

УДК 5 57 579 579.64

СКРИНИНГ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА СПОСОБНОСТЬ К СТИМУЛИРОВАНИЮ РОСТА РАСТЕНИЙ

Кочетова Мария Антоновна, Лазарева Марина Дмитриевна, Панина Полина
Ивановна

Государственное бюджетное профессиональное образовательное учреждение
Ленинградской области «Кингисеппский колледж технологии и сервиса»

Структурное подразделение детский технопарк «Кванториум»

Г. Кингисепп, Ленинградская область,

OPPOWINK2022@gmail.com

Аннотация: с целью выявления многофункциональных штаммов бактерий, адаптированных к климатическим условиям Кингисеппского района, способных не только к фиксации атмосферного азота и выделению в почву растворимых форм соединений азота, но, также, к солюбилизации фосфора, калия, производству сидерофоров, целлюлаз, пектиназ. Было собрано и исследовано 10 образцов почвы с разных участков Кингисеппского района (изучен механический состав почвенных образцов, кислотность, наличие карбонатов, измерено дыхание отдельных почвенных образцов). Проведен посев образцов почвы на питательную среду с целью выявления азотфиксирующих бактерий. Изучены морфологические характеристики выявленных колоний азотфиксирующих бактерий. Проведен скрининг выявленных азотфиксирующих бактерий на их способность к солюбилизации фосфора, калия, производства сидерофоров, пектиназ и целлюлаз. Скрининг исследуемых азотфиксаторов выявил несколько колоний, показавших, также, способность к солюбилизации фосфора и секреции сидерофоров.

Ключевые слова: азотфиксирующие бактерии, скрининг, фосфатсолюбилизация, солюбилизация калия, секреция сидерофоров, целлюлазы

Annotation: In order to identify multifunctional strains of bacteria adapted to the climatic conditions of the Kingisepp district, which are capable not only of fixing

atmospheric nitrogen and releasing soluble forms of nitrogen compounds into the soil, but also of solubilizing phosphorus, potassium, production of siderophores, cellulases, pectinases. 10 soil samples from different sites of Kingisepp district were collected and examined (the mechanical composition of soil samples, acidity, the presence of carbonates were studied, the respiration of individual soil samples was measured). Sowing of soil samples on a nutrient medium was carried out in order to identify nitrogen-fixing bacteria. Morphological characteristics of the identified colonies of nitrogen-fixing bacteria were studied. Screening of the detected nitrogen-fixing bacteria for their ability to solubilize phosphorus, potassium, production of siderophores, pectinases and cellulases was carried out. Screening of the studied nitrogen fixators revealed several colonies that also showed the ability to solubilize phosphorus and secrete siderophores.

Keywords: nitrogen-fixing bacteria, screening, phosphate solubilization, potassium solubilization, secretion of siderophores, cellulases

Введение

Проблема истощения почв - одна из самых острых во всём мире, так как на истощенных землях сложно выращивать сельскохозяйственные культуры и практически невозможно получать урожаи. Поскольку почва является самостоятельно не возобновляемым природным ресурсом, продолжает оставаться актуальным вопрос повышения производительности сельского хозяйства с целью получения высоких и стабильных урожаев.

Почвы Кингисеппского района являются подзолистыми [1], формируются в условиях повышенного промывного водного режима, что приводит к вымыванию макро- и микроэлементов и снижению плодородия. Актуальным для нашего региона является вопрос создания оптимальных условий для накопления гумуса и увеличения доступных растениям форм химических элементов.

Использование химических удобрений, с одной стороны, увеличивает количество необходимых растениям химических элементов, но, с другой стороны, не способствует сохранению биоценоза почвы. За многие тысячелетия совместного существования обитатели почвы – бактерии, грибы, растения,

простейшие, черви, насекомые и др. приспособились к совместной жизни и сформировали сложные биотические связи. Интенсивное сельское хозяйство с использованием химических удобрений нацелено на получение высоких урожаев выращиваемых культур, но не решает ряд сопутствующих проблем, в частности, сокращение численности многих видов живых организмов почвы в результате сокращения гумусового слоя. Растениям для нормального роста и развития важно не только достаточное количество всех макро- и микроэлементов, но и наличие тесных биотических связей с другими обитателями почвы.

