

На правах рукописи



Петюренко Марта Юрьевна

**ВЛИЯНИЕ ИНТРОДУКЦИИ В ПОЧВУ БАКТЕРИЙ
РОДА *PSEUDOMONAS*, СПОСОБНЫХ ФИКСИРОВАТЬ
АЗОТ, НА ПРОДУКТИВНОСТЬ САХАРНОЙ СВЁКЛЫ**

Специальность 06.01.01 – общее земледелие, растениеводство

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Рамонь – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова» в 2013-2016 гг.

Научный руководитель: доктор сельскохозяйственных наук,
Безлер Надежда Викторовна.

Официальные оппоненты: **Турусов Виктор Иванович**, доктор сельскохозяйственных наук, академик РАН, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Центрально-Черноземной полосы имени В.В. Докучаева», директор;

Лукин Алексей Леонидович, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», заведующий кафедрой биологии и защиты растений.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Курский научно-исследовательский институт агропромышленного производства».

Защита диссертации состоится «03» марта 2017 года в 10:00 на заседании диссертационного совета Д 006.065.01, созданного на базе ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», по адресу: 396030, Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС, д. 86; тел./факс (47340) 5-33-26; e-mail: dissovetsvniiss@mail.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «ВНИИСС имени А.Л. Мазлумова» и на сайте www.gnuvniiss.narod.ru.

Автореферат разослан _____ 2017 г., размещен на сайте www.gnuvniiss.narod.ru. «29» декабря 2016 г., на сайте ВАК Минобрнауки РФ <https://vak3.ed.gov.ru> «30» декабря 2016 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
д-р с.-х. наук



Минакова
Ольга Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. В Российской Федерации сахарная свёкла является одной из важнейших технических культур, дающей сырьё для сахарной промышленности. При рекомендованных дозах удобрений на черноземах и других почвах получают высокие урожаи этой культуры. Почвы, на которых выращивают эту культуру, содержат все необходимые элементы минерального питания. Однако азот, как правило, находится в минимуме, и растения испытывают его недостаток в результате потребления его культурой, высокой подвижности нитратов и процесса денитрификации (Зубенко В.Ф., 1979; Кураков В.И., 1992, 2004; Минеев В.Г., 2006; Минакова О.А., 2010).

Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, благодаря наличию у них *nifH* гена, принимают участие в фиксации атмосферного азота и способствуют пополнению запасов азота в почве (Мишустин Е.Н., 1984; Chan Y. K., 1994; Despoues N., 2003; Natayama K., 2005; Lalucat J., 2006; Емцев В.Т., 2014).

В.Г. Минеевым (1991) установлено, что внесение в пойменную почву бактерий рода *Pseudomonas*, фиксирующих азот, увеличивало урожай корнеплодов столовой свёклы на 35 %. В.П. Шабаев (2012) в микрополевом опыте на черноземе выщелоченным показал, что инокуляция семян сахарной свёклы азотфиксирующей бактерией *Pseudomonas putida* 23 способствовала повышению не только урожайности корнеплодов на 25 %, но и содержания водорастворимых сахаров в корнеплодах на 22 %.

В течение последних лет выявлено, что использование в сельском хозяйстве ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* стимулирует рост и развитие растений за счет продуцирования фитогормонов, подавления фитопатогенных микроорганизмов, увеличения доступности в почве питательных элементов, активизации микробиологической азотфиксации (Osburn R.M., 1989; Смирнов В.В., 1990; Боронин А.М., 1998; Nielsen M.N., 1998; Логинов О.Н., 2006). Применение биологических препаратов, созданных на основе азотфиксирующих микроорганизмов, является одним из новых направлений и технологических приемов, способствующих повышению урожая сельскохозяйственных культур, что показано в работах многих учёных (Умаров М.М., 1986; Кожемяков А.П., 1989, 1997; Завалин А.А., 2005; Тихонович И.А., 2005; Емцев В.Т., 2014). Особенное теоретическое и практическое значение в этом направлении имеют работы сотрудников института сельскохозяйственной микробиологии (Воробьев Н.И.; Кожемяков А.П.; Тихонович И.А.; Чеботарь В.К., 2005).

В настоящее время эффективность внесения бактерий в агроценоз сахарной свёклы и их влияние на накопление доступного для растений азота в почве и формирование микробного сообщества на разных типах почв и при различных уровнях минерального питания изучены недостаточно. В связи с этим актуальным является поиск аборигенных штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, способных фиксировать азот, а также изучение особенностей их интродукции в агроценоз сахарной свёклы для улучшения азотного пита-

ния растений и повышения продуктивности культуры.

Объект исследований – штамм *P. fluorescens* 116, выделенный из ризопланы сахарной свёклы, штамм *Pseudomonas* sp. 110, выделенный из ризосферы сахарной свёклы.

Предмет исследований – влияние бактерий рода *Pseudomonas*, способных фиксировать азот, на продуктивность культуры.

Цель исследований – выделить и изучить новые штаммы бактерий рода *Pseudomonas* из ризосферы и ризопланы сахарной свёклы, способных фиксировать азот и тем самым оптимизировать азотное питание культуры, увеличивать при их интродукции в почву численность агрономически ценной микрофлоры, повышать продуктивность культуры.

В соответствии с поставленной целью исследования решались следующие задачи:

- провести скрининг штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из почвы, ризосферы и ризопланы сахарной свёклы;

- выявить наличие гена *nifH* в штаммах бактерий рода *Pseudomonas*, ответственного за фиксацию азота;

- определить динамику накопления щелочногидролизуемого, нитратного, аммонийного азота в почве при интродукции штаммов псевдомонад;

- выявить влияние штаммов псевдомонад на динамику численности основных таксономических, физиологических и эколого-трофических групп микроорганизмов в агроценозе сахарной свёклы в системе почва – ризосфера – ризоплана;

- определить влияние штаммов псевдомонад на массу 100 растений сахарной свёклы и пораженность их корневидом;

- установить их влияние на продуктивность фотосинтеза;

- оценить влияние штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas* sp. 110 на продуктивность сахарной свёклы;

- рассчитать экономическую эффективность использования штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas* sp. 110 при возделывании сахарной свёклы.

Научная новизна полученных результатов. Впервые выделены новые штаммы бактерий рода *Pseudomonas* из почвы (чернозем выщелоченный), ризосферы и ризопланы сахарной свёклы. У штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas* sp. 110 впервые был получен продукт амплификации с праймером *nifH-univ* (размер 473 п.н. и 595 п.н. соответственно), что доказало наличие *nifH* гена, ответственного за фиксацию азота.

Установлена способность штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas* sp. 110 продуцировать природный фитогормон – индолил-3-уксусную кислоту и синтезировать свободные аминокислоты.

Впервые выявлено увеличение содержания щелочногидролизуемого и нитратного азота в черноземе выщелоченном под сахарной свёклой при интродукции штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas* sp. 110 в почву.

Получены новые данные о распределении штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas* sp. 110 после их интродукции в агроценоз сахарной свёклы в системе почва – ризосфера – ризоплана. Наиболее высокая их численность

обнаружена в ризоплане сахарной свёклы, что подтверждает перемещение бактерий к корням и их колонизацию.

Установлено, что штаммы *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 сдерживают рост численности микромицетов, среди которых встречаются факультативные фитопатогены, в ризоплане в начальный период вегетации сахарной свёклы, что способствует снижению распространения корнееда до 18,2 и 12,4 % (в контроле – 25,3 %). Экспериментально доказано положительное влияние штаммов на улучшение азотного питания культуры, увеличение продуктивности фотосинтеза и повышение урожайности.

Теоретическая значимость. Впервые экспериментально установлена закономерность увеличения численности интродуцированных в агроценоз сахарной свёклы штаммов псевдомонад в ряду почва < ризосфера < ризоплана, что имеет теоретическое значение в биоценологии при формировании агрофитосистем. С помощью полимеразно цепной реакции доказана способность штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 фиксировать азот, а тестовым методом – способность продуцировать в окружающую среду гетероауксин. У изученных штаммов выявлено проявление антагонистических свойств по отношению к микромицетам в первой половине вегетации сахарной свёклы, что имеет теоретическое значение при разработке системы защиты проростков от корнееда. Способность *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 продуцировать в окружающую среду аминокислоты теоретически аргументирует накопление в почве щелочногидролизуемого азота и формирование фонда доступных для растений его форм. Результаты исследований расширяют и дополняют теоретические и практические данные о влиянии внесения азотфиксирующих ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* на урожай и азотное питание сахарной свёклы при выращивании на черноземе выщелоченном в условиях ЦЧР.

Практическая значимость. Разработан прием пополнения запасов доступного азота в почве с помощью бактерий рода *Pseudomonas*, фиксирующих азот, что способствует росту урожайности сахарной свёклы на 7,0-16,5 % и увеличению сбора сахара на 0,48-0,91 т/га.

