

Департамент образования администрации города Липецка

Муниципальное автономное общеобразовательное учреждение

«Лицей 44» (Липецкая область)

Исследовательский проект

Влияние почвенных азотфиксаторов из экосистем разного типа на развитие свеклы

Автор:

Руднева Анастасия Михайловна

ученица 11 «А» класса

Научный руководитель:

Бутова Анна Валерьевна,

учитель биологии

Липецк,

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	6
Азотификсаторы — это микроорганизмы, способные усваивать молекулы азота из атмосферы и преобразовывать их в формы, доступные для растений (например, в аммоний или нитраты). Этот процесс называется азотфиксацией и играет ключевую роль в круговороте азота в природе.....	6
Молекулярный азот (N_2) в атмосфере состоит из двух атомов азота, связанных прочной тройной ковалентной связью. Эта связь делает молекулу очень стабильной, и в нормальных условиях без катализаторов азот практически не вступает в реакции окисления-восстановления. Растения не обладают необходимыми ферментами для разрыва этой связи и преобразования газообразного азота в доступные для них соединения.	6
Несимбиотические азотификсаторы — это свободноживущие бактерии, которые не образуют симбиотических ассоциаций с растениями, в отличие от симбиотических видов (например, клубеньковых бактерий рода <i>rhizobium</i>). Род <i>azotobacter</i> — один из наиболее изученных примеров несимбиотических азотификсаторов.	6
Протеазы — это ферменты, которые расщепляют белки, гидролизуя пептидные связи между аминокислотами. Микроорганизмы (бактерии, грибы) — основной источник протеаз в промышленном производстве благодаря их биоразнообразию и простоте культивирования.	6
1.1. ОПИСАНИЕ МЕСТА ОТБОРА ОБРАЗЦОВ	7
1.3. получение ЧИСТОГО ШТАММА	13
ГЛАВА 2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	16
2.1. ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО УДОБРЕНИЯ	16
2.2. . ВЛИЯНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ УДОБРЕНИЙ НА ВСХОЖЕСТЬ СЕМЯН	17

2.3. СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ЭКСПЕРИМЕНТА.....	18
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	21

ВВЕДЕНИЕ

Почва является одним из ключевых компонентов экосистемы, играющим важнейшую роль в поддержании биологического разнообразия и обеспечении устойчивости агроэкосистем. Она не только служит средой обитания для множества организмов, но и выполняет функции, важные для функционирования природных и сельскохозяйственных систем.

Несембиотические азотфиксаторы представляют собой группу микроорганизмов, способных фиксировать атмосферный азот, не образуя симбиотических отношений с растениями. Протеолитическая активность этих микроорганизмов способствует разложению органических веществ, что ведет к улучшению структуры почвы и увеличению ее плодородия.

Актуальность исследования связана с необходимостью улучшения плодородия почв и повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Использование природных азотфиксаторов может снизить зависимость от химических удобрений. Исследование поможет выявить природные ресурсы для экологически чистого земледелия. Это важно для устойчивого развития сельского хозяйства региона.

Проблема: существует ли связь между активностью почвенных азотфиксаторов и типом экосистемы?

Гипотеза. Азотфиксаторы в почвах Грязинского района обладают большей активностью, чем азотфиксаторы в почвах Левобережного района г. Липецка.

Цель данной работы заключается в анализе почв Грязинского и Левобережного районов Липецкой области на предмет наличия несимбиотических азотфиксаторов, их протеолитической активности и влияния на всхожесть модельных растений.

Объект исследования: усредненные почвенные образцы.

Задачи исследования

1. Отбор и подготовка проб: Провести отбор почвенных образцов на ключевых участках Левобережного и Грязинского районов с учетом типа почв, характера землепользования (поле, луг, болото, лесополоса) и антропогенной нагрузки.

2. Выделение и культивирование микроорганизмов: выделить из почвенных образцов чистые культуры несимбиотических азотфиксирующих бактерий с использованием селективных среды Эшби .

