МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФАКУЛЬТЕТ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА,
ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ И ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Н.Н. Терещенко

БИОУДОБРЕНИЯ НА ОСНОВЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Учебное пособие

Томск – 2003

УДК 631.847.22/3(075)
ББК 40.40
Т 35

Т 35 Терещенко Н.Н. Биоудобрения на основе микроорганизмов: Учебное пособие.– Томск: Томский государственный университет, 2003.– 60 с.

Учебное пособие освещает вопросы, связанные с производством и применением биоудобрений на основе агрономически важных групп микроорганизмов, способствующих улучшению азотного и фосфорного питания растений, а также повышающих устойчивость растений к неблагоприятным условиям внешней среды. Рассмотрены факторы, влияющие на эффективность биоудобрений в случае их комплексного применения совместно с минеральными удобрениями и средствами химизации.

Для студентов вузов биологических и сельскохозяйственных специальностей.

УДК 631.847.22/3(075)
ББК 40.40

Рецензент – канд. биол. наук Т.М. Тронова

© Томский государственный университет, 2003
© Н.Н. Терещенко, 2003

Введение

Разнообразные биохимические процессы, протекающие в почве обусловлены прежде всего жизнедеятельностью многочисленной армии почвенных микроорганизмов. Между микрофлорой почвы и растениями эволюционно сформировались особые сложные взаимоотношения как симбиотического, так и антагонистического характера. Симбиоз между растениями и почвенными бактериями имеет в основном трофическую природу. Растения, выделяя через корни различные специфические органические соединения, способствуют формированию определенного типа микробиоценоза в зоне своей ризосферы. Жизнедеятельность микроорганизмов, в свою очередь, в значительной степени определяет режим корневого питания растений, их устойчивость к заболеваниям и неблагоприятным условиям среды, а в конечном итоге – урожайность.

Среди огромного количества разнообразных микроорганизмов имеются виды, особенно тесно связанные с растениями и приносящие им несомненную пользу. Это послужило основанием для создания и применения различных биопрепаратов, содержащих те или иные виды полезных микроорганизмов.

Толчком для разработки бактериальных удобрений послужили два обстоятельства: во-первых, экологические проблемы, связанные с применением больших объемов минеральных удобрений; а во-вторых, значительные затраты труда и материальных средств, связанные с производством и применением минеральных удобрений. Особенно энергоемким является производство азотных минеральных удобрений. В развитых странах на их выпуск в среднем тратится почти треть всей энергии, потребляемой в сельскохозяйственной отрасли. Достаточно дорогостоящи и фосфорные минеральные удобрения.

Глава 1. Биоудобрения на основе азотфиксирующих микроорганизмов

Для улучшения азотного питания растений в настоящее время разработаны и применяются следующие разновидности микробных удобрений, основанные на 4 известных группах азотфиксирующих микроорганизмов:

1. Нитрагин и его аналоги представляют собой препараты клубеньковых бактерий р. Rhizobium под бобовые культуры (симбиотические азотфиксаторы).

2. Азотобактерин представляет собой препарат бактерий р. Azotobacter (несимбиотические свободноживущие азотфиксаторы).

3. Биопрепараты на основе ризосферных диазотрофов (ассоциативные азотфиксаторы).

4. Биопрепараты на основе папоротника *Azolla* в симбиозе с цианобактериями.

Экспериментально установлено, что азот, фиксированный микроорганизмами, на 100% усваивается растениями, в то время как азот минеральных удобрений – всего на 50%. Кроме того, биологический азот практически бесплатный, так как бактерии для осуществления азотфиксации используют энергию органических веществ, синтезированных растениями в процессе фотосинтеза.

В западных странах биоудобрения применяются достаточно широко, и количество поступающего в почву минерального и биологического азота вполне сопоставимо. Так, например, в Великобритании с минеральными удобрениями в почву ежегодно вносят около 1,6 млн т азота. Бобовые растения при этом обеспечивают поступление почти 0,5 млн т азота. В США с минеральными удобрениями в почву поступает 9,4 млн т азота, а бобовые растения привносят 8,7 млн т.

1.1. Биоудобрения на основе симбиотических азотфиксаторов р.Rhizobium

Положительное влияние бобовых растений на плодородие почвы известно уже довольно давно. Еще греческий философ Теофраст, живший в третьем столетии до н.э., в своей работе "Исследования о растениях" писал о том, что именно бобовые растения лучше всего восстанавливают почву. В Фессалии и Македонии бобовые запахи-

вали в землю в качестве зелеиого удобрения. Уже древние римляне включали бобовые в севообороты с зерновыми культурами. Однако научное обоснование пользы, приносимой бобовыми растениями, было получено сравнительно недавно, лишь в конце IX в.

В 1838 г. фраицузский ученый Буссенго высказал впервые идею о возможности фиксации азота из атмосферы. Однако эту роль он приписывал самим растениям. Впоследствии из-за неправильно поставленного эксперимента с семенами бобовых растений, высаживаемых в прокалениый песок, он отказался от своих первоначальных выводов.

Вновь к этой идее вернулись уже в 1886 г. немецкие ученые Хельригель и Вильфарт, обнаружившие в тканях клубеньков клетки бактерий. В 1866 г. почти за 20 лет до этого русский ученый М.С. Вороиин также наблюдал клубеиьковые бактерии.

В чистую культуру эти микроорганизмы были выделены и морфологически описаны в 1888 г. М. Бейеринком. При этом была окончательно доказана их роль в фиксации атмосферного азота.

Почти сразу же после открытия клубеиьковых бактерий появилась мысль о возможности их использования для усиления азотфиксации бобовыми культурами. Первый препарат клубеньковых бактерий под иазваиием "Нитрагин" был изготовлен в 1896 г. в Германии и представлял собой измельченные клубеньки в смеси с почвой.

Клубеньковые бактерии образуют весьма прочный симбиоз с бобовыми культурами, заражая корни растеиий и поселяясь внутри образовавшихся вздутий – клубеиьков. В ризосфере иебобовых растений за редким исключением клубеиьковые бактерии не размножаются. Кроме того, симбиоз обычио отличается строгой специфичностью, т.е. каждому виду растений сопутствует определенный набор штаммов ризобий. При этом видовое иазваиие бактериям обычно дается по растеиию-хозяину (Rh. lupini, Rh. trifoli).

Специфичность симбиоза между клубеньковыми бактериями и бобовыми растениями обусловлена выделеиием корнями бобовых особых белков – лектинов, которые играют ключевую роль в адгезии клеток бактерий на поверхности корня. При этом адгезия осуществляется по имуиному прииципу "антиген-аититело", когда макромолекулы на поверхности корневого волоска и клеточные оболочки ризобий сшиваются друг с другом как замок-молиия при помощи связующего компонента – белка лектина. Белок лектин бивалеитен и одним коицом соединяется с полисахаридами поверхности корневого волоска, а другим – с полисахаридами капсулы ризобий,

которые, вероятно, идентичны друг другу (рис. 1). Таким образом, лектин, вырабатываемый определенным видом бобовых, присоединит клетки только тех штаммов ризобий, полисахаридная оболочка которых идентична оболочке корневого волоска и подойдет к лектину, как ключ к замку.

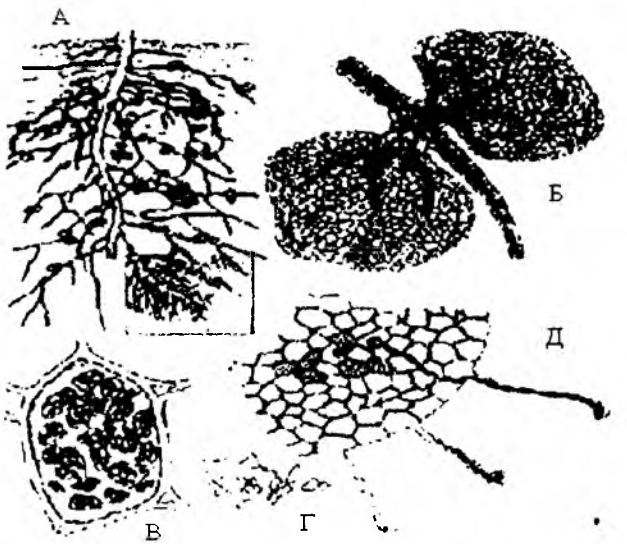


Рис. 1. Симбиотическая фиксация азота в корневых клубеньках бобовых: *А* – корень гороха с клубеньками; *Б* – клубеньки в разрезе; *В* – растительная клетка, заполненная бактериями, в разрезе; *Г* – бактерии, находящиеся в клетках растений, приобретают форму бактероидов; *Д* – внедрение бактерий через кончики корневых волосков и рост инфекционных нитей

После адгезии клеток ризобий на поверхности корневого волоска последний начинает закругляться, образуя на месте изгиба пространство для размножения бактерий. При этом бактерии начинают формировать инфекционную нить – тонкий, заполненный слизью канал, пронизывающий ткани корня и способствующий свободному проникновению бактерий. Встретив на своем пути тетраплоидные клетки коры корня, ризобии начинают активно размножаться, вызывая вздутие оболочек. Кроме того, бактерии одновременно сти-

мулируют деление клеток самого корня. В результате на поверхности инфицированных корневых волосков формируются вздутия – клубеньки (рис. 2).

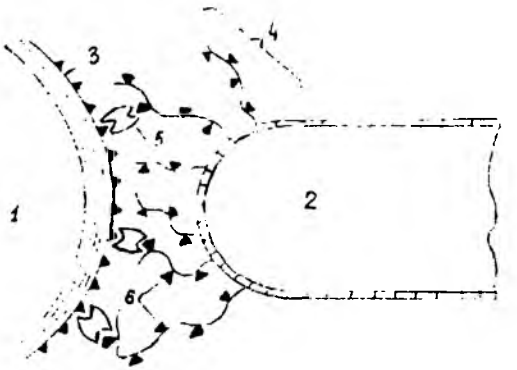


Рис. 2. Взаимодействие клубеньковых бактерий с поверхностью корневого волоска растения-хозяина: *1* – корневой волосок; *2* – бактерия; *3* – клеточная стенка; *4* – капсула; *5* – лектин трифолин, *6* – О-антиген

В цитоплазме тетраплоидных клеток палочки ризобий преобразуются в бактероиды – крупные неправильной формы клетки. При этом размер клеток ризобий может увеличиться в 10 – 15 раз. Бактероиды способствуют вырабатыванию пигмента леггемоглобина, обусловливающего розовую окраску клубеньков. Неокрашенные клубеньки азот не фиксируют. Леггемоглобин подобно гемоглобину крови выполняет функцию снабжения бактероидов кислородом, одновременно облегчая его диффузию через клетки растения и регулируя уровень парциального давления кислорода.

С химической точки зрения связывание молекулярного азота представляет собой восстановительный процесс, осуществляемый ферментным комплексом нитрогеназой. Первичным фиксируемым продуктом является аммоний, который далее преобразуется в глутаминовую кислоту. Нитрогеназа состоит из двух молекул белка с активным молибденсодержащим центром. В качестве источника энергии для азотфиксации бактерии используют молекулы АТФ, запасаемые в процессе фотосинтеза.

Уровень накопления азота клубеньковыми бактериями в симбиозе с бобовыми растениями колеблется в зависимости от вида растения. Например, соя обеспечивает 57 – 152 кг/га азота; кормовые бобы – 326 – 648; горох – 69 – 85; люцерна – 128 – 300; клевер – 98 – 220.

В начале для инокуляции бобовых культур использовали ризобии без идентификации штаммов. Однако вскоре было установлено, что различные штаммы клубеньковых бактерий очень сильно различаются по интенсивности азотфиксации. Это обусловило необходимость проведения селективного отбора активных штаммов ризобий. Активный штамм помимо высоких показателей азотфиксации должен обладать высокой конкурентноспособностью, позволяющей ему вытеснять дикие, менее эффективные штаммы и занимать доминирующее положение в ризосфере бобовых. Кроме того, он должен быть устойчив к неблагоприятным условиям окружающей среды.

В настоящее время многие страны имеют свои банки клубеньковых бактерий. По инициативе ЮНЕСКО создан мировой каталог коллекций ризобий на основе 125 национальных коллекций.

Исследования в области селекции клубеньковых бактерий ведутся как традиционными методами, так и при помощи генной инженерии. Например, в Индии, где почвы в основном кислые, был выведен кислотоустойчивый штамм ризобий, способный активно фиксировать азот даже при pH почвенного раствора, составляющей 4,5. В Канаде был получен холодоустойчивый штамм, который обеспечивал больший приток азота в почву за вегетационный сезон благодаря более раннему началу азотфиксации – уже при температуре +10 °С. При этом эталонный штамм ризобий начинает фиксировать азот при температуре не ниже +17 °С.

Одновременно не прекращаются работы по выделению из природы все новых штаммов клубеньковых бактерий. В Китае американской экспедиции микробиологов удалось выделить новый штамм, скорость роста и размножения которого была почти в три раза выше, чем у бактерий почв США. Однако уровень азотфиксации китайского штамма был невысоким. Плазмида, выделенная из китайского штамма, была пересажена американскому коллекционному штамму, отличающемуся активной азотфиксацией, но низкой скоростью роста. В результате получили новый штамм, унаследовавший положительные качества обоих родителей и сразу же запущенный в производство.

