

Открытый международный конкурс творческих, учебно-образовательных, исследовательских, научно-популярных проектов

«ECO LIFE»

Направление: биологические науки

Тема: Выделение из почвы азотфиксацирующих бактерий Азотобактер и их влияние на укоренение растений

**Авторы: Честнягина Альбина Сергеевна
Лапицкий Максим Константинович**

**Научный руководитель Родионова Ирина Владимировна
Наро-Фоминская СОШ № 4 с УИОП, Московская область,**

Аннотация

При выполнении данной работы мы

- отбираем пробы почв в различных биоценозах Наро-Фоминского района Московской области;
- проводим изучение механического состава, содержания нитратов, кислотности почв;
- изучаем с помощью микроскопа микроскопический состав образцов;
- выделяем из почвы чистую культуру Азотобактер;
- используем полученный Азотобактер для укоренения пророщенных семян фасоли и отводков комнатного растения хлорофитум, подтверждая эффективность бактериальных удобрений для нужд растениеводства.

Цель работы - наблюдение влияния бактерий рода Азотобактер на укоренение растений.

Задачи работы: забор и изучение образцов почв Наро – Фоминского района Московской области, выделение из данных проб Азотофиксирующих бактерий и оценка их влияния на процесс укоренения растений.

В ходе выполнения данной работы мы создаем бактериологическое удобрение и проверяем его эффективность.

Содержание

Введение.....	3
Обзор литературы.....	3
Мы – исследователи.....	5
Мы – настоящие почвоведы.....	5
Мы – настоящие химики.....	6
Мы- настоящие микробиологи.....	9
Мы – настоящие растениеводы.....	12
Выводы.....	14
Заключение.....	14
Список литературы.....	15
Приложение.....	16

Введение

Природа родного края... Красота средней полосы России... «Во всех ты, душенька, нарядах хороша»... Твой образ передавали художники на своих полотнах, композиторы тебе посвящали прекрасную музыку, песни, романсы. Ты грустила и радовалась вместе с героями произведений великих русских классиков. Ты вдохновляла и успокаивала. Именно тебя вспоминаем мы, находясь в гостях у других стран. Ты неразрывно связана с родным домом, с местом, где мы родились и растем. И навсегда в душе мы останемся русскими! Мы будем любить стройные березки, душистые травы лугов, камыши перед озерцом, изящные ивы, сильные дубы. А сколько восторга вскипает в душе во время сильного дождя и грозы! Природа Русской равнины, ты прекрасна в любое время года в своей скромности и величии! Ты свидетель и участник жизни наших предков. И они с любовью называли тебя матерью. Всем живущим в твоем лоне ты даешь жизнь и пищу, жилище и защиту. Земля - матушка! Земля – начало жизни! Земля – наша колыбель!

Земля - главный источник наших ресурсов. Она сама является ценнейшим, легкоразрушаемым и практически невосполнимым ресурсом. Слово «земля» часто используется как синоним слова «почва». В. В. Докучаев впервые в 1886 г дал определение почвы как плодородного поверхностного слоя земли, созданного совместным воздействием всех компонентов природы. В 1877 г он отправляется в первое «черноземное» путешествие по России. Преодолев в общей сложности 10 тыс км, ученый собирает тысячи проб. По результатам своих путешествий он, обобщив все полученные материалы, подготовил классический труд «Русский чернозем», в котором доказал, что почва – не горная порода, а совершенно самостоятельное тело природы. Этим были заложены основы новой науки - почвоведения.

Роль почвы многообразна: это важный участник всех природных круговоротов, основа для производства биомассы.

Почва является средой обитания различных почвенных микроорганизмов. Как среда жизни почва занимает промежуточное положение между атмосферой и гидросферой. Все это определяет распространение жизни в почве: микроорганизмы встречаются во всей ее толще, беспозвоночные животные обитают в верхних почвенных горизонтах. Бактерии находятся в подземных водах, сопровождают залежи нефти на глубине 3-5 км. Этим ограничивается распространение жизни в «твёрдой» оболочке земли – литосфере. 80 % почвенных микроорганизмов ученым еще предстоит изучить.

