

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение
«Средняя общеобразовательная школа №3»
Изобильненского муниципального округа
Ставропольского края

Проектная работа «Скрининг азотофиксирующих бактерий
на способность к стимулированию роста растений»
по химии

Выполнила: ученица 10 класса
МБОУ «СОШ №3» ИМОСК
Шаршова Алина Витальевна
Руководитель:
Селина Екатерина Николаевна
Учитель химии
МБОУ «СОШ №3» ИМОСК

Город Изобильный
2024 год

Оглавление

Введение	3
Глава 1 Теоретическая часть.....	4
1.1 Почвы России.....	4
1.2 Почвы Ставропольского края	6
1.5 Бактерии	7
1.6 Азотофиксирующие бактерии	8
Глава 2. Практическая часть	10
2.1 Отбор почвы и определение механического состава.	10
2.2 Определение кислот почвы.....	12
2.3 Приготовление среды Эшби	13
2.4 Подготовка планшетов	14
Заключение.....	17
Список используемой литературы	18

Введение

Актуальность: Почвенные микроорганизмы – пионеры почвенно-образовательного процесса. Они в значительной степени определяют биологическую активность почв, их плодородие, экологическое состояние. Однако на сегодняшний день актуальным является их свойство служить индикаторами «здоровья почвы». Именно микроорганизмы одними из первых реагируют даже на незначительные изменения окружающей среды, поэтому они являются очень ценными для экологического мониторинга, в том числе и для почвенного.

Микроорганизмы играют важную роль в превращениях органических веществ и биогеохимических циклах питательных веществ в растениях. Значительная часть бактерий в почве, и в том числе корневой зоне растений, взаимодействует с растениями хозяевами и может оказывать положительное влияние на рост и питание растений, и даже подавление болезней [9].

Цель: провести скрининг азотофиксирующих бактерий на способность к стимулированию роста растений.

Задачи:

1. Собрать и изучить информацию о почве;
2. Отобрать пробы почвы;
3. Выявить наличие азотофиксирующих бактерий.
4. Определить механический состав почвы.
5. Определить уровень pH.
6. Произвести скрининг азотофиксирующих бактерий на способность к стимулированию роста растений.

Объект исследования: почвы города Изобильного.

Гипотеза: Во всех почвах г. Изобильного присутствуют бактерии, способствующие росту растений.

Глава 1 Теоретическая часть.

1.1 Почвы России

Почва — это верхний плодородный слой земли.

Почва состоит из различных компонентов: песка, глины, перегноя, воздуха, воды. Также неотъемлемая часть почвы — живые организмы: животные, растения (их корни), грибы, бактерии, лишайники. Песок и глина — твёрдая часть почвы, её основа. Она служит опорой для закрепления корней растений, средой, где перемещаются и строят норы животные. Если в почве больше песка, она рассыпчатая, а если глины — податливая, как пластилин. От содержания различных веществ в почве зависит её плодородие.

Плодородие — это способность почвы снабжать растения питательными веществами, водой и воздухом для их полноценного роста и развития.

Плодородие — важнейшее свойство почвы.

Живой мир почвы очень разнообразен и тоже влияет на её плодородие. Например, дождевые черви, медведки, кроты, перемещаясь в почве, рыхлят и перемешивают её. Созданные ими ходы заполняются воздухом. Так почва насыщается кислородом. Почвенные бактерии участвуют в образовании перегноя.

Перегной — это разложившиеся остатки растений и животных.

Перегной придаёт почве тёмный цвет. Чем больше перегноя в почве, тем она плодороднее. Остатки отмерших организмов разлагаются и насыщают почву минеральными солями, которые способствуют росту и развитию растений. Соли перемещаются по растению с водой, которую всасывают корни.

Даже в очень сухой и плотной почве между частицами песка, глины и перегноя есть место для воды и воздуха. Для роста растений важно, чтобы почва была достаточно влажной и насыщенной кислородом. Поэтому, выращивая культурные растения, нужно рыхлить и поливать почву

В России почвы отличаются разнообразием. К главным типам, встречающимся на территории нашего государства, относятся:

