

**С.И. Кислякова,**  
10 класс  
МБОУ «СОШ № 220»  
г. Заречный  
Пензенской области

**«Изучение состава почв на наличие или отсутствие азотфиксирующих бактерий, влияющих на рост редких видов растений Венерина башмачка (*Cypripedium calceolus*) и Прострела раскрытого (*Anémone pátens*) на территории памятника природы «Зареченский лес» и ЦПКиО «Заречье»**

**Пенза -2024**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	2
ГЛАВА 1. СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ ВОПРОСА (ОБЗОР ИСТОЧНИКОВ).....	4
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	6
ВЫВОДЫ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	7
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ И ИНТЕРНЕТ - ИСТОЧНИКОВ .....	9
Приложение 1 .....	10
2.1. Первичный скрининг.....	10
2.2. Изучение почвенного дыхания .....	10
2.3. Изучение содержания органических веществ .....	11
2.4. Посев и наблюдение за ростом колоний азотфиксирующих бактерий .....	11
2.5. Микроскопическое исследование образцов .....	12
Приложение 2 .....	12
3.1.1. Определение гранулометрического состава почвы .....	12
3.1.2. Определение кислотности .....	13
3.2. Изучение почвенного дыхания в верхних горизонтах в мг CO <sub>2</sub> /100 грамм почвы .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3. Содержание органических веществ .....	13
3.4. Микроскопическое исследование образцов .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Приложение 3 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность

Команда учащихся нашей школы несколько лет занимается комплексным исследованием территорий ЦПКиО «Заречье» и памятника природы «Зареченский лес». Положено начало изучению флоры, выявлен ряд редких видов растений, места произрастания которых нуждаются в дальнейшем исследовании, в том числе в изучении почв, как компонента экосистем. Дефицит питательных элементов, ограниченная влажность, наличие тяжелых металлов, биоциды<sup>1</sup> засоление почв и сочетание всех вышеперечисленных факторов может приводить к исчезновению популяций азотфиксаторов и изменению микробиоценоза почвы.

Данное исследование является также частью программы «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов, как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами», реализуемой в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019-2027 годы при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ. Для продуктивной работы в сотрудничестве с институтом химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН была создана киберфизическая платформа навыков будущего «Synсwoia», присоединившись к ней, мы стали научными волонтерами и соавторами в создании атласа. **Объектом исследования** выступают почвы выше указанных территорий, а **предметом**, соответственно, их особенности, в частности, наличие или отсутствие азотфиксирующих бактерий, влияющих на рост редких растений (Венерина башмачка и Прострела раскрытого).

В связи с этим **целью работы** является изучение почвенных горизонтов по ряду показателей на трех основных точках, где производился отбор образцов.

### Задачи:

➤ определить гранулометрический состав почв указанных территорий, водородный показатель<sup>2</sup>, наличие карбонатов<sup>3</sup>;

---

<sup>1</sup> Биоцид - это противомикробное химическое вещество, которое может отпугивать, обезвреживать или оказывать регулирующий эффект на многие вредные виды организмов.

<sup>2</sup> Все прострелы предпочитают нейтральную, рыхлую и плодородную почву, Прострел раскрытый в природе может расти в слабокислом грунте хвойных лесов.

- измерить почвенное дыхание и определить количество органического вещества в интересующих нас образцах почвы, выявить возможную корреляцию;
- изучить верхний плодородный горизонт на наличие или отсутствие Азотобактера на трех точках, выбранных в соответствии с целью работы;
- **проверить гипотезу**, о приуроченности редких видов растений Венерина башмачка (*Cypripedium calceolus*) и Прострела раскрытого (*Anémone patens*) к определенным типам почв в зависимости от количества Азотобактера и других особенностей;
- наметить тематику исследований по дальнейшему изучению почвенных горизонтов.

Участники программы отбирались на конкурсной основе, в связи с этим мы написали мотивационное письмо<sup>4</sup>, после одобрения нашей заявки собрали и отправили почвенные образцы, получили специальные наборы «Охотник за микробами» и «Исследование азотфиксирующих бактерий» для проведения экспериментов. Поиск штаммов Азотобактера в почвах города Заречного осуществляется впервые. В этом состоит **научная новизна** данного исследования.

