Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение

«Средняя общеобразовательная школа №1 с.Вольно-Надеждинское

Надеждинского муниципального района им. А.А. Курбаева» Приморского края

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение

дополнительного образования «Станция юных туристов»

Надеждинского муниципального района Приморского края

**Всероссийский конкурс юных исследователей окружающей среды «Открытия 2030»**

Номинация: «Ландшафтная экология и почвоведение»

# Определение

# азотфиксаторов в почвах Надеждинского, Партизанского и Хасанского районов

# Приморского края

Выполнили: Афонин Захар, Анучина Ульяна,

Бабкина Кристина, учащиеся 8- х классов

Руководитель: Белавкина Надежда Дмитриевна,

зам. дир. по УВР, учитель географии,

педагог дополнительного образования

Село Вольно – Надеждинское

2022

**Оглавление**

Введение …………………………………………………………………3

# 1. Литературный обзор. ……………………………….………………...4

# 2. Методика исследований …. ………………………………………....6

2.1 .Материалы и методы…………………………………………….....6

# 2.2. Определение механического состава почвы……………………...6

# 2.3. Определение кислотности почвы………………………………….7

# 2.4. Наличие карбонатов……………………………………………….7

# 2.5. Создание питательной среды для выращивания азотобактера....7

3. Этапы работы………………………………………………………...8

4. Результаты и их обсуждение………………………………………..9

5. Выводы……………………………………………………………….10

Заключение……………………………………………………………..11

Список литературы…………………………………………………….12

Приложение…………………………………………………………….1-13

**Введение**

Почва – это особое природное тело, которое образуется в течение длительного взаимодействия живой и неживой природы. Считается, что плодородие почвы зависит от наличия в ней плодородного, гумусового слоя. Чем больше толщина его горизонта, тем плодороднее будет почва. Этот процесс сложный и в нём участвуют различные микроорганизмы, которые насыщают почву кислородом, способствуют разложению мертвых органических веществ до минеральных. Немаловажную роль в образовании перегноя и улучшении свойств почвы играют и бактерии.

Выдающийся русский ученый — В.В. [Докучаев](https://geographyofrussia.com/dokuchaev-vasilij-vasilevich-2/) писал, что почва — «зеркало» природы. В её формировании участвуют: [горные породы](https://geographyofrussia.com/gornye-porody-i-ix-mnogoobrazie/),[рельеф](https://geographyofrussia.com/relef/), климат, воды, микроорганизмы, растения и животные.

Особая роль в процессе формирования почвы отводится растениям, для развития которых необходим азот. Известно, что его достаточно в воздухе, но растения не способны поглощать, так как представлен в виде газа. Молекула очень «прочная» и разорвать связь не так-то просто, поскольку им не хватает ферментов, которые могут фиксировать газ.

В почве азот представлен другими соединениями, которые проще усваиваются. Процесс фиксации азота в почве называется азотфиксацией, первой стадией азотного цикла. При фиксации азота он превращается в аммиак. В этом процессе участвуют микроорганизмы и бактерии. Это приводит к образованию клубеньков в корне растения.

**Азотфиксирующие**[бактерии](https://www.pesticidy.ru/dictionary/Bacterium)– это [бактерии](https://www.pesticidy.ru/dictionary/Bacterium), обладающие способностью к биологической азотфиксации, то есть связыванию [азота](https://www.pesticidy.ru/active_nutrient/nitrogen) атмосферы и переводу его в азотосодержащие соединения. [13].

Почвенные микроорганизмы делают большую работу по возвращению азота в почву. Наличие растворимых форм азота – важный лимитирующий фактор для всей экосистемы.

Человек, занимаясь возделыванием почвы и выращивая растения, решает важную задачу – обеспечения себя продуктами питания, в которых содержится азот. Следовательно, его растворимые формы должны находиться в достаточном количестве в почвах, используемых для земледелия.

Для определения различных штаммов бактерий исследователи выделяют их из различных типов почв, распространённых в разных уголках нашей страны.

Наша работа является частью большой программы «Атлас почвенных микроорганизмов», реализуемого учёными Новосибирского отделения РАН в ноябре 2021года.

Исследовательская программа «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов, как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами» реализуется в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019 – 2027 годы при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Исследовательская программа реализуется в целях проведения на территории Российской Федерации масштабных исследований с участием ведущих ученых и привлечением обучающихся для сбора образцов и анализа данных и результатов.

Эта тема нас заинтересовала и предоложила своё исследование почв на территориях Приморского края и применение известного метода на местном материале.

Цель: определить плодородие почв по наличию азотфиксирующих бактерий в почвах Надеждинского и Хасанского районов Приморского края.

Задачи:

1.Подобрать участки почв в Приморском крае, обладающие разной характеристикой с точки зрения антропогенной нагрузки (сельско-хозяйственного назначения, лесных массивов и прибрежных территорий).

2. Собрать образцы почв, проанализировать их физические и химические характеристики.

3. Выделить из почв культуры азотфиксирующих бактерий и описать их.

4. Дать рекомендации жителям районов о плодородии почв.

Гипотеза: предполагаем, что во всех отобранных образцах почвы, будут присутствовать азотфиксирующие бактерии.

Объект исследования — почва с участков Надеждинского, Партизанского и Хасанского районов Приморского края. Предмет исследования — азотфиксирующие бактерии.

**1. Литературный обзор**

Азотобактер — это род бактерий, живущих в почве и умеющих переводить газообразный азот в растворимую форму, которую уже потом могут усваивать растения.[1]. Азотобактеры называют свободноживущими азотфиксаторами. Они фиксируют молекулярный азот из атмосферы.

Эти бактерии приспособились жить в самых разных условиях. Они живут и в нейтральных, и в щелочных почвах. Их находят и в экстремальных условиях почв полярных регионов, и в арктическом, и в антарктическом регионах. Они спокойно живут и в пресноводных водоёмах, и в солоновато- водных болотах. И конечно, несмотря на свою независимость в азотфиксации, они все равно нередко образуют симбиотическую связь с растениями и живут в ризосфере .[14].

Известно несколько способов перевода азота в растворимую форму: под воздействием природных сил, биотической фиксации и синтеза в промышленных условиях. Первый способ не всегда оправдан, так как силы природы предсказать, стопроцентно, невозможно. Да и не на всех территориях нашей страны возможны эти явления природы ввиду разности в климатических показателях.

Второй способ предусматривает производство удобрений и он востребован как для сельскохозяйственных предприятий, так для населения, занимающегося огородничеством и садоводством. Но удобрения имеют свойства накопления в почве, при неразумном их применении, и, тогда возникает опасность их накопления в почве, что может небезопасным для потребления в пищу выращенных культур.

