

УДК 631.82, 631.46

ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ НА РАЗМНОЖЕНИЕ САПРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ В ПОЧВАХ

Марина Леонидовна Сидоренко

Биолого-почвенный институт ДВО РАН
690022, Владивосток, пр-т 100-лет Владивостоку, д. 159

К.б.н., с. н. с. сектора почвоведения и экологии почв; e-mail: sidorenko@biosoil.ru

Изучено влияние минеральных удобрений, вносимых в почву, на формирование бактериальных комплексов в почвенных экосистемах в условиях разных температур (4–6°C и 20–22°C). Применение минеральных удобрений положительно влияет на сохранение и размножение бактерий в почвах. Сапротрофные бактерии особенно активно развивались в бурой подзолистой культурной почве после внесения азотного и фосфорного удобрения при температуре 20–22°C.

Ключевые слова: минеральные удобрения, сапротрофные бактерии, почвенные экосистемы.

Изучение механизма регуляции жизнедеятельности почвенных микроорганизмов представляется одной из центральных проблем почвенной микробиологии. Видовой состав почвенного микробного комплекса определяется как функциональными взаимосвязями между микроорганизмами, так и условиями внешней среды. Одним из факторов, влияющих на существование и размножение бактерий в наземных экосистемах, могут быть вносимые в почвы удобрения, особенно при интенсивной химизации земледелия [1]. Эти вопросы освещены в литературе достаточно широко. Однако данные о влиянии удобрений на микробиоту почв носят противоречивый характер. Некоторые авторы отмечают существенное увеличение интенсивности микробиологических процессов в почве при внесении навоза, основных видов минеральных удобрений (NPK), известки [2–6]. Другие отмечают угнетающее их воздействие на почвенные бактерии [7, 8]. Есть мнение, что снижение численности микроорганизмов при длительном применении минеральных удобрений происходит за счет неспорозоносных форм бактерий и актиномицетов [9].

В связи с этим целью настоящей работы – определить характер влияния минеральных удобрений, вносимых в почву, на размножение почвенных бактерий при разных температурах (4–6°C и 20–22°C).

Методика. Бактерии, используемые в работе, были выделены из естественно сложившихся микробных ассоциаций бурой лесной почвы (хвойно-широколиственный лесной массив в предгорьях Сихотэ-Алиня, Шкотовский район, Приморский край) и бурой подзолистой культурной почвы (пашня, капустное поле, Надеждинский район, Приморский край). Все образцы отбирали из верхнего (0–10 см) слоя почвы. В почвенных образцах определяли гу-

мус по Тюрину, групповой состав гумуса по Тюрину в модификации Пономаревой и Плотниковой, pH_{KCl} , pH_{H_2O} , обменную и гидролитическую кислотность, состав обменных катионов ППК, обменные основания (Ca^{2+} и Mg^{2+}), емкость катионного обмена, степень насыщенности основаниями [11, 12].

Микроорганизмы выделяли и выращивали на пептонном агаре (1% пептона («Микроген» ФГУП НПО МЗ РФ), 0,5% NaCl в дистиллированной воде с 2%-ным агаром, pH 7,4).

Всего было выделено из почвы 20 штаммов микроорганизмов, различных по своим культуральным и биохимическим свойствам, которые были отнесены по определителю бактерий Берги [17] и с помощью API-тестов (Analytical Profile Index) производства bioMerieux (Франция) к родам: *Agrobacterium*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Micrococcus* (*M. roseus*), *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. putida*), *Flavobacterium*, *Bacillus* (*B. cereus*, *B. mesentericus*).

Трижды отмытые в физиологическом растворе культуры этих штаммов вносили в подготовленные заранее почвенные суспензии дозировано из расчета 100 клеток на 0,1 мл суспензии. Количество бактериальных клеток в 1 мл суспензии определяли по оптическому стандарту мутности.

Для определения численности жизнеспособных клеток бактерий в почвенных экосистемах из образцов почв были приготовлены суспензии, содержащие 1 г почвы на 100 мл физиологического раствора. Эти суспензии служили контролем во всех опытах.

Для экспериментов с удобрениями предварительно готовили смесь из 1 кг почвы и 0,3 г одного из минеральных удобрений: азотного – $CO(NH_2)_2$, фосфорного – Ca_2HPO_4 , калийного – K_2CO_3 . Подготовленную смесь в количестве 1 г вносили в колбу со 100 мл дистиллированной воды. Все подготовленные суспензии стерилизовали дробно по 20 мин. в течение 3 сут при температуре 100°C в автоклаве.

Исследования проводили при периодическом культивировании. Исходная доза при контрольном высеве составила 100 КОЕ/0,1 мл почвенной су-

Материалы работы были представлены на Международной конференции «Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред», 4–6 февраля 2013 г., МГУ, Москва, Россия.

1. Физико-химические и химические свойства почв

Почва	рН _{H2O}	рН _{KCl}	Обменная кислотность	Гидролитическая кислотность	Емкость катионного обмена	Обменные основания		Степень насыщенности основаниями, %	C _{общ.} , %
						Ca ²⁺	Mg ²⁺		
						ммоль экв/100 г почвы			
Бурая лесная	5,85	5,00	3,25	7,20	44,70	30,3	7,50	83,9	1,1
Бурая подзолистая культурная	7,36	6,36	1,15	1,74	80,74	65,1	14,2	97,8	2,6

спензии. Для построения кривой роста определяли динамику численности бактерий путем периодических высевов по 0,1 мл инокулята (делая необходимые серийные разведения) на мясо-пептонный агар (МПА) и растительный агар (РА) [10]. Стадии кривой роста и максимальную концентрацию бактерий определяли по подсчету числа колоний, выросших на чашках Петри (колониеобразующие единицы, КОЕ) [13].

Для выяснения значимости температурного фактора все эксперименты проводили при 20–22°C и 4–6°C.

Повторность опытов 3-кратная, результаты обрабатывались статистически в компьютерной программе электронных таблиц Excel.

Результаты и обсуждение. В результате изучения динамики размножения бактерий было установлено, что сохранение и размножение бактерий в почвах зависит как от типа исследуемых почв и их свойств, так и от биологических свойств бактерий на уровне штамма. Так, активное размножение большинства исследуемых штаммов бактерий (особенно, бактерий рода *Aeromonas*), наблюдали в бурой подзолистой культурной почве (5,4 lg), тогда как в бурой лесной почве уже на пятые сутки отмечалось значительное снижение количества бактерий вплоть до их полной гибели (рис. 1). Это связано с тем, что в бурой культурной почве выше концентрации ионов кальция и магния, которые являются жизненно необходимыми для нормального размножения бактерий [14]. Кроме того, эта почва имела оптимальный для развития бактерий уровень рН (7,0–7,4) и достаточное содержание органического углерода (табл. 1). Исключение составили штаммы *Pseudomonas fluorescens*, которые активнее размножались в бурой лесной почве (7,2 lg).

Известно, что при внесении умеренных доз минеральных удобрений улучшается питательный режим почвы, ее агрохимические свойства, что сопровождается увеличением численности различных

групп почвенных микроорганизмов, повышением ферментативной активности почвы и интенсивности продуцирования почвенной углекислоты [1].

Внесение смеси минеральных удобрений в бурую лесную почву способствовало активному размножению исследуемых бактерий и увеличению их концентрации на 3–4 lg по сравнению с почвой, не содержащей удобрений. Очевидно, что в данном случае значительную роль играет кислотность среды (рН_{H2O} 5,85) этого типа почв, неблагоприятная для размножения большинства видов бактерий (табл. 2). Дополнительное внесение удобрений в эту почву увеличивает рН среды до значений, оптимальных для размножения исследуемых бактерий. В бурой подзолистой культурной почве наблюдалась тенденция к увеличению роста популяции всех исследуемых штаммов на 2–3 lg по сравнению с контролем.

Наиболее активное размножение почвенных бактерий наблюдалось при внесении в почвенную суспензию азотного удобрения, как для бурой подзолистой культурной, так и для бурой лесной почвы (рис. 2). Удобрения можно расположить по степени их положительного влияния на размножение бактерий следующим образом: азотное > фосфорное > калийное, независимо от типа почв. Так, бактерии рода *Bacillus* преимущественно размножались в присутствии азотного и фосфорного удобрений (6,2 и 5,4 lg соответственно), а в присутствии калийного удобрения рост бактерий не превышал максимального значения 4,0 lg, независимо от типа почвы. При этом следует отметить, что в данном случае были получены одинаковые результаты как для «холодовых», так и для «тепловых» вариантов штаммов.

Очевидно, внесение в почву фосфорного и азотного удобрений положительно сказывалось на сохранении и размножении сапротрофных бактерий различных штаммов, поскольку, исходя из данных табл. 1, при этом выдерживаются оптимальные для

2. Значения рН_{H2O} почв при внесении удобрений

Почва	Без удобрения	После внесения		
		CO(NH ₂) ₂	Na ₂ HPO ₄	K ₂ CO ₃
Бурая лесная	5,85	8,01	7,56	8,31
Бурая подзолистая культурная	7,36	7,80	7,49	8,08

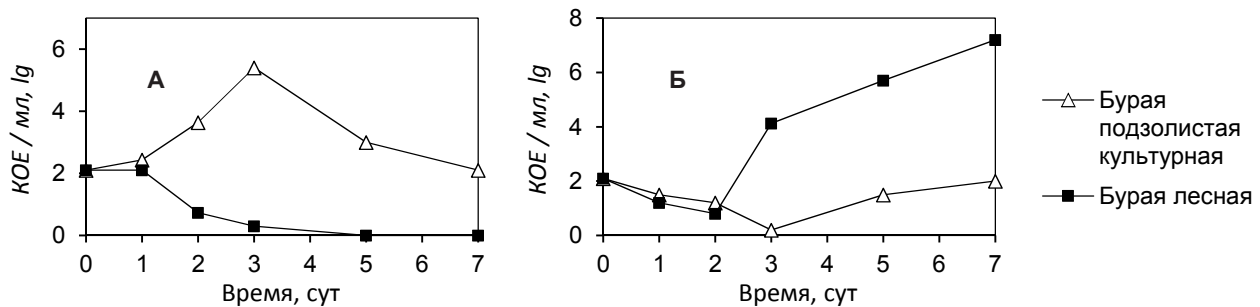


Рис. 1. Динамика размножения бактерий рода *Aeromonas*, штамм 1 (А) *P. fluorescens*, штамм 6 (Б) в бурой лесной и бурой подзолистой культурной почвах при 20–22°C (контрольный вариант без внесения удобрений).

них значения кислотности (рН 7,2–7,4). Менее благоприятно для размножения исследуемых бактерий присутствие калийного удобрения, сильно подщелачивающего почву (до рН 10). Известно также, что азот и фосфор – исключительно важные биогенные элементы. Они входят в состав основных компонентов любой живой клетки – структурных белков и белков-ферментов, нуклеиновых и аденозинфосфорных кислот. Азот служит микроорганизмам материалом для образования аминных (-NH₂-) и иминных (-NH-) групп в молекулах аминокислот, пуринов и пиримидинов, нуклеиновых кислот и других веществ. Фосфор входит в состав ряда важных органических соединений (нуклеиновых кислот, фосфолипидов, коферментов и др.), в том числе и высокоэнергетических.

Кроме того, известно, что внесение минеральных удобрений усиливает минерализационную деятельность микроорганизмов и приводит к разложению органического вещества почвы [5, 9, 15]. В результате увеличивается количество ионов кальция и магния, что необходимо для нормального роста любых микроорганизмов [14].

Следует отметить, что температурный фактор оказывал существенное влияние на размножение почвенных бактерий. Так, максимум размножения бактерий рода *Micrococcus* при температуре 20–22°C (6,2 lg, бурая подзолистая культурная почва) регистрировался на 6-е и 14-е сутки, тогда как при температуре 4–6°C – только на 18-е сутки (срок

наблюдения) и достигал значений 4,0 lg (бурая подзолистая культурная почва) (рис. 3).

Таким образом, активность размножения сапротрофных бактерий в почвах при внесении в них удобрений зависит, прежде всего, от вида удобрения, а также от температуры среды и свойств самих штаммов бактерий. Преимущество в этом случае имеет бурая подзолистая культурная почва и внесение таких удобрений, как азотное и фосфорное (при температуре 20–22°C). Длительное применение минеральных удобрений положительно влияет на бактериальные комплексы почв различных типов. Результаты опыта свидетельствуют об активном размножении сапротрофных бактерий в почвах при внесении минеральных удобрений.

Выводы.

1. Показано, что применение минеральных удобрений (CO(NH₂)₂, Ca₂HPO₄, K₂CO₃) способствовало активному размножению сапротрофных бактерий в почвах. При этом наиболее благоприятно внесение азотного или фосфорного удобрений.

2. Установлено, что при внесении удобрений сапротрофные бактерии активнее размножались в бурой подзолистой культурной почве по сравнению с бурой лесной.

3. Температура оказывала влияние на размножение бактерий в почвах, содержащих минеральные удобрения. Более интенсивное их размножение отмечено при температуре 20–22°C по сравнению с 4–6°C.

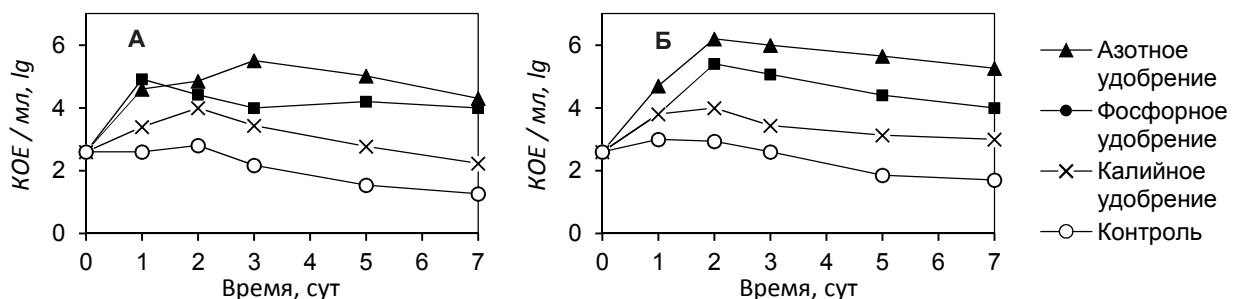


Рис. 2. Динамика размножения *Bacillus cereus*, штамм 18 при 20–22°C в бурой подзолистой культурной (А) и в бурой лесной (Б) почвах с различными видами удобрений (n = 5).

