**ВОПРОСЫ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ БИОТЕСТА С ПРИМЕНЕНИЕМ  
БАКТЕРИЙ РОДА AZOTOBACTER**© 2021 А. А. Данилова <sup>1</sup>, А. А. Петров <sup>2</sup><sup>1</sup>Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, р.п. Краснообск, а/я 356, Новосибирский район, Новосибирская область, 630501, Россия, E-mail: [Danilova7alb@yandex.ru](mailto:Danilova7alb@yandex.ru)<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт прикладной экологии Севера им. профессора Д.Д. Саввинова СВФУ, пр. Ленина, д. 43, г. Якутск, 677000, Россия, E-mail: [Petrov\\_Alexey@mail.ru](mailto:Petrov_Alexey@mail.ru)

**Цель исследования:** Бактерии рода *Azotobacter* являются известной тест-культурой для оценки состояния среды. При интерпретации результатов биотеста возникает противоречие между общепринятым положением, что обилие азотобактера свидетельствует о благополучии среды, и экспериментальными данными, обнаруживающими большое число КОЕ этих бактерий в объектах с явно неблагоприятными характеристиками. Цель работы – обсудить возможную причину возникновения данной проблемы и предложить один из путей к её решению.

**Объекты исследования.** Чернозём выщелоченный (лесостепь Приобья, 54°53'13,5"N и 82°59'36,7"E) с различным содержанием органического вещества и минерального азота вследствие различного агроиспользования: 1) бессменный пар, 2) выращивание пшеницы, ежегодное удаление соломы с поля + чистый пар, 3) пшеница + оставленная солома + чистый пар, 4) пшеница + оставленная солома + сидеральный пар, 5) многолетняя залежь. Грунты многолетних (30 лет) отвалов после добычи угля на территории ГОК «Денисовский» в Южной Якутии (56°46'20,23"N и 124°51'06,95"E), остающиеся без растений и под растительностью с содержанием общего углерода 1,8 и 5,7%, общего азота – 0,3 и 0,4% соответственно.

**Методология.** В работе в качестве критерия нарушенности почвы применили отношение C:N, вычисленное на основе определения содержания углерода в мортмассе и нитратного азота. Азотобактер выделяли на среде Эшби методом почвенных комочков. Идентификацию видов проводили с помощью амплификации гена 16S rPHK с универсальными праймерами 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') и U1492R (5'-GGTACCTGTACGACTT-3'). В качестве экспериментального стресса в почву вносили глюкозу в дозе 10 мг/г. Для оценки выживаемости *Azotobacter* в почву вносили (примерно 1 млн клеток/10 г) суспензию семисуточной культуры бактерий, выделенных из исследуемой почвы. Плотность микробного населения почвы оценивали по микробным пейзажам на стеклах обрастания, инкубированных в почвенных монолитах в течение 60 дней при оптимальных гидротермических условиях.

**Основные результаты.** Активизация роста азотобактера при внесении глюкозы (отклик на стресс) была более выраженной в более нарушенных почвах в сравнении с менее нарушенными и была обратно пропорциональной отношению C:N, вычисленному как отношение содержания углерода в мортмассе и азота нитратного. Интенсивность роста внесённой живой культуры азотобактера была выше также в более нарушенных почвах, что коррелировало с плотностью микробного населения. То есть обилие азотобактера не может быть однозначным свидетельством благополучия почвы.

**Заключение.** Причина возникновения противоречия при интерпретации результатов биотеста на основе азотобактера связана с недооценкой того факта, что первоначально показатель был предложен для индикации плодородия пахотных (нарушенных) почв. Для универсализации биотеста предложено дополнить традиционное определение числа обрастаний почвенных комочков процедурой, оценивающей отклик показателей роста азотобактера на экспериментальный стресс.

**Ключевые слова:** *Azotobacter*; индикация среды; экспериментальный стресс, чернозем выщелоченный, техногенные отвалы в криолитозоне, микробные пейзажи

**Цитирование:** Данилова А.А., Петров А.А. Вопросы интерпретации результатов биотеста с применением бактерий рода *Azotobacter* // Почвы и окружающая среда. 2021. Том 4. № 3. e154. doi: 10.31251/pos.v4i3.154

**ВВЕДЕНИЕ**

В условиях драматического антропогенного изменения окружающей среды совершенствование методов биотестирования состояния почвы остается актуальной проблемой

экологии. Известной тест-культурой для этих целей являются бактерии р. *Azotobacter*. Интерес исследователей к роду *Azotobacter* не ослабевает с момента их обнаружения в 1901 г. В XXI веке эти бактерии становятся объектом исследований в области биотехнологии – широкий спектр уникальных соединений, синтезируемых ими, используют в самых разных областях науки и технологий (Viscardi et al., 2016; Noar, Bruno-Barcelona, 2018; Kour et al., 2020). Простая техника выделения, характерная морфология клеток позволили использовать азотобактер в качестве удобного индикатора для оценки состояния среды. Исходным положением в интерпретации результатов биотеста было утверждение, что чем выше заселенность почвы азотобактером, тем плодороднее почва (Мишустин, Шильникова, 1968), то есть обилие этих бактерий оценивалось как положительное агрономическое свойство почвы. В последующем этот показатель стали применять в экологических оценках и обилие азотобактера считают положительным свойством почвы (Свистова, Истомина, 2019; Скугорева и др., 2012, 2019). Между тем многие авторы отмечали большое число этих бактерий в почвах и почвоподобных субстратах с явно неблагоприятными свойствами (Феоктистова, 2019; Феоктистова и др., 2011; Артамонова, Бортникова, 2018). Возникло определенное противоречие. Осознание ситуации привело экологов к введению дополнительных критериев для оценки состояния азотобактера в биотесте: размеры образований, их пигментация и морфология (Артамонова, Бортникова, 2016, 2018). Цель работы: обсудить возможную причину возникновения данной проблемы и предложить один из путей к её решению.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе в качестве критерия степени нарушенности почвы приняли отношение C:N, вычисленное на основе определения содержания углерода в мортмассе и нитратного азота (N-NO<sub>3</sub>), поскольку C:N, традиционно рассчитанное по органическому углероду (C<sub>орг</sub>) и общему азоту (N<sub>общ</sub>), оказалось малоинформативным.

