

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ
Муниципальное общеобразовательное учреждение Туринская средняя школа
Эвенкийского муниципального района

КРАЕВОЙ МОЛОДЕЖНЫЙ ФОРУМ
«НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ СИБИРИ»

НОМИНАЦИЯ «НАУЧНЫЙ КОНВЕНТ»

Направление: естественнонаучное

Название работы: «Насколько живая почва в окрестностях посёлка Тура?»

Кобизкая Александра Алексеевна, МБОУ ТСШ
ЭМР, 76, 04.06.2009, kobizkaya.alex@mail.ru
8 983 157 45 25  /личная подпись/

Подоляк Валерия Алексеевна, МБОУ ТСШ ЭМР,
76, 11.08.2009, 8 983 507 08 46  /личная подпись/

Биссинг Дарья Витальевна, МБОУ ТСШ ЭМР,
76, 17.03.2009, darabissing@gmail.com 8 913 519
51 52  /личная подпись/

Недилько Любовь Александровна, МБОУ
«Туринская средняя школа» Эвенкийского
муниципального района, учитель биологии
nedilko82@bk.ru 89135867346
 /личная подпись/

С условиями Конкурса ознакомлен(-а) и согласен(-а). Организатор конкурса оставляет за собой право использовать конкурсные работы в некоммерческих целях, без денежного вознаграждения автора (авторского коллектива) при проведении просветительских кампаний, а также полное или частичное использование в методических, информационных, учебных и иных целях в соответствии с действующим законодательством РФ.

Тура, 2023

Человек, в сущности, не думает о том,
Что у него под ногами. Всегда мчится...
И – самое большое – взглянет,
Как прекрасны у него облака над головой
И ни разу не поглядит себе под ноги,
Не похвалит: «Как прекрасна почва».
Карел Чапек (1890-1938)
Чешский писатель

ВВЕДЕНИЕ

Многие из нас, наверное, никогда не задумывались о том, могут ли быть в почве разные микроорганизмы. Нам кажется, что из-за вечной мерзлоты, на территории которой мы проживаем, в почве нет ничего живого.

Совсем недавно наш учитель по биологии предложила исследовательскую работу по определению почвенных продуцентов антимикробных веществ *Bacillus subtilis*, возможно, существующих в условиях Крайнего Севера. Мы собрали команду и начали работу.

Почва – это рыхлый поверхностный слой земной коры. Благодаря действиям природных факторов, почва была создана в течении 4,5 млрд лет. [1]
Наука о почвах называется почвоведением. Ее основоположником является русский ученый Василий Васильевич Докучаев. В почвенном слое постоянно протекают разнообразные процессы. Вода, дожди и снег растворяют минеральные соли. Часть остается в почве, а часть с грунтовыми водами уносится в реки и озера. Грунтовая вода поднимается вверх и испаряется с поверхности почвы. Перемещаются и газы. Все эти разнообразные процессы обеспечивают почвенную среду обитания для многих живых организмов. Между частицами почвы, как в пещерах, живут микроорганизмы. И мы решили исследовать почву на наличие бактерий рода *Bacillus subtilis*. [1]

Чем же так примечательна данная бактерия? Мы изучили различные источники литературы и интернет-сайтов определили, что *Bacillus subtilis* защищает растения от широкого спектра возбудителей и грибных болезней, стимулирует рост и развитие, активизирует иммунную систему растений. А на поверхности корней формирует биопленку. Это повышает концентрацию различных видов антибиотиков, которые защищают растение от фитопатогенов. С другой стороны Бациллюс обладает свойствами синтеза веществ, таких как: витаминов, аминокислот, ферментов для гнилостного распада тканей.

Конечно же, зная такие ценные качества бактерии, ученые всего мира исследуют их наличие в почве. Мы выяснили, что изучением наличия *Bacillus subtilis* занимались: Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. М.Г. Сафронова – Федеральный исследовательский центр «Якутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»; Автореферат диссертации по теме "Пробиотики из штаммов *Bac.Subtilis* при профилактике болезней молодняка и некробактериозе северных оленей", автор Ягловский С.А.

