

VI Международный конкурс исследовательских работ школьников
"Research start" 2023/2024

Направление: Естественно-научные дисциплины

**Ростостимулирующее влияние азотофиксирующих
бактерий рода *Azotobacter***

Исследовательскую работу выполнила: ученица 10а
класса

ГАОУ «Губернаторский многопрофильный лицей-
интернат для одаренных детей Оренбуржья»; Центр
выявления и поддержки одаренных детей «Гагарин»:
Сучкова Софья

Руководитель исследовательской работы: педагог
дополнительного образования Центра выявления и
поддержки одаренных детей «Гагарин», ГАОУ
«Губернаторский многопрофильный лицей-интернат
для одаренных детей Оренбуржья»,
к.б.н. Игнатенко М.Е.

Оренбург, 2024

Содержание

Введение.....	3
Бактерии рода <i>Azotobacter</i> , их роль в природе и жизни человека.....	4
Материалы и методы исследования.....	5
Результаты исследования.....	7
Заключение.....	12
Список литературы.....	13

ВВЕДЕНИЕ

Для своего роста и развития растения нуждаются в макро- и микроэлементах. Потребность растений в макроэлементах, являющихся незаменимой биохимической основой клеток и тканей, выше, чем в микроэлементах [1]. Общеизвестно, что основными макроэлементами необходимыми для растений являются: азот (N), фосфор (P), калий (K). Потребность растений в азоте значительно выше, чем в других питательных веществах. Недостаток азота подавляет фотосинтез сильнее, чем недостаток других элементов, так как от него напрямую зависит содержание хлорофилла в листьях [4]. Улучшение снабжения азотом вызывает качественные изменения в морфологии, анатомии и химическом составе растений. Так установлено, что у травянистых растений в ответ на увеличение количества доступного азота увеличиваются высота и число надземных побегов, количество листьев, их размеры, возрастает отношение массы надземных частей к подземным. Лучшая обеспеченность азотом ведет к более экономному расходованию воды на образование фитомассы (снижается транспирационный коэффициент) [4].

Значительную роль в обеспечении растений азотом играют азотфиксирующие бактерии, способные переводить газообразный азот в растворимую форму, доступную для усваивания растениями. Помимо того, что азотфиксирующие бактерии играют важную роль в развитии растений, они обеспечивают им защиту от патогенов и вредителей, адаптацию к различным стрессам, а также предохраняют почвы от истощения, восстанавливают их естественное плодородие и поддерживают биологическое разнообразие растительных сообществ [5].

Исходя из вышесказанного **целью исследовательской работы** явилось изучение ростстимулирующего влияния бактерии рода *Azotobacter* на развитие корневой системы цветочно-декоративных растений (на примере *Tagetes*).

Для достижения цели исследования были поставлены следующие **задачи**:

- Изучить литературу, посвященную проблеме исследования бактерий рода *Azotobacter*;
- Выделить чистые культуры бактерий рода *Azotobacter* из образцов почвы;
- Изучить влияние бактерии рода *Azotobacter* на развитие корневой системы *Tagetes*.

Объект исследования: бактерии рода *Azotobacter*.

Предмет исследования: корневая система рассады бархатцев.

Гипотеза: бактерии рода *Azotobacter* оказывают стимулирующее влияние на развитие корневой системы растений.

БАКТЕРИИ РОДА *AZOTOBACTER*, ИХ РОЛЬ В ПРИРОДЕ И ЖИЗНИ ЧЕЛОВЕКА

Род *Azotobacter* был признан в 1901 г., когда голландский микробиолог, ботаник и основатель экологической микробиологии Мартин Виллем Бейеринк выделил из почвы аэробную неспорообразующую грамотрицательную бактерию, фиксирующую молекулярный азот, и назвал ее *Azotobacter chroococcum* [10]. В последующие годы были обнаружены *Azotobacter vinelandii* (1903), *Azotobacter beijerinckii* (1904), *Azotobacter nigricans* (1949), *Azotobacter paspali* (1966), *Azotobacter armeniacus* (1981), *Azotobacter salinestris* (1991). Представители рода *Azotobacter* широко распространены по всему миру и встречаются почве, воде, донных отложениях и корнях растений [8].