**Объект 1.** Многолетний опыт в Новосибирском Приобье (54°53'13,5"N и 82°59'36,7"E"). Почва чернозём выщелоченный среднегумусный, среднесуглинистый. Различное содержание в нём органического вещества (мг С мортмассы/кг) и нитратного азота (мг N-NO<sub>3</sub>/кг) являлось следствием разного предшествующего сельскохозяйственного использования почвы:

1. Бессменный пар (300 мг С/ кг, 50–60 мг N-NO<sub>3</sub>/кг);
2. Выращивание пшеницы с ежегодным удалением соломы с поля + чистый пар (440, 15–10);
3. То же с оставлением соломы + чистый пар (690, 15–10);
4. То же с оставлением соломы + сидеральный пар (1040, 0–5);
5. Многолетняя залежь возрастом не менее 30 лет (2500, 0).

Опыт подробно описан ранее (Данилова, 2018).

**Объект 2.** Образцы грунтов с многолетних (30 лет) отвалов после добычи каменного угля на территории ГОК «Денисовский» в Южной Якутии (56°46'20,23"N и 124°51'06,95"E):

Отвал 1. Поверхность занята растительностью. Субстрат определен как молодая почва с четко оформленным органо-генным горизонтом. По классификации (Андроханов и др., 2004) – эмбриозём органо-аккумулятивный. Содержание C<sub>орг</sub> 5,7%, N<sub>общ</sub> 0,30%, pH 5,5.

Отвал 2. Поверхность без растительного покрова. Субстрат – элювиозём инициальный. Содержание C<sub>орг</sub> 1,8%, N<sub>общ</sub> 0,42%, pH 6,3. Содержание тяжёлых металлов (изучен список из 9 элементов) в субстратах было ниже уровня ПДК, но абсолютная величина некоторых из них в элювиозёме превышала показатели эмбриозёма. Так, содержание Pb превышало в 3 раза, Zn – в 7 раз, Co – в 2 раза, Cu – в 2 раза, Mn – в 2,4 раза.

*Azotobacter* учитывали стандартным методом комочков на среде Эшби (Методы..., 1980). В лабораторном опыте для активизации *Azotobacter* в почву вносили глюкозу (10 мг/г), инкубировали образцы 7 дней при влажности 60% от ППВ и температуре 25 °С, далее производили учёт по стандартной схеме. Для оценки выживаемости *Azotobacter* в почву вносили (1 млн клеток/10 г) суспензию 7-суточной культуры бактерий, выделенных из исследуемой почвы. Образцы инкубировали 7 дней, далее производили учёт по стандартной схеме.

Идентификацию азотобактера до вида проводили с помощью амплификации гена 16S рРНК с универсальными праймерами 27F (5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3') и U1492R (5'-GGTTACSTTGTTCAGACTT-3'). Полученный ПЦР-продукт очищали и определяли нуклеотидную последовательность секвенированием по Сэнгеру. Результаты анализировали с использованием сервиса BLAST (NCBI сайт: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

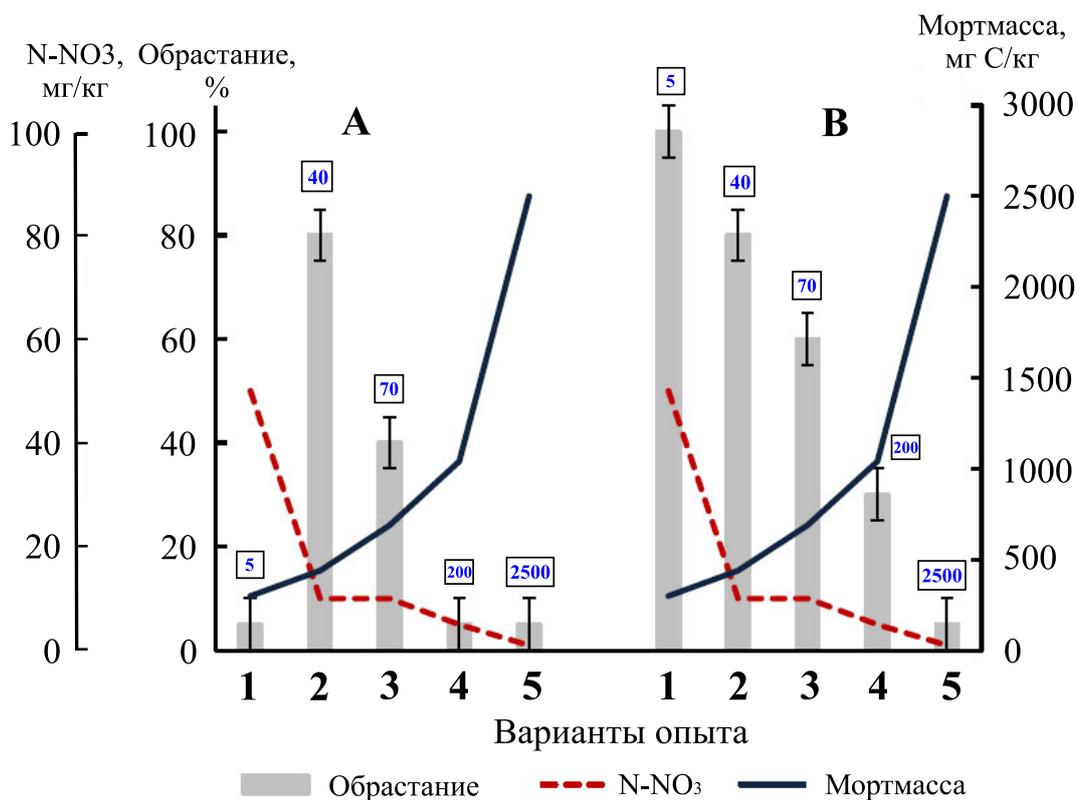
Процедура фиксации микробного пейзажа почвы: в монолиты с ненарушенным сложением вставляли обезжиренные предметные стёкла, почву инкубировали 60 дней при влажности 60% от ППВ и температуре 23 °С. Отпечатки красили карболовым эритрозином (5%). Просматривали по 50 полей зрения на одном стекле, на каждом варианте изучали по 3 стекла. Фотографии выполнены при помощи микроскопа Primo Star Zeiss с видеокамерой Axiocam105 color.

