

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение  
«Ювановская средняя общеобразовательная школа»  
Ядринского района Чувашской Республики

Всероссийский конкурс юных исследователей окружающей среды

Номинация «Ресурсосберегающее земледелие»

## **Изучение биологической фиксации азота культурными штаммами клубеньковых бактерий**

Автор работы:

Кузьмина Анастасия Николаевна, 11 класс

МБОУ «Ювановская СОШ»,

Ядринского района Чувашской Республики

Научный руководитель:

Садикова Людмила Витальевна,

учитель биологии и химии

МБОУ «Ювановская СОШ»,

Ядринского района Чувашской Республики

2018г.

«Сельское хозяйство сегодня является высокотехнологичной, привлекательной для инвестиций отраслью, которая демонстрирует устойчивую положительную динамику. Каждый гектар сельхозугодий должен быть вовлечен в оборот. Важно не только осваивать земли, но и получать богатый, качественный урожай за счет внедрения цифровых технологий, обобщения информации об агрохимическом составе почвы, оценки качества используемых земель».

*Из Послания Главы Чувашской Республики М.В. Игнатьева Государственному Совету*

Низкий уровень показателей почвенно-климатических ресурсов земледелия Ядринского района определяет интенсификацию производства, а именно химизацию и мелиорацию почв и другие.

За последние годы, в силу экономических причин, резко сократились объемы внесения минеральных удобрений и применения средств химической мелиорации почв, наметилась тенденция экстенсивного ведения земледелия, что неизбежно ведет к снижению уже имеющегося уровня плодородия. В агроэкосистемах не возмещается вынос элементов минерального питания растений с урожаем - нарушается круговорот веществ.

Азотные подкормки повышают содержание сырого протеина в растительной массе, но в то же время очень часто приводят к загрязнению фунтовых вод нитратами, сдвигу биологического равновесия в нежелательную сторону, повышению стоимости и ухудшению качества получаемой продукции (Посыпанов, 2000).

Белок является основным ограничивающим фактором, который сдерживает увеличение продуктивности растений и животных. Проблему белка решают двумя способами: 1) внесение повышенных норм азотных удобрений под злаковые кормовые культуры, 2) возделывание бобовых культур, которые содержат большое количество белка.

При внесении минеральных азотных удобрений в первый год растениями используется только 50% от внесённого, а из оставшихся 50% значительная часть вымывается в грунтовые воды, загрязняя окружающую среду нитратами и нитритами. А высокие дозы азотных удобрений способствуют накоплению нитратов и нитратов в растениях в больших количествах, что небезопасно для здоровья животных и человека. Также следует отметить, что азотные удобрения очень дорогие, и у сельскохозяйственных предприятий нет средств на их приобретение.

Второй способ по повышению содержания белка основан на биологической (симбиотической) фиксации азота воздуха бобовыми культурами в симбиозе с клубеньковыми бактериями, не требует затрат на внесение азотных удобрений. В настоящее время в условиях Чувашской республики из кормовых культур семейства бобовых возделываются клевер

луговой, люцерна посевная, горох посевной, вика озимая. Но эти культуры не обеспечивают в полной мере решения проблемы кормового белка.

Люпин узколистный обладает самой высокой азотфиксирующей способностью, удельный вес атмосферного азота от общего содержания его в растениях может достигать в благоприятных условиях 75 – 85% [5], и даже больше – до 95% [6]. При благоприятных условиях он способен накапливать в почве 150–200 кг/га симбиотического азота [4]. Исследования показывают, что в восстановлении почвенного плодородия доля биологического азота от общего его поступления может составлять до 45–50% [4]. Использование на зеленое удобрение люпина равнозначно внесению 35 – 40 т/га навоза, не считая затрат на перевозку последнего от ферм и комплексов на поля [53]. Запаханная зеленая масса люпина разлагается постепенно, и в растениях не накапливается свободный азот, что часто наблюдается при избыточном минеральном азотном питании растений [5].

Поры, оставляемые стержневыми корнями люпина, улучшают газо-, тепло- и водообмен в почве. Люпин усиливает антифитопатогенный потенциал почвы, очищая ее от нематод, многих возбудителей болезней картофеля, зерновых и других культур севооборота.

