

АУ ДО РА «РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО  
ОБРАЗОВАНИЯ»,  
ДЕТСКИЙ ТЕХНОПАРК КВАНТОРИУМ-04

РЕСПУБЛИКА АЛТАЙ

Г. ГОРНО-АЛТАЙСК

творческое объединение «7СОТ: биопроектирование»

Направление исследования «Юные исследователи»

**ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ПОЧВЕННОГО МИКРОБИОМА  
ПРИРОДНЫХ КОМПЛЕКСОВ РЕСПУБЛИКИ АЛТАЙ**  
(исследовательская работа)

Авторы:

Анастасия Янисовна Третьякова,  
Владислава Васильевна Казагачева

7 класс, МБОУ «Гимназия №3  
«Гармония» г. Горно-Алтайска»

Сурлай Шульмусовна Янкинова, 8 класс  
БОУ РА «Республиканская гимназия  
им. В.К. Плакаса»

Руководитель:

Анастасия Николаевна Малкова,  
к.б.н., педагог дополнительного  
образования

АУ ДО РА «Республиканский центр  
дополнительного образования»

2022 г.

## Оглавление

Введение	3
Глава 1. Методика исследований	4
Глава 2. Результаты исследований	6
Выводы	10
Приложение	12

## ВВЕДЕНИЕ

В нашей лаборатории «Биоквантум» детского технопарка Кванториум-04 изучение бактерий рода *Azotobacter* проводится уже не первый год в рамках общероссийского проекта «Охотники за микробами» и «Атлас почвенных микроорганизмов».

Бактерий *Azotobacter* являющихся основными природными стимуляторами здорового роста и развития растений. Первые публикации исследований азотфиксирующих бактерий на территории Горного Алтай принадлежат нашей группе обучающихся детского технопарка Кванториум-04 [1, 2].

В 2021-2022 учебном году исследованиями были охвачены четыре природные провинции Алтая: Центральный, Юго-Восточный, Северный и Северо-Восточный Алтай, шесть типов почв из восьми основных, которые характерны для территории Республики Алтай. В результате наших исследований некоторые сложности возникли в обнаружении бактерий рода *Azotobacter* в супесчаных, легко- и среднесуглинистых горнотундровых почвах Юго-Восточного Алтая, т.е. за период исследований в посевах из этих проб колонии бактерий не выросли.

Потому, мы поставили перед собой **цель**: проведение оценки качества почв на присутствие в них азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter* с помощью подбора разных качественных методик.

### **Задачи:**

1. С помощью литературных источников изучить разные методики изучения активности микробиома почв и выбрать наиболее интересные и доступные для проведения наших исследований.
2. Провести ряд тестов для оценки активности почвенного микробиома.
3. Осуществить эксперимент по оптимизации питательной среды для выявления азотфиксирующих бактерий в «пустых» пробах.
4. Сделать выводы по работе.

**Гипотеза:** возможно для обнаружения азотфиксирующих бактерий в «пустых» пробах почв необходимо усилить питательную среду дисахаридами. Подбор соответствующих методик выявления активности микробиома почв позволит составить более полное представление о почвенной микросистеме.

Исследования проводились в апреле - июне 2022 года. Часть материала, по оптимизации питательной среды, уже докладывалась Анастасией Третьяковой на Межрегиональном форуме юных исследователей - 2022 г. Новосибирск (научоград Кольцово), где работа заняла третье место.

## ГЛАВА 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для проведения оценки активности почвенного микробиома нами изучены и проведены следующие методы: редуктазная проба, каталазная активность и фитотест.

Редуктазная проба - тест основан на обесцвечивании органического красителя, метиленового синего, в присутствии фермента редуктазы, выделяемой бактериями в процессе их жизнедеятельности. Редуктазы это комплексные ферменты способствующие окислительно-восстановительным процессам дыхания и брожения микроорганизмов. На основе активности работы фермента можно сформулировать вывод об активности микроорганизмов в почве.

Описание метода. Сделать почвенную вытяжку: 4 мл почвенного раствора вносим в 10-мл пробирки, добавляем 1 мл готового 0,01% раствора метиленового синего. Концентрат метилена синего 50 мл /100 мл воды разводим из расчёта 200 мл дистиллированной воды/1 мл метилена синего.

