

РОЛЬ ИНТРОДУЦИРУЕМЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АССОЦИАЦИЙ В РИЗОЦЕНОЗЕ ПШЕНИЦЫ НА ПОЧВЕ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ Zn

Т.М. НАЗАРОВА, В.Ф. ВОЛОБУЕВА

(Кафедра микробиологии)

Приведены результаты изучения влияния цинка на рост, урожай и качество зерна (содержание сырого протеина) пшеницы в условиях лабораторных и вегетационных опытов. Выявлена способность бактериальных ассоциаций снижать ингибирующий эффект цинка на растения пшеницы при их интродукции в ризосферу.

С каждым годом выброс промышленных отходов в окружающую среду все более возрастает. Одним из наиболее опасных загрязнителей агроландшафтов являются тяжелые металлы, в частности цинк.

В микродозах цинк необходим живым организмам, его недостаток может вызвать снижение продуктивности сельскохозяйственных растений [1]. Однако избыток этого элемента вызывает дисбаланс компонентов питания в растениях и отрицательно влияет на синтез и функции ферментов, витаминов, гормонов [8]. По степени токсичности для теплокровных цинк относится к первому классу опасности [1].

Содержание цинка в растениях, токсичное для их развития, колеблется в широких пределах. По данным Ю.В.Алексеева [1], снижение продуктивности сельскохозяйственных растений на 10% наступает при содержании в них 290 мг/кг почвы цинка. По Н.С.Петрушиной [6] токсичная для кукурузы и овса концентрация цинка составляет 1700-7500 мг/кг почвы.

Биоиндикаторами состояния системы «почва-растение» служат микроорганизмы, являющиеся показа-

тельными объектами загрязнения почв тяжелыми металлами [9].

Еще в 1945 г. известный русский ученый Н.А.Красильников писал, что «подавить или полностью устранить вредную микрофлору из зоны корней и заменить ее полезными формами бактерий и грибов — дело первостепенной важности» [4]. Ризобактерии первыми колонизируют прорастающие корни, в то время как другие проявляют активность на более поздних этапах вегетации [3, 10]. Интродукция микроорганизмов позволяет регулировать общее состояние ризосферной микробиоты, создает возможность замены одних популяций на другие и, возможно, улучшает условия развития микроорганизмов за счет повышения их природного потенциала. С таких позиций использование мультиинокулюмов, к которым относятся и ризосферные бактериальные ассоциации, может быть весьма перспективным приемом, повышающим биоразнообразие ризосферного комплекса и их активность.

В условиях повышенного загрязнения тяжелыми металлами и нарушения функционирования микробной системы почв необходимо макси-

мально повысить микробный потенциал почвы и ризосферы и выявить наиболее эффективные ризосферные ассоциации для сельскохозяйственных культур, обеспечивающие биоконтроль.

Взаимодействие тяжелых металлов с микроорганизмами рассматривается в разных аспектах, связанных с изменениями физиолого-биохимических, генетических и других особенностей микроорганизмов. Так, при изучении аккумуляции тяжелых металлов микроорганизмами в условиях чистой культуры установлены способы проникновения и места локализации этих элементов в клетках, связь с физиологическими характеристиками культуры и внешними условиями накопления металлов микроорганизмами [2, 5]. В качестве механизмов, обеспечивающих устойчивость микроорганизмов к тяжелым металлам, отмечают биотрансформацию и частичную детоксикацию некоторых из них [2].

Обеспечение функционирования растений за счет использования естественных помощников — почвенных и ризосферных бактерий как интегральных показателей функциональных свойств почвы и растений, несомненно, перспективное направление, цель которого — не только моделирование взаимодействия растения с микробными ассоциациями в ризосфере, но и поиск и практическое применение наиболее эффективных бактериальных ассоциантов с полифункциональными свойствами, которые должны обеспечить растениям реализацию их потенциальной продуктивности и микробиологический биоконтроль в ризосфере.