Весьма перспективным направлением в настоящее время является усовершенствование непосредственно самого нитрогеназного комплекса клубеньковых бактерий при помощи методов генной инжеиерии. Известно, что на процесс азотфиксации микроорганизмы расходуют довольно много энергии, но значительная ее часть (почти 40%) используется непроизводительно. Она расходуется на выделение атомарного водорода, образующегося в процессе азотфиксации. Однако существуют виды клубеньковых бактерий, обладающие иаряду с нитрогеназой еще одним фермеитным комплексом, используемым при связываиии молекулярного азота, – гидрогеназой. Благодаря наличию гидрогеназы микробная клетка не выделяет попусту водород, а использует его для отправления своих жизнеиных фуикций. В результате энергозатраты на собственно азотфиксацию значительно сокращаются и эффективность процесса возрастает. К сожалеиию, известно всего несколько штаммов бактерий, обладающих подобными достоинствами, и все онн являются симбионтами сои. Представляется весьма перспективным перенести плазмиду с геном, отвечающим за сиитез гидрогеназы, штаммам клубеиьковых бактерий, этими геиами не обладающим. Кроме того, активио ведутся селекциоиные исследоваиия по выведеиию штаммов, устойчивых к воздействию пестицидов и гербицидов.

В Нациоиальном уииверситете Австралии проводятся исследования по переиосу геиов, отвечающих за азотфиксацию, не только от одного вида клубеньковых бактерий к другому, ио и к почвеиным бактериям, ие способным к азотфиксации, например к бактериям родов Lignobacter, Corinebacterium и др. Растения, инокулированные такими бактериями, в 10 случаях из 100 приобретали способность образовывать псевдоклубеиьки.

Контрольные вопросы

1. Чем обусловлена необходимость селективиого отбора активных штаммов ризобий?
2. Перечислить осиовные требования, предъявляемые к активным штаммам клубеньковых бактерий.
3. При помощи какого фермента осуществляется процесс химического связываиия молекуляриого азота в клетках азотфиксирующих бактерий?
4. Какие особеиности строеиия клеточных оболочек ризобий определяют специфичность их симбиоза с бобовыми растеииями?

5. Каков механизм инфицирования корней бобовых растений клубеньковыми бактериями?

1.1.1. Препаративные формы и способы применения инокулятов

Биопрепараты на основе клубеньковых бактерий применяют либо для предпосевной обработки семян, либо непосредственно вносят в почву в зависимости от особенностей возделываемой культуры и от препаративной формы удобрения.

В настоящее время в мире производится несколько десятков разновидностей инокулятов для бобовых культур, которые можно условно разделить на 4 основные категории:

1. Препараты клубеньковых бактерий на жидкой осиове.
2. Сухой нитрагин, представляющий собой обезвоженную биомассу клубеньковых бактерий в смеси с мелом, каолином или бентонитом.
3. Препараты на твердом носителе (клубеньковые бактерии, адсорбированные на торфе, клетчатке, лигиите, древесиом угле, перегное и др.).
4. Гранулированные препараты.

В самом начале промышленного производства нитрагина использовали агаровые и жидкие формы препаратов. Культуру бактерий выращивали поверхностным способом на агар-агаре. Затем получали жидкую накопительную культуру, которую смешивали со снятым молоком и суспендировали. В молоко добавляли немного фосфата кальция. Полученную суспензию выливали на кучу зерна, перемешивали и подсушивали. При этом бактерии прилипали к поверхности семян, а пленка высохшего молока надежно защищала их от неблагоприятных внешних воздействий. Но с увеличением масштабов применения нитрагина данный способ стал экономически невыгодным. На смену жидкому нитрагину пришли препараты на твердой основе и сухой нитрагин.

Сухой нитрагин представляет собой порошок светло-серого или коричневого цвета, содержащий в 1 г не менее 9 млрд жизнеспособных клеток бактерий в смеси с наполнителем (бентонитом, каолином и т.д.). Количество влаги в порошке не должно превышать 55 – 75%.

Промышленное производство нитрагина построено по типичной схеме асептического микробиологического предприятия. Поскольку "узким" местом производства является стадия высушивания живых клеток, то каждый из вновь используемых штаммов оценивается не только с точки зрения его продуктивности, но и на устойчивость к температурным воздействиям.

Для производства посевного материала исходную культуру клубеньковых бактерий выращивают сначала на агаризованной среде, содержащей, например, отвар семян бобовых растений, 2% агар-агара и 1% сахарозы, затем полученную культуру размножают в колбах на жидкой питательной среде в течение 1 – 2 сут. при 28 – 30°С и pH 6,5 – 7,5. На всех этапах промышленного культивирования применяют питательную среду одного и того же состава, включающую такие компоненты, как мелассу, кукурузный экстракт, минеральные соли в виде сульфатов аммония.

Готовую культуру, содержащую до 10 млрд клеток в 1 мл раствора (3 – 5% от объема питательной среды инокулятора) передают в посевной аппарат и продолжают выращивание в нем при той же температуре в условиях постоянного перемешивания и принудительной аэрации (1 объем воздуха на 1 объем среды в 1 мин). Если по истечении 1 сут. титр посевного материала достигнет 1 млрд клеток, культивирование заканчивают, а полученным посевным материалом в количестве 3 – 5% от объема среды посевного аппарата засевают производственный ферментер. Основную ферментацию проводят в течение 2 – 3 сут. при той же температуре и pH среды, что и в инокуляторе, но при более высоком объемном расходе воздуха (до 1,3 объема на 1 объем среды в 1 мин). К концу процесса культивирования штамм находится в стадии "опоясанных" палочек, титр клеток достигает 10 млрд в 1 мл. Готовую культуральную жидкость направляют на сепарацию, в результате которой отделяется биомасса в виде пасты влажностью 70 – 80%. Пасту смешивают с защитной средой, имеющей различный состав, но всегда содержащую мелассу и тиомочевину, например в соотношении 20 : 1, и направляют на высушивание. Процесс сушки осуществляется в вакуум-сушильных шкафах при 30 – 35 °С и остаточном давлении 10 – 13 кПа. Высушенную биомассу размалывают. Более производительным является процесс высушивания в распылительных сушилках, однако при этом до 75% клеток теряет жизнеспособность.

Препараты сухого нитрагина герметично фасуют в полиэтиленовые пакеты по 0,2 – 1кг, хранят при 15 °С не более 6 мес. На упако-

вочной этикетке указывают дату выпуска препарата и перечень бобовых растений, для которых он предназначен.

Наряду с сухим нитрагином в настоящее время широко применяют препараты клубеньковых бактерий на твердых носителях. При этом бактерии находятся в адсорбированном состоянии и поэтому лучше сохраняются в почве и обеспечивают большую степень инфицирования растения. Наиболее эффективным носителем является торф.

Технология производства торфяного нитрагина ("Ризоторфина") была разработана в ВНИИСХМ и сводится к следующему. Торф высушивают до 10%-ной влажности и измельчают в порошок. Значение pH доводят до 6,5 – 7,0 добавлением карбоната кальция. Для производства ризоторфина используют как стерилизованный, так и нестерилизованный торф. В первом случае стерилизацию торфа осуществляют либо автоклавированием при 120 °С в течение 4 ч, либо гамма-облучением в течение 2 – 3 мес. Культуру ризобий вносят в количестве 40% от общей массы торфа и оставляют на несколько сут. при температуре 20 – 25 °С для размножения бактерий. Препарат расфасовывают в полиэтиленовые пакеты по 0,5 – 1кг и хранят при +5 °С в течение года.

В случае использования стерильного торфа его сначала расфасовывают в полиэтиленовые пакеты по 300 – 350 г (гектарная порция). Стерильный торф в пакетах инокулируют охлажденной до +5...+8 °С ферментационной жидкостью. Объем инокулюма – 40 – 80 мл на каждый пакет. Эту смесь вводят острой полой иглой, прокалывая полиэтиленовую пленку. Затем отверстие заклеивают липкой лентой. Инокулированные пакеты помещают на 2 – 3 мин во вращающиеся смесители для перемешивания.

При недоступности торфа используют и другие носители, такие как вермикулит, бентонит, перепревшие опилки, каменный и древесный уголь, молотые кукурузные кочерыжки, нильский ил с добавлением питательных веществ, а также сапропель. В состав препаратов часто дополнительно вводят раствор углеводов и микроэлементы Co, B, Mn и Mo, способствующие более длительному сохранению клеток ризобий.

Все этапы технологического процесса производства ризоторфина находятся под тщательным микробиологическим контролем. Стерилизованный торф и готовый препарат проверяют на присутствие посторонней микрофлоры. В готовом препарате допускается не

более 1% посторонней микрофлоры. К концу 6-месячного хранения эта величина не должна превышать 10%.

Посевной материал на каждой стадии высевают на жидкие среды с мясопептонным бульоном (с добавлением 0,5% глюкозы и 0,5% сахарозы) и выдерживают сутки. Клубеньковые бактерии не растут на подобных средах, голько контаминанты.

Одним из преимуществ торфяного препарата является возможность использования мультикультуры клубеньковых бактерий, так как адсорбция на твердом субстрате сокращает до минимума риск несовместимости между разными штаммами. Кроме того, торф защищает бактерии от неблагоприятного воздействия пестицидов и гербицидов.

Торфяные препараты вносят непосредственно в почву или обрабатывают ими семена бобовых. В последнем случае торф разводят водой до кашицеподобного состояния и добавляют различные прилипатели, такие как гуммиарабик и КМЦ (карбоксиметилцеллюлоза).

В последнее время большим спросом стали пользоваться гранулированные препараты. При этом применяют различные способы грануляции. Например, часто гранулы делают из смеси КМЦ и гипса, далее смешивают с жидким препаратом клубеньковых бактерий и высушивают. В других случаях гранулы представляют собой частицы монтмориллонита, покрываемые в процессе перемешивания смесью торфа с клубеньковыми бактериями на прилипателе (полиакриламидный гель, альгинат из водорослей, полисахариды, КМЦ, мед, пельгель, обрат, гуммиарабик, кукурузный сироп и др.). Часто используют также дражирование семян бактериальным инокулятом. При этом семена сначала дражируют известняком, а потом наносят торфяной инокулят. Данный прием позволяет нанести большее количество клеток бактерий, особенно на мелкие семена (например, люцерны или клевера). Дражирование оберегает клетки бактерий от выделяемых семенами токсичных продуктов обмена. Вместо известняка часто используют КМЦ, гуммиарабик, активированный уголь и различные глинистые минералы.

Контрольные вопросы

1. Перечислить осиовные препаративные формы бактериальных удобрений на основе клубеньковых бактерий.
2. Указать основные преимущества бактериальных препаратов на твердых носителях.
3. Перечислить основные этапы технологии получения сухого нитрагина.
4. Перечислить основные этапы получения торфяного нитра-гина –"ризоторфина".

1.1.2. Факторы, влияющие на эффективность препаратов клубеньковых бактерий

Как показывает практика, инокуляция бобовых культур не всегда дает положительный результат, поскольку целый ряд факторов может оказывать негативное влияние на азотфиксирующую активность клубеньковых бактерий, таких как:

1.Кислая реакция почвы

Все бобовые растения по эффективности симбиоза с клубеньковыми бактериями в зависимости от кислотности почвы можно условно разделить на четыре большие группы (табл. 1). Данная классификация показывает, какова будет интенсивность азотфиксации у конкретной бобовой культуры в почве с тем или иным значением pH. Например, согласно этой классификации при pH почвы 4,0 у люпина желтого уровень азотфиксации составит примерно 60% от его потенциальной азотфиксирующей способности. А у клевера красного и гороха – не более 5 - 6%. У фасоли и люцерны клубеньковые бактерии при таком уровне кислотности почвы фиксировать азот не будут вовсе.

Как известно, для снижения кислотности почвы традиционно применяют известкование. Однако при интродукции клубеньковых бактерий в кислые почвы наряду с известкованием рекомендуется применять специально выделенные кислотоустойчивые штаммы. Например, в Индии применение кислотоустойчивого штамма обеспечило 80 – 100%-ную прибавку урожая зерна сои, тогда как простое известкование способствовало увеличению урожая всего на 50 – 60%.

Таблица 1

Классификация бобовых культур по эффективности симбиоза в зависимости от кислотности почвы

Тип	Культура	Эффективность симбиоза при pH почвенного раствора					
		4.0	5.0	5.5	6.0	6.5	7.5
1	Люпин многолетний или желтый, лядвенец рогатый	3	4	5	5	5	4
2	Клевер красный, люпин узколистый, горох, вика, кормовые бобы	1	2	3	4	5	4
3	Люпин белый, соя, фасоль, нут	0	1	3	4	5	5
4	Эспарцет, люцерна	0	1	2	3	4	5

Примечание. 0 – отсутствие симбиоза; 1 – единичные мелкие клубеньки на отдельных растениях; 2 – бледно-розовые клубеньки не более чем на 50% растений; 3 – клубеньки преимущественно мелкие, розовые; 4 – более 1/2 клубеньков крупных, розовых; 5 – много крупных красных клубеньков с высоким содержанием леггемоглобина.

2. Азотные удобрения

По вопросу применения азотных удобрений при инокуляции бобовых препаратами клубеньковых бактерий до сих пор не сложилось единого мнения. Результаты многочисленных экспериментов весьма противоречивы. Установлено, что высокие дозы азотных удобрений негативно сказываются на формировании у бобовых клубеньков, в то время как низкие дозы минерального азота (20 – 30 кг/га) иногда дают положительный эффект.

3. Уровень фосфорного и калийного питания, содержание микроэлементов

Экспериментально установлено, что клубеньковые бактерии положительно реагируют на внесение фосфорных удобрений. Недостаток фосфатов в почве может негативно отразиться на эффективности бактеризации бобовых. Различные культуры бобовых отличаются неодинаковой потребностью в фосфорном питании. Фасоль, например, при недостаточном содержании фосфатов клубеньки не формирует. Люпин желтый независимо от уровня фосфорного питания формирует большое количество клубеньков, а интенсивность азотфиксации даже в случае явного дефицита фосфора составляет 30% от максимально возможной. Средние дозы калийных удобрений, как правило, положительно сказываются на бактеризации бобовых, однако избыточное содержание калия в почве негативно влияет на клубеньковые бактерии. Среди микроэлементов наиболее важными являются B, Co, Fe, Mn, Cu и Zn.