В качестве контроля в одной пробирки смешиваем метиленовый синий с водой.

Фиксируем изменения интенсивности голубого цвета через 5, 15, 30, 45, 60 минут. Если визуальные изменения не произойдут - фиксируем динамику цвета через 12 и 24 часа.

На всех этапах - фотографируем пробирки на белом фоне, беря в качестве результативного фото с явными изменениями.

Оценка каталазной активности. Каталазную активность оценивали с помощью эксперимента с перекисью водорода. *Каталаза* — окислительно-восстановительный двухкомпонентный фермент, непосредственно не участвующий в окислительных реакциях, но тесно с ними связанный. Каталаза разлагает перекись водорода (которая образуется в процессе дыхания клетки и весьма ядовита для неё) на воду и молекулярный кислород [3]. Подробное описание использованной нами методики исследования можно посмотреть перейдя по следующей ссылке: <https://cloud.mail.ru/public/85w6/6JQJmFak>.

Для фитотеста использовали кресс-салат, который проращивали в чашках Петри на растворах вытяжек соответствующих почв, которые были взяты для экспериментов. В качестве контроля использовали дистиллированную воду. В каждую чашку Петри помещали по 30 семян кресс-салата. По итогам фитотеста - можно учесть фитомассу (взвесив молодые ростки) и/ или длину ростков (замерив каждый линейкой в мм).

### Оценка активности бактерий рода *Azotobacter*

Для выращивания азотфиксирующих бактерий обычно используют среду Эшби [4, 5]. Мы проводили эксперименты по выращиванию бактерий на среде Эшби, на этой же среде с заменой глюкозы на сахарозу. Для этого мы брали сахарную пудру. Рецепт для третьей среды: дистиллированная вода 200 мл, MgSO 0,2 г, агара 3г, сахароза 4 г.

В результате эксперименты на редуктазную и каталазную активность и фитотест провели с 20 пробами почв, взятых ранее с определённых участков Центрального, Юго-Восточного, Северного и Северо-Восточного Алтая [2] (приложение 1). Нумерация проб согласно лабораторному журналу. Оценку активности азотфиксирующих бактерий провели с пробами почв, в которых у предыдущих исследователей не выявлено активности данных микроорганизмов. Это три пробы с территории Сайлюгемского национального парка Юго-Восточный Алтай. В качестве контроля взяли самые активные пробы от предыдущего эксперимента - эта с участка поймы реки Катунь Северный Алтай.

## ГЛАВА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЧВ ЦЕНТРАЛЬНОГО, ЮГО-ВОСТОЧНОГО, СЕВЕРНОГО И СЕВЕРО-ВОСТОЧНОГО АЛТАЯ

Исследованиями охвачены четыре природные провинции Алтая: центральная, юго-восточная, северная и северо-восточная. Это наиболее полно представленные провинции на территории Республики Алтай. Северо-восточная провинция заходит на территорию Республики Тыва. А северная начинается в Алтайском крае. Юго-восточная провинция протягивается на восток в Монголию.

За счёт исследования доступных нам проб почв нам удалось изучить шесть типов почв из восьми основных, характерных для территории Республики Алтай: аллювиальные засоленные почвы, горнолесные бурые и чернозёмовидные, лугово-чернозёмные, горнолесные серые оподзоленные почвы, горнотундровые, горнотундровые южные обыкновенные типичные почвы.

По механическому составу типы почв в основном характеризуются как легко- и среднесуглинистые. Тяжелосуглинистые встречаются только в Центральном Алтае в горнотундровых обыкновенных типичных почвах. Супесчанники, наряду с легко- и среднесуглинистыми характеризуют горнотундровые почвы Юго-Восточного Алтая. Песчаные почвы характерны для поймы реки Катунь – это аллювиальные засоленные почвы Северного Алтая.