Следовательно, биотический способ фиксации для обогащения почв растворимыми формами азота будет наиболее приемлем. Возможно внесение бактериальных удобрений, содержащих азотофиксирующие бактерии (например, ризоторфина, нитрагина и азотобактерина) [6]. Однако, азотофиксаторы в почвах часто содержатся и без вмешательства человека.

Аэробные неспорообразующие грамотрицательные бактерии, фиксирующие молекулярный азот, были впервые выделены из почвы М.Бейеринком в 1901 году. Ученый дал им имя Azotobacter chroococcum. Уже само название говорит о том, что эти бактерии способны к концентрации азота, для них характерен коричневый пигмент – chroo и они создают кокковидные клетки – coccum. В 1903 году Лимпаном был охарактеризован еще один вид азотфиксирующих бактерий - Azotobacter vinelandii Lipman.

В 1904 году он охарактеризовал Azotobacter beijerinckii Lipman, название которого было дано в честь Мартина Бейеринка [10]. В середине XX века, в 1949 году, Н.А. Красильников охарактеризовал вид Azotobacter nigricans, Krasilnikov, который в 1981 году Томпсон и Скирман разделили на 2 подвида: Azotobacter nigricanssubsp. Nigricans Krasilnikov, и Azotobacter nigricanssubsp. Achromogenes Thompsonand Skerman. Практически в это же время эти ученые охарактеризовали вид Azotobacterarmeniacus Thompsonand Skerman. Позднее, в 1991 году, Пейджем и Шивпрасадом были описаны особенности вида Azotobacter salinestris Pageand Shivprasad [5]. Сначала их относили к семейству Azotobacter aceae Pribram, но чуть позднее их определили к Pseudomonadaceae на основании изучения нуклеотидных последовательностей РНК.

В 2004 году было проведено генетическое исследование и ученые выяснили, что Azotobacter vinelandii принадлежат к одному и тому же классу с бактерией Pseudomonas aeruginosa. В 2007 году ученые предположили близость родов Azotobacter, Azomonas и Pseudomonas. Род Azotobacter включал в себя такие виды как Azotobacter agilis (сейчас входит в состав рода Azomonas), Azotobacter macrocytogenes и Azotobacter [7].

Азотобактер - типичный представитель свободноживущих микроорганизмов. Свободноживущими называют те микроорганизмы, которые живут в почве без условий обязательного развития растений рядом.

Азотобактер – грамм отрицательная, аэробная, неспорооборазующая, гетеротрофная, несимбиотическая бактерия, способная к фиксации азота при обычных условиях окружающей среды.

Азотобактер образует крупные слизистые, они разных размеров, с неправильными формами. На плотных питательных средах, которые не содержат азот, колонии, вследствие старения, могут окрашиваться в розовый, коричневый (до чёрного), желтовато-зеленоватый, цвет. Причем, специфическая пигментация характерна для разных видов азотобактера.

В качестве источника азота азотобактер использует разнообразные органические (мочевина, различные аминокислоты) и минеральные (соли аммония, азотной и азотистой кислот) соединения. Но при развитии только за счет связанного в среде азота, он не выполняет своей главной функции — не фиксирует молекулярный азот. Обычная цифра фиксации на 1 г использованного источника углерода до 10—15 мг молекулярного азота.

Исследователи достигали выращивания азотобактера в чашках Петри с питательной средой без углерода и азота, только в том случае, когда чашки помещались в камеру с парами этилового спирта ацетона, или других органических соединений. Из атмосферы азотобактер может частично использовать углекислоту, если в лёгком доступе присутствуют углеродсодержащие соединения.

На развитие азотобактера влияет концентрация в воздухе углекислого газа до 0,5%. Известно, что, гораздо, лучше усваиваются азотобактером легкодоступные формы углеродсодержащих органических соединений. Так как в почве запас подвижного органического вещества небольшой, поэтому маленькое количество легкодоступных соединений углерода будет ограничивать развитие азотобактера в природных условиях. Что же использует азотобактер в почве?

Перегной азотобактером почти не усваивается. И, как бы почвы не были насыщены перегноем, это не повлияет на интенсивное образование азотобактера, если не будет свежих органических остатков. Если они в почве присутствуют и продукты распада растительных и животных клеток, тогда развитие идёт интенсивно. Особенно ускоряются эти процессы, если в почве есть остатки соломы и перегной из неё, а также содержимое компостных куч, содержащих целлюлозу.

Что касается уровня увлажнённости почвы, то азотобактер очень чувствителен к этому показателю, потому что он плохо переносит избыток увлажнения и процессы его образования могут замедлиться.

Оптимальные значения рН для развития азотобактера 7,2—8,2. Кислая среда губительно влияет на бактерию. Однако, неактивные формы могут выделяться, но у них будет утрачена возможность связывать молекулярный азот.

**2.Методика исследований**

2.1. Материалы и методы

Материалы:

1. Десять проб почв (для удобства им присвоены коды от 0601 до 0610):

- с огорода (после посева овса);

- с территории лиственного леса;

- с территории возле дома, от дороги десять метров.

4. с прибрежной зоны Амурского залива:

с территории с лесными насаждения в 2 км от дороги;

с территории смешанного леса;

с ровного поля, покрытого полынью;

с огорода (ровный участок);

с огорода (возвышенный участок);

с лесопарковой зоны у дороги.

2. Соляная кислота 0,1 М.

3.Пипетки Пастера на 1мл.

4. Перчатки.

5. Пробирки.

6.Лакмусовая бумага

1. Среда Эшби: карбонат кальция (CaCO3)-1г;агар- 3г;глюкоза- 4г.

8. Вспомогательный раствор:300-400 мл воды,соли- хлорид натрия (NaCl) -0,2; сульфит калия (K2SO4)-0,1; сульфат магния (MgSO4 ‧7H2O) – 0,2; калий фосфорнокислый однозамещенный (K2HPO4) – 0,2. Добавить в полученный раствор воду до одного литра.

9.Чашки Петри.

10. Вода дистиллированная – 1,0.

11. Материалы для окраски ( Фуксин Циля, тушь).

12.Зубочистки.

13. Химическая посуда, весы.

14.Микроскоп.

Методы:

1.Отбор проб методом прикопки (25-40 см)

2.Определение механического состава почвы

Для определения механического состава почвы почву смешивают с водой до получения вязкой массы, из которой надо попробовать скатать шарик, затем растянуть его в жгут и соединить в кольцо. В зависимости от типа почвы, при скатывании она:

а) не скатается в шарик – песчаная почва;

б) не скатается в шарик, но слепится в непрочные шарики – супесчаная почва;

в) образует непрочный шарик, который в жгут не раскатывается – легкосуглинистая почва;

г) образует сплошной жгут, который разламывается при соединении в кольцо – среднесуглинистая почва;

д) образует сплошной жгут, который покрывается трещинами при соединении в кольцо – тяжелосуглинистая почва;

е) образует сплошной жгут, который соединяется в кольцо – глинистая почва [10].