Повторность опытов 3-кратная. Статистическая обработка данных проведена по стандартной схеме дисперсионного анализа в пакете программ Stat Soft Statistica 10 for Windows.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

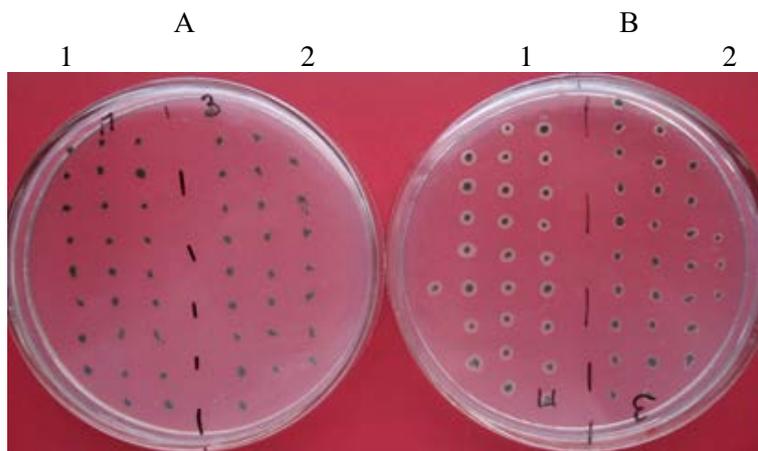
Судя по отношению C:N, вычисленному на основе определения содержания углерода в мортмассе и нитратного азота, наиболее нарушенной является почва бессменного пара (рис.1, вар.1), где длительное отсутствие поступления растительных остатков и выноса азота привели к снижению содержания почвенного органического вещества (ПОВ) и накоплению нитратного азота. Варианты 2–4 представляли собой ряд постепенного увеличения содержания ПОВ при агротехническом регулировании количества поступающих пожнивных остатков. Вариант 5 является аналогом целиной равновесной почвы. Как известно, в целинных почвах нитратный азот не обнаруживается. Появление его является признаком дисбаланса в метаболизме вещества в почве.

Все изученные культуры бактерий были отнесены к виду *Azotobacter chroococcum*. Обрастание комочков в указанном ряду вариантов составило: 0–80–40–0–0% (рис. 1). После внесения глюкозы в почву показатель составил ряд: бессменный пар – 100%, пахотные почвы (варианты 2, 3) – 80–100%, залежь – 0%. При этом динамика обрастания комочков имела тесную связь с отношением C:N. При повышении этого отношения в изученном ряду вариантов снижался отклик показателя (обрастание комочков) на стресс (внесение глюкозы).



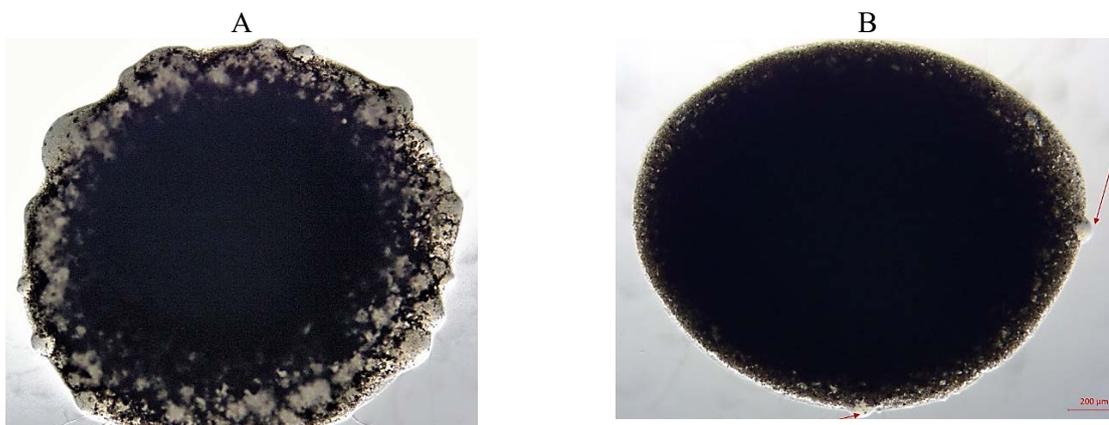
**Рисунок 1.** Содержание органического вещества в почве и процент обрастания комочков на среде Эшби. Варианты опыта: 1 – бессменный пар, 2 – удаление соломы с поля + чистый пар, 3 – оставление соломы на поле + чистый пар, 4 – оставление соломы на поле + сидеральный пар, 5 – многолетняя залежь. А – исходная почва, В – после внесения 10 мг/г глюкозы. Вертикальный отрезок показывает доверительный интервал при P05. В квадратах над столбцами приведено отношение C:N, вычисленное на основе определения содержания углерода в мортмассе и нитратного азота.

При внесении живых культур *Azotobacter* через 24 ч после посева в почве из-под пара обросло 100% комочков, в почве из-под залежи появились только зачатки в виде мелких единичных колоний (рис. 2).



**Рисунок 2.** Обрастание комочков в лабораторном опыте (внесение живой культуры *Azotobacter*). А – контроль без внесения культуры, В – опыт с внесением культуры; 1 – бессменный пар, 2 – многолетняя залежь.

В первом варианте обрастания были равномерными по всей границе комочков, что свидетельствует об отсутствии факторов, препятствующих размножению клеток культуры (рис. 3). Во втором – появились единичные колонии, которые за последующие сутки дали обрастания, но ширина их уступала показателям почвы из-под пара примерно в 2,5 раза (1333+50 и 533+30 мкм соответственно). Следовательно, на фоне залежи существовали факторы, подавляющие, по крайней мере, начальный рост внесённой живой культуры *Azotobacter*. Наиболее вероятной причиной последнего являлась конкуренция со стороны аборигенной микробиоты почвы. Как известно, более высокая плотность микробного населения почвы на целине в сравнении с паром обусловлена прежде всего обилием грибов, что в свою очередь связано с накоплением растительных остатков разной степени разложения (Gueneta et al., 2011; Habtewold et al., 2020). В контексте нашего исследования при изучении микробных пейзажей нам удалось визуально оценить обилие и соотношение компонентов микробиоты в почве многолетнего бессменного пара и многолетней залежи.

