

УДК 633.63:631.416.1:576.851.11

ВНЕСЕНИЕ В ПОЧВУ АЗОТФИКСИРУЮЩЕЙ БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* 116 И ДИНАМИКА ДОСТУПНЫХ ФОРМ АЗОТА В ПОСЕВАХ САХАРНОЙ СВЁКЛЫ

Н.В. Безлер, д.с.-х.н., М.Ю. Петюренко, А.С. Хуссейн, к.б.н.,
ВНИИ сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова

С поверхности корней сахарной свёклы выделена бактерия вида *Pseudomonas fluorescens* штамм 116. Установлена ее способность к фиксации азота. Определено, что ее интродукция в посевах сахарной свёклы повышает содержание щелочногидролизующего и нитратного азота в почве. Отмечено положительное влияние штамма на продуктивность культуры.

Ключевые слова: *Pseudomonas fluorescens*, сахарная свёкла, щелочногидролизующий азот, нитратный азот, продуктивность.

В последнее время для стимуляции роста растений и повышения продуктивности сельскохозяйственных культур все чаще применяют различные микроорганизмы, в том числе ризосферные флюоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas*. Их относят к группе PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) – ризобактерий, способствующих росту растений. Ризосферные псевдомонады активно колонизируют корни растений, многие обладают антагонистической активностью по отношению к фитопатогенам за счет синтеза разнообразных антибиотиков и сидерофоров, а так же являются активными продуцентами фитогормонов [3]. У представителей данного рода обнаружена способность к фиксации азота. Установлено, что некоторые штаммы псевдомонад могут быть добавлены в список азотфиксаторов на основании выявления у них *nifH* гена, ответственного за азотфиксацию [7]. В ряде вегетационных опытов показано, что внесение псевдомонад в почву способствует повышению урожая ряда сельскохозяйственных культур, в том числе столовой и сахарной свёклы [4-6].

Цель исследований – изучить влияние аборигенного штамма бактерии *Pseudomonas fluorescens* 116 для чернозема выщелоченного, выделенного с поверхности корней сахарной свёклы, при его интродукции в почву на динамику накопления в почве подвижных форм азота и продуктивность культуры.

Методика. Ранее авторами статьи было выделено 13 штаммов бактерий рода *Pseudomonas* из почвы, ризосферы и поверхности корней в посевах сахарной свёклы. Идентификация выделенных штаммов была проведена с помощью ПЦР-анализа, который подтвердил, что все 13 штаммов относятся к роду *Pseudomonas* sp., а 3 из них идентифицированы как *P. fluorescens* [1].

Для выявления у псевдомонад свойства фиксировать азот атмосферы их культивировали на среде Эшби не содержащей азот. По результатам проведенных тестов были отобраны 5 штаммов, способных к росту на ней.

Для подтверждения способности этих штаммов к азотфиксации с помощью молекулярно-генетических методов была проведена полимеразная цепная реакция (ПЦР) с универсальным праймером *nifH-univ*, позволяющим определять наличие гена *nifH*, ответственного за фиксацию азота у микроорганизмов [8]. Результат проведенного нами анализа показал наличие ожидаемого продукта реакции с этим праймером, что подтвердило на генетическом уровне способность этих штаммов фиксировать азот.

В чашках Петри в моделируемых условиях был проведен лабораторный опыт, позволяющий выявить накопление щелочногидролизующего азота в почве. Результаты исследова-

ний показали, что в присутствии штамма *P. fluorescens* 116 в почве накапливается эта формы азота [2].

На основании результатов лабораторных исследований в 2014-2015 гг. во ВНИИ сахарной свёклы и сахара имени А. Л. Мазлумова был заложен полевой опыт в паровом звене зернопаропропашного севооборота с чередованием культур: 1- пар; 2 – озимая пшеница; 3 – сахарная свёкла; 4 – ячмень. Повторность опыта – 4-кратная. Площадь делянки в 2014 г. составила 27 м², в 2015 г. – 32,4 м². Расположение делянок систематическое. Почва – чернозем выщелоченный среднегумусный среднесуглинистый на карбонатных лёссовидных суглинках. Почва имела следующие показатели: рН_{сол.} 5,6, содержание гумуса – 5,5%, щелочногидролизующего азота – 52 мг/кг почвы, обменного калия – 8,1, подвижного фосфора – 10,3 мг/100 г почвы.