3. Измерение pH.

Водородный показатель (pH) среды является важной химической характеристикой, от которой зависит биоразнообразие населяющих ее организмов. Простейшим способом измерения pH является использование лакмусовой бумаги. С её помощью определяют кислотность среды почвенного раствора, для этого в пробирку насыпают небольшое количество почвы, оставшийся объём заполняется водой. Интенсивно встряхивать пробирку в течение пяти минут. Дождаться полного осаждения взвеси почвы на дно пробирки. Опустить индикаторную бумагу в почвенную вытяжку. Сравнить окрашивание со шкалой.

4.Определение наличия карбонатов.

С помощью пипетки наносится несколько капель соляной кислоты на почву. Если в почве находится значительное количество карбонатов, то будет наблюдаться вспенивание.

5.Приготовление вспомогательного раствора.

В 300-400 мл воды добавить соли- хлорид натрия (NaCl) -0,2; сульфит калия (K2SO4)-0,1; сульфат магния (MgSO4 ‧ 7H2O) – 0,2; калий фосфорнокислый однозамещенный (K2HPO4) – 0,2. Добавить в полученный раствор воду до одного литра.

6. Приготовление раствора Эшби: в химический стакан налить 200мл вспомогательного раствора. Добавить карбонат кальция (CaCO3)-1г; агар- 3г; глюкоза- 4г. Смесь вскипятить в микроволновке, охладить до пятидесяти градусов и разлить в чашки Петри, заполнив половину объёма.

7. Микроскопическое исследование образцов.

Отбирается небольшое количество биомассы из колоний с помощью зубочистки и наносится на предметное стекло, обработанное спиртовой салфеткой. Биомасса размазывается на предметном стекле площадью один квадратный сантиметр. Рядом наносится капля фуксина Циля и капля туши. Зубочисткой перемешиваются красители и биомасса до равномерного тонкого слоя грязно – розового цвета. Высушивается препарат в течение 10-20 минут.

**3.Этапы работы**

Для исследования были выбраны 10 образцов почв: с огорода (после посева овса), с территории лиственного леса, с территории возле дома, от дороги 10 метров, с прибрежной зоны Амурского залива, с территории с лесными насаждения в 2 км от дороги, смешанного леса, с ровного поля, покрытого полынью, с огорода (ровный участок), с огорода (возвышенный участок), с лесопарковой зоны у дороги.(Приложение №1).

Таким образом, изучаемые образцы были отобраны с территорий, испытывающих разную антропогенную нагрузку и с разной историей.

На первом этапе очищали отобранные образцы почвы от корней, мелких включений и измельчали почву во избежание комков. Из образцов подготовленной почвы определили механический состав почвы почвы, смешав её с водой до получения вязкой массы, из которой опробовали скатывать шарик, растягивать его в жгут и соединять в кольцо.

С её помощью лакмусовой бумаги определяли кислотность среды почвенного раствора. Опуская индикаторную бумагу в почвенную вытяжку и сравнивали окрашивание со шкалой.

Внесение нескольких капель соляной кислоты на почву позволило нам увидеть реакцию или её отсутствие в различных образцах почвы.

Для культивирования бактерий была использована среда Эшби, она помещалась на чашки Петри. Бактерии культивировались при температуре 24˚C в течение десяти суток. Выросшие на чашках Петри колонии фотографировались, в результате чего было посчитано процентное отношение площади чашки Петри, покрытой колониями, ко всей ее площади на протяжении всех десяти дней наблюдения. Затем выросшие колонии просматривались под бинокуляром на х40.

**4.Результаты исследования и их обсуждение**

Результаты исследования мы фиксировали в лабораторном журнале «Результаты определения азотфиксирующих бактерий в почвах Приморского края», ноябрь- декабрь 2021год. (Приложение № 2).

Определение механического состава почвы показало: среднесуглинистая почва у шести проб: номера- 1,3,4,6,8,9; легкосуглинистая - у двух проб, номера 2 и 10; тяжелосуглинистая – одна проба. номер 7; глинистая – одна проба, номер 5. В итоге, мы обнаружили, что большинство образцов почвы являются суглинистыми. (Приложение № 3, диаграмма № 1)

Уровень pH во всех десяти пробах почвы в пределах 5–6 единиц, что соответствует слабокислым почвам.(Приложение № 4,диаграмма № 2).

Карбонаты обнаружены в двух пробах из десяти, номера: 5 и 7, что составило 20% (Приложение № 5, диаграмма № 3).

После посева комочков почвы мы проводили наблюдения за процессом прорастания азотобактера. (Приложение № 6).

При выращивании азотфиксирующих бактерий методом почвенных комочков, на среде Эшби из десяти проб, взятых на территориях Надеждинского, Партизанского, Хасанского районов и г. Артёма, в семи мы наблюдали обрастания. Три пробы обрастаний не дали: №2,5,6. (Приложение №7). Причём, первые появились в трёх чашках на четвёртый день. В одной чашке (№3) 100% обрастаний (г. Артём). На десятый день % обрастания в семи образцах составил от 8 до 100%. Из них: в четырёх чашках (№1,3,7,8) – 100%. Средние показатели у образцов №9,10 – 48-56%. Наименьший процент обрастания наблюдался у одного образца: №4 – 10%. (Приложение №8, диаграмма №4). Рост бактерий происходил при температуре 20-25°C.

На четвёртые сутки культивирования колонии были маленькими (3-4 мм в диаметре), на 7-10 сутки достигали 5-7 мм, форма колоний приподнятая, округлая, края ровные, гладкие, маслянисто-блестящие, беловатые, полупрозрачные, сильно ослизненные.

На девятые сутки их культивирования происходило образование коричневого пигмента у трёх образцов (№3,7,8).

У образцов №3 и №7, посев которых осуществлялся на чистую среду Эшби, формировались колонии значительно меньшего размера, правильной округлой формы, сильно слизистые, растекающиеся колонии, форма колоний  приподнятая,  край и поверхность – гладкие.

Микроскопическое исследование образцов позволило установить следующее: выявлено наличие типичных колоний штаммов азотобактера в семи образцах почв. Все они имеют разную форму и размеры (Приложение № 9).

Наше исследование показало, что из десяти проб почв, взятых на территориях Надеждинского, Партизанского и Хасанского районов Приморского края, у семи обнаружены азотфиксирующие бактерии. Активность обрастания разная.

Полученные из почв азотофиксирующие бактерии по морфологическим признакам могут быть идентифицированы как *Azotobacter*, однако различия в морфологии колоний и количестве колоний, выросших при одинаковых условиях и времени культивации, свидетельствуют о том, что для каждого образца почвы характерны свои штаммы бактерий.