4. Провести сравнительный анализ численности, разнообразия и активности выделенных микроорганизмов в зависимости от района отбора и типа почвы (Левобережный vs. Грязинский район).

4. Скрининг протеолитической активности: Провести качественный и количественный анализ выделенных колоний на наличие протеолитической активности.

5. Получить культуральную жидкость из колоний азотфиксаторов.

6. Исследовать влияние штаммов на всхожесть и прирост свеклы.

7. Провести сравнительный анализ результатов. Сделать выводы. дать оценку гипотезы.

Практическая значимость исследования

1. Фундамент для создания биоудобрений: Выделенные активные штаммы, обладающие одновременно способностью к фиксации азота и выработке протеаз, могут стать основой для создания новых биоудобрений. Такие препараты не только обогащают почву азотом, но и ускоряют разложение растительных остатков, делая питательные вещества более доступными для культурных растений .

2. Повышение эффективности сельского хозяйства: Внедрение таких биопрепаратов позволит частично заменить дорогостоящие и экологически опасные минеральные азотные удобрения, что особенно актуально для агропромышленного комплекса Липецкой области .

ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Азотификсаторы — это микроорганизмы, способные усваивать молекулы азота из атмосферы и преобразовывать их в формы, доступные для растений (например, в аммоний или нитраты). Этот процесс называется азотфиксацией и играет ключевую роль в круговороте азота в природе.

Молекулярный азот (N_2) в атмосфере состоит из двух атомов азота, связанных прочной тройной ковалентной связью. Эта связь делает молекулу очень стабильной, и в нормальных условиях без катализаторов азот практически не вступает в реакции окисления-восстановления. Растения не обладают необходимыми ферментами для разрыва этой связи и преобразования газообразного азота в доступные для них соединения.

Несимбиотические азотфиксаторы — это свободноживущие бактерии, которые не образуют симбиотических ассоциаций с растениями, в отличие от симбиотических видов (например, клубеньковых бактерий рода *rhizobium*). Род *azotobacter* — один из наиболее изученных примеров несимбиотических азотфиксаторов.

Протеазы — это ферменты, которые расщепляют белки, гидролизуя пептидные связи между аминокислотами. Микроорганизмы (бактерии, грибы) — основной источник протеаз в промышленном производстве благодаря их биоразнообразию и простоте культивирования.

1.1.ОПИСАНИЕ МЕСТА ОТБОРА ОБРАЗЦОВ

Первым этапом исследования стало определение целей и задач, которые необходимо решить для достижения поставленной цели. Основной задачей являлось выявление несембиотических азотофиксаторов в почвах Грязинского района, а также оценка их протеолитической активности, что непосредственно связано с их ролью в азотном обмене и улучшении плодородия почв. Для этого необходимо было собрать образцы почвы из различных участков районов, что позволило бы получить репрезентативные данные о распределении азотофиксаторов в пространстве и времени.

Исследуемые участки:

1.Место: Большесамовецкий сельсовет, Грязинский район; Липецкая область (луг);Координаты: 52.526281, 39.876278;Кол-во образцов 300 грамм; Глубина отбора 10см.рис.1



Рис.1

2.Место: Липецк-Снт Дачный-5 (болото); координаты 52,50841° С, 39,78926°; Кол-во образцов 400 грамм; Глубина отбора 10 см рис.2



Рис.2

3. Место: Липецк -СНТ Дачный - 5 (почва подвергалась хим обработке); Координаты: 52,50671° С, 39,78826°; Кол-во образцов 300 грамм Глубина отбора 7 см рис.3



Рис.3

4.Место:Липецк - Снт Дачный-5 (лес); Координаты: 52,50457° С, 39,78551°; кол-во образцов 300грамм; Глубина отбора 5 см рис.4



Рис.4

5.Место:Большесамовецкий сельсовет, Грязинский район, Липецкая область (поле); Координаты: 52.526281, 39.876278; Кол-во образцов 300 грамм; Глубина отбора 5см рис.5



Рис.5

Сбор образцов почвы был проведен с учетом различных факторов, таких как тип почвы, растительность, климатические условия и антропогенное воздействие. Образцы были взяты из верхнего слоя почвы (0-10 см), так как именно в этом горизонте сосредоточены основные биологические процессы, включая азотфиксацию. Для обеспечения репрезентативности выборки, в каждом из исследуемых участков было собрано несколько проб, которые затем были объединены в одну составную пробу для дальнейшего анализа. Такой подход позволяет минимизировать влияние случайных факторов и повысить достоверность полученных результатов.