- **тундровые глеевые почвы** – отличительной чертой этих почв является малое содержание гумуса и повышенная кислотность. Находятся южнее арктических почв в районах вечной мерзлоты.
- **арктические почвы** – такой тип почвы образуется в процессе таяния вечной мерзлоты. Плодородный слой составляет не более 2 см. Эти почвы не восстанавливаются, и из-за сурового климата на них нет растительности.
- **подзолистые почвы** – тип почв характерный для лесов с содержанием гумуса до 4%. Из-за воздействия с кислотой эти почвы называют кислыми. Для получения стабильного урожая почвы нужно удобрять и правильно обрабатывать.
- **серые лесные почвы** – образуются в лиственных лесах исключительно с континентальным климатом. Из-за содержащегося в почве кальция вода не проникает внутрь и не размывает ее. Плодородность средняя, так как слой гумуса не превышает 8%.
- **бурые лесные почвы** – почвы распространены в лесах умеренного климата. Плодородный слой составляет 30 см, далее следует слой глины 20–40 см. Основные подвиды: оподзоленные, типичные, глеевые.
- **каштановые почвы** – распространены в таких природных зонах, как степи и полупустыни. Плодородный слой достигает 4,5%, что является показателем средней плодородности почвы. [1]

1.2 Почвы Ставропольского края

В Ставропольском крае распространены три основных вида почв: темно-каштановые, каштановые и черноземные. Названные подтипы каштановых

почв отличаются между собой, прежде всего по окраске и мощности верхних гумусовых горизонтов, по содержанию гумуса, степени солонцеватости и запасов питательных веществ. Чаще всего более солонцеватыми являются светло-каштановые почвы, менее солонцеватыми – каштановые почвы и еще менее солонцеватыми – темно-каштановые почвы.

Механический состав почв черноземного и каштанового типа преимущественно легкосуглинистый. Это объясняется, главным образом, на карбонатных, буровато-палевых лёссовидных, или лёссах, которые повсеместно выступают в качестве почвообразующих пород.

Мощность пахотного слоя до 150-180 см

pH солевой вытяжки 6,7-7,5.

Плотность почвы колеблется от 1,1 до 1.3 г/см³. [2]

1.3 Важные элементы для роста растений

Азот – это один из важнейших макроэлементов. Без его участия невозможно развитие растений. Он отвечает за обмен веществ. Растениям он необходим постоянно, так как отвечает за все процессы питания. Поэтому его недостаток задевает жизненно важные функции. Роль азота в жизни растения заключается еще в том, что он больше других элементов влияет на качество и количество урожая. Поэтому, чтобы вырастить богатый урожай нужно с ранней весны позаботиться о достатке азота. [3]

Фосфор (P) является вторым по необходимости питательным веществом для растений после азота. Снижать его потери при внесении фосфорных удобрений, не давая фосфатам быстро перейти в нерастворимую недоступную для растения форму, — еще одна задача, с решением которой могут помочь бактерии. Бактерии почвы способны значительно повышать солубилизацию фосфатов. [4]

Наконец, третий по необходимости минеральный элемент, важный для здоровья растений, — это калий (K). И здесь нам опять на помощь приходят бактерии! Существует довольно много ризобактерий, которые способны

превращать нерастворимые соли калия в доступные для растений соединения. [5]

Сидерофоры — это органические соединения, которые синтезируются микроорганизмами (бактериями, археями или грибами) с целью «захвата» трехвалентного железа из окружающей среды и его передачи в клетку по специальным каналам. В случаях, когда почва обеднена ионами трехвалентного железа, сидерофоры почвенных микроорганизмов помогают растению более эффективно их добывать. Пока точные механизмы того, как бактерии снабжают железом растения, мало изучены. Однако уже существуют многочисленные экспериментальные данные о важности этого феномена в стимуляции роста. [6]

1.5 Бактерии

Бактерии считаются важным звеном круговорота веществ в природе. Благодаря их жизнедеятельности, отмершие частицы растений и животных перерабатываются в перегной. Вышеперечисленные компоненты представители флоры снова способны использовать для своего роста и развития.

Грунты в современном виде являются результатом упорных стараний многих сообществ бактерий. Одноклеточные на протяжении длительного времени смешивали горные породы, перерабатывали отмершую органику, соединяя ее с элементами от своей жизнедеятельности. Шаг за шагом микроорганизмы превращали дикие пустыни и скалы в земли с плодородным верхним слоем.

Бактерии – это самые древние организмы, которые могут быть как жизненно важными, так и вредоносными для растений и животных. Микроорганизмы – основные двигатели жизни на нашей планете. В состав микрофлоры грунта входят бактерии, грибы, плесень. Их роль в росте и развитии растительности переоценить довольно сложно. Почвенные бактерии регулярно осуществляют переработку животной органики и преобразуют ее в полезные минеральные компоненты.

