

УДК 631.461:631.458

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНОКУЛЯЦИИ РИЗОЦЕНОЗНЫМИ АССОЦИАЦИЯМИ ПШЕНИЦЫ НА ПОЧВЕ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЦИНКА

Т.М. КАЗАРОВА, к. б. н.; Н.К. СИДОРЕНКОВА, к. б. н.; В.Ф. ВОЛОБУЕВА, к. б. н.

(Кафедра микробиологии, кафедра агрохимии)

Приведены результаты изучения влияния инокуляции семян ризоценозными ассоциациями на урожай и качество зерна яровой пшеницы на почве с повышенным содержанием цинка. Выявлена способность бактериальных ассоциаций снижать фитотоксичность металла при их интродукции в ризосферу.

Рост концентрации тяжелых металлов в окружающей среде увеличивает их содержание во всех компонентах экосистемы, способствует передвижению по трофической цепи и может серьезно влиять на здоровье человека [11, 17]. Цинк относится к числу наиболее токсичных в высоких концентрациях элементов, что обусловлено большим числом источников загрязнения им почвы, высокой подвижностью в ней, быстрым передвижением по растению к органам запасаания ассимилятов и высокой интенсивностью поступления в биосферу [10, 14].

Фитотоксичность металлов и устойчивость к ним растений зависят от многих условий. На сегодняшний день выявлены [1, 10] основные факторы передвижения тяжелых металлов в системе почва – растение и это находит практическое отражение в нормировании защитных мерах по снижению загрязнения сельскохозяйственной продукции и деkontаминации почв [13].

В последние годы появились исследования [2, 6, 16] по закреплению металлов в почве и снижению их фитотоксичности с помощью микроорганизмов, что весьма актуально в связи с непрекращающимся техногенным по-

ступлением химических элементов в окружающую среду. Определяющая роль отводится ассоциативным ризосферным бактериям, которые, взаимодействуя с корневой системой растений, влияют на ее поглотительную и синтетическую функции. Ризобактерии (PGPR — «plant growth-promoting rhizobacteria») первыми колонизируют прорастающие корни, в то время как другие активны на более поздних этапах вегетации [5, 18]. К тому же механизмы положительного влияния ассоциативных ризосферных бактерий на растения разнообразны в зависимости от конкретной агроэкологической обстановки [7]. Наиболее важное значение из них имеют: фиксация атмосферного азота, стимуляция роста и развития и улучшение питания растений, повышение устойчивости их к различным стрессовым условиям, подавление фитопатогенов и микростатический эффект [12, 15, 19].

В связи с этим необходимо выявить наиболее полно возможности эффективных ризосферных ассоциаций для сельскохозяйственных культур, которые бы обеспечивали и биоконтроль в условиях загрязнения почвы тяжелыми металлами и при которых макси-

мально бы проявлялись положительные свойства ризоценозных ассоциаций.

Методика

Исследования проводили в 2000–2001 гг. на кафедрах микробиологии и агрономической и биологической химии РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева. Объекты исследований — бактериальные ассоциации №6, 23 и 25 из коллекции культур бактерий, выделенных из ризоценозов дикого тропического растения *Sesbania sp.* 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.

Влияние инокуляции семян бактериальными ассоциациями на урожай и качество зерна пшеницы на почве с повышенным содержанием Zn изучали в условиях вегетационных опытов по следующей схеме:

