

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОМИЦЕТОВ *Trichoderma* В БИОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ ЛЕСОПИТОМНИКОВ

© 2006 г. И. Д. Гродницкая, Н. Д. Сорокин

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН,  
660036 Красноярск, Академгородок

E-mail: microlab@akadem.ru

Поступила в редакцию 01. 02. 2005 г.

Получены данные по улучшению почвенных микробоценозов в искусственных экосистемах при использовании микромицетов-интродуцентов *Trichoderma*. Применение биологически активных веществ, выделяемых некоторыми аборигенными штаммами микроорганизмов позволит решать проблемы биоремедиации в конкретном регионе без значительных экономических затрат.

Проблемы, связанные с восстановлением нарушенной окружающей среды вследствие антропогенного (техногенного) воздействия сегодня становятся первоочередными. Применение пестицидов неизбежно приводит к нарушениям экосистемного баланса. Накопление ядохимикатов увеличивает токсичность почв. Особенно это наглядно показано в питомниках, где естественная растительность из почв изымается и преобладает монокультура (Берестецкий и др., 1978; Великанов, Сидорова, 1988).

Регуляция биологических процессов с помощью пестицидов приводит к деградации почв: почвы в питомниках значительно отличаются в худшую сторону по физическим, агрохимическим и биологическим свойствам от почв под лесом, находящихся рядом с питомниками. Ежегодная обработка различными фунгицидами, гербицидами и инсектицидами при систематическом применении производственных доз (6–8 кг/га) (симазин, глифосат) приводит к отрицательному влиянию на динамику содержания нитратного азота, легкоподвижного фосфора и обменного калия в разных слоях почвы (Иванов, 1974). Экологической мишенью становятся микроорганизмы, участвующие в трансформации азота и углерода: небольшие дозы внесения симазина, атразина и зеазина уменьшают активность уреазы и других почвенных ферментов, а также способствуют накоплению фитотоксических форм бактерий и грибов.

В целом, в окультуренных почвах нарастают условия олиготрофности, разрушается гумус, падают общая биологическая активность и плодородие. Вследствие этих нарушений исчезают многие виды микроорганизмов, появляются вакантные ниши, которые занимаются случайными популяциями, что ведет к обеднению микрофлоры и затуханию многих биохимических процессов. Одновременно ослабевает конкуренция и ан-

тагонистическая активность сапротрофной микрофлоры в отношении фитопатогенов, численность популяций которых начинает возрастать. Происходит переход ряда видов сапротрофных микроорганизмов к вынужденному паразитизму (Великанов, Сидорова, 1988; Горленко, 1995). Основными токсинообразующими микроорганизмами становятся сапротрофные микромицеты и бактерии: увеличение их численности в почве приводит к росту ее фитотоксичности (Берестецкий и др., 1978; Мирчинк, 1988). Наибольшее значение в проявлении почвой микробного токсикоза имеют токсинообразующие микроорганизмы, обитающие в ризосфере (Возняковская, 1976; Иларионов и др., 2003). Кроме того, частое применение пестицидов ослабляет иммунитет семян, что также стимулирует инфекционный процесс. Изменение видового разнообразия микроорганизмов в почвах лесных питомников Красноярского края вследствие постоянной их обработки ядохимикатами было показано нами ранее (Якименко, Гродницкая, 1996; Якименко, Гродницкая, 2000).

В связи с этим важной задачей является биоремедиация почвенного покрова, способствующая восстановлению изначальной почвенной микробиоты. Интродукция микроорганизмов в почву является одним из наиболее перспективных современных подходов для улучшения продуктивности почвы, как в сельском, так и в лесном хозяйстве. Эффективным вариантом биоремедиации является биоаугментация, предполагающая внесение в загрязненную почву относительно большого количества специализированных микроорганизмов, способных изменить почвенную микробиоту, и тем самым, улучшить фитосанитарное состояние почвы и семян хвойных в искусственных экосистемах (Иларионов и др., 2003; Якименко, 1992).