После сбора образцов почвы, следующим этапом стало их высушивание. Рис.6



Рис.6

1.2. АНАЛИЗ НЕСИМБИОТИЧЕСКИХ АЗОТОФИКСАТОРОВ В ПОЧВЕ. ОЦЕНКА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ.

Следующим шагом в методологии исследования стало выделение микробных сообществ из образцов почвы. Для этого использовались методы, основанные на селективной среде «эшби». Для приготовления среды я использовала 1 г CaCO_3 ; 3 г Агара; 4 г глюкозы. На среде разместила комочками увлажненные образцы земли.

Первый посев земли на селективную среду «Эшби»:

Чашка Петри с образцом с участка «луг» рис.7

Чашка Петри с образцом с участка «болото» рис.8

Чашка Петри с образцом с участка «с хим.обработкой» рис.9

Чашка Петри с образцом с участка «лес» рис.10

Чашка Петри с образцом с участка «поле» рис.11

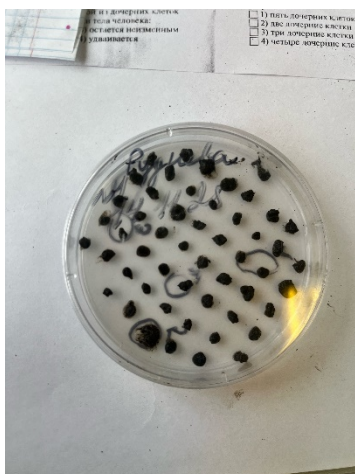


Рис.7



Рис.8

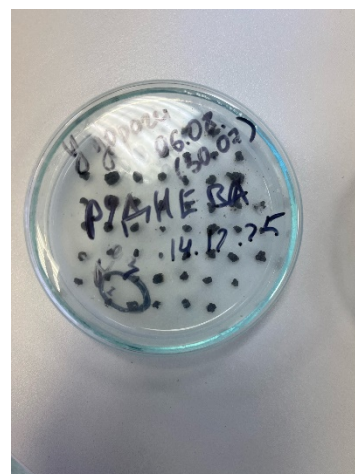


Рис.9



Рис.10

Рис.11

Через 3 дня некоторые образцы уже обросли приложением. Продолжив наблюдение , через 6 дней уже особенно были видны обрастания на образцах с участков «поле», «луг» с этими образцами я продолжила исследование .

