

УДК 631.461.5

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА НАКОПЛЕНИЯ АЗОТОБАКТЕРА В ПОЧВЕ НА ПРИМЕРЕ ГОРОДА ИННОПОЛИС

О.В. Никишина¹, Г.А. Морозов²

¹Государственное автономное образовательное учреждение «Лицей Иннополис»
Российская Федерация, 420500, г. Иннополис, Квантовый бульвар, 1

²Казанский национальный исследовательский технический университет
им. А.Н. Туполева-КАИ

Российская Федерация, 420111, г. Казань, ул. К. Маркса, 10

Аннотация. В статье изложены результаты исследования пространственной неоднородности почвы города Иннополис, определения ее механического и химического состава. Описан процесс выращивания почвенных образцов, исследования микроскопических образцов бактерий, выявления накопления полимеров в бактериях.

Ключевые слова: азотобактер, механический и химический состав почвы, микроскопическое исследование образцов, нитраты, кислотность почвы, полимеры, карбонаты.

Введение

Отказ от применения минеральных удобрений и переход к биологизации земледелия становится все более перспективным направлением в последние годы. В органическом сельском хозяйстве фиксация атмосферного азота рассматривается в качестве одного из альтернативных источников минерального питания растений [1]. Способность фиксировать атмосферный азот имеют симбиотические клубеньковые бактерии, несимбиотические азотфиксаторы, а также лишайники и сине-зелёные водоросли. Особую роль при несимбиотической фиксации атмосферного азота играют бактерии рода *Azotobacter* [2], свободноживущие аэробные микроорганизмы. Они используют атмосферный азот для синтеза клеточного белка. После гибели клеток *Azotobacter* клеточный белок минерализуется в почве, способствуя доступности азота растениям [3]. Микроорганизмы рода *Azotobacter* оказывают благотворное влияние на рост и урожайность растений, биосинтез биологически активных веществ, стимуляцию ризосферных микробов, продуцирующих фитопатогенные ингибиторы, и повышение биологической азотфиксации. Исходя из этого представляется актуальным изучение процесса накопления *Azotobacter* в традиционном и органическом земледелии с целью альтернативного источника поступления азота в почву без внесения минеральных удобрений.

Цель исследования - изучить пространственную неоднородность почвы и накопление в ней *Azotobacter* в зависимости от состава почвы и воздействия антропогенной нагрузки.

Задачи исследования:

- изучить механический состав почвы и наличия карбонатов;
- определить рН почвенной вытяжки;
- определить содержание нитратов в почве;
- изучить распространение колоний бактерий *Azotobacter*;
- микроскопическое исследование образцов;
- изучить способности бактерий к накоплению полимерных соединений.

Материалы и методы исследований

Объектами исследования являлась почва города Иннополис, расположенная в Верхнеуслонском районе Республики Татарстан. Образцы пахотного слоя отбирались методом конверта, предусматривающим отбор 10 смешанных образцов (по диагонали поля через заданные отрезки) [4]. В лесополосе отбор почвенных образцов проводился через каждые 200м. При этом пробы, отобранные на различных горизонтах, помещали в разную посуду. Отобранные пробы хранили в охлажденном состоянии (от 0 до -3°C). Отбор почвенных образцов производился из слоя агросерой лесной среднесуглинистой почвы (глубина 18-30 см) с точно заданными координатами.



Рис.1. Почвенный разрез

Первым этапом работы стало определение механического состава образцов почвы и наличие в ней карбонатов. Исследования проводились “методом скатывания” по Н.А. Качинскому. Образцы почвы были высушены, убраны крупные остатки растительности, камни, мусор. Затем почвы были просеяны через сито с диаметром 1-2 мм. Небольшой образец почвы растирался в порошок, удалялись корешки, мелкие камешки, увлажнялась почва до тестообразного состояния. Образец промешивался ножом, скатывался в шнур толщиной 0,5 см и шнур сворачивался в кольцо диаметром 3 см. Далее рассматривалось полученное кольцо.

