Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение

«Средняя общеобразовательная школа №22 им. Н.И. Кузнецова»

Асбестовского городского округа

Свердловская область, город Асбест

Детское объединение «Студия школьного проектирования»

Всероссийский конкурс юных исследователей окружающей среды

«Открытия 2030»

**Направление: «Ландшафтная экология и почвоведение»**

Исследовательская работа:

**Бактерии рода *Azotobacter* в грунтах отвалов**

**и повреждённых промышленностью почвах города Асбест**

**и возможности их использования в агро- и биотехнологиях**

Авторы работы: Дербенева Дарья Евгеньевна, 10 класс,

Руководитель: Шабалина Анна Андреевна,

педагог дополнительного образования, ВКК

МБОУ «СОШ № 22 им. Н.И. Кузнецова» АГО

г. Асбест

2022

**Содержание**

Введение 3

I. Теоретическая часть 5

* 1. Азотфиксирующие микроорганизмы в почве 5

1.2. Биологические особенности бактерий рода *Azotobacter* 5

1.3. Историческая справка о промышленности г.Асбест 6

1.4. Возможности использования бактерий рода *Azotobacter* в современных агро- и биотехнологиях 6

II. Экспериментальная часть: 7

2.1. Схема исследования 7

2.2. Методика 7

2.3. Описание мест отбора проб 10

2.4. Результаты исследования 12

Выводы 17

Заключение 18

Список литературы 19

Приложение 21

**Введение**

По высказыванию В. И. Вернадского: «Почва пропитана жизнью» [1]. Некоторые виды почвенных микроорганизмов представляют большой интерес для учёных. Российские микробиологи активно изучают перспективные штаммы бактерий рода *Azotobacter*, а научные сотрудники Новосибирского государственного университета привлекают к своим исследованиям школьников. Так, в программе «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов, как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами» предусмотрено проведение масштабных исследований с привлечением обучающихся для сбора образцов и анализа данных и результатов.

Наша команда приняла участие в этой исследовательской программе, и нам нужно было отобрать пробы почв в уникальных для региона местах. А так как мы живём в промышленном городе Асбесте, то мы решили отбирать нарушенные промышленностью почвы.

**Актуальность и практическая значимость** нашего исследования состоит в том, что изучение азотфиксирующих бактерий – это перспективное направление агро- и биотехнологий, потому что они способны повысить плодородие почв без применения химических удобрений. Кроме того, бактерии рода *Azotobacter* выделяют биологически активные вещества, которые можно использовать для повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Ещё у нашего исследования высокая практическая значимость в сфере промышленной экологии: тема рекультивации нарушенных почв очень актуальна для нашего региона.

Мы выдвинули **гипотезу**: в отвальных грунтах и поврежденных промышленностью почвах города Асбеста живут бактерии рода *Azotobacter*. Но история у этих почв разная, и, предположительно, *Azotobacter* будет проявлять свою активность по-разному. Кроме того, изучив литературные источники, мы предположили, что Azotobacter можно использовать как стимулятор роста растений.

**Объект исследования**: бактерии рода *Azotobacter*.

**Предмет исследования**: активность роста бактерий рода *Azotobacter* в разных грунтах и почвах и влияние этих бактерийна всхожесть семян и рост растений.

**Цель исследования**: определить наличие и пронаблюдать активность бактерии рода Azotobacter в отвальных грунтах и поврежденных промышленностью почвах города Асбест и выявить влияние бактеризации семян тест-растений на их прорастание и рост.

**Задачи:**

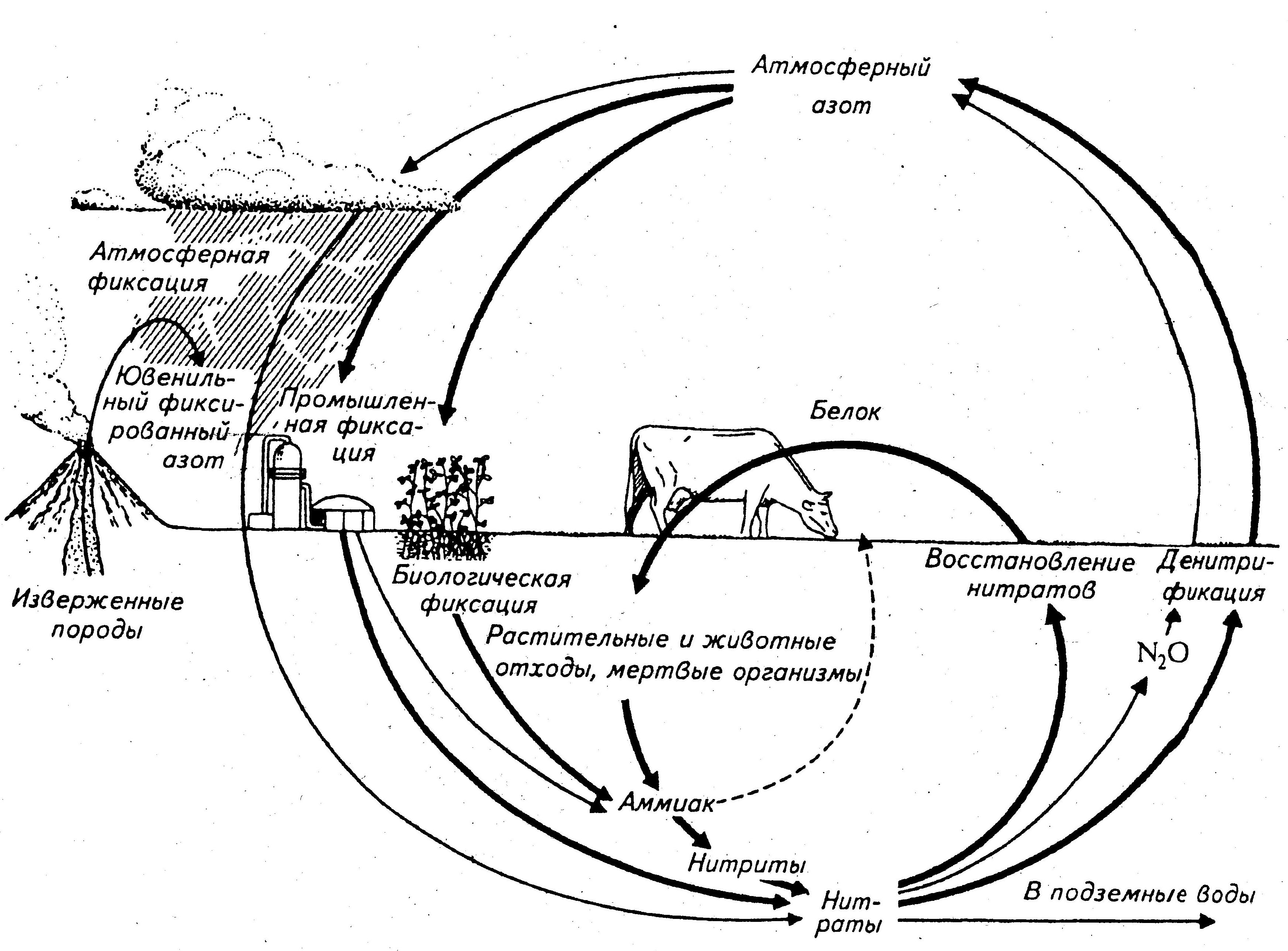
1. Отобрать образцы почв, подготовить их к отправке и отправить в Новосибирский Университет для дальнейших исследований;
2. Провести первичные физико-химические исследования почв и внести их в базу данных программы;
3. Провести микробиологические посевы и выявить азотфиксирующие бактерии, отправить микробиологические образцы в Новосибирский Университет;
4. Провести опыт по стимуляции прорастания семян и роста тест растений с использованием чистой культуры *Azotobacter*.

**I. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ**

**1.1. Азотфиксирующие микроорганизмы в почве**

Почва — природное тело, формирующееся в результате преобразования поверхностных слоёв суши Земли под воздействием факторов почвообразования [10]. Одним из ведущих факторов почвообразования является деятельность почвенных микроорганизмов, которые играют огромную роль в круговороте веществ в природе. Одни виды микробного сообщества почвы разрушают отмершие органические соединения растительного и животного происхождения до минеральных веществ. Другие виды, наоборот, способны синтезировать из простых неорганических веществ более сложные соединения. Например, азотфиксирующие бактерии способны усваивать из атмосферы азот [3].

Азотфиксация – это фиксация молекулярного [атмосферного](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D1%82%D0%BC%D0%BE%D1%81%D1%84%D0%B5%D1%80%D0%B0_%D0%97%D0%B5%D0%BC%D0%BB%D0%B8) [азота](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%B7%D0%BE%D1%82) [прокариотными микроорганизмами](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D1%80%D0%BE%D0%BA%D0%B0%D1%80%D0%B8%D0%BE%D1%82%D1%8B) для синтеза аммиака. Этот метаболит может усваиваться как самими азотфтксаторами так и растениями а почва становится более плодородной [7]. Содержание и соотношение растворимых форм азота в почве постоянно изменяется в результате их усвоения растениями, а так же вследствие эрозии, вымывания и денитрификации. Таким образом, соединения азота являются одним из главных дефицитных элементов питания естественных и промышленных экосистем, а азотфиксаторы играют важную роль в круговороте азота в биосфере [6] (рис.1).



**Рис.1. Круговорот азота в природе**

**1.2.биологические особенности бактерий рода azotobacter**

Род *Azotobacter* – род грамотрицательных бактерий, обитающих преимущественно в слабокислых, нейтральных и слабощелочных почвах (рост и азотфиксация возможны в диапазоне pH от 4,8 до 8,5, оптимально – 7,0 – 7,5). Бактерии рода азотобактер являются свободноживущими азотофиксаторами, однако они способны жить в ассоциации с некоторыми растениями [7]. Азотобактер является удобным объектом исследования из-за своей распространенности, изученности и простоты в культивировании.