Все виды азотобактера аэробны. Источником азота для них служат соли аммония, нитриты, нитраты и аминокислоты. При отсутствии связанных форм азота азотобактер фиксирует молекулярный азот. Фиксация азота – сложный энергозатратный процесс, который начинается при недостатке нитратов и аммиака и катализируется ферментом нитрогеназой. 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. Осуществляя фиксацию молекулярного азота, представители рода *Azotobacter* играют важнейшую роль в круговороте азота почвы [10]. Бактерии рода *Azotobacter* являются биологическими стимуляторами роста растений. Они продуцируют широкий спектр вторичных метаболитов, в числе которых витамины, аминокислоты, гормоны роста растений, противогрибковые соединения, цианистый водород и сидерофоры. Перечисленные выше вещества оказывают непосредственное влияние на прорастание корней и семян многих сельскохозяйственных культур, а также их рост и развитие [9]. В связи с этим представители рода *Azotobacter* активно используются в производстве биоудобрений. Удобрения на основе *Azotobacter* производят и применяют в России, Канаде, Колумбии, Венгрии, Индии, Австралии [8]. Экзополисахариды, синтезируемые *Azotobacter*, мобилизуют тяжёлые металлы в почве, способствуя тем самым самоочищению почв, загрязнённых тяжёлыми металлами, такими, например, как кадмий, ртуть и свинец. Некоторые представители рода *Azotobacter* способны к биodeградации ароматических соединений, например, протокатехиновой кислоты, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты или 2,4,6-трихлорфенола — ранее использовавшегося инсектицида, фунгицида и гербицида, имеющего мутагенное и канцерогенное действие и являющегося ксенобиотиком и поллютантом [10].

Кроме того, бактерии рода *Azotobacter* являются в качественным индикатором в оценке состояния среды [2].

Таким образом, важно отметить, что интерес исследователей к роду *Azotobacter* не ослабевает с момента их обнаружения в 1901 г. до настоящего времени, что обусловлено их высоким значением как в природе, так и в жизнедеятельности человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования послужили 4 штамма бактерий рода *Azotobacter*, выделенные из почв Оренбургской области. В исследование были взяты два образца почвы: почва из городского парка отдыха «Зауральная роща» (г. Оренбург, Оренбургская область) и лесопосадки в окрестности с. Беляевка (Беляевский район, Оренбургская область). Выделение бактерий проводили в два этапа. На первом этапе почвенные комочки высевали на чашки Петри со средой Эшби (г/л: фруктоза 20,0; K_2HPO_4 0,2; $MgSO_4$ 0,2; NaCl 0,2; K_2SO_4 0,1; $CaCO_3$ 5,0; агар бактериологический 15,0). Высевы выполняли в трех повторностях (рис. 1). Культивирование осуществляли при комнатной температуре, в защищенном от попадания прямых солнечных лучей месте. Учет выросших колоний проводили на 4-е, 7-е и 10-е сутки (рис.1В).

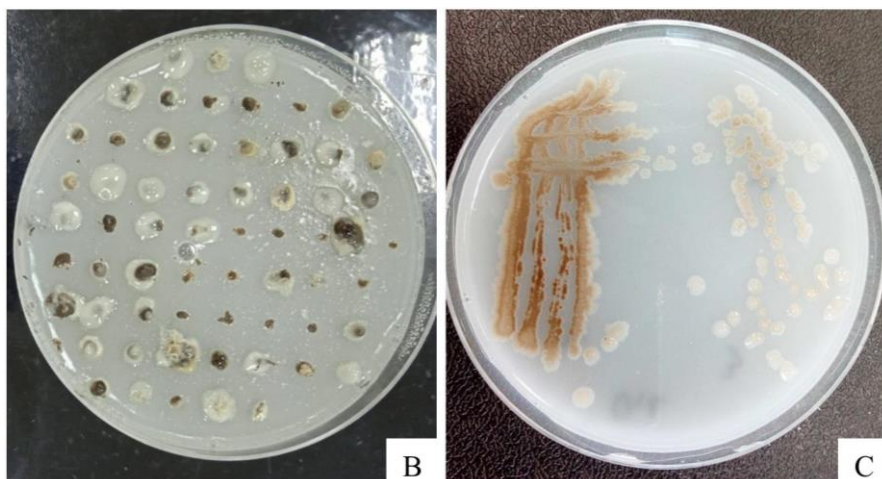


Рисунок 1. Обнаружение бактерий рода *Azotobacter* в исследуемых почвенных образцах методом почвенных комочков (В) и выделение бактерий в чистую культуру методом истощающего штриха (С).