### **Практическое значение**

Всю информацию об отправленных образцах мы внесли в базу данных, куда ученые также будут продолжать вносить результаты своих исследований, мы увидим новую информацию о них. Все это является нашим **вкладом в науку**. Эта работа продвигает нас на еще один шаг в комплексном изучении экосистем города и нахождению редких штаммов Азотобактера. Теперь ученые проанализируют полученные данные, определят видовое разнообразие Азотобактера<sup>5</sup>, живущего в почвах на территории памятника природы «Зареченский лес» и центрального парка.

---

<sup>3</sup> Венерин башмачок является *кальцефилом*, растением, обитающим преимущественно на почвах, богатых соединениями кальция, а также в местах выхода известняков, мергелей, мела и других пород.

<sup>4</sup> Письмо представлено в приложении №1. Обязательным условием было представить гипотезу исследования.

<sup>5</sup> К настоящему времени известен ряд видов азотобактера: *Azotobacter chroococcum*, *Az. beijerinckii*, *Az. vinelandii*, *Az. agilis*, *Az. nigricans*, *Az. galophilum*.

## ГЛАВА 1. СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ ВОПРОСА (ОБЗОР ИСТОЧНИКОВ)

Оценкой биологической активности почв нашего города занимались Ю. А. Вяль, А. В. Шиленков [1]. Авторы статьи считают, что Почвы города Заречного до сих пор остаются еще относительно слабо изученным объектом, несмотря на заметно возросший в последнее время к ним интерес. В условиях города с его интенсивными потоками вещества и энергии нагрузка на них сильно возрастает, поэтому важно знать, насколько городские почвы справляются со своими экологическими функциями [2].

Для сохранения уникальных лесов Заречного Постановлением Законодательного собрания Пензенской области от 26.05.1999 №357-16/2 ЗС создан государственный памятник природы регионального значения «Зареченский лес» [5]. Ботанический памятник природы занимает 80 га в зеленой зоне г. Заречного. Он представляет собой участок хорошо сохранившегося лиственного леса с участием сосны. Однако, главную ценность охраняемого сообщества представляют орхидеи. Здесь они представлены 11 видами [6].

Экологически малограмотные граждане выбрасывают мусор на территорию, не смотря на многочисленные баннеры с изображениями редких растений данной местности. Экологи города вместе с волонтерами осуществляют мониторинг и убирают объекты антропогенного загрязнения. В 2007 году Горбушиной Т.В.<sup>6</sup> была проведена работа по изучению химического состава почв в местообитаниях редких растений Пензенской области, в число которых вошел и памятник природы «Зареченский лес». Ранее (2005г) этим же автором была определена кислотность почв на данной территории. Было сделано необходимое количество анализов рН, результаты которых, после нанесения на карту, выявили четко очерченную зону повышенного содержания карбонатов.

Изучение флоры парка ЦПКиО является частью нашего комплексного исследования городской среды. Центральный парк расположен на месте естественного соснового леса. Возраст деревьев не превышает 80 лет. Освоение площадей началось в 1963 г. Работы по благоустройству производились с

---

<sup>6</sup> Кандидат с.-х. наук, старший научный сотрудник государственного природного заповедника «Приволжская лесостепь».

сохранением природной территории, в 2023 году была предпринята еще одна его реконструкция, проведенная с учетом зоны произрастания Прострела раскрытого, которую сохранили без изменений.

Скашивание травы в парке производится несколько раз за сезон. Опавшие листья также удаляются с территории, что ведет к снижению плодородия почвы и негативно сказывается на росте растений. Почвоведческих исследований на указанной территории ранее не проводилось.

Азотобактер (*Azotobacter*), род аэробных грамотрицательных<sup>7</sup> бактерий. Они способны к фиксации молекулярного азота ( $N_2$ ) атмосферы [7]. Впервые этот род выделен в чистой культуре голландским ученым М. Бейеринком в 1901 году. Представители этого рода чаще всего обитают в нейтральных и слабощелочных почвах, нередко образуют симбиотическую связь с растениями. Бактерии способны расти и осуществлять фиксацию азота в диапазоне рН от 4,8 до 8,5, а оптимальным для жизнедеятельности данных организмов считается диапазон рН 7,0-7,5.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Материалом** выступают образцы почвы, взятые в трех повторностях, с учетом горизонтов, согласно ГОСТ Р 58595-2019<sup>8</sup> на участках памятника природы «Зареченский лес» (точки №1 и №3) и ЦПКиО «Заречье» (точка №2) в сентябре 2023 года (фото №1-3, прил.3). Почвенные образцы были предварительно высушены на белых листах бумаги и промаркированы. Дальнейшее хранение осуществлялось при температуре 18°C в закрытых полиэтиленовых пакетах. Нами использован «мокрый метод» для определения гранулометрического состава; Абсорбционный метод по И.Н. Шаркову 1984г. для определения количества органического вещества, микроскопирование колоний; фотофиксация объектов. Индикаторная бумага для определения рН; НСИ 10% р-р для определения карбонатов; содовые вытяжки 2% и 5%; среда Эшби для посева; Подробная методика приведена в приложении 1.