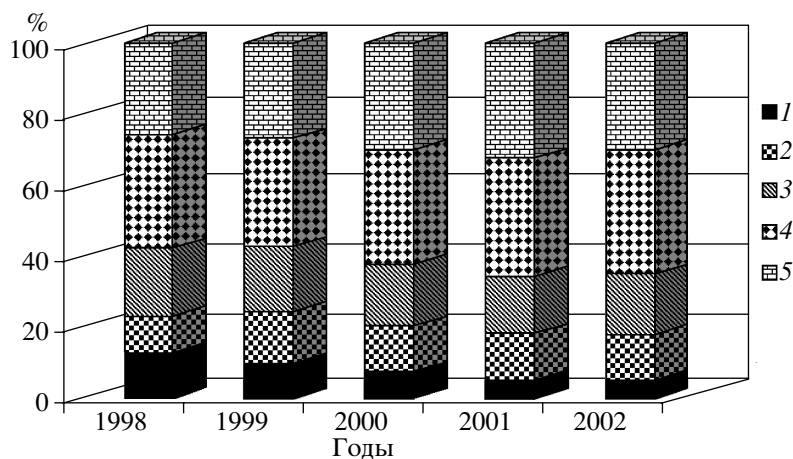


Рис. 1. Изменение численности почвенных микроорганизмов в течение 1998–2002 гг.: 1 – дрожжи; 2 – *Mycobacterium*; 3 – *Bacillus*; 4 – микромицеты; 5 – *Pseudomonas*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На протяжении 1996 – 2002 гг. велось исследование состава почвенной микрофлоры в двух лесопитомниках Красноярского края. Почвенные образцы отбирались на опытных участках, которые систематически обрабатывались различными пестицидами в течение всего вегетационного сезона. Образцы высевали из разведений  $1 : 10^2$ – $1 : 10^3$  на различные питательные среды: МПА (мясо–пептонный агар); СА (сусло–агар); МПА + СА; Чапека (Методы..., 1991). Выделялись наиболее часто встречаемые микроорганизмы и определялось их разнообразие по идентификации до родовой принадлежности (Краткий определитель Берги, 1980; Литвинов, 1967). Также учитывалась частота встречаемости микромицетов *Trichoderma*, обладающих антагонистическими и биотрофными свойствами ко многим почвенным фитопатогенам.

Изучались свойства биологически активных микромицетов *Trichoderma*, позитивных для сеянцев хвойных, с целью определения возможности интродукции их в естественные почвенные микробоценозы. Первоначально были проделаны лабораторные, а затем и полевые опыты с аборигенными штаммами микромицетов и с биопрепаратом “Триходермин”, основанном на комбинации видов грибов *Trichoderma*.

В лабораторных опытах изучалось стимулирующее влияние триходермы на рост и развитие семян сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*), лабораторная всхожесть которых составляла 86%. Семена сосны, обработанные 0.05%-ным раствором  $KMnO_4$  и промытые стерильной водой, замачивали на 30 мин в водной суспензии спор *T. viride*, *T. hamatum*, *T. koningii* (титром  $10^8$ – $10^9$  КОЕ  $мл^{-1}$ ); в качестве контроля служила вода. Обработанные семена проращивали в течение 12 сут на чаш-

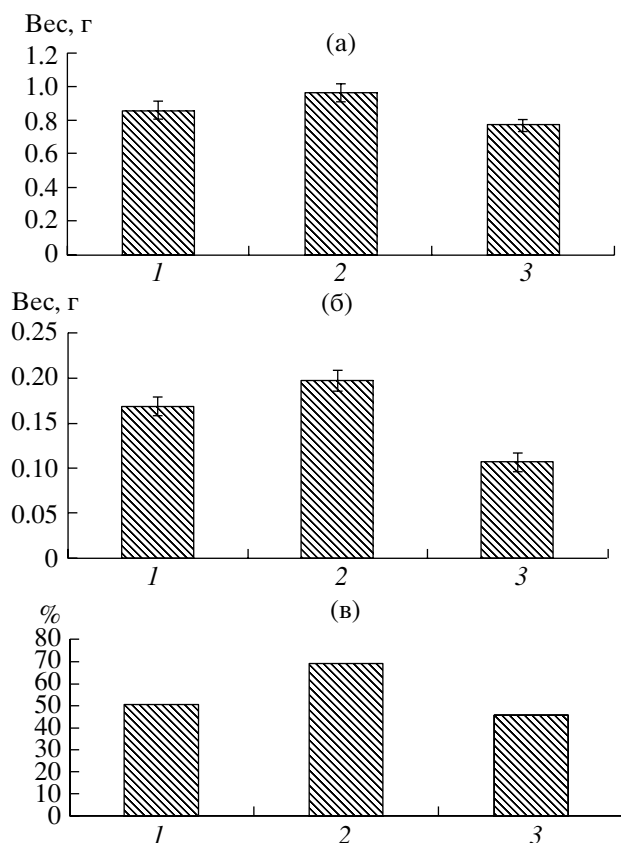
ках Петри по 50 шт. в трехкратной повторности. В конце опыта учитывали количество проростков, их размеры и биомассу (сырой и сухой вес).

С целью подтверждения лабораторных экспериментов исследования были продолжены в естественных условиях: на экспериментальных участках и в лесных питомниках. Для этого семена сосны обыкновенной обрабатывали различными способами: а) обработка семян водной суспензией *Trichoderma viride* титром  $10^9$  КОЕ  $мл^{-1}$  (150 шт. на 1 пм); б) обработка семян сухими спорами биопрепарата (2 г/кг семян и 5 г/кг семян); в) обработка почвы триходермином (2 г/10 л  $H_2O$ ) под посевами семян сосны методом полива.

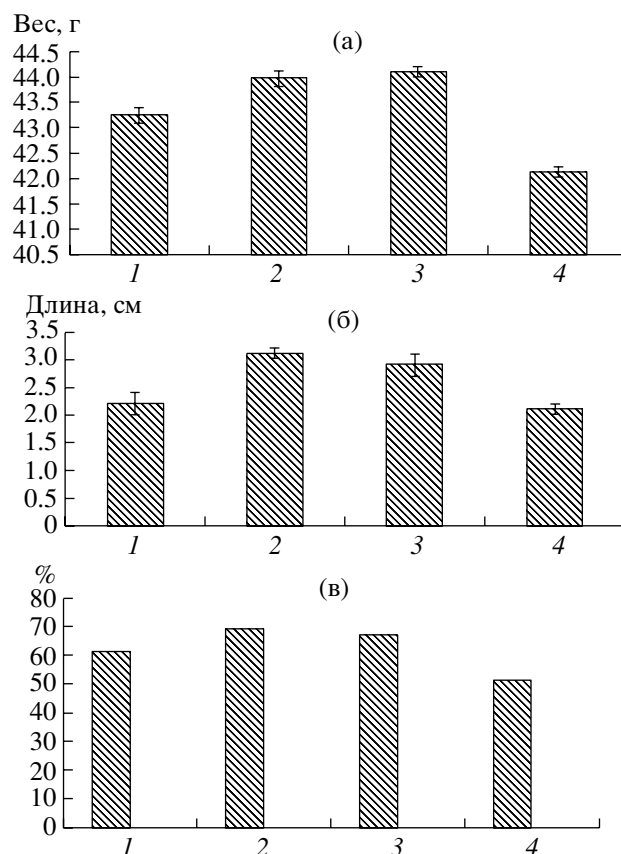
В конце вегетации биометрические показатели опытных сеянцев сравнивали с контрольными по количеству хвоинок в мутовке, длине корневых систем, диаметру корневой шейки, размерам надземной части. Достоверность различий между средними разных вариантов оценивали по критерию Стьюдента. Разность считали достоверной, если критерий, вычисленный из опыта, превышал табличное значение при 95%-ном уровне достоверности (Доспехов, 1985).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате обследований почв питомников для установления их токсичности было отмечено, что в них нарастает численность некоторых патогенных и токсинообразующих почвенных грибов и бактерий, по сравнению с целиной. Основу грибных группировок составляли микромицеты *Penicillium*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Aspergillus*, бактериальных – *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Mycobacterium*, кроме того, заметно снизилась доля почвенных дрожжей (рис. 1). Производимые патогенами вещества вызывают