Интродукция в почву бактерий *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 способствует накоплению доступного для растений азота, увеличению численности микроорганизмов, участвующих в формировании эффективного плодородия. Установленное в процессе исследований положительное влияние бактерий рода *Pseudomonas* на растения сахарной свёклы представляет практический интерес для повышения продуктивности культуры в свекловичных агроценозах. Результаты по молекулярной диагностике бактерий рода *Pseudomonas* целесообразно использовать в учебном процессе на агрономических факультетах вузов при подготовке студентов по сельскохозяйственным специальностям.

Положения, выносимые на защиту:

1. Внесение под предпосевную культивацию в агроценоз сахарной свёклы штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 обуславливает колонизацию ими корневой системы растений, оптимизацию структуры микробного сообщества ризосферы и ризопланы этой культуры.

2. Штаммы *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 способны фиксиро-

вать азот и сбалансировать азотное питание сахарной свёклы.

3. Интродукция штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 повышает фотосинтетическую активность и продуктивность сахарной свёклы.

4. Использование штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 повышает экономическую эффективность возделывания сахарной свёклы.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были доложены, обсуждены и получили одобрение на Международной конференции, посвященной 100-летию кафедры ботаники, защиты растений, биохимии и микробиологии Воронежского государственного аграрного университета (Воронеж, 2014), Всероссийской научно-практической конференции Белгородского научно-исследовательского института сельского хозяйства (Белгород, 2015), Международной научно-практической конференции «Проблемы развития современной науки» (Уфа, 2015), научно-практической конференции с международным участием Курского отделения МОО «Общество почвоведов имени В.В. Докучаева» (Курск, 2016), Международной научно-практической конференции «Традиционная и инновационная наука: история, современное состояние, перспективы» (Екатеринбург, 2016), 9-й научно-практической конференции «Перспективы использования инновационных форм удобрений, средств защиты и регуляторов роста растений в агротехнологиях сельскохозяйственных культур» (Анапа, 2016), на VII съезде Общества почвоведов им. В.В. Докучаева с международным участием (Белгород, 2016), а также на заседаниях ученого совета ФГБНУ «ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова» (20014-2016 гг.).

Публикации. Основное содержание диссертации и результаты проведенного исследования нашли отражение в 10 научных работах общим объемом 3,37 п.л. (авторский вклад – 1,60 п.л.), в том числе 2 работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях.

Личный вклад. Автор принимал непосредственное участие на всех этапах проведения исследований: в разработке программы, схемы опыта, планировании и проведении исследований, анализе и обобщении полученных данных, их математической обработке, формулировании выводов, в подготовке публикаций по теме исследования, оформлении диссертационной работы и автореферата. Доля участия автора в исследованиях – более 85,3%.

Структура работы. Диссертация изложена на 144 страницах компьютерного текста, состоит из введения, 7 глав, выводов и предложений производству, списка использованной литературы, включающего 205 наименований, в том числе 67 публикаций иностранных авторов, содержит 13 таблиц, 31 рисунок и 16 приложений.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность доктору биологических наук Т.П. Федуловой, кандидату биологических наук А.С. Хуссейну и сотрудникам отдела биотехнологии ФГБНУ «ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова» за помощь при выполнении работ по молекулярно-генетическим методам, консультации и поддержку идей, а также сотрудникам лаборатории эколого-микробиологических исследований почв за помощь в проведении лабораторных и полевых исследований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2 УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПОЛЕВЫХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Диссертационное исследование выполнялось в 2013-2016 гг. в ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова» и являлось разделом утвержденной темы ФГБНУ «ВНИИСС имени А.Л. Мазлумова» № 0618-2014-0008 «Выделить и изучить новые штаммы микроорганизмов в агроценозе сахарной свёклы, способствующие пополнению почвы элементами питания и повышению её супрессивности».

Климат района исследований умеренно-континентальный с неустойчивым увлажнением. Годы исследований характеризовались разной обеспеченностью влагой. В 2014 г. гидротермический коэффициент вегетационного периода составил 0,57, что позволило охарактеризовать его как засушливый, а в 2015 и 2016 гг. ГТК равнялся соответственно 0,94 и 0,96, что также свидетельствует о недостатке влаги. Сумма эффективных температур в 2014, 2015 и 2016 гг. составила соответственно 3231,0, 3175,3 и 3094,2°C.

На первом этапе исследований проводили выделение бактерий рода *Pseudomonas* из почвы под сахарной свёклой, её ризосферы по методу Красильникова, культивирование микроорганизмов ризопланы сахарной свёклы – по методу Березовой (Сеги Й., 1983).

Молекулярно-генетическую идентификацию выделенных бактерий проводили с использованием родоспецифического праймера PA-GS-F/PA-GS-R для определения рода *Pseudomonas species* и видоспецифического праймера 16SPSEfluF/16SPSER – для определения *P. fluorescens* (Spilker T., 2004; Scarpellini M., 2004). Для исключения среди выделенных штаммов фитопатогенного вида *Pseudomonas syringae* pv *aptata*, вызывающего заболевания сахарной свёклы, проводили амплификацию гена *hrpZ* (Musa A.R., 2001). Для выявления фрагмента гена *nifH* осуществляли амплификацию геномной ДНК выделенных бактерий с праймером *nifH-univ* (Widmer F., 1999; Bürgmann H., 2004). Полученные фрагменты амплификации секвенировали в научно-производственной компании «Синтол» (Москва, Россия).

В лабораторных условиях с использованием метода проращивания семян в рулонах (Казаков Е.Д., 1987, в модификации ВИЗР) определяли фитотоксичность штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 на семенах сахарной свёклы гибрида РМС 120. Способность штаммов псевдомонад к накоплению щелочногидролизующего азота в почве изучали в моделируемом лабораторном опыте в чашках Петри.

Продуцирование свободных аминокислот штаммами устанавливали с помощью качественной реакции с нингидрином, способность к растворению минеральных органофосфатов – на среде Пиковской (Сеги Й., 1983). Продуцирование индолил-3-уксусной кислоты штаммами определяли с помощью метода Гордона-Вебера (Gordon S.A., 1951).

На основании лабораторных исследований был заложен опыт в соот-

ветствии с методикой полевого опыта. Почва опытного участка – чернозем выщелоченный среднегумусный тяжелосуглинистый на карбонатных лёссовидных суглинках. Содержание гумуса 5,5 %, $pH_{\text{сол.}}$ – 5,6, содержание щелочногидролизуемого азота – 52 мг/кг почвы, обменного калия – 12,0 мг/100 г почвы, подвижного фосфора – 11,6 мг/100 г почвы.

В опыте по изучению влияния интродукции в почву бактерий рода *Pseudomonas* на продуктивность сахарной свёклы в 2014 г. площадь посевной делянки составила 27 м², учётной – 10 м², в 2015 и 2016 гг. – соответственно 32,4 м² и 10 м². Повторность опыта четырехкратная, размещение вариантов систематическое. Выращивали гибрид сахарной свёклы РМС 120 в севообороте со следующим чередованием культур: пар – озимая пшеница – сахарная свёкла – ячмень. Удобрения под сахарную свёклу вносили осенью под основную обработку в дозе N₁₀₀P₁₀₀K₁₀₀. Технология возделывания культуры – общепринятая для ЦЧР.

В качестве объекта исследования служили фиксирующие азот штаммы бактерий *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110, которые вносили под предпосевную культивацию в виде водной суспензии опрыскивателем (использовали водопроводную воду) с титром жизнеспособных бактериальных клеток 10⁸ и 10¹⁰ КОЕ/мл. Расход рабочей жидкости составил 200 л/га. В качестве контроля был выбран вариант без обработки бактериальной суспензией.

Количественный учет почвенных микроорганизмов, относящихся к разным таксономическим, физиологическим и эколого-трофическим группам, проводили методом высева суспензий из почвы, ризосферы и ризопланы сахарной свёклы различной степени разведения на селективные питательные среды. Численность внесенных штаммов псевдомонад учитывали на среде Кинг В (Теппер Е.З., 2014). В почвенных образцах, отобранных для микробиологического анализа из слоя почвы 0-20 см, параллельно определяли щелочногидролизуемый азот по методу Корнфилда (в модификации ЦИНАО), нитратный азот – колориметрическим методом с дисульфифеноловой кислотой (ГОСТ 26951-86), аммиачный азот – с реактивом Несслера (ГОСТ 26489-85).

Влияние интродукции псевдомонад на фотосинтетическую активность растений определяли по содержанию в листьях хлорофилла по показаниям прибора N-Tester. Урожайность корнеплодов сахарной свёклы учитывали весовым методом, сахаристость корнеплодов определяли на автоматической поточной линии VENEMA, сбор сахара – расчетным методом (Силин П.М., 1977). Экономическая эффективность рассчитана с использованием нормативов и расценок, действующих в 2016 г. Данные учета урожайности и основные сопутствующие наблюдения подвергались статистической обработке методом дисперсионного анализа (Доспехов Б.А., 1979).

