

БИНАРНАЯ КОМПОЗИЦИЯ *A. BRASILENSE* + *B. CIRCULANS* И ЕЕ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЛЯ ИНОКУЛЯЦИИ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ НА ЭРОДИРОВАННЫХ ДЕРНОВО- ПОДЗОЛИСТЫХ СУГЛИНИСТЫХ ПОЧВАХ

Н.А. Михайловская, Т.Б. Барашенко, Т.В. Погирницкая, С.В. Дюсова

*Институт почвоведения и агрохимии,
г. Минск, Беларусь*

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальные удобрения служат дополнительным средством повышения урожайности и качества сельскохозяйственных культур, частичного снижения химической нагрузки и экологизации растениеводства. В настоящее время наибольший интерес вызывают многокомпонентные микробные препараты, способные оказывать полифункциональное действие на сельскохозяйственные культуры. Многофункциональность – один из способов повышения эффективности микробных препаратов [1].

Учитывая синергетический эффект азотного и калийного питания, перспективна разработка бинарного биоудобрения, содержащего азотфиксирующие и калиймобилизующие бактерии. В коллекции Института почвоведения и агрохимии имеются штаммы и изоляты азотфиксирующих – *Azospirillum* sp. и калиймобилизующих бактерий *Bacillus* sp.

Накопленные к настоящему времени научные данные свидетельствуют о положительном воздействии ассоциативных бактерий *Azospirillum brasilense* на рост и урожайность многих злаковых культур [2, 3]. Большинство исследователей считают, что их положительное действие обусловлено комбинацией следующих механизмов: стимуляция роста и адаптационный эффект [3], улучшение использования воды [3, 4] и элементов питания из почвы и удобрений [3, 8], азотфиксация [5], бактериальная нитратредукция [3], фосфатмобилизация [7], биоконтроль, влияние на иммунитет растений, синтез сидерофоров [8]. Существенными преимуществами *Azospirillum* spp. является их высокая подвижность, как фактор успешной колонизации корней, а также способность

трансформироваться в цистоподобные образования при неблагоприятных условиях [8, 9].

В отношении биологической мобилизации калия наиболее активными признаны распространенные в умеренной зоне слизиобразующие бациллы [10, 11]. В состав микробных слизей входят полисахариды и уроновые кислоты, содержащие карбоксильные и фенольные группы, способные образовывать комплексные связи с элементами минералов, что приводит к их постепенному высвобождению из кристаллической решетки и переходу в растворимое состояние. Слизеобразование является также защитным фактором, обеспечивающим выживание бактерий в ризосфере и при неблагоприятных экологических условиях. Кроме того, многие представители *Bacillus* spp. способны синтезировать и выделять в окружающую среду антибактериальные и антигрибные вещества – антибиотики [13]. Слизеобразующие бациллы способны к фосфатмобилизации [12].

Перспективно совместить в одном биоудобрении азоспириллы и слизиобразующие бациллы и оценить их совместное воздействие на растения в лабораторных и полевых условиях. Для этого необходимо провести отбор активных, конкурентоспособных и технологичных штаммов азотфиксирующих и калиймобилизующих бактерий и определить их биологическую совместимость.

Цель исследований – отбор активных штаммов азотфиксирующих и калиймобилизующих бактерий, изучение их совместимости в условиях *in vitro*, разработка бинарной бактериальной композиции и оценка ее эффективности на посевах озимой пшеницы на эродированных дерново-подзолистых почвах.

МЕТОДИКА И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований служили штаммы и изоляты собственной коллекции Института почвоведения и агрохимии: ассоциативные азотфиксирующие бактерии *p. Azospirillum* и калиймобилизующие бактерии *p. Bacillus*. Исследования проводили путем постановки модельных лабораторных и полевых экспериментов. Микробиологические исследования включали: микроскопию, физиолого-биохимическое тестирование (СИБ), определение титра (метод предельных разведений, посев на твердые питательные среды) [14–17].

Отбор активных, конкурентоспособных, технологичных штаммов азотфиксаторов и калиймобилизаторов проводили на основании оценки их полезных свойств по нитрогеназной активности [18]; мобилизации калия в лабораторных опытах с минералами в качестве единственных источников калия (мусковит, гидромусковит) [19]; фосфатмобилизации – с трикальцийфосфатом в качестве единственного источника фосфора [12].

В лабораторных исследованиях использовали питательные среды, оптимальные для роста отобранных штаммов и различимости колоний по цвету для визуальной оценки результатов. Состав сред (г/л) приведен ниже.

Картофельный агар (КА): 200 г очищенного картофеля варят в 1 л дистиллированной воды в течение 30 минут. Полученный отвар охлаждают и фильтруют через ватный фильтр, фильтрат с pH 6,8 стерилизуют при температуре 121 °C в течение 20 мин при 1 атм. [14].

Среда DN: яблочная кислота – 3,6; KH_2PO_4 – 0,4; K_2HPO_4 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; NaCl – 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,002; спиртовой раствор бромтимолблау (0,1 %) – 5,0 мл или конго красный (0,25 %) – 15 мл; агар – 2,0 %; 1000 мл воды; pH – 6,4 – 6,6 [22].