Микрофлора грунта не только обогащает ее состав, но и делает структуру лучше. Она довольно разнообразна и богата, таким образом, в 1 грамме почвы может находиться около 1 млрд бактерий. Для учета их количества используют специальные методы, а также приспособления, включая оптический микроскоп, метод посева и другие. Со временем видовой состав почвенных

микроорганизмов меняется. Разновидности популяций бактерий в субстрате зависят от следующих факторов:

типа почвы;

состава субстрата;

глубины исследуемого участка земли.

Почвенные бактерии имеют вид мелких одноклеточных микроорганизмов. Они проживают в тонкой водной пленке грунта, около корней растительности. Небольшие размеры этих существ способствуют их возможности расти, функционировать и адаптироваться даже к тем условиям среды, которые быстро меняются. [7]

1.6 Азотофиксирующие бактерии

Азотификсация — это процесс перевода молекулярного азота из атмосферы (N_2) в восстановленную растворимую форму. Растворимые соединения азота доступны для усваивания растениями, а почва, насыщенная такими соединениями, считается более плодородной. Содержание и соотношение растворимых форм азота в почве постоянно изменяются в результате их усвоения растениями, сбором урожая, а также вследствие эрозии, вымывания и денитрификации. Описанные процессы относят соединения азота к одному из главных и дефицитных элементов питания естественных и сельскохозяйственных экосистем, а азотфиксаторы играют важную роль в круговороте азота в природе и биосфере в целом.

Azotobacter — это род свободноживущих грамотрицательных бактерий, обитающих в почве. *Azotobacter chroococcum* был впервые выделен в чистой культуре голландским ученым М. Бейеринком в 1901 г.

Представители рода *Azotobacter* чаще всего обитают в нейтральных и слабощелочных почвах, а также в пресноводных водоемах и солоноватоводных болотах. *Azotobacter* нередко образуют симбиотическую связь с растениями и живут в ризосфере — узком слое почвы, прилегающем к корням растения толщиной около 2-5 мм. Представители данного рода получают энергию в ходе окислительно-восстановительных реакций, используя углеводы, спирты и соли органических кислот. Азотфиксаторы способны фиксировать по крайней мере 10 микрограмм (микрограмм = 10⁻⁶ грамм) азота на один грамм потреблённой глюкозы. Бактерии *Azotobacter* способны расти и осуществлять процесс фиксации азота в диапазоне pH от 4,8 до 8,5, а оптимальным для жизнедеятельности данных организмов считается диапазон pH 7,0—7,5. [8]

Глава 2. Практическая часть

2.1 Отбор почвы и определение механического состава.

Отбираем пробу с разных земельных участков, отмечаем почвенный разрез, заводим блокнот для записей будущих действий, отмечаем GPS-координаты.



Для определения механического состава почвы насыпаем 1 столовую ложку земли в ладонь. С помощью пипетки Пастера к почве приливаем воду и тщательно перемешивать воду с почвой до получения как можно более вязкого «теста». Из полученного «теста» скатываем шарик диаметром 2-3 см и попробовали растянуть его в жгут. По таблице 1 определяли механический состав почвы.

Механический состав	Вид в лупу/микроскоп	При скатывании
Песчаный	Состоит почти исключительно из песчаных зерен	Не скатывается в шарик
Супесчаный	Преобладают песчаные частицы с небольшой примесью глины	Не скатывается, но лепится в непрочные шарики
Легкосуглинистый	Среди глинистых частиц преобладают песчаные частицы	Образует непрочный шарик, в жгут не раскатывается, образует отдельные колбаски или цилиндрики
Среднесуглинистый	Среди глинистых частиц заметны песчаные частицы	Образует сплошной жгут, который при сгибании в кольцо разламывается
Тяжелосуглинистый	Крупные песчаные зерна отсутствуют	Образует длинный жгут, при сгибании в кольцо которого образуются трещины
Глинистый	Песчаные зерна отсутствуют	Дает гладкий шарик и длинный жгут

Таблица 1

Результаты наших исследований представлены в таблице 2

Почва	Механический состав
1.У магазина «Марс»	Среднесуглинистый
2.Между дорогой и мутнянкой	Тяжелосуглинистый
3.Сожженная трава	Глинистый
4.Компост	Легкосуглинистый
5.Крот	Легкосуглинистый
6.Железная дорога	Легкосуглинистый
7.У дороги	Глинистый

2.2 Определение кислот почвы

Реакция почвы оказывает большое влияние на развитие растений и почвенных микроорганизмов, на скорость и направленность происходящих в ней химических и биохимических процессов. В природных условиях рН почвенного раствора колеблется от 3 до 10. Чаще всего кислотность почвы не выходит за пределы 4-8. Связь между кислотностью почвы и величиной рН приведена в таблице 3.