Изучение почвы в нашей местности на наличие *Bacillus subtilis* ранее не проводилось. Территория отдаленная, труднодоступная и малоизученная. Благодаря Институту химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ СО РАН), которые предоставили нам кейсы со всем необходимым оборудованием для обнаружения *Bacillus subtilis* и методическими рекомендациями, мы и смогли провести данное исследование. Все полученные нами данные, а также образцы почвы были отправлены почтой в г. Новосибирск ИХБФМ СО РАН, просп. Академика Лаврентьева д. 8, для дальнейшего исследования. Мы благодарны Институту химической биологии и фундаментальной медицины г. Новосибирск, что они запускают такие проекты и дают возможность познать и исследовать окружающий нас мир.

Цель: определение почвенных продуцентов антимикробных веществ, *Bacillus subtilis*, существующих в условиях Крайнего Севера

Проблема: малоизученная территория Крайнего Севера

Гипотеза: В почве, собранной в окрестностях п.Тура Эвенкийского муниципального района Красноярского края, будут обнаружены антимикробные микроорганизмы *Bacillus subtilis*.

Задачи:

1. Подобрать материалы о антимикробных веществах *Bacillus subtilis*;
2. Провести сбор почвенных образцов на территории Эвенкийского муниципального района Красноярского края п. Тура;
3. Высушить и проанализировать образцы почвы;
4. Подготовить материалы и инструменты для первичного посева почвы;
5. Первичный посев почвы в музейные чашки;
6. Анализ выросших колоний.

Актуальность: Наличие продуцентов антимикробных веществ, обнаруженных в почве Крайнего Севера

Методы исследования:

1. Сбор и анализ почвенных образцов;
2. Опыт;
3. Наблюдение.

Объект исследования: почвенные продуценты антимикробных веществ *Bacillus subtilis* в почве Эвенкийского муниципального района Красноярского края п.Тура.

Предмет исследования: почва районов Крайнего Севера

ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ

Первичный посев почвы:

Весной 2022 года, когда почва в условиях вечной мерзлоты немного оттаяла, наша команда с наставником выехала для сбора почвенных образцов. Почвенные образцы выехали собирать вместе со взрослыми в тайгу, недалеко от п. Тура, около трех километров от Туры. Ехать далеко мы не можем, опасно, ходят таежные опасные животные: медведи и волки. Слишком близко к поселку не стали брать, хотелось набрать именно в лесу нетронутой человеком почвы. Выбрали именно май так как в это время почва уже хоть немного оттаяла, она, конечно, летом оттаит немного больше чем в мае, но в связи с особенностями перевозок пассажиров, мы можем добраться в г. Красноярск только самолетом, в конце мая или начале июня многие выезжают в отпуск на все лето. Собрать команду летом для исследований просто не получится, многих не будет уже в Туре.

Набрать почву оказалось непростой задачей. Почва оттаяла примерно до 40 см вглубь. Почва выявилась суглинистой и с огромным количеством камней. На 30 см уже пробились грунтовые воды, что усложнило сбор почвенных образцов. Мы аккуратно сняли подстилку и отложили в сторону. Разрез расположили таким образом, чтобы его лицевая стенка была обращена к солнцу, чтобы избежать солнечных бликов, мешающих правильной оценке окраски почвы. Начали выкапывать почву и формировать лесенку, чтобы спуститься и набрать почвенные образцы с нижних слоев. С лицевой стороны стенки никто не ходил, чтобы избежать искажения результатов исследования. Набрали почву, на трех разных глубинах: поверхностный слой, средний и нижний. Затем по слоям вернули почву на исходное место и сверху на почву положили подстилку.

Вернувшись в школу, мы разложили почвенные образцы на бумагу подсыхать (Рисунок 1). Затем разровняли почву и убрали крупные камни, корни и травинки.