Азотобактер известны не только способностью усваивать молекулярный азот и переводить его в доступную растениям форму [2], но, также, способностью синтезировать биологически активные вещества, стимулирующие рост и развитие растений. Кроме того, есть вероятность выявления штаммов азотфиксирующих бактерий, способных не только фиксировать молекулярный азот, но и переводить нерастворимые формы соединений фосфора, калия, железа в растворимые, доступные для растений.

Интерес представляет поиск многофункциональных штаммов [3] азотфиксирующих бактерий, адаптированных к климатическим особенностям нашего региона, с целью их использования в качестве биоудобрений [4].

Методики исследования:

1. Сбор и изучение образцов почвы.

На местах сбора почвенных образцов проводили поверхностный почвенный разрез, согласно методике, приведенной в методичке «Охотник за микробами» [5]. Сбор образцов почвы проводили с глубины 5-7 см от поверхности почвы.

Для определения механического состава почвы увлажненную почву скатывали в шарик, затем в жгут. Результаты соотносили с таблицей, приведенной в пособии «Охотник за микробами» [5].

Для определения наличия карбонатов на почву наносили каплю 0,1 М HCl. Оценивали по наличию вспенивания [5].

Для определения кислотности универсальную индикаторную бумагу опускали в почвенную вытяжку. Для приготовления почвенной вытяжки образцом почвы заполняли половину пробирки типа «эппендорф». Оставшийся свободный объем пробирки заполняли дистиллированной водой, интенсивно встряхивали в течение 5 минут, давали отстояться [5].

Определение нитратов проводили в почвенной вытяжке (к 30 граммам почвы добавили 100 мл дистиллированной воды, перемешали, дали отстояться 30 минут, профильтровали). Тест-полоски погружали в почвенную вытяжку. Изменение цвета оценивали по шкале и сравнивали с цветом тест-полоски, погруженной в чистую дистиллированную воду [5].

2. Выявление азотфиксирующих колоний

С целью выявления азотфиксирующих бактерий увлажненную почву с помощью зубочистки наносили точно на поверхность среды Эшби [5]. Состав вспомогательного раствора для среды Эшби: NaCl – 0,2 г; K₂SO₄ – 0,1 г; MgSO₄ * 7H₂O – 0,2 г; K₂HPO₄ – 0,2 г; дистиллированная вода 1000 мл. Состав среды Эшби: CaCO₃ – 1 г; глюкоза — 4 г; агар – 3 г; вспомогательный раствор – 200 мл. Чашки Петри были поставлены в термостат при температуре 28°C. Проводили подсчет выросших колоний [5].

3. Скрининг азотфиксирующих бактерий.

Скрининг выросших колоний проводили на планшетах из набора «Охотник за микробами» [5]. Исследуемые колонии с помощью зубочисток переносили последовательно в планшеты 1-5. Инкубировали при комнатной температуре в течение 7 дней. Результат оценивали визуально по изменению цвета среды [5].

Результаты исследования:

Образец № 6 собран 12.05.2022 г на окраине города Сланцы. Координаты места взятия образца 59°6'47.50.20" N, 28°12'34.9272" E. На месте забора почвы росли ель, ива, береза. Подстилку составляли: ветви, лиственной опад, сухая трава, мох, ракушки улиток (рис. 1а).

Образец № 11 собран 26.08.2022 г в черте города Кингисепп. Координаты места взятия образца $59^{\circ}22'43.64''N$, $28^{\circ}37'35.93''E$. На месте забора почвы росли: ежа сборная, мох, вербейник монетчатый, сныть обыкновенная, береза обыкновенная, ива пепельная, яблоня лесная, яблоня низкая, рябина домашняя, манжетка желто-зеленая (рис.1б).

Образец № 12 собран 26.08.2022 г в черте города Кингисепп. Координаты места взятия образца $59^{\circ}22'42.68''N$, $28^{\circ}37'34.13''E$. На месте забора почвы росли вероника дубравная, марьянник дубравный, яблоня низкая, рябина обыкновенная, жимолость покрывная, карагана древовидная. Подстилку составляли лиственный опад, яблоки, трава (рис.1в).



а



б



в

Рисунок 1. Почвенные разрезы

Образец № 13 собран 26.08.2022 г в городе Кингисепп. Координаты места взятия образца $59^{\circ}37'80.69''N$, $28^{\circ}62'60.06''E$. На месте забора почвы росли чубушник венечный, сныть обыкновенный, клен яснолистный, карагана древовидная, плагиомниум остроконечный (рис.2а).