Таблица 3 **Зависимость кислотности почвы от рН.**

рН	Степень кислотности почв
< 4,5	Сильнокислые почвы
4,5 – 5,0	Среднекислые почвы
5,1 – 5,5	Слабокислые почвы
5,6 – 6,0	Близкие к нейтральным
6,1 – 7,0	Нейтральные почвы
>7,1	Щелочные почвы

Результаты наших исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4.Количество рН в почве.

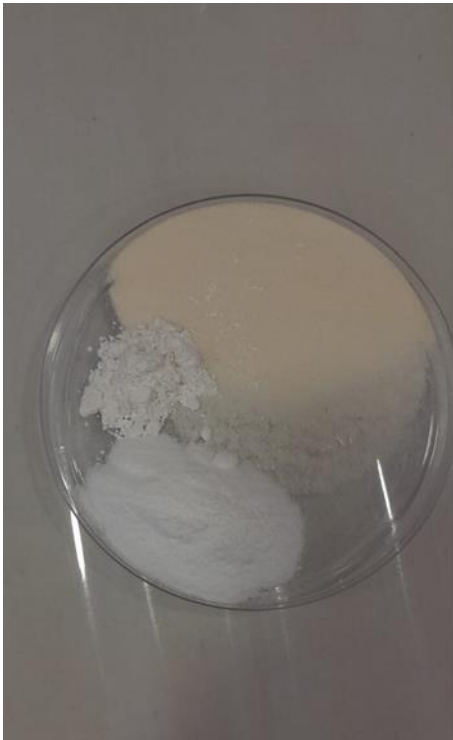
Почва	Кол-во рН / Степень кислотности почв
1.У магазина «Марс»	6 (близкие к нейтральным)
2.Между дорогой и Мутнянкой	5 (среднекислые почвы)
3.Сожженная трава	6 (близка к нейтральным)
4.Компост	6 (близка к нейтральным)
5.Крот	5 (среднекислые почвы)
6.Железная дорога	6 (близка к нейтральным)
7.У дороги	6 (близка к нейтральным)

Кислотность почвы оказывает непосредственное влияние на корни растений и почвенные организмы. Кислотность определяют в водной почвенной вытяжке.

2.3 Приготовление среды Эшби

После отбора переходим к приготовлению питательной среды для бактерий – среды Эшби.

Для приготовления среды Эшби подготавливаем CaCO_3 , агар и глюкозу, а также такие химические соединения как FeSO_4 , K_2HPO_4 , K_2SO_4 , MgSO_4 .



Полученную смесь нагреваем до закипания и оставляем остывать до температуры 50-60 градусов. После распределяем среду по чашкам Петри.



Для посева берем 3г каждой из почв и помещаем землю во флаконы, содержащие 50 мл дистиллированной воды, тщательно взбиваем все содержимое. При помощи пипетки Пастера переносим по 1мл полученной суспензии из флакона на поверхность среды Эшби. Закрываем чашки Петри и оставляем их «отдыхать» на 2 дня.

2.4 Подготовка планшетов

Для начала подготавливаем несколько сред для планшетов, а именно, среды «Азот», «Фосфор», «Калий», «Сидерофоры», «Целлюлоза».

Для приготовления среды «Азот» используем пробирки с солями: FeSO_4 , KH_2PO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 , NaCl . Высыпаем в колбу с водой все содержимое флаконов и перемешиваем. На весах подготавливаем навески: 1г CaCO_3 , 3г агара, 4г глюкозы. После взвешивания добавляем эти вещества в ту же колбу, нагреваем раствор до кипения, затем даем ему остыть, действуем по этой же схеме 3-5 раз. После проделывания данных действий даем раствору остыть до температуры 50 градусов.

Для приготовления других сред действуем по тому же принципу, только используем другие вещества.

Для среды «Фосфор» берем KCl , MgCl , MgSO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (не используем CaCO_3).

Для среды «Калий» - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 , MgCl , MgSO_4 , Na_2HPO_4 (не используем агар).