4. Влажность почвы

Уровень влажности почвы является очень важным фактором, влияющим на формирование клубеньков бобовыми. Оптимальной является 60%-ная влажность почвы. Клубеньки у всех бобовых культур формируются в диапазоне влажности, равном 40–80% от ПВ почвы. Исключением является клевер, способный формировать клубеньки даже при 100%-ной влажности почвы.

5. Температура

Температура оказывает опосредованное влияние на формирование клубеньков бобовыми культурами, регулируя фотосинтетическую активность растений. Низкие температуры в начале и конце вегетационного периода, а также жара в середине лета угнетают развитие растений, что выражается в снижении площади листовой поверхности и, как следствие, уменьшении интенсивности фотосинтеза. Последнее приводит к сокращению количества корневых выделений – основного энергетического субстрата для клубеньковых бактерий, что не может не сказаться на интенсивности процессов азотфиксации. Поэтому, как правило, пик активности азотфиксации обычно приходится на начало лета.

6. Применение пестицидов и фунгицидов

Часто на симбиотические взаимоотношения партнеров в бобово-ризобиальной системе отрицательное влияние оказывают химические пестициды. Одним из способов повышения устойчивости микроорганизмов к персистентным ксенобиотикам является создание штаммов-деструкторов при помощи переноса плазмид биодеградации. Эти плазмиды распространены у бактерий р. Pseudomonas. У ризобий таких плазмид нет. Поэтому сотрудники ВНИИСХМ предприняли попытку конъюгативного переноса плазмиды из Ps. Putida в клубеньковые бактерии клевера. В результате трансконъюгаты приобрели более высокую устойчивость к гербицидам. Это свидетельствует о перспективности переноса плазмид биодеградации в клубеньковые бактерии.

Выявлена видовая специфичность реакции бобовых растений на то или иное средство химизации. Например, при внесении фунгицида каптана урожайность гороха снижается на 5%; кормовых бобов – на 16%; а чечевицы – на 25%.

Анализируя возможность совмещения обработки семян бобовых культур пестицидами с инокуляцией клубеньковыми бактериями, американские исследователи пришли к выводу, что это возможно при соблюдении следующих условий:

– использовании штаммов ризобий, устойчивых к химикатам;

– дражировании семян;

– разделении во времени операций протравливания семян и инокуляции клубеньковыми бактериями.

Эффективность бактеризации бобовых культур обусловлена, во-первых, экономией дорогостоящих минеральных удобрений, а во-вторых – уменьшением риска загрязнения окружающей среды нитратами. В Германии бактеризация бобовых ежегодно экономит более 40 кг азотных удобрений на 1 га. В Канаде и США ведется широкая пропаганда внедрения методов бактеризации бобовых. Возделывание люцерны ежегодно экономит до 210 канадских дол. с 1 га, клевера – 105, сои и кормовых бобов – по 70. При этом затраты на бактеризацию составляют всего 2 дол. на 1 га. По оценке специалистов в США инокулирование бобовых растений клубеньковыми бактериями ежегодно приносит стране прибыль на сумму 1 млрд дол.

Контрольные вопросы

1. Перечислить основные факторы, влияющие на эффективность инокулирования бобовых растений клубеньковыми бактериями.

2. Каково влияние кислотности почвы на жизнедеятельность клубеньковых бактерий? Привести примеры толерантности различных видов бактерий.

3. Какова реакция клубеньковых бактерий на содержание в почве основных макро- и микроэлементов, а также средств химизации?

4. Каково влияние температуры и влажности почвы на эффективность инокулирования бобовых растений клубеньковыми бактериями.

1.2. Биоудобрения на основе несимбиотических азотфиксаторов р. Azotobacter

Помимо клубеньковых бактерий в почве обитает большое количество так называемых свободноживущих азотфиксирующих микроорганизмов, способных связывать азот атмосферы вне контакта с клетками корня растений. Однако наибольший практический интерес среди них вызывают бактерии р. Azotobacter.

На основе Az. chroococcum в 20-е гг. был создан первый бактериальный препарат "Азотобактерин". Однако результаты полевых испытаний нового удобрения оказались весьма неоднозначными, так как положительный эффект от применения азотобактерина оказался нестабильным. В большинстве случаев прибавка урожая при использовании препарата не превышала 10%, что находится в пределах систематической ошибки полевого опыта. Это привело к тому, что в 70-е гг. препарат азотобактерин был снят с промышленного производства в Советском Союзе.

Однако за рубежом исследования продолжались и показали возможность получения штаммов, способных фиксировать до 13 – 15 кг/га азота на пастбищах и до 22 – 25 кг/га азота на пашне. Проблемы, возникающие при использовании азотобактерина, обусловлены в основном тем, что азотобактер весьма требователен к условиям среды. Так, например, он плохо переносит отклонения от нейтральной реакции почвенного раствора, а температурный оптимум лежит в пределах 25 – 30 °С. Кроме того, азотобактер нуждается в достаточном количестве органического вещества. Поэтому применение азотобактерина как правило дает

азотобактерина как правило дает положительный эффект только при его внесении по фону органических удобрений, таких как навоз, солома или разнообразные компосты. Кроме того, хорошо зарекомендовало себя применение азотобактерина в условиях защищенного грунта на богатых органических субстратах. При этом бактеризация семян овощных культур увеличивает урожай на 20 – 30% и ускоряет его созревание.

В настоящее время установлено, что положительный эффект от применения азотобактерина в основном обусловлен продуцированием азотобактером большого количества биологически активных веществ, таких как витамины группы В, пантотеновая и никотиновая кислоты, биотин, пиридоксин, гетероауксины и гиббереллины, придающих препарату свойства стимулятора роста растений. Внесение азотобактерина способствует заметному увеличению содержания в плодах аскорбиновой кислоты. Кроме того, еще Е.Н. Мишустиным было доказано продуцирование азотобактером фунгицидных веществ из группы анисомицина с широким спектром воздействия.

С бактериями р. Azotobacter широко ведутся работы по селекции новых активных штаммов с заданными свойствами. Так как природные расы азотобактера не способны колонизировать поверхность корней растений, методами генной инженерии был создан штамм К азотобактера, несущий трансмиссивную плазмиду с широким кругом хозяев. Клетки этого штамма вносили в ризосферу определенного вида растений и после их длительного культивирования отбирали изоляты, плотно связанные с ризопланой. Таким образом были получены штаммы азотобактера, адаптированные к корням ячменя и томатов. Бактеризация растений новыми штаммами обеспечила 40%-ную прибавку урожая. На основании штамма К для окультуренных огородных почв и тепличных грунтов был разработан новый препарат на торфяной основе под названием "Ризофил".

За рубежом основная масса препаратов на основе азотобактера производится на торфяной, почвенной или компостной основе или в виде сухого препарата высушенных клеток бактерий.

1.2.1. Технология получения сухого азотобактерина

Азотобактерин сухой представляет собой активную культуру высушенных клеток азотобактера в смеси с наполнителем. При этом

используют лиофильную либо вакуумную сушку при 30 – 35 °С и остаточном давлении 10 – 13 кПа. В 1 г сухого препарата должно содержаться не менее 0,5 млрд жизнеспособных клеток.

Культуру микроорганизмов выращивают методом глубинного культивирования на среде, содержащей мелассу, кукурузный экстракт, сахар и минеральные соли: сульфаты аммония, железа, магния, марганца, сложную соль молибденовой кислоты, мел, хлористый натрий и двузамещенный фосфат калия. При этом pH среды поддерживают на уровне 5,7 – 6.5; аэрацию – 1 объем воздуха на 1 объем среды в мин.

Процесс ферментации проводят до начала стационарной фазы роста культуры. В этот период из клеток в культуральную среду начинают выделяться биологически активные вещества, поэтому существует опасность, что после внесения препарата в почву клетки могут утратить способность фиксировать азот.

Биологические вещества могут также частично разрушаться в процессе высушивания клеток. Однако установлено, что жизнеспособные клетки после выхода из состояния анабиоза восстанавливают способность продуцировать биологически активные вещества

Высушенную культуру стандартизуют путем добавки необходимого количества наполнителя (каолина или бентонита) и фасуют в полиэтиленовые пакеты по 0,4 – 2 кг. Пакеты хранят при температуре не выше +15 °С в течение не более 3 мес.

Способ применения сухого азотобактерина зависит от особенностей посевного материала. Семена зерновых опудривают препаратом из расчета 100 млрд клеток на 1 гектарную порцию семян. Картофель, корневую систему рассады овощных культур равномерно смачивают водной суспензией бактерий. Для получения суспензии 1 гектарную норму препарата (300 млрд клеток) последовательным разведением суспендируют в 15 мл воды.

1.2.2. Технология получения почвенного или торфяного азотобактерина

Торфяной или почвенный препарат представляет собой активную культуру азотобактера, размноженную на твердой питательной среде. При этом в 1 г препарата должно содержаться не менее 50 млн жизнеспособных клеток.

Для приготовления данных препаратов используют плодородную почву или торф высокой степени разложения с нейтральной реакцией среды. К просеянному твердому субстрату добавляют до 2% извести и 0,1% суперфосфата. Полученную смесь в количестве 500 г переносят в 0,5 л бутылки, увлажняют на 40 – 60% по объему водой, плотно закрывают ватными пробками и стерилизуют.

Посевной материал готовят на агаризованных средах, содержащих до 2% сахарозы и минеральные соли. Культуру выращивают при 27 °С примерно 3 – 5 сут. Полученный посевной материал стерильно смывают с поверхности агара водой и переносят в подготовленные бутылки с субстратом. Содержимое бутылок перемешивают и термостатируют при 25 – 27 °С. Культивирование продолжается до тех пор, пока в 1 г почвы или торфа количество бактерий достигнет 50 млн клеток. Препарат сохраняет свою активность в течение 2 – 3 мес.

При обработке семян торфяным или почвенным азотобактерином семена перемешивают с увлажненным препаратом и для последующего равномерного высева подсушивают. При высадке рассады овощных корневую систему растений смачивают приготовленной суспензией с необходимым титром клеток или вносят суспензию непосредственно в заранее подготовленные лунки.

Контрольные вопросы

1. Перечислить основные требования азотобактера к условиям внешней среды.
2. Чем обусловлены адаптогенные свойства азотобактерина?
3. Перечислить основные этапы получения сухого азотобактерина.
4. Какой фазой роста бактериальной культуры ограничивается процесс ферментации при производстве сухого азотобактерина и чем это обусловлено?
5. Перечислить основные этапы получения торфяного или почвенного азотобактерина.
6. Указать способы применения сухого и торфяного азотобактерина.

1.3. Биопрепараты на основе ассоциативных азотфиксаторов (ризосферных и филосферных диазотрофов)

Азотфиксирующие микроорганизмы представляют собой обширную и разнообразную по своим свойствам группу, в которой особое внимание сейчас уделяют бактериям, способным усваивать азот атмосферы посредством ассоциативных связей с корневой системой или наземной вегетативной частью растений злаковых, пасленовых и др. семейств.

Широко развернувшиеся в последние два десятилетия исследования позволили установить обширность ареала распространения этих микроорганизмов и их большое значение в пополнении азотом природных экосистем. В настоящее время уже выявлено около 50 видов диазотрофов, относящихся к 12 семействам. Наиболее активные представители принадлежат к родам Azospirillum, Bacillus, Beijerinkia, Clostridium, Corinebacterium, Enterobacter, Klebsiella, Pseudomonas и др.

Способность фиксировать молекулярный азот и наличие нитрогеназного комплекса у Azospirillum были доказаны в 1975 г. бразильцем Доберейнером. В настоящее время среди диазотрофов именно бактерии рода Azospirillum являются наиболее изучаемыми микроорганизмами из-за своей широкой распространенности в почвах всех климатических поясов. Температурный оптимум для азоспирилл составляет примерно +25... +30 °С, но развиваться и фиксировать азот они могут в широком диапазоне температур: от +10 до +40 °С.

В отличие от азоспирилл клебсиелла и энтеробактер в основном распространены в почвах умеренных широт. Они могут фиксировать азот атмосферы в диапазоне температур от +10 до +30 °С с оптимумом при +20 °С. Поэтому данные микроорганизмы практически никогда не выделяются из почв тропического региона.

Развитие ассоциативных азотфиксаторов может происходить в широком интервале pH среды: от 5,5 до 8,0. Оптимум для каждого вида бактерий свой.

Интересно, что азоспириллы в условиях жаркого климата в основном образуют ассоциации с зерновыми культурами: пшеницей,

рисом, кукурузой и др. А в зоне умеренных широт – со злаковыми травами: овсяницей и тимофеевкой.

Ризосферные диазотрофы для осуществления азотфиксации используют около 1/3 всех продуктов фотосинтеза растений, выделяемых корнями. При этом на 1 г фиксированного бактериями азота растение затрачивает от 4,1 до 24,2 г углевода в зависимости от его природы. Помимо этого источниками пищи для ризосферных диазотрофов могут быть разнообразные органические остатки в почве, так как данные микроорганизмы являются типичными гетеротрофами. Основными источниками углерода для ризосферных диазотрофов являются сахара, бикарбоновые кислоты и спирты. В качестве органического материала для данных микроорганизмов могут служить разнообразные органические удобрения, такие как солома, навоз и компосты. Например, внесение в почву при бактеризации кукурузы азоспириллами 5% соломы и 3% навоза по весу почвы обеспечило 70%-ное повышение урожайности кукурузы.

Важнейшим экологическим фактором, определяющим интенсивность азотфиксации, является содержание в почве минерального азота. Ряд экспериментов свидетельствует об эффективности применение низких (50 кг/га) и средних (100 кг/га) доз минеральных азотных удобрений и мочевины. Применение высоких доз (150 кг/га и более) до сих пор является спорным вопросом. Например, английские источники приводят факты угнетения азотфиксации азоспириллами при внесении 130 кг/га минеральных азотных удобрений. Американцы, напротив, отмечали значительную прибавку урожая кормовых трав при инокуляции их азоспириллами по фону высоких доз минеральных удобрений.