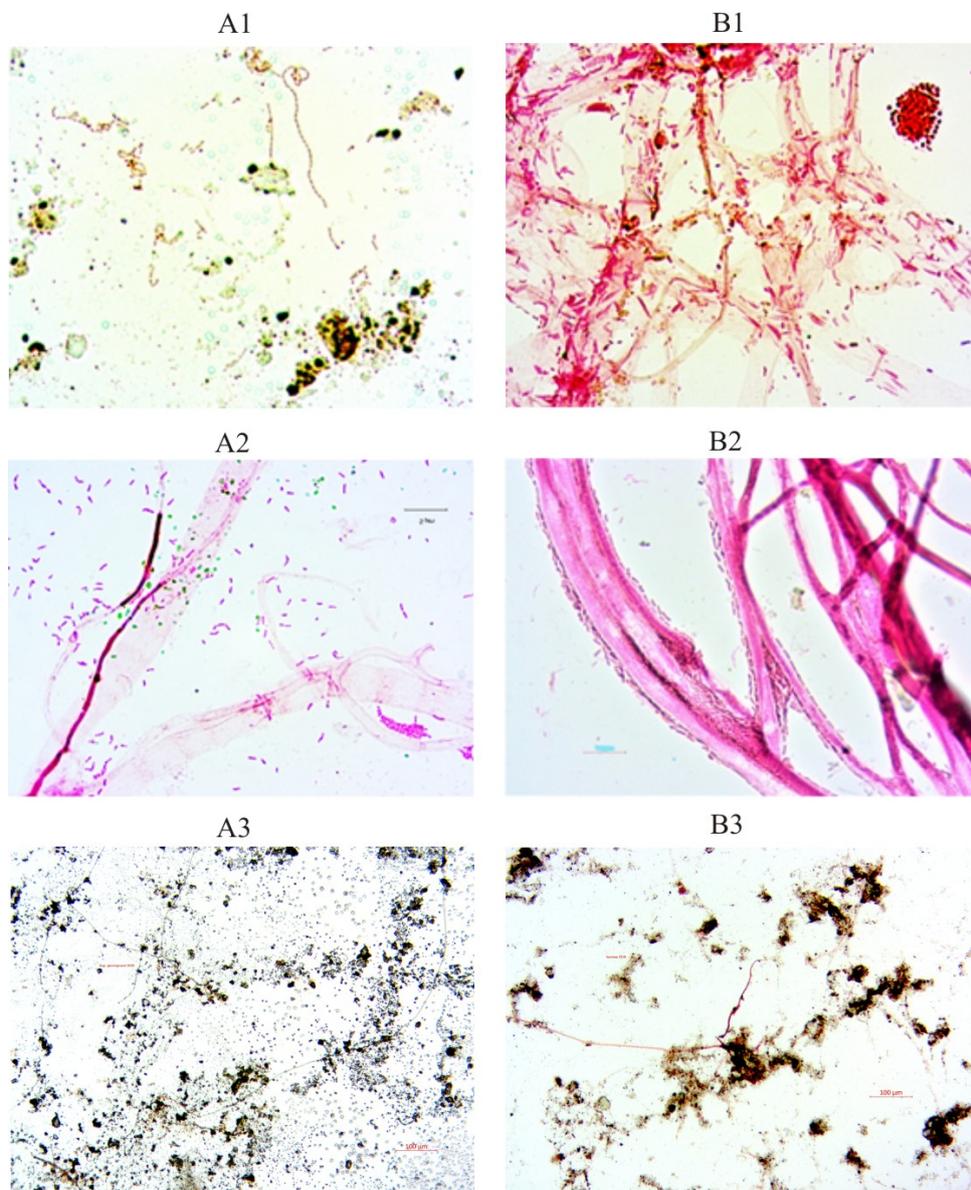


**Рисунок 3.** Характер обрастаний комочков почвы через 24 ч после посева (x40). А – бессменный пар, В – многолетняя залежь.

На рисунке 4 представлены типичные поля зрения из 150 изученных на каждом варианте. На фоне пара обычно отмечали редкие колонии и россыпи клеток бактерий, гиф грибов было мало. На залежи все поля зрения были покрыты слоем грибных гиф, около которых обнаруживали много

клеток бактерий (рис. 4, A1, B1). Принципиальное различие пейзажей заключалось в следующем: в парующей почве клетки бактерий и гифы грибов практически не контактировали, тогда как в залежной – закономерностью было развитие бактерий на гифах и в пространстве около них, то есть наблюдали формирование микобактериальных сообществ (рис. 4, A2, B2). Эти особенности были тесно связаны с состоянием ПОВ (рис.4, A3, B3): на пару диспергированное высокой степени конденсированное, на залежи обогащенное слаборазложившейся биомассой.

В отвальных субстратах скорость появления обрастаний была существенно ниже, чем в чернозёме: через 21 день после посева вокруг 100% комочков на обоих вариантах появились визуально отличимые мелкие обрастания шириной 1-2 мм. Микроскопическая картина и результаты амплификации гена 16S рРНК подтвердили, что это действительно колонии азотобактера. После внесения глюкозы наблюдали активизацию роста бактерий – обрастания появились через 7 дней после посева. На элювиозёме диаметр около 10 мм имели 100% обрастаний, эмбриозёме – 24%. Внесённая культура азотобактера одинаково хорошо развивалась на обоих вариантах. Таким образом, в субстрате, не занятом в течении 30 лет растительностью, активизация клеток азотобактера при поступлении глюкозы происходила более интенсивно в сравнении с молодой почвой под хорошо развитой растительностью.



**Рисунок 4.** Микробный пейзаж и состояние ПОВ (A3, B3) чернозёма выщелоченного под бессменным паром (A) и залежью (B). A1–2, B1–2: x1000, эритрозин карболовый, масляная иммерсия; A3, B3 – x100, сухой объектив