Рисунок 1 – Сушка почвенных образцов

Для каждого образца почвы подготовили четыре флакона для разведения. Подписали флаконы, обозначив на них номер образца этикетки и порядковый номер флакона (Рисунок 2,3).



Рисунок 2 – Флаконы для разведения почвенных образцов



Рисунок 3 –Перенесение физиологического раствора во флаконы

Вскрыли ампулы с физиологическим раствором и перенесли по 10 мл в каждый флакон. Воспользовавшись кухонными весами, приготовили навеску почвы массой 3 г. (Рисунок 4).



Рисунок 4 – Навески почвенных образцов

Визуально разделили навеску на три части и поместили 1/3 навески почвы во флакон №1. Закрыли крышку флакона №1 и взбалтывающими движениями перемешали его содержимое. Дождались осаждения крупных частиц почвы, песка, растительности, прождав несколько минут. Во флаконе №1 получили ~10% суспензии почвы. С помощью пипетки Пастера перенесли 1,1 мл 10% суспензии из флакона №1 во флакон №2.

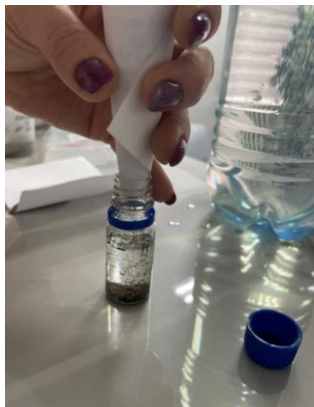


Рисунок 5 – Высыпание навески образцов в физиологический раствор



Рисунок 6 – Взбалтывание почвенных образцов с физиологическим раствором

Закрыли крышку флакона №2, взбалтывающими движениями перемешали содержимое и оставили на несколько минут (Рисунок 6). Во флаконе №2 получена ~1% суспензии почвы. Используя новую пипетку Пастера перенесли 1,1 мл 1% суспензии из флакона №2 во флакон №3. Закрыли крышку флакона №3, взбалтывающими движениями перемешали его содержимое и оставили на несколько минут. Во флаконе №3 получена ~0,1% суспензии почвы. Используя новую пипетку Пастера, перенесли 1,1 мл 0,1% суспензии из флакона №3 во флакон №4. Закрыли крышку флакона №4, взбалтывающими движениями перемешали его содержимое и оставили на несколько минут. Во флаконе №4 получили ~0,01% суспензии почвы (Рисунок 7).

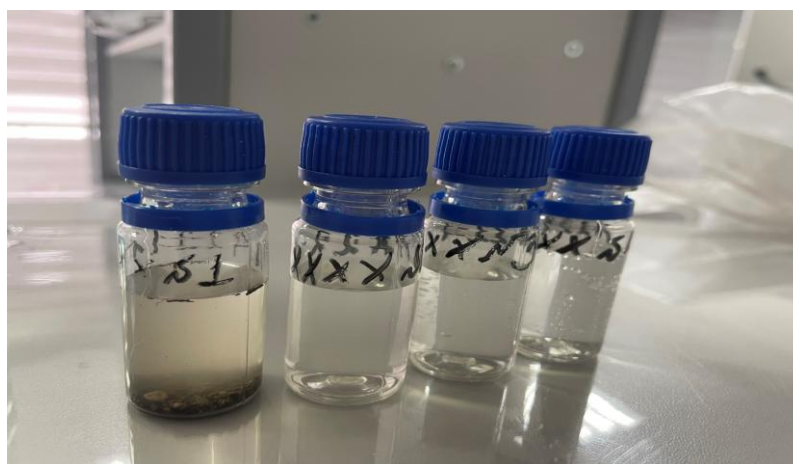


Рисунок 7 – Флаконы с суспензией

Вскрыли 3 упаковки с чашками Петри «Гуазе» и подписали их следующим образом: ПА22-1-5001-Гуазе-1; ПА22-1-5001-Гуазе-0,1; ПА22-1-5001-Гуазе-0,01, где ПА22-1-5001 – уникальный номер образца с этикетки для маркировки, 1, 0,1 и 0,01 – концентрации суспензий. Аналогичным образом подписали 3 чашки Петри «SFM»: ПА22-1-6001-SFM-1; ПА22-1-6001-SFM-0,1; ПА22-1-6001-SFM-0,01 (Рисунок 8).

