

Агрочвоведение и агроэкология

УДК 576.851.13: 631.411: 635.13

DOI: 10.31857/S2500262721040116

**ОТЗЫВЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕНЕНИЕ
АЗОТФИКСРУЮЩЕЙ БАКТЕРИИ В РАЗЛИЧНЫХ ПОЧВЕННЫХ УСЛОВИЯХ*****В.П. Шабаяев**, доктор биологических наук*Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
142290, Пушкино, Московская обл., ул. Институтская, 2
E-mail: VPSH@rambler.ru*

*Изучено влияние стимулирующей рост растений азотфиксирующей бактерии *Pseudomonas putida* 23 на урожай свеклы столовой в двухлетних микрополевых опытах (в сосудах без дна в естественных условиях) на почвах и специально приготовленных почвенных смесях с различной азотфиксирующей активностью. Исследования проводили при внесении NPK-удобрений. Активность азотфиксации определяли ацетиленовым методом. В вегетационном опыте изучена приживаемость устойчивого к антибиотикам штамма бактерии в ризоплане и ризосфере растений. Внесение бактерии увеличило урожай в почвенных условиях с минимальными в опыте значениями активности азотфиксации при высокой приживаемости бактерии. Применение бактерии было неэффективным на почвах и смесях с максимальными в опыте значениями азотфиксации при низкой приживаемости бактерии. Максимальные в опыте урожаи отмечены на почвах и смесях с максимальными значениями азотфиксирующей активности, на которых внесение бактерии не приводило к их увеличению. Применение бактерии на почвах и смесях с минимальными значениями активности азотфиксации, несмотря на рост величины этого показателя, не приводило к повышению урожая до максимального уровня. Вероятно, лимитирующими факторами в этом случае выступали другие показатели почвенного плодородия. Для прогноза эффективности внесения азотфиксирующих бактерий и стимуляции роста растений в различных почвенных условиях предложен почвенный тест – активность азотфиксации.*

**RESPONSIVENESS OF PLANTS TO APPLICATION OF N₂-FIXING
BACTERIUM IN VARIOUS SOIL CONDITIONS****Shabayev V.P.***Institute of Physicochemical and Biological Problems of Soil Science, Russian Academy of Sciences,
142290, Pushchino, Moskovskaya obl., ul. Institutskaya, 2
E-mail: VPSH@rambler.ru*

*The effect of N₂-fixing bacterium *Pseudomonas putida* 23 promoting growth of red beet plants on the yield in 2-year microfield experiments (in pots without bottom in a natural conditions) on soils and specially prepared soil mixtures with various N₂-fixing activity was examined. Plants were grown with NPK fertilization. N₂-fixing activity was determined by acetylene reduction assay. In pot experiment, the survival of bacterium in the rhizoplane and rhizosphere of plants were studied under using an antibiotics-resistant strain of bacterium. Application of bacterium increased yield in soil conditions with minimum values of N₂-fixing activity and with a high survival rate of bacterium. Application of bacterium was ineffective on soil and mixtures with the maximum values of N₂ fixation at a low bacterial survival rate. Maximum yields were obtained when plants were grown on soils and mixtures with maximum values of N₂ fixation, where application of bacterium did not lead to increase in the yield. Application of bacterium on soils and mixtures with minimum values of N₂-fixing activity, despite the increase in this index, did not lead to increase in yield to maximum level. Probably, herewith other indices of soil fertility were the limiting factors in increasing yield. A soil test is proposed – the activity of N₂ fixation to predict the effectiveness of application of N₂-fixing bacteria and plant growth promotion in various soil conditions.*

Ключевые слова: *Pseudomonas*, почвы и почвенные смеси, свекла столовая (*Beta vulgaris* L.), ацетиленовый метод

Key words: *Pseudomonas*, soils and soil mixtures, red beet (*Beta vulgaris*, L.), acetylene reduction assay