3 ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОТБОР ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*, СПОСОБНЫХ К ФИКСАЦИИ АЗОТА

На первом этапе исследования проводили выделение бактерий флюоресцирующей группы *Pseudomonas* из почвы, ризосферы и ризопланы сахарной свёк-

лы. Образцы отбирали с мая по сентябрь 2013 г. Всего было выделено 13 штаммов, которые проявили способность к образованию флюоресцирующего пигмента на среде King B (рис. 1). Им были присвоены в коллекции номера 36, 67, 75, 77, 91, 91/2, 97, 103, 110, 113, 115, 116, 117. Штаммы под номерами 67, 103 были выделены из почвы под сахарной свёклой, штаммы под номерами 36, 77, 110, 113 – из ризосферы сахарной свёклы, а штаммы под номерами 75, 91, 91/2, 97, 115, 116, 117 – из ризопланы этой культуры.

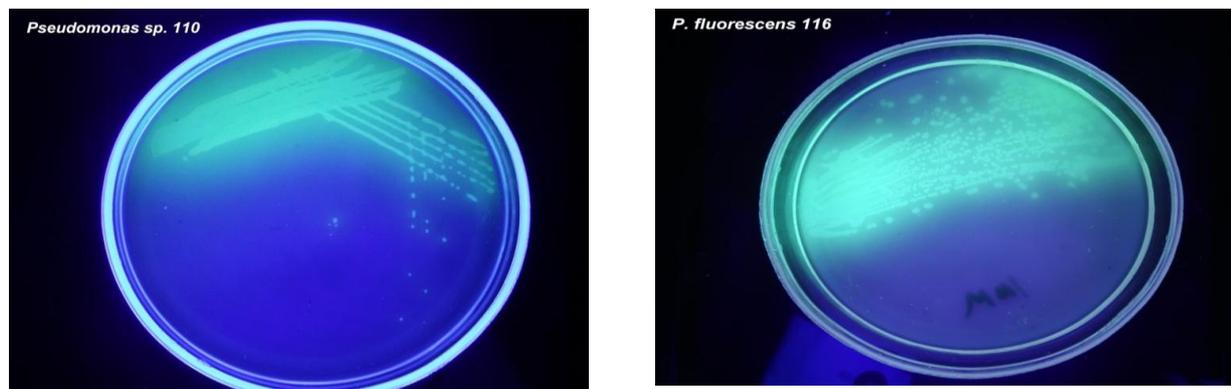


Рисунок 1 – Производство флюоресцирующего пигмента штаммами *Pseudomonas sp.* 110 и *P. fluorescens* 116 на среде King B

Проведенные исследования выявили широкое распространение бактерий рода *Pseudomonas* в посевах сахарной свёклы, особенно в ризоплане, что, по-видимому, связано с использованием бактериями корневых экссудатов культуры в качестве источника питания.

Проведенный ПЦР анализ показал, что все 13 штаммов были идентифицированы как *Pseudomonas species*, а три из них – под номерами 36, 116, 117 были отнесены к виду *P. fluorescens*. ПЦР анализ для выявления фитопатогенного вида *Pseudomonas syringae* pv *aptata* среди выделенных бактерий показал отсутствие соответствующего продукта реакции, что позволило исключить присутствие этого вида среди изучаемых бактерий.

В лабораторном опыте выявлен рост штаммов бактерий рода *Pseudomonas* под номерами 75, 77, 91/2, 110, 116 на безазотистой среде Эшби, что косвенно позволяет судить о способности аэробных микроорганизмов использовать молекулярный азот. В лабораторном опыте изучали способность этих штаммов фиксировать азот в моделируемых условиях в чашках Петри, при этом о фиксации азота судили по накоплению в почве щелочногидролизуемого азота (табл. 1).

Результаты проведенного исследования показали, что наибольшую способность к накоплению азота в почве проявили штаммы *Pseudomonas sp.* 110 и *P. fluorescens* 116. Так, при титре бактериальной суспензии 10^{10} КОЕ/мл было отмечено увеличение содержания щелочногидролизуемого азота соответственно на 83,7 и 49,8 %, а при снижении инокуляционной нагрузки прибавка составила 70,5 и 64,2 %.

Таблица 1 – Накопление щелочногидролизующего азота штаммами псевдомонад в лабораторном опыте

Вариант	Титр бактерий, млн КОЕ/мл	Содержание щелочногидролизующего азота, мг/кг а.с.п.
Контроль	-	55,6
Штамм 75	10^{10}	71,0
	10^8	67,4
Штамм 77	10^{10}	71,6
	10^8	65,0
Штамм 91/2	10^{10}	60,3
	10^8	55,3
Штамм 110	10^{10}	102,1
	10^8	94,8
Штамм 116	10^{10}	83,8
	10^8	91,3

У изучаемых бактерий предварительно была выявлена способность к фиксации азота. При амплификации геномной ДНК штаммов под номерами 116 и 110 с праймером *nifH-univ* установлено наличие ампликонов размером соответственно 595 п.н. и 473 п.н. (по результатам секвенирования), что позволило доказать на генетическом уровне способность к фиксации азота.

В лабораторном опыте выявлена способность штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 к продуцированию индолил-3-уксусной кислоты, свободных аминокислот, растворению трифосфата кальция. При инокуляции семян сахарной свёклы штаммами бактерий *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 не выявлено фитотоксическое воздействие на проростки тест-культуры. Показан ростостимулирующий эффект. Штамм *P. fluorescens* 116 при инокуляционной нагрузке из расчета 10^4 КОЕ/мл, увеличив длину корешка и проростка соответственно на 2,63 и 0,32 см, тем самым увеличил общую массу проростков на 0,23 г. При инокуляции семян сахарной свёклы штаммом *Pseudomonas sp.* 110 фитотоксический эффект также не выявлен. Инокуляция семян штаммом в той же концентрации бактериальных клеток, увеличив длину корешка и проростка соответственно на 0,90 и 1,19 см, увеличила общую массу проростков на 0,21 г.

Таким образом, в результате исследований были отобраны 2 штамма бактерий рода *Pseudomonas* – *P. fluorescens* 116, выделенный из ризопланы сахарной свёклы, и штамм *Pseudomonas sp.* 110, выделенный из ризосферы сахарной свёклы в зернопаропропашном севообороте из чернозема выщелоченного среднегумусного тяжелосуглинистого (опытное поле ВНИИСС Рамонского района), проявивших способность к фиксации азота, синтезу гетероауксина, свободных аминокислот, растворению неорганических соединений фосфора.

4 ВЛИЯНИЕ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* 116 И *PSEUDOMONAS SP.* 110 НА МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО ЧЕРНОЗЕМА ВЫЩЕЛОЧЕННОГО

Аборигенные штаммы микроорганизмов, имеющие хозяйственно зна-

чимые качества, адаптированы к местным экологическим условиям. Они могут оказывать воздействие на микробиологическое сообщество почвы, поэтому важно установить степень их влияния на численность агрономически ценной микрофлоры, а также их распределение в системе почва – ризосфера – ризоплана сахарной свёклы после интродукции в агроценоз сахарной свёклы.

Проведенные исследования показали, что численность интродуцированных в агроценоз сахарной свёклы штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 в системе почва – ризосфера – ризоплана оставалась высокой на протяжении всего вегетационного периода (рис. 2).