### 2.2. ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЧВ И АКТИВНОСТЬ ПОЧВЕННОГО МИКРОБИОМА

Из химических показателей почвенные пробы проверены на присутствие карбонатов, наличие свободного водорода (кислотность почв), электропроводность и количество нитратов. Карбонаты обнаруживаются в аллювиальных засоленных почвах поймы реки Катунь (Северный Алтай), которая дольше всего в весеннее время находится под водой, и в супесчаных горнотундровых почвах Юго-Восточного Алтая, которая в доисторическое время представляла собой морское дно. Все пробы по рН показателю указывают на подкисленную среду, лишь в тех типах почв, где обнаруживаются карбонаты показатель близок к нейтральному.

Степень минерализации не высокая за исключением супесчаных горнотундровых почв юго-восточного Алтая, где равна 10 мСм.

Редуктазная проба - тест основан на обесцвечивании органического красителя, метиленового синего, в присутствии фермента редуктазы, выделяемой бактериями в процессе их жизнедеятельности.

Варианты различных характеров смены окраски индикатора в случае редуктазного теста с различными почвенными фильтрами и чистыми культурами бактерий показывает разную степень активности биома, но в целом через сутки во всех почвенных вытяжках произошли изменения, что говорит

присутствии микроорганизмов и их активности (таблица 1, приложение фото 1, 2).

Таблица 1

Редуктазная активность почвенных проб

№	Время редуктазной активности (мин)						
	5	15	30	45	60	720 (12ч.)	1440 (24 ч.)
1						+	+
2						+	+
3			+	+	+	+	+
4			+	+	+	+	+
5		+	+	+	+	+	+
6						+	+
7		+	+	+	+	+	+
8						+	+
9						+	+
10				+	+	+	+
11				+	+	+	+
12					+	+	+
14							+
16			+	+	+	+	+
17			+	+	+	+	+
18				+	+	+	+
19			+	+	+	+	+
20			+	+	+	+	+
21						+	+
22		+	+	+	+	+	+
конт роль							

Оценка каталазной активности показала, что во всех исследуемых почвах микроорганизмы активно вырабатывают фермент каталазу, таблица 2 (приложение, фото 3). Высокая скорость реакции на каталазную активность выражена в пробе почвы как раз Сайлюгемского национального парка - проба №10, наименьшая в одной из проб почв Катунского биосферного заповедника - это проба №20.

Таблица 2.

## Каталазная активность микроорганизмов в почвенных пробах

№	S(л)	t(час)	V(л/ч)
1	0,007	0,083	0,084
2	0,0152	0,1	0,152
3	0,0076	0,083	0,092
4	0,0088	0,067	0,131
5	0,0169	0,15	0,113
6	0,0104	0,083	0,125
7	0,0041	0,1	0,041
8	0,0107	0,1	0,107
9	0,0191	0,13	0,147
10	0,0243	0,15	0,162
11	0,0044	0,067	0,066
12	0,0043	0,083	0,052
14	0,0039	0,1	0,039
16	0,0115	0,12	0,096
17	0,0045	0,083	0,054
18	0,005	0,083	0,060
19	0,004	0,083	0,048
20	0,001	0,033	0,030
21	0,0066	0,083	0,080
22	0,0072	0,083	0,087

Для фитотеста берём семена исследуемых тест-растений (в нашем случае кресс-салат) и отсчитываем по 30 шт на каждый образец исследуемого почвенного раствора (водного фильтра). На дно чашки Петри разместить бумажный фильтр. Внести такой объём исследуемой жидкости, чтобы полностью пропитать бумажный слой, вплоть до появления плёночной влаги поверх его, выложить семена. Закрывать крышкой, оставить в тени (во избежание перегрева и испарения) на 3-7 дней с учётом роста. Данные по всхожести внести в таблицу. В качестве контроля использовать ёмкость с дистиллированной водой (таблица 3).

При сравнении результатов фитотеста с контролем, где для прорастания кресс-салата использовали дистиллированную воду, лишь 3 пробы (две из них взяты на горе Комсомольская, и одна в окрестностях поселения Яйлю Алтайский биосферный заповедник) оказались с более слабыми ростками. Лучший результат показали пробы, взятые в Катунском биосферном заповеднике.