В СМИ часто освещают патогенное влияние микроорганизмов на человека и окружающую среду. Действительно, некоторые микроорганизмы могут быть причиной заболеваний растений, человека и животных. Но микроорганизмы являются важной частью экосистем, выполняют в ней полезную функцию.

Микроорганизмы почвы превращают перегной в минеральные вещества, которые способны поглощать корни растений. Бактерии очищают воду от различных отходов, окисляют ядовитые вещества до нетоксичных соединений, предотвращая гибель водных организмов. Они участвовали в образовании залежей угля, нефти, газа.

Бактерии являются прокариотами – одноклеточными организмами, не имеющими оформленного ядра. Они имеют разнообразную форму и размеры. Наиболее

распространенными являются кокки – бактерии сферической формы, бациллы (палочки и цилиндры с закругленными концами), спириллы (жесткие спирали) и спирохеты (тонкие и гибкие волосовидные формы). Они могут жить в широком диапазоне температур, давления, кислотности. Многие бактерии ведут подвижный образ жизни, используя для движения жгутики. Известны даже прыгающие движения бактерий, природа которых до конца не изучена.

Одним из перспективных направлений современной науки является создание дешевого бактериологического удобрения. Применение в сельском хозяйстве минеральных удобрений вызывает истощение почв, загрязнение окружающей среды. Избыток удобрений снижает качество сельскохозяйственной продукции, отражается на питательной ценности и сроках хранения.

И тут на помощь приходят микроорганизмы!

Взаимодействие микробного сообщества и прикорневой системы растений является одним из способов получения растениями необходимых питательных веществ из почвы. Только 1-2 % бактерий, обитающих в ризосфере, могут способствовать росту растений. Растения образуют с микроорганизмами симбиоз – взаимовыгодное сожительство. Разлагая вещества, содержащиеся в почве, бактерии делают их доступными для растений (переводят вещества из нерастворимых форм в растворимые). Например, растения семейства Бобовых образуют на корнях специальные клубеньки, в которых живут азотфикссирующие бактерии. Они являются анаэробами (живут в бескислородной среде), в клубеньках – расширениях корней – создается благоприятная среда для азотфиксаторов. Бактерии, усваивая атмосферный азот и переводя его в растворимые формы, создают благоприятные условия для роста и развития растения. Симбиозы образуют не только Бобовые. Растения взаимодействуют со свободноживущими азотфиксаторами, фосфорными бактериями, получая необходимые для жизни минеральные вещества. Для удовлетворения потребности растения в питательных веществах могут использоваться биоудобрения, содержащие микроорганизмы, способные скорректировать элементарный состав ризосфера.

Чем более почве насыщена растворимыми соединениями азота, тем более она считается плодородной. Содержание и соотношение растворимых форм азота в почве постоянно меняется (эррозия почв, сбор урожая, и тд). Поэтому азот относится к одному из главных и дефицитных элементов питания растений, а азотобактеры играют важную роль в круговороте азота.

Мы решили повторить исследования, предложенные в брошюре «Охотники за микробами», самостоятельно вырастить азотфикссирующие бактерии и оценить их влияние на процесс укоренения растений.

МЫ - ИССЛЕДОВАТЕЛИ

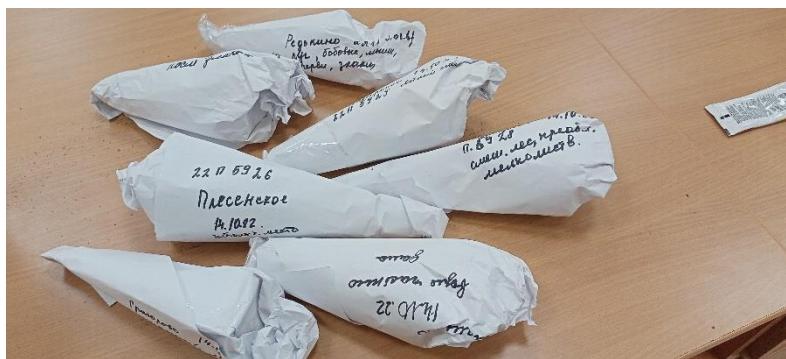
Мы – настоящие почвоведы

Мы оделись как настоящие исследователи: куртки, резиновые сапоги, перчатки, взяли с собой пакеты и лопаты и отправились в экспедицию.