На втором этапе выделяли чистую культуру бактерий. Для этого методом истощающего штриха выросшие колонии переносили на свежую среду Эшби (рис. 1С). Посевы культивировали в течении 2 суток при комнатной температуре, в защищенном от попадания прямых солнечных лучей месте. Через двое суток выросшие

изолированные колонии вновь пересевали на свежую питательную среду. Морфологию и чистоту культуры выделенных бактерий изучали с помощью микроскопов Primo Star, Carl Zeiss при увеличении 1000х.

Влияние бактерий рода *Azotobacter* на процесс корнеобразования у растений оценивали в эксперименте. В опыт были взяты 4 штамма бактерий. При выборе бактериальных штаммов для эксперимента учитывали интенсивность их роста (были отобраны самые быстрорастущие штаммы). В качестве посадочного материала использовали семена бархатцев (*Tagetes*). Посев проводили в грунт для рассады овощей и цветов «Огородник», приобретенный в магазине (рис. 2).



Рисунок 2. Постановка эксперимента по оценке влияния бактерий рода *Azotobacter* на процесс корнеобразования у растений.

После посева семян почву во всех посадочных ящиках поливали равным объемом воды (100 мл). Были смоделированы 2 варианта опыта: для I варианта в поливную воду сносили 5 мл густой бактериальной взвеси, содержащей смесь из четырех штаммов бактерий (штаммы «Б 12», «Б 2», «Р 1», «Р 5»); для II варианта — 5 мл густой бактериальной взвеси, содержащей только один штамм бактерий («Р 5»). В поливную воду для контрольного образца приливали 5 мл чистой воды (рис. 3). Полив проводили по мере высыхания почвы (в среднем, каждые 2–3 дня). Бактериальные взвеси готовили из 2-х суточных культур бактерий.

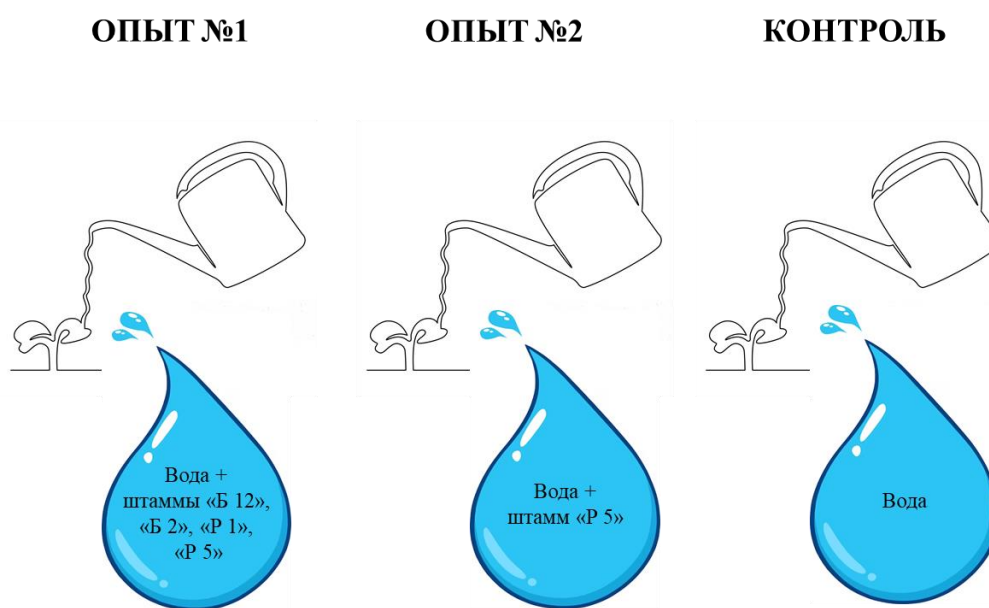


Рисунок 3. Схема эксперимента по оценке влияния бактерий рода *Azotobacter* на процесс корнеобразования у растений.

На этапе развитых семядольных листьев проводили измерения длины формирующегося корня. Для этого ростки вместе с почвенным комом аккуратно извлекали из посадочного ящика, погружали в воду, отмывали корень от почвы и после этого проводили замер длины. Полученные результаты заносили в дневник эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе исследования, методом почвенных комочков, мы оценили содержание бактерий рода *Azotobacter* в грунте, который был приобретен в магазине и использован нами для выращивания бархатцев. В исследуемом грунте было отмечено крайне низкое содержание азотобактерий по сравнению с природными образцами

почвы из городского парка отдыха «Зауральная роща» (г. Оренбург, Оренбургская область) и лесопосадки в окрестности с. Беляевка (Беляевский район, Оренбургская область) (рис. 4).