Удобрения под сахарную свёклу применяли осенью в дозе N₁₀₀P₁₀₀K₁₀₀. Технология возделывания культуры – общепринятая для ЦЧЗ. Штамм бактерии *P. fluorescens* 116 вносили под предпосевную культивацию в виде водной суспензии (использовали водопроводную воду) с титром 10¹⁰ КОЕ/мл. Расход рабочей жидкости – 200 л/га. Для посева использовали семена сахарной свёклы гибрида РМС 120.

Погодные условия в период проведения эксперимента складывались неблагоприятно (табл.1).

1. Гидротермический коэффициент (ГТК) в период проведения исследований

Месяц	2014 г.		2015 г.	
Май	0,70	Очень засушливый	0,75	Засушливый
Июнь	1,50	Влажный	1,10	Слабо засушливый
Июль	0,05	Сухой	1,50	Влажный
Август	0,55	Очень засушливый	0,33	Очень засушливый
Сентябрь	0,08	Сухой	0,32	То же
ГТК вегетационного периода	0,57		0,96	

ГТК вегетационного периода в 2014 г. составил 0,57, а в 2015 г. – 0,96. Сухая погода в 2014 г. в фазы начального и интенсивного роста сахарной свёклы, а также отсутствие осадков в этот период отразились на ее последующем развитии и, в итоге, на эффективности внесённого штамма. Так, влажность почвы в конце июля 2014 г. составила 21,3%, в середине августа 11,5, в начале октября всего лишь 10,5%. Более благоприятная ситуация сложилась в первой половине вегетационного периода 2015 г. за счет значительного количества осадков. Влажность почвы составила в конце июля 26,6%, в начале августа 18,9, а в конце сентября 12,9%.

Таким образом, погодные условия 2015 г. в начале вегетации культуры складывались благоприятно для внесённого штамма.

Результаты и их обсуждение. В агрономическом отношении большой интерес представляет содержание щелочногидролизующего азота в почве, определяемого по методу Корнфилда. Это форма, по существу, характеризует количество потенциально доступного для растений азота, что отражает уровень эффективного плодородия.

Наблюдение за динамикой содержания в почве щелочно-гидролизующего азота показало, что интродукция в почву штамма *P. fluorescens* 116 в посевах сахарной свёклы способствовала накоплению этой формы азота.

В первый год исследований, при внесении псевдомонад под предпосевную культивацию, содержание щелочногидролизующего азота в почве было выше, чем на контроле на протяжении всего периода вегетации: в фазе смыкания междурядий – на 10,3 мг/кг (на контроле 63,3 мг/кг), в период интенсивного роста – на 21,1 (на контроле 58,1 мг/кг), перед уборкой – на 2,4 мг/кг (на контроле 74,5 мг/кг) (рис. 1).

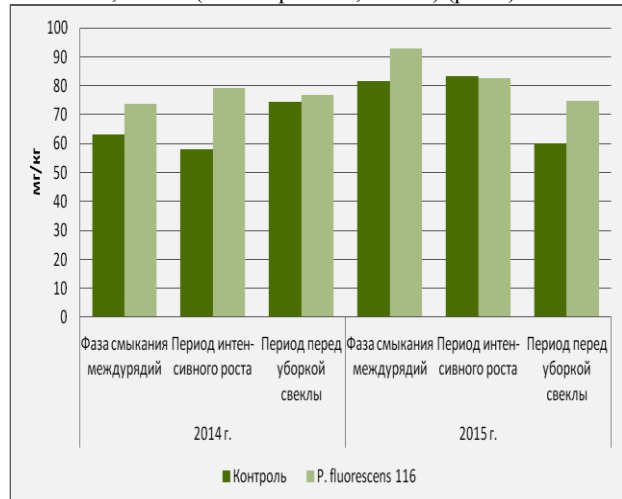


Рис. 1. Динамика содержания щелочногидролизующего азота в почве по годам исследований, мг $\text{NO}_3/\text{кг}$ а.с.п. НСР₀₅: по году – 2,6, по сроку наблюдений – 3,2, по влиянию штамма – 4,2.