Образец №14 собран 26.08.2022 г в черте города Кингисепп. Координаты места взятия образца $59^{\circ}22'40.35''N$, $28^{\circ}37'32.49''E$. На месте забора почвы росли клен яснолистный, карагана древовидная, клен остролистный, ива ломкая, сныть обыкновенная (рис.2б).

Образец № 15 собран 26.08.2022 г в черте города Кингисепп. Координаты места взятия образца $59^{\circ}22'40.14''N$, $28^{\circ}37'24.99''E$. На месте забора почвы росли тысячелистник, вейник наземный, полынь обыкновенная, пастернак посевной, икотник серый, полынь полевая, боярышник (рис.2в).



а



б



в

Рисунок 2. Разрезы почвы в черте города Кингисепп

Образец № 16 собран 26.08.2022 г на дачном участке. Координаты места взятия образца $59^{\circ}45'59.49''N$, $28^{\circ}44'81.58''E$. На месте забора почвы росли орешник, купырь лесной, сныть обыкновенная, ель.

Образец № 17 собран 28.08.2022 г на дачном участке. Координаты места взятия образца $59^{\circ}42'54.43''N$, $28^{\circ}42'72.33''E$. Произведен поверхностный разрез, забор почвы с глубины 10 см. На месте сбора росли базилик, огурцы, баклажан.

Образец № 18 собран 27.08.2022 г на картофельном поле. Координаты места взятия образца $59^{\circ}42'22.05''N$, $28^{\circ}80'61.68''E$. На месте сбора росли борщевик, картофель.

Образец № 19 собран 27.08.2022 г на картофельном поле. Координаты места взятия образца $59^{\circ}42'16.13''N$, $28^{\circ}80'89.90''E$. На месте сбора уже много лет картофельное поле.

Собранные образцы почвы были проверены на содержание нитратов, карбонатов, кислотность, изучен их механический состав (табл.1). 29.08.2022 г.

был проведен посев почвы на питательную среду Эшби с целью выявления колоний азотфиксирующих бактерий согласно методике [8]. Проводили подсчет числа колоний (см. табл. 1).

Таблица 1. Результаты изучения образцов почвы и колоний азотфиксаторов.

№ образца	Мех. состав	рН	Кол-во нитратов	Появление прорастаний	% прораст.	Карбонаты	Особенность
6	Легкий суглинок	6	<10 мг/л	Через 4 дня	66	Нет	Колонии азотобактер бурой окраски
11	Супесчаный	6	<10 мг/л	Через 18 дней	28	Нет	2 разных вида колоний прозрачные и желтые. Много колоний.
12	Супесчаный	6	<10 мг/л	Через 32 дня	16	Нет	Много мелких прозрачных колоний. Слабый рост азотфиксаторов.
13	Песчаный	6	<10 мг/л	Через 32 дня	24	Нет	Азотфиксаторы совместно с плесневыми грибами. Много мелких прозрачных колоний.
14	Супесчаный	6	<10 мг/л	Через 18 дней	16	Нет	Цвет колоний-бесцветные, прозрачные
15	Песчаный	6	<10 мг/л	Через 32 дня	12	Нет	Много мелких колоний. Бесцветные, прозрачные
16	Средний суглинок	6	<10 мг/л	Через 16 дней	28	Нет	Одна колония. Бесцветная, прозрачная
17	Легкий суглинок	6	<10 мг/л	Через 21 день	28	Нет	Одна колония. Цвет – желтый
18	Средний суглинок	6	<10 мг/л	Через 18 дней	28	Нет	Колонии белые непрозрачные и бесцветные прозрачные

19	Легкий суглинок	6	<10 мг/л	Через 5 дней	98	Нет	Цвет колоний флуоресцирующий желтовато-зеленоватый
----	-----------------	---	----------	--------------	----	-----	--

03.10.2022г провели посев выросших азотфиксирующих бактерий на 5 планшетов (1 планшет – рост колоний, 2 планшет – фосфатсолубилизация, 3 планшет – солубилизация калия, 4 планшет – секреция сидерофоров, 5 планшет – секреция целлюлазы).