В последние годы проведены многочисленные исследования по применению стимулирующих рост растений ризосферных бактерий (plant growth-promoting rhizobacteria), в том числе принадлежащих к флуоресцирующим бактериям рода *Pseudomonas* [1, 2, 3], с целью повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. В ряде работ установлена высокая эффективность их использования, которая обусловлена высокой конкурентоспособностью таких бактерий с аборигенной почвенной микрофлорой, а также их приживаемостью в ризоплане и ризосфере растений [4]. Среди представителей бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из ризосферы различных растений [1, 5] и эндосферы риса [5], выявлены штам-

мы, обладающие способностью фиксировать атмосферный азот. Установлено, что ростстимулирующая активность и отзывчивость (увеличение массы) растений при использовании бактерий рода *Pseudomonas* значительно различались на разных почвах [4]. При этом в некоторых публикациях, наряду со значительной стимуляцией роста растений и увеличением урожая сельскохозяйственных культур, отмечается отсутствие или даже негативный эффект от применения различных полезных (beneficial) микроорганизмов. Во многом это обусловлено тем, что бактериальные препараты применяли без учета свойств почв [6]. Существенным фактором различной отзывчивости растений была колонизация ростстимулирующими

*Работа выполнена в рамках Госзадания «Физико-химические и биогеохимические процессы в антропогенно измененных почвах» (ААА-А-А18-118013190180-9 от 31.01.2018 г.).

ризосферными бактериями рода *Pseudomonas* ризоплана и ризосферы [4]. Определяющими и оказывающими значительное влияние на колонизацию интродуцированными ростстимулирующими бактериями *P. fluorescens* и *P. putida* ризоплана и ризосферы, а также на отзывчивость растений на бактеризацию факторами выступали влажность и тип почвы, вид и сорт растений, корневые экссудаты и др. [4]. Так, при установлении на корнях растений популяции флуоресцирующих псевдомонад большее влияние оказывали свойства почвы, а не вид растений [7]. Для успешного применения микроорганизмов-стимуляторов роста, сопровождающегося увеличением урожая, необходимо исследовать эффективность их использования на различных почвах. На сегодняшний день информации о влиянии ростстимулирующих ризосферных бактерий рода *Pseudomonas*, обладающих способностью фиксировать атмосферный азот, на урожай сельскохозяйственных культур и о колонизации внесенными бактериями ризоплана и ризосферы растений, выращиваемых на различных почвах, недостаточно.

Цель работы – изучение влияния стимулирующей рост растений свеклы столовой ризосферной бактерии *P. putida* 23, фиксирующей атмосферный азот, на приживаемость в ризоплане и ризосфере растений, а также урожай на различных почвах и специально приготовленных почвенных смесях, отличающихся активностью азотфиксации.

Методика. Исследования проводили при выращивании свеклы столовой (*Beta vulgaris*, L.) сорта Бордо на различных почвах и почвенных смесях в двухлетних микрополевых и в вегетационном опыте. В экспериментах использовали 0...20 см слой агродерново-подзолистой и агросерой почв, аллювиальной агротемно-гумусовой почвы центральной части поймы р. Ока (юг Московской обл.), смесь агросерой почвы и речного песка (1:1) и аллювиальную агротемно-гумусовую почву с внесением перепревшего навоза (200 г/сосуд). Отличительная особенность заключалась в том, что почвы аналогичных типов для обоих опытов были отобраны в разные годы с участков с различным местоположением. Перед посевом растений определяли активность азотфиксации почв и смесей ацетиленовым методом при внесении глюкозы из расчета 2 % от массы почвы и ее инкубации при 60 % ПВ и 28 °С в течение 24 ч [8]. В опытах использовали культуру бактерии *P. putida* 23, обладающую азотфиксирующей активностью – 8 нМ С₂Н₄/мг белка/мин. Бактерия в чистой и смешанных культурах стимулировала рост и увеличивала массу зерновых, бобовых и корнеплодных культур, том числе свеклы столовой [9].

Исследования проводили в сетчатом вегетационном павильоне Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН.