## ОБСУЖДЕНИЕ

Необходимо отметить, что обычно признаком ухудшения состояния среды считают отрицательную динамику числа или скорости роста азотобактера (Мишустин, Шильникова, 1968; Свистова, Истомина, 2019 и др.). Как известно, азотобактер, как и любой другой микроорганизм, является одним из компонентов чрезвычайно сложной живой системы почвы. Изменение его численности в определенной мере является индикатором степени конкурентности в этой системе. То есть, изменение числа азотобактера, как и любой другой группы микроорганизмов, при изменении условий среды возможно как в сторону увеличения (вследствие снижения активности конкурирующих организмов), так и в сторону понижения (повышение активности конкурентов). По нашим данным, такое колебание числа азотобактера можно уловить при экспериментальном стрессе на почву. Даже в сильно истощенной почве длительного бессменного пара сохраняются жизнеспособные клетки азотобактера, которые легко активируются при поступлении доступного источника питания. На многолетней залежи видимо подобных клеток немного из-за специфики условий для развития. Одно из них – конкурентная среда обитания. В климаксовой экосистеме, к каковой можно отнести многолетнюю залежь, доступных источников питания практически не бывает, все экологические ниши заняты специализированными сообществами, что мы и наблюдали визуально на микробных пейзажах почвы. Продукты метаболизма грибов, концентрированные около гиф, дают возможность размножению бактерий. Именно растущие гифы грибов доставляют питательные ресурсы к практически неподвижным клеткам бактерий (Wu et al., 2012; Pandit et al., 2020; Habbewold et al., 2020). Понятно, что эти сообщества хорошо «подогнаны» друг к другу и это осложняет внедрение «чужих». На пару, где плотность микробного населения относительно низкая, кроме того, систематическая вспашка нарушает формирующиеся зачатки сообществ, свободных ниш очевидно много, их и занимает азотобактер. Отсюда следует, что обилие азотобактера никак не может быть однозначным свидетельством экологического благополучия почвенной среды (высокое биоразнообразие, сбалансированность круговорота вещества, вследствие чего устойчивость к стрессам). Равно и низкое число обрастаний не может указывать на обратное. Факты низкого значения показателя в целинных почвах известны давно (Мишустин, Шильникова, 1968). Исследования на техногенных отвалах позволили подтвердить наши предположения. На наш взгляд, при применении азотобактера в качестве критерия для оценки степени благополучия среды произошло некоторое смешение понятий. В исходных рекомендациях предлагали азотобактер как тест для оценки уровня плодородия почвы. Пахотная почва – это пример экосистемы, глубоко нарушенной для целей производства продукции. С экологической точки зрения обилие азотобактера в пахотной почве показывало степень нарушения равновесия в микробной системе почвы, в результате чего преимущество в конкуренции за источники питания получают культурные растения (эффективное плодородие почвы). Со временем этот показатель стали применять в качестве критерия оценок для других экосистем без изменения позиции при интерпретации результатов.

Какой же выход из ситуации? Как следует из анализа литературы, интерпретация результатов биотеста с позиции «больше/меньше» не совсем эффективна. На наш взгляд, достаточно продуктивным может быть учёт отклика показателей на тот или иной экспериментальный стресс. Ранее данный подход нам позволил разработать информативные инструменты для решения прикладных экологических задач. В качестве критериев мы применяли отклик функциональной активности сапротрофной микробиоты (Данилова и др., 2019), скорости дыхания (Данилова, 2020). В качестве стрессоров использовали пестицид, тяжёлый металл, поступление растительных остатков или наоборот экспериментальное истощение почвы. Оказалось, что величина отклика живой фазы на стресс обратно пропорциональна степени антропогенной нагрузки, испытываемой почвой. Показатель этот позволил разработать шкалу устойчивости живой фазы почвы, на основе которой удалось обосновать нормирование пестицидной нагрузки на агроценоз, провести оценку эффективности рекультивационных мероприятий в техногенных ландшафтах. На наш взгляд, такой же подход можно применить и при биотесте на основе азотобактера. Как показывает изложенный выше материал, при первом приближении отклик (активизация роста) азотобактера на стресс (внесение глюкозы) коррелировал со степенью нарушения почвы. Тесная связь величины отклика с соотношением C:N, вычисленном на основе определения содержания углерода в мортмассе и азота нитратного, на наш взгляд, является еще одним свидетельством обоснованности нашего методического подхода. При практической реализации идеи задача будет состоять в калибровке отклика на

стресс. Основная сложность заключается в выборе критерия для оценки ростовых процессов азотобактера. Вероятно, для этих целей обычный учёт числа обрастания комочков будет недостаточно чувствительным, а расчёт площади обрастания каждого комочка – слишком трудоёмким. Работа в этом направлении продолжается.

В качестве заключительного замечания к обсуждению представленного материала считаем необходимым отметить следующее. При знакомстве с литературой, связанной с изложенной выше проблемой, на первый взгляд может возникнуть сомнение в ее актуальности. Действительно, при поиске в базе данных WoS по ключевому слову *Azotobacter* из 5900 записей 67% связаны с молекулярной биологией и биотехнологией, с почвоведением всего – 4,3% (время обращения 10.12.2021). Биотестированием на основе этих бактерий занимаются преимущественно в РФ. Тем не менее, считаем, что актуальность нашего исследования связана со следующими моментами:

1. Поиск «диких» штаммов азотобактера для биотехнологических целей продолжается. При выделении культур из специфических биотопов может оказаться весьма полезным изложенный в статье методический подход – внесение в почву глюкозы. Отметим, что при помощи такого подхода нам удалось выделить весьма перспективный в биотехнологическом плане штамм *Azotobacter chroococcum* из незарастающих в течение 30 лет отвалов после разработки кимберлитовой трубки «Айхал» в Западной Якутии (неопубликованные данные).

2. Данный подход может оказаться дополнительным, доступным критерием для оценки степени устойчивости микробной системы почвы. Как известно, амплитуда изменения той или иной характеристики под влиянием стресса является критерием устойчивости экосистемы (Одум, 1967).

3. Еще один важный момент – образовательный. Непатогенный, относительно легко выделяемый из почвы азотобактер является удачным объектом для освоения навыков работы с микроорганизмами, о чем, в частности, свидетельствует опыт реализации научно-образовательного проекта для школьников «Охотники за микробами», инициированного ИХБФМ СО РАН (<https://microbehunters.ru/>). Изложенный выше материал может служить дополнительным методическим материалом для этих целей.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Имеющиеся противоречия в интерпретации данных при использовании азотобактера в качестве индикатора состояния почвы связаны с недооценкой факта, что первоначально показатель был предложен для индикации плодородия пахотных почв. Как известно, последние относятся к разряду нарушенных, где остаются экологические ниши для размножения того, же азотобактера, слабого конкурента автохтонной микрофлоры в целинной почве. Иными словами, проблема связана с различием критериев для оценки «хорошо» или «плохо» с точки зрения производительных и экологических функций почвы. Для разрешения проблемы предлагаем оценивать изменение обилия или скорости роста азотобактера при экспериментальном стрессе.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность Ворониной Е.Н., к.б.н., старшему научному сотруднику Института химической биологии и экспериментальной медицины (ИХБФМ) СО РАН за идентификацию бактерий рода *Azotobacter*.

#### ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках выполнения государственных заданий ГЗ 0778-2019-0024 «Разработать перспективные системы земледелия на основе изучения, моделирования и прогноза количественных изменений свойств почв и продуктивности культур под влиянием длительного антропогенного воздействия в основных природно-сельскохозяйственных зонах Западной Сибири (СФНЦА РАН) и НМНиВО (проект FSRG-2020-0018) «Изучение особенностей функционирования Арктических и Субарктических экосистем Якутии в условиях усиления техногенного воздействия и глобального изменения климата» (НИИПЭС СВФУ).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андроханов В.А., Куляпина Е.Д., Курачев В.М. *Почвы техногенных ландшафтов: генезис и эволюция*. Новосибирск: Наука, 2004. 151 с.

2. Артамонова В.С., Бортникова С.Б. Биогенное почвообразование на территории длительного хранения насыпных отвалов сульфидсодержащих отходов цианирования // *Антропогенная трансформация природной среды*. 2018. № 4. С. 9–12.
3. Артамонова В.С., Бортникова С.Б. О развитии *Azotobacter chroococcum* Beijerinck в старовозрастных отвалах антрацита // *Теоретическая и прикладная экология*. 2018. № 1. С. 60–72.
4. Артамонова В.С., Бортникова С.Б. О состоянии почвенных азотфиксирующих бактерий на территории городского леса // *Вестник Пермского университета*. 2016. Вып. 2. С. 150–159.
5. Данилова А.А. *Биодинамика пахотной почвы при различном содержании органического вещества*. Новосибирск: Изд-во СФНЦА РАН, 2018. 156 с.
6. Данилова А.А. Дыхательный отклик живой фазы на стресс как критерий оценки состояния почвы // *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2020. Т. 50. № 5. С. 87–93. DOI: [10.26898/0370-8799-2020-5-10](https://doi.org/10.26898/0370-8799-2020-5-10)
7. Данилова А.А., Легостаева Я.Б., Сивцева Н.Е., Петров А.А. Способ оценки устойчивости сапротрофного микробного сообщества почвы методом мультисубстратного теста // *Патент № 2678876*. 2019. Бюл. № 3.
8. *Методы почвенной микробиологии и биохимии*. М.: Изд-во МГУ, 1980. 223 с.
9. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. *Биологическая фиксация атмосферного азота*. М.: Наука, 1968. 530 с.
10. Одум Ю. *Основы экологии*. М.: Мир, 1975. 736 с.
11. Свистова И.Д., Истомина Е.И. *Азотфиксирующая активность урбопочв на примере различных категорий урбаноземов г. Воронежа* // Биогеохимия - научная основа устойчивого развития и сохранения здоровья человека: труды XI Междунар. биогеохимической школы (Тула, 13-15 июня 2019 г.). Тула: Изд-во ТГПУ им. Л.Н. Толстого, 2019. С. 183–185.
12. Скугорева С.Г., Адамович Т.А., Олькова А.С., Домрачева Л.И., Домнина Е.А., Злобин С.С., Измestьева А.В., Ашихмина Т.Я. Использование методов биоиндикации и биотестирования в оценке состояния природного комплекса в зоне влияния Кирово-Чепецкого химического комбината // *Вестник института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН*. 2012. № 3. С. 30–37.
13. Скугорева С.Г., Кутявина Т.И., Огородникова С.Ю., Кондакова Л.В., Симакова В.С., Блинова А.Л., Зыкова Ю.Н., Домрачева Л.И., Ашихмина Т.Я. Комплексный подход в оценке экологического состояния городских почв // *Теоретическая и прикладная экология*. 2019. № 3. С. 57–65. DOI: [10.25750/1995-4301-2019-3-057-065](https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-3-057-065)
14. Феоктистова И.Д. *Оценка состояния почв г. Владимира по наличию азотобактера и санитарному числу* // Сборник избранных статей по материалам научных конференций ГНИИ «Нацразвитие» (Санкт-Петербург, 24–28 февраля 2019 г.). Санкт-Петербург: Изд-во ГНИИ «Нацразвитие», 2019. С. 87–90.
15. Феоктистова И.Д., Сахно О.Н., Журавлева А.Г. Оценка экологического состояния почв урбанизированных территорий, загрязненных нефтепродуктами // *Известия Самарского научного центра РАН*. 2011. Т. 13. № 1 (5). С. 1233–1235.
16. Gueneta B., Juarez S., Bardoux G., Pouteau V., Cheviron N., Marraud C., Abbadie L., Chenu C. Metabolic capacities of microorganisms from a long-term bare fallow // *Applied Soil Ecology*. 2011. V. 51. p. 87–93. DOI: [10.1016/j.apsoil.2011.07.006](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.07.006)
17. Habtewold J.Z., Helgason B.L., Yanni S.F., Janzen H.H., Ellert B.H., Gregorich E.G. Litter composition has stronger influence on the structure of soil fungal than bacterial communities // *European Journal of Soil Biology*. 2020. V. 98. p. 2–9. DOI: [10.1016/j.ejsobi.2020.103190](https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2020.103190)
18. Kour D., Rana K.L., Yadav A.N., Yadav N., Kumar M., Kumar V., Vyas P., Dhaliwal H.S., A.K. Saxena Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020. V. 23. 101487. DOI: [10.1016/j.bcab.2019.101487](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101487)
19. Noar J., Bruno-Barcena J. *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come // *Microbiology*. 2018. V. 164. p. 421–436. DOI: [10.1099/mic.0.0006](https://doi.org/10.1099/mic.0.0006)
20. Pandit A., Adholeya A., Cahill D., Brau L., Kochar M. Microbial biofilms in nature: unlocking their potential for agricultural applications // *Journal of Applied Microbiology*. 2020. V. 129. p. 199–211. DOI: [10.1111/jam.14609](https://doi.org/10.1111/jam.14609)
21. Viscardi S., Ventrino V., Duran P., Maggio A., De Pascale S., Mora M.L., Pepe O. Assessment of plant growth promoting activities and abiotic stress tolerance of *Azotobacter chroococcum* strains for a potential use in sustainable agriculture // *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 2016. V. 16 (3). p. 848–863. DOI: [10.4067/S0718-95162016005000060](https://doi.org/10.4067/S0718-95162016005000060)
22. Wu Y., Kemmitt S., White R.P., Jianming Xu J., Brookes P.C. Carbon dynamics in a 60 year fallowed loamy-sand soil compared to that in a 60 year permanent arable or permanent grassland UK soil // *Plant Soil*. 2012. V. 352. p. 51–63. DOI: [10.1007/s11104-011-0979-4](https://doi.org/10.1007/s11104-011-0979-4)