Выбрали колонии для скрининга под номерами 6-1,6-2, 6-3, 11-1,11-2, 11-3, 11-4, 11-5, 11-6, 11-7, 11-8, 12-1, 13-1, 14-1, 14-2, 14-3, 14-4, 14-5, 14-6, 15-1, 16-1, 17-1, 18-1, 18-2, 18-3, 18-4, 18-5, 19-1, 19-2, 19-3. С помощью зубочистки переносили колонию в одну и ту же лунку на всех планшетах. Инкубировали планшеты в течении 3 недель при комнатной температуре. Фиксировали изменения в лунках планшетов №2-5 (табл. 2).

Таблица 2. Результаты скрининга азотфиксирующих бактерий.

Планшет	Начальный цвет среды	Номер колонии	Изменения цвета среды
№2	Бледно-желтый	11-18;	Розовый
		14-4; 14-5; 14-6;	Ярко-розовый
		15-1;	Бледно-розовый
№3	Бледно-розовый	19-2;	Желто-розовый
		16-1;	Бледно-желто-розовый
№4	Зеленый	11-4; 15-1; 17-18-1; 18-2;	Желто-розовый
		6-1; 6-2; 6-3; 11-5; 11-8; 12-1; 13-1; 14-5; 18-4; 19-1; 19-2; 19-3;	Бледно-желтый
		14-1; 14-4; 14-6;	Желто-розовый
		16-1;	Желто-зеленый
№3	Бледно-розовый	14-4	Ярко-красный

Таким образом, в образцах почв газонов черты города №11, 14 и 15 обнаружены штаммы, способные солюбилизировать фосфор и вырабатывать сидерофоры. В образцах почв: №6 (дикий луг), №11-15 (газоны черты города), №16-19 (дачные участки) были выявлены штаммы, способные к секреции сидерофоров. Выявленные многофункциональные штаммы азотфиксирующих бактерий перспективны с точки зрения стимуляции роста и развития растений.

Заключение

1. Азотфиксирующие бактерии были выявлены во всех изученных образцах почвы.
 - В образцах почв из лесных массивов, диких лугов, а также газонов в черте города колонии отличались низкой скоростью роста. По оптическим свойствам и цвету можно было различить две разновидности – белые непрозрачные и бесцветные прозрачные колонии.
 - В обрабатываемой почве садоводческих участков, картофельного и клубничного полей отмечено наличие как медленно растущих, так и быстро растущих колоний. По оптическим свойствам и цвету были выявлены колонии бесцветные непрозрачные, коричнево-черные, желтовато-зеленоватые.
2. Были выявлены многофункциональные штаммы азотфиксирующих бактерий
 - В образцах почв газонов черты города №11, 14 и 15 обнаружены штаммы, способные солюбилизировать фосфор и вырабатывать сидерофоры.
 - В образцах почв: №6 (дикий луг), №11-16 (газоны черты города), №17-19 (дачные участки) были выявлены штаммы, способные к секреции сидерофоров.
3. Выявленные многофункциональные штаммы азотфиксирующих бактерий перспективны с точки зрения стимуляции роста и развития растений.

Список литературы

1. МИКРОБИОМ ПОЧВ КИНГИСЕППСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ ФОСФОРИТОВ ПРИ РАЗНЫХ ТИПАХ ГОРНОТЕХНИЧЕСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕКУЛЬТИВАЦИИ – тема научной статьи по биологическим наукам читайте бесплатно текст научно-исследовательской работы в электронной библиотеке КиберЛенинка. - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mikrobiom-pochv-kingiseppskogo-mestorozhdeniya-fosforitov-pri-raznyh-tipah-gornotechnicheskoy-i-biologicheskoy-rekultivatsii?ysclid=lfiflt1x1f355213291> (дата обращения: 21.03.2023).
2. Азотобактер: чем питается бактерия, строение и функции. - URL: <https://noparasites.ru/protozojnye-organizmy/azotobakter.html> (дата обращения: 10.02.2023).
3. Могилевская А. Азотфиксирующие бактерии различных почв и их влияние на рост и урожайность культурных растений: статья, 2021 - 15с.
4. Романенко М.Н. Разработка параметров промышленного культивирования свободноживущих азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter*: выпускная квалифицированная работа бакалавра, 2021 - 39с.
5. Методические рекомендации и инструкции по применению набора «Охотник за микробами» - ООО «Живые системы», 2022 – 34 с.