Таблица 3

Прорастание крессалата в почвенных вытяжках исследуемых образцов

№	3 суток		7 суток		Длина ростков, мм			Вес (гр)
	шт	%	шт	%	min	max	сред.	
1	23	77	27	90	16	39	22	0,85
2	21	70	24	80	10	51	33,5	0,66
3	19	63	23	77	16	47	29,8	0,48
4	22	73	24	80	16	44	32	0,81
5	20	67	24	80	6	43	30	0,76
6	21	70	27	90	7	45	32	0,48
7	26	87	26	87	16	49	38,2	0,68
8	21	70	25	83	6	46	31,3	0,70
9	20	67	26	87	11	43	30	0,62
10	23	77	25	83	10	50	26	0,76
11	18	60	21	70	6	52	29	0,54
12	27	90	27	90	22	41	33,6	0,87
14	30	100	30	100	21	35	23	0,78
16	21	70	29	97	12	36	25	0,49
17	22	73	24	80	25	57	40	0,6
18	21	70	30	100	17	54	31	0,81
19	21	70	21	70	2	6	4	1,09
20	27	90	28	93	10	44	32	0,7
21	29	97	29	97	25	43	33,8	1,08
22	19	63	22	73	25	46	33	0,81
Контроль	24	80	25	83	7	45	32,6	0,87

### 2.3. ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО ВЫРАЩИВАНИЮ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В РАЗНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

В ходе эксперимента участвовали три питательные среды: классический состав Эшби – как контрольный вариант и два экспериментальных рецепта: среда Эшби с заменой глюкозы на сахарозу; MgSO<sub>4</sub>, сахар, агар в соотношении веществ как в классическом составе Эшби (приложение, таблицы 2-4).

В ходе анализа данных мы усреднили результаты по трём повторностям в каждом эксперименте со средой. Результаты свели в таблицу.

Таблица 1.

Усреднённый показатель обрастания почвенных комочков колониями бактерий рода *Azotobacter* в условиях разных питательных сред (%)

место	Эшби	Эшби_сахар	MgSo4_сахар
7	84	100	97
8	97	41	83
10	100	89	61
17	95	100	92
18	99	74	99

В таблице видно, что прорастание колоний во всех пробах активно. Жёлтым выделены пробы, в которых во время проведения эксперимента выявлено нарушение стерильности среды и появился грибок.

Номера проб, это номера согласно лабораторному журналу. В данном исследовании не имеет значение откуда взята проба почвы. Главное чтобы было известно что почва точно богата биотой. Все эти пробы участвовали и в предыдущих экспериментах, результаты которых были положительными. Это и редуцтазная активность, каталазная реакция, оценивание фитотестом и т.д.

Далее мы провели анализ скорости развития колоний в разных питательных средах.

Сначала мы проанализировали результаты развития колоний в чашках Петри без признаков распространения грибка.