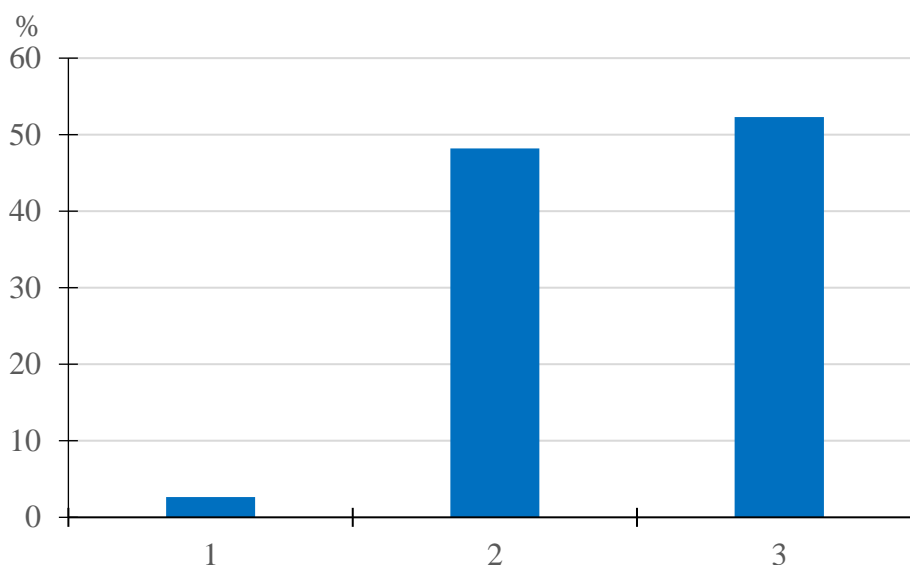


Рисунок 4. Обилие обрастаний почвенных комочков в исследуемых почвенных образцах: 1 – грунт для рассады овощей и цветов «Огородник» 2 – Зауральная роща, г. Оренбург; 3 – лесопосадка в окрестности с. Беляевка, Беляевский район, Оренбургская область.

На следующем этапе исследования были получены чистые культуры *Azotobacter*. Выбранные нами штаммы бактерий соответствовали описанию бактерий рода *Azotobacter*: клетки относительно крупного размера (1—2 мкм в диаметре), грамотрицательные, овальные или сферические, расположенные одиночно, парами, неправильными скоплениями или, изредка, цепочками различной длины; в старых культурах клетки продуцируют толстый слой слизи, формирующий капсулу[6] (рис. 5).

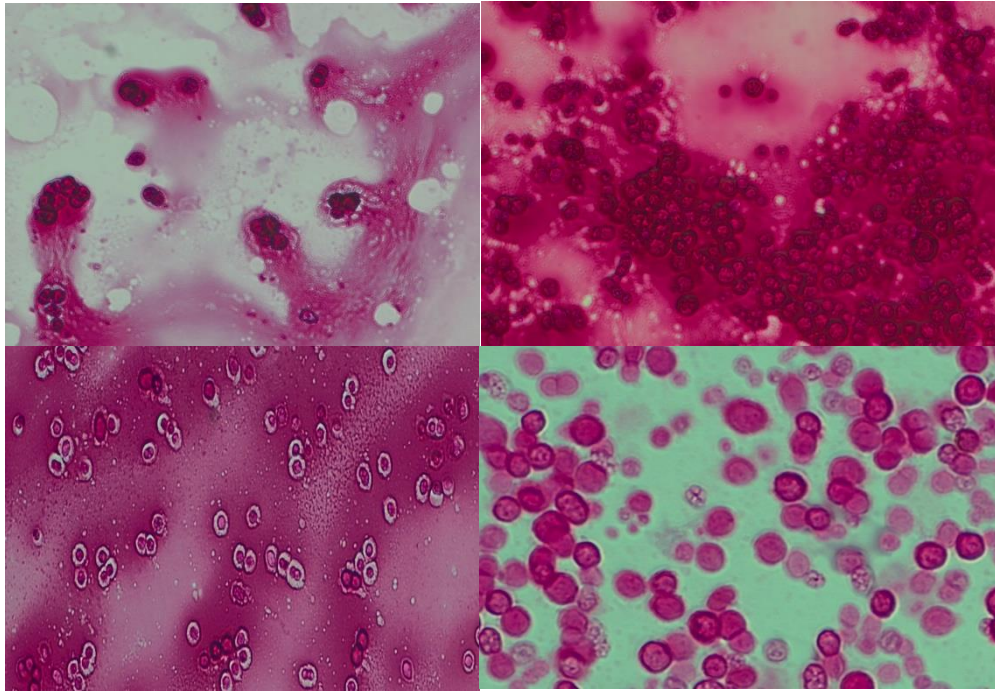


Рисунок 5. Микроскопическое исследование бактерий рода *Azotobacter*, используемых в эксперименте (увеличение 1000×).