Среда Nfb: яблочная кислота – 5,0; KOH – 4,0; K_2HPO_4 – 0,5; NaCl – 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; CaCl_2 – 0,02; $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,002; бромтимоловый синий (0,5 % спиртовой раствор) – 2 мл; агар – 1,75; 1000 мл воды; pH 6,8 [23, 24].

Лабораторные опыты по оценке совместимости бактерий *A. brasilense* и *B. circulans* на плотных питательных средах. Биологическую совместимость бактериальных компонентов *in vitro* определяли диффузионными методами на плотных питательных средах [20, а также методом совместного культивирования в жидких средах [21]. Использовали суточные культуры бактерий, выращенные в жидких питательных средах. При использовании метода капель культуру *A. brasilense* наносили на поверхность плотной питательной среды. После впитывания капли на ее поверхность наносили равную по объему каплю *B. circulans*, чтобы примерно наполовину покрыть первую каплю. В совмещенной части капли обе культуры развиваются, конкурируя друг с другом. После высыхания второй капли чашки с посевами помещали в термостат (28 °C) и инкубировали в перевернутом состоянии. Контролями служили совмещенные капли индивидуальных культур. При исследовании методом перпендикулярных штрихов культуру *A. brasilense* высевали штрихом на поверхность плотной среды в чашки Петри, затем перпендикулярно от края чашки подсеивали штрихом суточную культуру *B. circulans*. Для определения биосовместимости бактериальных культур методом капли-штриха *A. brasilense* наносили на поверхность картофельного агара и DN с конго красным и оставляли при комнатной температуре до полного впитывания. После этого от края чашки наносили радиально штрихом культуру *B. circulans*. Опыты выполняли в трехкратном повторении с изменением порядка чередования культур. Результат учитывали визуально по наличию признаков подавления роста культур.

Модельный опыт по оценке совместимости бактерий *A. brasilense* и *B. circulans* в жидких средах. В эксперименте использовали стерильные среды – картофельную и Nfb, стерильные водопроводную воду и физраствор. В три конические колбы емкостью 300 мл вносили по 100 мл жидкой питательной среды (физраствора). Для их засева использовали суточные культуры *A. brasilense* и *B. circulans*. В первую и вторую колбы засевали по 5 мл культуральной жидкости *A. brasilense* и *B. circulans* отдельно (титры $3,0 \cdot 10^9$ КОЕ/мл); в третью засевали смесь культур в соотношении 1:1 (по 2,5 мл культуральной жидкости каждого вида). Посевы помещали в термостат при 28 °C на трое суток. В опыте предусмотрено выращивание культур в обычных условиях и на качалке (195 об./мин). Все испытуемые бактериальные культуры хранили при комнатной температуре в течение 6 месяцев. Через определенные промежутки времени в препаратах определяли значения титров бактерий.

Лабораторный эксперимент по изучению влияния азотфиксирующих и калиймобилизующих бактерий на развитие проростков яровой пшеницы. Исследуемые бактерии выращивали на картофельном агаре при температуре 28 °C в течение 24 часов. Суточные культуры использовали для приготовления

суспензии клеток исследуемых штаммов бактерий путем разведения в стерильном физрастворе до конечного титра $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Предварительно откалиброванные по размеру и выполненности семена яровой пшеницы выдерживали 1 час в суспензиях *A. brasilense* и *B. circulans*. В контрольном варианте семена выдерживали в дистиллированной воде. В каждом варианте опыта использовали по 60 семян. После обработки семена (10 штук на каждое повторение) раскладывали в чашки Петри на увлажненную дистиллированной водой фильтровальную бумагу и помещали в термостат при 28 °С на 5 суток с контролем увлажнения. По истечении 5-ти суток определяли биометрические показатели развития проростков пшеницы: среднюю длину проростка, суммарную длину корешков одного растения, число корешков.

Полевые опыты для оценки эффективности монокультур и бинарной композиции на посевах озимой пшеницы. Заложены два полевых опыта на эродированных на дерново-подзолистых почвах в Центральной и Северной почвенно-экологических провинциях республики. Стационарные опыты заложены по геоморфологическому профилю от водораздельной равнины до подножья склона. На водоразделе расположена незероэродированная почва, в верхней части склона – среднеэродированная, в средней – сильноэродированная почва. Изучаемые факторы – степень эродированности почвы, системы удобрения, инокуляция посевов монокультурами бактерий и бинарной бактериальной композицией.

Влияние бинарной бактериальной композиции на урожайность озимой пшеницы изучено на эродированных дерново-подзолистых почвах на мощных моренных суглинках при разных системах удобрения (ОАО «Межаны», Браславский р-н). Агрохимические свойства пахотного слоя почвы: гумус – 1,5–2,1 %; pH – 6,1–6,3; P_2O_5 – 177–280 и K_2O – 127–185 мг/кг. Севооборот зернотравяной: озимая пшеница + пожнивные (2016 г.), горох + пожнивные (2017 г.), ячмень + клевер (2018 г.). Изготовлен бинарный инокулянт с соотношением компонентов 1:1 (титры – *A. brasilense* – $1,6 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, *B. circulans* – $1,6 \cdot 10^9$ КОЕ/мл). Инокуляция посевов озимой пшеницы проведена весной в фазе кущения на водоразделе, слабо-, средне- и сильноэродированной почвах на вариантах с отвальной вспашкой. Системы удобрения: контроль, NPK и NPK + навоз (в расчете на положительный баланс гумуса). Дозы минеральных удобрений в 2016 г. – $N_{90+30+30}P_{70}K_{120}$.