---

<sup>7</sup> Грамотрицательные бактерии (обозначаются Грам (-)— бактерии, которые не окрашиваются кристаллическим фиолетовым при использовании окраски микроорганизмов по методу окрашивания по Граму.

<sup>8</sup> Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 58595-2019 "Почвы. Отбор проб" (утв. и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 октября 2019 г. N 954-ст).

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**3.1.1.** Определен гранулометрический состав почвы (табл. №1, прил.2).

**3.1.2.** Кислые почвы обнаружены в зареченском лесу, нейтральные тоже в этой же локации, но небольшим островком, который показан на карте – схеме №2, приложения 1. В ЦПКиО «Заречье» рН почвы близок к нейтральному (таблица №2, прил.2).

**3.1.3.** В образцах первого и второго почвенных горизонтов в точке №3 («Зареченский лес» - место произрастания Венерина башмачка) наблюдали «вскипание», что является качественной реакцией на наличие  $\text{CaCO}_3$ . В других образцах данная реакция не наблюдалась.

**3.2.** «Дыхание почвы» это процесс образования  $\text{CO}_2$  в результате разложения и окисления органического вещества почвенными микроорганизмами и корнями растений. Анализ данных показывает, что интенсивнее всего «дышит» верхний почвенный горизонт в точке №3. Это указывает на большое количество микроорганизмов и корней растений в этом почвенном горизонте. На втором месте по количеству выделившегося  $\text{CO}_2$  оказался верхний почвенный горизонт точки №2 (парк «Заречье» - место произрастания Прострела раскрытого). Меньше всего интенсивность дыхания на большей территории зареченского леса, где не встречается Венерин башмачок (Точка №1)(табл. №3, прил.2).

Интересно отметить, что количество органического вещества (по шкале оценки содержания углерода) коррелирует с интенсивностью дыхания (количеством выделившегося  $\text{CO}_2$ ) в точках №1 и №3 в верхнем горизонте почвы (табл. №4, прил. 2).

**3.3.** Количество органического вещества в почвенных горизонтах (по количеству углерода), получили с помощью 2% и 5 % раствора соды ( $\text{NaHCO}_3$ ). Единица измерения мг С/кг.

**3.4.** Огромное значение на количество колоний Азотобактера оказывает и рН почвы. Кислая почва неблагоприятно действует на его развитие. В таких почвах выделяются неактивные формы Азотобактера, которые утрачивают способность связывать молекулярный азот. Поэтому в точке №1 с рН почвы-5, обнаружено

минимальное количество этих бактерий (в повторности Т1ПЗГ1 не выросло ни одной колонии, а в Т1П2Г1 только 1).

Известно, что важную роль в обмене веществ Азотобактера играет Са. Этот элемент необходим ему при питании молекулярным и аммонийным азотом. Этим объясняется 100% обрастания почвенных комочков (появление колоний) в образцах с точки №3, где произрастает кальцефильный вид Венерин башмачок и почва богата соединениями кальция. Кроме этого, почва в этом месте имеет нейтральную реакцию рН.

Потемнение до коричневого, изначально молочного цвета колоний, даёт основание предполагать, что бактерии относятся к виду *Azotobacter chroococcum*<sup>9</sup>. Эти бактерии любят СО<sub>2</sub>, что также коррелирует с данными, полученными в точке №2 по дыханию и количеству потемневших колоний в образцах почвы с этого места парка. Видовую принадлежность в нашем случае определить невозможно, так как для этого полученные штаммы нужно секвенировать.