Далее мы использовали полученные штаммы бактерий для оценки их влияния на процесс корнеобразования у растений. В результате проведенных экспериментов нами установлено, что при поливе рассады смесью из четырех штаммов бактерий рода *Azotobacter* длина формирующегося корня варьировала от 2,5 см до 5,2 см ($n=18$), составляя в среднем 4,25 см (табл. 1, рис. 6).

Во втором варианте опыта, когда полив рассады проводился только одним штаммом бактерий *Azotobacter*, длина формирующегося корня варьировала от 1,5 см до 5,6 см ($n=18$), составляя в среднем 3,67 см (табл. 1, рис. 6).

Наименьшие величины длины формирующегося корня были отмечены нами в контроле, где поливная вода не содержала бактериальные штаммы (табл. 1, рис. 6). В контроле длина формирующегося корня варьировала от 0,1 см до 3,0 см ($n=18$), составляя в среднем 1,48 см.

Таблица 1. Результаты эксперимента по влиянию бактерий рода *Azotobacter* на формирование корневой системы у ростков *Tagetes*.

№ ростка	Опыт №1 Длина, см	Опыт №2 Длина, см	Контроль Длина, см
1	5,0	5,6	1,0
2	3,0	4,5	0,1
3	5,0	4,6	2,3
4	6,0	2,0	2,1
5	3,5	3,5	1,0
6	5,0	4,3	3,0
7	4,0	3,0	1,5
8	4,0	5,1	1,9
9	5,2	2,5	2,2
10	4,0	4,0	0,3
11	2,5	4,4	1,0
12	5,0	2,0	1,8
13	3,6	4,0	2,0
14	4,0	5,0	1,6
15	4,7	4,5	1,3
16	1,5	1,5	2,3
17	4,5	3,0	1,0
18	3,0	2,5	0,2



Опыт №1



Опыт №2



Контроль

Рисунок 6. Результаты эксперимента по влиянию бактерий рода *Azotobacter* на формирование корневой системы у ростков *Tagetes*

Полученные нами результаты могут быть аргументированы способностью *Azotobacter* продуцировать широкий спектр вторичных метаболитов, оказывающих прямое влияние на прорастание корней и семян многих растений, а также их дальнейший рост и развитие [3, 7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проделанной работы были получены 4 штамма бактерий рода *Azotobacter*. В ходе эксперимента оценено влияние выделенных штаммов бактерий на процесс корнеобразования у *Tagetes*. Установлено, что регулярное внесение с поливными водами бактерий в почву стимулировало развитие корневой системы у рассады бархатцев. Средняя длина формирующегося корня в эксперименте превышала среднюю длину корня в контроле в 2,5 и в 2,9 раза (при внесении в почву одного и четырех штаммов бактерий, соответственно). Исследуемые штаммы могут быть рекомендованы в качестве биологического удобрения для цветочно-декоративных растений, так как они гораздо полезнее для почвы, чем химические удобрения.