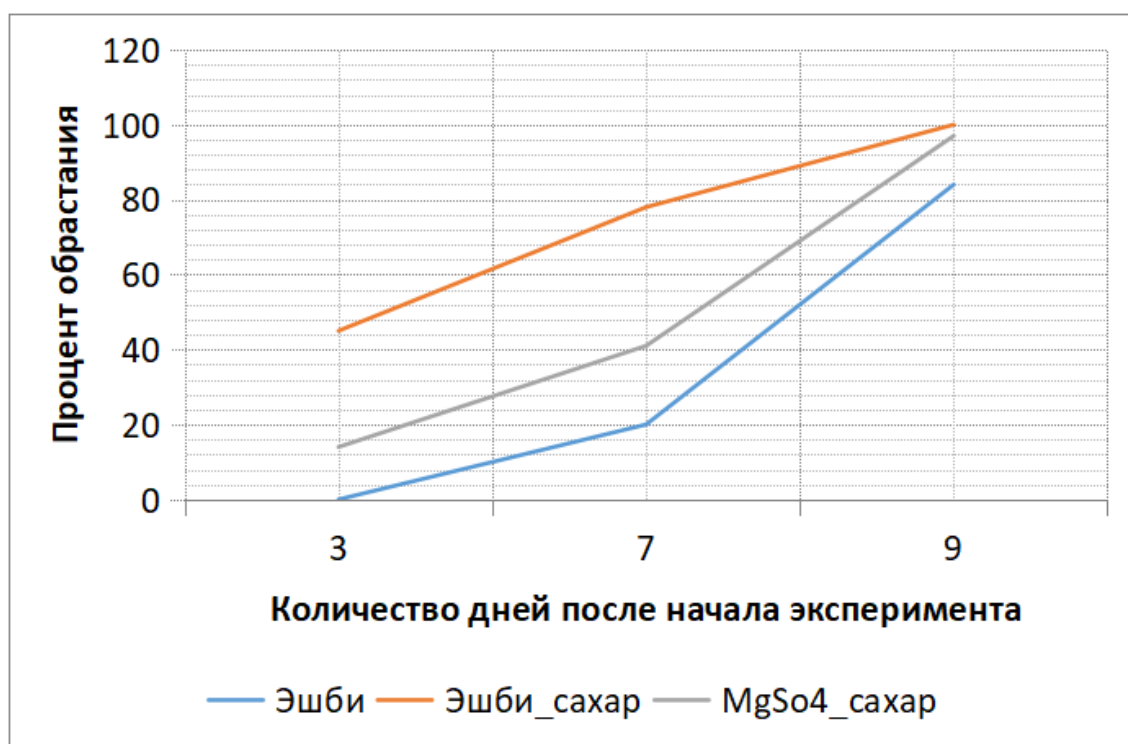


Рисунок 1. График изменений обрастания почвенных комочков колониями бактерий рода Azotobacter в условиях разных питательных сред без заражения грибком и нарушением среды (%).

В результате лучшую активность прорастания колоний бактерий рода Azotobacter дала питательная среда Эшби с сахаром. Меньшую продуктивность среда на основе магния, сахара и агара, и еще меньшую среда Эшби. Но скорость развития колоний на последних питательных средах одинакова.

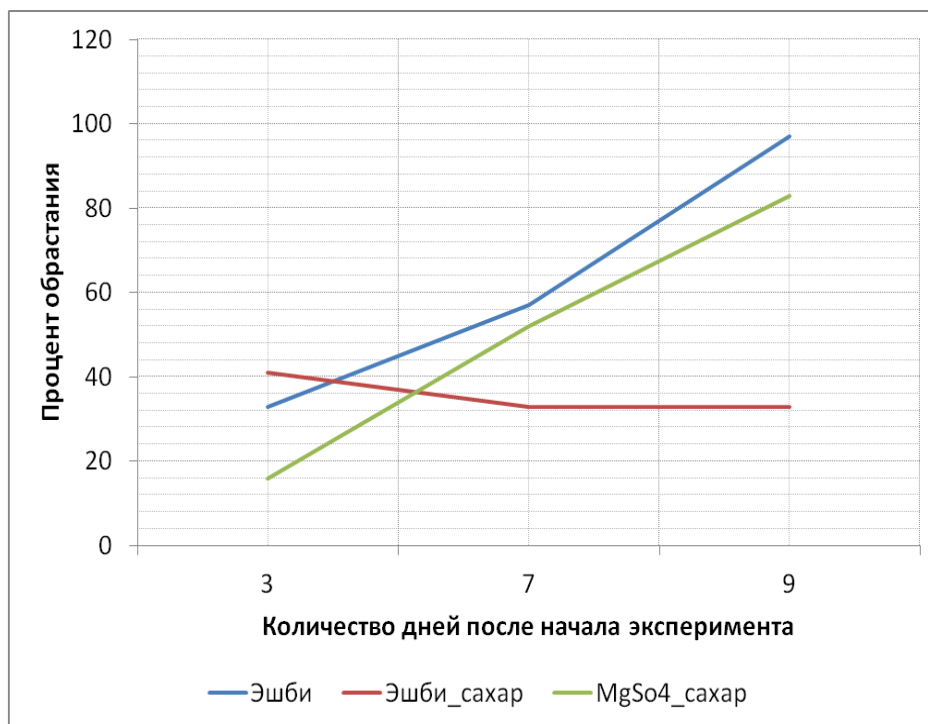


Рисунок 2. График изменений обрастания почвенных комочков колониями бактерий рода *Azotobakter* в условиях разных питательных сред, из которых среда Эшби с сахаром была заражена грибком (%).