Образцы брались из верхнего слоя почвы глубиной до 5 см.

Образец № 1 Поселок Таширово	Мелколиственный светлый лес, преобладают березы, ольха, на земле богатый ковер из осенних листьев, растения первого яруса не угнетены. 
Образец № 2 Деревня Васильчиково	Территория перед деревенским домом. Почва взята около деревьев напротив дома. 
Образец № 3 Деревня Редькино	Небольшой луг. Много бобовых растений, злаков, в месте подкопа была нора мышки или крота, почва богата кольчатыми червями. Одного червячка мы не заметили (он был очень маленький) и привезли вместе с почвой в школу. 
Образец № 4 Поселок Слепушкино	Агроциноз. Поле после злаков, свежеперепаханная земля.
Образец № 5 Деревня Назарьево	Смешанный светлый лес. Мы взяли почву под большой сосной. Почва темная, рыхлая, много корней растений. Под деревом мы нашли птичьи перья.
Образец № 6 Деревня Плесенское	Низкое влажное место. Даже заболоченное. Много осоки. На месте заботы растения не росли, голый холмик земли.

		
Образец № 7 Деревня Григорово	Смешанный лес с преобладанием ели. Лес темный, влажный, мы ездим в это место за грибами. Особенно много здесь лисичек, встречаются и белые грибы, сыроежки, опята, грузди.	



листочки и размельчили крупные комочки.

После трех дней сушки почву поместили для хранения в бумажные кулечки.

Можно приступать к исследованию!

Образцы почв были высушены на белых листах бумаги. Нельзя брать газеты или бумагу с печатью (черновики) – краска для печати содержит свинец, убивающий микроорганизмы почвы.

Мы выбрали из образцов камни, корешки растений, червячка,

Мы - настоящие химики!

Изучение механических свойств почвы, ее кислотности, содержания нитратов

Опыт 1. Определение кислотности почвы.

Половину объема пробирки типа «эппendorф» заполняем почвой, остальной объем – дистиллированной водой.

Плотно закрываем крышку и энергично встряхиваем пробирку в течении 5 минут. Затем оставляем пробирку в вертикальном положении на 25 - 30 минут до полного осаждения взвеси почвы на дно пробирки.

Опускаем индикаторную бумагу с универсальным индикатором в почвенную вытяжку и сравниваем полученное окрашивание с эталонной шкалой.

Результат опыта.

№ образца	Место взятия пробы	pH почвы
Образец № 1	Поселок Таширово	5
Образец № 2	Деревня Васильчиково	6
Образец № 3	Деревня Редькино	7
Образец № 4	Поселок Слепушкино	6
Образец № 5	Деревня Назарьево	6
Образец № 6	Деревня Плесенское	5
Образец № 7	Деревня Григорово	5

Мы выяснили, что образцы почв имеют разную кислотность:
кислые почвы – смешанный лес в Таширово и Григорово, а также почва из Плесенского;
почва луга в деревне Редькино – среда ближе к щелочной;
остальные образцы - нейтральная среда (Назарьево, Васильчиново, Слепушкино).

Опыт 2. Определение содержания нитратов.

Приготовление почвенной вытяжки: навеска влажной почвы массой 30 г помещалась в колбу. Добавляется 100 мл дистиллированной воды. Колба закрывается крышкой, содержимое взбалтывается . Колба оставлялась на 30 минут. Затем фильтруем содержимое колбы с помощью воронки с фильтром.

В полученную вытяжку на 2-3 секунды погружаются индикаторные полоски. Затем извлекаются и сравниваются с эталонной шкалой. По интенсивности изменения окрашивания тест-полосок судим о содержании нитратов.

Результат опыта.



Мы проверили 5 образцов, тест-полосок было только 5.