Методика

Исследования проводили в 2000–2001 гг. на кафедрах микробиологии и агрономической и биологической

химии МСХА им. К.А.Тимирязева. Влияние Zn на рост, урожай и качество урожая (содержание сырого протеина) пшеницы при инокуляции семян бактериальными ассоциациями исследовали в условиях лабораторных и вегетационных опытов. Опытная культура — яровая пшеница, сорт Иволга. За 2 ч до постановки опытов семена инокулировали 48-часовыми культурами микроорганизмов (титр 10^7 – 10^8 клеток/мл). Обеззараживание (стерилизацию) семян проводили нейтральным анолитом с содержанием активного хлора 0,05%. Инокуляцию семян проводили чистой культурой *Azotobacter chroococcum* (контроль) и бактериальными ассоциациями № 6, № 23 и № 25, выделенными из ризоценозов дикорастущего тропического растения *Sesbania*. Ассоциации характеризуются высокой нитрогеназной активностью (до 73 нмоль C_2H_4 /мл среды в сутки), стабильностью доминирования составляющих популяций (pp. *Pseudomonas* и *Bacillus*) и их соотношения в ассоциациях. Для определения роли инокуляции семена замачивали в стерильной воде (контроль). Опыты проводили в 4-кратной повторности. Цинк вносили в виде $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ с учетом ориентировочно-допустимых концентраций (ОДК) в зависимости от pH и гранулометрического состава почвы. Вносимые дозы цинка были кратны ОДК.

В лабораторных опытах использовали метод рулонов [7]. Фосфор вносили в виде $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$ из расчета 40 мг/л (фон 1) и 70 мг/л (фон 2). Растения выращивали в световой камере с дневной температурой 25°C (16 ч в сутки) и ночной 20°C (8 ч в сутки). На 10-й день опыта измеряли длину растений и корней.

Вегетационные опыты были заложены в почвенной культуре на базе

вегетационного домика кафедры агрономической и биологической химии МСХА им. К.А.Тимирязева. Почва опытов — дерново-подзолистая среднесуглинистая, ее агрохимическая характеристика: содержание гумуса (по Тюрину) — 2,1%, $pH_{\text{сол}}$ — 5,7, N_g — 1,35 мг-экв/100 г, S — 22,6 мг-экв/100 г, T — 24 мг-экв/100 г, V — 94%, содержание подвижных форм (по Кирсанову) P_{20_5} — 87 мг/кг и K_2O — 295 мг/кг, содержание подвижного Zn , извлекаемого 1 н. HCl — 38 мг/кг. Опыты закладывали в соответствии с общепринятыми методиками. НПК в опыте без инокуляции вносили из расчета 0,15; 0,10; 0,10 г/кг почвы по фону 1; по фону 2 вносили полуторную дозу фосфора. В опытах с инокуляцией ассоциациями diaзотрофов дозу азота снизили до 1/3 от полной. Чтобы вычленить роль инокуляции был поставлен опыт с дозой азота 1/3 от полной. Азот вносили в форме NH_4NO_3 , фосфор — $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$, калий — KNO_3 (в связи с высоким его содержанием в почве введен коэффициент 0,7). Учет урожая проводили при достижении растениями биологичес-

кой спелости. О содержании сырого протеина судили по количеству общего азота в растениях, определенному методом Кьельдаля.

Математическую обработку данных проводили методом дисперсионного анализа на ЭВМ.

Результаты

Результаты лабораторных опытов (табл. 1) свидетельствуют о значительном влиянии цинка на развитие растений пшеницы. Однако уменьшить негативное влияние цинка можно инокуляцией семян бактериальной суспензией микроорганизмов.

В наших исследованиях инокуляция семян пшеницы diaзотрофами достоверно увеличивала длину растений и корней. По сравнению с контролем длина растений увеличивалась в среднем в 1,2-1,3 раза, длина корней в среднем в 1,2 раза. Такая же закономерность отмечается при внесении фосфора в водный раствор. При этом длина растений и длина корней по всем вариантам с внесением фосфора в дозе 70 мг/л была выше, чем в контроле и по фону 1.