Поступила в редакцию 01.11.2021

Принята 11.12.2021

Опубликована 16.12.2021

**Сведения об авторах:**

**Данилова Альбина Афанасьевна** – доктор биологических наук, главный научный сотрудник, Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН (р.п. Краснообск, Новосибирская область, Россия); [Danilova7alb@yandex.ru](mailto:Danilova7alb@yandex.ru)

**Петров Алексей Анатольевич** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт прикладной экологии Севера им. профессора Д.Д. Саввинова СВФУ (Якутск, Россия); [Petrov\\_Alexey@mail.ru](mailto:Petrov_Alexey@mail.ru)

*Автор прочитал и одобрил окончательный вариант рукописи.*



Статья доступна по лицензии [Creative Commons Attribution 4.0 License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

**SOIL BIOTEST RESULTS USING AZOTOBACTER BACTERIA: INTERPRETATION PROBLEMS AND POSSIBLE SOLUTIONS**

© 2021 A. A. Danilova <sup>1</sup>, A. A. Petrov <sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the RAS, Krasnoobsk, Novosibirskaya oblast, Russia, E-mail: [Danilova7alb@yandex.ru](mailto:Danilova7alb@yandex.ru)*

<sup>2</sup>*North-Eastern Federal University, Institute of Applied Ecology of the North, Yakutsk, Russia, E-mail: [Petrov\\_Alexey@mail.ru](mailto:Petrov_Alexey@mail.ru)*

**The aim of the study.** *The Azotobacter genus is a well-known bioassay for testing the soil environment quality. A large number of these bacteria is considered as evidence of the ecological well-being of a soil. However, a high number of these microorganisms was found in disturbed ecosystems, which means there is a problem of how to interpret the results of the biotest. Therefore the aim of the study was to clarify the causes of this problem and suggest a possible way to solve it.*

**Location and objects of the study.** *The study was conducted in West Siberia (Russia) in the Priobskoe plateau (54°53'13.5"N, 82°59'36.7"E). Leached chernozem with different content of organic matter (mortmass) was studied under the following treatments: 1) permanent fallow, 2) wheat cultivation, annual removal of straw from the field + summer fallow, 3) wheat + left straw + summer fallow, 4) wheat +left straw + green manure fallow, 5) grassland. The content of N-NO<sub>3</sub>, respectively, was equal to 50, 10, 15, 5, 0 mg/kg. Another object was a site at the mining and processing plant "Denisovsky" in South Yakutia (Russia) (56°46'20.23"N, 124°51'06.95"E). Abandoned for a long time (30 years) after coal mining spoils were studied in two variants: without plants and with well-developed vegetation cover. Total SOC content was 1.8 and 5.7%, N – 0.3 and 0.4 %, respectively.*

**Methodology.** *The direct sowing of single soil aggregates onto the N-free medium containing glucose as C-source was used to cultivate Azotobacter. Glucose (10 mg/g soil) was added to the soil to activate Azotobacter growth. A live culture of bacteria was introduced into the soil at a dose of 1 ml/g to check the viability of Azotobacter in experimental soils.*

**Main results.** *The status of the microbial community in situ was observed on microbial landscapes obtained by exposing slides in the undisturbed soil for 30 days. The overgrowth of soil lumps in the specified range of options was 0–80–40–0–0% and after glucose addition – 100–80–80–0%. The activation of Azotobacter growth after glucose addition was inversely proportional to the C: N ratio (between the mortmass and the mineral nitrogen). Live Azotobacter culture under grassland developed 2.5 times slower in comparison with the fallow. Similar patterns were found in the study of the soils developed on the coal mining spoils. Activation of Azotobacter growth by glucose (response to stress) was more pronounced in soils with apparently less favorable environment for bacteria.*

**Conclusion.** *The reason behind misleading interpretation of Azotobacter biotest results was that the original purpose of the test was to assess fertility of arable soils. This role of the indicator bacterium was previously underestimated. It is known that the arable soil belongs to the category of disturbed ones, and the abundance of Azotobacter may indicate instability in the microbial community of the soil. To expand the capabilities of the biotest, the authors propose to supplement the test with a procedure for evaluating the Azotobacter growth response to experimental stress, e.g. C-substrate addition.*

**Key words:** *Azotobacter; environment assessment; experimental stress; leached chernozem; coal mining spoils; cryolithozone; microbial landscape*

**How to cite:** Danilova A.A., Petrov A.A. Soil biotest results using *Azotobacter* bacteria: interpretation problems and possible solutions // *The Journal of Soils and Environment*. 2021. 4(3). e154. doi: [10.31251/pos.v4i3.154](https://doi.org/10.31251/pos.v4i3.154) (in Russian with English abstract).