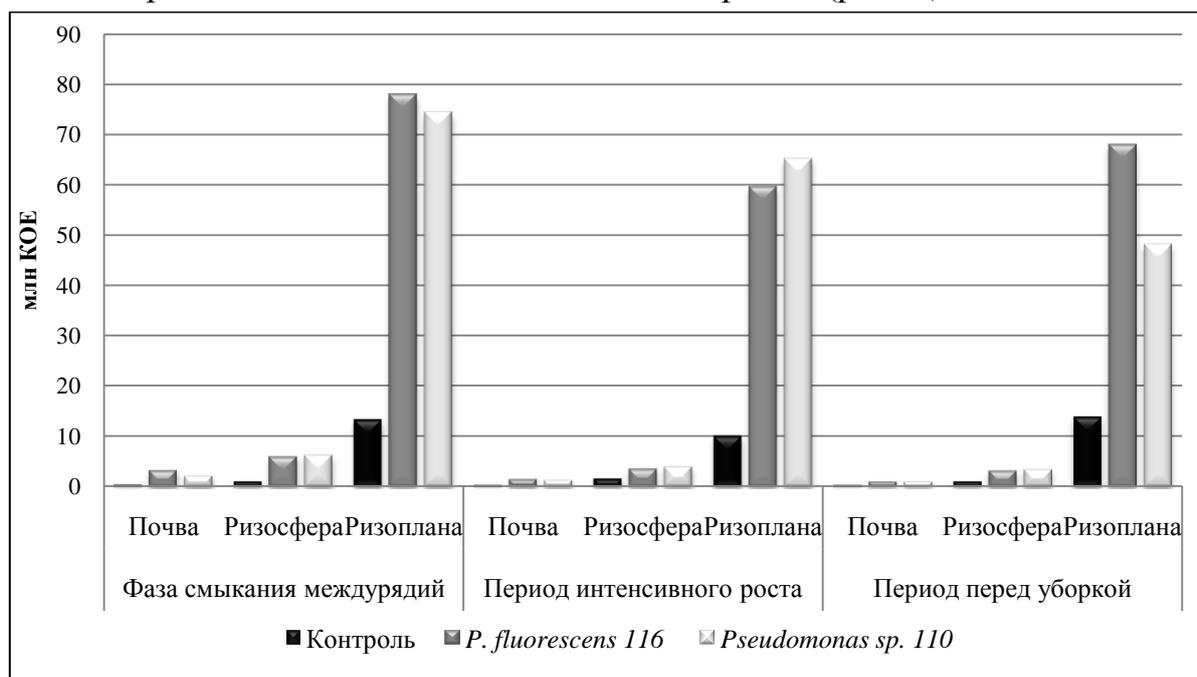


Рисунок 2 – Численность штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 при их интродукции в агроценоз сахарной свёклы в системе почва – ризосфера – ризоплана (2014-2016 гг.) при НСР₀₅ – 2,93

Установлено, что в фазе смыкания междурядий сахарной свёклы численность штамма *P. fluorescens* 116 в почве увеличилась до 3,4 млн КОЕ/1 г абсолютно сухой почвы (а.с.п.) (в контроле – 0,5), в ризосфере – до 6,2 млн КОЕ/1 г а.с.п. (в контроле – 1,2), а численность в ризоплане в 5,9 раза превышала показатель контроля. Спустя месяц, в период интенсивного роста культуры, численность штамма *P. fluorescens* 116 постепенно снижалась по всем средам обитания и составила: в почве – 1,6 млн КОЕ/1 г а.с.п., в ризосфере – 3,7 млн КОЕ/1 г а.с.п., в ризоплане – 59,6 млн КОЕ/1 г сухого вещества корешков (с.в.к.) (в контроле соответственно – 0,4, 1,7, 10,0). К концу вегетационного периода в почве и ризосфере отмечено дальнейшее снижение численности интродуцированного штамма, но в ризоплане его численность была по-прежнему высокой и составила 67,9 млн КОЕ/1 г с.в.к. (в контроле – 13,6).

Динамика численности штамма *Pseudomonas sp.* 110 показала, что интродуценты также успешно заселяли ризосферу и ризоплану развивающихся растений. В фазе смыкания междурядий сахарной свёклы их количество воз-

росло в почве и в ризосфере соответственно на 1,8 и 5,2 млн КОЕ/1 г а.с.п., а их численность на поверхности корней в 5,7 раза превышала показатель контроля. В период интенсивного роста культуры численность штамма *Pseudomonas sp.* 110 постепенно снижалась в почве и ризосфере, оставаясь при этом высокой в ризоплане – 65,1 млн КОЕ/1 г с.в.к. Перед уборкой сахарной свёклы отмечено дальнейшее снижение численности интродуцированного штамма в почве и ризосфере культуры, при этом его численность в ризоплане по-прежнему оставалась высокой – 48,1 млн КОЕ/1 г с.в.к.

Таким образом, проведенные исследования показали, что предпосевное внесение в агроценоз сахарной свёклы штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 позволяет им успешно заселять ризосферу и ризоплану развивающихся растений и выдерживать конкурентное давление со стороны местной микрофлоры, поддерживая свою численность на высоком уровне на протяжении всего вегетационного периода.

Диазотрофы способны фиксировать молекулярный азот, синтезировать витамины и гормоны роста. Свободноживущие микроорганизмы зависят от вида и величины корневого опада, конкурируя с остальными обитателями ризосферы за питательные вещества (Шлегель Г.Г., 1987).

В ходе проведенного исследования установлено, что при интродукции в агроценоз штамма *P. fluorescens* 116 в начале вегетации сахарной свёклы численность diaзотрофов в почве снижалась на 2,1 млн КОЕ/1 г а.с.п. (в контроле – 2,9); в ризосфере и ризоплане, наоборот, был отмечен рост численности изучаемой группировки соответственно на 2,0 млн КОЕ/1 г а.с.п. (в контроле – 1,7) и 8,8 млн КОЕ/1 г с.в.к. (в контроле – 20,9). В период интенсивного роста культуры численность diaзотрофов в почве сокращалась на 0,3 млн КОЕ/1 г а.с.п. (в контроле – 1,2), в ризосфере увеличивалась до 3,6 млн КОЕ/1 г а.с.п. (в контроле – 2,3) и в ризоплане приближалась к контрольным значениям. К концу вегетационного периода сахарной свёклы в почве, ризосфере и ризоплане изучаемой культуры отмечена стабилизация численности diaзотрофов на уровне контроля.

При интродукции в агроценоз сахарной свёклы штамма *Pseudomonas sp.* 110 в фазе смыкания междурядий отмечено снижение численности diaзотрофов в почве на 2,1 млн КОЕ/1 г а.с.п. и рост на 0,4 млн КОЕ/1 г а.с.п. в ризосфере, при этом в ризоплане их численность возрастала в 2,3 раза по отношению к контролю. В период интенсивного роста культуры также наблюдалось снижение diaзотрофов в почве и в ризосфере – соответственно на 0,4 млн КОЕ/1 г а.с.п. и 0,2 млн КОЕ/1 г с.в.к. (в контроле – соответственно 1,2 и 2,3). Интродуцированный штамм не оказывал существенных изменений на численность diaзотрофов в ризоплане. К концу вегетационного периода сахарной свёклы в почве отмечено снижение численности diaзотрофов как в контроле, так и при интродукции штамма *Pseudomonas sp.* 110. Тем не менее, в связи с активным накоплением сахарозы в корнеплодах в этот период, большее её количество поступает в зону ризосферы и ризопланы с экссудатами. В итоге под влиянием штамма *Pseudomonas sp.* 110 отмечено увеличение коли-

чества diaзотрофов в ризосфере на 1,9 млн КОЕ/1 г а.с.п. и в ризоплане – на 8,1 млн КОЕ в 1 г с.в.к. (в контроле – соответственно 2,1 и 26,1).

На основе анализа полученных данных, можно сделать вывод, что на фоне интродукции в почву штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 показан рост популяции diaзотрофов в ризосфере и в ризоплане сахарной свёклы, что, по-видимому, связано с накоплением легкодоступных сахаров.

Микромицеты почв являются полноправным компонентом агроценозов, и играют существенную роль в почве, участвуя, в разложении и трансформации растительных остатков (Бабьева И.П., 1983).

Результаты проведенного исследования показали, что в начале вегетации сахарной свёклы под влиянием штамма *P. fluorescens* 116 количество микромицетов в почве и в ризосфере возросло соответственно на 14,7 и 24,3 тыс. КОЕ/1 г а.с.п. (в контроле соответственно – 44,7 и 95,6) (рис. 3).

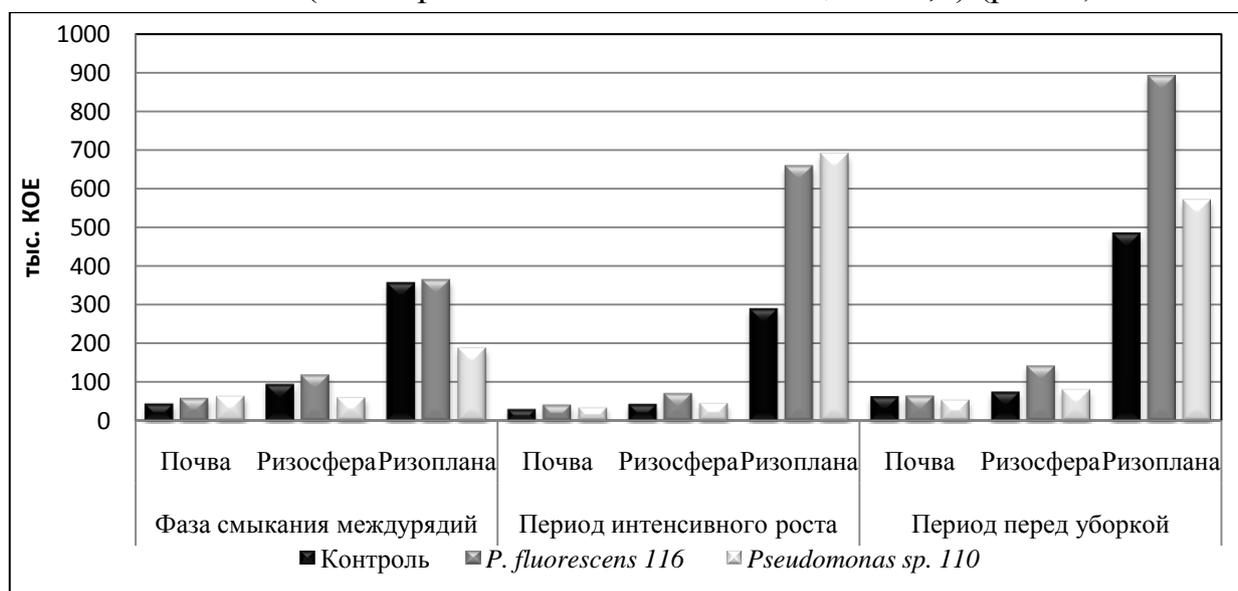


Рисунок 3 – Влияние интродукции в агроценоз сахарной свёклы штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 на численность микромицетов в системе почва – ризосфера – ризоплана (2014-2016 гг.) при НСР₀₅ – 13,30