Во второй год исследований положительная тенденция к накоплению щелочногидролизующего азота сохранялась. Так, в июне, в фазе смыкания междурядий отмечено увеличение содержания этой формы азота на 11,5 мг/кг (на контроле 81,5 мг/кг). В период интенсивного роста сахарной свёклы, содержание щелочногидролизующего азота в почве составляло 82,6 мг/кг и было близко к его содержанию на контроле (83,4 мг/кг). Вероятно, это связано с активными микробиологическими процессами в почве и более энергичным ростом культуры благодаря оптимальному температурно-влажностному режиму (ГТК 1,5), сложившемуся в этот период.

К концу вегетации сахарной свёклы внесенный штамм способствовал накоплению изучаемой формы азота, составившему 14,7 мг/кг (на контроле 60,2 мг/кг).

Щелочногидролизующий азот используется и в процессе нитрификации. Для того, чтобы установить способствует ли в наших условиях повышение количества первой формы азота накоплению нитратного, определяли динамику содержания последнего в почве. Результаты анализа показали, что при использовании штамма *P. fluorescens* 116 содержание нитратного азота в почве увеличилось в конце июня на 1,0 мг/кг (на контроле 4,3 мг $\text{NO}_3/\text{кг}$). К началу июля, в период интенсивного роста сахарной свёклы, наметившаяся тенденция сохранялась: его содержание возросло на 1,7 мг/кг по отношению к контролю (3,4 мг $\text{NO}_3/\text{кг}$). Немалую роль в этот период сыграли и благоприятные температурно-влажностные условия, способствовавшие активной минерализации органических остатков и последующей нитрификации. К концу июля содержание нитратного азота было несколько больше после использования штамма *P. fluorescens* 116, чем на контроле (4,0 мг $\text{NO}_3/\text{кг}$) и составило 4,5 мг $\text{NO}_3/\text{кг}$ (рис. 2).

В дальнейшем, с августа по сентябрь, в связи с понижением температуры и отсутствием осадков активность микроорганизмов падала. В результате содержание нитратного азота в почве снижалось и практически стабилизировалось на уровне контроля: в начале августа составив 3,9 мг/кг (на контроле 3,7 мг $\text{NO}_3/\text{кг}$), а в начале сентября – 3,2 мг/кг (на контроле 3,1 мг $\text{NO}_3/\text{кг}$). Вероятно, это связано и с продолжением активного роста сахарной свёклы в этот период.

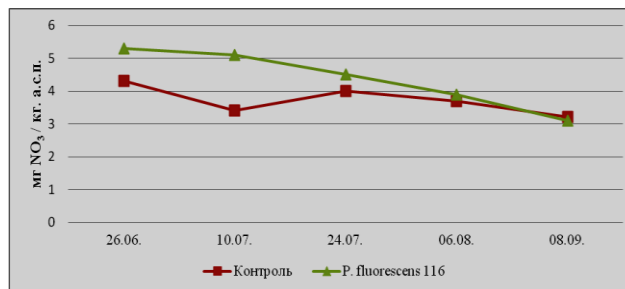


Рис. 2. Динамика содержания нитратного азота в почве (2015 г.) НСР₀₅: по сроку наблюдений – 0,27, по влиянию штамма – 0,27.

Таким образом, проведенные исследования показали, что внесенный в почву под предпосевную культивацию сахарной свёклы штамм *P. fluorescens* 116, способствовал накоплению щелочногидролизующего азота на протяжении всего периода вегетации культуры, а также нитратного азота в почве в первой половине вегетации. Это положительно сказалось на питании культуры и формировании урожая.

В результате, благодаря внесению нового штамма *P. fluorescens* 116, в посевах сахарной свёклы проявилась тенденция к росту урожайности корнеплодов. В 2014 г. она увеличилась на 2,1 т/га, а в 2015 г. – на 6,3 т/га. При этом сахаристость корнеплодов практически не изменялась и колебалась в 2014 г. в пределах 18,9-18,8 %, а в 2015 г. – 21,1-20,9 %. В соответствии с ростом урожайности сахарной свёклы вырос и сбор сахара: в 2014 г. – на 0,3 т/га, в 2015 г. на – 1,2 т/га (табл. 2).