Принимая во внимание, что в зависимости от типа почвы, при скатывании образцы имеют разные свойства:

- а) если почва не скатывается в шарик, то это песчаная почва;
- б) почва не скатывается в шарик, но лепится в непрочные шарики – супесчаная почва;
- с) почва образует непрочный шарик, который в жгут не раскатывается – легкосуглинистая почва;
- д) почва образует сплошной жгут, который разламывается при соединении в кольцо – среднесуглинистая почва;
- е) почва образует сплошной жгут, который покрывается трещинами при соединении в кольцо – тяжелосуглинистая почва;

f) почва образует сплошной жгут, который соединяется в кольцо – глинистая почва [5] - выяснили, что в большинстве образцов преобладает легкий суглинок и супесь.

Определение карбонатов проводилось следующим образом: раствор 0,1М HCl наносился на почвенные образцы и наблюдалась реакция - вспенивание. В 8-ми из 10-ти исследуемых образцах было обнаружено присутствие карбонатов [6].

Таблица 1. Механический и химический состав почвы

№	Тип почвы	Вскипание	Содержание карбонат – ионов, %
1	Супесь	Слабое и кратковременное	2 – 3
2	Легкий суглинок	Сильное, продолжительное	5-10
3	Средний суглинок	Вскипание отсутствует	≤ 1
4	Средний суглинок	Заметное, но кратковременное	3-4
5	Легкий суглинок	Слабое и кратковременное	2-3
6	Легкий суглинок	Сильное, продолжительное	5-10
7	Легкий суглинок	Слабое и кратковременное	2-3
8	Средний суглинок	Вскипание отсутствует	≤ 1
9	Средний суглинок	Сильное, продолжительное	5-10
10	Легкий суглинок	Заметное, но кратковременное	3-4

Определение кислотности почвы и содержание нитратов в ней. Был взят образец почвы и дистиллированная вода в соотношении 1:4. Раствор хорошо взболтали, затем отстаивали и, когда на дне колбы образовался земляной осадок, его отфильтровали с помощью фильтровальной бумаги. В полученную вытяжку опустили универсальную индикаторную бумагу на 1-2 секунды и наблюдали за изменением окраски смоченного участка. При сравнении её с цветной шкалой универсальной индикаторной бумаги была определена кислотность среды (pH) почвенной вытяжки - в среднем слабокислая среда. С помощью индикаторных полосок Биосенсор- Аква- нитрат- NO было проведено исследование нитратов в почве. Данные показали содержание нитратов в пределах нормы [7].

Таблица 2. Определение кислотности среды (рН) и содержание в ней нитратов

№	рН	Тип почвы	Показатель нитратов Мг/мл	Показатель загрязнения
1	6	Близкая к нейтральной	25	норма
2	5,5	Слабокислая	25	норма
3	5	Среднекислая	25	норма
4	6	Близкая к нейтральной	25	норма
5	5	Среднекислая	25	норма
6	6	Близкая к нейтральной	10	норма
7	6	Близкая к нейтральной	10	норма
8	6	Близкая к нейтральной	10	норма
9	5	Среднекислая	10	норма
10	5	Среднекислая	25	норма
Ср. значение	5.55	Слабокислая	19	норма

Для выявления азотобактера в почве и определения его относительного содержания пользовались методом почвенных комочков. Колонии азотобактеров растут на плотной питательной среде Эшби (рис.2), которая готовилась из вспомогательного раствора – это раствор солей хлорида натрия, сульфатов калия и магния, гидрофосфата калия и суспензии, включающей карбонат кальция, агар, глюкозу. Из увлажненной почвы формировали комочки диаметром 3-4 мм и размещали их в чашке Петри (в узлах трафарета). Чашки Петри с закрытыми крышками оставили при комнатной температуре на 4 дня. По истечении этого времени вокруг комочков появились обрастания 4-суточные культуры. Наблюдение за ростом колоний проходило ежедневно, а сбор статистической информации проводили на 4, 8 и 12 день [8]. В ходе работы было выявлено, что азотобактерии присутствуют во всех анализируемых образцах почвы. Установлено, что их содержание значительно меньше на среднесуглинистых почвах в среднекислой среде, по сравнению с легким суглинком и нейтральной средой. В образце №10 наблюдается максимальное количество обрастаний. Он был отобран из места скопления перегноя и компоста, где соответственно происходит активное накопление азота, что способствует обогащению почвы азотфиксирующими бактериями.