При этом в ризоплане интродуцированный штамм сдерживал рост численности микромицетов, где она была близка к контрольным значениям, составив 365,4 тыс. КОЕ/1 г с.в.к. (в контроле – 356,9). В период интенсивного роста культуры отмечено увеличение микромицетов уже по всем средам обитания. Выявлено резкое увеличение их численности в ризоплане – в 2,3 раза (в контроле – 289,5 тыс. КОЕ/1 г с.в.к.).

К концу вегетационного периода в почве уже не наблюдалось превышение численности микромицетов после интродукции штамма *P. fluorescens* 116: их количество составило 63,7 тыс. КОЕ/1 г а.с.п. (в контроле – 65,8). В связи с активным накоплением сахарозы в корнеплодах в этот период большее её количество поступает в зону ризосферы и ризопланы с корневыми экссудатами. В итоге максимальное количество микромицетов было сосредоточено именно в ризоплане, где оно составило 891,4 тыс. КОЕ/1 г с.в.к. (в контроле – 483,4).

Интродукция штамма *Pseudomonas sp.* 110 способствовала снижению численности микроскопических грибов в ризосфере и в ризоплане сахарной свёклы в начальный период вегетации культуры соответственно на 34,5 тыс. КОЕ/г а.с.п. и 167,1 тыс. КОЕ/1 г с.в.к. В период интенсивного роста культуры в почве и в ризосфере существенных колебаний численности микромицетов выявлено не было. К концу вегетационного периода под воздействием интродуцированного штамма в агроценоз сахарной свёклы в системе почва – ризосфера – ризоплана количество микромицетов значительно не изменялось. Так, их количество составило: в почве – 54,5 (в контроле – 63,7), в ризосфере – 82,5 тыс. КОЕ/1 г а.с.п. (в контроле – 75,5), в ризоплане – 571,0 тыс. КОЕ/1 г с.в.к. (в контроле – 483,4). Вероятнее всего, это связано с более широким спектром антагонизма этого штамма по отношению к фитопатогенным грибам.

Таким образом, показано, что интродукция в агроценоз сахарной свёклы штамма *P. fluorescens* 116 в начальный период вегетации культуры стабилизирует численность почвенных микромицетов в ризоплане, а интродукция штамма *Pseudomonas sp.* 110 сдерживает их развитие в ризоплане в 1,9 раза.

Ряд неорганических форм фосфора в почве не доступен для растений, но многие микроорганизмы способны их трансформировать в растворимые соединения (Ягодин Б.А. 1989; Минеев В.Г., 2004). Проведенные исследования позволили выявить положительное влияние интродуцированных штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 на численность фосфобактерий.

Установлено, что интродукция в агроценоз сахарной свёклы штамма *P. fluorescens* 116 на протяжении первых двух периодов вегетации культуры способствовала увеличению численности этой группировки по всем средам обитания. Так, в фазе смыкания междурядий численность фосфобактерий в почве увеличилась на 2,4 млн КОЕ /1 г а.с.п. (в контроле – 1,2), в ризосфере – на 0,5 млн КОЕ /1 г а.с.п. (в контроле – 3,7), а в ризоплане – на 16,1 млн КОЕ/ 1 г с.в.к. (в контроле – 37,8). Спустя месяц рост численности фосфобактерий составил: в почве – 0,1 млн КОЕ/1 г а.с.п. (в контроле – 0,5), в ризосфере – 1,1 млн КОЕ /1 г а.с.п. (в контроле – 2,6), в ризоплане – 20,5 млн КОЕ/1 г с.в.к. (в контроле – 32,5). Наибольшее количество фосфобактерий отмечено на поверхности корней. В первую очередь, это связано с тем, что именно в этой зоне идет активное развитие микроорганизмов за счет выделения корневых экссудатов вдоль корня с образованием органических кислот, способствующих разложению минеральных форм фосфатов. В конце вегетационного периода в ризоплане наблюдалось снижение численности фосфобактерий почти в 1,9 раза, что может быть связано с перегруппировкой микробного сообщества.

Сходный механизм действия на численность фосфобактерий наблюдался и при интродукции штамма *Pseudomonas sp.* 110: был отмечен рост численности фосфобактерий на протяжении первых двух периодов вегетации сахарной свёклы в почве, ризосфере и ризоплане. Так, в фазе смыкания междурядий количество изучаемой группировки в почве увеличилось на 1,2 млн КОЕ/1 г а.с.п., в ризосфере – на 1,4 млн КОЕ/1 г а.с.п., а в ризоплане на – 12,6 млн КОЕ/1 г с.в.к. В период активного роста культуры увеличение численности микроорганизмов, участвующих в трансформации минеральных фосфа-

тов, составило: в почве – 1,4 млн КОЕ/1 г а.с.п., в ризосфере – 1,0 млн КОЕ/1 г а.с.п., в ризоплане – 2,2 млн КОЕ/1 г с.в.к. В конце вегетационного периода культуры в ризоплане численность фосфобактерий снижалась относительно контроля почти в 3 раза.

Таким образом, установлено, что интродукция штаммов псевдомонад не подавляет развитие эколого-трофических групп микроорганизмов в почве. Интродукция штамма *P. fluorescens* 116 способствует увеличению численности фосфобактерий на поверхности корней в фазе смыкания междурядий и период интенсивного роста соответственно на 42,5-63,2 %, diaзотрофов на поверхности корней в фазе смыкания междурядий – на 42,0 %. Интродукция штамма *Pseudomonas sp.* 110 способствует увеличению количества фосфобактерий на поверхности корней в фазе смыкания междурядий и период интенсивного роста соответственно на 33,2-6,8 %, diaзотрофов в ризоплане в первый период вегетации – на 125 %.

5 УЧАСТИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS* В ПРОЦЕССЕ НАКОПЛЕНИЯ ДОСТУПНОГО АЗОТА В ПОЧВЕ

В агрономическом отношении содержание щелочногидролизуемого азота представляет особый интерес. Это форма, по существу, характеризует количество потенциально доступного для растений азота, что отражает уровень эффективного плодородия. Если минеральные формы характеризуют текущий запас усвояемого азота, то легкогидролизуемый азот дает представление о мобильных органических соединениях, используемых растениями в течение всего вегетационного периода (Адерихин П.Г., Щербаков А.П., 1974; Щербаков А.П., 1983).

В ходе исследований было установлено, что в контроле содержание щелочногидролизуемого азота в фазе смыкания междурядий составило 77,0 мг/кг, в период интенсивного роста этот показатель существенно не менялся и был равен 77,4 мг/кг. К концу вегетационного периода содержание изучаемой формы азота в почве снижалось и составило 75,2 мг/кг, что характеризует высокую способность микробного сообщества выщелоченного чернозема к фиксации азота и процессу аммонификации (табл. 2).

Таблица 2 – Влияние внесения бактерий *Pseudomonas* на динамику щелочногидролизуемого азота в почве под сахарной свёклой, мг/кг почвы (2014-2016 гг.)

Вариант	Фаза смыкания междурядий	Период интенсивного роста культуры	Период перед уборкой
Контроль	77,0	77,7	75,2
<i>P. fluorescens</i> 116 (титр 10 ¹⁰ КОЕ/мл)	92,4	90,3	86,0
<i>P. fluorescens</i> 116 (титр 10 ⁸ КОЕ/мл)	87,3	88,6	84,0
<i>Pseudomonas sp.</i> 110 (титр 10 ¹⁰ КОЕ/мл)	86,4	92,4	87,0
<i>Pseudomonas sp.</i> 110 (титр 10 ⁸ КОЕ/мл)	90,0	93,9	92,4
НСР ₀₅		2,38	

Под влиянием интродукции штамма *P. fluorescens* 116 (титр 10^{10} КОЕ/мл) в почве наблюдалось накопление щелочногидролизуемого азота в течение всего периода вегетации. Его запасы достоверно превышали контрольные показатели в фазе смыкания междурядий, в период интенсивного роста и в сентябре соответственно на 12,6, 15,4 и 10,8 мг/кг. Отмечено, что снижение титра бактерий также положительно сказывалось на накоплении доступной для растений формы азота. Так, в фазе смыкания междурядий его количество превышало контроль на 10,3 мг/кг, в период интенсивного роста – на 10,9 и перед уборкой корнеплодов – на 8,8 мг/кг.