#### ВЫВОДЫ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

➤ В зареченском лесу почвы по гранулометрическому составу представляют собой средние суглинки, кроме горизонта №2 в месте произрастания Венерина башмачка. Здесь встречаются тяжелые суглинки. В ЦПКиО «Заречье» каждый горизонт имеет свой механический состав: от среднего суглинка в верхнем слое, до легкого суглинка и даже супеси в нижнем слое почвы. Слабокислые почвы (рН5) представлены в зареченском лесу, за исключением места произрастания Венерина башмачка, где почвы имеют нейтральную реакцию (рН7,5). В парке «Заречье» почвы близки к нейтральным (рН6). Карбонаты найдены только в почвах участка зареченского леса, в месте произрастания кальцефила - Венерина башмачка. Эти данные подтверждают приуроченность редкого вида растения к нейтральным почвам, содержащим карбонаты.

---

<sup>9</sup>*Azotobacter chroococcum* (лат.) — типовой вид бактерий рода азотобактер, первый известный вид азотфиксирующих бактерий. Открыт в 1901 году известным немецким микробиологом Марином Бейеринком. Обитает в условиях с повышенным содержанием СО<sub>2</sub>, способна фиксировать азот в аэробных условиях.

➤ Мы установили корреляционную зависимость между количеством  $\text{CO}_2$ , выделяющегося при почвенном дыхании, от количества органического вещества в верхнем почвенном горизонте в 3 точке исследования. Это лидер по интенсивности дыхания, участок зареченского леса в месте произрастания Венерина башмачка. В то время как остальная часть леса имеет минимальные показатели  $\text{C}_{\text{гр}}$  на 100 грамм почвы.

➤ Нами установлена прямая связь типа почв (с изученными в данной работе характеристиками) с произрастающими на ней 2 редких видов растений, в зависимости от количества Азотобактера. Максимальное количество колоний в чашках Петри дали оба почвенных горизонта зареченского леса в месте произрастания Венерина башмачка. В месте произрастания Прострела раскрытого также достаточное количество азотфиксирующих бактерий. Нами обнаружена «желтая колония», возможно, эти бактерии содержат Fe. Ответ на этот вопрос смогут дать ученые НГУ. Минимальное количество Азотобактера в зареченском лесу на большей его территории. Эти данные также коррелируют со значениями почвенного дыхания.

**Гипотеза** о связи мест произрастания 2 редких видов растений (Прострела раскрытого и Венерина башмачка), и количеством азотфиксирующих бактерий **подтвердилась полностью**. Материалы данного исследования будут опубликованы в специальном издании Педагогического института им. В.Г. Белинского Пензенского государственного университета в журнале «Вестник молодых ученых».

➤ Данное исследование имеет несколько **перспективных направлений** для своего продолжения:

1) Нам предстоит выяснить количество Азотобактера в **нижних горизонтах** исследуемых точек отбора проб, и провести тесты на количество  $\text{CO}_2$ , выделяющегося при дыхании.

2) Попытаться найти новые штаммы Азотобактера в стрессовых условиях, в которых могут находиться почвы на территории города. Мы предлагаем

расширить круг поиска азотфиксирующих бактерий на территориях с высокой антропогенной нагрузкой (зоны отдыха «Лесная» и «Солнечная»).

3) Выявить места дефицита этого рода бактерий и в целом органического вещества. Разработать меры по его наращиванию.

4) Провести подобные исследования почв в местах произрастания других редких видов растений нашего города.

Возможно, после исследования учеными наших образцов почв и появления новых данных в базе, которую мы начали заполнять, возникнут и другие интересные направления для исследования.

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ И ИНТЕРНЕТ - ИСТОЧНИКОВ**

1. Вяль Ю.А., Шиленков А.В. – Оценка биологической активности почв городских ландшафтов (на примере г. Заречного) // Известия ПГПУ им. В. Г. Белинского. 2009. № 14 (18). С. 7–10.

2. Строганова М.Н., Мягкова А.Д., Прокофьева Т.В. Роль почв в городских экосистемах // Почвоведение. 1997. №1. С. 96–101.

3. Шарков, И.Н. Определение интенсивности продуцирования CO<sub>2</sub> почвой абсорбционным методом / И.Н. Шарков // Почвоведение. – 1984. – № 7. –136 с.