1 — $N_1P_1K_1$ — фон 1 (контроль), 2 — фон 1 + Zn_1 , 3 — фон 1 + Zn_2 , 4 — $N_{1/3}P_{1,5}K_1$ — фон 2 (контроль), 5 — фон 2 + Zn_1 , 6 — фон 2 + Zn_2 , 7 — $N_{1/3}P_1K_1$ — фон 3, 8 — фон 3 + Zn_1 , 9 — фон 3 + Zn_2 , 10 — $N_{1/3}P_{1,5}K_1$ — фон 4, 11 — фон 4 + Zn_1 , 12 — фон 4 + Zn_2 , 13 — фон 3 + ассоциация №6, 14 — фон 3 + ассоциация №6 + Zn_1 , 15 — фон 3 + ассоциация №6 + Zn_2 , 16 — фон 4 + ассоциация №6, 17 — фон 4 + ассоциация №6 + Zn_1 , 18 — фон 4 + ассоциация №6 + Zn_2 , 19 — фон 3 + ассоциация №23, 20 — фон 3 + ассоциация №23 + Zn_1 , 21 — фон 3 + ассоциация №23 + Zn_2 , 22 — фон 4 + ассоциация №23, 23 — фон 4 + ассоциация №23 + Zn_1 , 24 — фон 4 + ассоциация №23 + Zn_2 , 25 — фон 3 + ассоциация №25, 26 — фон 3 + ассоциация №25 + Zn_1 , 27 — фон 3 + ассоциация №25 + Zn_2 , 28 — фон 4 + ассоциация №25, 29 — фон 4 + ассоциация №25 + Zn_1 , 30 — фон 4 + ассоциация №25 + Zn_2

Вегетационные опыты были поставлены в почвенной культуре на базе вегетационного домика кафедры агрономической и биологической химии РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева. Опытная культура — яровая пшеница сорта Иволга.

Почва опытов — дерново-подзолистая среднесуглинистая, ее агрохимическая характеристика: содержание гумуса (по Тюрину) — 2,1%, $pH_{\text{сол}}$ 5,7, H_r — 1,4 мгэкв/100 г, S — 22,6 мгэкв/100 г, T — 24 мгэкв/100 г, V — 94%, содержание подвижных форм (по Кирсанову) P_2O_5 — 87 мг/кг и K_2O — 295 мг/кг, содержание подвижного Zn (ААБ pH 4,8) — 9 мг/кг.

Опыты закладывали в сосудах Митчерлиха. Азот, фосфор и калий по фону 1 вносили соответственно 0,15; 0,10; 0,07 г д.в./кг почвы (с учетом поправочного коэффициента по калию — 0,7); по фону 2, 4 вносили полуторную дозу фосфора. Чтобы выяснить роль инокуляции в схему опытов введены варианты без инокуляции с дозой азота 1/3 от полной. Азот вносили в форме NH_4NO_3 , фосфор — $Ca(H_2PO_4)_2 \times H_2O$, калий — KNO_3 .

Цинк вносили в 1-й год опытов в виде $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ с учетом ориентировочно-допустимых концентраций (ОДК, 1995) в зависимости от pH и гранулометрического состава почвы. Вносимые дозы составляли 110 и 220 мг/кг почвы.

Закладку, посев, уход и учет урожая проводили по общепринятой методике. Норма высева — 25 семян на сосуд с учетом прорезывания до 20 растений. Повторность опытов — 4-кратная. Обеззараживание (стерилизацию) семян проводили путем намачивания в растворе нейтрального анолита с содержанием активного хлора 0,05%. Время экспозиции — 1 ч. После обеззараживания семена проращивали в термостате. Инокуляцию семян проводили двухсуточными культурами микроорганизмов (титр 10^7 – 10^8 КОЕ/мл). Химические анализы почв и растений проводили согласно ГОСТам и по об-

щепринятым методическим указаниям. Содержание Zn в почве определяли в растворе ААБ с рН 4,8, в растительных образцах — после сухого озоления на атомно-адсорбционном спектрометре ААС PERKIN-ELMER 5100РС. О содержании сырого протеина судили по количеству общего азота в растениях, определенному методом Кьельдаля.

Все аналитические работы проводили в 4–6-кратной повторности. Математическая обработка данных проведена методом дисперсионного анализа с использованием программы Stars.

Результаты

Анализ урожая яровой пшеницы показал, что он в значительной степени определялся инокуляцией семян ассоциациями, дозами металла и уровнем минерального питания растений (табл. 1).

Для выявления роли ассоциаций ризоценозов на урожай зерна были введены варианты без инокуляции семян с дозой азота 1/3 от полной. В данных вариантах изучаемый показатель оказался ниже в 1,3–1,5 раза по сравнению с вариантами с инокуляцией семян. Это позволило судить о положи-

тельной роли diaзотрофов в формировании урожая. При этом урожай в вариантах с инокуляцией находился на уровне и даже выше, чем в контроле (без инокуляции с полной дозой азота). Максимальной величиной характеризовался вариант с ассоциацией №23. Прибавка урожая зерна пшеницы по сравнению с контролем составила в среднем по обоим фонам 2,2 г/сосуд в 2000 г. и 2,1 г/сосуд в 2001 г.

Цинк в дозе 110 мг/кг почвы в контроле отрицательно влиял на урожай пшеницы — снижение изучаемого показателя в этом варианте составило 7,3%. Увеличение дозы Zn до 220 мг/кг почвы вызвало дальнейшее существенное падение урожая зерна на 10,9%. В то же время повышение уровня фосфорного питания растений (фон 2) несколько снизило фитотоксичность Zn. Уменьшение урожая культуры в данных вариантах опыта составило соответственно 4,0–8,0%.

Фитотоксичность Zn независимо от доз в вариантах с инокуляцией семян проявлялась в меньшей степени по сравнению с аналогичными вариантами контроля (фон 1, фон 2). В данных вариантах Zn снижал урожай пшеницы в среднем на 4,0% при дозе 110 мг/кг почвы

Таблица 1

Урожай пшеницы при инокуляции семян бактериальными ассоциациями, г/сосуд

Вариант	Доза Zn, мг/кг почвы			Вариант	Доза Zn, мг/кг почвы			
	0	110	220		0	110	220	
N ₁ P ₁ K ₁ — фон 1 (контроль)	19,3	17,9	17,2	N ₁ P _{1,5} K ₁ — фон 2 (контроль)	19,9	19,1	18,3	
	19,8	18,2	17,8		20,3	19,6	18,8	
N _{1/3} P ₁ K ₁ — фон 3	14,7	13,5	13,0	N _{1/3} P _{1,5} K ₁ — фон 4	15,0	14,2	13,7	
	14,9	13,8	13,3		15,2	14,5	13,9	
Фон 3 + ассоциация №6	19,6	18,7	18,0	Фон 4 + ассоциация №6	20,9	20,1	19,4	
	19,9	19,5	18,9		21,2	20,8	20,0	
Фон 3 + ассоциация №23	21,4	20,7	19,8	Фон 4 + ассоциация №23	22,2	21,5	20,8	
	21,9	21,3	20,6		22,5	22,0	21,5	
Фон 3 + ассоциация №25	19,9	19,1	18,4	Фон 4 + ассоциация №25	21,6	20,8	20,1	
	20,1	19,9	19,4		22,0	21,5	20,6	
HCP ₀₅ ^A 0,2/0,3			HCP ₀₅ ^B 0,4/0,6			HCP ₀₅ ^C 0,4/0,3		

Примечание. В числителе — опыт 2000 г., в знаменателе — опыт 2001 г.; А — доза цинка, В — доза фосфора, С — вариант инокуляции.

и на 7,7% при повышенной дозе элемента. При полуторной дозе фосфора урожай зерна снижался лишь на 3,6–6,8% соответственно. Наиболее существенным детоксикационным эффектом характеризовался вариант с ассоциацией №23, где урожай культуры в зависимости от доз элемента ниже на 3,3–7,5% по фону 3 и на 3,2–6,3% по фону 4.

Следует отметить, что более высокая обеспеченность растений фосфором характеризовалась и большим уровнем урожая, что, с одной стороны, можно объяснить [8] положительным действием минерального фосфора на активность ризосферных микроорганизмов. С другой стороны, взаимодействие в почве тяжелых металлов с фосфат-ионами, очевидно, привело к снижению их подвижности вследствие образования труднорастворимых соединений [10], а следовательно, и фитотоксичности.

Во 2-й год при изучении последствий действия Zn урожай зерна пшеницы во всех вариантах был выше, чем в 1-й год, что, по-видимому, связано со снижением фитотоксического действия металла вследствие уменьшения содержания его подвижных соединений в почве в результате поглощения их растениями. При этом рассмотренные выше закономерности сохранялись.

Содержание сырого протеина в зерне зависело от инокуляции семян, доз Zn и уровня минерального питания растений, а также внешних условий (табл. 2). Наибольшим количеством протеина в оба года характеризовался вариант с ассоциацией №23.

Внесение Zn в дозе 110 мг/кг почвы привело к увеличению содержания сырого протеина в контроле и составило 12,4% при оптимальном уровне фосфорного питания. Возможно, это связано с защитными функциями растений — образованием специфического белка металлотенина, способного связывать поступающие в растения тяжелые металлы [4]. Повышение уровня минерального фосфорного питания растений положительно действовало на накопление протеина, что сопровождалось увеличением данного параметра и составило 13,6 против 12,4% по фону 1. Фитотоксичность Zn проявилась в дозе 220 мг/кг почвы. Отмечалось снижение количества сырого протеина в зерне пшеницы на 1,7–0,4% по фону 1 и 2 соответственно.

Такая же закономерность в изменении изучаемого показателя отмечена во всех вариантах опыта с инокуляцией семян. Цинк в дозе 110 мг/кг почвы стимулировал синтез азотис-

Таблица 2
Содержание сырого протеина в зерне пшеницы (% на абсолютно сухую массу)

Вариант	Доза Zn, мг/кг почвы			Вариант	Доза Zn, мг/кг почвы		
	0	110	220		0	110	220
N ₁ P ₁ K ₁ — фон 1 (контроль)	11,8 11,5	12,4 12,1	10,1 9,7	N ₁ P _{1,5} K ₁ — фон 2 (контроль)	12,7 12,3	13,6 13,4	12,3 12,0
N _{1/2} P ₁ K ₁ — фон 3	8,9 8,8	9,2 8,9	7,8 7,5	N _{1/2} P _{1,5} K ₁ — фон 4	9,7 9,5	10,3 9,8	9,3 8,9
Фон 3 + ассоциация №6	12,1 11,9	12,8 12,6	11,1 10,6	Фон 4 + ассоциация №6	13,2 12,9	13,9 13,4	12,9 12,7
Фон 3 + ассоциация №23	12,6 12,4	13,1 12,9	12,0 11,5	Фон 4 + ассоциация №23	13,5 13,1	14,2 13,7	13,0 12,9
Фон 3 + ассоциация №25	12,3 12,0	13,0 12,6	11,3 10,7	Фон 4 + ассоциация №25	13,3 12,9	14,0 13,5	12,8 12,7
HCP ₀₅ ^A 0,2/0,2			HCP ₀₅ ^B 0,6/0,4			HCP ₀₅ ^C 0,4/0,3	

Примечание. В числителе — опыт 2000 г., в знаменателе — опыт 2001 г.; А — доза цинка, В — доза фосфора, С — вариант инокуляции.

тых веществ в зерне, в то время как при дозе 220 мг/кг почвы снижался изучаемый параметр в среднем на 0,9–0,4%.

Во 2-й год при изучении последствия Zn наибольшее количество сырого протеина в зерне пшеницы отмечалось также при дозе металла 110 мг/кг почвы. Следует отметить, что величина данного показателя во всех вариантах опыта была несколько ниже, чем в 1-й год, что, по-видимому, связано с менее благоприятным температурным режимом вегетационного периода.

Одним из механизмов устойчивости растений к тяжелым металлам слу-

жит ограничение поступления их из корней в надземную часть. Если, несмотря на защитную функцию корней, токсикант все же проникает в стебель и листья, у растения остается способность ограничения его поступления в репродуктивные органы [10]. В последние годы Zn относят к группе тяжелых металлов, способных легко накапливаться в с.-х. продукции [3, 9].

Результаты исследований (табл. 3) показали определенную вариабельность содержания Zn в зерне пшеницы в зависимости от вносимых доз элемента, уровня минерального питания и инокуляции.

Т а б л и ц а 3

Аккумуляция Zn в зерне яровой пшеницы, мг/кг

Вариант	Доза Zn, мг/кг почвы			Вариант	Доза Zn, мг/кг почвы			
	0	110	220		0	110	220	
N ₁ P ₁ K ₁ — фон 1 (контроль)	27,4 26,0	51,9 48,9	57,7 54,7	N ₁ P _{1,5} K ₁ — фон 2 (контроль)	26,1 23,8	49,2 45,3	55,4 50,3	
Фон 3 + ассоциация №6	26,2 24,6	47,4 40,5	54,1 46,9	Фон 4 + ассоциация №6	24,9 22,9	45,7 39,1	52,5 43,6	
Фон 3 + ассоциация №23	25,9 23,7	43,5 35,8	52,4 43,1	Фон 4 + ассоциация №23	24,2 22,5	42,1 34,9	49,2 42,3	
Фон 3 + ассоциация №25	26,5 24,1	46,5 39,9	53,0 45,2	Фон 4 + ассоциация №25	25,4 23,3	44,2 37,3	51,8 43,8	
HCP ₀₅ ^A 0,3/0,4			HCP ₀₅ ^B 0,7/0,6			HCP ₀₅ ^C 0,3/0,5		

П р и м е ч а н и е. В числителе — опыт 2000 г., в знаменателе — опыт 2001 г.; А — доза цинка, В — доза фосфора, С — вариант инокуляции.

Оценку уровня загрязнения зерна яровой пшеницы Zn проводили на основании утвержденных ПДК для продовольственного сырья и пищевых продуктов и МДУ для кормов. Следует отметить, что в контроле при внесении Zn в дозе 110 мг/кг почвы накопление данного элемента в зерне яровой пшеницы в значительной степени определялось уровнем фосфорного питания растений. В варианте с оптимальной дозой фосфора содержание Zn в зерне было выше ПДК и МДУ; при полуторной дозе фосфора его количество составляло 49,2 мг/кг. Наиболь-

шая аккумуляция Zn была в вариантах с дозой 220 мг/кг почвы (концентрация выше предусмотренных нормативов по обоим фонам).

Аналогичная закономерность в накоплении Zn в зависимости от доз металла отмечена в вариантах с инокуляцией семян. При этом превышение значений ПДК и МДУ в данных вариантах наблюдалось только при внесении повышенной дозы Zn (220 мг/кг почвы) по обоим фонам. Исключение — вариант с ассоциацией №23 на фоне лучшей обеспеченности растений фосфором.

В последствии аккумуляция Zn в зерне пшеницы во всех вариантах была ниже по сравнению с 1-м годом исследований. В вариантах с инокуляцией семян Zn не накапливался выше ПДК и МДУ даже при внесении повышенной дозы этого элемента. В контроле гигиенически безопасная продукция была получена только при дозе металла 110 мг/кг почвы.

Выводы

1. Бактериальные ассоциации из ризосфер дикорастущих тропических культур №6, 23 и 25 повышают урожай яровой пшеницы (сорт Иволга) в вегетационных опытах. Инокуляция в отдельные годы и в среднем за два года обеспечила также улучшение качества зерна пшеницы, что выразилось в повышении содержания сырого протеина в среднем по обоим фонам на 0,6% по сравнению с контролем (без инокуляции).

2. Наибольшую результативность проявила ассоциация №23, обеспечившая прибавку урожая в среднем за два года на 10,8–11,2% при оптимальной и полуторной дозе фосфора соответственно, прирост сырого протеина — на 0,8% по обоим фонам (относительно контроля).

3. При внесении Zn (110–220 мг/кг) в зависимости от доз урожай зерна пшеницы снижался в контроле в среднем по обоим фонам на 5,7–9,5% в 2000 г. и на 5,8–8,8% в 2001 г. Инокуляция семян пшеницы ассоциациями, особенно №23, способствовала снижению фитотоксичности металла.

4. Повышенная доза Zn ингибировала накопление сырого протеина. Отмечалось снижение содержания протеина в среднем за два года в контроле на 1,8–0,4%, в вариантах с инокуляцией семян — на 1,1–0,3% при оптимальной и полуторной дозе фосфора соответственно.

5. Наименьшим содержанием Zn в зерне пшеницы в оба года характеризовались варианты с ассоциацией №23. Аккумуляция Zn в зерне в зависимости от доз ниже контроля в среднем по обоим фонам на 15,3–10,2% в 2000 г. и на 24,9–18,6% — в 2001 г.

Библиографический список

1. Добровольский В.В. Биосферные циклы тяжелых металлов и регуляторная роль почвы // Почвоведение, 1997. №4. С.431–441. — 2. Емцев В.Т. Почвенная микробиология — итоги и перспективы: взгляд в XXI век (обзор) / Сб.: Актуальные проблемы почвоведения, агрохимии и экологии. М., 2004. С. 41–60. — 3. Зубкова В.М. Особенности накопления и распределения тяжелых металлов в сельскохозяйственных культурах и влияние удобрений на их поведение в системе почва – растение: Автореф. докт. дис. М., 2004. — 4. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. М.: Мир, 1989. — 5. Кожевин П.А., Корчмарь С.С., Большица Т.Н., Егоров В.С. Интродукция микробных комплексов в ризосферу растений / Сб.: Интродукция микроорганизмов в окружающую среду. М., 1994. — 6. Кожемяков А.П. Эффективность и основные функции симбиотических и ассоциативных бактерий-инокулянтов сельскохозяйственных культур // Сельскохозяйственная микробиология в XIX — XXI веках: Тез. докл. Всерос. конф. Санкт-Петербург, 14–19 июня 2001. С. 25–26. — 7. Кожемяков А.П., Тихонович И.А. Использование инокулянтов бобовых и биопрепаратов комплексного действия в сельском хозяйстве // Доклады Россельхозакадемии, 1998. №6. С. 7–10. — 8. Кураков А.В., Гузев В.С., Умаров М.М. и др. Минеральные удобрения как фактор антропогенного воздействия на почвенную микрофлору // Микроорганизмы и охрана почв / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1989. С. 47–58. — 9. Лукин С.В., Солдат И.Е., Пендюрин Е.А. Закономерности накопления цинка в сельскохозяйственных растениях // Агрохимия, 1999. №2. С. 79–82. — 10. Овчаренко М.М. Тяжелые металлы в системе почва – растение – удобрение. М., 1997. — 11. Соколов О.А., Черников В.А. Экологическая безопасность и устойчивое развитие. Книга 1. Атлас распределения тяжелых металлов в объектах окружающей среды. Пушкино, ОНТИ ПНЦ РАН, 1999. — 12. Умаров М.М. Ассоциативная

азотфиксация. М.: МГУ, 1986. — 13. *Фатеев А.И., Мирошниченко Н.Н., Самохвалова В.Л.* Миграция, транслокация и фитотоксичность тяжелых металлов при полиэлементном загрязнении почвы // *Агрохимия*, 2001. №3. С. 57–61. — 14. *Черных Н.А.* Изменение содержания ряда химических элементов в растениях под действием различных количеств тяжелых металлов в почве // *Агрохимия*, 1991. №3. С. 68–76. — 15. *Шабает В.П.* Роль биологического азота в системе «почва – растение» при внесении ризосферных микроорганизмов. Автореф. докт. дис. М., 2004. — 16. *Юджин Л.Ю.,*

Степанок В.В. Роль ассоциативных ризосферных бактерий в устойчивости растений в условиях загрязнения экосистем тяжелыми металлами. *Сельскохозяйственная микробиология в XIX – XXI веках: Тез. докл. Всероссийской конф., Санкт-Петербург, 14–19 июня 2001.* С. 83–84. — 17. *Ягодин Б.А.* Тяжелые металлы и здоровье человека // *Химия в сельском хозяйстве*, 1995. №4. С. 18–20. — 18. *Klopper J.W., Lifshitz R., Zablutowitz R.M.* // *Trends Biotechnol.*, 1989. V.51, №2. P. 39–44. — 19. *Zaady E., Okon Y., Perevolotsky A.* // *Journal of Range Management*, 1994. №1. P. 12–15.

Рецензент — к. б. н. Г.В. Годова

SUMMARY

Results of investigation into inoculated seeds by rhizocoenosis associations effect on both crop capacity and grain quality of spring wheat, in soil with higher amount of Zn (zinc), are cited in the article. Bacterial associations capacity to reduce phytotoxicity of this metal introduced in rhizosphere has been exposed.