Таким образом, запасы щелочногидролизуемого азота при интродукции штамма *P. fluorescens* 116 снижались от начала к концу вегетации. Отмечено, что перед уборкой прибавка изучаемой формы азота была ниже, чем в предыдущие сроки наблюдений, что связано с активным потреблением элемента сахарной свеклой в процессе роста.

Результаты исследований показали, что интродукция штамма *Pseudomonas sp.* 110 в агроценоз сахарной свёклы также способствовала накоплению изучаемой формы азота на протяжении всего периода вегетации. Внесение штамма *Pseudomonas sp.* 110 (титр 10^{10} КОЕ/мл) способствовало достоверному увеличению содержания щелочногидролизуемого азота в почве в фазе смыкания междурядий, в период интенсивного роста и в сентябре соответственно до 86,4, 92,4 и 87,0 мг/кг, что было выше контроля на 9,4, 14,7 и 11,8 мг/кг. Снижение титра бактерий до 10^8 КОЕ/мл оказалось более эффективным в накоплении щелочногидролизуемого азота в почве. Так, в этом варианте в фазе смыкания междурядий, в середине вегетационного периода и к сентябрю его содержание превышало контроль соответственно на 13,0, 16,2 и 17,2 мг/кг.

Таким образом, накопление щелочногидролизуемого азота в почве зависит от штамма и его титра при интродукции.

Данные 2016 г. не выявили наличие аммиачной формы азота в почве в достоверном количестве, что может быть связано с активным процессом аммонификации – нитрификации, протекающим в черноземных почвах.

Содержание нитратов характеризует обеспеченность почвы минеральным азотом, а также степень выраженности процесса нитрификации, т.е. биологического окисления аммиака до азотсодержащих органических соединений. В связи с тем, что бактерии рода *Pseudomonas* принимают участие и в процессах аммонификации, они косвенно могут влиять на протекающий в почве процесс нитрификации (Шлегель Г.Г., 1979; Емцев В.Т., 2014).

Полученные в ходе проведения исследования данные свидетельствуют о накоплении нитратного азота в почве при интродукции штаммов псевдомонад в агроценоз сахарной свёклы в первой половине вегетации.

Результаты выполненных в 2015 г. анализов показали, что внесение штамма *P. fluorescens* 116 (титр 10^{10} и 10^8 КОЕ/мл) способствовало увеличению содержания нитратного азота в почве в июне соответственно на 1,0 и 1,7

мг NO₃/кг (в контроле – 4,3). Интродукция штамма *Pseudomonas sp.* 110 в этот же период повысила содержание изучаемой формы азота на 1,4 мг NO₃/кг.

Спустя месяц, в июле, сложившиеся благоприятные температурно-влажностные условия (ГТК=1,5), способствовали активной минерализации органических остатков и последующей нитрификации. Однако в этот период значительно активизировался рост сахарной свеклы, что привело к активному поглощению ею нитратного азота и снижению его содержания в почве. В июле, на делянках, где вносили штамм *P. fluorescens* 116 (титр 10¹⁰ и 10⁸ КОЕ/мл) количество нитратного азота повысилось соответственно на 0,5 и 0,8 мг NO₃/кг. Под воздействием штамма *Pseudomonas sp.* 110 (титр 10¹⁰ и 10⁸ КОЕ/мл) отмечено увеличение количества нитратов на 1,2 и 0,5 мг NO₃/кг, благодаря фиксации атмосферного азота и дальнейшей его трансформации микроорганизмами (в контроле – 4,0). В дальнейшем, с августа по сентябрь, в связи с понижением температуры и отсутствием осадков активность микроорганизмов падала, содержание нитратного азота в почве снижалось и практически стабилизировалось на уровне контроля (табл. 3).

В 2016 году закономерность динамики накопления нитратного азота в почве сохранялась. В ходе исследований было установлено, что в контроле его содержание в июле составило 4,8, а в июле – 3,1 мг NO₃/кг, а к концу вегетационного периода в связи с потреблением его культурой и затуханием микробиологической деятельности снижалось в августе до 2,8, в сентябре до – 1,7 мг NO₃/кг. Интродукция штамма *P. fluorescens* 116 (титр 10¹⁰ и 10⁸ КОЕ/мл) в июне способствовала увеличению содержания нитратного азота в почве соответственно на 1,4 и 1,8 мг NO₃/кг, а штамма *Pseudomonas sp.* 110 (титр 10⁸ КОЕ/мл) – на 1,4 мг NO₃/кг (в контроле – 4,8).

Таблица 3 – Бактерии рода *Pseudomonas* и динамика нитратного азота в почве, мг NO₃/кг (2015-2016 гг.)

Вариант	Даты отбора							
	2015 г.				2016 г.			
	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Июнь	Июль	Август	Сентябрь
Контроль	4,3	4,0	3,7	3,2	4,8	3,1	2,8	1,7
<i>P. fluorescens</i> 116 (титр 10 ¹⁰ КОЕ/мл)	5,3	4,5	3,9	3,1	6,2	6,3	5,5	1,9
<i>P. fluorescens</i> 116 (титр 10 ⁸ КОЕ/мл)	6,0	4,8	3,8	3,5	6,6	3,5	3,1	1,9
<i>Pseudomonas sp.</i> 110 (титр 10 ¹⁰ КОЕ/мл)	5,7	5,2	4,1	3,1	4,7	7,6	5,9	2,0
<i>Pseudomonas sp.</i> 110 (титр 10 ⁸ КОЕ/мл)	5,7	4,5	4,0	3,6	6,2	9,6	4,7	1,9
НСР ₀₅	0,27				0,15			

Спустя месяц, в июле, активное накопление нитратов было отмечено при интродукции штамма *P. fluorescens* 116 (титр 10¹⁰ КОЕ/мл) и составило – 6,3 мг NO₃/кг. Использование штамма *Pseudomonas sp.* 110 (титр 10¹⁰ и 10⁸

КОЕ/мл) в этот период также способствовало накоплению нитратного азота: прибавка составила 4,5-6,5 мг NO₃/кг. В августе содержание изучаемой формы азота под воздействием штамма *Pseudomonas sp.* 110 превышало показатели варианта интродукции штамма *P. fluorescens* 116 и колебалось в пределах 4,7-5,9 мг NO₃/кг (в контроле – 2,8). К моменту уборки сахарной свёклы, в сентябре, в связи с затуханием микробиологической деятельности и перегруппировкой микробного сообщества почвы, накопление нитратного азота не наблюдалось.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что внесенные в почву под предпосевную культивацию сахарной свёклы штаммы бактерий *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 способствуют накоплению нитратного азота в почве в первой половине и середине вегетации, что положительно сказывается на питании культуры и формировании урожая.

6 ПРОДУКТИВНОСТЬ САХАРНОЙ СВЁКЛЫ ПРИ ИНТРОДУКЦИИ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* 116 И *PSEUDOMONAS SP.* 110

Изучение динамики появления всходов показало, что на контроле густота всходов составила в первый день наблюдений 5,7 шт. 1 п. м., а в последний день наблюдений – 6,2 шт. 1 п. м.

Внесение штамма *P. fluorescens* 116 (титр 10¹⁰ КОЕ/мл) ускорило прорастание семян, количество проростков на 1 п. м в последний день наблюдений составило 6,7 шт. То есть густота всходов увеличилась на 8,1 %. Снижение титра, наоборот, уменьшало густоту всходов сахарной свёклы на протяжении всего периода вегетации, как по сравнению с контролем, так и по сравнению с другими вариантами. Число проростков в первый день было ниже на 10,5 %, а в последний день учёта – на 11,3 % относительно контроля. Это, вероятно, связано с динамикой численности микромицетов на поверхности корней.

Наблюдения показали, что штамм *Pseudomonas sp.* 110 (титр 10⁸ КОЕ/мл) достоверно повысил густоту всходов относительно контроля в первый день на 10,5 %, но к последнему дню учёта этот показатель снижался. Повышение титра бактериальной суспензии до 10¹⁰ КОЕ/мл не оказало влияния на динамику всходов проростков сахарной свёклы, и к последнему дню учёта густота всходов составила 6,3 шт. 1 п. м. (близко к контролю).

С конечной продуктивностью культуры связано накопление массы сахарной свёклы в начальный период роста (Зубенко В.Ф., 1979).