Влияние моноинокулянтов и бинарной бактериальной композиции на урожайность озимой пшеницы изучено на дерново-подзолистых почвах на мощных лессовидных суглинках («Стоковые площадки», Минский р-н). Агрохимические свойства пахотного слоя почвы: гумус – 0,8–2,5 %; pH – 5,2–5,9; P_2O_5 – 290–330 и K_2O – 180–230 мг/кг. Севооборот зернотравяной: многолетние травы 2 г.п. (2011 г.); вико-овсяная смесь (2012 г.); яровой рапс (2013 г.); яровая пшеница (2014 г.); однолетние травы (2015 г.); озимая пшеница (2016 г.). Инокуляция посевов озимой пшеницы проведена весной в фазе кущения моноинокулянтами *A. brasilense* и *B. circulans* (титры $1,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл) и бинарным инокулянтом *A. brasilense* + *B. circulans* (титр $1,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл в соотношении 1:1) на всех элементах склона в вариантах с внесением $N_{100+30}P_{60}K_{100}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведена серия лабораторных экспериментов, изучены культуральные, морфологические и физиологические свойства штаммов и изолятов азотфиксирующих (р. *Azospirillum*) и калиймобилизующих (р. *Bacillus*) бактерий. По критериям высокой активности по целевым свойствам, азотфиксации и калиймобилизации, а также по наличию дополнительного приспособительного механизма, фосфатмобилизации, для создания бинарной микробной композиции отобраны наиболее активные штаммы. Нитрогеназная активность отобранного штамма *Azospirillum brasilense* в чистой культуре варьирует в пределах 130–135 мкг N_2 /сосуд. Активность мобилизации калия из мусковита для отобранного штамма *Bacillus circulans* составила 13,6 мг К/10г, из гидромусковита – 10,3 мг К/10г. Перспективные штаммы характеризовались способностью к мобилизации фосфора из ортофосфата кальция: фосфатмобилизующая активность *A. brasilense* составила 308 мг/л Р, *B. circulans* – 144 мг/л Р.

Исследование биологической совместимости бактерий *A. brasilense* и *B. circulans*. Оценка антагонистической активности микроорганизмов выполнена с применением диффузионных методов. К ним относятся метод перпендикулярных штрихов, метод блоков или лунок, метод капель, напыления, агаровых слоев и другие. Эти методы основаны на диффузии антибиотических метаболитов испытуемых бактерий в толщу агаровой среды, содержащей тест-культуру. В экспериментах использованы картофельный агар (КА) и среда DN с конго красным.

Проведена серия лабораторных экспериментов по изучению биологической совместимости бактерий *A. brasilense* и *B. circulans* in vitro с применением метода капель (рис. 1), перпендикулярных штрихов и капли-штриха (рис. 2). Анализ результатов экспериментов, проведенных разными диффузионными методами, показал, что штаммы *A. brasilense* и *B. circulans* биологически совместимы и могут использоваться в качестве компонентов бинарного бактериального инокулянта.

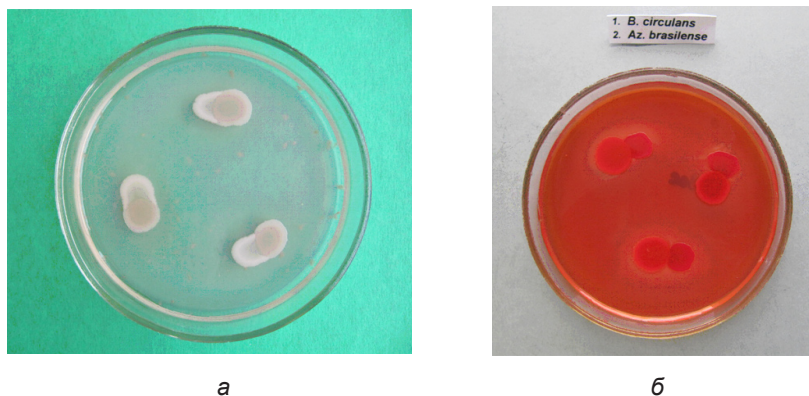


Рис. 1. Совместное культивирование бактерий *A. brasilense* и *B. circulans* (метод капель) на:
а – картофельном агаре; б – среде DN с конго красным