4. <https://www.penza-press.ru/lenta-novostey/82205/zarechency-ne-dogadyvayutsya-chto-zhivut-ryadom-s-zapovednikom>

5. <https://vk.com/@-216878101-taina-zarechenskogo-lesa>

6. [https://eco.atomgoroda.ru/cities/zarechnyj\\_penzenskaja\\_oblast](https://eco.atomgoroda.ru/cities/zarechnyj_penzenskaja_oblast)

7. <https://bigenc.ru/c/azotobakter-1b467b>

## Приложение 1

### 2.1. Первичный скрининг

Для определения группы почв по гранулометрическому составу использовался *мокрый метод*. Образец растертой почвы увлажняли и перемешивали до тестообразного состояния, при котором почвы становились наиболее пластичными (при работе с карбонатными почвами, если они представляют из себя твердые комочки, возможно применение 10% раствора HCl для разрушения водонепроницаемых агрегатов). Из подготовленной почвы на ладони скатывали шарик и раскатывали его в шнур, затем свертывали в кольцо (фото №4-6, прил. 3). После этого с помощью таблицы определяли механический состав образца.

Для **определения кислотности** образцов почвы мы использовали способ определения pH с помощью индикаторной бумаги (фото №7-8, прил. 3).

Оборудование и реактивы: Пробирки Эппендорфа, универсальная индикаторная бумага со шкалой значений pH. Процедура включала 3 этапа:

1. Маркировка пробирок Эппендорфа. Одна пробирка - 1 образец;
2. Приготовление почвенной вытяжки: в пробирку помещали почву на одну треть объема, приливали дистиллированную или бутилированную не газированную воду, содержимое хорошо перемешивали в течение минуты и давали отстояться на штативе, сделанном из подручных средств.

3. Для определения значения pH: брали полоску индикаторной бумаги и опускали в вытяжку, через 2 секунды вынимали и сравнивали полученную окраску бумаги со шкалой значений pH, определяя тип образца почвы: от 1 до 5 - почва кислая; от 5,5 до 6,5 - слабокислая; от 6,5 до 7 - нейтральная; от 7 до 8 - слабощелочная; выше 8 - щелочная.

Для **определения наличия карбонатов в почве** мы воспользовались раствором 10% HCl; пипеткой Пастера и столовой ложкой. Соблюдая технику безопасности (работали в резиновых перчатках), капали на ложку с образцом почвы несколько капель раствора соляной кислоты с помощью пипетки Пастера. Наблюдали за реакцией («вскипание») или ее отсутствием. После чего делали вывод о наличии или отсутствии карбонатов в данном образце. Реакция качественная. В журнале отмечали знаком «+» или «-».

### 2.2. Изучение почвенного дыхания

Мы использовали Абсорбционный метод по И.Н. Шаркову 1984г.[3](фото №9-10, прил. 3).

Оборудование: перманентный маркер, резиновые перчатки, стаканчики для титрования (12 штук), HCl 0,1 М раствор, NaOH 0,1 М раствор, фенолфталеин, шприц медицинский на 5мл, кухонные весы (до 1 кг), 12 литровых промаркированных банок с крышками, из расчета на 1 точку - три банки с номерами, где банки под №1 являются контролем, а №2 и №3 - повторностями эксперимента (Т1Б1;Т1Б2;Т1Б3;Т2Б1;Т2Б2;Т2Б3;Т3Б1;Т3Б2;Т3Б3).

1) Мы взвешивали по 100 грамм сухой почвы каждого образца в 2 повторностях, взятого из верхнего горизонта почв Точек №1 и №2, у Точки №3 исследовали два горизонта. После этого навески почвы переносились в банки с номерами 2 и 3 с учетом точки, распределялись равномерно по дну.

2) На дно банок ставили стаканчики с 0,1 М раствором щелочи в количестве 10мл. Банки плотно закрывали и ставили в одинаковые условия при комнатной температуре на сутки.

3) Поочередно извлекали стаканчики с раствором щелочи из каждой банки и добавляли в них по 1 капле фенолфталеина, после чего раствор окрашивался в малиновый цвет.

4) Размещали стаканчик для дальнейшего титрования на листе белой бумаги и добавляли раствор 10% соляной кислоты с помощью медицинского шприца с обязательным подсчетом мл кислоты, понадобившейся для этого процесса. После слегка посветлевшего раствора щелочи, кислоту вливали каплями с учетом, что  $V$  одной капли = 0,04 мл. Необходимо совершать вращательные движения для лучшего перемешивания, так как любая капля может стать последней и раствор обесцветится.