Т а б л и ц а 1

Влияние Zn (мг/л) на развитие растений пшеницы в разных вариантах инокуляции семян

Вариант инокуляции	Вариант опыта							НСР ₀₅
	0	фон 1	фон 2	фон 1 + 27,5	фон 1 + 220	фон 2 + 27,5	фон 2 + 220	
Без инокуляции	<u>7.5</u>	<u>9.9</u>	<u>11.2</u>	<u>7.6</u>	<u>6.8</u>	<u>8.9</u>	<u>7.7</u>	<u>0.8</u>
	6,4	8,2	10,0	4,5	3,5	5,6	2,5	0,5
Az. chroococcum	<u>8.4</u>	<u>12.5</u>	<u>13.6</u>	<u>9.2</u>	<u>8.2</u>	<u>10.6</u>	<u>9.6</u>	<u>0.9</u>
	7,2	9,7	11,2	6,0	4,5	7,1	5,2	0,6
Ассоциация № 6	<u>8.1</u>	<u>11.8</u>	<u>12.7</u>	<u>9.8</u>	<u>7.6</u>	<u>10.0</u>	<u>8.5</u>	<u>0.8</u>
	6,8	8,6	9,8	5,9	4,2	6,6	4,6	0,6
Ассоциация № 23	<u>9.0</u>	<u>13.5</u>	<u>14.2</u>	<u>11.2</u>	<u>9.2</u>	<u>12.1</u>	<u>10.1</u>	<u>0.9</u>
	7,6	12,2	13,1	7,1	4,8	7,6	5,6	0,5
Ассоциация № 25	<u>8.6</u>	<u>12.8</u>	<u>13.8</u>	<u>10.9</u>	<u>8.7</u>	<u>11.1</u>	<u>9.1</u>	<u>1.0</u>
	7,3	10,1	11,4	6,2	4,4	7,0	4,8	0,6

Примечание. В числителе — длина растений, см, в знаменателе — длина корней, см.

Наибольшее увеличение длины растений и корней отмечается при инокуляции семян ассоциацией бактерий № 23 в варианте с внесением фосфора в дозе 40 мг/л соответственно в 1,4 и 1,5 раза. При повышении дозы фосфора до 70 мг/л данные показатели увеличивались лишь в 1,3 раза.

Цинк независимо от фона тормозит развитие растений пшеницы во всех вариантах. Растения пшеницы без инокуляции в одинаковой степени ингибируются Zn по фону 1 и 2. Длина растений уменьшается с увеличением дозы Zn в 1,3-1,5 раза, а длина корней — в 1,8-2,3 раза. При инокуляции семян в среднем развитие растений выше в 1,2 раза, чем в варианте без инокуляции. Наибольший эффект на начальный рост пшеницы оказывает ассоциация бактерий № 23 по сравнению с *Azotobacter chroococcum* и ассоциациями № 6 и № 25. В целом влияние инокуляции семян бактериальной суспензией азотфиксирующих микроорганизмов на снижение токсического действия Zn можно расположить в следующий ряд: ассоциация № 23 > ассоциация № 25 > *Az. chroococcum* > ассоциация № 6.

Важным показателем продуктивности сельскохозяйственных культур является урожай. В настоящее время накоплен достаточно большой материал по вопросу продуктивности сельскохозяйственных растений в зависимости от уровня минерального питания. Практическое значение имеют исследования по изучению действия тяжелых металлов на урожай и показатели качества сельскохозяйственной продукции (содержание белка, сахаров, углеводов).

Анализ результатов показал, что урожай пшеницы зависит от применяемых доз цинка и уровня минерального питания. Цинк в дозе 110 мг/кг

почвы в опыте без инокуляции снижал урожай по фону 1 на 7,3%, по фону 2 — на 4,0% по сравнению с контролем. С увеличением дозы цинка до 220 мг/кг почвы урожай при оптимальном фосфорном питании снижался на 10,9% к контролю, в то время как при полуторной дозе фосфора — на 8,0%. Следовательно, более высокая обеспеченность растений пшеницы фосфором снизила токсическое действие цинка (табл. 2).

Характер влияния разных доз цинка на урожай и содержание сырого протеина в зерне яровой пшеницы, инокулированной различными диазотрофами, представлен в табл. 3.

Т а б л и ц а 2
Влияние цинка на урожай и содержание сырого протеина в зерне яровой пшеницы (вариант без инокуляции)

Доза Zn, мг/кг почвы	Уро- жай, г/сосуд	Содержание сырого протеина, %
Фон 1 — $NP_{opt}K$		
0	<u>19,3</u>	<u>11,8</u>
	14,7	8,9
110	<u>17,9</u>	<u>12,4</u>
	13,5	9,2
220	<u>17,2</u>	<u>10,1</u>
	13,0	7,8
Фон 2 — $NP_{1,5opt}K$		
0	<u>19,9</u>	<u>12,7</u>
	15,0	9,7
110	<u>19,1</u>	<u>13,6</u>
	14,2	10,3
220	<u>18,3</u>	<u>12,3</u>
	13,7	9,3
НСР ₀₅	A <u>0,2</u>	<u>0,2</u>
		0,2
	B <u>0,4</u>	<u>0,3</u>
		0,2

Примечание. В числителе — варианты с полной дозой азота, в знаменателе — 1/3 от полной. А — доза цинка, В — доза фосфора.

**Влияние цинка на урожай и содержание сырого протеина в зерне
яровой пшеницы при инокуляции семян бактериальными ассоциациями**

Доза Zn, мг/кг почвы	Ассоциация № 6		Ассоциация № 23		Ассоциация № 25	
	урожай, г/сосуд	содержа- ние сырого протеина, %	урожай, г/сосуд	содержа- ние сырого протеина, %	урожай, г/сосуд	содержа- ние сырого протеина, %
<i>Фон 1 — NP_{опт}K</i>						
0	<u>19,6</u>	<u>12,1</u>	<u>21,4</u>	<u>12,6</u>	<u>19,9</u>	<u>12,3</u>
	19,9	11,9	21,9	12,4	20,1	12,0
110	<u>18,7</u>	<u>12,8</u>	<u>20,7</u>	<u>13,1</u>	<u>19,1</u>	<u>13,0</u>
	19,5	12,6	21,3	12,9	19,9	12,6
220	<u>18,0</u>	<u>10,6</u>	<u>19,8</u>	<u>12,0</u>	<u>18,4</u>	<u>10,7</u>
	18,9	11,1	20,6	11,5	19,4	11,3
<i>Фон 2 — NP_{1,5опт}K</i>						
0	<u>20,9</u>	<u>13,2</u>	<u>22,2</u>	<u>13,5</u>	<u>21,6</u>	<u>13,3</u>
	21,2	12,9	22,5	13,1	22,0	12,9
110	<u>20,1</u>	<u>13,9</u>	<u>21,5</u>	<u>14,2</u>	<u>20,8</u>	<u>14,0</u>
	20,8	13,4	22,0	13,7	21,5	13,5
220	<u>19,4</u>	<u>12,7</u>	<u>20,8</u>	<u>12,9</u>	<u>20,1</u>	<u>12,7</u>
	20,0	12,9	21,5	13,0	20,6	12,8
A	<u>0,3</u>	<u>0,2</u>	<u>0,3</u>	<u>0,4</u>	<u>0,3</u>	<u>0,3</u>
	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3
HCP ₀₅ B	<u>0,6</u>	<u>0,4</u>	<u>0,5</u>	<u>0,6</u>	<u>0,5</u>	<u>0,4</u>
	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4	0,5

Примечание. В числителе — 2000 г. (прямое действие), в знаменателе — 2001 г. (последствие). A — доза цинка, B — доза фосфора.

Урожай снижался во всех вариантах опытов, причем уровень снижения пропорционально связан с применяемыми дозами цинка. Однако во всех вариантах опытов урожай растений при инокуляции семян различными ассоциациями был выше, чем в опыте без инокуляции в оба года исследований. Более высокая обеспеченность растений фосфором сопровождалась повышением урожая во всех вариантах с инокуляцией как в прямом действии, так и при изучении последствия.

В 1-й год исследований в вариантах с оптимальной дозой фосфора цинк независимо от доз снижал урожай в зависимости от инокуляции семян различными ассоциациями в следующем порядке: ассоциация № 6 — на 4,6-8,2%; ассоциация № 23 — на 3,3-7,5%; ассоциация № 25 — на 4,0-7,5% по отношению к контролю. При полуторной дозе фосфора снижение составило: при инокуляции ассоциацией № 6 — 3,8—7,2%; ассоциацией № 23 — 3,2-6,3%; ассоциацией № 25 — 3,7-6,9%. Наибольший уро-

жай получен у пшеницы, в вариантах с инокуляцией семян ассоциацией № 23. Во всех вариантах, включая и контроль, данный показатель был несколько выше по сравнению с урожаем, полученным от инокуляции ассоциациями № 6 и № 25. Таким образом, по снижению детоксикационного эффекта на урожай пшеницы диазотрофы можно расположить в следующий ряд: ассоциация № 23 > ассоциация № 25 > ассоциация № 6.

В опыте без инокуляции с дозой азота 1/3 от полной урожай данной культуры снизился в 1,3-1,5 раза по сравнению с аналогичными вариантами опытов при инокуляции семян диазотрофами, что позволило судить о положительной роли инокуляции в формировании урожая.

Во 2-й год исследований при изучении последствий урожай зерна во всех вариантах опытов был достоверно выше, чем данный показатель в 1-й год исследований. Следует отметить, что при внесении цинка в дозе 110 мг/кг почвы урожай был практически на уровне такового в варианте без внесения элемента независимо от инокуляции и уровня фосфорного питания. Во 2-й год исследований наблюдалось снижение негативного действия цинка, что, скорее всего связано с его выносом в 1-й год.

Содержание сырого протеина в зерне зависело от уровня обеспеченности фосфором и применяемых доз цинка. В опыте без инокуляции при оптимальном фосфорном питании (фон 1) количество сырого протеина ниже, чем при полуторной дозе фосфора (фон 2). Внесение цинка в дозе 110 мг/кг почвы привело к увеличению содержания сырого протеина и составило 12,4% (фон 1) и 13,6% (фон 2). Это согласуется с фактом, что цинк способствует синтезу бел-

ков из аминокислот. С увеличением дозы цинка до 220 мг/кг почвы содержание сырого протеина снизилось по фону 1 на 18,5%, по фону 2 — на 9,6%.

При инокуляции семян ассоциациями диазотрофов наблюдалась та же закономерность. Наибольшее количество сырого протеина в опыте первого года отмечалось при внесении цинка в дозе 110 мг/кг почвы и полуторной дозе фосфора, что составило при инокуляции ассоциацией № 6 — 13,9%, ассоциацией № 23 — 14,2% и ассоциацией № 25 — 14,0%. С возрастанием дозы цинка до 220 мг/кг почвы наблюдалось уменьшение количества сырого протеина в зерне пшеницы, независимо от вариантов инокуляции.

Во 2-й год исследований наибольшее содержание сырого протеина отмечалось в зерне при дозе цинка 110 мг/кг почвы. Однако в числовом выражении величина данного показателя была несколько ниже, чем в первый год, что объясняется выносом элемента растениями пшеницы. При внесении же цинка в дозе 220 мг/кг почвы содержание сырого протеина в зерне выше по сравнению с аналогичными вариантами первого года. В целом можно отметить, что инокуляция семян пшеницы способствовала снижению фитотоксичности цинка.