Результаты посева почвы на селективную среду «Эшби» через 6 дней

Чашка Петри с образцом с участка «луг» рис.12

Чашка Петри с образцом с участка «болото» рис.13

Чашка Петри с образцом с участка «с хим.обработкой» рис.14

Чашка Петри с образцом с участка «лес» рис.15

Чашка Петри с образцом с участка «поле» рис.16

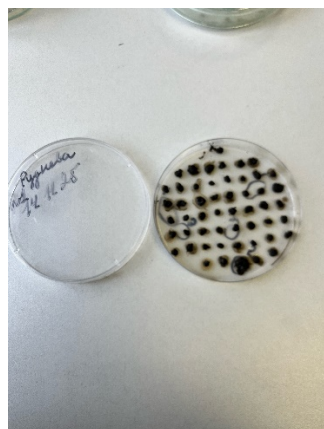


Рис.12

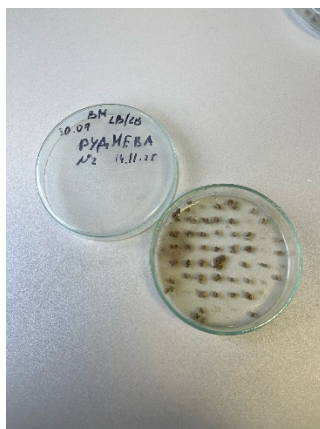


Рис.13



Рис.14



Рис.15



Рис.16

По формуле $Дк. пр = \frac{К. пр}{К. всего} \times 100\%$, где Дк.пр - доля колоний с зоной просветления, К.пр - количество колоний с зоной просветления. К.всего - количество колоний на исследуемой чашке Петри, рассчитала долю колоний с зоной просветления для образцов с «поле» и «луг». Процент колоний с зоной просветления у образца с луга составил 67% , а с поля 76 %. Процент колоний на образце с поля составил больше процентов , поэтому дальше я продолжила работу с этим образцом.

Посветлевшие колонии – штамм Агилис, темные – штамм Хроококкум.

1.3. ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТОГО ШТАММА

Мясо-пептонный агар (**МПА**) – это среда общего назначения, которая является неселективной и подходит для культивирования широкого спектра нетребовательных микроорганизмов. (МПА) - основная плотная питательная среда, используемая для выращивания хемоорганотрофных бактерий. Пептон и мясной экстракт служат источниками питательных веществ, необходимых для роста микроорганизмов: азота, витаминов, минеральных солей и аминокислот. Агар-агар, который добавляют к среде, придаёт ей повышенную плотность, обеспечивая расплавление только при закипании среды.

Первым этапом сварили среду МПА (1г. Пептон; 2г сухое обезжиренное молоко; 2г. Агар; 0,6г. Смесь компонентов для скрининговых сред). После разлива среды в чашки Петри методом «истощающего посева» посеяли заранее приготовленную суспензию из земли с образца «поле». Перед варкой среды приготовили суспензию: в емкость с чистой водой добавили 10 грамм земли, тщательно взболтали, оставили на время, чтобы земля осела Рис. 17



Рис.17

Спустя 4 дня выросли колонии светлого оттенка рис.18, одну из колоний рассеяли на отдельную твердую среду Эшби для того, чтобы получить чистый штамм, рис.19.

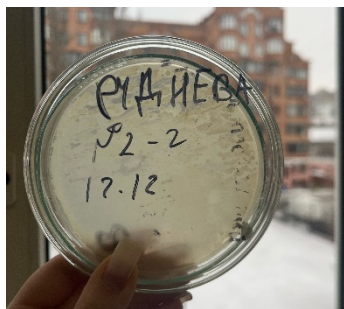


Рис.18



Рис.19

Через 5 дней из одной наиболее крупной колонии (рис.20) изготовили культуральную жидкость (колонию перенесли петлей с твердой среды на жидкую). Суспензии стояла в темном теплом месте на протяжении 10 дней под плотности клеток на мутнометре (рис.21.)

Получена суспензия штамма Агилис с образца «поле»

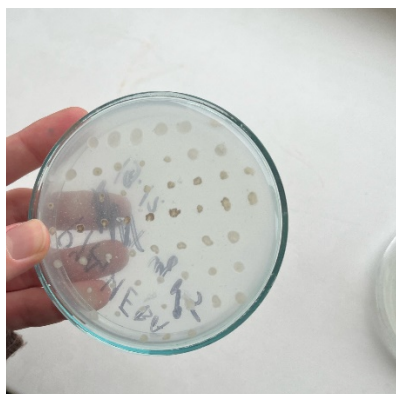


Рис.20

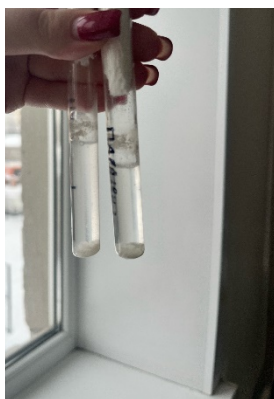


Рис.21

ГЛАВА 2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

2.1. ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО УДОБРЕНИЯ

Микробиологические удобрения - это препараты, содержащие живые культуры полезных бактерий. Они предназначены для улучшения питания растений и повышения плодородия почв.