Все это определяет высокую ценность люпина как предшественника для всех культур севооборота, кроме бобовых. Это актуально в современных условиях, так как доля злаковых зерновых и кормовых культур в севооборотах составляет более 70%.

На производство азотных удобрений расходуется около 1/3 всей энергии, потребляемой сельскохозяйственным производством [3]. Д.Н. Прянишников неоднократно указывал, что «биологически фиксированный азот следует считать даровым». Люпин накапливает в почве биологический азот эквивалентный внесению 0,5–0,6 т/га аммиачной селитры [49]. На производство и внесение в почву одного килограмма азота удобрений расходуется такое количество энергии, которое можно получить при сжигании 1,65 л бензина [50].

В связи с этим для условий села Юваново определенный интерес представляет биологическая фиксация азота воздуха, которую связывают как с жизнедеятельностью клубеньковых бактерий, усваивающих атмосферный азот в симбиозе с бобовыми растениями, так и азотфиксирующих ризосферных бактерий. При этом следует отметить более высокую биологическую полноценность белка бобовых культур по сравнению с белком злаковых и других культур.

Таким образом, проблема поиска путей решения проблемы кормового белка является весьма актуальной. Изучение особенностей интродукции новых для условий Чувашии видов бобовых трав и усиления биологической азотфиксации за счет инокуляции посевного материала высокоэффективными штаммами симбиотических и ризосферных азотфиксирующих бактерий будет способствовать разработке системы производства кормов на основе

расширения потенциала биоэкологических ресурсов.

В связи с этим определённый интерес представляют люпины однолетние, которые в сельскохозяйственном производстве Чувашии не применяются. Из многочисленных видов люпина 3 могут быть внедрены в Чувашии. Это люпин синий (*Lupinus angustifolius* L.), люпин жёлтый (*Lupinus futeus* L.), люпин белый (*Lupinus albus* L.)

Люпин узколистный относится к ценным зернобобовым культурам. В его семенах содержание белка составляет 27-37 %. Белок люпина в животных организмах хорошо усваивается без тепловой обработки. Широкое распространение люпина в кормопроизводстве ограничивалось наличием в его семенах алкалоидов. Современные безалкалоидные (алкалоидов  $\leq 0.025$  %) и малоалкалоидные сорта (алкалоидов 0.025 – 0.100 %) позволяют их включать в кормовые рационы [2,3].

Способность люпина развигать на неокультуренных почвах мощную корневую систему, усваивать труднорастворимые фосфаты и в симбиозе с клубеньковыми бактериями фиксировать азот воздуха делают эту культуру весьма привлекательной для внедрения в сельскохозяйственное производство. В то же время известно, что на территориях, где эта культура ранее не возделывалась, клубеньки на корнях люпина не формируются, т.е. биологическая фиксация азота воздуха не происходит.

Люпин возделывали в основном на зеленое удобрение (сидерат). Преимущество люпина как сидерата состоит в его высокой азотфиксирующей способности и большом накоплении органического вещества в почве. Азота в растениях накапливается 180-200 кг/га, что равноценно внесению 36-40 т/га навоза.

Корневая система люпина, глубоко проникая в почву, использует труднорастворимые фосфаты, способствует улучшению фосфатного режима.

**Актуальность** нашей работы заключается в том, что только бактерии (прокариоты) в частности симбиотические (клубеньковые) *Rhizobium* на бобовых способны усваивать азот воздуха, но в сельском хозяйстве производство биологического азота используется недостаточно; дефицит азота восполняется минеральными удобрениями – их производство опасно и при внесении в почву нередко вызывают отрицательные последствия. Поэтому изучение и определение особенностей биологической фиксации азота воздуха имеет большое научное и практическое значение. При этом перспективность интродукции люпинов однолетних, которые в сельскохозяйственном производстве в Чувашии не применяются, не вызывает сомнений.

Цель исследования - изучение эффективности влияния различных штаммов клубеньковых бактерий на урожайность люпина узколистного сорта Кристалл.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние штамма клубеньковых бактерий на урожайность семян люпина узколистного.
2. Определить содержание сырого протеина в семенах люпина в зависимости от штамма клубеньковых бактерий.
3. Рассчитать объемы фиксированного азота воздуха люпином на формирование семян в симбиозе с клубеньковыми бактериями.
4. Определить массу 1000 семян.
5. Определить урожайность картофеля и яровой пшеницы на участке с биологической фиксацией азота.

Объект исследования: культурные штаммы (363а, 367а, 375а) клубеньковых бактерий люпина, присланные из ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии весной 2017 года на кафедру земледелия Чувашской ГСХА.

**Методика исследования:**

1. Исследования проводили на экспериментальном участке МБОУ «Ювановская СОШ» Ядринского района Чувашской республики закладкой мелкоделяночных опытов с люпином узколистным сорта Кристалл.

За время исследований проводились фенологические наблюдения и биометрические измерения. После уборки изучали структуру полученного урожая.

Опыт мелкоделяночный. Все варианты опыта имели 4-кратную повторность. Посев производился во второй декаде, 19 мая. Посев проводился вручную, широкорядным способом - ширина междурядья 30 см.

Площадь учетной делянки составила  $-10 \text{ м}^2$ . В период вегетации проводили фенологические наблюдения. При этом отмечали: всходы, ветвление, цветение, формирование бобов, созревание. За начало наступления той или иной фазы принимали моменты, когда в нее вступали 10% растений.

Уборку осуществляли вручную по повторностям в один прием. Структуру урожая определяли в лабораторных условиях. Экспериментальный материал подвергли статистической обработке.

Схема опыта:

363а		контроль	
1	2	1	2
3	4	3	4

375а

1	2
3	4

367а

1	2
3	4

Варианты:

1. Без инокуляции (контроль);
2. Штамм 363а
3. Штамм 367а
- 4 Штамм 375а

Наши исследования, выполненные на дерново-подзолистых почвах с pH = 5,2 и содержанием гумуса 1,95 %, подвижного фосфора и обменного калия соответственно 144 и 162 мг/кг показали высокую эффективность инокуляции семян люпина узколистного (сорта Кристалл) культурными штаммами клубеньковых бактерий.

Месяц май 2017 года характеризовался низкими температурами, почва очень поздно нагрелась, что повлияло на дружность появления всходов и на уровень урожайности.

Уборка семян проведена 18 сентября.

Таблица №1. Продуктивность люпина узколистного

Вариант	Урожайность, ц/га	Содержание сырого протеина	Масса 1000 семян
Без инокуляции	9,5	36	138,27
штамм 363 а	18,5	40,6	179,32
штамм 367 а	27,8	40,8	158,65
штамм 375 а	31,6	39,6	177,46

Таблица №2. Фиксация азота воздуха в семенах люпина узколистного

Вариант	Наличие клубеньков	Содержание азота, %	Сборы азота, кг/га	± к контролю
Без инокуляции	-	5,76	54,7	
штамм 363 а	+	6,49	120,1	65,4
штамм 367 а	+	6,52	181,3	126,6
штамм 375 а	+	6,34	200,34	145,6

Достоверность результатов исследований определена методом дисперсионного анализа [1].

Таким образом, на опыте было 16 делянок, соответственно разброс данных (дисперсия) составил 16 ( 4 варианта в 4-х повторностях) точность полученных данных по определению урожайности определена методом дисперсионного анализа [2]. НСР<sub>05</sub> (наименьшая существенная разность с 95% достоверностью составляет 4,1 ц/га.

Условием успешной интродукции люпина узколистного является инокуляция посевного материала клубеньковыми бактериями.

Клубеньковые бактерии обеспечивали статистически достоверные прибавки урожая сухой массы по сравнению с контролем от 9 до 22,1 ц/га.

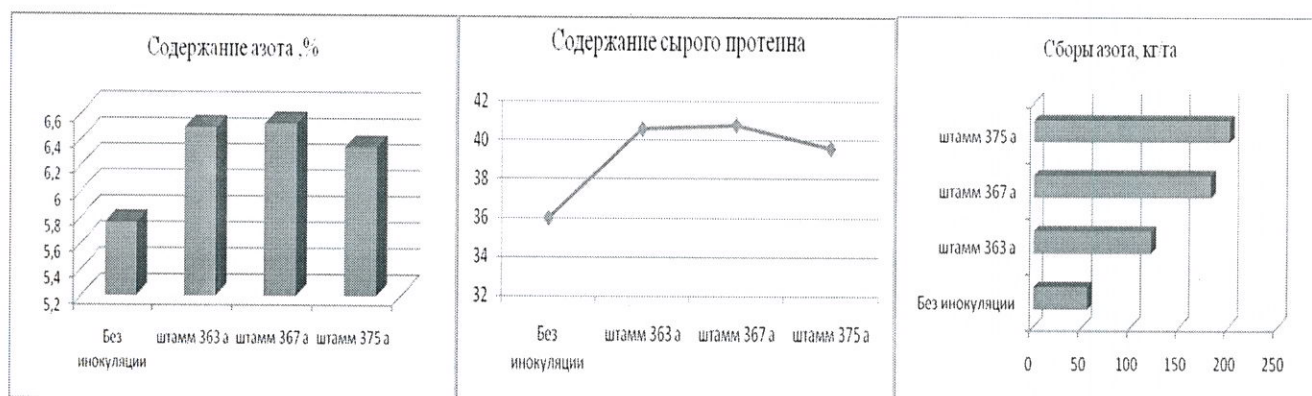
Максимальная урожайность сухой массы 31,6 ц с 1 га в 2017 году была получена при совместной обработке семян симбиотическими азотфиксирующими бактериями штаммов 363а,367а,375а.

Люпин узколистный обеспечил сборы сырого протеина протеина 36 ц с га, При обработке бактериальными препаратами сборы сырого протеина достигали 39-40,8 ц с га.

Азотфиксирующие бактерии обеспечивали статистически достоверные прибавки урожая сухой массы -повышение урожайности по сравнению с контролем при обработке бактериальными препаратами.

Все штаммы клубеньковых бактерий, использованные нами для инокуляции семян люпина, обеспечивали достоверное повышение урожайности семян: превышение показателей урожайности на опытных делянках было выше значения НСР<sub>05</sub>. Статистически доказано только превосходство обработки штаммом 367 над штаммом 363а (разность в урожаях равна 0.03 т/га при НСР<sub>05</sub> равной тоже 0.03 т).

Диаграмма №1 Фиксация азота воздуха в семенах люпина узколистного



При инокуляции семян содержание белка в зерне люпина узколистного достигало уровня 35 %, а сборы кормового высококачественного растительного белка – 510 кг/га.

Таким образом, нами показана эффективность инокуляции семян люпина узколистного эффективными штаммами клубеньковых бактерий.

При работе с клубеньковыми бактериями (и ассоциативными азотфиксаторами) следует

помнить, что в целях предотвращения их гибели микробиологические препараты и обработанные ими семена должны быть надежно защищены от попадания прямых солнечных лучей.

Выводы:

1. Возделывание люпина узколистного позволяет:
  - снизить в севообороте применение химических средств защиты растений;
  - применять почвозащитные способы безплужной обработки почвы после его выращивания;
  - благодаря уникальной способности люпина фиксировать в симбиозе с клубеньковыми бактериями атмосферный азот, он способен без минеральных азотных удобрений не только формировать высокобелковый, экологически чистый урожай, но и оставлять в почве значительные количества азота, используемого последующей культурой, делая безопасным в экологическом отношении два поля севооборота.
2. Все штаммы способствуют достоверному повышению урожайности по сравнению с контролем.
3. Все три штамма клубеньковых бактерий оказывают существенное влияние на урожайность семян. На вариантах с инокуляцией урожайность больше, чем  $НСР_{05} = 4,1$  ц/га.
4. Штаммы 367а и 375а оказывают более существенное воздействие на урожайность люпина узколистного, чем штамм 363а (разность составляет 9,3 и 13,1 ц/га при  $НСР_{05} = 4,1$  ц/га).
5. Штаммы 367а и 375а оказывают одинаковое влияние, т.к. превосходят штамм 375а над 367а всего на 3,8 ц/га, тогда, как  $НСР_{05} = 4,1$  ц/га.
6. Клубеньки на корнях люпина образовались при обработке бактериальными препаратами. На контроле (без инокуляции) корни были «голые»
7. На участках с биологической фиксацией азота урожайность яровой пшеницы и картофеля была на 20% выше контроля и участка с применением минеральных удобрений.