№ образца	Место взятия пробы	Содержание нитратов мг/л
Образец № 2	Деревня Васильчиново	25
Образец № 3	Деревня Редькино	45
Образец № 4	Поселок Слепушкино	25
Образец № 6	Деревня Плесенское	45
Образец № 7	Деревня Григорово	25

Значения, полученные нами по содержанию нитратов в почвах, могут быть чуть заниженными по сравнению с истинными. Исследование проводилось на 4-й день после взятия проб. Рекомендовано проводить анализ в течении 3-х дней, что связано с разрушением соединений азота в почве, и получением заниженных данных при исследовании поздних образцов.

Полученные нами данные говорят о низком (Васильчиново, Слепушкино, Григорово) и среднем(Редькино, Плесенское) содержании азота в почве.

Содержание азота показывает активность азотофиксирующих бактерий в данной почве. Забор проб почвы производился в начале октября, суточные температуры в нашем регионе в данное время года уже невысокие: + 8 днем и + 5 вечером. При таких условиях азотофиксирующие бактерии снижают свою активность, а значит и содержание азота в почве снижается.

Опыт 3. Определение механического состава почвы.

Для определения механического состава почвы сухая почва (примерно столовая ложка) помещается в ладонь.

Пипеткой Пастера к почве приливается вода и тщательно перемешивается до получения «теста».

Из полученного «теста» скатываем шарик диаметром 2-3 см и пробуем растянуть его в жгут. По пластичности шарика и жгута определяем тип почвы.

Результат опыта.

№ образца	Место взятия пробы	При скатывании	Тип почвы
Образец № 1	Поселок Таширово	Образует непрочный шарик. Не раскатывается в жгут, образует отдельные колбаски и цилиндрики	Легкий суглинок
Образец № 2	Деревня Васильчиково	Образует сплошной жгут, который при сгибании разламывается	Средний суглинок
Образец № 3	Деревня Редькино	Дает гладкий шарик и длинный жгут	Глинистая
Образец № 4	Поселок Слепушкино	Образует сплошной жгут, который при сгибании разламывается	Средний суглинок
Образец № 5	Деревня Назарьево	Образует сплошной жгут, который при сгибании разламывается	Средний суглинок
Образец № 6	Деревня Плесенское	Образует сплошной жгут, который при сгибании разламывается	Средний суглинок
Образец № 7	Деревня Григорово	Образует непрочный шарик. Не раскатывается в жгут, образует отдельные колбаски и цилиндрики	Легкий суглинок

На исследуемой нами территории чаще всего встречаются средние и легкие суглинки, реже – глинистые почвы (деревня Редькино)

Мы - настоящие микробиологи!

Опыт 1. Микроскопическое исследование образцов почв.

Для проведения исследования мы приготовили временный препарат из всех образцов почв и изучили их под микроскопом.

Результат опыта.

При микроскопическом исследовании были обнаружены мелкие твердые частицы почвы, микроскопические зеленые водоросли, гифы грибов.

Опыт 2. Выращивание бактерии Азотобактер, сравнение активности Азотобактера в разных образцах почв.

Азотобактер впервые был выделен в чистой культуре голландским ученым М. Бейеринком в 1901 г. Для выращивания данного микроорганизма используется среда Эшби.

Реактивы для приготовления среды Эшби:

вода дистиллированная 0,5л
сахароза 10г,
калий фосфорнокислый однозамещенный 0,1г,
сульфат магния 0,1 г,
хлорид натрия 0,1 г,
сульфит калия 0,05 г,
карбонат кальция 2,5 г
желатин 10 г

Хорошо промытые баночки и крышки к ним 20 мин обрабатываются горячим водяным паром для стерилизации.

По рецептуре готовится среда Эшби: в теплую воду вносятся навески солей и сахароза. Раствор при постоянном перемешивании доводится до кипения и вводится желатин. Нагрев отключается. Раствор немного остывает и разливается в стерильные банки. После разлива банки со средой стерилизуются в течении 20 минут и закрываются закручивающимися крышками. Полученная стерильная среда в герметично закрытых банках оставляется при комнатной температуре для застывания. Стерилизация и приготовление среды проводятся в лаборатории на электрической плитке. После остывания среда для засеваания микроорганизмов имеет вид прозрачного желе средней плотности с легким желтоватым оттенком.

Небольшое количество почвы из каждого образца готовится к посеву- смачивается водой и оставляется на короткое время. На застывшую стерильную среду производится посев комочков влажной почвы исследуемых образцов: маленькие комочки почвы



размещаются рядами на поверхность среды с интервалом около 5 мм друг от друга.

Банки герметично закрываются, маркируются и оставляются на батарее для поддержания благоприятной температуры. Банки укрываются темной

тканью. Теплая темная среда благоприятна для размножения Азотобактера.

В течении 10 дней велись наблюдения за ростом бактерий. Банки не открывались. Примерно через четыре дня стали заметны изменения в некоторых банках: появление белёсого налета, выделение пузырьков газа.

Результат опыта.



Наибольшая активность роста Азотобактера наблюдалась в образцах из Плесенского, взятом на низком, влажном месте и Редкино (почва луга). Средняя интенсивность - Слепушкино (агроциноз после злаков), Васильчиново (почва возле деревенского дома). В образцах лесных почв роста

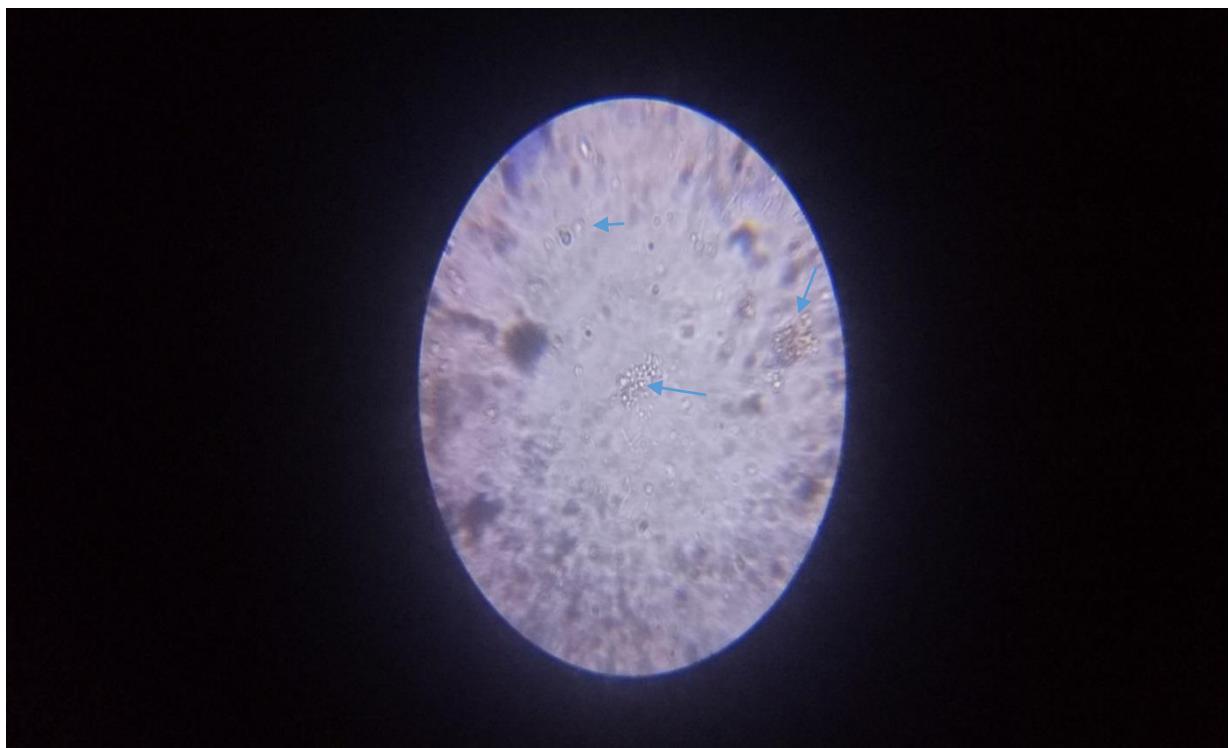
микроорганизма не было.