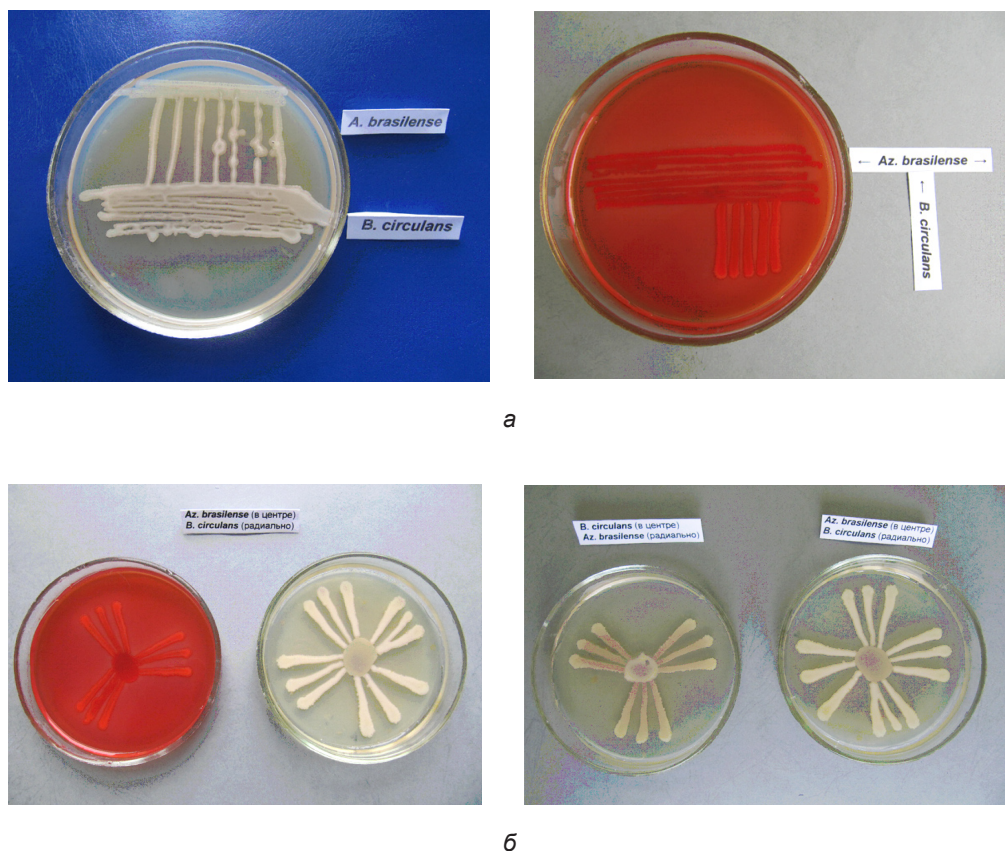


Рис. 2. Совместное культивирование бактерий *A. brasilense* и *B. circulans*:
 а – метод перпендикулярных штрихов на картофельном агаре и среде DN
 с конго красным; б – метод капли-штриха на среде DN с конго красным
 и картофельном агаре

Лабораторный эксперимент по изучению влияния азотфиксирующих и калиймобилизующих бактерий на развитие проростков яровой пшеницы. Гормональный эффект считается одним из основных факторов повышения урожайности при использовании микробных удобрений. Стимуляция развития корневой системы повышает способность инокулированных растений использовать элементы минерального питания и воду.

В лабораторном эксперименте с 5-суточными проростками пшеницы инокуляция семян *A. brasilense* приводила к увеличению средней длины проростков яровой пшеницы на 21 %, суммарной длины корешков (в расчете на одно растение) – на 44 %, число корешков – на 9 %. Влияние *B. circulans* на ростовые процессы было менее выражено, средняя длина проростков увеличилась на 20 %, суммарная длина корешков одного растения – на 36 %, число корешков – на 9 %. Совместное действие азотфиксирующих и калиймобилизующих бактерий *A. brasilense* + *B. circulans* стимулировало длину проростка на 20 %, суммарную длину корешков одного растения – на 39 %, число корешков – на 10 % (табл. 1).

Таблица 1

**Биометрические показатели развития проростков яровой пшеницы
при разных способах обработки семян**

Вариант	Средняя длина проростка		Суммарная длина корешков 1 растения		Число корешков	
	мм	%	мм	%	шт.	%
Контроль	47,1	100	178,3	100	4,41	100
Поверхностная стерилизация	51,3	109	197,0	110	4,55	103
<i>A. brasilense</i>	57,2	121	257,5	144	4,80	109
<i>B. circulans</i>	56,4	120	242,1	136	4,80	109
<i>A. brasilense</i> + <i>B. circulans</i>	56,6	120	247,6	139	4,85	110
НСП ₀₅	6,14		29,20		0,11	

Длительный модельный эксперимент по изучению динамики накопления титров бактерий *A. brasilense* и *B. circulans* при совместном и раздельном культивировании в жидких средах и растворах. К основным показателям качества микробной композиции относятся биологическая эффективность препарата, титр активных компонентов, а также сохранность их полезных качеств при длительном хранении. Отобранные штаммы удовлетворяют требованиям технологичности – не являются патогенными, не представляют опасности для человека и окружающей среды, характеризуются высокой скоростью роста на недорогих субстратах (картофельный агар), сохранением титров и отсутствием заражения посторонней микрофлоры при длительном культивировании.

Экспериментальные данные свидетельствуют о возможности совместного культивирования *A. brasilense* и *B. circulans* в жидких средах и растворах. По данным 6-месячного модельного эксперимента титры и свойства *A. brasilense* и *B. circulans* в бинарной композиции были сравнимы с таковыми при культивировании монокультур бактерий на разных средах и при различных условиях культивирования (табл. 2, 3). Загрязнение посторонней микрофлорой отсутствовало в течение 6-месячного культивирования.

Таким образом, в результате лабораторных исследований установлено, что отобранные для бинарной композиции штаммы бактерий *A. brasilense* и *B. circulans* технологичны, оказывают положительное влияние на проростки пшеницы, не угнетают друг друга при совместном культивировании на плотных питательных средах, сохраняют титры при длительном хранении в жидких средах и физрастворах.