Микрополевые опыты 1 и 2 выполняли в течение двух вегетационных периодов на почвах и специально приготовленных для каждого опыта почвенных смесях. В сосуды без дна размерами 0,33 м × 0,33 м × 0,33 м, вкопанные в верхний слой почвы и содержащие по 36 кг почв или почвенных смесей помещали по 4 растения. В обоих опытах в верхний 0...15 см слой вносили азотное удобрение в виде азотнокислого аммония в дозе 1,2 г N/сосуд (12 г N/м²) на фоне фосфорного и калийного удобрений соответственно в виде двухзамещенного фосфорнокислого калия и сернокислого калия в дозах по 1,2 г действующего вещества/сосуд (12 г д.в./м²). Кроме того, в обоих опытах

аллювиальную агротемно-гумусовую почву вносили перепревший навоз в дозе 200 г/сосуд (2 кг/м²). Пророщенные и стерилизованные 10 %-ным раствором гипохлорита натрия семена при посеве инокулировали суспензией клеток бактерии из расчета 10⁸ колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 растение. Аналогичным образом в вариантах без инокуляции применяли адекватные количества суспензии автоклавированных бактериальных клеток. Растения находились под открытым небом при естественном увлажнении, поддерживая влажность почвы в сосудах на уровне не ниже 60 % ПВ дополнительными поливами. Повторность опытов 5-кратная. После уборки корнеплоды и надземную массу (ботву) высушивали и взвешивали.

Вегетационный опыт проводили в сосудах, содержащих по 1 кг почв и почвенных смесей, использованных в микрополевом опыте 2. Выращивали по 2 растения свеклы столовой в течение 8 недель. Для определения колонизации бактерией *P. putida* 23 корней растений и выживания бактерии в ризосфере семена инокулировали мутантным штаммом, устойчивым к антибиотикам рифампицину и канамицину (минимальная ингибирующая концентрация > 200 мкг/мл). Повторность опыта 15-кратная. В динамике через 4, 6 и 8 недель в 5-и повторностях опыта определяли численность интродуцированной бактерии в ризоплане и ризосфере растений [8] с применением среды Кинга Б для флуоресцирующих псевдомонад с добавлением рифампицина и канамицина по 200 мкг/мл среды.

Результаты и обсуждение. Почвы и почвенные смеси резко отличались по активности азотфиксации – ацетиленредукции (табл. 1). Минимальной в опыте активностью азотфиксации среди почв и смесей обоих микрополевых опытов отличалась агросерая почва, в том числе разбавленная песком – 11...35 мг С₂Н₄ × 10⁻²/кг почвы/ч. Агродерново-подзолистая и аллювиальная агротемно-гумусовая почва с внесением навоза в опыте 1 характеризовались наибольшей активностью азотфиксации – 292 и 374 мг С₂Н₄ × 10⁻²/кг почвы/ч соответственно. Азотфиксирующая активность аллювиальной агротемно-гумусовой почвы в опыте 1 была

Табл. 1. Активность азотфиксации* почв и почвенных смесей

Опыт	Почва, почвенная смесь	мг С ₂ Н ₄ /кг почвы/ч × 10 ⁻²
Микрополевой 1	Агродерново-подзолистая почва	292 ± 33
	Агросерая почва + песок	11 ± 2
	Агросерая почва	14 ± 3
	Аллювиальная агротемно-гумусовая почва	51 ± 9
	Аллювиальная агротемно-гумусовая почва + навоз	374 ± 53
Микрополевой 2, вегетационный	Агродерново-подзолистая почва	43 ± 8
	Агросерая почва + песок	21 ± 4
	Агросерая почва	35 ± 4
	Аллювиальная агротемно-гумусовая почва	260 ± 52
	Аллювиальная агротемно-гумусовая почва + навоз	338 ± 61

*среднее из пяти определений ±ошибка средней.