На графике видно, что сразу положительную динамику в росте колоний бактерий даёт среда Эшби с сахарозой, но потом она быстро подвергается заражению грибком и колонии быстро погибают. Данная среда хорошо подходит для экспресс анализа, но не для длительных экспериментов.

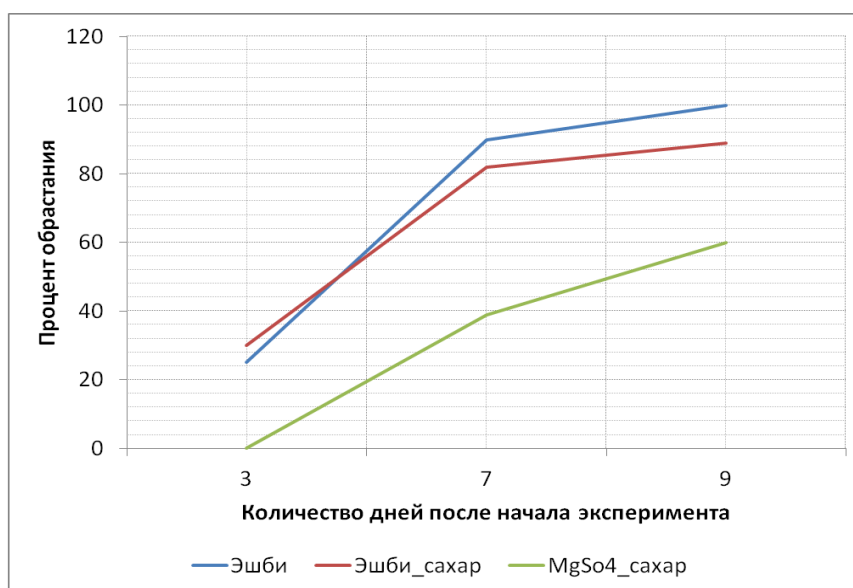


Рисунок 3. График изменений обрастания почвенных комочков колониями бактерий рода *Azotobakter* в условиях разных питательных сред, из которых среда на основе MgSo4\_сахар была заражена грибком (%).

Среда «MgSo4\_сахар» по питательности немного уступает остальным и скорость прорастания в ней колоний замедлена. Интересен тот факт, что при появлении грибка появление новых колоний азотфиксирующих бактерий продолжается и гибель давно появившихся не происходит. Что может говорить о том, что в целом такая среда при отсутствии других веществ для проращивания *Azotobakter* тоже допустима.

## ВЫВОДЫ

1. По результатам фитотеста более здоровые и крепкие ростки получены в пробах почв Катунского биосферного заповедника. Наиболее слабые в пробах земли с горы Комсомольская. Пробы почв Сайлюгемского национального парка показали результаты близкие к контролю.
2. Скорость редуктазной активности разная и возможно здесь сыграло роль, что пробы не свежие /датировка сбора сентябрь-октябрь 2021 г., поэтому реакция проходит не равномерно. Но в целом во всех почвенных образцах мы её отмечаем.
3. Высокая скорость реакции на каталазную активность выражена в пробе почвы Сайлюгемского национального парка, наименьшая в одной из проб почв Катунского биосферного заповедника.
4. При приготовлении питательной среды Эшби возможна замена глюкозы на сахарозу для экспресс анализа на обнаружение азотфиксаторов. Но надо понимать, что такая замена провоцирует развитие грибков на среде из-за повышенной сладости.
5. Приготовление и использование питательной среды для выращивания бактерий рода *Azotobakter* на основе лишь сахара и  $MgSO_4$ , если нет других составляющих, чтобы подготовить среду Эшби, вполне доступно. Единственное, лучше к данным веществам ещё добавить Са, с целью подщелачивания среды.
6. Наши эксперименты показали, что пробы почв Сайлюгемского национального парка также содержат азотфиксирующие бактерии. Видимо для их обнаружения не достаточно было трёх повторностей. А также усиление питательной среды дисахаридом ускоряет процесс их развития. Что также подтверждает результаты предыдущих исследователей. То есть на активность азотфиксаторов прямое влияние оказывает присутствие признаков жизнедеятельности человека.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Прасоль, Е. А., Гончарова, Е. Д., Афанасьева, В. С., & Шашукова, П. П. (2021). Первые результаты изучения азотфиксирующих бактерий почвенной микробиоты низкогорий Алтай. In *МНСК-2021* (pp. 141-141).
2. Казанцева Т.К., Малкова А.Н. Азотфиксирующие бактерии в природных зонах Республики Алтай / Большой Алтай. Горы и люди. Материалы Международной научно-практической конференции, посвящённой Международному дню гор. - Горно-Алтайск: БИЦ Горно-Алтайского государственного университета, 2022. - С. 151 - 153.
3. Ферменты микроорганизмов. Классификация ферментов. [электронный ресурс]. - режим доступа свободный: [https://studref.com/592634/matematika\\_himiya\\_fizik/fermenty\\_mikroorganizmov](https://studref.com/592634/matematika_himiya_fizik/fermenty_mikroorganizmov), дата посещения 12.12.2022.
4. Бученков И.Э., Рышкель О.С., Шутова А.Г. Лабораторный практикум по микробиологии. - Минск: ИВЦ МИНфина, 2017. - 114 с.
5. Охотник за микробами / Методические рекомендации и инструкции по применению набора. – Новосибирск, 28 с.
6. Азотобактер [электронный ресурс]. – режим доступа свободный: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%B7%D0%BE%D1%82%D0%BE%D0%B1%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B5%D1%80>, дата посещения: 5.04.2022.

Таблица 1

## Описание проб и характеристики почв природных комплексов Горного Алтая

№	место сбора	GPS-координаты
1	южный склон горы Тугая	51,96188 / 85,95449
2	южный склон горы Тугая	51,96167 / 85,95452
3	гора комсомольская	51,95206 / 85,95670
4	гора комсомольская	51,95276 / 85,95579
5	гора комсомольская м/д деревьями	51,95357 / 85,95279
6	гора комсомольская	51,95324 / 85,95315
9	Майминский район	52,03056 / 85,90631
17	Майминский район	52,06990 / 85,91461
18	Майминский район	52,06885 / 85,91041
7	Сайлюгемский хребет	49,67158/88,71799
8	Байан Чаган долина реки	49,52670/88,78711
10	Верхнее течение реки Чаган-Бургазы	49,55906/88,62560
11	Турочакский район 1	51,773197/87,621467
12	Турочакский район 2	51,775694/87,619167
14	Турочакский район 4	51,773244/87,597886
16	Турочакский район 6	51,770614/87,627867
19	Усть-Коксинский район	50,27575 / 85,59014
20	Усть-Коксинский район	50,27639 / 85,58981
21	Усть-Коксинский район	49,61978 / 85,71796
22	Усть-Коксинский район	49,61915 / 85,71759