5) Производили необходимые расчеты по формуле. Масса углекислого газа в мг на 100 грамм почвы вычисляется по формуле:  $m(CO_2) = (n(NaOH_k) - (NaOH_{cp.}) * 44) / \text{моль}$ , где 44 гр./моль - молярная масса  $CO_2$ . Данные заносили в таблицу и в базу данных (<https://atlas.niboch.nsc.ru/user/stock>)

### **2.3. Изучение содержания органических веществ**

Оборудование и компоненты: перчатки; стеклянные флаконы с крышкой или пробирки Эппендорфа; соляная кислота 0,1 М раствор; сода ( $NaHCO_3$ ); пипетка Пастера на 5мл; мерный стакан на 100мл; дистиллированная вода; емкости для приготовления растворов соды; кухонные весы (до 1кг); термометр.

#### **Приготовление растворов соды 2% и 5%**

Взвешивали 2 или 5 гр. соды, засыпали в емкость и заливали 100мл воды, перемешивали. Нагревали полученные растворы до 50 градусов на водяной бане.

#### **Определение содержания органических веществ**

1) В стеклянные флаконы с белыми крышками или в пробирки Эппендорфа (промаркированными заранее) помещали по 1 грамму сухой почвы. Для каждого почвенного горизонта проводится опыт с 2% и 5 % раствором соды, как требует методика.

2) Навеску почвы заливали 10мл раствора горячей соды, закрывали крышкой, взбалтывали. Оставляли на 24 часа, первые 12 часов стаканчики периодически взбалтывали.

3) Через сутки переливали часть раствора в крышку и ставили на белую бумагу со шкалой. Сравнивали цвет раствора и записывали количество мг С/кг почвы в таблицу.

### **2.4. Посев и наблюдение за ростом колоний азотфиксирующих бактерий**

1) Сделали трафарет из бумаги в контуре чашки Петри. Каждую чашку предварительно промаркировали с нижней стороны, согласно присвоенным номерам образцов. Пример: ТЗП2Г1.

2) Приготовили вспомогательный раствор солей для среды Эшби и саму среду.

Данная среда является селективной, на ней могут расти только бактерии, фиксирующие азот, поэтому она безопасна для школьников с точки зрения возможных появлений на ней патогенных микроорганизмов.

В банку объемом один литр налили 400мл дистиллированной воды, высыпали в банку навески солей ( $K_2HPO_4$ -0,2 гр.;  $NaCl$ -0,2 гр.;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,2гр.;  $K_2SO_4$ -0,1 гр.) и перемешали взвесь. Довели объем раствора до 1 литра.

На весах подготовили навески  $CaCO_3$ -1г.; Агар-3г.; Глюкозы-4г. В стакан налили 200мл вспомогательного раствора, добавили навески, перемешали смесь до однородности. Смесь вскипятили на водяной бане до максимального растворения компонентов среды Эшби. Охладили смесь до 50-60°C и заполнили ей чашки Петри, так, чтобы смесь полностью покрывала дно. В качестве контроля сделали пробу воздуха на этой питательной среде.

3) Подготовили почву для анализа (3г. увлажненной дистиллированной водой почвы, тщательно перемешанной до пастообразной массы с помощью зубочистки) и произвели посев

комочков каждого образца на точки пересечения линий трафарета в чашке Петри, для чего отделили 40-50 комочков диаметром 3-4 мм.

4) Каждую чашку Петри накрыли крышкой и поставили в теплое место.

5) Рост колоний, согласно методике, контролировали на 4,7 и 10 день. Чашки Петри фотографировали, подсчитывали количество колоний, описывали их цвет. Описание и фото вносили в базу данных и в дневник наблюдений в виде таблицы.

### 2.5. Микроскопическое исследование образцов

Исследование проводили на 8 день после посева культуры бактерий.

Оборудование: предметные стекла; пипетка Пастера; зубочистки; красители: фуксин Циля тушь; спиртовые салфетки; микроскоп.

1. Протирали предметные стекла спиртовой салфеткой. Отбирали пробу колоний и с помощью зубочистки наносили некоторое количество биомассы на предметное стекло (фото №11, прил. 3). После этого краем чистого стекла делали мазок одним движением. Подсушивали препарат на воздухе.

2. В чашке Петри обозначали маркером номер колонии и приклеивали, необходимую для базы данных, этикетку. Описывали цвет колонии.

3. На предметное стекло с помощью пипетки наносили каплю фуксина Циля, не допуская растекания, оставляли окрашиваться на 1 минуту (фото №12, прил. 3).