В отличие от «химических удобрений», бактерии работают безопаснее: они заселяют ризосферу (зону корня) и в процессе жизнедеятельности поставляют растениям питание.

Минеральные удобрения часто вымываются дождями и засаливают почву, в то время как микробиологические восстанавливают её естественную микрофлору.

Изучение влияния микробиологических удобрений на всхожесть семян на культуру свеклы .

Полученную суспензию развели с 300мл бутилированной воды. Полученный раствор 3 дня стоял в темном теплом месте. В это время семена свеклы сначала для обеззараживания на протяжении 40 минут лежали в перексиде водорода, после этого они сутки лежали в кипяченной воде.

После этого в пластиковых стаканчиках сделали дренажные отверстия , для того чтобы посеять семена.

2.2. . ВЛИЯНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ УДОБРЕНИЙ НА ВСХОЖЕСТЬ СЕМЯН

Объект : микробиологическое удобрение (суспензия из штамма Агилис)

Предмет: всхожесть семян свеклы в разных видах почвы с разным количеством азотофиксаторов.

Гипотеза: обработка семян микробиологическим удобрением повышает процент всхожести и стимулирует рост корневой системы по сравнению с семенами, которые растут в земле с малым количеством азотофиксаторов и не удобряются суспензией.

1.Эксперимент№1. Земля обладающая большим количеством азотофиксаторов . В землю с «поля» посадили семена свеклы , на протяжении 10 дней кроме воды ничем не поливали .

2.Эксперимент№2. Земля не обладающая азотофиксаторами. В землю с «леса» посадили семена свеклы, на протяжении 10 дней кроме воды ничем не поливали.

3.Эксперимент№3. Земля не обладающая азотофиксаторами, но удобряемая суспензией. В землю с «леса» посадили семена свеклы , на протяжении 10 дней помимо воды удобряли полученной суспензией.

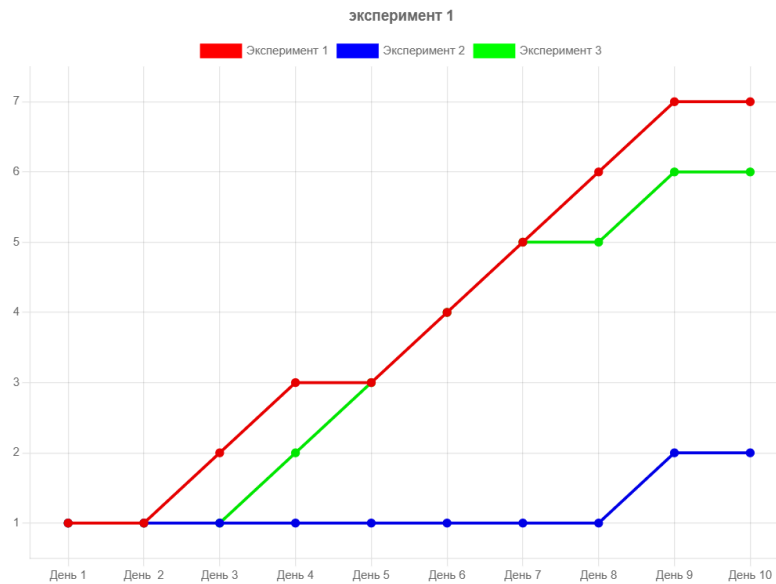
Каждого эксперимента для усредненного результата было по 3 повторности , все стаканчики с семена находились в одинаковых условиях (свет, температура), продолжительность эксперимента 10 дней.