Наше исследование позволяет сделать определённые выводы, согласно поставленной цели с дальнейшей постановкой задач по использованию полученного азотобактера для повышения урожайности сельскохозяйственных культур, роста и развития комнатных растений.

Вместе с тем при определенных условиях азотобактер улучшает рост растений. В этом можно убедиться, если в условиях монобактериальной культуры семена растений обработать культурой азотобактера. Объясняется это тем, что азотобактер синтезирует много биологически активных соединений. Комплекс этих веществ способен стимулировать прорастание семян растений и ускорять их рост в благоприятных условиях среды.

**5. Выводы**

1. Образцы почв взяты из разных участков Приморского края, проанализированы их физические и химические характеристики.

2. Из образцов выделены и описаны культуры азотфиксирующих бактерий.

3. Гипотеза, выдвинутая нами в начале исследования, не подтвердилась, так как не все десять проб почвы показали наличие азотобактера.

4. Интенсивность роста азотобактера разная. Замедленный процесс роста азотобактера наблюдался у двух образцов почв.

5. Четыре образца почв показали 100% обрастания.

6. Разные участки почв в Надеждинском, Партизанском и Хасанском районах Приморского края обладают разной характеристикой с точки зрения антропогенной нагрузки.

7 Рекомендации жителям районов, занимающимся огородничеством:

- использовать материалы исследования для расширения личного опыта по обогащению почв азотфиксирующими бактериями;

- учитывать тот факт, что азотобактер тяготеет к нейтральным почвам и плохо переносит подкисление;

- для определения состояния почвенного покрова использовать способ измерения pH с помощью лакмусовой бумаги.

Рекомендации педагогам школы:

- использовать результаты исследования на уроках биологии, географии при изучении темы «Почвы» и во внеурочной деятельности.

**Заключение**

В результате работы были отобраны десять образцов почв, различающиеся по своему механическому составу, антропогенной нагрузке, из которых были выделены азотофиксирующие бактерии.

Высокая требовательность к внешним факторам делает распространение азотобактера весьма ограниченным. В кислых подзолистых почвах бактерия практически не встречается, а выделенные немногочисленные колонии оказываются ослабленными. В серых лесных почвах в летний период, когда почва в достаточной степени увлажнена и устанавливается благоприятный температурный режим, количество азотобактера имеет наибольшее значение. В хорошо окультуренных огородных почвах азотобактер обычно находиться в значительных количествах. Таким образом, азотобактер может служить индикатором степени окультуренности почвы.

В нашем исследовании азотфиксирующая культура Azotobacter произрастала в анализируемых почвах по-разному, наблюдались различия в скорости роста, количестве колоний.

На основании полученных данных можно предположить, что Azotobacter может фиксироваться в различных типах почв, но уровень его наличия будет зависеть от условий окружающей среды.

Почвенные микроорганизмы являются наиболее чувствительными индикаторами изменения почвенно-экологических условий. Особую роль в формировании и поддержании плодородия почвы играют азотфиксирующие микроорганизмы, которые трансформируют недоступный для растений молекулярный азот атмосферного воздуха в связанный. Многими авторами [6, 7,11] также показано, что азотобактер может быть использован как индикатор экологического состояния почвенного покрова, поскольку развивается только в среде с нейтральным и слабощелочным значением pH.

В ходе выполнения исследования мы значительно расширили свои знания и навыки работы. Был также получен опыт работы под руководством, когда для выполнения задания ставятся конкретные задачи и сроки их выполнения, и опыт разделения текущей работы не просто пополам, а на определенные части, которые выполнялись индивидуально, т.е. каждый был ответственен за их качество и скорость выполнения.

Работа над развитием данной темы будет продолжаться с определением тем для каждого участника исследования.

**Список литературы**

1. Азотобактер: Википедия. Свободная энциклопедия. – URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Азотобактер (дата обращения: 10.01.2021).

2. Азотистые удобрения: Википедия. Свободная энциклопедия. –URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Азотистые_удобрения> (дата обращения: 10.01.2021).

3. Бактериальные удобрения: Википедия. Свободная энциклопедия. – URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Бактериальные_удобрения> (дата обращения: 10.01.2021).

4. Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв, М. ИКЦ «Академкнига», 2002, 282 с.

5. Игнатов В.В. Биологическая фиксация азота и азотфиксаторы // Сорос. образоват. журн. — 1998. — № 9. — С. 28–33.

6. Логинов О.Н. Бактерии Pseudomonas и Azotobacter как объекты сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Наука, 2005, - 166 с.

7. Мишустин, Е. Н. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. М.: Наука,2013. – 240 с.

8.Методические рекомендации и инструкции по применению набора «Охотник за микробами».

9. Методические указания для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Почвоведение» для студентов очной формы обучения направления подготовки бакалавриат 35.03.10 Ландшафтная архитектура – Н. Новгород, ННГАСУ, 2016. – 24 с.

10. Новикова Н. И. Современные представления о филогении и систематике клубеньковых бактерий // Микробиология. – 2016. – № 4. – С. 437 – 450.

11. Статья об азотфиксирующих бактериях: среда обитания, функции. — Текст: электронный // fb.ru: [сайт]. — URL: https://fb.ru/article/225017/azotfiksiruyuschie-bakterii-sreda-obitaniya-funktsii Информационное письмо № 1 «Охотники за бактериями: азотфиксаторы» Научный журнал «Молодой ученый».

12. [История открытия азотфиксирующих бактерий — Биологическая энциклопедия (gufo.me)](https://gufo.me/dict/biology_encyclopedia/%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%B8%D1%8F_%D0%BE%D1%82%D0%BA%D1%80%D1%8B%D1%82%D0%B8%D1%8F_%D0%B0%D0%B7%D0%BE%D1%82%D1%84%D0%B8%D0%BA%D1%81%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%8E%D1%89%D0%B8%D1%85_%D0%B1%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%B9).

13. https://www.pesticidy.ru/dictionary/Nitrogen\_fixing\_bacteria.

14. https://noparasites.ru/protozojnye-organizmy/azotobakter.html.

15. https://dic.academic.ru/dic.nsf/enc\_biology/1265/Азотобактер.

**Приложение №1.**

**Сбор проб почв (прикопки) на разных территориях Приморского края**

****

Надеждинский район, п. Новый. Координаты: 43.363972; 132.014238



с. Вольно – Надеждинское.Координаты:43.379383, 131.998658

****

с. Вольно – Надеждинское. Координаты: 43.22474; 131.59484

****

Надеждинский район, СНТ «Селяне». Координаты: 43.3835131, 132.0621376



г. Артем.Координаты: 43.28066 С, 132.05133 В



Надеждинский район, п. Шмидтовка.

Координаты: 43.318054,131.998636



Надеждинский район, с.Прохладное.

Координаты: 43.340776, 132.031411



Партизанский район, садовое товарищество «Заповедный».

Координаты: 2.734359; 133.157533



Хасанский район, п-ов Брюсса, прибрежная зона Амурского залива

.

Координаты: 42.877865; 131.468391



Надеждинскийрайон, с. Вольно – Надеждинское.

Координаты: 43.37054; 132.0067

**Приложение №2.**

**Лабораторный журнал**

«Результаты определения азотфиксирующих бактерий в почвах

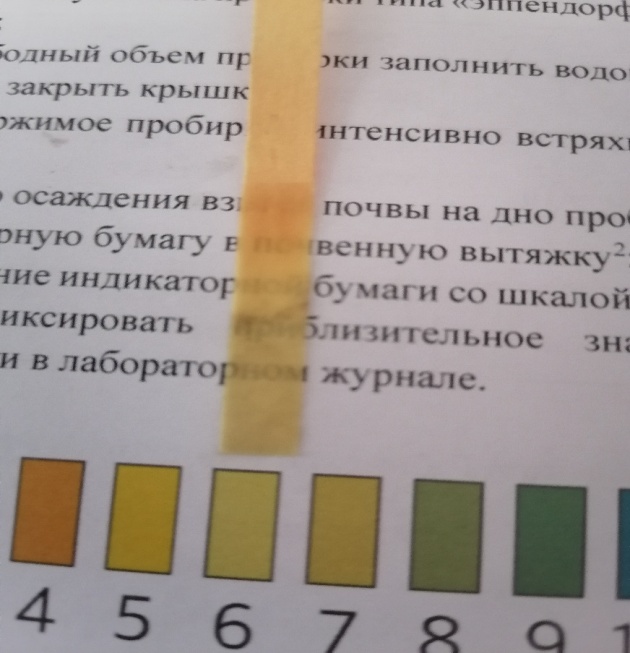
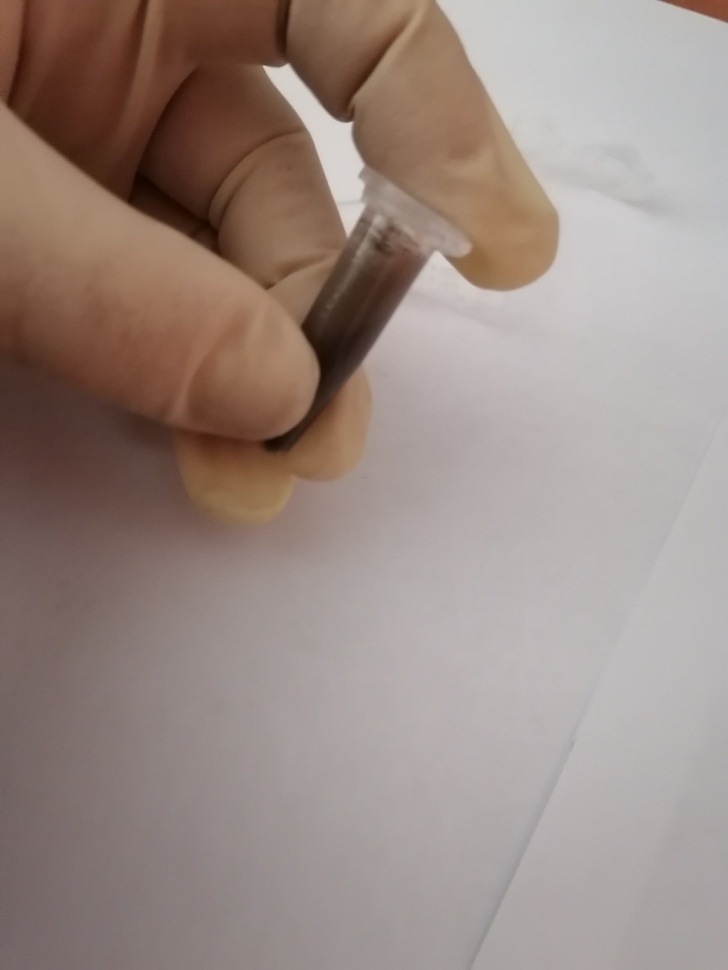
Приморского края», ноябрь- декабрь 2021год

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Но  мер об  разца | Дата сбора образца/  глубина | Место сбора/GPS –координа  ты | Вид расти  тель  ности в месте при  копки | Характеристики почвы | | | Количество обрастаний (кол. (%)/)  дни | | | | | | | | | |
| Механический сос  тав | pH | На  ли  чие карбо  на  тов | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 1 | 07.11.  2021  30см  IMG_20211127_095213 | Приморс  кий край Надежди  нский район,  п. Новый  43.363972;  132.014238 | Рельеф равнин  ный, огород (после посева овса) | Средне  сугли  нис  тый | 6 | - | 0 | 0 | 0 | 44/  88 | 50/  100 | 50/  100 | 50/  100 | 50/  100 | 50/  100 | 50/  100 |
| 2 | 01.11.2021  25см  IMG_20211127_095220 | с. Вольно – Надеждинс  кое  43.37054;  132.00671 | Лиственный лес | Лег  косугли  нис  тый | 5 | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 10.11.2021  30см  IMG_20211127_095226 | г. Артем 43.28066 С,  132.05133 В | Ровная территория возле дома, от дороги 10 метров | Средне  сугли  нис  тый | 5 | - | 0 | 0 | 0 | 50/  100 | 50/  100 | 50/  100 | 50/  100 | 50/  100 | 50/  100 | 50/  100 |
| 4 | 06.11.2021  30см  IMG_20211127_095233 | Хасанский район, п-ов Брюсса,  прибрежная зона Амурского залива  42.877865;  131.468391 | Прибрежная зона равнин  ная, с травянистой расти  тельно  стью | Средне  сугли  нис  тый | 5 | - | 0 | 0 | 0 | 3/  6 | 5/  10 | 5/  10 | 5/  10 | 5/  10 | 5/  10 | 5/  10 |
| 5 | 20.11.2021  30см  IMG_20211127_095240 | Надеждинс  кий район, СНТ «Селяне»  43.3835131,  132.0621376 | Лесные насаждения в 2 км от дороги | Гли  нис  тый | 5 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 05.11.2021  30см  IMG_20211127_095245 | Партизанс  кий район, садовое товарищес  тво «Заповед  ный»  42.734359;  133.157533 | Смешанный лес | Средне  сугли  нис  тый | 4 | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 12.11.2021  30см  IMG_20211127_095252 | Надеждинс  кийрайон,  с.Прохлад  ное  43.340776,  132.031411 | Ровное поле, покры  тое по  лынью | Тяжело  суглинис  тый | 5 | + | 0 | 0 | 0 | 20/40 | 32/64 | 36/72 | 50/100 | 50/100 | 50/100 | 50/  100 |
| 8 | 16.11.2021  30см  IMG_20211127_095257 | Надеждинс  кий район,  с. Вольно – Надеждинс  кое  43.379383,  131.998658 | Ровный, разрабо  танный участок (огород) | Средне  сугли  нис  тый | 5 | - | 0 | 0 | 0 | 30/60 | 49/98 | 50/100 | 50/100 | 50/100 | 50/100 | 50/  100 |
| 9 | 10.11.2021  30 см  IMG_20211127_095304 | Надеждинс  кий район,  П. Шмидтовка  43.318054,  131.998636 | Возвы  шенный | Средне  сугли  нис  тый | 5 | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 4/8 | 10/20 | 24/48 | 24/48 | 24/48 | 24/  48 |
| 10 | 13.11.2021  20см  IMG_20211127_095309 | Надеждинский район,  с. Вольно – Надеждинс  кое  43.22474;  131.59484 | Лесопарковая зона у дороги. | Лег  косугли  нис  тый | 5 | - | 0 | 0 | 0 | 10/20 | 27/54 | 28/56 | 28/56 | 28/56 | 28/56 | 28/  56 |