К роду *Azotobacter* всего относится 6 видов, наиболее распространены *Azotobacter chroococcum* (типовой вид), образующий колонии бурого, почти черного цвета, *Azotobacter agilis,* для которого характерны бесцветные колонии, и *Azotobacter vinelandii,* чьи колонии флуоресцирующей желтовато-зеленой окраски. Клетки относительно крупные (1-2 мкм в диаметре), как правило, имеют овальную форму, но возможен широкий полиморфизм от палочковидной до сферической формы. Клетки могут располагаться одиночно, парами, неправильными скоплениями, цепочками. Клетки не образуют спор. В ранних культурах клетки имеют жгутики. Формируют особые покоящиеся формы - цисты - пузыря, защитной оболочки вокруг клеток [8]

**1.3.Историческая справка о промышленности г. Асбеста**

Асбест – промышленный город. Он был основан более 130 лет назад. В нем находится крупнейшее в мире месторождение хризотил-асбеста, добыча которого ведётся открытым карьерным способом, поэтому вокруг города много карьеров, отвалов и старых приисков с поврежденной почвой. Кроме хризотил-асбеста вблизи города велась и ведется добыча драгоценных камней (александриты, изумруды), а также тантало-берилливых и магниевых руд. Кроме добывающей отрасли в Асбесте развита сельскохозяйственная промышленность: есть пахотные земли, на которых выращиваются кормовые культуры для нужд животноводства и птицеводства.

**1.4.Возможности использования бактерий рода Azotobacter в современных агро- и биотехнологиях**

Сельскохозяйственная микробиология изучает возможность использования микроорганизмов для частичной или полной замены агрохимикатов, что позволяет успешно решать проблему обеспечения питательными веществами и защиты растений от болезней и вредителей. [11].

Благодаря своей способности фиксировать молекулярный азот, тем самым повышая плодородие почвы и стимулируя рост растений, представители рода *Azotobacter* используются в сельском хозяйстве для получения азотных биоудобрений, в том числе [азотобактерина](https://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%90%D0%B7%D0%BE%D1%82%D0%BE%D0%B1%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BD&action=edit&redlink=1). Ещё одним перспективным направлением для изучения почвенных бактерий рода *Azotobacter* является их способность синтезировать фитогормоны, что помогает растениям быстрее расти и развиваться [2, 14].

Ещё одно направление в использовании азотобактера связано с открытием его антибиотических свойств. Так, советскими учёными из азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter* выведены селекционные штаммы, обладающие антибиотической активностью в отношении фитопатогенных организмов [13]. Также представители рода являются продуцентами [полисахарида](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D1%81%D0%B0%D1%85%D0%B0%D1%80%D0%B8%D0%B4) - [альгиновой кислоты](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BB%D1%8C%D0%B3%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F_%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0) (E400), использующегося в медицине и фармацевтике, в пищевой промышленности (в качестве пищевой добавки к мороженому, пудингам и кремам) [12].

**II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

**2.1. Схема исследования**

Наше исследование проходило в несколько этапов, представленных на рисунке2.

**Рис.2. Схема исследования**

**2.2. Методика**

1. Отбор почвенных проб проводили в ноябре 2021 года согласно ГОСТ 17.4.4.02-84 [4] и рекомендаций методички «Охотник за микробами» [8]. С целью фиксации результатов был заведен лабораторный журнал. Для отбора проб делали поверхностный почвенный разрез глубиной до 10 см. Почвенными образцами заполняли 2/3 полиэтиленового пакета, пакеты нумеровали и заносили данные в журнал (координаты местности, описание погодных условий, рельефа, растительных сообществ). Образцы привезли в учебную лабораторию СЮН. Все наши действия фиксировали на фотоаппарат (Приложение 1).

2. Подготовку почвенных проб проводили согласно ГОСТ 17.4.4.02-84 и рекомендаций методички «Охотник за микробами». Доставленную почву высыпали на белую бумагу, убрали крупные включения и оставили сохнуть на 2-3 дня. Высушенную почву просеяли на сите с размером отверстий 1 мм. (Приложение 2)

3. Физико-химические характеристики, которые мы определяли (Приложение 3):

* Механический состав почвы определяли по ГОСТ 17.4.4.02-84 [4] и рекомендациям методички «Охотник за микробами» [8]. С помощью пипетки Пастера к почве добавили воду и тщательно перемешали до получения вязкого «теста». Из полученного «теста» скатали шарик диаметром 2-3 см и попробовали растянуть его в жгут, затем жгут пробовали согнуть в кольцо. Результаты сравнили с таблицей в методичке.

Для дальнейших исследований нам потребовалось сделать водную вытяжку из почвы ориентируясь на ГОСТ 26423-85 [5]. На весах мы подготовили навеску почвы массой 30 г, перенесли её в колбу и добавили 100 мл дистиллированной воды, перемешали содержимое и оставили на 30 минут. Затем отфильтровали почву через фильтр «Белая лента» и получили почвенную вытяжку.

* Кислотность почвы определяли при помощи датчика цифровой лаборатории «Сенсор». В почвенную вытяжку погрузили датчик и зафиксировали показания. После каждого определения датчик тщательно промывали дистиллированной водой.
* Электропроводность почвы также определяли при помощи датчика цифровой лаборатории «Сенсор». В почвенную вытяжку погрузили датчик, определили электропроводность и зафиксировали показания пробора в журнал. После каждого определения датчик тщательно промывали дистиллированной водой.
* Содержание нитратов в почвенной вытяжке определяли с помощью тест полосок [8]. Мы погрузили их в вытяжку из почвы на 2 секунды, извлекли тест-полоску и удалили избыток воды стряхивающим движением, положили ее на белую бумагу и дождались проявления цвета. Затем сравнили цвета полосок с таблицей в методичке.

4. Для культивирования азотфиксирующих бактерий использовали питательную среду Эшби (твёрдый агар). Мы выбрали эту питательная среду, т.к. она является селективной, т.е. специфичной только к данным бактериям. Другие микроорганизмы на ней не смогут расти, т.к. в её составе нет азотистых веществ, необходимых для синтеза белков, ДНК, РНК и других жизненно необходимых соединений.

Питательную среду приготовили согласно требованиям [9]. Сначала мы простерилизовали дистиллированную воду и посуду. Первым делом сделали вспомогательный раствор. Для этого на электронных весах мы сделали навески солей: NaCl, K2SO4, MgSO4\*7H2O, К2HPO4 и растворили их в 300 мл воды. Раствор тщательно перемешали, и довели его объём до отметки в 1 литр. Следующим нашим действием было приготовление среды Эшби. Мы сделали навески реактивов: CaCO3 2,5 г; агар-агар 7,5 г; глюкоза 10 г, добавили их в 500 мл вспомогательного раствора и перемешали до однородного состояния. Смесь вскипятили на плите, а потом остудили до 50-60°. Раствор разлили по чашкам Петри и пробиркам Эппендорфа, дождались полного остывания, пробирки убрали в холодильник. (Приложение 4). На 10 почвенных образцов подготовили 20 чашек Петри и 20 пробирок Эппендорфа с питательной средой для проведения наблюдений в двух повторностях.

5. Культивировали бактерии р. *Azotobacter* методом почвенных комочков, ориентируясь на рекомендации методички [8], делали наблюдения в двух повторностях. Чтобы сделать посев, мы взяли навеску 3 грамма почвы в пустую чашку, по каплям добавили дистиллированную воду и перемешали до пастообразного состояния. В чашки Петри выкладывали 50 почвенных комочков чистой зубочисткой на затвердевшую питательную среду на расстоянии 1 см помощью трафарета (Приложение 4). Чашки Петри подписывали перманентным маркером в соответствии с нумерацией образцов. Чтобы создать асептические условия, комнату перед посевами обработали УФ лампой, а в непосредственной близости от открытой чашки Петри разместили зажженную спиртовую горелку. Затем посевы инкубировали в термостате при температуре +23°. Подсчёты проводили через 4, 7 и 10 суток после посева (Приложение 5). Для этого подсчитывали количество почвенных комочков, покрытых слизью (обрастаниями) и переводили абсолютные значения (сколько комочков обросло) в процентное соотношение (% от общего количества). Все данные фиксировали в лабораторный журнал.

6. Микроскопировали колонии разного цвета с увеличением в 640 раз, опираясь на рекомендации методички [8]. С помощью зубочистки брали небольшое количество биомассы с колоний разной окраски, размазывали по предметному стеклу и добавляли красители: фуксин Циля и тушь. После дожидались полного высыхания смеси. Фото с микроскопа фиксировали с помощью цифрового окуляра (Приложение 6).

7. Через 10 суток сделали пересев чистой культуры с почвенных комочков на новую питательную среду, соблюдая асептические условия: в чашки Петри – для наращивания биомассы бактерий и в пробирки Эппендорфа – для отправки микробиологических образцов в Новосибирск. Чашку Петри с чистой культурой делили на несколько секций и пересевали колонии разного цвета для того, чтобы нарастить биомассу бактерий разных видов: *A.chroococcum* (коричневые колонии) и *A.agilis* (прозрачные колонии).

8. Чашки Петри с чистой культурой подписали и культивировали до интенсивного разрастания колоний (Приложение 6) затем скребком брали биомассу и растворяли в воде.

На последнем этапе наблюдений делали 1% и 10% растворы бактериальной биомассы двух разных видов в водопроводной воде. Затем по 10 семян кресс-салата раскладывали в чашки Петри и замачивали растворами с разной концентрацией бактерий *A.chroococcum* и *A.agilis*. Для сравнения поставили контроль: 10 семян замочили водопроводной водой без бактерий (Приложение 7). Все наблюдения делали в двух повторностях. Далее наблюдали за прорастанием семян, подсчитывая проклюнувшиеся семена через 1 сутки, через 2 суток и через 10 суток. У проросших семян линейкой измеряли длину корней и стеблей в течение 10 суток (Приложение 7). Все данные фиксировали в лабораторный журнал.

**2.3. Описание мест отбора проб**

Места для отбора проб мы выбирали согласно требованиям организаторов программы «Атлас почвенных микроорганизмов». Это должны быть уникальные места для нашего региона. Так как в городе Асбесте развита добывающая и сельскохозяйственная промышленные отрасли, то мы решили отбирать пробы в тех местах, где велась добыча полезных ископаемых в разное время (19-20 век), а также на пахотном поле агропромышленного комплекса и на огороде частного домовладения (рис.3) (Приложение 1). Перед тем, как выехать в полевые условия, изучили информацию о нужных нам локациях на сайте Викимапия [15] На территории действующих промышленных объектов отбор проб не проводился.

Локация №1 – поле агропромышленного комплекса Птицефабрики Рефтинская - используется для выращивания кукурузы на силос, на поле в течение нескольких лет в большом количестве зимой вывозится куриный помет с птицефабрики.

Локация №2 – отвал Михайловского прииска. Образовался в начале 20 века. Высота примерно 30 метров, зарос деревьями и кустарниками, почва сформирована, покрыта травянистым ярусом.

Локация №3 – карьер Михайловского прииска - до революции здесь велась разработка хризотил-асбеста. Добыча его производилась только ручным трудом. В настоящее время имеется древесный и кустарниковый ярус. Много поваленных с корнями деревьев. Почва сформирована, покрыта травянистым ярусом.

Локация №4 – отвал Красноболотского прииска. Образован в середине 20 века. Состоит из глинистых пород с вкраплениями слюды. Гумусового слоя нет, имеется древесный ярус (сосновые лесопосадки), травянистый ярус отсутствует, встречаются лишайники.

Локация №5 – затопленный карьер Красноболотского прииска. Разработка началась в 1839 году. На этом прииске добывались драгоценные камни, преимущественно александриты. В разные времена добыча производилась через небольшие шахты, а позже — в большом карьере. Берег карьера зарос прибрежной растительностью.

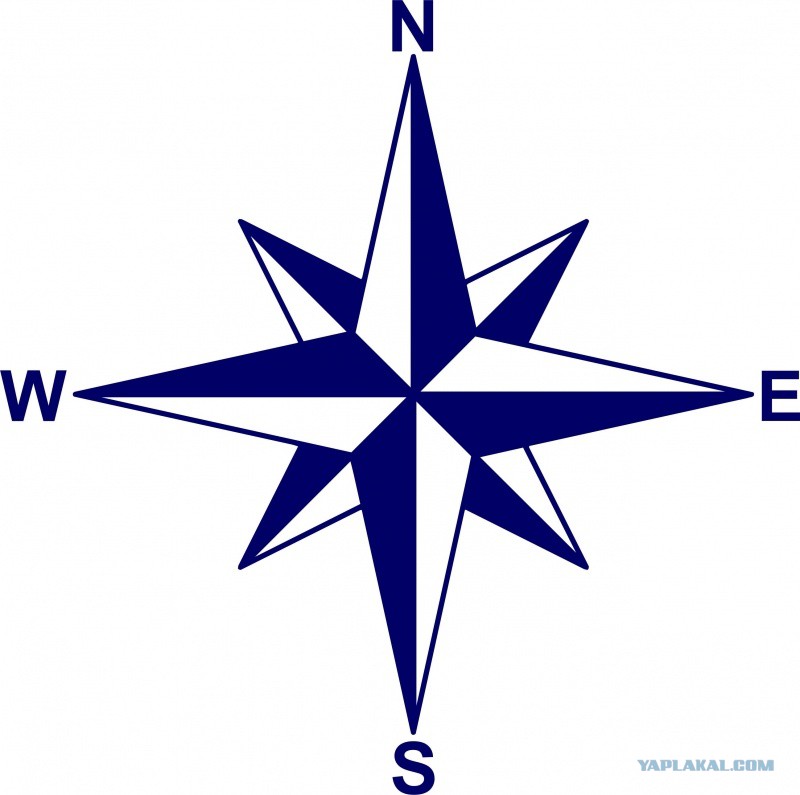
Локация №6 – огород частного домовладения. Используется для выращивания картофеля, удобряется компостом.

Локация №7 –отвал Окунёвского прииска. Формировался с конца 19 до начала 20 века. Невысокий, примерно 5-7 метров. В настоящее время выглядит как зрелый лес. Почва сформирована. Имеется древесный, кустарниковый и травяно-кустарничковый ярус.

Локация №8 – Окунёвский прииск. В 1889 году началась разработка хризотил-асбеста ручным способом. В начале 20 века на прииске работали политзаключённые из находившегося поблизости лагеря. Почва сформирована. Имеется древесный ярус и травянисто-лишайниковый ярус

Локация №9 – отвал карьера Липовый лог. Формировался в 90-х годах 20 века. Высота примерно 50 метров, породы каменисто-глинистые, гумусового слоя нет, порос сосняком, травянистого яруса нет, встречается лишайник.

Локация №10 – карьер Липовый лог – тантало-берилииевое месторождение, было открыто в начале 1940-х годов. Разработки велись в 80-90х годах 20 века. В настоящее время затоплен, берега глинистые, местами поросли прибрежной растительностью.

****

**Рис.3. Карта расположения точек отбора проб**

**2.4. Результаты исследования**

1. Отобрали 10 образцов почв, нарушенных промышленностью. Просушили и просеяли почвенные образцы, сделали навески по 100 грамм и отправили их в Новосибирский Университет для дальнейших исследований.
2. Провели первичные физико-химические исследования почв (таблица 1.) и внесли полученные результаты в базу данных программы.

**Таблица 1. Физико-химические характеристики почвенных образцов**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № образца | Механический состав | Кислотность, pH | Электропроводность, мкСм/см | Нитраты, мг/л |
| 1 | Легкосуглинистый | 6,8 | 516 | >250 |
| 2 | Супесчаный | 7,4 | 148 | 25 |
| 3 | Супесчаный | 6,8 | 175 | 25 |
| 4 | Среднесуглинистый | 6,9 | 45 | 25 |
| 5 | Среднесуглинистый | 6,9 | 28 | 25 |
| 6 | Среднесуглинистый | 6,8 | 216 | 25 |
| 7 | Супесчаный | 7,16 | 285 | 25 |
| 8 | Легкосуглинистый | 6,9 | 55 | 10 |
| 9 | Супесчаный | 6,8 | 80 | 25 |
| 10 | Тяжелосуглинистый | 6,9 | 35 | 25 |

Как видно из таблицы 1 механический состав почвенных образцов разнообразен: от супесчаного до тяжелосуглинистого.

Кислотность почвенных вытяжек у всех образцов нейтральная и слабощелочная, что является благоприятным условием для жизни азотобактера.

Значения электропроводности почвенных вытяжек очень сильно различались. Например, наибольшее значение имеет образец с поля агропромышленного комплекса, что говорит о том, что в почве находится большое количество растворённых веществ. Так же в этом образце зафиксировано самое высокое содержание нитратов. Мы считаем, что высокие значения по электропроводности и нитратам связаны с тем, что на эти поля много лет и в больших количествах вывозится куриный помёт с птицефабрики Рефтинская.

1. Провели микробиологические посевы и выявили азотфиксирующие бактерии. Затем пересеяли колонии с почвенных комочков на питательную среду в пробирки Эппендорфа и отправили микробиологические образцы в Новосибирский университет.

**Таблица 2. Интенсивность обрастаний почвенных комочков**

**(среднее значение для двух повторностей)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № образца | Интенсивность обрастания, % | |
| на 4 сутки | на 10 сутки |
| 1 | 0 | 15 |
| 2 | 61 | 86 |
| 3 | 69 | 98 |
| 4 | 0 | 27 |
| 5 | 6 | 25 |
| 6 | 99 | 100 |
| 7 | 86 | 100 |
| 8 | 84 | 93 |
| 9 | 21 | 68 |
| 10 | 88 | 88 |
| Контроль | 0 | 0 |

Как видно из таблицы 2 наименьшая интенсивность обрастания почвенных комочков колониями азотобактера наблюдается в образце №1. Анализируя результаты таблиц 1 и 2, можно сделать вывод о том, что в почве с высоким содержанием растворимых солей, в том числе нитратов (образец №1) встречается намного меньше клеток азотобактера и активность их размножения ниже, чем в других почвах.

Так же, анализируя таблицы 1 и 2, мы не обнаружили корреляции между механическим составом почвы и активностью роста азотобактера.

В контрольных чашках рост микроорганизмов не обнаружен. Это свидетельствует о том, что нами были соблюдены асептические условия. Хотя, после четвёртых суток наблюдений в некоторых чашках с образцами появилась плесень. Мы предполагаем, что споры плесневых грибов попали на питательную среду во время подсчёта и фотографирования.

Наша гипотеза подтвердилась. В почвах, нарушенных промышленностью и даже в грунтах промышленных отвалов, обитают азотфиксирующие бактерии. И их активность выше в тех местах, где разработки не ведутся более века (образцы №3, 7, 8). Так же высокая активность азотобактера оказалась в почве сельхозназначения, которая возделывается ручным трудом и удобряется натуральным способом (образец №6) (рис. 4).

**Рис.4.** **Интенсивность обрастаний почвенных комочков, %**

4. Провели опыт по стимуляции прорастания семян тест растений (кресс-салата) с использованием чистой культуры *Azotobacter.*

**Таблица 3.**

**Влияние бактеризации семян кресс-салата на всхожесть**

**(среднее значение для двух повторностей)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Вид бактерий | Концентрация разведения бактерий, % | Всхожесть семян, % | | |
| На 2 сутки | На 3 сутки | На 10 сутки |
| *A.chroococcum* | 1 | 0 | 90 | 95 |
| 10 | 0 | 100 | 100 |
| *A.agilis* | 1 | 0 | 80 | 90 |
| 10 | 0 | 90 | 90 |
| Контроль  (вода) | 0 | 0 | 80 | 85 |

Как видно из таблицы 3, семена во всех чашках взошли на 3 сутки, причём максимальная всхожесть (100%) наблюдается при бактеризации семян 10% раствором *A.chroococcum.* По сравнению с нейбактеризация семян 10% раствором *A.agilis* оказывает меньшую эффективность (90%). Всхожесть семян, замоченных в воде без добавления бактерий, на 10 сутки была ниже, чем семена, замоченные в бактериальных растворах.

Таким образом, данный опыт подтвердил нашу гипотезу: бактеризация семян тест-растений оказывает стимулирующее действие на всхожесть. При этом более эффективно будет использовать чистую культуру *A.chroococcum* в концентрации не более 10% (рис. 5)

**Рис. 5. Влияние бактеризации семян кресс-салата на всхожесть, %**

**(по наблюдениям на 10 сутки)**

После того, как семена взошли, мы провели дальнейшее наблюдение за ростом тест-растений. Результаты представлены в таблице 4.

**Таблица 4.**

**Влияние бактеризации семян кресс-салата на рост корней и стеблей (среднее значение для двух повторностей)**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Вид бактерий | Концентрация разведения бактерий, % | Длина на 3 сутки, мм | | Длина на 4 сутки, мм | | Длина на 5 сутки, мм | | Длина на 10 сутки, мм | |
| Корень | Стебель | Корень | Стебель | Корень | Стебель | Корень | Стебель |
| *A.chroococcum* | 1 | 18 | 3 | 21 | 13 | 32 | 19 | 66 | 35 |
| 10 | 19 | 4 | 32 | 15 | 34 | 25 | 70 | 45 |
| *A.agilis* | 1 | 15 | 3 | 23 | 12 | 33 | 14 | 75 | 33 |
| 10 | 18 | 3 | 24 | 15 | 41 | 23 | 91 | 35 |
| Контроль | 0 | 15 | 3 | 19 | 14 | 32 | 21 | 65 | 31 |