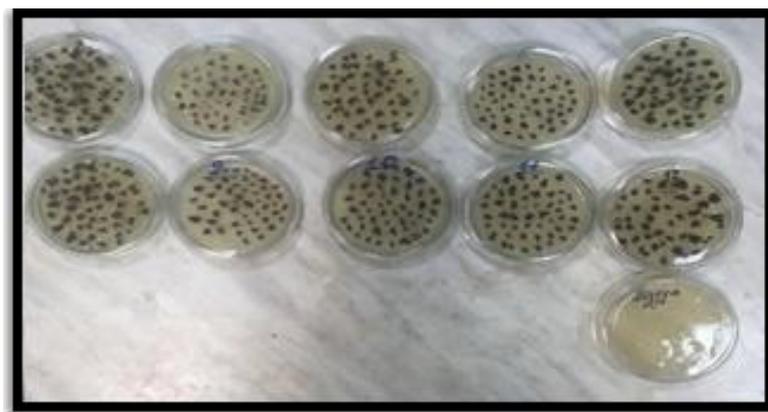


Рис.2. Колонии Azotobacter

Таблица 3. Посев и наблюдение за ростом колоний бактерий Azotobacter

№ образца	Azotobacter, % обрастания 4 день	Azotobacter, % обрастания 8 день	Azotobacter, % обрастания 12 день
1	21	33	57
2	12	18	65
3	24	36	56
4	25	31	66
5	10	15	57
6	8	12	48
7	23	34	51
8	22	35	48
9	12	23	56
10	26	43	70
Контрольный образец	0	0	0
Среднее значение	18,3	28	57,4

Микроскопическое исследование образцов производили по методу Цилю — Нильсена. Для знакомства с азотобактером из блестящих слизистых колоний был приготовлен препарат-мазок, окрашенный фуксином Циля и тушью. Микроскопия показала, что азотобактерии присутствуют во всех анализируемых образцах почвы [9]. Клетки бактерий рода *Azotobacter* имеют овальную форму (окрашены в розовый цвет), располагаются одиночно, парами и неправильными скоплениями (рис. 3). Розовый цвет свидетельствует о том, что полученные бактерии – грамотрицательные [10].



Рис.3. Снимки препаратов при x800 (водная иммерсия)

Изучена способность штамма *Azotobacter* накапливать полимеры. Исследования проводились с помощью красителя Судана черного, все бактерии в образцах окрасились в голубой цвет, что свидетельствует о способностях бактерий к накоплению полимерных соединений (рис. 4).

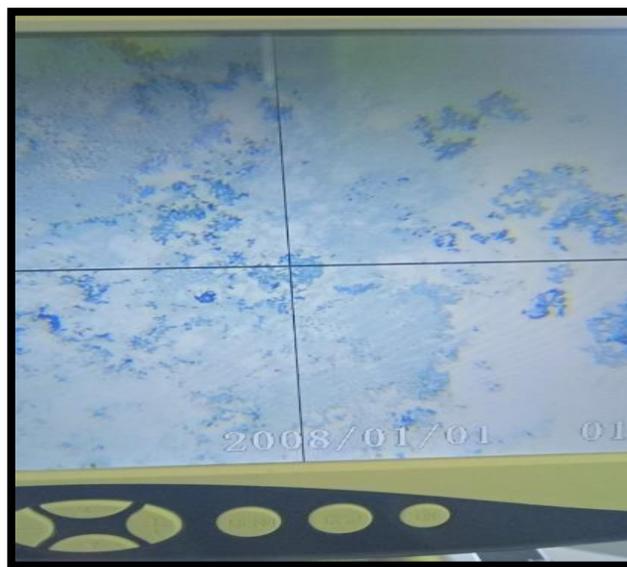


Рис.4. Исследование способности бактерий к накоплению полимерных соединений

Выводы

В результате работы были отобраны 10 образцов почв, различающиеся по своему химическому и механическому составу, антропогенной нагрузке, из которых были выделены азотофиксирующие бактерии, оказавшиеся *Azotobacter*.