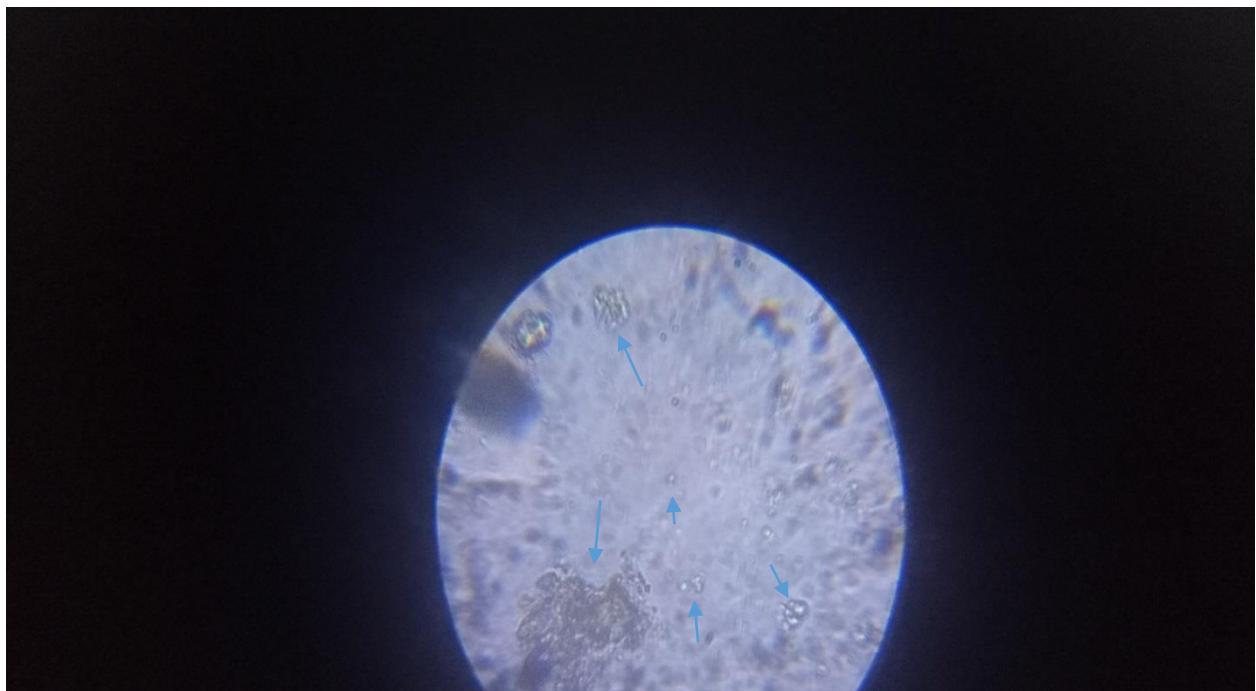
При открывании баночек ощущался кисло-сладкий запах. На поверхности образовалась белая полупрозрачная пленка, местами выделялись пузырьки газа.

При микроскопическом исследовании пленки под увеличении в 800 раз были обнаружены прозрачные клетки круглой

формы. Некоторые располагались одиночно, некоторые образовывали сгущения.



Азотобактер. Образец Плесенское.



Азотобактер . Образец Редькино

Мы – настоящие растениеводы!

Для наблюдения за влиянием азотобактера на скорость укоренения растений, мы взяли отростки хлорофитума и семена фасоли.

Прорастание семян фасоли.

Предварительно до эксперимента сухие семена фасоли поместили в кусочек марли, смочили водой и оставили для набухания.

Для контроля несколько семян фасоли оставлены без обработки. Прочие обработаны полученным азотобактером.

Семена фасоли высажены во влажную почву. Почва была куплена в магазине и предназначена для рассады. В процессе эксперимента земля дополнитель но увлажнялась, экспериментальные образцы дополнительно обрабатывались азотобактером.



Через четыре дня после начала эксперимента проведено сравнение экспериментальных и контрольных образцов.