Приложение №3. Определение механического состава образцов почвы

Приложение №4.Определение уровня pH



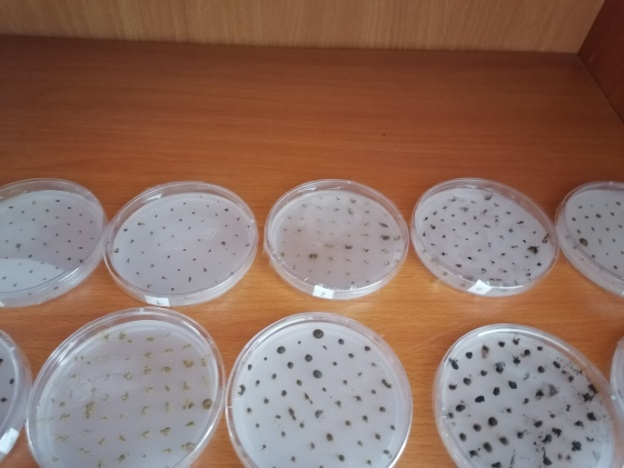
Приложение №5. Наличие карбонатов



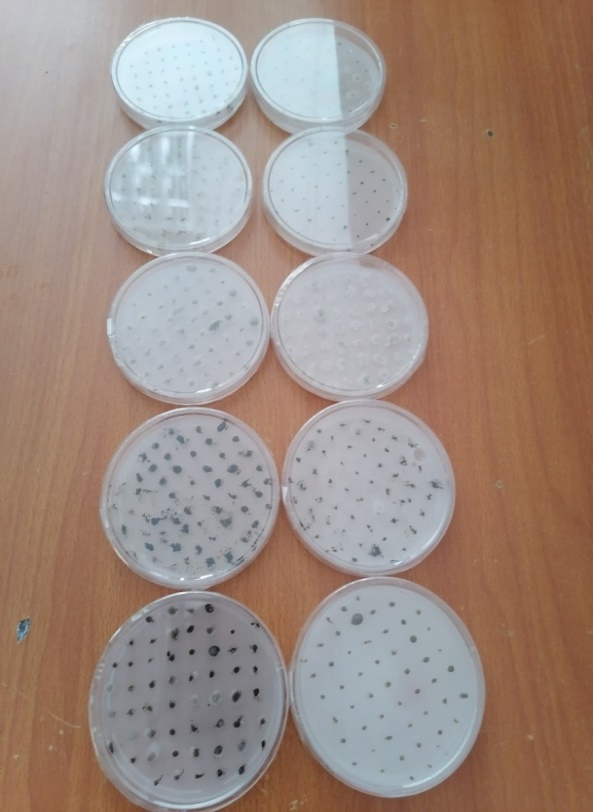
Приложение №6. Посев комочков почвы и наблюдение



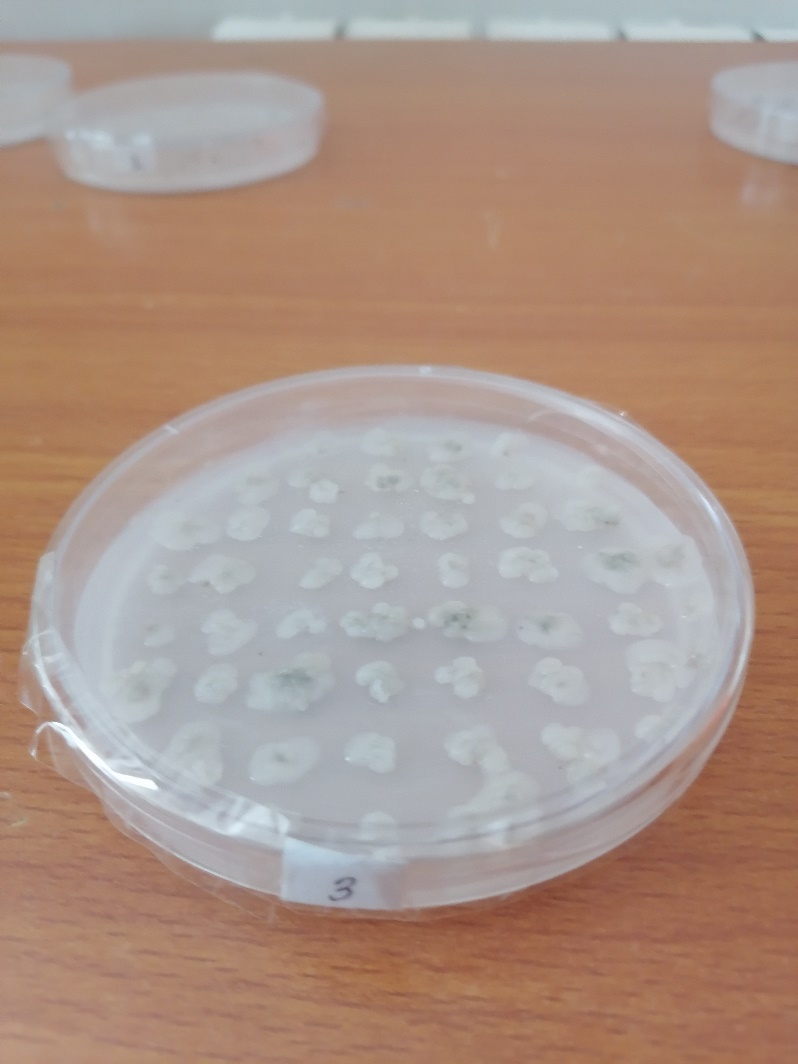
Приложение №7. Выращивание азотфиксирующих бактерий методом почвенных комочков, на среде Эшби