Табл. 2. Численность бактерий* *P. putida* 23 в ризоплане (числитель) и ризосфере (знаменатель) в вегетационном опыте, КОЕ/г корней/почвы × 10⁵

Почва, почвенная смесь	Срок измерения, сут		
	28	41	51
Агродерново- подзолистая	82,3 ± 12,5	7,0 ± 1,5	3,5 ± 0,9
	21,1 ± 5,2	11,1 ± 1,8	7,5 ± 2,5
Агросерая + песок	53,2 ± 9,4	6,0 ± 1,3	2,4 ± 0,7
	5,9 ± 1,1	8,8 ± 0,9	1,7 ± 0,5
Агросерая	12,1 ± 2,1	18,0 ± 3,1	1,0 ± 0,2
	6,1 ± 0,9	0,8 ± 0,3	1,2 ± 0,4
Аллювиальная агроотемно-гумусовая	32,2 ± 6,3	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1
	0,5 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,2
Аллювиальная агроотемно-гумусовая + навоз	8,1 ± 1,1	5,1 ± 1,2	0,8 ± 0,2
	3,4 ± 1,2	6,4 ± 1,3	1,4 ± 0,4

*среднее из пяти определений ± ошибка средней.

примерно в 4 раза больше, чем у агросерой, в том числе модифицированной песком. Внесение навоза увеличивало активность азотфиксации аллювиальной агроотемно-гумусовой почвы в этом опыте почти на порядок, доводя ее до уровня агродерново-подзолистой почвы. Активность азотфиксации аллювиальной агроотемно-гумусовой почвы в микрополевым опыте 2 была максимальной, более чем в 5 раз превышала величину этого показателя у аналогичной почвы микрополевого опыта 1 и практически не изменялась при внесении навоза. Минимальные величины этого показателя во втором опыте были зафиксированы для агросерой почвы, в том числе разбавленной песком, и агродерново-подзолистой почвы, азотфиксирующая активность которой в опыте 2, была почти в 7 раз меньше, чем в опыте 1.

Численность меченной по устойчивости к антибиотикам бактерии *P. putida* 23 в ризоплане и ризосфере растений в динамике в процессе их роста в вегетационном опыте зависела от почвенных условий и продолжительности роста свеклы (табл. 2). В среднем за вегетационный период бактерия в наибольшей степени колонизировала корневую систему растений в агродерново-подзолистой и агросерой почвах, в наименьшей – в аллювиальной агроотемно-гумусовой почве, удобренной навозом. Максимальная в опыте численность интродуцированной бактерии в ризоплане для большинства почвенных разновидностей отмечена в первый срок определения, через 28 суток роста растений. Наибольшее количество бактерий на корнях в этот срок было зафиксировано на агродерново-подзолистой и агросерой почвах – 82 × 10⁵ и 53 × 10⁵ КОЕ/г корней соответственно и несколько меньше – 32 × 10⁵ КОЕ на аллювиальной агроотемно-гумусовой почве. На аллювиальной агроотемно-гумусовой почве с внесением навоза и агросерой почве величина этого показателя была минимальной в опыте. После 41 и 57 суток роста количество бактериальных клеток в ризоплане заметно уменьшилось, за исключением аллювиальной агроотемно-гумусовой почвы, и находилось в пределах 0,2...3,5 × 10⁵ КОЕ в конце опыта. В среднем за период наблюдений численность бактерий в ризосфере растений на агродерново-подзолистой почве была на самом высоком в эксперименте уровне, на аллювиальной агроотемно-гумусовой почве – на минимальном в опыте. Максимальное в условиях эксперимента количество бактериальных клеток в ризосфере, как и в ризоплане, для большинства поч-

венных разновидностей отмечено в первый (после 28 суток роста) срок определений и составляло на агродерново-подзолистой почве 21,1 × 10⁵ КОЕ почвы. На агросерой почве без внесения и с внесением песка и аллювиальной агроотемно-гумусовой почве с внесением навоза величина этого показателя варьировала в пределах 3,4...6,1 × 10⁵, а минимальной в опыте она была на аллювиальной агроотемно-гумусовой почве без внесения навоза. После 41 и 57 сут опыта (во второй и третий срок определений соответственно) установлено значительное уменьшение числа бактериальных клеток в ризосфере растений для большинства почвенных разновидностей, кроме агросерой почвы и аллювиальной агроотемно-гумусовой почвы с навозом. Аналогичные закономерности по динамике численности генетически модифицированного и исходного штамма бактерии *P. fluorescens* в ризоплане и ризосфере выявлены при выращивании кукурузы на песчаной и глинистой почвах [10].