У контрольного образца семени фасоли чуть-чуть проклонулся корешок, у экспериментальных семян уже наблюдался хорошо развитый главный корешок с боковыми корнями.

Прорастание отростков хлорофитума.

В горшочки с готовым грунтом сажаем по два отростка хлорофитума. Один горшочек поливаем чистой водой. Второй горшочек поливаем водой с добавлением бактерий Азотобактер.

Через четыре дня отростки извлекаем из земли и промываем.



На одном из отростков, которые мы поливали чистой водой, виден маленький придаточный корешок. Второй отросток без корешков.



Обработанные Азотобактером отростки дали короткие мощные придаточные корни.

Вывод : После обработки Азотобактером набухших семян фасоли и отводков хлорофитума их укоренение происходило быстрее.

Вывод

1. На территории Наро-Фоминского района Московской области встречаются легкие и средние суглинистые слабокислые или нейтральные почвы, реже – глинистые, щелочные.
2. Почвы нашего района бедны азотом.
3. При микроскопическом исследовании образцов почвы были обнаружены мелкие твердые частицы почвы, микроскопические зеленые водоросли, гифы грибов.
4. Наибольшая активность азотофиксирующих микроорганизмов наблюдалась в почве с болотистого места и в луговой почве. В лесных почвах Азотобактер не обнаружен.
5. После обработки Азотобактером набухших семян фасоли и отводков растений их укоренение происходило быстрее.

Заключение

Применение препаратов, содержащих азотофиксирующие бактерии, оправдано для нужд сельского хозяйства и декоративного растениеводства.

Создание бактериальных удобрений является перспективным направлением современной науки. Основная цель – разработка низкозатратной технологии производства бактериального удобрения. Бактериальные удобрения по эффективности не уступают минеральным. Применение бактериальных удобрений позволит сохранить природный потенциал почв сельскохозяйственного назначения, наносит меньший вред окружающей среде, помогает получить экологически чистую сельскохозяйственную продукцию.

Дальнейшее изучение микроорганизмов почвы может позволить решить ряд острых проблем современности. Изучение микроорганизмов почвы находят практическое применение в экологии, медицине, фармацевтике.

Почва – главный фундамент жизни. Ни в одной лаборатории и никаким путем, кроме природного, естественного, почву нельзя создать. Все живое на земле зависит от этого тонкого, драгоценного жизнеродящего слоя земной поверхности. Земля накапливала его многие тысячелетия с очень медленной скоростью: один сантиметр чернозема за 100, а иногда и за 300 лет. Охрана почвенных ресурсов – важнейшая задача современности.

Список литературы

1. «Охотник за микробами» Методические рекомендации по сбору и исследованию образцов почвы
2. Баринова И. И. «География: Природа России .8 кл» Дрофа,2016
3. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Микробиологические измерения концентрации PAENIBACILLUS MUCILAGINOSUS PM 2906 ВКПМ В-12259 В воздухе рабочей зоны МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ МУК 4.2.3435-17
4. Статья «Строение бактерий» Википедия
5. Маврищев В.В. «Основы экологии» (учебник) (электронная версия)

При разработке проекта использовались материалы вебинаров в рамках программы «Всероссийский атлас почвенных организмов»:

Лекция «Почвенные исследования»

Лекция, посвященная азотофиксирующим организмам, «Удивительный Азотобактер»

Приложение

Таблица 1. «Кислотность образцов почвы Наро-Фоминского района Московской области»

№ образца	Место взятия пробы	pH почвы
Образец № 1	Поселок Таширово	5
Образец № 2	Деревня Васильчиново	6
Образец № 3	Деревня Редькино	7
Образец № 4	Поселок Слепушкино	6
Образец № 5	Деревня Назарьево	6
Образец № 6	Деревня Плесенское	5
Образец № 7	Деревня Григорово	5