Оценка эффективности бинарной бактериальной композиции в полевых опытах на эродированных дерново-подзолистых почвах. В полевом опыте на дерново-подзолистых почвах на моренных суглинках (ОАО «Межаны») изучено влияние бинарной бактериальной композиции *A. brasilense* + *B. circulans* на урожайность озимой пшеницы в зависимости от степени эродированности и системы удобрения. На разных элементах склона отмечено повышение урожайности при минеральной и органо-минеральной системах удобрения по сравнению с контролем. По почвенно-эрозионной катене наблюдается снижение урожайности от водораздела к сильноэродированной почве.

Таблица 2

Титры бактерий в жидких средах при разных условиях культивирования

Вариант	Титр, КОЕ/мл									
	исходный	3 сут.	2 нед.	4 нед.	6 нед.	8 нед.	10 нед.	12 нед.	4 мес.	6 мес.
<i>Картофельная среда</i>										
<i>A. brasilense</i>	1,6·10 ⁸	7,6·10 ⁸	9,4·10 ⁹	7,2·10 ⁹	4,8·10 ⁹	2,9·10 ⁹	6,3·10 ⁸	1,1·10 ⁸	4,3·10 ⁶	220
<i>B. circulans</i>	1,5·10 ⁸	5,4·10 ⁸	7,3·10 ⁹	9,8·10 ⁹	7,9·10 ⁹	7,6·10 ⁹	1,5·10 ⁹	3,6·10 ⁸	7,6·10 ⁶	440
<i>A. brasilense</i> + <i>B. circulans</i>	0,8·10 ⁸ 0,8·10 ⁸	4,2·10 ⁸ 4,6·10 ⁸	5,7·10 ⁹ 6,6·10 ⁹	5,0·10 ⁹ 5,6·10 ⁹	3,0·10 ⁹ 4,1·10 ⁹	1,9·10 ⁹ 2,7·10 ⁹	6,3·10 ⁸ 8,7·10 ⁸	1,7·10 ⁸ 3,4·10 ⁸	1,8·10 ⁶ 3,1·10 ⁶	140 420
<i>Картофельная среда с дополнительной аэрацией на качалке</i>										
<i>A. brasilense</i>	1,6·10 ⁸	7,2·10 ⁸	9,8·10 ⁹	9,9·10 ⁹	7,4·10 ⁹	4,4·10 ⁹	1,1·10 ⁹	9,4·10 ⁸	4,9·10 ⁶	340
<i>B. circulans</i>	1,5·10 ⁸	5,8·10 ⁸	8,3·10 ⁹	1,3·10 ¹⁰	9,8·10 ⁹	6,3·10 ⁹	1,5·10 ⁹	7,3·10 ⁸	6,7·10 ⁶	620
<i>A. brasilense</i> + <i>B. circulans</i>	0,8·10 ⁸ 0,8·10 ⁸	3,9·10 ⁸ 3,3·10 ⁸	6,8·10 ⁹ 6,2·10 ⁹	5,4·10 ⁹ 6,5·10 ⁹	4,8·10 ⁹ 5,9·10 ⁹	2,2·10 ⁹ 3,6·10 ⁹	8,5·10 ⁸ 1,1·10 ⁹	3,4·10 ⁸ 6,0·10 ⁸	2,0·10 ⁶ 4,1·10 ⁶	210 550
<i>Физ. раствор, 0,9 % NaCl</i>										
<i>A. brasilense</i>	1,6·10 ⁸	5,2·10 ⁸	8,1·10 ⁸	8,2·10 ⁸	6,4·10 ⁸	6,5·10 ⁸	8,2·10 ⁷	2,9·10 ⁷	8,7·10 ⁴	≈ 0
<i>B. circulans</i>	1,5·10 ⁸	3,8·10 ⁸	4,5·10 ⁸	4,6·10 ⁸	3,8·10 ⁸	3,4·10 ⁸	6,4·10 ⁷	1,4·10 ⁷	4,1·10 ⁴	≈ 0
<i>A. brasilense</i> + <i>B. circulans</i>	0,8·10 ⁸ 0,8·10 ⁸	2,9·10 ⁸ 2,3·10 ⁸	5,9·10 ⁸ 2,3·10 ⁸	5,3·10 ⁸ 2,9·10 ⁸	3,5·10 ⁸ 3,1·10 ⁸	3,1·10 ⁸ 2,9·10 ⁸	6,3·10 ⁷ 7,9·10 ⁷	7,2·10 ⁶ 1,1·10 ⁷	2,4·10 ⁴ 4,2·10 ⁴	27 44
<i>Физ. раствор, 0,9 % NaCl с дополнительной аэрацией на качалке</i>										
<i>A. brasilense</i>	1,6·10 ⁸	5,6·10 ⁸	8,8·10 ⁸	8,6·10 ⁸	6,3·10 ⁸	6,0·10 ⁸	5,3·10 ⁷	4,8·10 ⁷	1,9·10 ⁵	≈ 0
<i>B. circulans</i>	1,5·10 ⁸	5,6·10 ⁸	9,3·10 ⁸	6,1·10 ⁸	5,8·10 ⁸	5,6·10 ⁸	9,0·10 ⁷	6,6·10 ⁷	8,7·10 ⁴	16
<i>A. brasilense</i> + <i>B. circulans</i>	0,8·10 ⁸ 0,8·10 ⁸	3,7·10 ⁸ 2,9·10 ⁸	5,7·10 ⁸ 4,9·10 ⁸	4,5·10 ⁸ 5,7·10 ⁸	2,9·10 ⁸ 4,9·10 ⁸	2,7·10 ⁸ 5,1·10 ⁸	6,1·10 ⁷ 9,8·10 ⁷	4,9·10 ⁷ 6,2·10 ⁷	4,3·10 ⁴ 1,1·10 ⁵	20 64

Примечание. Отклонения от средних величин до ±7,2 % для картофельной среды; до ±5,1 % для раствора NaCl.