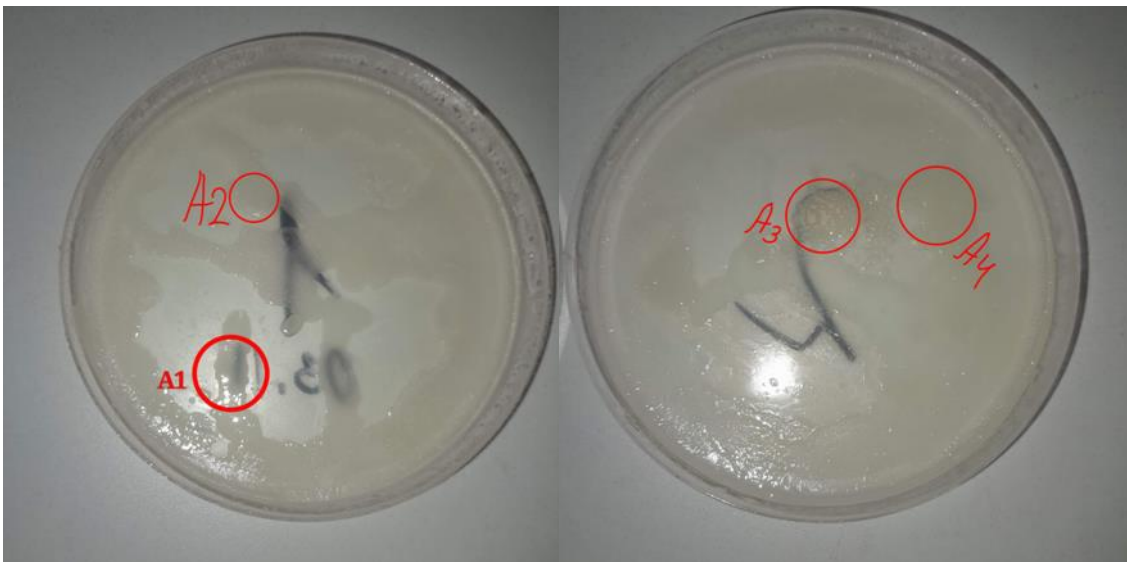
Для среды «Сидерофоры» готовая «Смесь солей для среды Сидерофоры», раствор «Смесь микроэлементы», а также Амфоторецин – краситель.

Для среды «Целлюлоза» $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , MgSO_4 , NaCl (не используется глюкоза и CaCO_3).

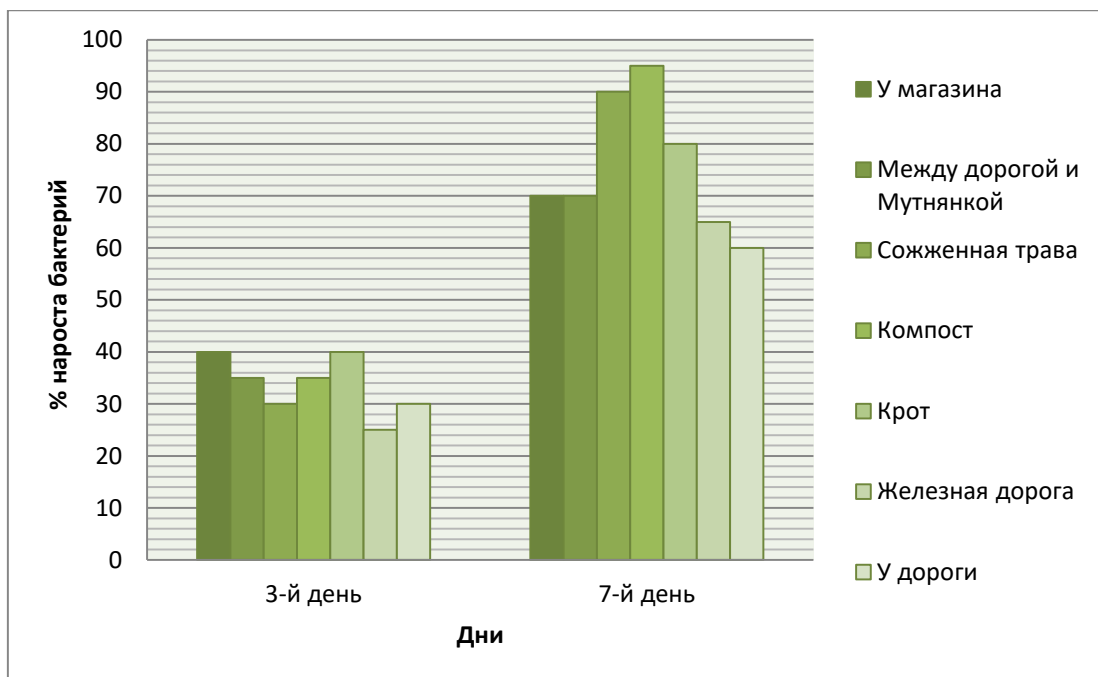
После приготовления сред размещаем их по планшетам.