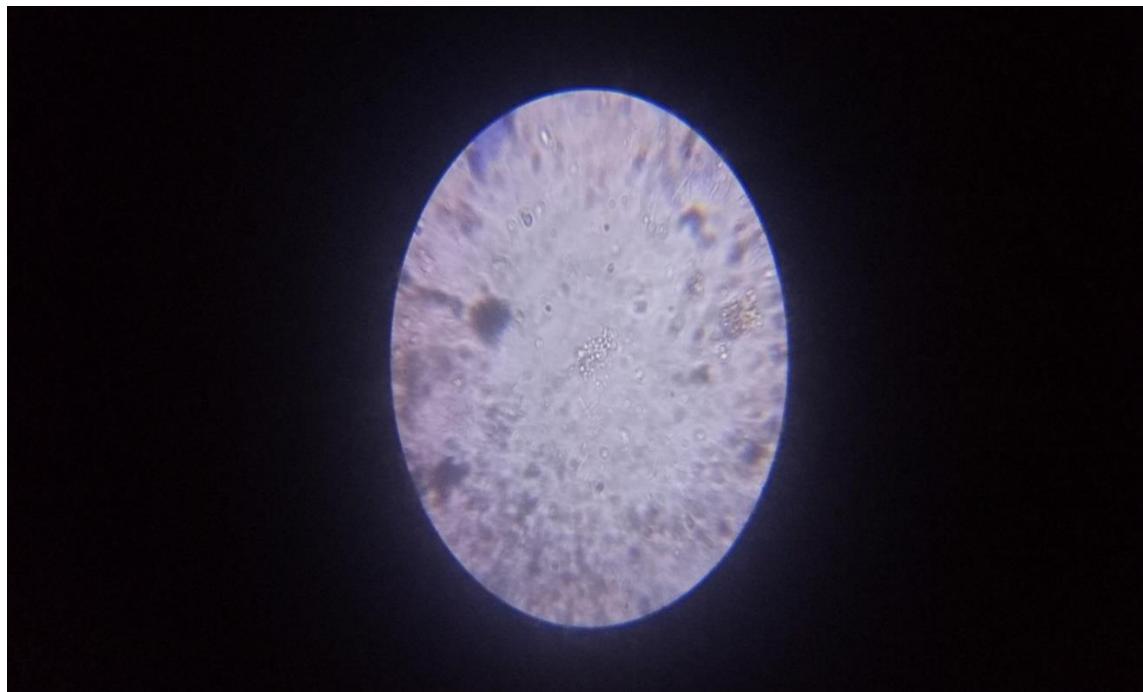
Таблица 2. «Содержание нитратов в образцах почвы Наро-Фоминского района Московской области»

№ образца	Место взятия пробы	Содержание нитратов мг/л
Образец № 2	Деревня Васильчиново	25
Образец № 3	Деревня Редькино	45
Образец № 4	Поселок Слепушкино	25
Образец № 6	Деревня Плесенское	45
Образец № 7	Деревня Григорово	25

Таблица 3. «Механический состав образцов почвы Наро-Фоминского района Московской области»

№ образца	Место взятия пробы	При скатывании	Тип почвы
Образец № 1	Поселок Таширово	Образует непрочный шарик. Не раскатывается в жгут, образует отдельные колбаски и цилиндрики	Легкий суглинок
Образец № 2	Деревня Васильчиково	Образует сплошной жгут, который при сгибании разламывается	Средний суглинок
Образец № 3	Деревня Редькино	Дает гладкий шарик и длинный жгут	Глинистая
Образец № 4	Поселок Слепушкино	Образует сплошной жгут, который при сгибании разламывается	Средний суглинок
Образец № 5	Деревня Назарьево	Образует сплошной жгут, который при сгибании разламывается	Средний суглинок
Образец № 6	Деревня Плесенское	Образует сплошной жгут, который при сгибании разламывается	Средний суглинок
Образец № 7	Деревня Григорово	Образует непрочный шарик. Не раскатывается в жгут, образует отдельные колбаски и цилиндрики	Легкий суглинок

Фотография азотфикссирующих бактерий Азотобактер, выращенных из образца почвы населенного пункта Плесенское.



Фотография азотфикссирующих бактерий Азотобактер, выращенных из образца почвы населенного пункта Редькино.



Влияние Азотобактера на укоренение семян фасоли



Влияние Азотобактера на укоренение отростков хлорофитума

контроль



Обработанный образец