В микрополевым опыте 1 максимальный урожай свеклы столовой, включая корнеплоды, без внесения бактерии *P. putida* 23 зафиксирован на агродерново-подзолистой почве и аллювиальной агроотемно-гумусовой почве, удобренной навозом (табл. 3), которые характеризовались наибольшей азотфиксирующей активностью (см. табл. 2). Наименьший урожай без бактерий в этом опыте отмечен на агросерой почве, модифицированной песком, имевшей минимальную азотфиксирующую активность. Повышение урожая растений до максимального уровня в опыте 1 при вне-

Табл. 3. Урожай свеклы столовой в микрополевых опытах

Опыт	Почва, почвенная смесь	Вариант	Сухая масса, г/сосуд	
			корне-плоды	целое растение
1	Агродерново-подзолистая	Без инокуляции	170	229
		<i>P. putida</i> 23	162	236
	Агросерая + песок	Без инокуляции	91	137
		<i>P. putida</i> 23	107	172
	Агросерая	Без инокуляции	109	152
		<i>P. putida</i> 23	138	198
Аллювиальная агроотемно-гумусовая	Без инокуляции	114	158	
	<i>P. putida</i> 23	150	215	
Аллювиальная агроотемно-гумусовая + навоз	Без инокуляции	153	208	
	<i>P. putida</i> 23	163	228	
		<i>HCP</i> ₀₅	15	30
2.	Агродерново-подзолистая	Без инокуляции	59	94
		<i>P. putida</i> 23	85	126
	Агросерая + песок	Без инокуляции	83	112
		<i>P. putida</i> 23	81	126
	Агросерая	Без инокуляции	87	124
		<i>P. putida</i> 23	98	145
	Аллювиальная агроотемно-гумусовая	Без инокуляции	129	167
		<i>P. putida</i> 23	118	176
	Аллювиальная агроотемно-гумусовая + навоз	Без инокуляции	128	173
<i>P. putida</i> 23		127	189	
		<i>HCP</i> ₀₅	11	13

сении навоза в аллювиальную агротемно-гумусовую почву, имевшую невысокую азотфиксирующую активность, было обусловлено ростом величины этого показателя более чем в 7 раз (см. табл. 1). В микрополевым опыте 2 без инокуляции бактерией максимальный урожай свеклы столовой также был сформирован на имеющей максимальную азотфиксирующую активность аллювиальной агротемно-гумусовой почве, в том числе с внесением навоза. Минимальные урожаи неинокулированных растений в этом опыте установлены на агродерново-подзолистой почве и агросерой почве, в том числе модифицированной песком, с самой низкой активностью азотфиксации. Таким образом, азотфиксирующая активность почвы выступала определяющим фактором в формировании максимального урожая.

Отзывчивость растений на внесение азотфиксирующей бактерии *P. putida* 23 также зависела от почвенных условий и имела место на агросерой почве, в том числе модифицированной песком, в обоих микрополевых опытах, а также на агродерново-подзолистой почве в микрополевым опыте 2 (см. табл. 3), имевших низкую азотфиксирующую активность (см. табл. 1). Прибавки урожая при использовании бактерии были установлены только на этих почвах и смесях, которые к тому же характеризовались максимальной в опытах приживаемостью бактерии в ризоплане и ризосфере (см. табл. 2). Внесение бактерии было неэффективным и не приводило к увеличению урожаев в почвенных условиях с высокими (максимальными в опыте) величинами азотфиксации. В этих вариантах бактерия отличалась низкой (минимальной в опыте) приживаемостью в ризоплане и ризосфере, что, вероятно, связано с конкуренцией с аборигенной микрофлорой почвы. Кроме того, использование бактерии на почвах и почвенных смесях, характеризующихся низкой азотфиксирующей активностью, не обеспечивало увеличение урожая до максимального уровня, несмотря на значительное усиление активности азотфиксации. Вероятно, лимитирующим фактором в повышении массы растений до максимального уровня выступал уровень других показателей плодородия этих почв и почвенных смесей. Использование бактерии на аллювиальной агротемно-гумусовой почве в микрополевым опыте 1, усиливая азотфиксирующую активность, увеличило урожай, в том числе корнеплодов, до максимального уровня, как и внесение навоза на аллювиальной агротемно-гумусовой почве без бактерии.