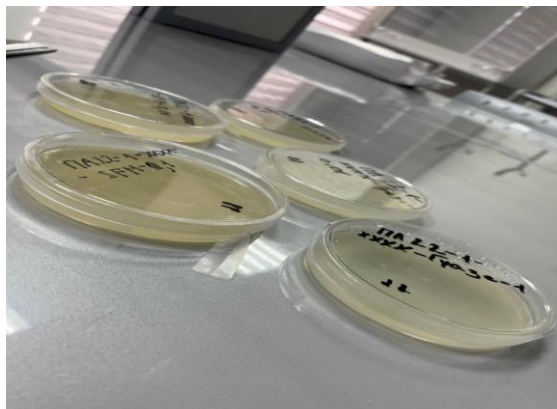


Рисунок 8 – Подписанные чашки Петри «Гуазе» и SFM»

С помощью пипетки Пастера перенесли каплю раствора из флакона №2 на поверхность чашки ПА22-1-5001-Гуазе-1. Распределили раствор по поверхности чашки с помощью ватной палочки и закрыли чашку Петри крышкой. Этой же пипеткой Пастера перенесли каплю раствора из флакона №2 на поверхность чашки ПА22-1-6001-SFM-1. Распределили раствор по поверхности чашки с помощью чистой ватной палочки и закрыли чашку Петри крышкой. Аналогичным способом перенесли и распределили суспензию из флакона №3 на чашки Петри ПА22-1-5001-Гуазе-0,1 и ПА22-1-6001-SFM-0,1, а из флакона №4 на чашки Петри ПА22-1-5001-Гуазе-0,01 и ПА22-1-6001-SFM-0,01. Место стыка чашки Петри с крышкой обернули лентой Parafilm(Рисунок 9) [2]

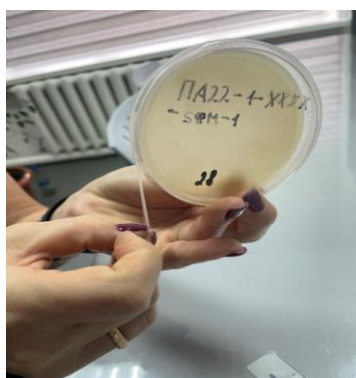


Рисунок 9 – Место стыка чашки Петри с крышкой обернули лентой Parafilm

Нашей целью было предотвратить высыхание среды в чашке Петри. Оставили чашу инкубироваться при комнатной температуре на 7 дней. Использованные ватные палочки, перчатки, пипетки Пастера и флаконы поместили в раствор ДП2Т и оставили на 2 дня. Далее компоненты утилизировали как бытовые отходы, а раствор ДП2Т слили в канализацию.

Получение музейных чашек Петри:

Через 7 пройденных дней проанализировали изменения в чашке Петри и выбрали чашки с разными типами агаров, на которых выросло около 50-ти колоний (Рисунок 10 и 11).