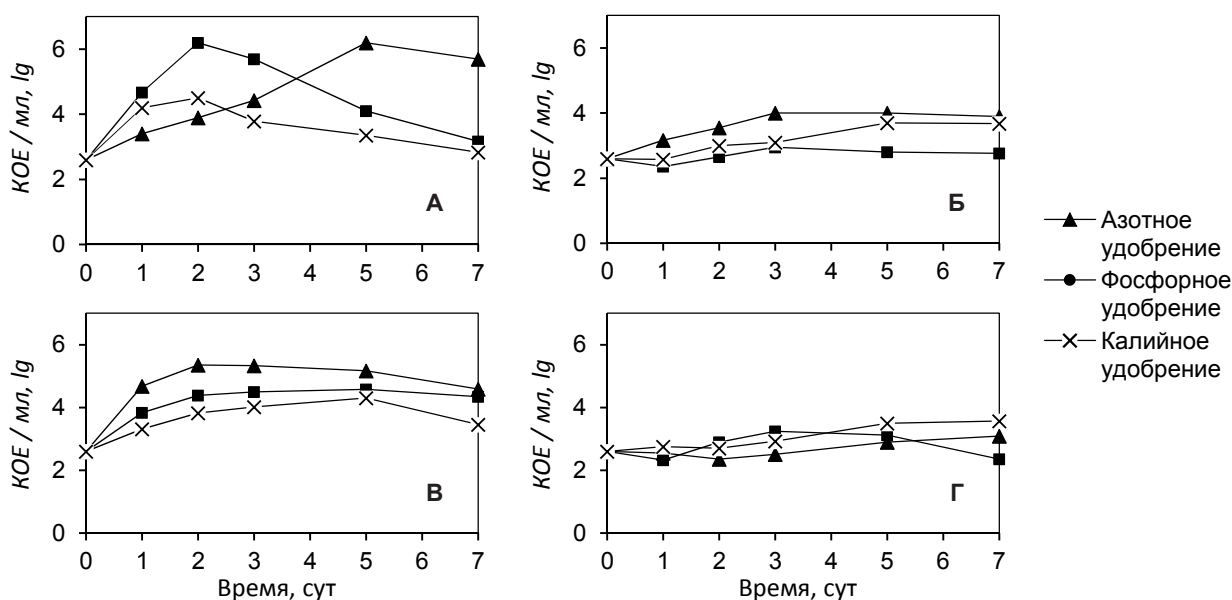


Рис. 3. Динамика размножения *Microsoccus roseus* штамм 3 в бурой подзолистой культурной при 20–22°C (А), при 4–6°C (Б) и в бурой лесной почвах при 20–22°C (В), при 4–6°C (Г) при внесении удобрений.

Литература:

1. Минеев В.Г., Ремпе Е.Х. Агрохимия, биология и экология почвы. – М.: Росагропромиздат, 1990. – 206 с.
2. Миненко А.К. Действие высоких доз минеральных удобрений на биологическую активность дерново-подзолистых почв // Агрохимия. – 1981. – № 3. – С. 77–82.
3. Джанаев Г.Г., Фарниев А.Т. Влияние удобрений на интенсивность микробиологических процессов // Известия АН СССР. Сер. Биол. – 1980. – № 5. – С. 754–761.
4. Кузнецов Н.П., Халитова В.С. Действие удобрений на биологическую активность черноземов // Сб. научн. трудов Восточно-Казахстанской Государственной с.-х. опытной станции. – 1981. – № 9. – С. 141–153.
5. Щапова Л.Н. Микрофлора почв юга ДВ России. – Владивосток: Дальнаука, 1994. – 186 с.
6. Стрельников В.Н., Бабаян Г.С., Соловьев П.П. Действие извести и высоких доз минеральных удобрений на агрохимические свойства и биологическую активность дерново-подзолистой супесчаной кислой почвы // Агрохимия. – 1981. – № 9. – С. 87–93.
7. Кубарева Л.С. Локальное внесение удобрений – один из путей повышения их эффективности // Бюл. ВИУА. – 1980. – № 53. – С. 3–9.
8. Пивоваров Г.Е., Гомонова Н.Ф., Ширская Г.М., Биологическая активность дерново-подзолистой почвы при длительном применении минеральных удобрений //

- Агрохимия. – 1985. – № 1. – С. 77–85.
9. Мишустин Е.М., Перцовская М.И. Микроорганизмы и самоочищение почвы. – М.: Изд-во АН СССР, 1954. – 158 с.
10. Бузолева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. Дисс. докт. биол. наук. – Владивосток, 2001. – С. 316.
11. Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв. – М.: Изд. Моск. ун-та, 1970. – 487 с.
12. Орлов Д.С., Гришина Л.А. Практикум по химии гумуса. – М.: Изд-во МГУ, 1981. – 272 с.
13. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1978. – 394 с.
14. Работнова И.Л., Позмогова И.Н. Некоторые вопросы общей физиологии микроорганизмов. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1994. – № 4. – С. 116–120.
15. Михновская А.З. Микробиологическая характеристика черноземов Украины и ее изменение под влиянием обработки и удобрений / Черноземы СССР (Украина). – М.: Колос, 1981. – 256 с.
16. Мишустин Е.М., Перцовская М.И., Горбов В.А. Санитарная микробиология почвы. – М.: Наука, 1979. – С. 125–229.
17. Определитель бактерий Берджи. – М.: Мир, 1997. – 800 с.

Sidorenko M.L.

EFFECT OF MINERAL FERTILIZERS ON THE REPRODUCTION OF SAPROTROPHIC BACTERIA IN SOILS

The effect of mineral fertilizers on the reproduction of saprotrophic bacteria in soil ecosystems under different temperatures (4–6°C and 20–22°C) are studied. Mineral fertilizers application contribute to the preservation and active reproduction of saprophytic bacteria in brown podzolic cultivated and brown forest soils. Saprotrophic bacteria develop in brown podzolic cultivated soil after the addition of nitrogen or phosphorus at the temperature 20–22°C especially intensively.

Keywords: mineral fertilizers, saprotrophic bacteria, soil ecosystems.