**Рис. 2.** Влияние *Trichoderma viride* на прорастание сосны обыкновенной: (а) – сырой вес проростков, г; (б) – абсолютно сухой вес проростков, г; (в) – количество проростков в конце опыта, %. Способы обработки: 1 – триходерма, 2 – триходерма +  $KMnO_4$ ; 3 – контроль.



**Рис. 3.** Влияние различных видов *Trichoderma* на прорастание сосны обыкновенной: (а) – биомасса проростков, мг; (б) – длина гипокотыля, см; (в) – количество проростков, %. 1 – *T. hamatum*; 2 – *T. koningii*; 3 – *T. viride*; 4 – контроль.

нарушения фотосинтеза, дыхания, биосинтеза первичных метаболитов и транспорта питательных веществ в сеянцах (Берестецкий и др., 1978; Великанов и др., 1988).

Одновременно отмечено ослабление конкуренции и биологической активности сапротрофной микрофлоры в отношении фитопатогенов. Ранее было показано, что происходит резкое снижение численности видов грибов *Trichoderma*, проявляющих антагонистические и биотрофные свойства в отношении целого ряда фитопатогенов, тогда как возрастает численность некоторых видов *Fusarium* и *Verticillium*, содержание которых в целинной почве значительно ниже (Гродницкая, Якименко, 1996; Якименко, Гродницкая, 2000).

В лабораторных опытах водные суспензии триходеры повышали всхожесть семян сосны обыкновенной от 6.7 до 18%. Комплексная обработка семян сосны 0.05%-ным раствором  $KMnO_4$  и суспензией *T. viride* концентрацией не ниже  $10^8$  КОЕ мл<sup>-1</sup>, позволила получить 69% здоровых

проростков. Количество проросших семян и вес сырой и абсолютно сухой биомассы проростков позволили судить о том, что обработанные изучаемыми штаммами проростки по всем параметрам превышали контрольные (рис. 2).

Кроме того, нами был отмечен и стимулирующий эффект. Обработанные триходермой проростки отличались увеличенными линейными размерами и весом. Так, изоляты грибов *T. koningii* и *T. viride* повышали величину гипокотыля и биомассу сеянцев от 3–4% до 14–15% (рис. 3).

Результаты действия *T. viride* ( $10^9$  КОЕ мл<sup>-1</sup>) на рост и развитие семян хвойных в открытом грунте представлены в таблице, в которой показано, что триходерма повышала грунтовую всхожесть семян сосны и выход жизнеспособных сеянцев в 1.7 раза по отношению к контролю, а также понижала отпад семян и сеянцев с 59 в контроле до 30% в опыте.

Внесение “Триходермина” в почвы питомников, посредством предварительной обработки семян сосны сухим способом, положительно сказа-

Всхожесть, довсходовый и послевсходовый отпад семян и проростков сосны

Вариант	Грунтовая всхожесть, %	Отпад, %	Количество оставшихся семян, %	Отношение к контролю, %	Уровень достоверности, P
Обработка семян водной суспензией <i>Trichoderma viride</i>					
Контроль, H <sub>2</sub> O	56	59	41	–	–
Триходерма, 10 <sup>9</sup> КОЕ мл <sup>-1</sup>	75	30	70	170.7	<95
Обработка семян “Триходермином”					
Контроль	–	38.7	61.3	–	–
2 г/кг семян	–	35.4	65.6	107.0	>95
5 г/кг семян	–	28.6	74.4	116.5	>95
Обработка почвы “Триходермином” под посевами сосны методом полива					
Контроль	14.4	83.4	16.6	–	–
“Триходермин”, 0.2 г/л	36	57.8	42.2	254.5	99.9

лось на росте и сохранности семян хвойных. Из таблицы видно, что увеличение количества препарата повышало конечный выход семян на 16% по сравнению с контролем. Количество семян к концу вегетации при обработке триходермином в соотношении 2 г на 1 кг семян достигало 65.6%, а при обработке в соотношении 5 г на 1 кг семян – до 74.4%, тогда как в контроле этот показатель не превышал 61.3%.