Ризосферные диазотрофы, как и азотобактер, способны продуцировать различные биологически активные соединения: ауксины, гиббереллины и цитокинины, способные увеличивать массу корней растений и их поглотительную способность. Кроме того, они также выделяют фунгициды.

Эффективность азотфиксации ризосферными диазотрофами колеблется в зависимости от штамма микроорганизма и сорта растения и составляет 12–90 кг азота на 1га в год.

Промышленные препараты, аналогичные нитрагину и азотобактерину, на основе ризосферных диазотрофов в настоящее время еще не выпускаются. В различных странах выпускаются опытные партии препаратов для бактеризации семяи растений. Большинство работ посвящено инокуляции ризосферными диазотрофами корней

пшеницы. При этом установлена избирательная реакция различных сортов и линий пшеницы на бактеризацию различными видами диазотрофов. Для каждого сорта подбирается свой штамм. Но селекционные работы ведутся и с самими растениями. Например, канадский сорт пшеницы "Кадет" после инокуляции его штаммом Bacillus C-11-25 приобретал способность получать из атмосферы 26,5% азота от общепотребляемого, а после бактеризации одним из штаммов Azospirillum – 37,7%. Другой испытанный сорт пшеницы "Рескью" с диазотрофами ассоциаций не образовывал. Однако после скрещивания этих двух сортов была получена новая линия, при бактеризации которой штаммом Bacillus C-11-25 усвоение азота атмосферы возросло до 63% от общей потребности в этом элементе. В настоящее время считается вполне реальным получение устойчивых сортов пшеницы, способных при инокуляции их диазотрофами до 10% своих потребностей в азотном питании удовлетворять за счет азотфиксации.

Успех бактеризации во многом зависит от активности бактериальной культуры, а также от ее способности создавать ассоциации с тем или иным возделываемым сортом. Кроме того, эффективность инокуляции определяется состоянием микробного ценоза самой почвы.

Эксперименты показали, что при посеве семян ячменя и сахарной свеклы, инокулированных азоспириллами, в момент начала микробной сукцессии в почве, вызванной поливом или внесением свежего органического вещества, урожай увеличился на 30 – 80%. При посеве семян на седьмые сутки развития сукцессии урожай по сравнению с контролем (без бактеризации) снизился на 10 – 60%.

Одним из важных условий эффективной бактеризации растений является способность интродуцированных бактерий активно колонизировать ризосферу растений и поддерживать численность популяции на экологически значимом уровне. Быстрая элиминация вносимой популяции из ризосферы во многом обусловлена слабой конкурентноспособностью внесенных бактерий по отношению к разнообразному микробному сообществу ризосферы растения. Большинство из аборигенных микроорганизмов, обитающих в ризосфере, принадлежит к r-стратегам и поэтому способно к быстрому размножению и активному усвоению корневых выделений растений. Кроме того, они продуцируют антибиотики. Следовательно, для инокуляции семян целесообразно использовать штаммы, выделенные из ризосферы конкретного растения.

Необходимо учитывать также тот факт, что, как правило, активные штаммы диазотрофов выделяют из ризосферы взрослых растений. Однако в процессе вегетации состав микробного сообщества ризосферы значительно меняется, т.е. имеет место микробная сукцессия. Поэтому для приготовления бактериального препарата, предназначенного для предпосевной обработки семян, целесообразней использовать штаммы, выделенные из ризосферы проростков, а не взрослых растений. Именно эти штаммы будут наиболее активно колонизировать ризосферу проростков.

В настоящее время помимо бактеризации пшеницы активно разрабатываются способы инокуляции сорго, овса, ячменя, африканского проса, могора и др. злаков. Весьма актуальными являются исследования по выделению штаммов для бактеризации риса – основной зерновой культуры Юго-Восточной Азии. Филиппинские ученые установили, что рис, инокулированный азоспириллами, способен ежедневно фиксировать из воздуха до 200 – 350 мкг азота. При этом число зерен и их масса на 1 растении увеличивается более чем в 2 раза.

Активно ведутся работы по бактеризации кормовых злаков. При этом установлено, что мятлик приобретает способность на 30% удовлетворять свои потребности в азоте за счет азотфиксации. Согласно данным американских исследователей 10 из 40 испытанных ими тропических кормовых трав положительно реагировали на бактеризацию.

В Индии работы по инокуляции проводятся не только с зерновыми, но и с овощными культурами, такими как цветная и белокачанная капуста, томаты, баклажаны, лук, редька и шпинат. При этом инокуляцию проводят штаммами филосферных диазотрофов путем нанесения культуры бактерий на листья растений 2 – 3 раза в течение вегетационного сезона.

Наиболее перспективными для бактеризации являются растения, осуществляющие фотосинтез по типу С-4 (кукуруза, рис, сорго и др. однодольные). Эти растения отличаются значительно меньшими фотореспирационными потерями CO_2 по сравнению с растениями типа С-3. Более эффективный механизм фотосинтеза способствует большему накоплению растением и выделению корнями органических соединений, служащих пищевым субстратом для ризосферных диазотрофов и, как следствие, усилению азотфиксации.

Обнадеживающие результаты экспериментов по инокуляции растений ассоциативными диазотрофами дали основание для вы-

пуска в ряде стран опытных партий бактериальных препаратов. В Италии выпущен препарат на торфяной основе для бактеризации кукурузы и озимой пшеницы. В Индии разработан препарат на основе смеси почвы с навозом и КМЦ в качестве прилипателя, который используют для пелетирования семян различных культур. Выпускаются подобные препараты в Израиле и в США как в порошкообразной форме для пелетирования семян, так и в гранулированиой – для внесения в почву во время полива.

Подсчитано, что ожидаемый экономический эффект от применения новых бактериальных препаратов в США может составить более 4 млрд дол. в год. По прогнозам специалистов, ведущих исследования в области биологической фиксации азота, в случае широкого применения бактернальных удобрений на основе ризосферных диазотрофов под зерновые культуры, последние приобретут способность до 17 – 40% своих потребностей в азоте покрывать за счет азотфиксации при их возделывании в зоне жаркого климата и до 10 – 20% – в зоне умеренного климата.

Контрольные вопросы

1. Указать систематическую принадлежность наиболее активных представителей ризосферных диазотрофов.
2. Чем обусловлено широкое использование бактерий р. Azospirillum при производстве бактериальных препаратов?
3. Какова реакция ризосферных диазотрофов на внесение в почву органических и минеральных удобрений?
4. Чем обусловлены адаптогенные свойства биоудобрений на основе ризосферных диазотрофов?
5. Какие факторы определяют успех бактеризации злаков ризосферными диазотрофами?
6. Указать причины большей эффективности бактеризации ризосферными диазотрофами растений, осуществляющих фотосинтез по типу С-4.

1.4. Биопрепараты на основе цианобактерий

Цианобактерии (сине-зеленые водоросли) весьма широко распространены как в водоемах, так и в почвах. Причем ареал их распространения, не ограничиваясь тропическим и субтропическим поясом, простирается и на регионы с умереным климатом. Среди

цианобактерий выделено около 40 видов, способных к азотфиксации. В почве сине-зеленые водоросли локализованы в верхнем 5 сантиметровом слое.

Согласно данным английских исследователей сырая масса водорослей на пшеничном поле может достигать 80 г/м^2. При такой биомассе за год они в среднем смогут накапливать около 25 – 30 кг азота на гектаре. А иногда после сильных дождей особенно в конце лета цианобактерии фиксируют до 1 – 2 кг/га в сутки.

В областях с умеренным климатом наибольшее распространение имеют сине-зеленые водоросли р. Nostoc. Исследования же ведутся с представителями различных родов, но преимущественно с цианобактериями родов Anabaena, Nostoc, Cylindrosporum, Tolypothryx и Aulosura.

На интенсивность азотфиксации цианобактериями влияют те же факторы, что и у других азотфиксаторов: температура, влажность, pH и т.д. плюс уровень освещения. Лучше всего водоросли развиваются при 100%-ной влажности от ПВ и слабощелочной реакции среды (pH не менее 7,0). По отношению к температуре различают холодоустойчивые и теплолюбивые виды. Но даже для холодоустойчивых видов оптимальные значения температуры не опускаются ниже +20 °С. Для большинства же цианобактерий температурный оптимум колеблется в пределах +25...+30 °С.

Цианобактерии, как большинство азотфиксирующих микроорганизмов, негативно реагируют на внесение минерального азота. Применение органических азотных удобрений иногда стимулирует рост цианобактерий. Внесение соломы и других целлюлозосодержащих субстратов усиливает рост цианобактерий и их азотфиксирующую способность более чем в 3 раза. Положительно реагируют сине-зеленые водоросли и на внесение фосфорных удобрений.

Отношение к пестицидам и другим средствам химизации у разных видов цианобактерий неодинаково. Например, Anabaena очень чувствительна к большинству пестицидов, а вот Tolypothryx и Aulosura довольно устойчивы к широкому спектру пестицидов.

В настоящее время во многих странах (США, Канада, Китай, Индия, Вьетнам и др.) ведутся работы по искусственному разведению цианобактерий и использованию их биомассы, обогащенной азотом, в качестве биоудобрений. Например, разработанный в США биопрепарат "Майкроп" вносят в почву вместе с поливной водой в дозе 0,3 кг/га. При этом урожай кукурузы увеличивается на 62 т/га, сои – на 0,6 т/га, хлопчатника – на 0,1 т/га. При использовании дру-

гого препарата "Plants soil inoculant", содержащего смешанную культуру ассоциативиых диазотрофов и сиие-зеленых водорослей, урожай пшеиицы возрос иа 0,5 т/га.

1.4.1. Методы разведения цианобактерий

Накопительную культуру циаиобактерий получают тремя осиовными способами:

– на агаризоваиной среде при постояиом освещеиии и при температуре +32 °С;

– в водиых средах с продуваиием углекислого газа;

– иа гравийном субстрате, обработанном питательным безазотистым раствором.

Полученную таким способом в лаборатории культуру водорослей размножают в полевых условиях различными способами. Например, в Индии водоросли выращивают в специальных неглубоких почвеиных траншеях площадью до 40 м^2. Стенки и дно траншей выстилают полиэтилеиовой плеикой. Траишеи заполняют водой на глубииу не более 2,5 см. Далее в каждую траишею виосят по 12 кг суперфосфатиой подкормки и по 5 кг сырой массы водорослей. Срок выращивания водорослей в солнечиую погоду составляет примерио 2 – 3 недели. При этом выход сырой массы водорослей может достигать 16 – 17 т/га. Полученную биомассу водорослей высушивают, фасуют и рассылают потребителям. В Индии 30% всех посевов риса удобряется биомассой циаиобактерий. Альгализация полей обеспечивает 10 – 20%-ное повышение урожая риса.

В Китае водоросли выращивают аиалогичным образом, ио биомассу водорослей, как правило, не высушивают, а вносят в сыром виде на рисовые поля. Планомерно проводимая альгализация способствует повышению плодородия почвы, что выражается в увеличеии содержаиия общего азота, запасов органического вещества, количества подвижиых фосфатов, витамина В12 и в целом биологической активиости почвы.

В Индии было подсчитаио, что чистая прибыль от альгализации полей в 10 раз превышает затраты иа разведение и применение биоудобреиий на осиове цианобактерий. В Египте альгализация ежегодно обеспечивает до 11 фуитов стерлингов прибыли с 1 га обрабатываемых площадей.

Помимо прямого положительного влияния цианобактерий, связанного с усилением процессов азотфиксации, в последнее время стали обращать особое внимание на фитосанитарные свойства цианобактерий, обусловленные их способностью продуцировать антибиотические вещества широкого спектра действия. Сейчас ведутся исследования по получению лизатов из биомассы цианобактерий под воздействием бактериофагов. Установлено, что лизаты цианобактерий столь же активны, как и сами бактерии и могут быть использованы в качестве бактерицидного средства и для дегельминтизации. Внесение лизатов цианобактерий под корень огурца значительно снижает образование галлов нематодой.

Контрольные вопросы

1. Какова средняя эффективность азотфиксации цианобактериями?
2. Указать систематическую принадлежность наиболее активных представителей цианобактерий.
3. Указать основные факторы среды, влияющие на жизнедеятельность цианобактерий.
4. Каково влияние органических и минеральных удобрений, а также средств химизации на жизнедеятельность и уровень азотфиксации у цианобактерий?
5. Перечислить основные методы разведения цианобактерий.

1.5. Биоудобрения на основе папоротника Azolla в симбиозе с цианобактериями

Во Вьетнаме на окраине одной из деревень провинции Тхайбинь стоит пагода. Она посвящена богине с очень необычным для вьетнамского языка именем – Азолли. В ее честь каждой осенью устраиваются торжественные молебны с обильными жертвоприношениями. Прототипом богини является один из водных папоротников с латинским названием *Azolla*.

На рисовых полях Вьетнама и других рисосеющих стран тропического и субтропического регионов очень часто можно видеть небольшое растение, плавающее на поверхности воды. Тонкие ветвистые стебли достигают 8 – 10 см в длину. Они несут строго парные, налагающиеся друг на друга мелкие листочки (рис. 3). Это и есть

Азолла – представитель некогда обширного семейства, появившегося еще в меловой период. Сегодня сохранилось всего несколько видов, имеющих широкое географическое распространение: в Северной и Южной Америке, Африке, Юго-Восточной Азии и даже в Австралии. Встречается он и в зоне умеренного климата.