Таким образом, люпин имеет огромный биологический и экологический потенциал, который до настоящего времени полностью не используется.

Литература:

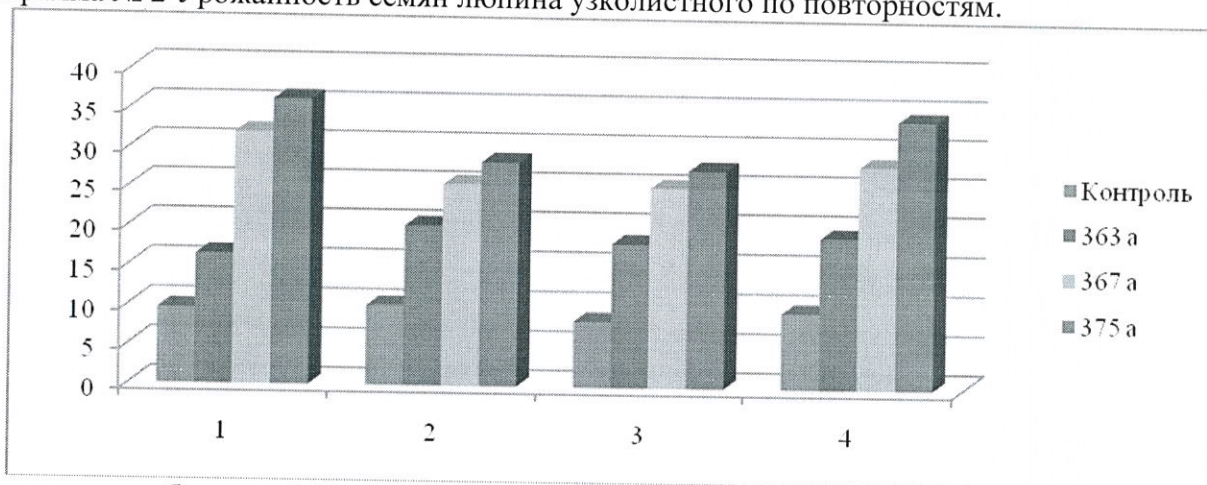
1. Вавилов П.П., Гриценко В.В., Кузнецов В.С. и др. Растениеводство. – М.: Агропромиздат, 1986. – 512 с.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
3. Ласкин П.В., Ласкина Н.Н., Хаитбаев А.Х., Агроэкологические подходы к регулированию продуктивности многолетних трав за полярным кругом (на примере Мурманской области) / База данных «Интеллект». – Мурманск, ЦНТИ, 2003. – 2 с.
4. Ласкин П.В. Рекомендации по практическому применению кормов из люпина в рационах сельскохозяйственных животных. – Брянск: ВНИИ люпина ФГОУ ВПО «Брянская ГСХА», 2009. – 80 с.
5. Ягодин Б.А., Жуков Ю.П., Кобзаренко В.И., Агрохимия. – М.: Мир, 2004. – 584 с.
6. Методика определения массы 1000 зерен - ГОСТ 10842-82

Приложение.

Таблица №3 Урожайность семян люпина узколистного по повторностям.

Вариант	Повторность				$\sum v$	$\sum v^2$	X
	1	2	3	4			
Контроль	9,6	10,1	8,4	9,7	37,8	1428,84	9,5
363 а	16,4	20,2	18,2	19,2	74	5476	18,5
367 а	31,9	25,5	25,3	28,3	111	12321	27,8
375 а	36,2	28,4	27,6	34,2	126,4	15976,96	31,6
$\sum p$	94,1	84,2	79,5	91,4	349,2	35202,8	
$\sum p^2$	8854,81	7089,64	6320,25	8353,96			
$\sum$	30618,66						

Диаграмма № 2 Урожайность семян люпина узколистного по повторностям.