Обработка почвы биопрепаратом “Триходермин” методом полива также увеличивала грунтовую всхожесть семян и снижала послевсходовый отпад проростков сосны. Результаты исследований показали, что выход семян в опыте и контроле различен – 42.2 и 16.6%, соответственно. Довсходовая и послевсходовая гибель семян и проростков в опыте составляла 57.8%, а в контроле – 83.4%; грунтовая всхожесть – 36% в опыте и 14% в контроле (таблица).

Ранее нами было отмечено (Якименко, Гродницкая, 2000), что интродуцированные штаммы грибов рода *Trichoderma* повышали видовое разнообразие почвенных микромицетов и улучшали в целом экологическое состояние питомников.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что применение микроорганизмов-интродуцентов, обладающих высокой биологической активностью, с целью биоаугментации, позволяет значительно улучшить агрохимическое и фитосанитарное состояние почв в искусственных фитоценозах за счет снижения их токсичности, а также существенно увеличить выход жизнеспособных семян.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Берестецкий О.А., Надкречный С.П.* Содержание грибов-продуцентов фитотоксических веществ в почве при бессменном выращивании и в севообороте // Фитотоксические свойства почвенных микроорганизмов. Л.: ВНИИСХМ, 1978. С. 94–104.
- Великанов Л.Л., Сидорова И.И.* Экологические проблемы защиты растений от болезней // Итоги науки и техники. Защита растений. 1988. Т. 6. С. 58–141.
- Возняковская Ю.М.* Взаимоотношения растений с микроорганизмами ризосферы и филлосферы // Агрономическая микробиология. Л.: Колос, 1976. С. 144–179.
- Горленко М.В.* О некоторых направлениях эволюции фитопатогенных грибов // Микология и фитопатология. 1995. Т. 29. Вып. 1. С. 87–94.
- Гродницкая И.Д., Якименко Е.Е.* Агрохимические и микробиологические свойства почвы лесного питомника на юге Красноярского края // *Почвоведение*. № 10. 1996. С. 1247–1253.
- Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта с основами статистической обработки результатов исследований. М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
- Иванов А.И.* Влияние симазина на пищевой режим почвы // Агрохимия. 1974. № 3. С. 113–115.
- Иларионов С.А., Назаров А.В., Калачникова И.Г.* Роль микромицетов в фитотоксичности нефтезагрязненных почв // *Экология*. 2003. № 5. С. 341–346.
- Краткий определитель бактерий Берги / Под ред. Холта Дж. М.: Мир, 1980. 495 с.
- Литвинов М.А.* Определитель микроскопических почвенных грибов. Л.: Наука, 1967. 299 с.

- Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Звягинцева Д.Г. М.: Изд-во МГУ, 1991. 303 с.
- Мирчинк Т.Г. Почвенная микология. М.: Изд-во МГУ, 1988. 220 с.
- Якименко Е.Е., Гродницкая И.Д. Инфекционное полегание сеянцев хвойных в лесных питомниках Красноярского края // Микология и фитопатология. 1996. Т. 30. Вып. 2. С. 56–60.
- Якименко Е.Е., Гродницкая И.Д. Влияние грибов рода *Trichoderma* на почвенные микромицеты, вызывающие инфекционное полегание сеянцев хвойных в лесных питомниках Сибири // Микробиология. 2000. Т. 69. № 6. С. 850–854.
- Якименко Е.Е. Микромицеты почв лесных питомников // Микология и фитопатология. 1992. Т. 26. Вып. 6. С. 480–86.