Таким образом, урожайность свеклы столовой и эффективность применения стимулирующей рост растений азотфиксирующей бактерии *P. putida* 23 на фоне внесения НРК-удобрений зависели от почвенных условий. Максимальные в опытах урожаи без применения бактерии отмечены на почвах и почвенных смесях с наибольшей азотфиксирующей активностью. Внесение бактерии на почвах и почвенных смесях с минимальными величинами активности азотфиксации и высокой приживаемостью бактерии в ризоплане и ризосфере, повышало урожай растений в этих почвенных условиях. Внесение бактерии не оказывало влияния на урожай на почвах и почвенных смесях с максималь-

ной в опытах азотфиксирующей активностью и низкой приживаемостью бактерии в ризоплане и ризосфере. Прибавки урожая, полученные при использовании бактерии на почвах и почвенных смесях с минимальной азотфиксирующей активностью, не увеличивали урожай до максимального уровня.

Определение активности азотфиксации ацетиленовым методом может быть рекомендовано для прогноза эффективности применения испытанной бактерии для стимуляции роста растений при их выращивании на различных почвах.

Литература.

1. *Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture* / G. Gupta, S.S. Parihar, N.K. Ahirwar, et al. // *Journal of Microbial and Biochemical Technology*. 2015. Vol. 7 (2). P. 96–102. doi: 10.4172/1948-5948.1000188.
2. Dorjey S., Dolkar D., Sharma R. *Plant growth promoting rhizobacteria Pseudomonas: A review* // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2017. Vol. 6 (7). P. 1335–1344. doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.607.160>.
3. *Ризосферные бактерии рода Pseudomonas в современных агробиотехнологиях* / Т.О. Анохина, Т.В. Сиунова, О.И. Сизова и др. // *Агрохимия*. 2018. № 10. С. 54–66. doi: 10.1134/S0002188118100034.
4. Kloepper J.W., Schroth M.N., Miller T.D. *Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield* // *Phytopathology*. 1980. Vol. 70. P. 1078–1082. doi: 10.1094/Phyto-70-1078.
5. *The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte Pseudomonas stutzeri A15* / T.K. Van Pham, H. Rediers, M.G.K. Ghequire, et al. // *Archives of Microbiology*. 2017. Vol. 199 (3). P. 513–517. doi: 10.1007/s00203-016-1332-3.
6. *Beneficial microbes for sustainable agriculture* / A.K. Chandel, H. Chen, H.Ch. Sharma, et al. // *Microbes for sustainable development and bioremediation. Chapter 15* / Eds Chandra R., Solti R.C. Boca Raton: CRC Press, 2019. 386 pp. <https://doi.org/10.1201/9780429275876>
7. *The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type* / X. Latour, T. Corberand, G. Laguerre, et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. 1996. Vol. 62 (7). P. 2449–2456. doi: 10.1128/AEM.62.7.2449-2456.1996.
8. *Методы почвенной микробиологии и биохимии* / под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1991. 303 с.
9. Шабаяев В.П. *Микробиологическая азотфиксация и рост растений при внесении ризосферных микроорганизмов и минеральных удобрений* // *Почвенные процессы и пространственно-временная организация почв*. М.: Наука, 2006. С. 195–211.
10. *Survival of genetically modified Pseudomonas fluorescens introduced into subtropical soil microcosms* / M.A.V. Araujo, L.C. Mendonça-Hagier, A. Hagier, et al. // *FEMS Microbiology Ecology*. 1994. Vol. 13 (3). P. 205–216. doi: 10.1111/j.1574-6941.1994.tb00067.x.

Поступила в редакцию 24.03.2021

После доработки 19.04.2021

Принята к публикации 27.06.2021