Таблица 3

Титры бактерий в жидких средах при разных условиях культивирования

Вариант	Титр, КОЕ/мл							
	исходный	6 сут.	2 нед.	4 нед.	6 нед.	3 мес.	4 мес.	6 мес.
Nfb								
A. brasiliense	2,4·10 ⁸	7,1·10 ⁹	8,3·10 ⁹	6,4·10 ⁹	4,9·10 ⁹	7,6·10 ⁸	7,2·10 ⁶	1,3·10 ⁴
B. circulans	2,7·10 ⁸	5,0·10 ⁹	7,6·10 ⁹	7,4·10 ⁹	7,0·10 ⁹	8,8·10 ⁸	6,5·10 ⁶	3,4·10 ⁴
A. brasiliense + B. circulans	1,2·10 ⁸ 1,4·10 ⁸	3,2·10 ⁹ 4,0·10 ⁹	3,5·10 ⁹ 6,6·10 ⁹	2,8·10 ⁹ 5,3·10 ⁹	2,5·10 ⁹ 4,9·10 ⁹	3,6·10 ⁸ 6,1·10 ⁸	3,1·10 ⁶ 4,1·10 ⁶	2,1·10 ⁴ 3,7·10 ⁴
Nfb с дополнительной аэрацией на качалке								
A. brasiliense	2,4·10 ⁸	8,5·10 ⁹	1,1·10 ¹⁰	9,9·10 ⁹	9,5·10 ⁹	8,7·10 ⁸	1,6·10 ⁷	1,5·10 ⁴
B. circulans	2,7·10 ⁸	6,8·10 ⁹	1,3·10 ¹⁰	9,8·10 ⁹	8,3·10 ⁹	6,9·10 ⁸	2,5·10 ⁷	5,7·10 ⁴
A. brasiliense + B. circulans	1,2·10 ⁸ 1,4·10 ⁸	3,2·10 ⁹ 4,7·10 ⁹	4,4·10 ⁹ 6,6·10 ⁹	4,9·10 ⁹ 5,9·10 ⁹	4,0·10 ⁹ 5,8·10 ⁹	2,1·10 ⁸ 3,7·10 ⁸	1,2·10 ⁷ 9,1·10 ⁶	4,3·10 ⁴ 1,9·10 ⁴
К.ж. (водопроводная вода)								
A. brasiliense	2,4·10 ⁸	7,2·10 ⁸	2,3·10 ⁹	8,5·10 ⁸	7,9·10 ⁸	2,5·10 ⁷	1,9·10 ⁵	1,0·10 ³
B. circulans	2,7·10 ⁸	5,1·10 ⁸	1,7·10 ⁹	9,0·10 ⁸	6,6·10 ⁸	4,3·10 ⁷	2,8·10 ⁵	6,9·10 ²
A. brasiliense + B. circulans	1,2·10 ⁸ 1,4·10 ⁸	5,0·10 ⁸ 4,9·10 ⁸	1,1·10 ⁹ 1,9·10 ⁹	4,6·10 ⁸ 6,8·10 ⁸	2,7·10 ⁸ 3,3·10 ⁸	9,7·10 ⁶ 2,3·10 ⁷	1,4·10 ⁵ 2,0·10 ⁵	5,1·10 ² 7,1·10 ²
К.ж. (водопроводная вода) с дополнительной аэрацией на качалке								
A. brasiliense	2,4·10 ⁸	7,7·10 ⁸	4,3·10 ⁹	2,8·10 ⁹	8,9·10 ⁸	6,4·10 ⁷	4,2·10 ⁵	2,7·10 ³
B. circulans	2,7·10 ⁸	8,1·10 ⁸	6,9·10 ⁹	5,7·10 ⁹	5,6·10 ⁸	8,1·10 ⁷	3,2·10 ⁵	4,4·10 ³
A. brasiliense + B. circulans	1,2·10 ⁸ 1,4·10 ⁸	5,0·10 ⁸ 6,6·10 ⁸	1,6·10 ⁹ 2,4·10 ⁹	4,2·10 ⁸ 6,5·10 ⁸	3,9·10 ⁸ 5,3·10 ⁸	3,5·10 ⁶ 6,6·10 ⁶	8,6·10 ⁴ 2,3·10 ⁵	1,1·10 ³ 6,2·10 ³

Примечание. Отклонения от средних величин до ±5,8 % для среды Nfb; до ±4,8 % для Н₂О.