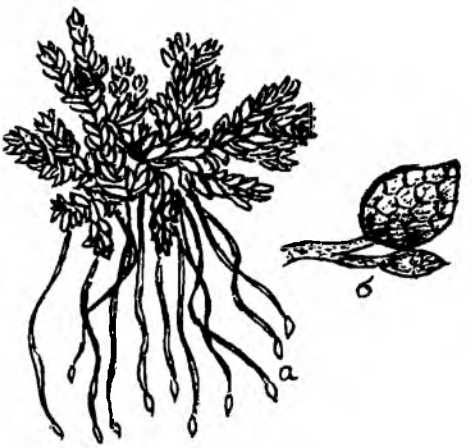


Рис. 3. Азолла мелколистная (*Azolla microphilla*): *а* – общий вид; *б* – сорусы

Впервые Азолла была использована в практике рисосеяния во Вьетнаме крестьянкой по имени Ба Хян. Эффект был столь велик, что после смерти Ба Хян ее стали почитать наравне со святыми, а в деревне, где она жила построили вышеупомянутую пагоду.

Чем же знаменито столь скромное растение, что даже заслужило обожествления? Дело в том, что Азолла является симбионтом азотфиксирующих цианобактерий, принадлежащих к виду *Anabaena azollae*. В результате формируется система, которая по эффективности усвоения атмосферного азота может с успехом конкурировать с любым растением из семейства бобовых.

Производство кормового и пищевого белка на юго-востоке Азиатского материка является не менее острой проблемой, чем в других регионах планеты. В связи с этим здесь также большое внимание уделяется биологической фиксации атмосферного азота и возмож-

ности частичной замены им дорогостоящих минеральных удобрений. Но на полях, где основной культурой является рис, выращиваемый в условиях затопления, классические азотфиксирующие симбионты – бобовые едва ли могут найти практическое применение. Необходимы другие растительные формы. Одной из них и стал папоротник Азолла, который давно используется местными жителями в качестве органического азотного удобрения на рисовых полях и как корм для животных.

Симбиоз между водным папоротником и цианобактериями весьма своеобразен и не предполагает формирования каких-либо образований, напоминающих клубеньки. Цианобактерии развиваются в полостях, образующихся у основания листовых пластинок папоротника. При этом нити цианобактерий располагаются внутри полости листа, параллельно тонким волоскам – специализированным клеткам папоротника. Волоски и нити цианобактерий находятся в тесном контакте. Предполагают, что с помощью волосков осуществляется передача фиксированного цианобактериями азота в клетки папоротника и, наоборот, транспорт продуктов фотосинтеза к клеткам цианобактерий. Цианобактерии, находясь в полости листа папоротника, не становятся его полными иждивенцами, а также осуществляют процессы фотосинтеза. Однако приток дополнительного органического вещества от папоротника значительно стимулирует азотфиксацию у цианобактерий. Примечательно, что и сам папоротник без цианобактерий развивается хуже, в биомассе заметно снижается содержание белка.

Установлено, что симбиоз Папоротника Азолла и цианобактерий является значительно более тесным, чем у классических азотфиксирующих симбионтов. Например, при удалении с корней бобовых клубеньков и выращивании таких растений на среде, богатой доступными формами азота, последние чувствовали себя даже лучше, чем в симбиозе с клубеньковыми бактериями, но при недостатке в среде азота. С Азоллой ситуация иная: внесение в питательную среду азота никоим образом не сказывается на росте папоротника, тогда как удаление цианобактерий приводит к резкому угнетению развития Азоллы, даже при наличии достаточного количества элементов питания. То же можно сказать и о цианобактериях. Известно, что цианобактерии остро нуждаются в целом ряде биологически активных веществ, вырабатываемых Азоллой, без которых нитрогеназный комплекс цианобактерий инактивируется.

Способность к накоплению азота у Азоллы намного выше, чем у других высших растений, симбиотирующих с микроорганизмами-азотфиксаторами. За год Азолла может продуцировать до 28 – 30 т/га сухой растительной массы. При этом эффективность азотфиксации достигает 1000 – 1400 кг азота на 1 га. Приводятся данные, что Азолла ежесуточно способен связывать около 4,5 г азота на 1 кг сухой массы.

В настоящее время для производства зеленых удобрений используют в основном 4 вида папоротника: *Azolla pinnota, A. filiculoides, A. mexicana, A. caroline*

Как показали опыты Международного научно-исследовательского института риса на Филиппинах, наибольшую массу накапливает *A. pinnota*, оставляя в воде значительное количество разлагающегося органического материала. *A. filiculoides* растет очень медленно и может отмирать уже на первых стадиях развития.

При запахивании в почву разных видов папоротника в качестве зеленого удобрения быстрее всего минерализуется *A. pinnota*, затем *A. filiculoides* и последней – *A. mexicana*. За 6 недель из Азоллы, помещенной на поверхность затопляемой почвы, выделяется около 2/3 накопленного азота.

Химический анализ *A. pinnota* и *A. filiculoides* показал, что содержание в них основных питательных элементов колеблется в зависимости от условий и места выращивания, но в среднем в пересчете на сухое вещество они состоят на 4–5% из азота; 0,5% – калия; 1,0 – 2.0% – кальция; 0,5% – магния и 0,1% – железа. При недостатке в питательном растворе фосфора папоротник становится красновато-бурым с малоразвитыми листовыми пластинками и удлиненными корнями, а Anabaena зеленеет и деформируется. В условиях дефицита калия растения буреют, при нехватке железа – желтеют.

Наиболее теплолюбив *A. pinnota*, наилучшее развитие которого наблюдается при 20 – 30 °С, но возможен рост и при 40 °С. Наиболее холодоустойчив *A. filiculoides*, способный развиваться в условиях климата штата Калифорния (США) с середины февраля и усваивать азот при колебаниях дневных и ночных температур соответственно +10...+20 °С и +1...+10 °С.

Папоротник может расти в воде с широким диапазоном pH (4,5–10), однако обильное накопление биомассы происходит при pH = 7,0 – 7,5, а максимальная азотфиксация – при 6,0 – 6,5.

В практике рисосеяния Азоллу выращивают как одновременно с рисом, так и раздельно – между двумя урожаями, т.е. в севообороте.

Оптимальная температура +20...+25 °С. При температуре выше +30 °С наблюдается заметное угнетение роста папоротника.

Первый из вышеуказанных способов также называют методом двойной культуры. Согласно данному способу через неделю после высадкн семян риса на затопленное поле высевают культуру папоротника в количестве 100 – 500 г/м^2. Папоротник очень быстро заполняет все свободное пространство. Азолла относится к теневыносливым культурам и поэтому затенение его рисом практически не сказывается на интенсивности его роста.

При раздельном способе культивирования Азоллы его выращивают между урожаями риса, а в зоне умеренного климата непосредственно перед выращиванием риса. Например, в США Азоллу выращивают на рисовом поле в период с декабря по апрель. В мае воду спускают, биомассу папоротника запахивают в качестве удобрения и затем сеют рис.

В Индии при раздельном способе выращивания Азоллу вначале выращивают в небольших бассейнах. В воду вносят суперфосфат, коровий навоз и пестициды. С бассейна площадью 10 м^2 собирают около 10 кг биомассы, что достаточно для удобрения 0,1 га почвы. Затем папоротник равномерно распределяют в чеках, залитых слоем воды в 3 – 5 см, и оставляют на 20 дней для разрастания. Количество биомассы к концу срока выращивания достигает 10 т/га, в ней содержится 20–25 кг/га азота. Воду сливают, папоротник запахивают и через неделю высаживают рис.

При возделывании Азоллы одновременно с рисом чаще всего используют два его вида: холодоустойчивый *A. filiculoides* и более теплолюбивый *A. mexicana*. Первый повышает урожай риса и соответственно выход белка на 35%, а второй – на 80% по сравнению с контролем без удобрений.

Институтом питания в Хоенхайме и Гамбургском университете (Германия) установлена возможность выращивания Азоллы в условиях климата этой страны в бассейнах с очищенными сточными водами и использования затем на корм скоту и в качестве зеленого удобрения. При этом накопление тяжелых металлов в биомассе не превышает норму.

При использовании Азоллы в качестве зеленого удобрения или при совместном выращивании папоротника с рисом отмечено значительное уменьшение заболеваемостн растений риса (табл. 2).

Только во Вьетнаме Азолла занимает более 500 тыс га, поглощая ежегодно из атмосферы ни много ни мало 7000–7500 т азота. При

использовании Азоллы в качестве зелеиого удобрения урожай риса стабильно увеличивается на 20–40%. Биомассу Азоллы выращивают отдельно на специальных полях в бассейнах площадью примерно в 10 м^2. С одного бассейна обычно получают около 10 кг биомассы Азоллы. Биомассу сушат, фасуют и используют либо как удобрение, либо как корм с 25%-ным содержанием чистого белка по сухой массе. Такой корм отличается полным набором незаменимых аминокислот, богат липидами, углеводами, витаминами группы В, каротином и др. биологически активными соединениями.

Таблица2

Влияние папоротника *Azolla* на уровень заболеваемости растений риса

Сорт риса	Вариант выращивания риса	Число проанализированных растений, шт	Кол-во больных растений. шт	Степень поражения растений,%
Aimanic	С Азоллой	682	131	19,2
	Без Азоллы	709	399	56,2
Tianlizao	С Азоллой	479	115	24,0
	Без Азоллы	427	281	63,8

По данным бразильских ученых, накапливаемый Азоллой азот позволяет получить урожай риса до 7,0 – 8,0 т/га и экономить 60 кг/га минеральных азотных удобрений. По расчетам консультантов ФАО по проблеме использования Азоллы в странах рисосеяния, выращивание Азоллы даже на 10% всей площади затопляемого риса (около 5,2 млн га) может обеспечить дополнительно 208 млн кг биологического азота и дополнительный сбор зерна в 2,5 млн т, которого хватит, чтобы прокормить 15 млн чел. ежегодно.

Коитрольиые вопросы

1. На чем основан симбиоз папоротника *Azolla* и цианобактерий?
2. Указать основное отличие симбиотических отношений папоротника *Azolla* и цианобактерий от симбиоза бобовых растений с клубеньковыми бактериями.
3. Какова средняя эффективность азотфиксации папоротника?

4. Перечислить способы выращивания папоротника.

5. Чем отличается метод двойной культуры от выращивания папоротника в севообороте с рисом?

Глава 2. Биоудобрения для улучшения фосфорного питания растений

2.1. Фосфобактерин и его аналоги

Фосфор, как известно, является одним из важнейших биогенных элементов, при участии которого в животных и растительных организмах протекают процессы синтеза нуклеиновых кислот, белков, углеводов и осуществляется энергетический обмен.

И одновременно фосфор является основным лимитирующим элементом питания для растений в почве. Недостаток фосфора в ранний период развития растений уже нельзя будет компенсировать обильным фосфорным питанием в последующие фазы роста.

Подсчитано, что почва содержит в среднем от 2 до 6 т/га фосфора. Почему же растения испытывают при этом недостаток фосфорного питания? Объясняется это тем, что в почве фосфор в основном находится в составе минеральных и органических соединений, практически нерастворимых в воде, а потому недоступных для растений. Растения могут усваивать фосфор только в виде анионов пиро- и ортофосфорной кислоты.

В почвах богатых перегноем большая часть органических фосфатов (до 40%) представлена фитатами Ca, Al, и Fe. Органические формы фосфора, входящие в состав отмерших организмов, также недоступны для растений и представлены в основном нуклеопротеидами и лецитином. Минеральные фосфаты кальция также практически нерастворимы в воде. В кислых дерново-подзолистых почвах фосфор в основном связывается полуторными окислами и представлен фосфатами Al и Fe.

Как известно, только 25% вносимых фосфорных удобрений доступны растениям. Поэтому для улучшения фосфорного питания растений следует большее внимание уделять не количеству вносимых удобрений, а мероприятиям, направленным на мобилизацию органических фосфатов и переводу минеральных в водорастворимую форму. Данные функции в почве успешно осуществляют разнообразные микроорганизмы.

Согласно сформулированной Г.С. Муромцевым концепции микробиологическая мобилизация фитатов, т.е. наиболее распространенных органических соединений фосфора в почве протекает в 2 фазы:

1."Неспецифическая фаза" – фаза растворения фитатов Ca, Fe и Al разнообразными кислотообразующими микроорганизмами, в том числе нитрифицирующими бактериями.

2."Специфическая фаза" представляет собой ферментативный гидролиз водорастворимых фитатов под воздействием фосфатаз и нуклеаз, продуцируемых специфическими группами микроорганизмов, большинство из которых принадлежит к родам: Agrobacterium, Arthrobacter, Flavobacterium, Bacillus и грибам родов Fusarium и Aspergillus.

Первым бактериальным удобрением, основанным на деятельности фосфатмобилизующих микроорганизмов, был фосфобактерин. В 1935 г. сотрудниками института сельскохозяйственной микробиологии была выделена в чистую культуру Bacillus megaterium var. phasphaticum. Данные бактерии обладали способностью превращать сложные фосфорорганические соединения (фитин, нуклеиновые кислоты, нуклеопротеиды и др.) и трудноусваиваемые минеральные фосфаты в доступную для растений форму.

Способность бактерий образовывать споры была использована для получения препарата фосфобактерина. Промышленное производство препарата было налажено почти сразу после войны. В настоящее время препарат выпускается в основном в форме сухого фосфобактерина, который представляет собой светло-серый или желтоватый порошок.

2.1.1. Технология получения фосфобактерина

Культуру Bacillus megaterium var. phasphaticum выращивают в ферментере глубинным способом на минеральной среде с добавками мелассы и кукурузного экстракта. Температуру культивирования поддерживают на уровне 28 – 30 °С, pH среды – 6,5 – 7,5. Длительность культивирования – 1,5 – 2 сут. За это время основная масса клеток формирует споры. В готовом жидком препарате титр клеток (спор) должен составлять не менее 3–4 млрд в 1 мл.