Определение массы 100 растений в фазу 1-й пары настоящих листьев показало, что интродуцированные в агроценоз сахарной свёклы штаммы *Pseudomonas sp.* 110 и *P. fluorescens* 116, благодаря способности фиксировать азот и продуцировать в окружающую среду природный фитогормон – индол-3-уксусную кислоту, способствовали более активному росту сахарной свёклы в начальный период (табл. 4).

Таблица 4 – Влияние внесения псевдомонад на распространение корнееда, массу 100 растений и содержание сухого вещества (2014-2016 гг.)

Вариант	Масса 100 растений		Распространение корнееда		Содержание сухого вещества в целых растениях	
	%	% к контролю	%	% к контролю	%	% к контролю
Контроль	59,3	100,0	25,3	100,0	8,8	100,0
<i>P. fluorescens</i> 116 (титр 10^{10} КОЕ/мл)	72,4	22,0	19,6	79,8	10,8	23,5
<i>P. fluorescens</i> 116 (титр 10^8 КОЕ/мл)	73,9	24,7	18,2	72,0	10,3	17,1
<i>Pseudomonas sp.</i> 110 (титр 10^{10} КОЕ/мл)	81,0	36,6	14,9	50,9	10,4	18,1
<i>Pseudomonas sp.</i> 110 (титр 10^8 КОЕ/мл)	71,3	20,2	12,4	49,1	9,3	6,0
НСР ₀₅	8,9		0,17		0,14	

В посевах гибрида РМС 120 интродукция штамма *P. fluorescens* 116 способствовала увеличению массы 100 проростков сахарной свёклы соответственно на 22,0 и 24,7 %, а штамма *Pseudomonas sp.* 110 – соответственно на 36,6 и 20,2 %.

Благодаря более активному росту в начальный период вегетации и нарастанию массы 100 растений сахарной свёклы под воздействием штаммов псевдомонад увеличилось и содержание сухого вещества в целых растениях. Данный показатель зависел от вида штамма и его концентрации. Наибольшее увеличение сухого вещества в ювенильных растениях сахарной свёклы отмечено при интродукции в почву штамма *P. fluorescens* 116 (титр 10^{10} КОЕ/мл) – на 23,5% выше по отношению к контролю.

Наблюдения за ростом и развитием сахарной свёклы показали, что распространение корнееда во всех вариантах опыта было ниже по сравнению с контролем. Степень распространения этого заболевания под воздействием штамма *P. fluorescens* 116 (титр 10^{10} и 10^8 КОЕ/мл) соответственно снижалась до 19,6 и 18,2% (в контроле – 25,3%). Интродукция штамма *Pseudomonas sp.* 110 оказалась более эффективной в сдерживании данного заболевания. Количество растений, пораженных корнеедом, снижалось и составило 14,9 % (титр 10^{10} КОЕ/мл) и 12,4 % (титр 10^8 КОЕ/мл).

Результаты опытов позволили установить положительное влияние штаммов псевдомонад на продуктивность фотосинтеза. Внесение штаммов псевдомонад достоверно увеличило показатель содержания хлорофилла в листьях.

Максимальные значения содержания хлорофилла в листьях отмечены при интродукции штамма *P. fluorescens* 116 (титр 10^{10} КОЕ/мл) и *Pseudomonas sp.* 110 (титр 10^8 КОЕ/мл) – 555 и 563 усл. ед., что превысило показатели контрольного варианта соответственно на 5,3 и 6,8 % (в контроле – 527 усл. ед.). Коэффициент продуктивности фотосинтеза при интродукции штаммов *P. fluorescens* 116 (титр 10^{10} КОЕ/мл) и *Pseudomonas sp.* 110 (титр

10⁸ КОЕ/мл) вырос соответственно на 0,74 (15,0 %) и 0,56 (11,4 %) при 4,93 в контроле.

Таким образом, использование штаммов псевдомонад оказывает положительное влияние на ювенильные растения сахарной свёклы, тем самым увеличивая густоту всходов культуры, снижая распространение корнееда у проростков и способствуя нарастанию массы растений сахарной свёклы на начальном этапе онтогенеза.

Изменения, вызванные влиянием бактерий рода *Pseudomonas* на растения и микробное сообщество чернозёма выщелоченного, особенно среди тех групп, которые определяют эффективное плодородие почвы, оказали положительное влияние на условия питания и, в конечном итоге, на продуктивность сахарной свёклы.

В результате интродукция в почву под предпосевную культивацию штамма *P. fluorescens* 116 (титр 10¹⁰ КОЕ/мл) в посевах сахарной свёклы способствовала росту урожайности корнеплодов на 5,20 т/га, при этом снижение титра не оказало значимого влияния на увеличение урожайности. Несмотря на то, что интродукция изучаемого штамма в обеих концентрациях не оказала существенного влияния на сахаристость корнеплодов (содержание сахара колебалось в пределах 18,67-19,10 %), был отмечен рост сбора сахара с гектара за счет увеличения урожайности: при титре 10¹⁰ КОЕ/мл – на 0,91 т/га, при титре 10⁸ КОЕ/мл – на 0,15 т/га (табл. 5).

Таблица 5 – Влияние внесения штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 на продуктивность сахарной свёклы (2014-2016 гг.)

Вариант	Урожайность		Сахаристость		Сбор сахара	
	т/га	±d	%	±d	т/га	±d
Контроль	31,37	-	18,77	-	5,85	-
<i>P. fluorescens</i> 116 (титр 10 ¹⁰ КОЕ/мл)	36,56	5,20	18,67	-0,10	6,76	0,91
<i>P. fluorescens</i> 116 (титр 10 ⁸ КОЕ/мл)	31,50	0,13	19,10	0,33	6,00	0,15
<i>Pseudomonas sp.</i> 110 (титр 10 ¹⁰ КОЕ/мл)	28,91	-2,46	19,13	0,36	5,54	-0,31
<i>Pseudomonas sp.</i> 110 (титр 10 ⁸ КОЕ/мл)	33,57	2,20	19,11	0,34	6,33	0,48
НСР ₀₅	2,20		Нет		0,41	

Результаты полевых опытов показали, что урожайность корнеплодов под влиянием штамма *Pseudomonas sp.* 110 была выше при титре бактериальной суспензии 10⁸ КОЕ/мл. Урожайность в этом варианте повысилась на 2,20 т/га при значительной тенденции роста сахаристости – на 0,34 %. В соответствии с ростом урожайности сахарной свёклы на 0,48 т/га повысился и сбор сахара с гектара. Повышение титра бактериальной суспензии штамма *Pseudomonas sp.* 110 до 10¹⁰ КОЕ/мл привело к снижению урожайности корнеплодов на 2,46 т/га, что, вероятно, связано с ингибирующим количеством

продуцированными физиологически активными веществами.

Таким образом, использование в технологии возделывания сахарной свёклы на черноземе выщелоченном штамма ризосферной бактерии *P. fluorescens* 116 (титр 10^{10} КОЕ/мл) способствовало максимальному росту урожайности корнеплодов на 5,20 т/га и повышению сбора сахара с гектара на 0,91 т/га.

7 ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* 116 И *PSEUDOMONAS SP. 110* В АГРОЦЕНОЗЕ САХАРНОЙ СВЁКЛЫ

Расчет экономической эффективности показал, что самый высокий уровень окупаемости дополнительных затрат отмечен при интродукции в почву штамма *P. fluorescens* 116 (титр 10^{10} КОЕ/мл). На этом варианте получен дополнительный чистый доход с 1 га в размере 9257,38 руб., а уровень рентабельности составил 146,65 %.

Экономическая эффективность варианта возделывания сахарной свёклы при интродукции в почву штамма *Pseudomonas sp. 110* (титр 10^8 КОЕ/мл) была ниже. На этом варианте получен дополнительный чистый доход в размере 297,25 руб., уровень рентабельности составил 4,72 %.

Таким образом, использование штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, способных фиксировать азот, в технологии возделывания сахарной свёклы является экономически эффективным приемом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В агроценозе сахарной свёклы на черноземе выщелоченном из ризосферы и ризопланы этой культуры были выделены 2 штамма бактерий рода *Pseudomonas* под номерами *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp. 110*, обладающие способностью фиксировать азот. На основании проведенных исследований выявлено положительное влияние интродуцированных штаммов в агроценоз сахарной свёклы на ряд агрономически ценных групп микроорганизмов, накопление доступных форм азота в почве, увеличение фотосинтетической активности растений и повышение продуктивности культуры на 2,20-5,20 т/га, что позволило повысить экономическую эффективность возделывания сахарной свёклы. Рентабельность вариантов интродукции штаммов бактерий рода *Pseudomonas* под номерами *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp. 110* составила соответственно 146,65 и 4,72 %.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что интродукция в почву бактерий рода *Pseudomonas*, способных фиксировать азот, повышает численность агрономически ценной микрофлоры, содержание доступных форм азота, увеличивает продуктивность сахарной свёклы.