Общее число наблюдений  $N=4*4=16$

$$C = (\sum X)^2 : N = 349,2^2 : 16 = 121940,6 : 16 = 7621,3$$

Корректирующий фактор

$$C_y = \sum X^2 - C = 8893 - 7621,3 = 1271,7$$

$$C_p = \sum p^2 : 4 - C = 30618,7 : 4 - 7621,3 = 7654,7 - 7621,3 = 33,4$$

$$C_v = \sum v^2 : n - C = 35202,8 : 4 - 7621,3 = 8800,7 - 7621,3 = 1179,4$$

$$C_z = C_y - C_p - C_v = 58,9$$

Таблица №4 Результаты дисперсионного анализа

Дисперсия	Сумма квадратов	Степени свободы	Средн. квадрат.	F факт.	F о5
Общая $C_y$	1271,7	15			
Повторений $C_p$	33,4	3			
Вариантов $C_v$	1179,4	3	393,1	60,5	9,3
Остаток ошибки	58,9	9	6,5		

F факт. > F о5, в опыте есть существенная разница ( $H_0$  – нулевая гипотеза, что различий между вариантами не отвергается).

$HC_{p05}$  - наименьшая существенная разность при 5% уровне значимости или 95 % уверенности применяется для полевых опытов.

$$HC_{p05} = t_{05} * S_d = 2,26 * 1,8 = 4,1 \text{ ц}$$

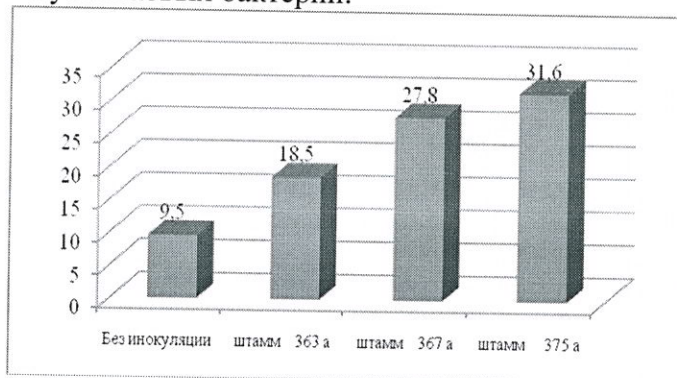
$$S_d = \sqrt{2S^2 : n} = \sqrt{2 * 6,5 : 4} = 1,8 \text{ ц}$$

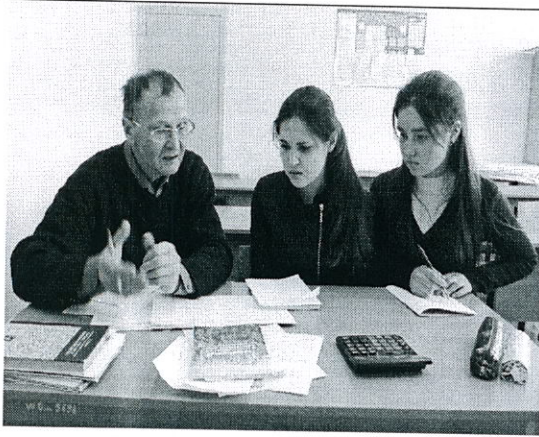
Таблица №5 Урожайность семян люпина узколистного в зависимости от инокуляции различными штаммами клубеньковых бактерий.

Вариант	Урожайность ц/га	Отклонения		
		от контроля	от штамма 363	от штамма 375
Без инокуляции	9,5			
штамм 363 а	18,5	9		
штамм 367 а	27,8	18,3	9,3	
штамм 375 а	31,6	22,1	13,1	3,8

$НСР_{05} = 4,1$  ц/га

Диаграмма №3 Урожайность семян люпина узколистного в зависимости от инокуляции различными штаммами клубеньковых бактерий.





Консультации с научным руководителем Ласкиным П.В. (статистическая обработка данных)



Подготовка почвы к посеву



Посев семян



Посев семян



Рассматриваем клубеньки на корнях люпина



Уборка урожая люпина узколистного



Фаза цветения люпина узколистного



Семена люпина