4. Наносили каплю туши на край стекла и с помощью зубочистки проводили тонкую дорожку для смещения красителей до получения грязно-розового цвета.

5. Препарат высушивали на воздухе и рассматривали под микроскопом при малом и большом увеличении.

6. С помощью смартфона фотографировали (при малом и большом увеличении микроскопа) культуру Азотобактера через окуляр.

## Приложение 2

### 3.1.1. Определение гранулометрического состава почвы

Таблица №1

Точки	№ образца (повторность)	Диагностические методы			Название типа механического состава почвы
		скатывание шарика	образование шнура	деформация шнура	
Точка № 1 Памятник природы «Зареченский лес»	T1П1Г1	скатывается	Раскатывается с трещинами	кольцо образует с трещинами	Средний суглинок
	T1П2Г1	скатывается	раскатывается с трещинами	кольцо образует с трещинами	Средний суглинок
	T1П3Г1	скатывается	раскатывается с трещинами	кольцо образует с трещинами	Средний суглинок
	T1П1Г2	скатывается	раскатывается с трещинами	кольцо образует с трещинами	Средний суглинок
	T1П2Г2	скатывается	раскатывается с трещинами	кольцо образует с трещинами	Средний суглинок
	T1П3Г2	скатывается	раскатывается с трещинами	кольцо образует с трещинами	Средний суглинок
	T1П1Г3	скатывается	раскатывается с трещинами	кольцо образует с трещинами	Средний суглинок
	T1П2Г3	скатывается	раскатывается с трещинами	кольцо образует с трещинами	Средний суглинок
	T1П3Г3	скатывается	раскатывается с трещинами	кольцо образует с трещинами	Средний суглинок
Точка № 2 Лес в ЦПКиО «Заречье»	T2П1Г1	скатывается	раскатывается с трещинами	кольцо образует с трещинами	Средний суглинок
	T2П2Г1	скатывается	раскатывается с	кольцо образует	Средний суглинок

Место произрастания Прострела раскрытого			трещинами	с трещинами	
	T2ПЗГ1	скатывается	раскатывается с трещинами	кольцо образует с трещинами	Средний суглинок
	T2П1Г2	скатывается	дробится при раскатывании	кольцо образует с трещинами	Легкий суглинок
	T2П2Г2	скатывается	дробится при раскатывании	кольцо образует с трещинами	Легкий суглинок
	T2ПЗГ2	скатывается	дробится при раскатывании	кольцо образует с трещинами	Легкий суглинок
	T2П1Г3	скатывается	раскатывается с трещинами	кольцо образует с трещинами или не образует	Легкий суглинок-супесь
	T2П2Г3	скатывается	раскатывается с трещинами	кольцо образует с трещинами или не образует	Легкий суглинок-супесь
Точка № 3 Памятник природы «Зареченский лес» Место произрастания Венерина башмачка	T3П1Г1	скатывается	раскатывается с трещинами	кольцо образует с трещинами	Средний суглинок
	T3П2Г1	скатывается	раскатывается с трещинами	кольцо образует с трещинами	Средний суглинок
	T3ПЗГ1	скатывается	раскатывается с трещинами	кольцо образует с трещинами	Средний суглинок
	T3П1Г2	скатывается	раскатывается	кольцо образует	Тяжелый суглинок
	T3П2Г2	скатывается	раскатывается	кольцо образует	Тяжелый суглинок
	T3П2Г2	скатывается	раскатывается	кольцо образует	Тяжелый суглинок

### 3.1.2. Определение кислотности

Таблица №2

Точка	Значение pH
«Зареченский лес». Горизонт 1	5
ЦПКиО «Заречье». Место произрастания Прострела раскрытого. Горизонт 1	6
«Зареченский лес». Место произрастания Венерина башмачка. Горизонт 1	7,45
«Зареченский лес». Место произрастания Венерина башмачка. Горизонт 2	7,45