Поставленная нами гипотеза о том, что бактерии рода *Azotobacter* оказывают стимулирующее влияние на развитие корневой системы растений, была подтверждена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуреев И.И. Приборное и методологическое обеспечение диагностики потребности растений в элементах питания. Инженерные технологии и системы. 2022. 32(4), 504–519. <https://doi.org/10.15507/2658-4123.032.202204.504-519>
2. Данилова А.А., Петров А.А. Вопросы интерпретации результатов биотеста с применением бактерий рода *Azotobacter*. Почвы и окружающая среда. 2021. 4(3): 1-11. <https://doi.org/10.31251/pos.v4i3.154>
3. Кадырова Г.Х., Абдуллаев А.К., Алиев З.З., Халилов И.М., Бобокулов М.Ш., Сафаров Х.Ш. Ростостимулирующие свойства азотфиксирующих и энтомопатогенных бактерий. *Universum: химия и биология: электронный научный журнал*. 2022. 5(95), 12–15. <https://7universum.com/ru/nature/archive/item/13530>
4. Лебединцев А.Н. Процесс нитрификации как фактор усиления зольного питания растений. Москва: Сельхозгиз. 2001. 289 с.
5. Никишина О.В., Морозов Г.А. Исследование процесса накопления азотобактера в почве на примере города Иннополис. *Электроника, фотоника и киберфизические системы*. 2022. Т.2, №2: 43-50.
6. Ряховский А.В., Яичкин В.Н., Косых А.Н., Сотникова И.И. Биологический баланс азота и фосфора в земледелии Оренбургской области. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2010. 2(26): 35-37.
7. Соколова М.Г., Акимова Г.П., Рудиковский А.В., Глянько А.К., Вайшля О.Б. Бактериальные биопрепараты и их влияние на урожай томатов и картофеля. *Плодородие*. 2008. № 1, 26–27.
8. Aasfar A., Bargaz A., Yaakoubi K., Hilali A., Bennis I., Zeroual Y., Meftah Kadmiri I. Nitrogen fixing *Azotobacter* species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. *Front. Microbiol.* 2021. 12:628379. doi: 10.3389/fmicb.2021.628379
9. Chennappa G., Sreenivasa M.Y., Nagaraja H. *Azotobacter salinestris*: A Novel Pesticide-Degrading and Prominent Biocontrol PGPR Bacteria. In: Panpatte, D., Jhala, Y., Shelat, H., Vyas, R. (eds) *Microorganisms for Green Revolution. Microorganisms for Sustainability*, vol 7. Springer, Singapore. 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7146-1_2
10. Sumbul A., Ansari R.A., Rizvi R., Mahmood I. *Azotobacter*: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020. 27(12): 3634-3640. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.004>

Анкета-заявка участника регионального этапа Всероссийского конкурса научно-исследовательских работ обучающихся общеобразовательных организаций
(на 2023/2024 учебный год)

Работа представлена на секцию: Биология и сельское хозяйство

Фамилия, имя, отчество автора (полностью): Сучкова Софья Александровна

Название работы, подаваемой на конкурс: Ростостимулирующее влияние азотфиксирующих бактерий рода Azotobacter

Год, месяц, день рождения: 14.02.2007 Место учебы: школа: ГАОУ «Губернаторский многопрофильный лицей-интернат для одаренных детей Оренбуржья» класс: 10а

e-mail: sofya_suchkova07@mail.ru* (* - проверьте правильность заполнения. В случае ошибки в написании адреса электронной почты наградные материалы до Вас не дойдут).

Сотовый (или дом телефон автора с междугородним телефонным кодом) 89033945187

Фамилия, имя, отчество руководителя работы (полностью):

Игнатенко Марина Евгеньевна

должность: педагог дополнительного образования

место работы: Центр выявления и поддержки одаренных детей «Гагарин», ГАОУ

«Губернаторский многопрофильный лицей-интернат для одаренных детей Оренбуржья»

телефон для связи (сотовый): 89619098177 e-mail: ignatenko_me@mail.ru *

Полный адрес школы индекс: 460000 город: Оренбург область: Оренбургская
село _____

телефон: 772573 федеральный

телефонный код города +7 (3532)

Анкета-заявка участника регионального этапа Всероссийского конкурса научно-исследовательских работ обучающихся общеобразовательных организаций
(на 2023/2024 учебный год)

Работа представлена на секцию: Биология и сельское хозяйство

Фамилия, имя, отчество автора (полностью): Фирсов Константин Олегович

Название работы, подаваемой на конкурс: Ростостимулирующее влияние азотфиксирующих бактерий рода Azotobacter

Год, месяц, день рождения: 02.05.2007 Место учебы: школа: ГАОУ «Губернаторский многопрофильный лицей-интернат для одаренных детей Оренбуржья» класс: 10а

e-mail: kostik.firs@yandex.ru* (*- проверьте правильность заполнения. В случае ошибки в написании адреса электронной почты наградные материалы до Вас не дойдут).

Сотовый (или дом телефон автора с междугородним телефонным кодом) 89586697067

Фамилия, имя, отчество руководителя работы (полностью):

Игнатенко Марина Евгеньевна

должность: педагог дополнительного образования

место работы: Центр выявления и поддержки одаренных детей «Гагарин», ГАОУ

«Губернаторский многопрофильный лицей-интернат для одаренных детей Оренбуржья»

телефон для связи (сотовый): 89619098177 e-mail: ignatenko_me@mail.ru *

Полный адрес школы индекс: 460000 город: Оренбург область: Оренбургская
село _____

телефон: 772573 федеральный

телефонный код города +7 (3532)