Анализируя таблицу 4 можно сделать вывод о том, что рост корней и стеблей тест-растений в чашках с бактериями и в контроле различается. На 10 сутки максимальный прирост стеблей зафиксирован в чашке с 10% раствором *A.chroococcum,* а самый большой прирост корней зафиксирован в чашке с 10% раствором *A.agilis.*

Таким образом, данный опыт подтвердил нашу гипотезу: бактеризация семян тест-растений оказывает стимулирующее действие на рост корней и стеблей. При этом более эффективно будет использовать смесь чистых культур *A.chroococcum и A.agilis* в концентрации 10% (рис. 6)

**Рис. 6. Влияние бактеризации семян кресс-салата на рост корней и стеблей, мм (по наблюдениям на 10 сутки)**

**Выводы**

В результате проведённого исследования можно сделать следующие выводы:

1. Отобрав почвенные образцы и отправив их в Новосибирский университет, мы приняли участие в глобальной исследовательской программе и внесли свой вклад в развитие науки.

2. Выявили отрицательную корреляцию между количеством нитратов в почве, значением её электропроводности и интенсивностью роста бактерий рода *Azotobacter*.

3. Обнаружили азотфиксирующие бактерии в нарушенных промышленностью почвах: в небольших количествах *Azotobacter* встречается даже в отсутствии гумусового слоя на отвалах, которым не более 30 лет. Наибольшее количество активных бактериальных клеток обнаружено в почвах, где промышленные разработки не ведутся уже более 100 лет. Таким образом, эти бактерии являются пионерами нарушенных промышленностью экосистем, без них невозможно почвообразование и рекультивация.

4. Подтвердили гипотезу о том, что *Azotobacter* стимулирует всхожесть и рост растений: при бактеризации семян кресс салата повысилась всхожесть и ускорился рост корней и стеблей. Кроме того, мы сделали наблюдение, о котором не нашли информацию в литературных источниках: разные виды бактерий оказывают разное стимулирующее действие. *A. chroococcum* положительно влияет на прирост стеблей, а *А. agilis* более активно стимулирует прирост корней растений. Таким образом, *A. chroococcum и A. agilis* являются перспективными объектами для использования в агро- и биотехнологиях.

**Заключение**

Наш исследовательский проект оказался очень интересным и увлекательным, ведь нам, школьникам из небольшого города, удалось принять участие в глобальной исследовательской программе, и внести свой личный вклад в науку.

Мы освоили некоторые физико-химические методы анализа почв, научились готовить питательную среду и проводить микробиологические исследования, работать с микроскопом и цифровыми приложениями к нему. Кроме этого мы погрузились в краеведение, поглубже узнали историю своего города.

Но, самое главное – мы сделали свои первые открытия в области агро- и биотехнологий и продолжим работу в этом направлении. Ведь перспективы изучения бактерий рода *Azotobacter* очень актуальны в современной науке. Особенно нас заинтересовала возможность использования этих бактерий для стимулирования и ускорения роста растений в нарушенных промышленностью почвах и отвальных грунтах для ускорения рекультивации. В этом направлении мы и планируем развивать свое исследование.

.**Список литературы**

1. Вернадский В.И. Биосфера и ноосфера. М.: Наука, 1989.-264 с.

1. Волова Т. Г. 6.3. Биологические удобрения // Биотехнология / Под ред. академика И. И. Гительзона. — Новосибирск: Издательство СО РАН, 1999. — С. 190—193. — ISBN 5-7692-0204-1
2. Гиляров М.С., Криволуцкий Д.А. Жизнь в почве. М.: Мол. гвардия, 1985 191 с., ил.
3. ГОСТ 17.4.4.02-84 МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ Охрана природы ПОЧВЫ Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа
4. ГОСТ 26423-85 МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ ПОЧВЫ Методы определения удельной электрической проводимости, рН и плотного остатка водной вытяжки
5. Демиденко Г.А. Сельскохозяйственная экология: учеб. пособие / Г.А. Демиденко, Н.В. Фомина; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2019. – 330 с.
6. Клещев Н.В. Агробиотехнология: биологическая фиксация молекулярного азота: учеб. пособие / Н.В. Клещев. – Х.: НТУ «ХПИ», 2014. – 168 с. – на рус. яз.
7. Охотник за микробами. Методические рекомендации и инструкции по применению набора
8. Практикум по биологии почв: Учеб. пособие / Зенова Г.М., П69 Степанов А.Л., Лихачева А.А., Манучарова Н. А. - М.: Издательство МГУ, 2002.- 120 с. ISBN 5-211-04657-9
9. Почвоведение. Учеб. для ун-тов. В 2 ч./Под ред. В. А. Ковды, Б. Г. Розанова. Ч. 1. Почва и почвообразование/Г. Д. Белицина, В. Д. Васильевская, Л. А. Гришина и др. — М.: Высш. шк., 1988. —400 с : ил.
10. Тихонович И. А., Проворов Н. А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего. СПб, 2009

11. Азотобактер // Википедия. Дата обновления: 02.02.2021. URL: <https://ru.wikipedia.org/?curid=1384068&oldid=112124181> (дата обращения: 02.02.2021).