2. Выделено в результате скрининга 2 штамма бактерий под номерами *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp. 110*, обладающих геном фиксации азота, что доказано ПЦР анализом.

3. Показана способность штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 к росту на безазотистой среде Эшби, продуцированию гетероауксина, синтезу свободных аминокислот, растворению органических форм фосфатов, накоплению щелочногидролизуемого азота. Показан ростостимулирующий эффект новых штаммов.

4. Выявлено, что интродукция в агроценоз сахарной свёклы бактерий рода *Pseudomonas* под предпосевную культивацию увеличивает их численность в почве под сахарной свёклой, ризосфере и ризоплане этой культуры. Показано увеличение численности штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 в первой половине вегетации в ризоплане соответственно в 5,9 и 5,6 раза.

5. Установлено, что интродукция штаммов не подавляет развитие микроорганизмов в почве. Штамм *P. fluorescens* 116 способствует увеличению численности фосфобактерий в ризоплане в фазе смыкания междурядий и период интенсивного роста культуры соответственно на 42,5 и 63,2 %, а также увеличению численности diaзотрофов на поверхности корней в фазе смыкания междурядий – на 42 %; штамм *Pseudomonas sp.* 110 при интродукции в те же периоды также способствует увеличению численности фосфобактерий – соответственно на 33,2 и 6,8 %, а diaзотрофов в ризоплане – на 125 %.

6. Доказано, что интродукция штамма *P. fluorescens* 116 в начальный период вегетации стабилизирует численность почвенных микромицетов в ризоплане, а штамм *Pseudomonas sp.* 110 сдерживает их развитие в ризоплане в 1,9 раза, что снижает распространение корневая еда соответственно до 18,2 и 12,4% (в контроле – 25,3 %).

7. Установлено, что применение в технологии возделывания сахарной свёклы псевдомонад способствует накоплению щелочногидролизуемого азота в почве: штамм *P. fluorescens* 116 позволяет увеличить содержание этой формы азота на 13,5-20,0 %, а штамм *Pseudomonas sp.* 110 – на 12,2-16,9 %.

8. Определено, что интродукция штаммов в агроценоз сахарной свёклы способствует повышению содержания нитратного азота в почве в первой половине вегетации.

9. Установлено, что интродукция штаммов *P. fluorescens* 116 и *Pseudomonas sp.* 110 не влияет на динамику аммонийного азота в почве на протяжении всего вегетационного периода.

10. Выявлено, что благодаря фиксации азота и продуцированию в среду гетероауксина штамм *P. fluorescens* 116 (титр 10^{10} и 10^8 КОЕ/мл) увеличил массу 100 растений соответственно на 22,0 и 24,7 %, а штамм *Pseudomonas sp.* 110 (титр 10^{10} и 10^8 КОЕ/мл) – соответственно на 36,6 и 20,2 %.

11. Интродукция штаммов псевдомонад *P. fluorescens* 116 (титр 10^{10} КОЕ/мл) и *Pseudomonas sp.* 110 (титр 10^8 КОЕ/мл) повысила коэффициент продуктивности фотосинтеза соответственно на 15,0 и 11,4 % по отношению к контрольному варианту.

12. Внесение в почву под предпосевную культивацию псевдомонад способствовало повышению урожайности сахарной свёклы: при интродукции штамма *P. fluorescens* 116 (титр 10^{10} КОЕ/мл) – на 16,5 %; при интродукции штамма *Pseudomonas sp.* 110 (титр 10^8 КОЕ/мл) – на 7,0 %.

13. Уровень рентабельности производства сахарной свёклы при использовании *P. fluorescens* 116 (титр 10^{10} КОЕ/мл) и *Pseudomonas sp.* 110 (титр 10^8 КОЕ/мл) составил соответственно 146,65 и 4,72 %.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ

Для активизации развития агрономически ценных микроорганизмов, сохранения и повышения эффективного плодородия почвы, увеличения содержания в почве щелочногидролизуемого и нитратного азота, ускорению роста растений и увеличения продуктивности сахарной свёклы рекомендуется использовать штамм бактерии *P. fluorescens* 116.

Последовательность технологических операций при внедрении данного технологического приема для ЦЧР:

- зяблевую обработку почвы и внесение удобрений в дозе $N_{100}P_{100}K_{100}$ проводить по общепринятой технологии;

- весеннее закрытие влаги проводить в оптимальные сроки;

- вносить бактериальную суспензию на основе штамма *P. fluorescens* 116 под предпосевную культивацию на поверхность почвы с помощью опрыскивателя. Норма расхода препарата – 200 г/га, норма расхода рабочей жидкости – 200 л/га.

Вносить бактериальную суспензию рекомендуется при отсутствии сильного ветра.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях

1. Безлер Н.В. ПЦР идентификация и генетическое разнообразие *Pseudomonas fluorescens*, выделенных из агроценоза сахарной свёклы (*Beta vulgaris* L.) [Текст] / Н.В. Безлер, А.С. Хуссейн, М.Ю. Петюренко // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2016. – № 1. – С. 43-49.

2. Безлер Н.В. Внесение в почву азотфиксирующей бактерии *Pseudomonas fluorescens* 116 и динамика доступных форм азота в посевах сахарной свёклы [Текст] / Н.В. Безлер, М.Ю. Петюренко, А.С. Хуссейн // Плодородие . – 2016. – № 6. – С. 9-11.

Статьи в сборниках и других научных изданиях

3. Безлер Н.В., Перспективы использования бактерий рода *Pseudomonas* в посевах сахарной свёклы [Текст] / Н.В. Безлер, М.Ю. Петюренко // Приемы и средства повышения продуктивности сахарной свёклы и других культур севооборота : сб. науч. тр. – Воронеж : Воронежский ЦНТИ – филиал ФГБУ «РЭА» Минэнерго России. – 2014. – С. 176-181.

4. Безлер Н.В. Распределение микроорганизмов в системе ризоплана – ризосфера – почва в посевах сахарной свёклы [Текст] / Н.В. Безлер, М.Ю. Петюренко // Агротехнологии XXI века: концепции устойчивого развития : матер. междунар. конф., посвященной 100-летию кафедры ботаники, защиты растений, биохимии и микробиологии Воронежского ГАУ. – Воронеж : ФГБОУ ВПО Воронежский ГАУ, 2014. – С. 22-26.

5. Налбандян А.А. Поиск возбудителей грибных заболеваний и полезных

бактерий растений сахарной свёклы методами ДНК-маркирования [Текст] / А.А. Налбандян, А.С. Хуссейн, М.Ю. Петюренко // Аграрная наука – сельскому хозяйству : сб. статей : в 3 кн. / X Международная науч.-практ. конф. (4-5 февраля 2015 г.). – Барнаул : РИО АГАУ, 2015. – Кн. 2. – С. 170-171.

6. Безлер Н.В. Использование RAPD-праймеров для изучения генетического разнообразия *Pseudomonas fluorescens* [Текст] / Н.В. Безлер, А.С. Хуссейн, М.Ю. Петюренко // Проблемы развития современной науки : сб. статей Междунар. науч.-практ. конф. – Уфа : Аэтерна, 2015. – С. 3-5.

7. Безлер Н.В. Внесение в почву азотфиксирующих бактерий рода *Pseudomonas* и динамика щелочногидролизующего азота [Текст] / Н.В. Безлер, М.Ю. Петюренко // Биологизация земель в адаптивно-ландшафтной системе земледелия : матер. Всерос. науч.-практ. конф. Белгородского науч.-исслед. ин-та сельского хозяйства. – Белгород : Изд-во «Отчий край», 2015. – С. 289-292.

8. Петюренко М.Ю. Бактерии рода *Pseudomonas* и динамика нитратного азота в черноземе выщелоченном [Текст] / М.Ю. Петюренко, Н.В. Безлер // Актуальные проблемы почвоведения, экологии и земледелия : сб. докладов науч.-практ. конф. с международным участием Курского отделения МОО «Общество почвоведов имени В.В. Докучаева». – Курск, 2016. – С. 244-248.

9. Безлер Н.В. Азотфиксирующие бактерии рода *Pseudomonas* в черноземе выщелоченном и их распределение в системе почва – ризосфера – ризоплана [Текст] / Н.В. Безлер, М.Ю. Петюренко // Тезисы докладов VII съезда Общества почвоведов им. В.В. Докучаева и Всерос. науч. конф. с международным участием. – Белгород : Изд-во «Белгород», 2016. – Ч. II. – С. 102-103.

10. Безлер Н.В. Перспективы использования аборигенных штаммов бактерий рода *Pseudomonas* в агроценозе сахарной свёклы [Текст] / Н.В. Безлер, М.Ю. Петюренко // Перспективы использования инновационных форм удобрений, средств защиты и регуляторов роста растений в агротехнологиях сельскохозяйственных культур : матер. докладов участников 9-й науч.-практ. конф. «Анапа-2016». – Москва : ВНИИА, 2016. – С. 25-27.