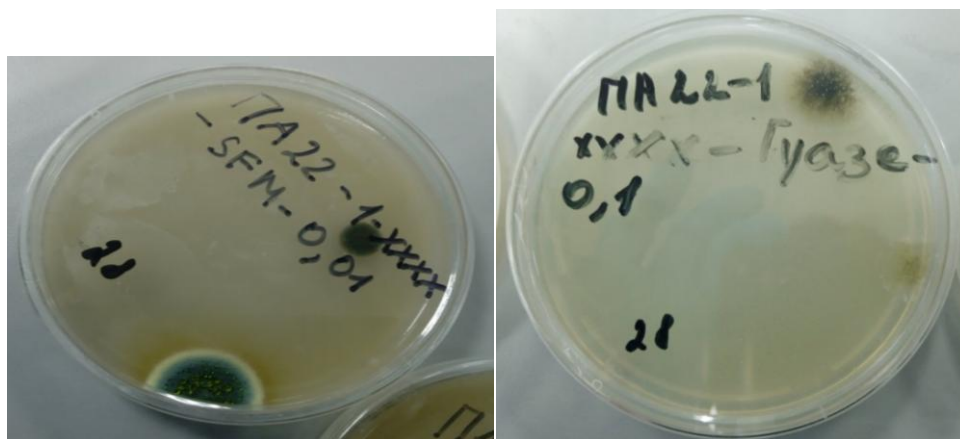


Рисунок 10 и 11 – Выросшие колонии в чашках Петри

Вскрыли и подписали чашку Петри «Гуазе», обозначив на ней номер почвенного образца: ПА22-1-5001-Гуазе-музей. Используя для каждой колонии чистую зубочистку, перенесли отличающиеся колонии с выбранных чашек Петри с агаром Гуазе в музейную чашку Петри ПА22-1-5001-Гуазе-музей(Рисунок 12).

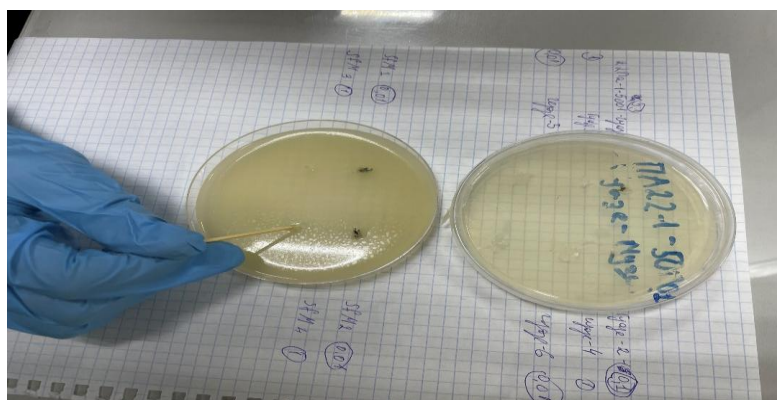


Рисунок 12 –Перенос колоний в чашки Петри с агаром SFM ПА22-1-6001-SFM-музей

Для этого мы подцепили небольшое количество колоний с помощью зубочистки и прокололи среду в музейной чашке Петри этой зубочисткой. При переносе различающихся колоний в чашку Петри соблюдали интервалы. Аналогичным образом подготовили и провели пересев колоний на музейную чашку Петри с агаром SFM ПА22-1-

6001-SFM-музей. Зубочистки, перчатки и чашки Петри, использовавшиеся для первичного посева, поместили в раствор ДП2Т и оставили на 1-2 дня. После этого использованные компоненты утилизировали как бытовые отходы, а раствор ДП2Т слили в канализацию. Оставили музейные чашки Петри инкубироваться на 7 дней при комнатной температуре, предварительно обмотав их лентой Parafilm. [2]

Определение антибактериальной активности полученных штаммов:

Через 7 дней сфотографировали музейные чашки Петри, фотографии распечатали, вклеили в журнал и присвоили каждой выросшей колонии свой уникальный номер (Рисунок 13,14).