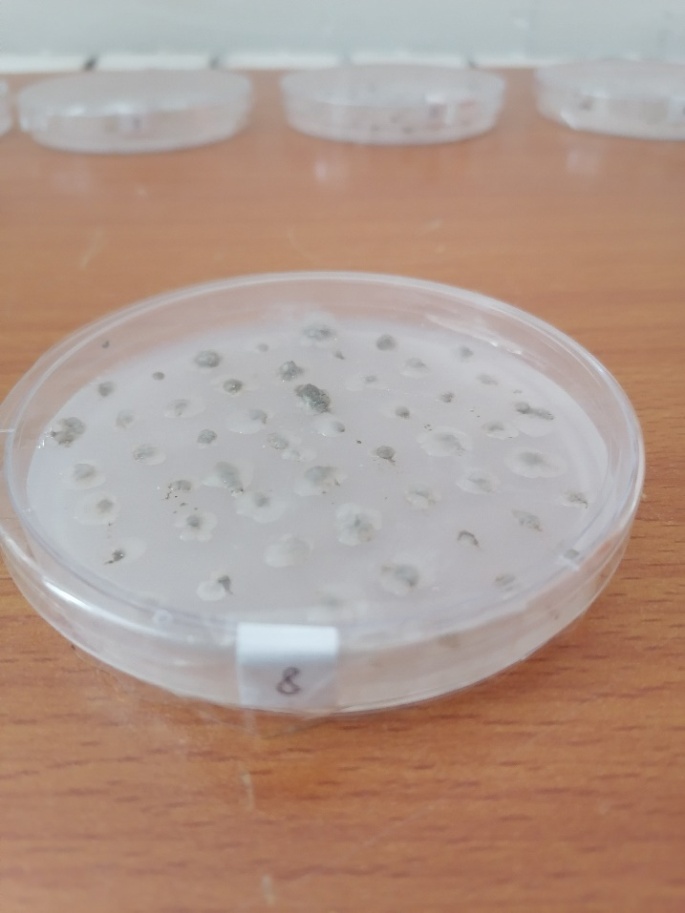
Второй день Четвёртый день

Седьмой - десятый дни

Приложение №8. Образцы со 100% обрастания



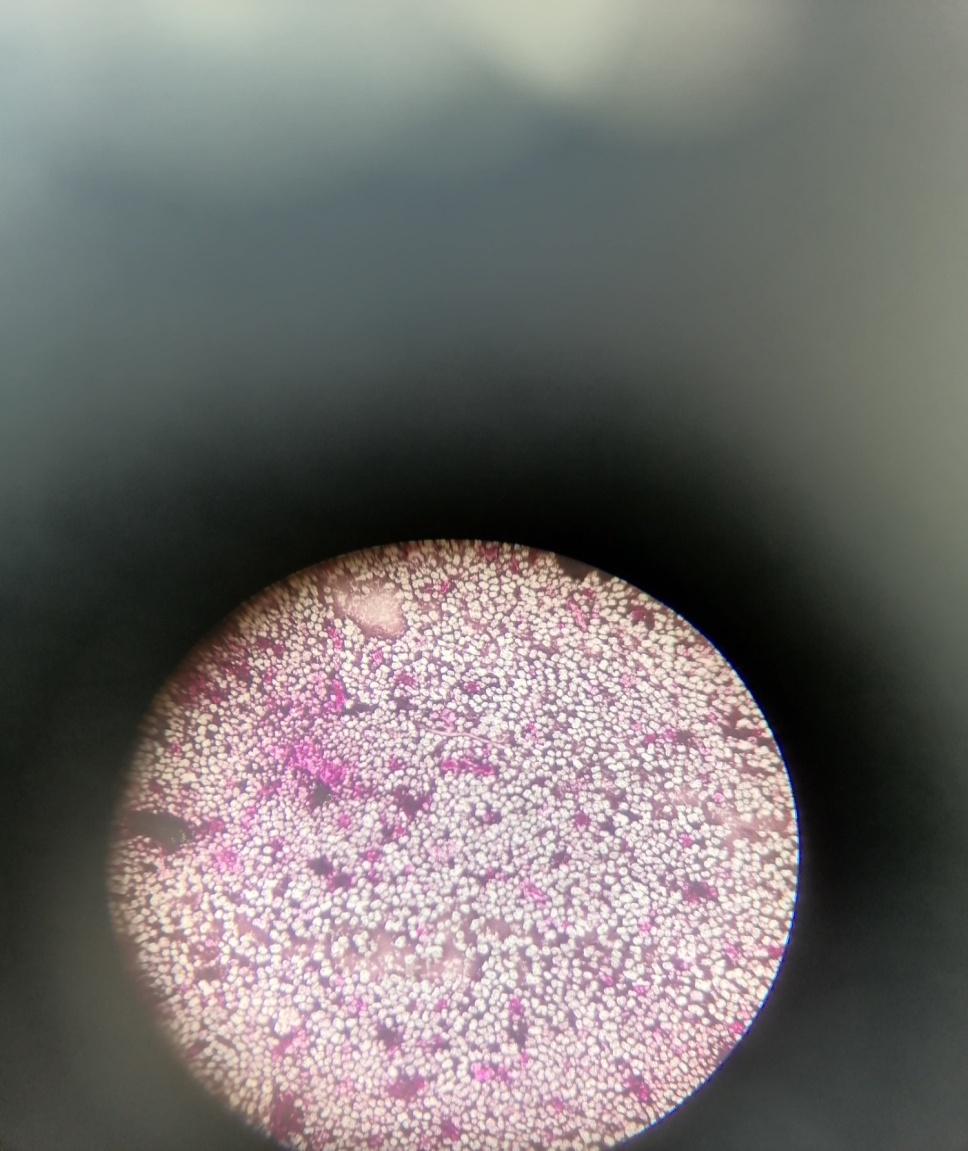
№1 №3

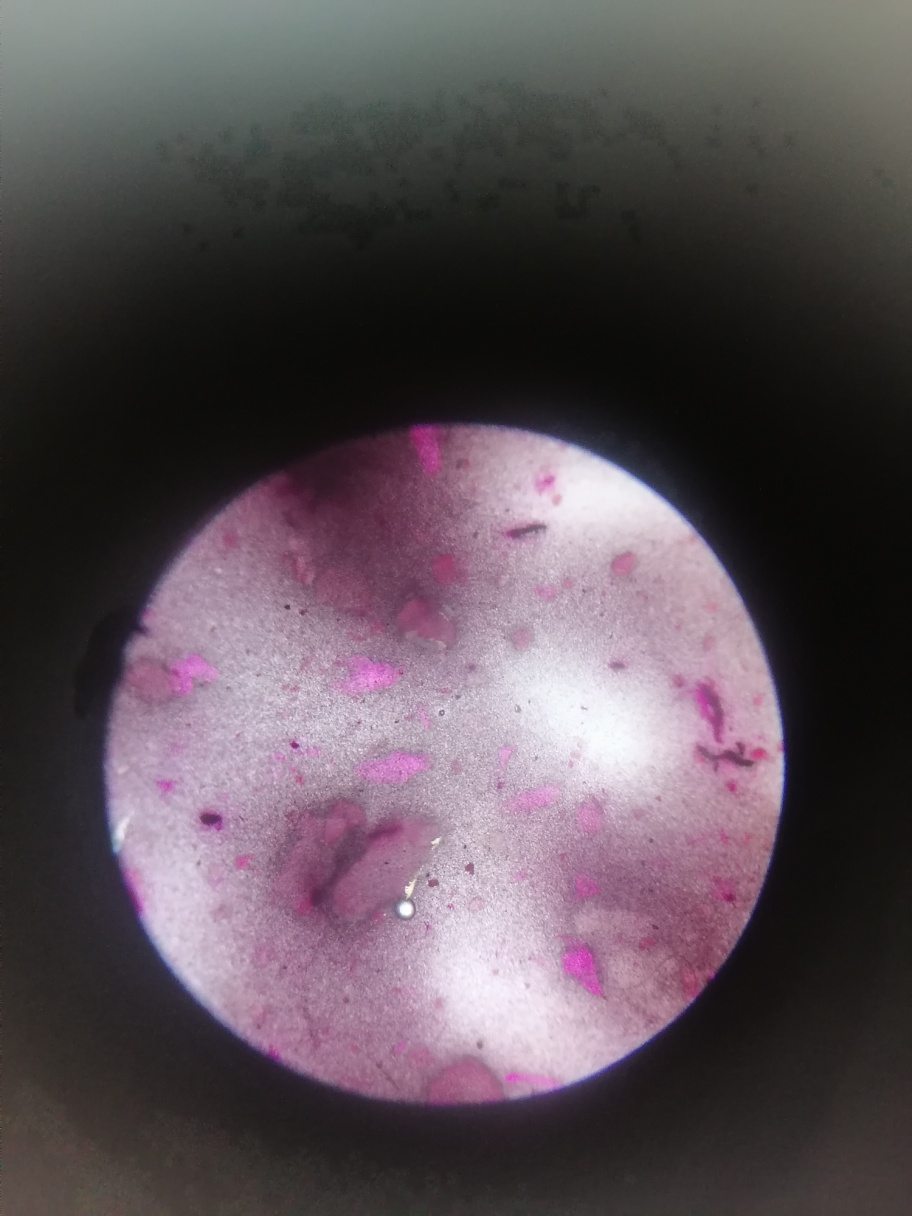
№7 №8

Приложение №9

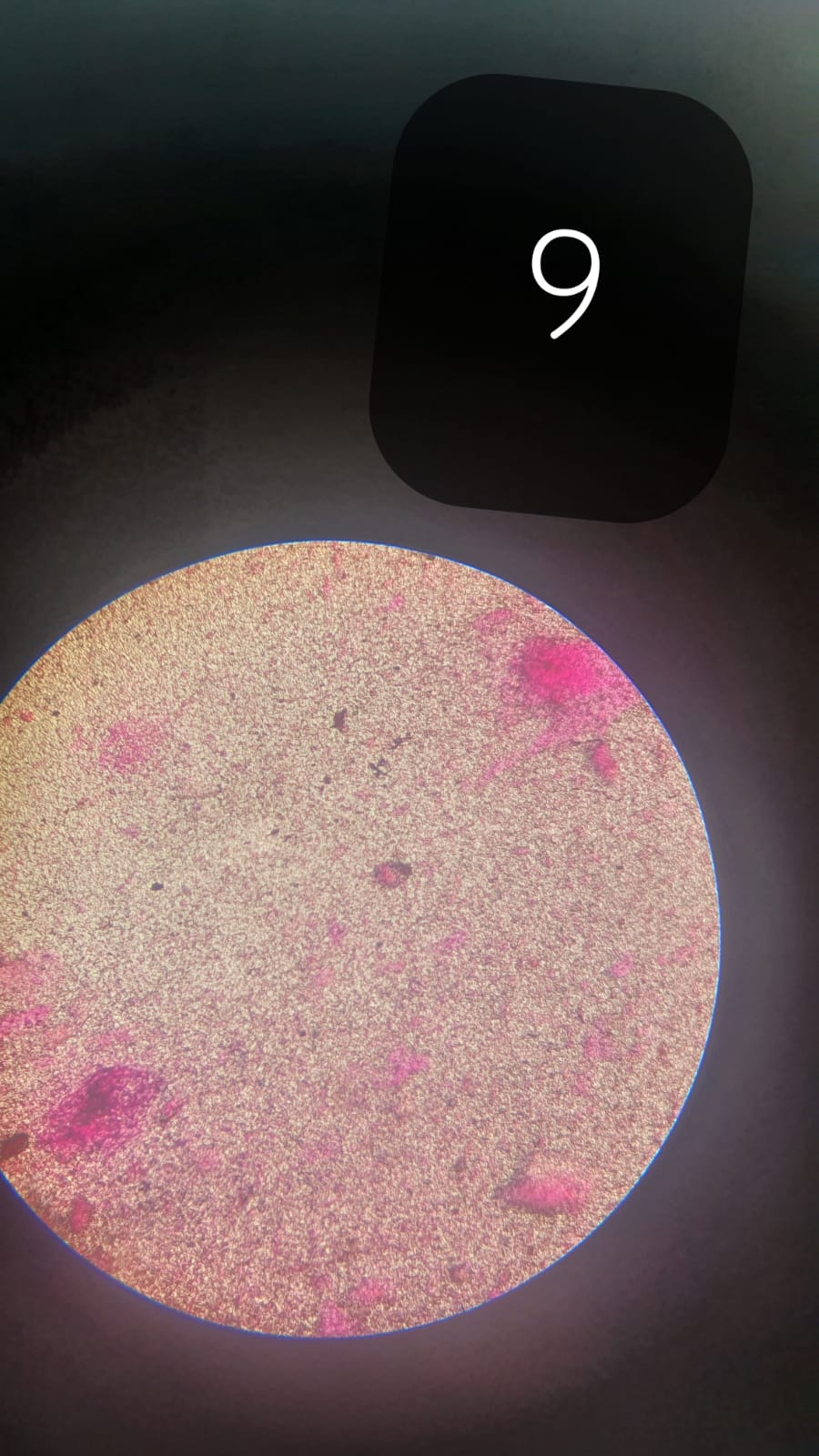
Подготовка азотобактера для

расматривания под микроскопом Образец №1  

Образец №3 Образец №4

Образец №7 Образец №8

Образец №9 Образец №10

Диаграмма №1 «Механический состав почвы»

Диаграмма№2 «Определение pH почвы»

Диаграмма№3 «Наличие карбонатов»

Диаграмма №4« Количество обрастаний азотобактера»