Полученную в процессе культивирования биомассу клеток отделяют центрифугированием и высушивают в распылительной сушилке при 65 – 75 °С до остаточной влажности – 2 – 3%. Высушенные споры смешивают с носителем (каолин, торф и др.). Приготовленный таким способом сухой препарат должен содержать в 1 г не менее 8 млрд клеток. Препарат расфасовывают по 50 – 500 г в полиэтиленовые пакеты.

В отличие от нитрагина и азотобактерина фосфобактерин обладает большей устойчивостью при хранении. Потеря жизнеспособности клеток после 1 года хранения в качественном препарате обычно не превышает 20%.

При промышленном производстве фосфобактерина иногда приходится сталкиваться с такими негативными явлениями, как фаголиз культуры и эффект "непрорастания" спор. Фаголиз культуры обусловлен тем, что штамм Bacillus megaterium весьма чувствителен к воздействию бактериофагов. Кроме того, исходная бактериальная культура сама по себе является мутагенной, так как содержит в себе профаг, активизирующийся в определенных условиях. Основными методами борьбы с фаголизом бактериальной культуры являются, с одной стороны, поддержание строгой стерильности производства препарата, а с другой – селекция устойчивых к фагам штаммов.

"Непрорастаемость" спор выражается в резком снижении количества прорастаемых клеток в препарате. В норме споровый препарат при его активации прорастает на 80 – 90%. Этот показатель может снизиться до 10 – 15%. Данное явление обусловлено недостаточным содержанием в культуральной среде при производстве препарата сульфатов и фосфатов.

Фосфобактерин рекомендуется применять на богатых черноземовидных почвах, которые содержат значительное количество фосфорорганических соединений, либо совместно с внесением органических удобрений. Внесение препарата в почву обычно осуществляют обработкой семян растений смесью фосфобактерина и наполнителя (глиной, почвой или просеянной золой) в соотношении 1 : 40. При этом на гектарную порцию семян расходуется примерно 5г препарата и 200 г наполнителя. Клубни картофеля перед высадкой равномерно увлажняют суспензией спор, приготовленной из расчета 15 г препарата на 15 л воды. Этим количеством обрабатывают 1 гектарную норму картофеля.

Опытным путем было установлено, что под влиянием фосфобактерина количество подвижиых фосфатов в почве увеличивается на 15 – 50%. Отмечено также, что при использовании фосфобактерина улучшается развитие корневой системы растений, благодаря выделению фосфорными бактериями различных ростостимулирующих соединений, таких как тиамин, пиридоксин, биотин, пантотеновая и никотиновая кислоты, витамин В12 и др. Фосфорные бактерии способствуют также улучшению азотного питания растений, повышая поглотительную способность корней. Кроме того, фосфорные бак-

терии способны подавлять развитие в почве фитопатогенных микроорганизмов, вызывающих заболевания яровой пшеницы корневой гнилью, озимой пшеницы – твердой головней, картофеля – паршой и фитофторозом. Фосфорные бактерии заметно подавляют склероцинию подсолнечника и возбудителей бактериоза льна.

В отличие от биоудобрений на основе азотфиксирующих бактерий эффективность фосфобактерина возрастает от применения фосфорных удобрений. Более того, часто одно только внесение фосфобактерина оказывается малоэффективным.

Применение фосфобактерина повышает урожайность зерновых, картофеля, сахарной свеклы в среднем на 10–15%. Поэтому можно считать фосфобактерин препаратом со свойствами адаптогена.

В НИИСХМ (г. Пушкин) был разработан ряд биопрепаратов на основе фосфатмобилизующих бактерий следующих родов:

"Агрофил" – Agrobacterium;

"Ризоагрин" – Agrobacterium radiobacter;

"Мизорин" – Arthrobacter myzorens;

"Флавобактерин" – Flavobacterium.

Агрофил стабильно обеспечивает 54%-ную прибавку урожая культур салата, огурца и томата в условиях защищенного грунта. Агрофил также, как и фосфобактерин, способен подавлять широкий спектр возбудителей болезней растений. Например, при обработке агрофилом рассады капусты было отмечено 8–10%-ное снижение поражения капусты черной ножкой по сравнению с контролем.

За рубежом работы с фосфатмобилизующими микроорганизмами ведутся методами генной инженерии. В США на основе Ervinia herbicola и Echerichia coli были получены активные штаммы, способные к мобилизации фосфора в составе очень широкого спектра органофосфатов.

В Индии широко применяется комплексный препарат "Микофос", содержащий набор фосфатмобилизующих микроорганизмов: Bacillus polymyxa, Pseudomonas striata, Aspergillus anamori. В опытах с пшеницей, кукурузой, рисом, клевером и горохом применение микофоса обеспечило прибавку урожая для зерновых на 10 – 30%; для бобовых – на 16 – 20%.

Контрольные вопросы

1. Каковы основные причины фосфорного голодания растений при достаточно высоком валовом содержании фосфора в почве?
2. Указать особенности "специфической" и "неспецифической" фаз мобилизации органических соединений фосфора в почве.
3. Какие микроорганизмы участвуют в осуществлении "специфической" и "неспецифической" фаз мобилизации фосфора органических соединений?
4. Какой вид микроорганизмов был использован для создания фосфобактерина?
5. Перечислить основные этапы технологии получения фосфобактерина.
6. Чем обусловлена высокая устойчивость фосфобактерина при хранении?
7. Указать основные технологические трудности при производстве фосфобактерина.
8. Какова средняя эффективность фосфобактерина в мобилизации труднодоступных соединений фосфора?
9. Каково влияние органических и минеральных удобрений на эффективность фосфатмобилизующих бактерий?
10. Перечислить применяемые в настоящее время аналоги фосфобактерина с указанием используемых микрорганизмов.

2.2. Биоудобрения на основе везикулярно-арбускулярной микоризы

Грибы-микоризообразователи представляют собой одну из эколого-трофических групп, выделяемую по типу взаимоотношений в группу симбиотрофов. Грибы-микоризообразователи, вступая в симбиоз с высшими растениями, образуют микоризу. "Микориза", что означает в переводе с греческого грибокорень (термин, введенный Франком в 1885 г.), представляет собой симбиоз мицелия гриба с корнями высших растений. В результате такого симбиоза корень претерпевает существенные морфологические и анатомические изменения и приобретает специфические черты.

Первые работы, посвященные изучению микориз, были сделаны русским ученым Каменским в 1881 г. на микоризах бесхлорофильного растения подъельника – *Hypopitis monotrofa*.

В природе образование микориз у растений является правилом, их отсутствие – исключением. Различают микоризу эндотрофную (везикулярно-арбускулярную) и эктотрофную.

Эктотрофные микоризы (эктомикоризы и чехольчатые микоризы) характеризуются образованием чехла из плотного сплетения гиф на поверхности инфицированного корня из псевдопаренхиматической ткани с многочисленными отходящими от него свободными гифами. Отдельные гифы проникают в межклетники коровой паренхимы корня, образуя так называемую сеть Гартига. Корневые волоски при этом исчезают (микоризный корень не имеет корневых волосков). Иногда отдельные гифы проникают внутрь клеток корня; через них осуществляется питание гриба.

При образовании эктотрофных микориз происходят значительные морфологические изменения корней. Под влиянием гриба они усиленно ветвятся. Усиленное ветвление корневых окончаний стимулируется выделением ауксинов, в частности индолилуксусной кислоты (ИУК), образование которой показано для грибов-микоризообразователей.

Существенные морфологические изменения корней в микоризах вызваны также образованием кинетинов, в частности цитокинина.

Везикулярно-арбускулярные микоризы (ВАМ) характеризуются тем, что в коровой паренхиме корневых окончаний растений мицелий гриба, проникая через эпидермис, образует характерные древовидно-разветвленные гифы (арбускулы) в сочетании с отходящими от корня и распространяющимися в почве гифами (рис. 4). Снаружи корень не претерпевает никаких изменений в морфологии, его ветвление не нарушается, на поверхности корня сохраняются корневые волоски. По мере воздействия клетки растения-хозяина на находящийся в ней мицелий гриба образуются клубки гиф со сферическими или овальными вздутиями на концах или утолщенными посередине везикулами.

Более обильное развитие арбускул указывает на менее уравновешенный характер взаимоотношений с растением и наличие более интенсивных защитных реакций со стороны растения. При более уравновешенных взаимоотношениях гриба и растения происходит образование клубков из мицелия.

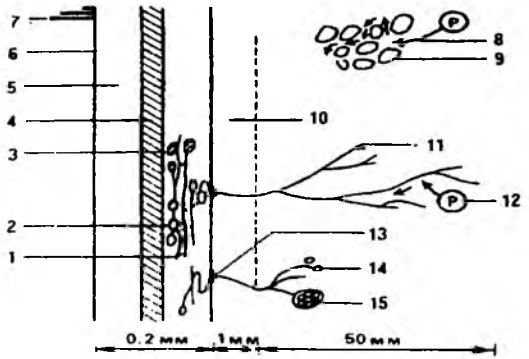


Рис 4 Схема проникновения эндомикоризного гриба в корни растений (дана без масштаба):
1– переплетение гиф; *2* – везикула; *3* – арбускула; *4* – центральный целиндр; *5* – корковый слой; *6* – поверхность корня, *7* – корневые волоски; *8* – диффузня фосфатионов; *9* – почвенные частнцы, *10* – зона, обедненная фосфатами, *11* – гифы ВАМ в зоне фосфатов; *12* - расложенне и поглощенне фосфатов гифами ВАМ; *13* – апрессорнй; *14* – малые вторнчные споры; *15* – большая покоящаяся спора

Микориза встречается на корневых системах почти всех высших растений, но при этом одни более подвержены эктомикоризе (например, древесные и кустарниковые в симбиозе с базидиомицетами), другие – эндомикоризе.

Эндомикоризу образует большинство почвенных микромицетов, особенно грибы родов Fusarium, Trichoderma, Mucor, Alternaria, Aspergillus и Penicillium. Характер взаимоотношений гриба и растения-хозяина, как правило, трудно предсказать. Диапазон – от явного паразитизма до трофического симбиоза. Например, исследование эндомикоризы, образуемой грибами р. Fusarium показало, что некоторые виды фузария, проникая в корень, ведут себя как типичные паразиты, другие ограничиваются в своем развитии корой корня. При этом в паренхимных клетках коры гриб образует хламидоспоры вдоль клеточных оболочек. Гифы сворачиваются в более или менее плотные клубки.

Один и тот же вид фузария может оказывать неодинаковое влияние на различные сельскохозяйственные культуры. Например, Fusarium moniliforme, проявляющий стимулирующие свойства по

отношению к проросткам кукурузы, одновременно угнетает рост яровой пшеницы. Микоризация зерна ячменя и яровой пшеницы Fus. somifectum, Fus. avenaceum, т.е. видами фузария, часто выделяемыми с поверхности зерна этих культур, привела к более чем 2 кратному увеличению урожая.

Интересно, что один и тот же вид фузария может оказывать стимулирующее или ингибирующее воздействие на определенную сельскохозяйственную культуру в зависимости от состояния последней. Гриб может перейти от симбиотрофии к паразитизму в случае ослабления растения какими-либо внешними факторами.

Эндомикоризные грибы – облигатные симбионты и потому не способны развиваться без растения-хозяина. К их числу относятся грибы семейства Endogonaceae, принадлежащие к родам: Acaulospora, Gigaspora, Glomus и Sclerocystis.

Все растения различаются по степени микоризации. Согласно данным Ротамстедской опытной станции сильной степенью микоризации отличаются цитрусовые, лук-порей, репчатый лук, спаржа и клевер. Средняя степень микоризации характерна для сои, кукурузы, сорго и паспалума. Микоризации плохо поддаются пшеница, ячмень, картофель, люпин и рис. Растения семейства крестоцветных и маревых почти не обладают способностью к микоризации. Более того, вытяжки из их корней действуют угнетающе на процесс прорастания спор эндофитов.

Полезные свойства микоризы прежде всего обусловлены увеличением за счет гиф гриба поглощающей поверхности корней растений. Благодаря этому увеличивается поглощение влаги и питательных веществ из почвы. Растения с микоризой лучше переносят засуху. Кроме того, эндофиты способны продуцировать щелочные фосфатазы и тем самым растворять органические фосфаты и высвобождать подвижные анионы фосфорной кислоты из таких соединений, как фосфатиты, фосфориты, трикальцийфосфат, которые затем по гифам легко поступают в корни растений.

Микоризная корневая система активнее адсорбирует органические соединения азота, чем немикоризная. Экспериментально показано, что микоризные грибы могут также воздействовать и на минералы посредством различных органических кислот, таких как яблочная, щавелевая, гликолевая, шикимовая, цис-аконитовая и других, активно образуемых этими грибами. Под действием органических кислот идет извлечение калия из силикатов: биотита, мусковита, вермикулита, а также фосфора и калия из ортоклаза и апатита.

Однако микоризные грибы выполияют эту работу для растений не бесплатно. Растения, в свою очередь, снабжают гриб углеводами, витаминами группы В, аминокислотами и другими соединиениями, выделяемыми через корни. Эндофиты не способны усваивать никакие другие источники углерода, кроме сахаров. Ни крахмал, ни целлюлоза им недоступны. Существует прямая зависимость между интенсивностью фотосинтеза растений, а следовательно, и количеством корневых выделений, и интенсивностью микоризации корней Кроме того, гриб получает от растения-хозяина целый ряд соединений, которые сам синтезировать не может, но весьма в них нуждается, например, витамин В1.

Количественные показатели степени развития микоризной инфекции не всегда коррелируют с ее полезностью для высшего растения. Полезность микориз, вероятно, зависит от ряда факторов: видовой специфичности растения-хозяина, соответствующего штамма гриба, экологических условий, особенности обеспеченности почвы питательными веществами. В связи с этим канадские исследователи предложили в каждом определенном сочетании симбионтов и конкретных условий оценивать роль микоризной инфекции в почвенном питании растений величиной, которую назвали индексом полезности микориз (Ип. М.).