## REFERENCES

1. Androkhonov V.A., Kulyapina E.D., Kurachev V.M. *Soils of technogenic landscapes: genesis and evolution*. Novosibirsk: Nauka Publ., 2004, 151 p. (in Russian)
2. Artamonova V.S., Bortnikova S.B. Biogenic soil formation in the territory of a long-term storage of sulfide wastes of gold cyanidation, *Anthropogenic Transformation of Environment*, 2018, No. 4, p. 9–12. (in Russian)
3. Artamonova V.S., Bortnikova S.B. About the development of *Azotobacter chroococcum* Beijerinck in old-age dumps of anthracite, *Theoretical and applied ecology*, 2018, No. 1, p. 60–72. (in Russian)
4. Artamonova V.S., Bortnikova S.B. The status of nitrogen-fixing bacteria in soils of urban forest, *Bulletin of Perm University*, 2016, Vol. 2, p. 150–159. (in Russian)
5. Danilova A.A. *Biodynamics of agricultural soil at various content of organic substance*. Novosibirsk: SFNTsA RAN Publ., 2018, 156 p. (in Russian)
6. Danilova A.A. Respiratory response of living phase to stress as a criterion for assessment of soil condition, *Siberian herald of agricultural science*, 2020, Vol. 50, No. 5, p. 87–93. (in Russian) DOI: [10.26898/0370-8799-2020-5-10](https://doi.org/10.26898/0370-8799-2020-5-10)
7. Danilova A.A., Legostaeva Ja.B., Sivceva N.E., Petrov A.A. Method for assessing the resistance of the soil saprotrophic microbial community by the method of CLPP, *Patent No. 2678876*. 2019. *Bull. No. №3*.
8. *Methods of soil microbiology and biochemistry*. Moscow: Publishing House of MGU, 1980, 223 p. (In Russian)
9. Mishustin E.N., Shilnikova V.K. *Biological fixation of atmospheric nitrogen*. Moscow: Nauka Publ., 1968, 530 p. (in Russian)
10. Odum E. *Fundamentals of ecology*. Moscow: Mir Publ., 1975, 736 p. (in Russian)
11. Svistova L.D., Istomina E.I. Nitrogen-fixing activity of urban soils on the example on different categories of urbanized territory of the city of Voronezh. In book: Biogeochemistry – nauchnaya osnova ustoychivogo razvitiya i sokhraneniya zdorovia cheloveka (Biogeochemistry is the scientific basis for sustainable development and preservation of human health). Works of the XI Intern. biogeochemical school (Tula, June 13-15, 2019). Tula: Publishing House of TGPU named after L.N. Tolstoy, 2019, p. 183–185. (in Russian)
12. Skugoreva S.G., Adamovich T.A., Olkova A.S., Domracheva L.I., Domnina E.A., Zlobin S.S., Izmistieva A.V., Ashikhmina T.Y. Using the methods of bioindication and biological testing in the evaluation of the state of the natural complex in the zone of influence of Kirovo-Chepetsk chemical works, *Vestnik institute biologii Komi nauchnogo tsentra Uralskogo otdeleniya RAN (Bulletin of the Institute of Biology of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the RAS)*, 2012, No. 3, p. 30–37. (in Russian)
13. Skugoreva S.G., Kutyavina T.I., Ogorodnikova S.Yu., Kondakova L.V., Simakova V.S., Blinova A.L., Zykova Yu.N., Domracheva L.I., Ashikhmina T.Ya. Integrated approach to environmental assessment of urban soil, *Theoretical and applied ecology*, 2019, No. 3, p. 57–65. (in Russian) DOI: [10.25750/1995-4301-2019-3-057-065](https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-3-057-065)
14. Feoktistova I.D. Assessment of the state of the soil in the city of Vladimir as per the presence of *Azotobacter* and sanitary index. In book: Collection of selected articles based on the materials of the Sci. Conf. of the GNII “Natsrazvitiye” (St. Petersburg, 24-28 February, 2019). St. Petersburg: Publishing House of GNII “Natsrazvitiye”, 2019, p. 87–90. (in Russian)
15. Feoktistova I.D., Sakhno O.N., Zhuravlyova A.G. Estimation the soils ecological condition at urbanized territories, polluted by oil products, *Izvestiya of the Samara Russian Academy of Sciences scientific center*, 2011, Vol. 13, No. 1 (5), p. 1233–1235. (in Russian)
16. Gueneta B., Juarez S., Bardoux G., Pouteau V., Cheviron N., Marraud C., Abbadie L., Chenu C. Metabolic capacities of microorganisms from a long-term bare fallow, *Applied Soil Ecology*, 2011, Vol. 51, p. 87–93. DOI: [10.1016/j.apsoil.2011.07.006](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.07.006)
17. Habtewold J.Z., Helgason B.L., Yanni S.F., Janzen H.H., Ellert B.H., Gregorich E.G. Litter composition has stronger influence on the structure of soil fungal than bacterial communities, *European Journal of Soil Biology*, 2020, V. 98, p. 2–9. DOI: [10.1016/j.ejsobi.2020.103190](https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2020.103190)
18. Kour D., Rana K.L., Yadav A.N., Yadav N., Kumar M., Kumar V., Vyas P., Dhaliwal H.S., Anil Kumar A.K. Saxena Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020. V. 23. 101487. DOI: [10.1016/j.bcab.2019.101487](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101487)
19. Noar J., Bruno-Barcena J. *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come, *Microbiology*, 2018, Vol. 164, p. 421–436. DOI: [10.1099/mic.0.0006](https://doi.org/10.1099/mic.0.0006)
20. Pandit A., Adholeya A., Cahill D., Brau L., Kochar M. Microbial biofilms in nature: unlocking their potential for agricultural applications, *Journal of Applied Microbiology*, 2020, Vol. 129, p. 199–211. DOI: [10.1111/jam.14609](https://doi.org/10.1111/jam.14609)
21. Viscardi S., Ventrino V., Duran P., Maggio A., De Pascale S., Mora M.L., Pepe O. Assessment of plant growth promoting activities and abiotic stress tolerance of *Azotobacter chroococcum* strains for a potential use in sustainable agriculture, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2016, Vol. 16 (3), p. 848–863. DOI: [10.4067/S0718-95162016005000060](https://doi.org/10.4067/S0718-95162016005000060)

22. Wu Y., Kemmitt S., White R.P., Jianming Xu J., Brookes P.C. Carbon dynamics in a 60 year fallowed loamy-sand soil compared to that in a 60 year permanent arable or permanent grassland UK soil, *Plant Soil*, 2012, Vol. 352, p. 51–63. DOI: [10.1007/s11104-011-0979-4](https://doi.org/10.1007/s11104-011-0979-4)

*Received 01 November 2021*

*Accepted 12 November 2021*

*Published 16 December 2021*

**Danilova Albina A.** – Doctor of Biological Sciences, Principal Researcher in the Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences (Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russia); [Danilova7alb@yandex.ru](mailto:Danilova7alb@yandex.ru)

**Petrov Alexey A.** – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher in the North-Eastern Federal University, Institute of Applied Ecology of the North (Yakutsk, Russia); [Petrov\\_Alexey@mail.ru](mailto:Petrov_Alexey@mail.ru)

*The authors read and approved the final manuscript*



The article is available under [Creative Commons Attribution 4.0 License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)