12. [Айша Сумбул](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sumbul%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=33304174), [Ризван Али Ансари](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ansari%20RA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=33304174), [Роза Ризви](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rizvi%20R%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=33304174), [Иршад Махмуд](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mahmood%20I%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=33304174) [Azotobacter: потенциальное биоудобрение для управления здоровьем почвы и растений // NLM: Национальная медицинская библиотека, Опубликовано онлайн 8 августа 2020 года](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7714982/) URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7714982/> (дата обращения 30.01.2022)

13. Новичкова А.А., Артикова Р.М., Халмуратова И.Ю Изучение влияние бактерий рода *Azotobacter* на прорастание семян и формирование проростков томата // URL: http://library.ziyonet.uz/ru/book/80077 (дата обращения 20.12.2021)

14. Wikimapia [Электронный ресурс] URL: <http://asbest.wikimapia.org/map/> (дата обращения 10.11.2021)

Приложение 1

**Фотоотчет об отборе почвенных проб**

|  |  |
| --- | --- |
| Маршрут №1 Красноармейское поле | D:\Рабочий стол\азотобактер\фото почва\2..jpg  Маршрут №2 отвал асбестового прииска на Папанинцев |
| Маршрут №3 карьер асбестового прииска на Папанинцев | D:\Рабочий стол\азотобактер\фото почва\3. панорама.jpg  Маршрут №3 Дорога, ведущая в карьер, использовалась в первом десятилетии 20 века |
| Маршрут №4 отвал Красноболотского прииска | Маршрут №5 Красноболотский карьер |
|  |  |
| Маршрут №8 карьер асбестового прииска на Окунева | |
|  |  |
| Маршрут №10 затопленный карьер Липовый лог | |

Приложение 2

**Подготовка почвенных образцов к отправке в Новосибирский университет**

|  |  |
| --- | --- |
| Высушили образцы почв | Измельчили и просеяли |
| Сделали навеску образцов | Отправили образцы в Новосибирск |

Приложение 3

**Фотоотчет о проведении физико-химических исследований почвенных образцов**

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| Определение механического состава почвы | |
| https://sun9-43.userapi.com/impf/6dTABDoau9I8hXMBg7HCn_cc9Hci1rjhPQk03Q/BkxbR_cbUFE.jpg?size=1600x900&quality=95&sign=bad6bc1d65cc8cc781de9ce3834bb66c&type=album |  |
| Определение электропроводности и кислотности почвенных вытяжек с помощью цифровых датчиков | |
|  |  |
| Определение нитратов в почве | |

Приложение 4

**Фотоотчет о проведении микробиологических посевов**

|  |  |
| --- | --- |
| Сделали навески веществ для приготовления вспомогательного раствора и питательной среды | Простерилизовали воду и посуду |
| Сделали вспомогательный раствор | Приготовили питательную среду Эшби |
| **C:\Users\45\Desktop\r9tH11JAmnA.jpg** |  |
| Разлили питательную среду по чашкам Петри и в пробирки Эппендорфа | |
|  | https://sun9-82.userapi.com/impf/qMuKVaPs-KGMnilvGN1JiyGxt0PBRbiKu9Bw-A/BOkftta8tyM.jpg?size=1560x1560&quality=95&sign=d8d3ea1a8df9b01faebd59419cf8cf82&type=album |
| Сделали посевы: разместили комочки почвы на питательную среду в чашки Петри и поставили в термостат при температуре 23 градуса | |

Приложение 5

**Наблюдение за интенсивностью обрастаний почвенных комочков**

|  |  |
| --- | --- |
| Образец 3.1 на 4 день | Образец 3.1 на 10 день |
| Образец 6.1 на 4 день | Образец 6.1 на 10 день |
| D:\Рабочий стол\bwcOD78dSEw.jpg  Образец на 2.2 на 4 день | D:\Рабочий стол\llrzY4_wFe8.jpg  Образец 2.2. на 10 день |

Приложение 6

**Фотоотчет о микроскопировании бактерий рода *Azotobacter***

|  |  |
| --- | --- |
| D:\Рабочий стол\азотобактер\WhatsApp Image 2021-12-05 at 15.07.16.jpeg  Смешали биомассу с фуксином Циля и тушью | Микроскопировали полученный препарат |
| D:\Рабочий стол\азотобактер\фото почва\2.2.2.bmp  Образец 2.1 (увеличение ×640).  Видны одиночные и делящиеся клетки  некоторые покрыты слизистой капсулой | D:\Рабочий стол\азотобактер\фото почва\4.1.1.bmp  Образец 4.1 (увеличение ×640)  Видны крупные сферические цисты |
| Образец номер 6.1 (увеличение ×640)  Видны одиночные и делящиеся клетки | D:\Рабочий стол\азотобактер\фото почва\7.1.1.bmp  Образец 7.2 (увеличение ×640)  Видны одиночные и делящиеся клетки,  покрытые слизистой капсулой |

Приложение 7

**Наблюдение за стимулированием прорастания кресс-салата**

|  |  |
| --- | --- |
| Семена кресс-салата в 10% растворе бактерий *Azotobacter chroococcum* через 1 сутки | Семена кресс-салата в 10% растворе бактерий *Azotobacter chroococcum* на 10 день |
| Семена кресс-салата в 10% растворе бактерий *Azotobacter agilis* через 1 сутки | Семена кресс-салата в 10% растворе бактерий *Azotobacter agilis* на 10 день |
| Семена кресс-салата в воде через 1 сутки | Семена кресс-салата в воде на 10 день |