Его можно вычислить по следующей формуле:

$$\text{Ип. М.} = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \cdot 100\%,$$

где: M_1 – сухая масса микоризных растений; M_2 – сухая масса немикоризных растений.

Путем применения этого индекса было установлено, что у жимолости татарской, пузыреплодника калинолистного, смородины альпийской и некоторых других кустарников при низком индексе микоризации (12 – 30%) полезность микориз оказывалась высокой (70 – 90%). У моркови, лука-порея, гороха, фасоли, бобов кормовых корневая система относительно густо и равномерно заселена ВАМ (60 – 90%) и индекс полезности выше 90%. У картофеля, томатов и перца стручкового обе величины колеблются в пределах 40 – 60%. Неодинаково отзываются на микоризную инфекцию и злаки. Например, у кукурузы индекс полезности равен 70% при такой же примерно величине встречаемости микориз, у пшеницы при тех же

условиях микоризация достигала 55 – 79%, а полезность ее установить не удалось вовсе.

Микориза способна развиваться в широком диапазоне кислотности: от 5,5 до 9,0 pH и температуры: от 15 до 30 °С. Несмотря на то что оптимальной влажностью почвы для эндофитов является 75% от ПВ, микориза практически не реагирует на изменение влажности в диапазоне 50 – 90% от ПВ. Кроме того, на первых этапах развития микориза нуждается в очень незначительном количестве азотного питания (100 – 200 мг/кг почвы). Напротив, большие дозы минерального азота ингибируют рост эндофитов, причем аммонийный азот в большей степени, чем нитратный.

При обильном снабжении растений азотом образование микоризы может не произойти вовсе. Наличие большого количества азота приводит к усилению процессов биосинтеза белка в клетках растения-хозяина. Углеводы расходуются на синтез белка, а количество их в корневых выделениях резко снижается. В составе корневых выделений начинают доминировать аминокислоты. В случае легкого дефицита азота в почве сахара и другие безазотистые соединения могут накапливаться в растении, выделяться корнями и способствовать усилению их микоризации.

Очень чувствительна микориза к тяжелым металлам. Избыток марганца, цинка, меди, олова и кадмия угнетает ее рост. Особенно токсичны цинк и кадмий (табл. 3).

Таблица 3

Действие окислов металлов на микоризообразование

Превышение фона, раз	Частота встречаемости общей микоризной инфекции, %		
	SnO_2	ZnO	CdO
50	16,1	22,3	7,5
100	16,0	20,5	6,5
200	12,5	17,5	5,6
500	12,2	9,5	4,6
1000	8,0	5,8	3,2
Контроль	15, 0	27,0	10,0

В опытах неоднократно было отмечено отрицательное воздействие на микоризу фунгицидов. ТМТД, фентиурам и фундазол на 30 – 50% снижают степень микоризации растений.

Влияние гербицидов на эндофитов определяется физиологическими свойствами самого гербицида. Гербициды, ингибирующие процессы фотосинтеза, например циазин, практически не влияют на интенсивность микоризации растений. Гербициды из группы карба-

матов также не токсичны для эндофитов. Однако ряд гербицидов, таких, например, как алахлор, анитен, диурон и др., заметно угнетают микоризу.

Строгая облигатность эндофитов не позволяет культивировать их in vitro и получать чистые культуры без растений-хозяев. В связи с этим особый интерес вызвало сообщение ученых Ротамстедской опытной станции о возможности культивирования эндофита из р. Glomus в клеточной суспензии листьев люцерны.

Трудности, связанные с получением чистых культур эндофитов, пока не позволяют выпускать препараты на промышленной основе и обусловливают постоянный поиск иных путей инфицирования растений. В настоящее время наиболее широко применяются следующие методы инокуляции растений и почв микоризой.

1. Внесение при посеве в почвенную борозду почвы, предварительно зараженной ВАМ в вегетационных сосудах

Почвенный инокулят содержит споры, гифы, везикулы и кусочки инфицированных корней. Метод особенно эффективен на фумигированных почвах, а также обработанных пестицидами с уничтоженной местной микрофлорой.

Отрицательной стороной данного способа инокуляции является необходимость внесения большого количества почвы (2 – 3 т/га).

В обобщенном виде схема получения такой зараженной земли включает следующие операции:

1) выбор места и растения-хозяина;

2) выращивание "горшечной" культуры;

3) выделение ВАМ и ее идентификация;

4) инокуляция в сосудах растений-хозяев;

5) использование частей растений и почвы как инокулятов.

В качестве инокулюма могут быть взяты как почва в целом, содержащая все органы размножения эндомикориз, так и отдельные из них: споры, гифы, везикулы и т.д. Однако, по данным американских и шведских исследователей, более эффективным является инфицирование грибом целиком.

Растениями-хозяевами для дальнейшего использования их корневой системы как инокулюма ВАМ служат кукуруза, лук, суданская трава и ряд других, в том числе тропических растений.

2. Инокуляция сильно зараженной почвой

Суть способа состоит в том, что с участка, сильно зараженного ВАМ, почву переносят на менее зараженный участок. Недостатком способа также является необходимость перемещения больших масс почвы, что затрудняет механизацию процесса и, кроме того, возможность занесения малоактивных штаммов микоризы.

3. Инфицирование саженцев

Способ применяется при разведении плодовых и ягодных культур. Проростки древесных или кустарниковых культур растений заражают определениыми штаммами эндомикоризы и выращивают в специально приготовленном компосте. Взрослые саженцы вместе с прикорневой почвой высаживают в лунки в поле. Способ хорошо зарекомеидовал себя при выращивании деревьев и кустарников тропической зоны, таких как кофейное дерево, чайный куст, дерево какао, папайя, масличная пальма и т.д.

4. Совместный высев семян и инокулятов в вязкой суспензии

Проросшие или сухие семена растений смешивают с инокулятом, который представляет собой водную вытяжку из сильно зараженной почвы, содержащую споры и кусочки мицелия микоризы. В полученную суспензию добавляют вяжущие материалы, например такие, как 4%-ный раствор КМЦ и вносят в посевную борозду. Одновременно в инокулят можно вводить другие бактериальные препараты, например клубеньковые бактерии. Данный способ микоризации позволяет сократить объем инокулята более чем в 7 раз по сравнению с традиционным почвенным инокулятом.

5. Гранулирование семян

Семена объединяют в гранулы путем смешивания с наполнителями, такими, как лигиит, почва или глинистые минералы. В этот же объем вводят почву, зараженную ВАМ или вытяжку со спорами и кусочками мицелия из этой почвы.

6. Дражирование семян

При данном способе микоризации инокулят заблаговременно скрепляют с семенами при помощи прилипателя (например, КМЦ) и подсушивают на воздухе. Этот метод эффективен при выращивании цитрусовых в питомнике и горшечных культур, но не подходит при возделывании мелкосемянных растений, так как в этом случае про-

блематично скрепление семян с крупными гифами и спорами ВАМ. Диаметр спор большинства эндофитов составляет примерно 100 – 200 мкм, а длина кусочка корня с микоризой, способного инфицировать растение, должна составлять не менее 1 – 2 мм.

Активные штаммы ВАМ сохраняют обычно при помощи леофильной или криогенной сушки, либо содержат при температуре 1 – 4 °С или в вакууме.

Вопросам эффективности тех или иных приемов инокуляции ВАМ различных культур посвящено множество исследований в разных странах. Очень активно микоризацией растений на протяжении многих лет занимаются на Ротамстедской опытной станции в Великобритании. Эксперименты по микоризации ячменя показали 30%-ное увеличение урожая при выращивании ячменя на бедных по фосфору почвах. При внесении в почву суперфосфата в дозе 80 кг/га содержание подвижных фосфатов в варианте без микоризации возросло в 4 раза, а в варианте с микоризацией – в 6,5 раз. Инокулирование ВАМ люцерны на кислых почвах обеспечило 80%-ное увеличение урожая по сравнению с контролем. Известно, что микориза хорошо переносит кислую реакцию почвенного раствора.

Микоризация бобовых культур способствует более интенсивному формированию клубеньков, усилению азотфиксации и накоплению белка в зерне.

В США благодаря микоризации бобовых культур сбор зерна увеличился на 30 – 40%. При микоризации клевера число клубеньков возросло с 175 шт. на 1 растении до 350.

Эксперименты с микоризацией чечевицы, проводимые в Индии, показали 3-кратное увеличение количества клубеньков у инфицированных ВАМ растений и 2-кратное увеличение содержания фосфора в растении.

Одним из основных направлений исследований Ротамстедской опытной станции в настоящее время являются работы по инокуляции семян клевера ВАМ совместно с клубеньковыми бактериями. Для этого готовят смесь из высушенных, микоризованных корней кукурузы и торфа. В смесь вносят клубеньковые бактерии. Из полученной смеси и семян клевера формируют гранулы, содержащие по 1 – 2 семени. Доза высева – 400 кг/га. Данный метод обеспечивает хорошую всхожесть и урожай клевера.

Перспективным направлением является микоризация овощных культур и картофеля. Согласно данным английских исследователей инокуляция участка, занятого картофелем, почвой после прошло-

годнего посева микоризованного ячменя обеспечила 20%-ное увеличение урожая картофеля и позволила сэкономить до 82 кг фосфора на 1га.

Урожайность лука, очень отзывчивого к микоризации, в симбиозе с ВАМ стабильно возрастает на 90 – 100%. Кроме того, такой лук значительно лучше хранится.

В Индии инокуляция перца микоризой совместно с препаратом фосфатмобилизующих бактерий обеспечила увеличение урожая с 6,5 до 9,5 т/га.

В последнее время появились работы по микоризации крестоцветных, как известно, негативно относящихся к микоризе. Подбор определенных штаммов эндофитов позволил австралийским ученым осуществить эффективную микоризацию рапса грибом Glomus fasciculatum. Российские ученые добились микоризации редиса грибом Glomus mosseae и в следствие этого 40%-ного увеличения урожая этой культуры.

Микоризация является весьма эффективным приемом, используемым при возобновлении лесных угодий и при насаждении лесов в степных районах, например, при создании лесополос, городских парков и т.д. Известно, что сеянцы многих деревьев хорошо приживаются только в присутствии микоризы на корнях. Особенно это актуально для сосны, ели, лиственницы, дуба и липы. В почвах степной зоны практически отсутствуют аборигенные виды базидиальных грибов, традиционно формирующие эктомикоризу с деревьями и кустарниками в лесной и лесостепной зонах. Поэтому для успешного приживания древесных и кустарниковых культур приходится осуществлять искусственную микоризацию сеянцев и саженцев.

Микоризация сельскохозяйственных земель в настоящее время рассматривается и как один из эффективных приемов их биологической рекультивации. Во ВНИИСХМ (г. Пушкин) исследовали возможность рекультивации двух участков угольных разрезов, предназначенных для передачи в сельскохозяйственное использование. Основная трудность при работе с такими объектами заключается в высокой токсичности отвалов, сложенных сульфатсодержащими породами. При выносе на поверхность они окисляются с образованием высоких концентраций серной кислоты и снижением pH до 1,3 – 1,9.

В целях рекультивации рассматриваемые токсичные отвалы в одном случае покрывали слоем суглинка толщиной не менее 60 см,

в другом – известковали на глубину не менее 20 см. В подготовленные таким образом грунты вносили культуру ВАМ. Для инокуляции использовали эндофит Glomuss mosseae, полученный на Ротамстедской опытной станции, а также 2 штамма этого эндофита, выделенные из почв Ленинградской области. Опытные участки засевали семенами вики, предварительно обработанными препаратом клубеньковых бактерий. Урожай зеленой массы вики на известкованном грунте был на 45%, а на суглинке – на 60 – 100% выше, чем на контрольных участках без микоризации грунта.

Опыты по использованию микоризации при восстановлении нарушенных земель проводили и за рубежом. Например, в исследованиях Института ландшафтной экологии и Института микробиологии АН ЧССР установлено, что для этих целей можно использовать посадку деревьев, обработанных гранулированными препаратами на основе ВАМ. Для изготовления препаратов необходима селекция микоризных симбионтов, массовое выращивание их в ферментерах. Препараты предлагают изготавливать путем смешивания мицелия ВАМ с алгинатом и перлитом.

Контрольные вопросы

1. Микориза – это ...?
2. Что определяет характер взаимоотношений низшего гриба и растения в диапазоне от симбиоза до паразитизма?
3. Указать основные характеристики ВАМ (везикулярно-арбускулярной микоризы).
4. Представители каких родов низших грибов формируют ВАМ?
5. Растения каких семейств поддаются микоризации:
   – хорошо;
   – в средней степени;
   – не обладают способностью к микоризации?
6. Чем обусловлены полезные свойства ВАМ?
7. Какие факторы среды определяют эффективность микоризации?
8. Указать причину негативного влияния избытка азота в почве на эффективность микоризации растений.
9. Каково влияние тяжелых металлов и средств химизации на ВАМ?
10. Почему невозможно получать чистые культуры эндофитов?
11. Перечислить основные способы микоризации растений.

12. Какова средняя эффективность микоризации растений?

13. Какова степень совместимости микоризации растений с обработкой другими бактериальными препаратами?

14. Как используется прием микоризации растений в рекультивационных целях и в лесопарковой культуре?

Глава 3. Комплексные биоудобрения

Многолетние исследования по бактеризации сельскохозяйственных культур свидетельствуют о том, что применение бактериальных удобрений далеко не всегда дает положительный эффект. Для более точного прогнозирования результатов бактеризации растений необходимо учитывать как минимум два фактора:

1) уровень питательных элементов в почве;

2) состояние микробного сообщества почвы.