### 3.2. Изучение почвенного дыхания в верхних горизонтах в мг CO<sub>2</sub>/100 грамм почвы

Таблица №3

точка	Кол-во HCl(мл) Конт роль	Кол-во HCl(мл) первая повторн ость	Кол-во HCl(мл) вторая повторнос ть	Кол-во HCl(мл) среднее	Кол-во NaOH(моль) контроль	Кол-во NaOH (моль) среднее	Масса углекислого газа в мг на 100 грамм почвы вычисляется по формуле: $m(CO_2) = (n(NaOH_k) - (NaOH_{cp})) * 44g/моль$ , где 44г./моль-молярная масса CO <sub>2</sub>
T1	8,60	7,70	7,90	7,80	0,860	0,780	$(0,86-0,78)*44г/моль=3,520 гр.$
T2	8,50	6,90	7,16	7,03	0,850	0,703	$(0,85-0,703)* 44г/моль= 6,468 гр.$
T3	7,24	4,60	4,35	4,47	0,724	0,447	$(0,724-0,447)* 44г/моль= 12,188 гр.$
T3Г2	5,40	4,24	4,00	4,12	0,540	0,412	$(0,54-0,412)* 44г/моль= 5,632 гр.$

### 3.3. Содержание органических веществ

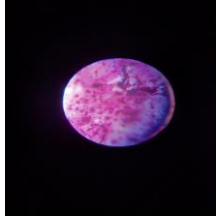


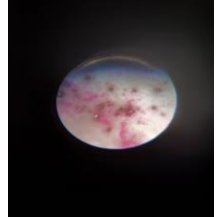




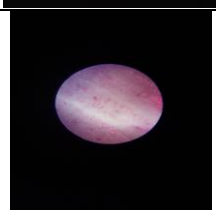


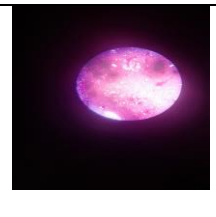



Количество органического вещества в почвенных горизонтах (по количеству углерода), полученного с помощью 2% и 5 % раствора соды (NaHCO<sub>3</sub>). Единица измерения мг С/кг.

Таблица №4

Концентрация соды Горизонты	Точка 1		Точка 2		Точка 3	
	2%	5%	2%	5%	2%	5%
1	1000	1000	800	800	2000	2100
2	1000	1100	700	700	800	1000
3	300	500	600	600	800	1000

### 3.4. Микроскопическое исследование образцов

Фото под микроскопом колоний азотобактера. Таблица №5

Маркировка	Увеличение в 120 раз	Увеличение в 600 раз	Номер в базе данных	Фото чашек Петри в базе данных на 10 день
T1П1Г1			23Б0921	
T1П2Г1			23Б0922	
T1П3Г1		-	23Б0923	
T2П1Г1			23Б0924	
T2П2Г1		 ОБЫЧНАЯ  ЖЕЛТАЯ КОЛОНИЯ	23Б0925	

### Приложение 3



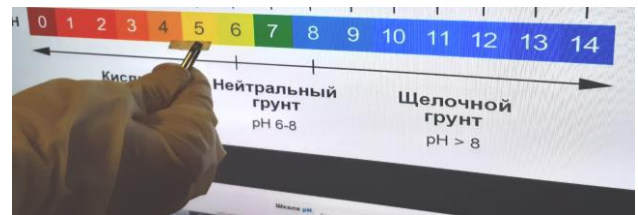
**Фото №1-3.** Места отбора проб «Зареченский лес» Т1 ЦПКиО Т2 «Зареченский лес» Т3. Место произрастания Венерина башмачка.

**Фото №4-6.** Определение гранулометрического состава образцов почвы.

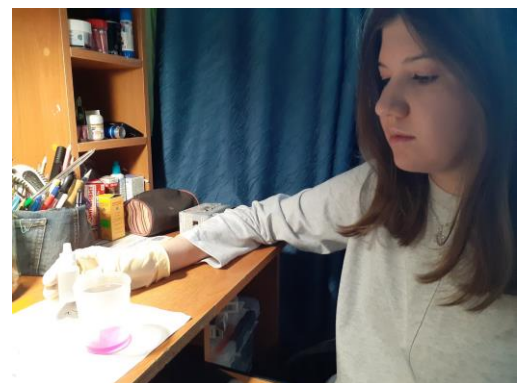


**Фото №7-8.**

Определение pH образцов почвы с предварительной маркировкой пробирок Эппендорфа и использованием штатива из подручных предметов.



**Фото №9-10.** Подготовка и проведение теста «Дыхание почвы» с помощью титрования. Абсорбционный метод по И.Н. Шаркову 1984г.



**Фото №11-12.** Взятие пробы из колонии бактерий, нанесение на предметное стекло. Окрашивание пробы, взятой из колонии