2.3. СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ЭКСПЕРИМЕНТА

Наблюдение на протяжении 10 дней . Результаты

ДНЕВНИК НАБЛЮДЕНИЙ

Номер дня с момента посева	6	7	8	9	10
Эксперимент №1	Ростки активно растут	Высота ростков в среднем 4см	Высота ростков 5 см, появился листик	Высота ростков 6 см	Высота ростков 6 см
Эксперимент №2	Не взошли	Не взошли	Не взошли	В одном стаканчике появился маленький росток	Росток не растет, сразу начал увядать
Эксперимент №3	Взошли все 3 ростка	Высота 1 ростка 3см, высота 2 и 3 ростков 2см	Высота всех ростков 3см	У одного ростка появился листик	У двух ростков есть листик , высота ростков 4см
Номер дня с момента посева	1	2	3	4	5
Эксперимент №1	Не взошли	Не взошли	Взошел в одном стакане	Взошли еще в 2 стаканах	Во всех трех стаканах взошли
Эксперимент №2	Не взошли	Не взошли	Не взошли	Не взошли	Не взошли
Эксперимент №3	Не взошли	Не взошли	Не взошли	Взошел один росток	Взошел еще один росток



Результаты эксперимента

Десятидневные результаты эксперимента №1 рис.22

Десятидневные результаты эксперимента №2 рис.23

Десятидневные результаты эксперимента №3 рис.24



Рис.22



Рис.23



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты:

В эксперименте №1 процесс прошел по наиболее благоприятно: семена быстро взошли и стабильно развивались на протяжении всего срока наблюдения. Это обусловлено высоким содержанием несимбиотических азотфиксаторов в исходной почве.

В эксперименте №2 кардинальных изменений не произошло — почва, лишенная необходимых микроорганизмов, не смогла стимулировать к росту, и всходы так и не появились.

В эксперименте №3 после полива суспензией ростки появились почти сразу, демонстрируя положительную динамику. Хотя процесс шел чуть медленнее, чем в первом случае, эксперимент доказал, что даже обедненную почву можно сделать плодородной путем искусственного внесения несимбиотических азотфиксаторов.

Результаты исследования показали, что в почвах Грязинского района присутствует значительное количество несимбиотических азотфиксаторов в сравнении с Левобережным районом, что свидетельствует о высоком потенциале почв для биологического обогащения азотом. Это особенно важно для сельского хозяйства, так как азот является одним из ключевых элементов, необходимых для роста растений.

Гипотеза подтверждается.

1. Азотфиксирующие микроорганизмы продуцируют биологически активные вещества), которые напрямую стимулируют прорастание семян и развитие корневой системы.
2. Увеличение доступного азота на начальных этапах онтогенеза обеспечивает ускоренный стартовый рост проростков.

В заключение, можно сказать, что проведенное исследование подтвердило наличие несимбиотических азотфиксаторов в почвах Грязинского района Липецкой области и их протеолитической активности, что открывает новые возможности для применения биологических методов в сельском хозяйстве, а также исследование доказало прямую зависимость растений от азотфиксаторов. Полученные результаты подчеркивают важность

изучения почвенной микробиоты и ее роли в агрономии, а также необходимость дальнейших исследований в этой области.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов. Методические рекомендации к базовому исследовательскому набору: получение и анализ азотфиксирующих бактерий
2. Емцев, В. Т. Микробиология : учебник для вузов / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. Москва : Дрофа, 2008.
3. Нетрусов, А. И. Практикум по микробиологии : учебное пособие / А.И. Нетрусов. — Москва: Академия, 2011.
4. Терещенко, Н. Н. Эффективность микробиологических удобрений в агроценозах / Н. Н. Терещенко. —Томск : Издательство Томского университета, 2015.
5. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д. Г. Звягинцева. — Москва: Издательство МГУ, 2013.
6. Ахмедова А.Ф., Гюльяхмедов С.Г., Мустафаева Р.С., Кулиев А.А.— Протеолитическая активность и некоторые технологические свойства молочнокислых бактерий, изолированных из традиционных сыров Азербайджана. «Вести Бакинского Государственного Университета». Серия естественных наук, 2010, № 4, с. 45–51
7. Азотобактер. [Электронный ресурс]: Википедия.Свободная энциклопедия.
URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki>