

Микробная интродукция и состояние почвенной аборигенной микрофлоры

© 2015. Л. И. Домрачева^{1,2}, д.б.н., профессор, в.н.с., Л. В. Трефилова¹, к.б.н., доцент, А. Л. Ковина¹, к.б.н., доцент, Е. А. Горностаева¹, аспирант, Д. В. Казакова¹, магистр, Е. С. Субботина¹, магистр,

¹Вятская государственная сельскохозяйственная академия;

²Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,
e-mail: dli-alga@mail.ru

Изучение состояния аборигенной микрофлоры после интродукции различных групп микроорганизмов (*Rhizobium loti*, *Fischerella muscicola* и *Fusarium culmorum*), попавших в почву в результате предпосевной инокуляции семян люцерны рогозчатой, показало, что в составе микробных комплексов происходят определённые изменения. Нечёткая и труднообъяснимая реакция отмечена для группы аммонифицирующих бактерий. Микромицеты при учёте на питательной среде Чапека отвечают повышением численности при всех видах микробной интродукции, особенно данная реакция выражена в случае предпосевной инокуляции семян люцерны бинарной (*Rhizobium loti* + *Fischerella muscicola*) и тройной (*Rhizobium loti* + *Fusarium culmorum* + *Fischerella muscicola*) смесью. При прямом микроскопическом количественном учёте грибов наблюдаются некоторые расхождения, по сравнению с методом учёта путём посева почвенной суспензии на питательную среду. Наибольшее влияние фузариозная интродукция оказала на структуру микокомплексов, что проявилось в выходе на доминирующие позиции грибов с бесцветным мицелием, как у фузария.

Микробная интродукция практически не повлияла на развитие водорослей в почве. Однако только в вариантах с инокуляцией *Fischerella muscicola* наблюдалось размножение в почве цианобактерий, что существенно повлияло как на общую численность фототрофных микроорганизмов, так и на структуру фототрофных популяций.

The study of the state of indigenous microflora after introduction of various groups of microorganisms (*Rhizobium loti*, *Fischerella muscicola* and *Fusarium culmorum*), which got in the soil as a result of seedbed inoculation of cat's clover, showed that certain changes take place in the composition of the microbial complexes. A fuzzy and hard-to-explain reaction is indicated in the group ammonifying bacteria. Micromycetes registered in the Capek medium increase in number at all types of microbial introduction, this reaction is especially well seen in case of cat's clover seedbed inoculation with binary (*Rhizobium loti* + *Fischerella muscicola*) and triple (*Rhizobium loti* + *Fusarium culmorum* + *Fischerella muscicola*) mixture. In direct microscopic quantitative registration of fungus there are some differences, as compared with the results of using the method of counting by planting soil suspension in the nutrient medium. *Fusarium* introduction has made the biggest impact on the myco-complexes structure, the result of that was a dominant position of the fungus with colorless mycelium, such as *Fusarium*.

Microbial introduction did lead to algae growth in soil. However, only in variants with inoculation of *Fischerella muscicola* cyanobacteria propagation in soil took place, which greatly influenced both the total number of phototropic microorganisms and the structure of phototrophic populations.

Ключевые слова: интродукция, инокуляция, цианобактерии, водоросли, микромицеты, структура популяций, микоценоз, альгоценоз.

Keywords: introduction, inoculation, cyanobacteria, algae, micromycetes, population structure, myco-coenosis, algo-coenosis.

Интродукция микроорганизмов в почву преследует различные цели. Вероятно, первые опыты в этом направлении были связаны с использованием ещё в конце XIX века бактериальных удобрений на основе клубеньковых бактерий р. *Rhizobium* при обработке семян бобовых для повышения урожая этих культур. В настоящее время спектр использования микробных биопрепаратов в земледелии существенно расширился и включает такие направления, как ростстимулирующая

активность микробов-инокулянтов, фосфат-мобилизующая активность, защита растений от вредителей и болезней, биоремедиация загрязнённых территорий. При этом даже традиционное использование препаратов клубеньковых бактерий модифицируется путём внесения других бактериальных препаратов, оказывающих дополнительное влияние на адаптивные свойства и продуктивность бобовых [1]. Во всех случаях при интродукции или реинтродукции в почву попадают

микроорганизмы, способные оказывать определённое воздействие на аборигенную микрофлору и вмешиваться в ход микробных сукцессий с воспроизведением определённого равновесного сообщества [2]. С другой стороны, судьба вселенцев, а следовательно, и эффективность применяемых препаратов во многом определяются взаимодействием с коренными обитателями почвы. Например, для эффективного подавления фитопатогенов микробам-интродуцентам необходимо быть среди первых колонизаторов зон корня, которые являются «воротами инфекции». Поэтому остро стоят вопросы поиска среди антагонистических штаммов наиболее ранних колонизаторов ризопланы и разработки приёмов их доставки в зону возможного поражения корня [3]. Эффективность влияния интродуцированных микроорганизмов на растение также во многом зависит от их хемотаксисных и адгезивных свойств [4].

Задача по перемещению нежелательного объекта на другую ранговую позицию с понижением его функциональной значимости может быть обеспечена посредством интродукции разнообразных микроорганизмов, включая как популяции антагонистов для конкретной мишени, так и микробные популяции сложного состава, эффективность которых связана с полифункциональностью. Высокий уровень обилия микроорганизмов в таких препаратах позволяет на какое-то время с помощью прямой конкуренции и механизмов инициации микробных сукцессий понизить значимость нежелательных доминантов в природной среде [5].

Цель данной работы – изучить состояние микробных комплексов почвы после интродукции в неё определённых групп микроорганизмов.

Объекты и методы исследования

Исследования по влиянию интродуцированной микрофлоры на состояние аборигенной микрофлоры были проведены на посевах лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus*). Предпосевную инокуляцию семян проводили следующими видами микроорганизмов: клубеньковыми бактериями *Rhizobium loti*, цианобактерией (ЦБ) *Fischerella muscicola* и микромицетом *Fusarium culmorum* в виде монокультур и в различных сочетаниях (ди- и тривидовые инокулюмы). Выбор микробов-интродуцентов был обусловлен необходимостью разработки дополнительных

путей стимуляции клубеньковых бактерий, обеспечивающих максимальный уровень активности в симбиозе с бобовым растением. Поэтому ЦБ *Fisch. muscicola* была выбрана в качестве биостимулятора и для ризобиума, и для лядвенца, а при использовании *F. culmorum* предполагалось изучение антагонистической активности фишереллы.

Инокуляцию механически скарифицированных семян проводили путём выдерживания их в течение суток в суспензиях ризобиума с титром $3,2 \cdot 10^9$ кл./мл, фишереллы с титром $(2,1 \pm 0,36) \cdot 10^7$ кл./мл, фузариума с титром $(1,1 \pm 0,15) \cdot 10^6$ макроконидий/мл и в их смесях.

В полевом опыте посев семян проведён на микроделянке площадью $0,25 \text{ м}^2$ в 3-кратной повторности 20 мая 2014 г. с производственной нормой высева $15,2 \text{ кг/га}$.

Прореживание посевов, определение количества образовавшихся клубеньков на корнях, степени нодуляции и ксеромассы надземной части растений проведены через 1,5 месяца в период бутонизации и начала цветения лядвенца. Было установлено, что самым эффективным оказался вариант с одновременной обработкой семян ризобием и фишереллой, в котором количество клубеньков в среднем на 1 корень в 10 с лишним раз было больше, чем в контроле (неинокулированные семена). При этом клубеньки образовались на корнях всех растений, в отличие от контроля, где этот показатель менее 50%. По сравнению с ризобияльной обработкой обработка семян *Rh. loti* + *Fisch. muscicola* приводила к возрастанию числа клубеньков на корне почти в 6 раз. Только в этом варианте степень нодуляции достигала 100%. Прирост сухой биомассы надземной части лядвенца рогатого в данном варианте также оказался максимальным и составил 76,6% по отношению к контролю [6]. В этот же срок (т.е. через 1,5 месяца после внедрения микробов-интродуцентов в микробные почвенные системы) были отобраны почвенные образцы для проведения микробиологического и альгологического количественного анализа.

Учёт численности аммонифицирующих бактерий проводили методом разведения с последующим посевом на питательную среду МПА. Численность водорослей и ЦБ проводили методом прямого учёта под микроскопом. Для определения численности микромицетов использовали 2 метода: посев почвенных разведений на питательную среду Чапека и метод прямого учёта под микроскопом с определени-

ем длины бесцветного и меланизированного мицелия, а также численности грибных пропагул (в данном случае – фрагментов мицелия).

Результаты и обсуждение

Определение численности гетеротрофных бактерий и грибов, выросших на питательных средах, показало, что существует определённый разброс результатов по вариантам (табл. 1). Численность бактерий максимальная и остаётся на уровне контроля в двух вариантах: *Rh. loti* + *Fisch. muscicola* и *Rh. loti* + *F. culmorum* + *Fisch. muscicola*. К значительному снижению численности этой группы микроорганизмов приводит интродукция монокультур – *Rh. loti*, *Fisch. muscicola* и *F. culmorum*, а также бинарной смеси *Rh. loti* + *F. culmorum*.

В случае грибов чётко прослеживается тенденция увеличения их численности во всех вариантах с микробной интродукцией. При этом максимальные показатели (превышающие в 4 раза показатели контроля) отмечены в вариантах с бинарной (*Rh. loti* + *Fisch. muscicola*) и тройной (*Rh. loti* + *F. culmorum* + *Fisch. muscicola*) смесью. Абсолютные показатели численности грибных популяций при данном методе количественного

определения колеблются от 400 тыс. КОЕ/г до 1,6 млн. КОЕ/г.

Близкие результаты получаются при прямом количественном учёте грибов на мазках под микроскопом, когда одновременно проводили не только подсчёт численности грибных пропагул (в данном случае обрывков мицелия), но и определение длины мицелия (табл. 2). Так, численность грибных зачатков колеблется в диапазоне от 840 тыс. до 1,3 млн пропагул/г почвы. Однако проявляется тенденция не стимуляции, а, наоборот, некоторого снижения численности микромицетов во всех вариантах с микробной интродукцией, по сравнению с контролем (табл. 1 и 2).

Определение длины грибного мицелия показало, что в двух вариантах (*F. culmorum* и *Fisch. muscicola*) этот показатель выше, чем в контроле, в других – ниже, чем в контроле. Таким образом, дополнительное внесение в почву грибного инокулята (*F. culmorum*) практически не повлияло на численность микромицетов в почве.

Однако влияние этого интродуцента, имеющего бесцветный мицелий, привело к изменению структуры микоценозов, что проявилось в усилении доли грибов с бесцветным мицелием (рис. 1).

Таблица 1

Влияние микробной интродукции на численность бактерий и грибов в почве

Вариант	Бактерии (МПА) • 10 ⁶ КОЕ/г	Грибы (Чапек) • 10 ⁵ КОЕ/г
1. Контроль	5,2±0,7	4,4±0,7
2. <i>Rh. loti</i>	1,5±0,7	10,3±1,6
3. <i>Rh. loti</i> + <i>F. culmorum</i>	3,8±0,4	5,9±0,4
4. <i>Rh. loti</i> + <i>Fisch. muscicola</i>	5,9±0,5	16,4±0,5
5. <i>Rh. loti</i> + <i>F. culmorum</i> + <i>Fisch. muscicola</i>	5,9±0,4	16,0±1,9
6. <i>Fisch. muscicola</i>	3,3±0,1	8,4±1,3
7. <i>F. culmorum</i>	2,6±0,1	7,1±0,8

Таблица 2

Влияние микробной интродукции на количественные характеристики почвенных микоценозов (по результатам прямого микроскопического учёта)

Варианты	Длина мицелия, м/г			Количество пропагул, тыс./г		
	бесцветного	окрашенного	общая	бесцветных	окрашенных	всего
1. Контроль	16,1±3,2	18,5±6,8	34,6±10,0	400±100	930±200	1330±300
2. <i>Rh. loti</i>	13,9±3,3	13,9±1,8	27,8±5,1	430±50	700±100	1130±150
3. <i>Rh. loti</i> + <i>F. culmorum</i>	16,4±1,6	11,2±1,0	27,6±2,6	670±20	630±110	1300±130
4. <i>Rh. loti</i> + <i>Fisch. muscicola</i>	17,1±4,8	15,5±2,4	32,6±7,2	370±50	470±110	840±160
5. <i>Rh. loti</i> + <i>F. culmorum</i> + <i>Fisch. muscicola</i>	12,8±3,2	11,7±0,7	24,5±3,9	367±50	630±20	997±70
6. <i>Fisch. muscicola</i>	18,1±1,0	20,2±1,3	38,3±2,3	430±30	470±20	900±50
7. <i>F. culmorum</i>	30,9±1,9	9,6±2,6	40,5±3,7	600±100	400±100	1000±200

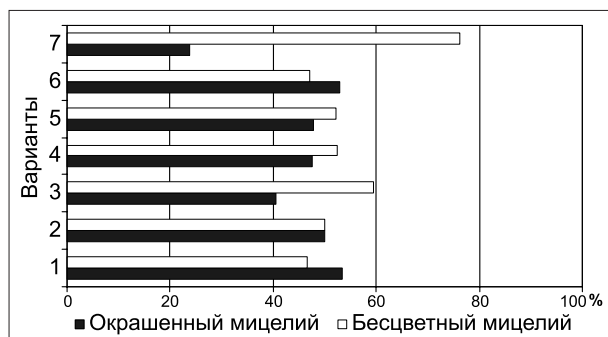


Рис. 1. Влияние микробной интродукции на структуру грибных популяций по длине окрашенного и бесцветного мицелия (%). Варианты: 1. Контроль. 2. *Rh. loti*. 3. *Rh. loti* + *F. culmorum*. 4. *Rh. loti* + *Fisch. muscicola*. 5. *Rh. loti* + *F. culmorum* + *Fisch. muscicola*. 6. *Fisch. muscicola*. 7. *F. culmorum*.

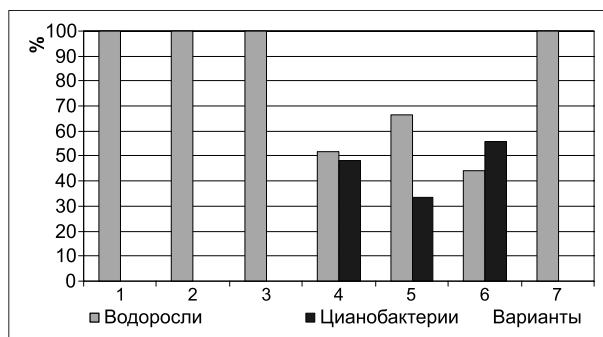


Рис. 2. Влияние микробной интродукции на структуру фототрофных популяций (%). Варианты: 1. Контроль. 2. *Rh. loti*. 3. *Rh. loti* + *F. culmorum*. 4. *Rh. loti* + *Fisch. muscicola*. 5. *Rh. loti* + *F. culmorum* + *Fisch. muscicola*. 6. *Fisch. muscicola*. 7. *F. culmorum*.

Изучение влияния микробной интродукции на фототрофные популяции показало, что численность фототрофов является максимальной в тех вариантах, где происходила инокуляция семян *Fisch. muscicola* и связана с размножением ЦБ. При этом в остальных вариантах численность водорослей практически была одинаковой – в пределах 1 млн. кл./г почвы. Vegetация ЦБ в 4-6-м вариантах явно обусловлена цианобактериальной интродукцией и непосредственным размножением только *Fisch. muscicola*, а не ускорением хода сезонной сукцессии, что порой наблюдается при внесении в почву различных удобрений, пестицидов и других поллютантов [7, 8]. Пик размножения ЦБ наблюдается в варианте с внесением *Fisch. muscicola* (табл. 3).

Появление в фототрофном микробном комплексе цианобактериального компонента приводит в конечном итоге к изменению структуры альгоценозов (рис. 2).

Таким образом, результаты проведённых исследований показывают, что при микробной интродукции в почве происходят опреде-

лённые изменения количественных показателей и структуры микробных комплексов. Существуют косвенные доказательства приживаемости интродуцированных микроорганизмов. Свидетельством этому является увеличение числа клубеньков на корнях лядвенца и степени нодуляции в вариантах с внесением *Rhizobium loti* [6]; увеличение доли грибов с бесцветным мицелием в вариантах с внесением *Fusarium culmorum*; массовое развитие ЦБ в вариантах с цианобактериальной инокуляцией. Единственной группой изучаемых микроорганизмов, на которую микробная интродукция не оказала никакого влияния, являются водоросли, численность которых во всех вариантах практически одинаковая.

Наиболее явные изменения статуса микробных комплексов регистрируются на уровне структуры популяций в микокомплексах (увеличение представительства грибов с бесцветным мицелием в вариантах с фузариозной инокуляцией) и в альгоценозах (расширение спектра фототрофов, обусловленное появлением прокариотного компонента в вариантах с цианобактериальной инокуляцией).

Таблица 3
Влияние микробной интродукции на количественные показатели фототрофной микрофлоры

Варианты	Численность фототрофов, тыс. кл./г				
	Зелёные водоросли	Диатомовые водоросли	Водоросли	Цианобактерии	Всего
1. Контроль	800±0	200±0	1000±0	не обнаружено	1000±0
2. <i>Rh. loti</i>	800±100	230±50	1030±150	не обнаружено	1030±150
3. <i>Rh. loti</i> + <i>F. culmorum</i>	667±50	270±50	937±100	не обнаружено	937±100
4. <i>Rh. loti</i> + <i>Fisch. muscicola</i>	800±0	200±0	1000±0	930±150	1930±150
5. <i>Rh. loti</i> + <i>F. culmorum</i> + <i>Fisch. muscicola</i>	670±50	200±0	870±50	443±65	1313±165
6. <i>Fisch. muscicola</i>	700±100	300±100	1000±200	1270±32	2270±232
7. <i>F. culmorum</i>	700±200	230±50	930±250	не обнаружено	930±250

Работа выполнена при финансовой поддержке внутривузовского гранта Вятской государственной сельскохозяйственной академии № 3 от 01.07.2014 г.

Литература

1. Пузырева М.Л., Бурденкова Т.В. Влияние бактериальных и ростстимулирующих препаратов на адаптивные свойства и продуктивность козлятника восточного // Достижения науки и техники АПК. 2010. № 12. С. 48–51.

2. Кожевин П.А. «Здоровье» почвы как проблема биотехнологии // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Матер. конгресса. Ч. 2. М.: 2007. С. 114.

3. Кураков А.В., Костина Н.В. Сапротрофные микромицеты ризопланы томатов, огурцов и дерново-подзолистой почвы и их способность подавлять фузариозную инфекцию корней // Почвоведение. 1998. № 2. С. 193–199.

4. Курдиш И.К., Чуйко Н.В., Бега З.Т. Хемотаксисные и адгезивные свойства *Azotobacter vinelandii* и

Bacillus subtilis // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 1. С. 58–63.

5. Кожевин П.А. Некоторые аксиомы почвенной биотехнологии и применение эффективных микроорганизмов // Микробиологические препараты «Байкал ЭМ1», «Тамир», «ЭМ-курунка». Практическая биотехнология в сельском хозяйстве, экологии, здравоохранении. Сб. трудов. М.: ООО «Изд-во Агрорус», 2006. С. 76–80.

6. Домрачева Л.И., Трефилова Л.В., Ковина А.Л., Горностаева Е.А., Малыгина О.Н., Новокшонова Н.В. Влияние способов предпосевной обработки семян лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.) на всхожесть и интенсивность образования клубеньков // Теоретическая и прикладная экология. 2014. № 3. С. 67–72.

7. Домрачева Л.И., Зыкова Ю.Н., Кондакова Поллютанты как пусковой механизм сукцессий альгоценозов // Теоретическая и прикладная экология. 2009. № 3. С. 20–24.

8. Помелов А.В., Березин Г.И., Домрачева Л.И. Адаптационные резервы высшего растения и почвенной альгофлоры при действии пестицидов // Теоретическая и прикладная экология. 2011. № 3. С. 87–94.