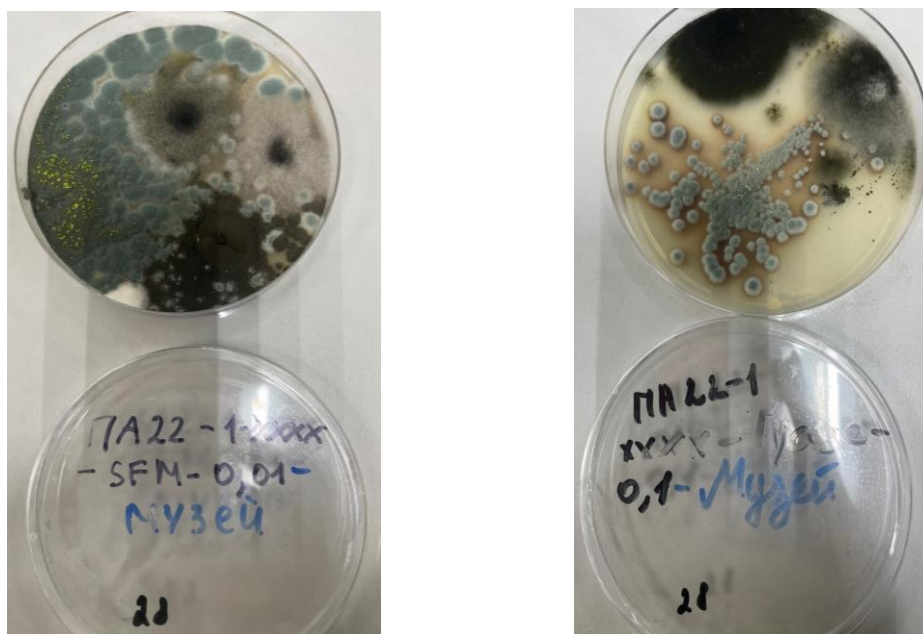


Рисунок 13,14– Выросшие колонии в Музейных чашках

Открыли капсулу «Ветом» и высыпали её содержимое в пробирку типа «Эппендорф». Вскрыли ампулу с физиологическим раствором. С помощью пипетки Пастера перенесли 1 мл физиологического раствора в пробирку типа «Эппендорф», содержащую препарат «Ветом» (Рисунок 15).



Рисунок 15 – Открыли капсулу «Ветом» и высыпали её содержимое в пробирку типа «Эппендорф»

Пробирку закрыли, перемешали её содержимое встряхивающими движениями. Вскрыли упаковку с 24-луночным планшетом с агаром LB. с помощью пипетки Пастера перенесли в каждую лунку планшета по капле раствора препарата «Ветом». Покачивающими движениями равномерно распределили раствор по поверхности лунок. Дожидались высыхания раствора на поверхности лунок планшета. С помощью зубочистки перенесли отдельные колонии с музейных чашек в лунки планшета, фиксируя в журнале номер колонии и номер лунки планшета, в который она переносится (Рисунок 16).

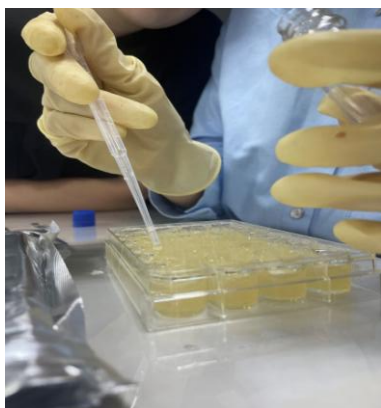


Рисунок 16 – с помощью пипетки Пастера перенесли в каждую лунку планшета по капле раствора препарата «Ветом»

Планшет закрыли крышкой, обернули зону стыка крышки и планшета лентой Parafilm и оставили инкубироваться при комнатной температуре на 7 дней. Не открывая крышки планшета ежедневно наблюдали за изменениями в лунках. Наблюдаемые изменения фиксировали в лабораторном журнале. Отметили в базе данных номера колоний и образцов почвы, для которых наблюдалось образование зон лизиса.