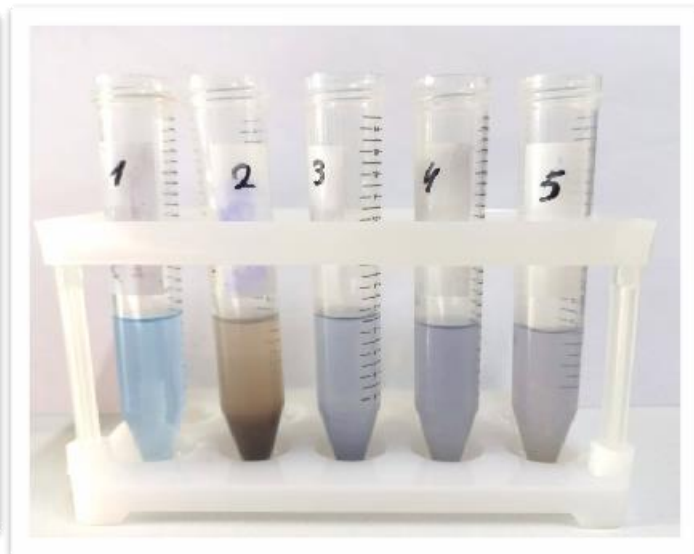
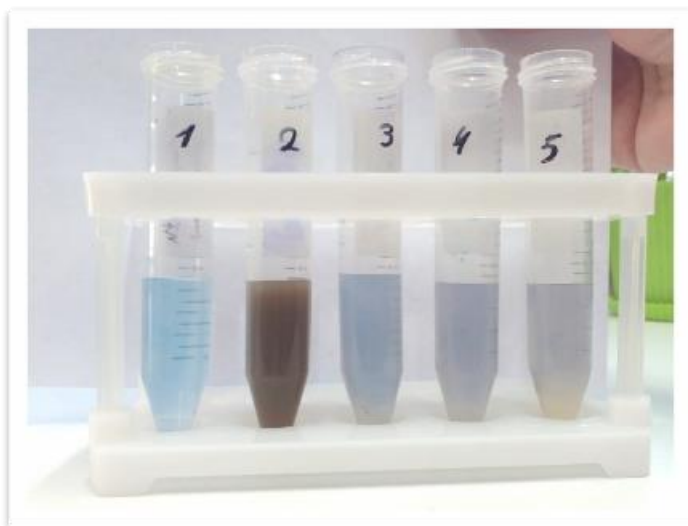


Фото 1-2 Редуктазная активность микробиома в вытяжках почвенных проб в начале эксперимента и через 24 часа.



Фото 3 Проведение каталазной активности.



Таблица 2.

## Результаты посева почвенных проб в среду Эшби

№	попытка	Кол.-во комочков	20.05.2022		24.05.2022		26.05.2022	
			n	%	n	%	n	%
7	1	45	0	0	6	43	38	87
	2	43	0	0	3	7	30	70
	3	46	0	0	5	11	44	96
8	1	42	0	0	0	0	40	95
	2	43	42	98	42	98	42	98
	3	41	0	0	30	73	40	98
10	1	44	15	33	42	96	44	100
	2	46	7	15	45	98	46	100
	3	45	10	27	34	76	45	100
17	1	42	0	0	0	0	42	100
	2	44	0	0	0	0	38	86
	3	53	0	0	0	0	52	98
18	1	46	16	39	16	39	46	100
	2	42	16	38	16	38	42	100
	3	46	0	0	20	43	44	96

Таблица 3.

## Результаты посева почвенных проб в среду Эшби/сахар

№	попытк а	Кол.-во комочко в	20.05.2022		24.05.2022		26.05.2022	
			n	%	n	%	n	%
7	1	43	22	51	32	84	43	100
	2	47	12	26	32	86	47	100
	3	52	33	57	34	65	41	99
8	1	40	6	15	0	0	0	0
	2	42	42	100	42	100	42	100
	3	44	3	7	0	0	0	0
10	1	44	0	0	42	95	43	100
	2	48	34	71	39	81	39	81
	3	49	10	20	33	69	42	86
17	1	43	43	100	43	100	43	100
	2	65	65	100	65	100	65	100
	3	42	42	100	42	100	0	0
18	1	50	3	6	15	30	50	100
	2	45	0	0	10	22	0	0
	3	54	3	6	8	15	54	100

Таблица 4.

Результаты посева почвенных проб в среду MgSO<sub>4</sub>+сахар

№	попытк а	Кол.-во комочко в	20.05.2022		24.05.2022		26.05.2022	
			n	%	n	%	n	%
7	1	59	11	19	29	49	53	90
	2	44	12	27	19	43	44	100
	3	43	2	5	14	32	43	100
8	1	43	8	19	24	56	38	88
	2	49	7	14	23	47	40	82
	3	55	8	14	26	54	43	78
10	1	46	0	0	15	3	0	0
	2	58	0	0	23	40	49	85
	3	61	0	0	46	75	58	95
17	1	31	10	32	19	63	29	94
	2	48	10	20	12	25	39	81
	3	46	9	19	9	19	46	100
18	1	48	1	2	25	52	48	100
	2	46	0	0	21	45	45	98
	3	51	0	0	37	73	51	100