Через некоторое время проверяем чашки Петри, на которые мы ранее наносили раствор с землей. Можно заметить, что на некоторых местах обильно выросли бактерии. При помощи зубочистки отбираем пробу с разных мест чашки Петри, далее наносим пробу на планшеты.



Через 3, 7 дней после посева анализируем изменение сред под воздействием бактерий.



После заключительной проверки при помощи зубочистки распределяем бактерии по планшетам. Через неделю анализируем результат.

	Азот	Фосфор	Калий	Сидерофоры	Целлюлоза
1. У магазина «Марс»	Сильное пожелтение	Нет реакции	Нет реакции	Сильное пожелтение	Слабая реакция
2. Между дорогой и Мутнянкой	Сильное пожелтение	Есть реакция	Есть реакция	Сильное пожелтение	Слабая реакция
3. Сожженная трава	Сильное пожелтение	Нет реакции	Есть реакция	Сильное пожелтение	Сильная реакция
4. Компост ул. Красноармейская	Нет реакции	Нет реакции	Есть реакция	Сильное пожелтение	Сильная реакция
5. Крот	Слабое пожелтение	Есть реакция	Есть реакция	Сильное пожелтение	Слабая реакция

6. Железная дорога	Нет реакции	Нет реакции	Нет реакции	Сильное пожелтение	Слабая реакция
7. У дороги	Сильное пожелтение	Есть реакция	Есть реакция	Сильное пожелтение	Слабая реакция

Заключение

В ходе работы: изучена литература, отобраны образцы почв, проведены исследования механического состава почвы, определение среды pH, проведены наблюдения за ростом колоний азотобактер, сделан скрининг азотфиксирующих бактерий на способность к стимулированию роста растений.

Гипотеза наша подтвердилась, в каждой почве присутствуют бактерии, способствующие росту растений.

Азотфиксирующие бактерии были выявлены во всех изученных образцах почвы.

Во всех образцах почв обнаружены штаммы, способные вырабатывать сидерофоры.

В образцах № 6, 7 колонии отличались низкой скоростью роста. По способности солюбилизировать фосфор оптическим свойствам и цвету можно было различить две разновидности – белые непрозрачные (2, 5, 7) и бесцветные прозрачные колонии (1,3,4,6).

В почве отмечено наличие как медленно растущих (3, 6, 7) так и быстро растущих колоний (1,2, 4, 5). По оптическим свойствам и цвету были

выявлены колонии бесцветные непрозрачные, коричнево-черные, желтовато-зеленоватые.

Были выявлены многофункциональные штаммы азотфиксирующих бактерий

В образцах почв №2, 5, 7 обнаружены штаммы, способные солюбилизовать фосфор и вырабатывать сидерофоры.

По структуре в г. Изобильном преобладают легкосуглинистые и глинистые почвы, а также присутствуют среднесуглинистые и тяжелосуглинистые.

Уровень рН в почвах преимущественно равен 6(близко к нейтральному)

Список используемой литературы

1. <https://obrazovaka.ru/geografiya/pochvy-rossii-geograficheskoe-polozhenie.html>
2. <https://studfile.net/preview/2465796/page:4/>
3. <https://agrodom.com/advice/azot-v-zhizni-rasteniy-ego-rol-nedostatok-i-sposoby-vosstanovleniya/>
4. <https://www.vhoz.ru/articles/ogorod/vidy-fosforykh-udobreniy-kakie-luchshe-vnosit-v-pochvu-na-ogorode/>
5. <https://biomolecula.ru/articles/probiotiki-dlia-rastenii-kak-nakormit-rastushchii-mir>
6. <https://biomolecula.ru/articles/probiotiki-dlia-rastenii-kak-nakormit-rastushchii-mir>
7. <https://stroy-podskazka.ru/pochva/bakteriya/>
8. <https://vk.com/badbrowser.php>
9. Ха Т. З., Канарский А. В., Канарская З. А., Щербаков А. В., Щербакова Е. Н. Ключевой стимулятор роста растений – ризобактерии // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Сер.: Лес. Экология. Природопользование. 2020. № 3 (47). С. 58–73. DOI: <https://doi.org/10.25686/2306-2827.2020.3.58>