Рисунок 17, 18 Выросшие колонии в планшете

Далее мы взяли образцы различных колоний из ранее полученных музейных чашек Петри с агаром Гуазе ПА22-1-5001-Гуазе-музей и с агаром SFM ПА22-1-6001-SFM-музей, и рассмотрели под микроскопом каждую колонию отдельно, фиксируя увиденное в лабораторном журнале, чтобы позже определить вид организма и есть ли среди них искомый почвенный продуцент антимикробных веществ *Bacillus subtilis*. Сверившись с

нашими данными и данными, предоставленными в Интернете, мы определили, что один из рассматриваемых организмов был почвенным продуцентом антимикробных веществ *Bacillus subtilis* (Рисунки 19-21).

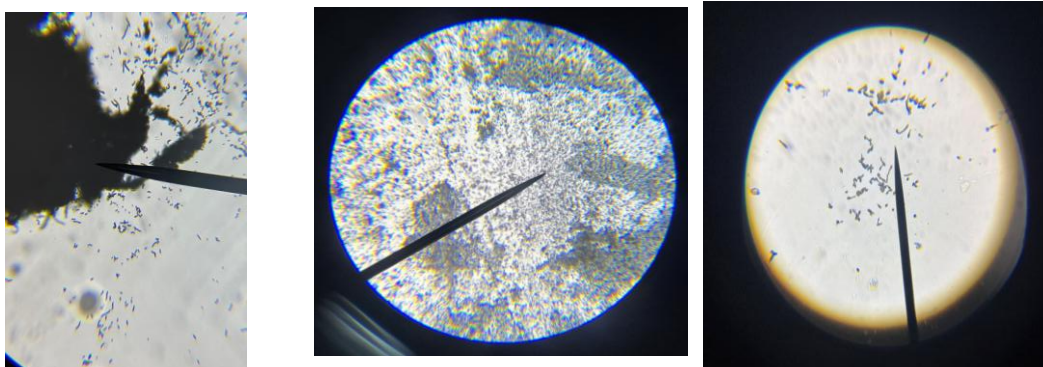


Рисунок 19,20,21 – Увиденные колонии под микроскопом

ВЫВОДЫ

Нами были собраны материалы о антимикробных веществах *Bacillus subtilis*. Выяснили, что они играют важную роль для нормальной жизнедеятельности корневой системы растений. Собранные нами образцы почвы высыхали в течении двух дней. Они содержали огромное количество камней и немного корней. Наша гипотеза была подтверждена. В собранных таежных почвенных образцах возле п. Тура Крайнего Севера действительно были обнаружены *Bacillus subtilis*. Мы смогли это определить, сравнив наши образцы с образцами интернет источника. Несмотря на то, что почва нашего района находится под снежным покровом около 9 месяцев, оттаивание поверхностных слоёв до 50 см вглубь, мы смогли обнаружить наличие штаммов микроорганизмов. Считаем, что наша работа сложная и трудоёмкая. Оказалось, что собрать образцы почвы было очень сложно. Земля ещё недостаточно оттаяла, сбору мешали подземные воды. Наблюдалось большое количество камней и корней деревьев.

Мы благодарны Институту химической биологии и фундаментальной медицины г. Новосибирск, за предоставленную возможность провести сложные исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Добровольский Г. В., Никитин Е. Д. Сохранение почв как незаменимого компонента биосферы. — М.: Наука, 2000.
2. Методическое пособие: Охотник за микробами/ проект по поиску азотфиксирующих бактерий, 2022 г.
3. Ганжара Н. Ф. Почвоведение.— М.: Агроконсалт, 2001.
4. Глазовская М. А., Геннадиев А. Н. География почв с основами почвоведения. — М.: МГУ, 1995.

5. Почва Архивная копия от 27 декабря 2018 на Wayback Machine в Большой Российской энциклопедии, 2018.
6. *Герасимов И. П.* Понятие «почва — природное тело» и его производные («почва — режим», «почва — воспроизводство», «почва — память»): К нашим дискуссиям // Почвоведение. 1983. № 4.
7. Почвы России — основные типы почв России. geographyofrussia.com.
8. <https://www.vidal.ru/drugs/molecule/1944>
9. <https://www.gastroscan.ru/handbook/118/5648>