Установлено, что бинарная инокуляция посевов *A. Brasilense* + *B. circulans* эффективна по всей почвенно-эрозионной катене. Урожайность зерна озимой пшеницы в вариантах без инокуляции при минеральной системе удобрения составила – 39,4–52,5 ц/га, при органо-минеральной – 43,1–56,98 ц/га, на контроле без удобрений – 38,4–46,1 ц/га. Прибавки урожайности зерна озимой пшеницы при минеральной системе удобрения составили – 2,9–3,9 ц/га, при органо-минеральной – 4,3–4,8 ц/га, на контроле без удобрений – 4,7–5,2 ц/га (табл. 4).

Таблица 4

Влияние бинарной бактериальной композиции на урожайность озимой пшеницы на дерново-подзолистых почвах на моренных суглинках в зависимости от степени эродированности и системы удобрения (ОАО «Межаны», 2016 г.)

Почва	Контроль			NPK			NPK + навоз		
	б/инок.	бинар-ная инок.	прибавка	б/инок.	бинар-ная инок.	прибавка	б/инок.	бинар-ная инок.	прибавка
Неэрод.	46,1	51,3	5,2	52,5	56,0	3,5	56,9	61,7	4,8
Слабо-	44,7	49,4	4,7	49,2	52,1	2,9	50,1	54,5	4,4
Средне-	42,4	47,5	5,1	50,7	53,9	3,2	49,5	53,9	4,4
Сильно-	38,4	43,3	4,9	39,4	43,3	3,9	43,1	47,4	4,3
НСР ₀₅ Фактор А (почва) 3,45; Фактор В (удобрения) 3,22; Фактор С (бактеризация) 3,04									

Примечание. Бинарная инокуляция – *A. Brasilense* + *B. Circulans*.

На дерново-подзолистых почвах, сформированных на лессовидных суглинках, проведено сравнение эффективности бинарной инокуляции с применением моноинокулянтов на посевах озимой пшеницы. Установлена более высокая эффективность бинарной инокуляции *A. Brasilense* + *B. circulans* по сравнению с монокультурами бактерий на всех элементах склона: на водоразделе, средне- и сильноэродированных почвах прибавки от моноинокулянтов *A. brasilense* и *B. circulans* составили – 3,9 и 2,5, 3,5 и 2,6, 3,5 и 3,6 ц/га, а от бинарного инокулянта *A. Brasilense* + *B. circulans* – 3,6, 4,1 и 4,6 ц/га соответственно (табл. 5). Отмечена тенденция повышения эффективности инокуляции на сильноэродированной почве в условиях стресса.

Таблица 5

Влияние моно- и бинарной инокуляции на урожайность озимой пшеницы (ц/га) на дерново-подзолистых почвах на лессовидных суглинках в зависимости от степени эродированности («Стоковые площадки», 2016 г.)

Вариант	Неэродированная		Среднеэродиро-ванная		Сильноэродиро-ванная	
	урожай-ность	прибавка	урожай-ность	прибавка	урожай-ность	прибавка
Контроль	61,4	–	54,2	–	45,9	–
<i>A. brasilense</i>	65,3	3,9	57,7	3,5	49,4	3,5
<i>B. circulans</i>	63,9	2,5	56,8	2,6	49,5	3,6
<i>A. brasilense</i> + <i>B. circulans</i>	65,0	3,6	58,3	4,1	50,5	4,6
НСР ₀₅ Фактор А (бактеризация) 3,39; Фактор В (почва) 2,93						

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По критериям высокой активности по целевым свойствам, азотфиксации, калиймобилизации, а также по наличию дополнительного приспособительного механизма, фосфатмобилизации, для создания бинарной микробной композиции из собственной коллекции отобраны активные штаммы *A. brasilense* и *B. circulans*, которые удовлетворяют требованиям технологичности, не патогенны, не опасны для человека и окружающей среды, характеризуются высокой скоростью роста на недорогих субстратах, сохранением титров и отсутствием заражения посторонней микрофлорой при длительном культивировании.

В лабораторных экспериментах с применением диффузионных методов установлена биологическая совместимость бактерий *A. brasilense* и *B. circulans*. В длительном модельном эксперименте изучена динамика накопления титров *A. brasilense* и *B. circulans* при совместном и раздельном культивировании в жидких средах в течение 6 месяцев; установлена возможность длительного совместного культивирования с сохранением титров и свойств активных агентов; загрязнение посторонней микрофлорой отсутствовало.