Рассмотрим последовательно влияние обоих факторов.

Многолетняя практика бактеризации свидетельствует о том, что применение азотобактера и монокультуры ассоциативных диазотрофов на бедных почвах часто бывает неэффективно, а иногда приводит даже к снижению урожайности. Чем может быть обусловлен подобный негативный эффект?

Успешно проведенная бактеризация растений азотфиксирующими микроорганизмами в любом случае приводит к усилению азотфиксации. Однако известно, что растение удовлетворяет свои потребности в азотном питании за счет азотфиксации только на 20 – 30%. Остальные 70–80% оно должно получить все же из почвы. Поэтому при резком дефиците азота в почве эти 20% азота, получаемого за счет азотфиксации, растение не спасут.

Кроме того, бактерии сами нуждаются в источниках азотного питания и при недостатке азота в почве львиную долю фиксированного ими азота используют для удовлетворения собственных потребностей, усваивая к тому же корневые выделения растений – продукты фотосинтеза. Таким образом, симбиотические отношения между интродуцированными клубеньковыми бактериями и растением-хозяином на бедных почвах и при резком дефиците азота могут перейти в отношения конкуренции за субстрат. Поэтому при внесении в почву бактериальных препаратов на основе азотфиксирующих бактерий необходимо обеспечить в ней какой-то минимальный уровень азотного питания. Однако делать это нужно осторожно, так как при передозировке азотных минеральных удобрений интродуцированные азотфиксирующие бактерии переходят на субстратный тип азотного питания, менее энергоемкий, чем азотфиксация, и бактеризация растений в этом случае теряет всякий смысл.

Ситуация еще более усугубляется, если наряду с азотом в почве имеет место недостаток фосфора. В этом случае можно ожидать

прямой конкуренции интродуцированных азотфиксаторов с растением за фосфор. Это часто приводит к снижению урожайности при применении бактериальных удобрений на основе монокультуры на бедных почвах без внесения органических удобрений.

По этой причине в последнее время стали переходить на применение одновременно нескольких бактериальных удобрений, т.е. на комплексное их использование. Наиболее эффективным является совместное применение азотфиксирующих и фосфатмобилизующих микроорганизмов, так как при этом частично устраняется конкуренция между азотфиксаторами и растением-хозяином за источники фосфатного питания.

Хорошо зарекомендовала себя двойная инокуляция зерновых культур микоризой совместно с азоспириллами или азотобактером, так как обеспечила 30%-ную прибавку урожая по сравнению с использованием только азотфиксаторов и 25%-ную – по сравнению с использованием только микоризы.

Двойная инокуляция клубеньковыми бактериями и микоризой обеспечила увеличение урожая люцерны в 2 раза, тогда как только микоризация – в 1,5 раза.

Хорошие результаты были получены при инокуляции препаратами фосфатмобилизующих бактерий, такими как агрофил, флавобактерин, ризоагрин совместно с азотобактерином котовника кошачьего – эфиромасличной культуры из семейства губоцветных, масло которого используется в медицине и парфюмерной промышленности. При этом наибольшую прибавку урожая (25 – 30%) обеспечило комплексное применение азотобактерина с флавобактерином. Кроме того, было замечено, что комплексное применение бактериальных удобрений приводит к более заметному снижению содержания нитратов в продукции. Например, при обработке котовника только одним "экстрасолом" (препаратом на основе бактерий р. Pseudomonas) количество нитратов по сравнению с контролем снизилось на 15%, а при совместной инокуляции с азотобактерином – на 18 – 20%.

Помимо обеспечения необходимого минимума элементов питания в почве вторым важным моментом при бактеризации является состав микробного сообщества самой почвы. Например, в почве при интенсивном возделывании одной и той же культуры в течение ряда лет обычно наблюдается снижение видового разнообразия микроорганизмов и доминирование грибов с ярко выраженными фитопатогенными свойствами. Это явление называется "почвоутомлением".

Длительное применение минеральных удобрений еще более усугубляет ситуацию. В таких случаях интродукция в почву любого сапрофитного микроорганизма или комплекса микроорганизмов в составе какого-либо органического удобрения приведет к расширению видового разнообразия микробиоценоза почвы и снижению значимости в структуре микробного сообщества нежелательных патогенных популяций (например, фитопатогенных грибов). Их доля резко сократится, а соответственно уменьшится и ущерб, ими причиняемый.

В этом случае положительный эффект при внесении бактериального удобрения достигается не столько за счет прямого воздействия на растение (например, усиления азотфиксации при внесении клубеньковых бактерий), а посредством улучшения общей микробиологической обстановки в прикорневой зоне растений. Поэтому на почвах с ярко выраженными признаками почвоутомления более эффективным и экономически оправданным будет простое внесение органических компостов.

Таким образом, эффективность микробных удобрений в значительной степени определяется структурными особенностями микробного сообщества почвы в целом, а для повышения уровня биоразнообразия целесообразно применять не отдельные виды микроорганизмов, отвечающих за какую-то одну функцию, например азотфиксацию или фосфатмобилизацию, а целый комплекс микроорганизмов. Причем перспективность той или иной комбинации микроорганизмов можно определить по результатам почвенных популяционных исследований. Например, установлено, что при наличии в почве эндофита Glomus mosseae одновременно растет численность и активность азоспирилл и псевдомонад. Следовательно, между данными микроорганизмами отсутствует антагонизм. Поэтому можно сделать предположение об эффективности комплексного препарата на их основе, совмещающего функции, присущие микоризе (т.е. фосфатмобилизацию), азотфиксаторам и агентам биоконтроля псевдомонадам – антагонистам патогенной микрофлоры.

А вот клубеньковые бактерии и азоспириллы не всегда уживаются в одном объеме почвы и комплексные препараты на их основе часто бывают неэффективными. Поэтому при создании комплексных бактериальных удобрений сначала в лабораторных условиях выделяют природные ассоциации микроорганизмов из почвы, а за-

тем проводят отбор наиболее активных штаммов по заданным свойствам.

По такому принципу наряду с уже перечисленными примерами комплексных биоудобрений был создан и так называемый грунт АМБ. Препарат АМБ был разработан в 40-е гг. коллективом сотрудников института сельскохозяйственной микробиологии под руководством А.М. Лазарева. Он рекомендуется к использованию на торфяно-болотных и дерново-подзолистых почвах для активации микробиологической минерализации перегноя с целью улучшения корневого питания растений при недостатке минеральных удобрений.

Бактериальное удобрение АМБ удобнее готовить на месте его применения. Для этого к 1 т измельченного торфа или торфоболотной почвы добавляют 1 ц известковой или фосфоритной муки и 1 кг маточной бактериальной культуры АМБ. Маточную культуру готовят на произвесткованном торфе путем внесения в него предварительно полученной на гуматной питательной среде культуры микроорганизмов, перерабатывающих перегной – так называемой автохтонной микрофлоры Б.

По А.М. Лазареву, в почве следует различать два основных сообщества микроорганизмов. Одно из этих сообществ, разлагающих растительные остатки с образованием перегноя, состоит из микроскопических грибов, аэробных и анаэробных бактерий. Это сообщество микроорганизмов получило название автохтонной микрофлоры А. Второе сообщество включает большую и разнообразную группу микроорганизмов, разлагающих перегной с образованием веществ минерального питания растений. Эта автохтонная микрофлора Б (АМБ) и является действующим началом комплексного бактериального удобрения АМБ.

Произвесткованный торф и маточную культуру тщательно перемешивают, увлажняют до 50% от ПВ. Инокулированный культурой АМБ торф выдерживают при температуре +25 °С в течение 20 сут., перелопачивая его дважды в неделю. По истечению 3 недель удобрение считается готовым.

Под зерновые культуры АМБ равномерно рассеивают по полю в количестве 500 кг/га непосредственно перед предпосевной обработкой почвы. Под картофель и овощные культуры его вносят в борозды или лунки из расчета не менее 1 т/га. Особенно эффективен препарат АМБ в качестве компонента парникового грунта.

Помимо рассмотренного выше способа получения комплексных бактериальных удобрений, основанного на выделении из почвы ассоциаций активных микроорганизмов, осуществляющих определенные процессы, и получении в лабораторных условиях их накопительных культур, существует альтернативный путь решения проблемы создания эффективных комплексных биоудобрений. Это решение не подразумевает подбор микроорганизмов с одной или несколькими определенными функциями и не требует даже самой процедуры получения чистых культур и приготовления препаратов на питательных средах.

Суть получения комплексных микробных удобрений в этом случае сводится к извлечению из ненарушенной плодородной почвы сложного естественного комплекса микроорганизмов. Так, например, на кафедре почвенной микробиологии МГУ было получено микробное удобрение на основе бактериального комплекса целинного чернозема. Препарат получали в результате 3 – 4 циклов изъятия клеток из почвы при помощи ультразвуковой обработки и последующего центрифугирования. Препарат содержал и частицы почвы.

Проверка эффективности данного комплексного микробного удобрения на дерново-подзолистой почве под культурами тритикале, льна и люпина показала в среднем 230% прибавки урожая по отношению к контролю с внесением NPK и 240% прибавки по отношению к варианту, где применяли микробное удобрение на основе монокультуры псевдомонад. Кроме того, новый комплексный микробный препарат оказался эффективнее двойной инокуляции культур клубеньковыми бактериями и псевдомонадами.

Высокая эффективность комплексных микробных удобрений данного типа объясняется следующими теоретическими предпосылками.

Элементы бактериального комплекса при их внесении в новую среду обитания, например в окультуриваемую почву, выживают в новых условиях не хуже популяций традиционных бактериальных удобрений. Экспериментальным путем было установлено, что при внесении в почву бактериальной культуры в количестве, превышающем численность естественных доминант в почве, доминирующее положение займет внесенная культура. Поэтому при достаточном уровне внесения комплексного бактериального удобрения значительно возрастает уровень биоразнообразия почвы, понижается значимость нежелательных популяций (например, фитопатоген-

ных грибов), что позволяет растению самостоятельно преодолеть ограничения множественной лимитации по Митчерлиху.

Принято считать, что рост растения ограничен каким-либо одним фактором, находящимся в минимуме. Это так называемая лимитация по Либиху. Однако данное явление может иметь место на почвах более или менее плодородных. В условиях интенсивного земледелия вполне обычна ситуация с умножением стрессов или иначе – умножения факторов лимитации. Это явление и называется лимитацией по Митчерлиху.

В данных условиях даже при небольшой значимости каждого лимитирующего фактора суммарный эффект от незначительного компенсирования каждого фактора может быть очень высоким. Рассмотрим данное утверждение на примере модели микробиоценоза ризосферы.

Ограничим ризосферу растения пятью условными популяциями микроорганизмов, каждая из которых ответственна за реализацию определенной функции:

– азотфиксаторы;
– фосфатмобилизующие бактерии;
– продуценты фитогармонов;
– продуценты биофунгицидов;
– деструкторы целлюлозы.

Истощенная почва, как правило, лимитирована по всем функциям, выполняемым данными микроорганизмами. Допустим, что каждая популяция при ее отдельной интродукции (т.е. при снятии лимитации по одному из признаков) обеспечивает повышение урожая всего на 15% (так как только 10%-ная прибавка урожая считается статистически достоверной в условиях полевого опыта). Следовательно, совместное внесение всех пяти популяций в случае множественной лимитации должно привести к повышению урожая в 2 раза:

$$1{,}15 \times 1{,}15 \times 1{,}15 \times 1{,}15 \times 1{,}15 \times 1{,}15 = 1{,}15^5 = 2{,}01.$$

Таким образом, даже при малой эффективности отдельных популяций ощутимый эффект от их комплексного применения может быть получен именно за счет повышения биоразнообразия. Этим как раз и обусловлена большая эффективность комплексных микробных удобрений по сравнению с биоудобрениями, основанными на использовании монокультуры, даже очень эффективной.

Кроме того, применение подобного комплексного биоудобрения на основе природных микробных популяций плодородной почвы в отличие от интродукции в почву объектов генной инженерии не требует анализа риска последствий.

Контрольные вопросы

1. Какие факторы необходимо учитывать для более точного прогнозирования результатов применения бактериальных удобрений?
2. Чем может быть обусловлен негативный эффект от применения азотобактерина или препарата на основе монокультуры другого азотфиксатора?
3. Каким образом состав микробного сообщества почвы может повлиять на успех бактеризации растений?
4. Чем можно объяснить положительный эффект от применения бактериальных удобрений на почвах с эффектом "почвоутомления"?
5. Какие особенности состава микробного сообщества почвы берутся за основу при создании комплексного биоудобрения на основе ассоциации почвенных микроорганизмов различных видов?
6. Чем обусловлена более высокая эффективность комплексных микробных удобрений по сравнения с биоудобрениями на основе монокультуры?
7. "Грунт АМБ" – это ...?
8. Автохтонная микрофлора А и Б по А.М. Лазареву – это ...?
9. Перечислить основные этапы технологии получения грунта АМБ.
10. Где и в каких целях применяется грунт АМБ?
11. Указать новые научные подходы к созданию комплексных биоудобрений.
12. Назвать основные теоретические предпосылки эффективности комплексных микробных удобрений нового поколения.

Наталья Николаевна Терещенко

Биоудобрения на основе микроорганизмов

Учебное пособие

Корректор Н.А. Афанасьева
Оригинал-макет
выполнен автором

Лицензия ИД № 00208 от 20.12.99 г.
Подписано к печати 14.10.2002 г. Формат 84x108/32
Бумага офсетная. Гарнитура Times. Ризография
Печ. л. 1,88. Усл. печ. л. 3,15. Тираж 100 экз. Заказ № 178

Томский государственный университет
634050, г. Томск, пр. Ленина, 36
участок оперативной ризографии и офсетной печати
Редакционно-издательского отдела ТГУ
Лицензия ПД № 00455 от 15.11.99 г.