotobacter* бактерии были выделены из всех образцов почвы, за исключением торфа верхового болота, обладавшего экстремальной кислотностью для данных микроорганизмов.

В данный момент необходима родовая идентификация выделенных микроорганизмов, которая будет осуществляться методом ПЦР на базе Новосибирского научно-исследовательского центра в рамках проекта «Охотник за микробами».

**ВЫВОДЫ**

Таким образом, в результате проведённого исследования сделаны следующие выводы:

1. Для почв растительных сообществ Крайнего Севера характерна умеренная или избыточная увлажнённость и кислая реакция среды в довольно широком пределе значений. Механический состав исследованных почв варьирует от супеси до тяжёлого суглинка, из чего следует, что воздушный режим субстратов в регионе может сильно различаться. Некоторые субстраты обладают невысокой влажностью. Большинство почв лежит вне пределов оптимумов для жизнедеятельности бактерий рода *Azotobacter*.

2. Несмотря на неблагоприятные условия, из почв и субстратов Мурманской области выделяются культуры микроорганизмов, способные расти на безазотистой питательной среде, то есть с большой долей вероятности, являющиеся азотфиксирующими. Морфологические и культуральные признаки некоторых из выделенных микроорганизмов сходны с характерными особенностями бактерий рода *Azotobacter.*

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Первый этап работы завершён, нами были выделены штаммы микроорганизмов по культуральным свойствам и особенностям строения клеток напоминающие представителей рода *Azotobacter*.

В настоящий момент идёт работа над выделением отдельных штаммов микроорганизмов и ожидается подтверждение родовой принадлежности бактерий.

В последствие предполагается проверить устойчивость выделенных штаммов к неблагоприятным условиям среды: пониженной температуре, повышенной солёности и кислотности среды.

Выделенные штаммы, обладающие такой устойчивостью, могли бы использоваться для улучшения качества почв в районах с неблагоприятными для азотфиксирующих бактерий условиями.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Азотобактер // А — Ангоб. — М. : Советская энциклопедия, 1969. — (Большая советская энциклопедия : [в 30 т.] / гл. ред. А. М. Прохоров ; 1969—1978, т. 1).

2. Географический атлас Мурманской области// Главное управление геодезии и картографии при совете министров СССР. Научно-исследовательский голого-географический институт Ленинградского Государственного университета имени А.А. Жданова. — Москва, 1971.

3. ГОСТ 17.4.4.02-2017 Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа (2017).

4. Жук О.Н. Влияние природного штамма *Azotobacter chroococcum* на ростовые характеристики тритикале (*Triticosecale*) /О.Н. Жук, Я.Н. Камельчук, Д.А. Грушевская, Г.А. Лагодич// Биотехнология: достижения и перспективы развития. Сборник материалов 3 международной научно-практической конференции, 22-23 ноября, 2018 года, Пинск. — Пинск, 2018. — С. 72-75.

5. Киракосян А.В. Влияние pH среды на развитие экологических форм Azotobacter chroococcum/А.В. Киракосян, Ж.С. Мелконян, Л.Г. Ананян// Вопросы микробиологии. —1964.

6. Никогосян В.Г. Об экологических и биологических особенностях азотобактера и олигонитрофильных микроорганизмов/ В.Г. Никогосян. —1995.

7. Паносян А.К. К вопросу об эффективности применения азотобактерина в различных почвах/ А.К. Паносян. —1956.

8. Симакова В.С. Бактерии рода *Azotobacter* как показатель состояния луговой почвы/ В.С. Симакова, А.Л. Коновалов, Л.И. Домрачева// Экология родного края: проблемы и пути их решения. Материалы 13 Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, 23-24 апреля 2018 года, Киров. — Киров, 2018. — С. 16-19

9. Химический анализ почв. Учебно-методическое пособие. Воронеж, 2010. — 60 с.

10. Чевердин Ю.И. Развитие микроорганизмов, связанных с циклом азота в сезонно переувлажненных почвах/ Ю.И. Чевердин, Л.В. Гармашова// Сельское хозяйство, лесное хозяйство, рыбное хозяйство. —2018.

11. Шильникова В.К. Микробиология/ В.К. Шильникова, А.А. Ванькова, Г.В. Годова. —2006.

Приложение

Характеристика колоний микроорганизмов, выросших на безазотистой среде Эшби

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № образца,  №№ колоний | | Размер колонии (диаметр) | Цвет субстрата | Форма | Край | Поверхность | Прозрачность и цвет | Структура | Профиль | Консистенция |
| 1. | 1, 4 | <1 мм | белый | круглая | ровный | гладкая | прозрачная | однородная | выпуклый | пастообразная |
| 2. от 17.09 | 3 | выраженных колоний не наблюдается, на местах проведения петли наблюдаются прозрачные разломы и неровности субстрата. Субстрат прозрачный. | | | | | | | | |
| 6 |
| 2. от 19.09 | 11 | 1 мм | белый | круглая, неправильная | ровный | зернистая | прозрачная | мелкозернистая | выпуклый | пастообразная |
| 14\* | <2 мм | белый | круглая | ровный | гладкая | прозрачная | однородная | выпуклый | пастообразная |
| 14 колония на исх образце была желтая колония, флуоресцировала под УФ светом, но на истощающем штрихе колонии не флуоресцировали, были прозрачные, как в прошлых образцах | | | | | | | | | |
| 3. от 17.09 | 2 | 1 мм | белый | по форме штриха | ровный | зернистая | молочная, мутная | зернистая | выпуклый | пастообразная |
| 5.1 | 1×0,5 см | белый | овальная | зернистая |
| 5.2 | 1×0,5 см | белый | овальная | гладкая |
| 3. от 19.09 | 12\* | ширина 1 мм | белый | по штриху | ровный | гладкая | прозрачная | однородная | выпуклая | пастообразная |
| исходная 12 колония флуоресцировала под УФ светом, но на истощающем штрихе нет | | | | | | | | |
| 4. | 10.1 | 4-5 мм | белый | круглая | нечеткий | гладкая | молочная | мелкозернистая | выпуклый | пастообразная |
| 10.2 | - | ровный |
| 13.1,  13.2 | большой нарост гиф коричневого цвета со шаровидными спорангиями, на момент описания колонии не наблюдались | | | | | | | | |
| 5. | 7, 8 | - | белый | круглая | ровный | гладкая, влажная | прозрачная | однородная | выпуклый | пастообразная |
| 6. | 9 | - | белый | круглая | ровный | гладкая | прозрачная | однородная | выпуклый | пастообразная |
| колоний очень мало, на ×40 видны плохо | | | | | | | | | |