Разработана бинарная бактериальная композиция. Для тестирования в полевых опытах изготовлены бинарный инокулянт *A. brasilense*+*B. circulans* и моноинокулянты *A. brasilense* и *B. circulans*. На дерново-подзолистых почвах на лессовидных суглинках, проведено сравнение эффективности бинарной инокуляции с применением моноинокулянтов на посевах озимой пшеницы; установлена более высокая эффективность бинарной инокуляции по сравнению с монокультурами на всех элементах склона: на водоразделе, средне- и сильноэродированных почвах прибавки от моноинокулянтов составили – 3,9 и 2,5, 3,5 и 2,6, 3,5 и 3,6 ц/га, а от бинарного инокулянта *A. Brasilens* + *B. circulans* – 3,6, 4,1 и 4,6 ц/га соответственно. На дерново-подзолистых почвах на моренных суглинках, изучено влияние бинарной бактериальной композиции на урожайность озимой пшеницы в зависимости от степени эродированности почвы и системы удобрения. Установлена эффективность бинарной инокуляции *A. brasilense*+*B. circulans* по почвенно-эрозионной катене – прибавки урожайности зерна при минеральной системе удобрения составили 2,9–3,9 ц/га, при органо-минеральной – 4,3–4,8 ц/га, на контроле без удобрений – 4,7–5,2 ц/га.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bashan, Y. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture / Y Bashan, H. Levanony. – Can. J. Microbiol. – 1990. – Vol. 36. – P. 591–608.
2. Okon, Y. Agronomic application of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation / Y. Okon, C.A. Labandera-Gonzalez // Soil Biol. Biochem. – 1994. – V. 26. – P. 1591–1601.
3. Boddy, R.M. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for future / R.M. Boddy, J. Dobereiner // Fertilizer Research. – 1995. – V. 42. – P. 241–250.
4. Okon, Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots / Y. Okon, Y. Kapulnik // Plant Soil. – 1986. – V. 90. – P. 3–16.

5. *Kapulnik, Y.* Contribution of nitrogen fixed by *Azospirillum* to N nutrition of spring wheat in Israel. / Y. Kapulnik, Feldman, Y. Okon and Y. Henis // Soil Biol. Biochem. – 1985. – V. 17. – P. 509–515.
6. *Boddy, R.M.* Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for future / R.M. Boddy, J. Dobereiner // Fertilizer Research. – 1995. – V. 42. – P. 241–250.
7. Изучение способности штамма *A. brasilense* к мобилизации ортофосфатов кальция / Н.А. Михайловская [и др.] // Почвенные исследования и применение удобрений. – 2003. – Вып. 27. – С. 325–332.
8. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? / I.R. Kennedy [et al.] // Soil Biol. Biochem. – 2004. – V. 36, № 8. – P. 1229–1244.
9. *Sadasivan, L.* Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145 / L. Sadasivan and C.A. Neyra // J. Bacteriol. – 1987. – V. 169. – P. 1670–1677.
10. *Аристовская, Т.В.* Микробиология процессов почвообразования / Т.В. Аристовская. – Л.: Наука, 1980. – 187 с.
11. *Звягинцев, Д.Г.* Биология почв / Д.Г. Звягинцев, И.Л. Бабьева, Г.М. Зенова. – М.: Изд-во МГУ, 2005. – 445 с.
12. Активность фосфатмобилизации у ризобактерий / Н.А. Михайловская [и др.] // Почвоведение и агрохимия. – 2007. – № 1(38). – С. 225–231.
13. *Gottschalk, G.* 1986. Bacterial metabolism / G. Gottschalk. – Springer, 1986, New York, N.Y. – 359 p.
14. *Теппер, Е.З.* Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. – М.: Агропромиздат, 1987. – 239 с.
15. Справочник по методам исследований в микробиологии и вирусологии / под ред. М.О. Бергера – М.: Медицина, 1982. – 464 с.
16. *Лысак, Л.В.* Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий / Л.В. Лысак, Т.Г. Добровольская, И.Н. Скворцова. – М.: МАКС Пресс, 2003. – 120 с.
17. Инструкция по применению систем индикаторных бумажных (СИБ), утвержденная начальником департамента Государственного контроля качества, эффективности и безопасности лекарственных средств и медицинской техники Р.У. Хабриева 25.01.1999 г.
18. *Умаров, М.М.* Ассоциативная азотфиксация / М.М. Умаров. – М.: Изд-во МГУ, 1986. – 132 с.
19. *Михайловская, Н.А.* Количественная оценка активности калиймобилизующих бактерий и их эффективность на посевах озимой ржи / Н.А. Михайловская // Весці НАН Беларусі. Серыя аграрных навук. – 2006. – № 3. – С. 41–46.
20. *Егоров, Н.С.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Н.С. Егоров. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 217 с.
21. Практикум по биологии почв: учеб. пособие / Г.М. Зенова [и др.]; МГУ, ф-т почвоведения; под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 2002. – 31 с.
22. Acetylene reduction (nitrogen fixation) associated with corn inoculated with *Spirillum*. / L.E. Barber [et al.] // Appl. Env. Microbiol. – 1976. – Vol. 32, № 1. – P. 108–113.

23. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – М.: Мир, 1984. – Т.1. – 340 с.

24. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* / J. Dobereiner [et al.] // Can. J. Microbiol. – 1976. – Vol. 22, № 10. – P. 1464–1473.

BINARY COMPOSITION A.BRASILENSE + B.CIRCULANS AND ITS EFFICIENCY FOR INOCULATION OF WINTER WHEAT ON ERODED SOD-PODZOLIC LOAMY SOILS

N.A. Mikhailovskaya, T.B. Barashenko, T.V. Pogirnitskaya, S.V. Dyusova

Summary

For the development of binary bacterial composition compatible strains of bacteria *A. brasilense* and *B. circulans* (own collection) were selected in experiments *in vitro* with application of diffusion methods. Binary bacterial composition was developed and tested in field experiments with winter wheat growing on eroded soddy-podzolic soils on loess and moraine loams. Most efficiency of binary inoculation (*A. brasilense* + *B. circulans*) compared application of monoinoculants was observed at all slope elements.

Поступила 21.04.17