Выводы

1. Инокуляция семян пшеницы ризосферными ассоциациями снижает ингибирующий эффект цинка в первые фазы развития растений на 20% по сравнению с неинокулированными растениями.

2. Урожай пшеницы зависит от применяемых доз цинка и уровня минерального питания. В опыте без инокуляции наибольшее снижение урожая наблюдалось по фону 1 при внесении цинка в дозе 220 мг/кг почвы, что составило 10,9% по отношению к контролю.

3. Зависимость урожая от градиента концентрации цинка определяется в значительной степени интродуцируемой бактериальной ассоциацией. Наибольший урожай получен у пшеницы, инокулированной ассоциацией №23. В опыте без инокуляции с дозой азота 1/3 от полной урожай данной культуры значительно ниже по сравнению с опытами при инокуляции семян диазотрофами, что позволяет судить о положительной роли инокуляции в формировании урожая.

4. Содержание сырого протеина в зерне яровой пшеницы зависит как от доз цинка, так и от уровня фосфорного питания. Внесение цинка в дозе 110 мг/кг почвы сопровождается увеличением данного показателя. Увеличение дозы цинка до 220 мг/кг почвы ведет к снижению содержания сырого протеина в зерне.

5. Инокуляция семян яровой пшеницы диазотрофами положительно влияет на растения, уменьшая негативное действие цинка на урожай растений и качество зерна пшеницы. Наибольшим детоксикационным эффектом характеризуется ассоциация № 23. По степени уменьшения фитотоксического эффекта цинка изучаемые диазотрофы можно расположить в следующий ряд: ассоциация № 23 > ассоциация № 25 > ассоциация № 6.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Алексеев Ю.В.* Тяжелые металлы в почвах и растениях. JL: Агропромиздат,

1987. — 2. *Илялетдинов А.Н.* Микробиологические превращения металлов. Алма-Ата: Наука, 1984. — 3. *Кожевин П.А., Корчмару С.С., Большева Т.Н., Егоров В.С.* Интродукция микробных комплексов в ризосферу растений. — Сб.: Интродукция микроорганизмов в окружающую среду. М., 1994, с. 54. — 4. *Красильников Н.А.* Микробиологические основы бактериальных удобрений. М.-Л: Изд-во Акад. Наук СССР, 1945. — 5. *Летунова С.В., Ермаков В.В., Алексеева С.А.* Роль почвенной микрофлоры в биогенной миграции ртути и сурьмы. *Агрохимия*, 1984, № 4, с. 77-82. — 6. *Петрушина Н.С.* Микроэлементы и болезни сельскохозяйственных растений. — Биологическая роль микроэлементов и их применение в сельском хозяйстве и медицине. М., 1974, с. 438. — 7. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести: ГОСТ 12038-84. Введ. 19.12.84. М., 1985. — 8. *Черных Н.А.* Изменение содержания ряда химических элементов в растениях под действием различных количеств тяжелых металлов в почве. — *Агрохимия*, 1991, № 3, с. 68-76. — 9. *Черных Н.А., Милащенко Н.З., Ладонин В.Ф.* Экотоксикологические аспекты загрязнения почв тяжелыми металлами. М.: Агроконсалт, 1999, с. 62-73. — 10. *Kloepper J.W., Lifshitz R., Zablotowitz R.M.* Free-living bacterial inocula for enhancing from productivity. — *Trends Biotechnology*, 1989, 51, № 2, pp. 39-44.

*Статья поступила
13 июля 2004 г.*

SUMMARY

Results of investigating effect of zinc on growth, yield and quality of grain (content of crude protein) in wheat in laboratory and vegetative experiments are presented. Ability of bacterial associations to lower inhibitory effect of zinc on wheat plants with their introduction into rhizosphere has been found.