2. Влияние внесения штамма *P. fluorescens* 116 на продуктивность сахарной свёклы

Вариант опыта	Урожайность, т/га	Сахаристость, %	Сбор сахара, т/га
2014 г.			
Контроль	27,3	18,9	5,2
<i>P. fluorescens</i> 116	29,4	18,8	5,5
2015 г.			
Контроль	30,7	21,1	6,5
<i>P. fluorescens</i> 116	37,0	20,9	7,7
НСР ₀₅ :			
по влиянию года	2,39	0,39	0,48
по влиянию штамма	2,93	Нет	0,59

Таким образом, использование в технологии возделывания сахарной свёклы на черноземе выщелоченном штамма ризосферной бактерии *P. fluorescens* 116, обладающей способностью к фиксации азота, пополнило почву доступным для растений азотом, что в итоге сказалось и на продуктивности культуры. Применение ризосферных бактерий, фиксирующих азот, улучшает питание культуры, существенно снижает негативную нагрузку на окружающую среду минеральных удобрений. Поэтому, целесообразно использовать полученные новые штаммы бактерий рода *Pseudomonas*, выделенные из агроценоза сахарной свёклы и обладающие рядом полезных свойств в технологии возделывания культуры.

Литература

- Безлер Н.В., Хуссейн А.С., Петюренко М.Ю. ПЦР идентификация и генетическое разнообразие *Pseudomonas fluorescens*, выделенных из агроценоза сахарной свёклы (*Beta vulgaris* L.) // Вестник ВГУ. – 2016. – № 1. – С. 43 – 49.
- Безлер Н.В., Петюренко М.Ю. Внесение в почву азотфиксирующих бактерий рода *Pseudomonas* и динамика щелочногидролизующего азота // Биологизация земель в адаптивно-ландшафтной системе земледелия: Материалы Всероссийской научно-практической конференции Белгородского научно-исследовательского института сельского хозяйства 14-17 июля 2015 г. – Белгород: Отчий край, 2015. – С. 289 – 292.
- Боронин А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 10. – С. 25 – 31.
- Минеев В.Г., Шабаетов В.П., Сафрина О.С., Смолин В.Ю. Влияние бактерий рода *Pseudomonas* на урожай столовой свёклы и вынос азота

растениями // Доклады ВАСХНИЛ. - 1991. - № 9. - С. 26 – 31.

5. Минеев В.Г., Сафрина О.С., Шаббаев В. П. Химический состав растений столовой свёклы, инокулированных бактериями рода *Pseudomonas* // Доклады ВАСХНИЛ. - 1991. - № 10. - С. 21 – 26.

6. Шаббаев В.П. Влияние инокуляции сахарной свёклы ростстимулирующими ризосферными бактериями рода *Pseudomonas* на урожай и качество растений // Агрохимия. - 2008. - №4. - С. 35 – 42.

7. Chan, Y.K., Barraquio W. L., Knowles R. N₂ – fixing pseudomonads and related soil bacteria // FEMS Microbiol. Rev. 1994. p. 95 – 117.

8. Helmut B, Widmer F., Von Sigler W., Zeyer J. New Molecular Screening Tools for Analysis of Free-Living Diazotrophs in Soil // Applied and environmental microbiology Jan. 2004, Vol. 70, No. 1. p. 240 – 247

SOIL APPLICATION OF NITROGEN-FIXING BACTERIA *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* 116 AND THE DYNAMICS OF AVAILABLE NITROGEN FORMS IN SUGAR BEET FIELDS

N.V. Bezler, M.Yu. Petyurenko, A.S. Khussein,

Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar

VNIIS 86, Ramon district, Voronezh oblast, 396030 Russia, e-mail: bezler@list.ru

Bacterium of the Pseudomonas fluorescens genus, strain 116, has been isolated from sugar beet root surface. Its nitrogen-fixing ability has been revealed. It has been determined that its introducing into sugar beet fields increases the contents of alkali-hydrolyzable and nitrate nitrogen in the soil. Positive influence of the strain on crop yield has been noted.

Keywords: Pseudomonas, P. fluorescens, sugar beet, alkali-hydrolyzable nitrogen, nitrate nitrogen, productivity.