Изучен механический состав почвы, в среднем преобладает легкий суглинок и супесь. Было выявлено небольшое наличие карбонат-ионов в 8-ми из 10-ти исследуемых образцах почвы. Определена кислотность среды (рН) почвенной вытяжки - исследования показали в среднем слабокислую среду.

Определено содержание нитратов во всех образцах почвы, данные показали их содержание в пределах нормы. В ходе работы было выявлено, что азотобактерии присутствуют во всех анализируемых образцах почвы. Установлено, что их содержание значительно меньше на среднесуглинистых почвах в среднекислой среде, по сравнению с легким суглинком и нейтральной средой. В образце №10 максимальное количество обростаний, он был отобран из места скопления перегноя и компоста, в связи с чем происходит активное накопление азота, что способствует обогащению почвы азотфиксирующими бактериями. При микроскопическом исследовании образцов видно, что *Azotobacter* имеют овальный и сферический вид. Все исследуемые образцы бактерий показали способность к накоплению полимерных соединений.

К сожалению, способность азотобактера активно размножаться в почве и проявлять свои многогранные качества весьма ограничена из-за дефицита легкодоступных органических веществ в почве и высокой требовательности микроорганизма к окружающим условиям. Поэтому стимулирующий эффект азотобактера проявляется лишь на плодородных почвах. Соответственно необходимо проанализировать и оценить возможность применения современных комбинированных технологий для дальнейшего развития *Azotobacter* и методы для их исследований.

Список литературы

1. Hajnal-Jafari T., Latković D., Durić S., Mrkovački N., Najdenovska O. The use of *Azotobacter* in organic maize production // *Research Journal of Agricultural Science*. - 2012. - 44 (2). - P. 28–32.
2. Jnawali A.D., Ojha R.B., Marahatta S. Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability // *Advances in plants & Agriculture research*. - 2015. - 2(6). - P. 1–5.
3. Ojha R.B. Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability // *Advances in plants & Agriculture research*. - 2015. - P. 1–5.
4. Сафонов, А.Ф. Системы земледелия / А.Ф. Сафонов - М.: Изд-во «Колос», 2006. - 447 с.
5. Алесковский, В.Б. Физико-химические методы анализа / В.Б. Алесковский, К. Б. Яцимирский. - М.: «Химия», 1971. – 214 с.
6. Алексанян, В.А. Содержание карбонатов, состав и соотношение обменных оснований пахотных земель / В.А. Алексанян // *Почвоведение и агрохимия*. - 2013. - №3. - С. 28-32.
7. Инструкция по применению тест-полосок индикаторных для одновременного определения нитратов, нитритов, жесткости, кислотности, а также хлора в воде «Биоаква»: [сайт]. - URL: http://bioakva.ru/Papki/instr_6.htm. (дата обращения: 26.06.2022).
8. Виноградский, С. Н. Микробиология почвы. Проблемы и методы / С.Н. Виноградский. - М.: Изд-во АН СССР, 1952. - 897 с.
9. Азотобактер // Википедия – свободная энциклопедия: [сайт]. – URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Азотобактер> (дата обращения: 26.06.2022).
10. Артамонова В.С. и др. Микробные комплексы почв урбанизированных территорий // *Сибирский экологический журнал*, 2007. - Т.14. - №5. – С. 797-808.

INVESTIGATION OF THE PROCESS OF ACCUMULATION OF AZOTOBACTERIN THE SOIL ON THE EXAMPLE OF THE CITY OF INNOPOLIS

O.V. Nikishina¹, G.A. Morozov²

¹State Autonomous Educational Institution "Lyceum Innopolis"

1, Quantum boulevard, Innopolis, 420500, Russian Federation

²Kazan National Research Technical University named after A.N.Tupolev

10, st. K. Marx, Kazan, 420111, Russian Federation

Abstract. The study of the spatial heterogeneity of the soil of the city of Innopolis, its mechanical and chemical compositions were determined. Soil samples were grown. Microscopic samples of bacteria were examined. Detection of polymer accumulation in bacteria.

Keywords: Azotobacter, mechanical and chemical composition of soil, microscopic examination of samples. Nitrates, soil acidity, polymers, carbonates.

Дата отправки статьи в редакцию 23.06.2022 г.