

ФРАКЦИОННЫЙ СОСТАВ СОЕДИНЕНИЙ НИКЕЛЯ В ПОЧВЕ И ЕГО НАКОПЛЕНИЕ В РАСТЕНИЯХ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ РОСТСТИМУЛИРУЮЩИХ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ НА ЗАГРЯЗНЕННОЙ ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛОМ ПОЧВЕ

В.П. Шабаяев¹, доктор биологических наук, **В.Е. Остроумов**¹, старший научный сотрудник, **И.О. Плеханова**², доктор биологических наук, **В.О. Куликов**², аспирант, **М.П. Волокитин**³, кандидат сельскохозяйственных наук

¹Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, 142290, Пушкино, Московская обл., ул. Институтская, 2
E-mail: vpsh@rambler.ru

²Факультет почвоведения МГУ им. М. В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

³Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290, Пушкино, Московская обл., ул. Институтская, 2

В вегетационном опыте изучено влияние бактерий рода Pseudomonas на фракционный состав соединений никеля в искусственно загрязненной агросерой почве и урожаем яровой пшеницы. Схема опыта включала следующие варианты: без внесения никеля и бактерий; внесение никеля без бактерий; внесение никеля и 20-го штамма бактерии P. fluorescens; внесение никеля и 21-го штамма бактерии P. fluorescens; внесение никеля и 23-го штамма бактерии P. putida 23. Растения выращивали до фазы выхода в трубку при загрязнении почвы NiCl₂·6H₂O в дозе 300 мг Ni/kg на фоне внесения NPK удобрений. Распределение никеля в почве определяли во фракциях, выделенных методом последовательных селективных экстракций. Содержание никеля в растениях после озоления в смеси HNO₃:HClO₄ (2:1) и в почвенных фракциях устанавливали методом эмиссионно-оптической спектрометрии индуктивно-связанной плазмы. Бактерии увеличивали содержания никеля в обменной и специфически сорбированной фракциях, в меньшей мере во фракциях, связанных с органическим веществом и с железистыми минералами, и уменьшали содержание металла в остаточной фракции. Применение бактерий повысило устойчивость растений к повышенной концентрации никеля и увеличило урожай, значительно снижая фитотоксичность тяжелого металла. Бактерии повышали вынос никеля из почвы надземными органами растений, главным образом вследствие увеличения урожая, без изменений или увеличения содержания металла в растениях. Тем самым, бактерии усиливали фитоэкстракцию – очистку почвы от тяжелого металла. Вынос никеля растениями возрастал вследствие увеличения его биодоступности, в основном благодаря обменной и специфически сорбированной фракциям.

FRACTIONAL COMPOSITION OF NICKEL COMPOUNDS IN SOIL AND ITS ACCUMULATION IN PLANTS IN APPLICATION OF GROWTH PROMOTING RHIZOSPHERE BACTERIA ON HEAVY METAL-CONTAMINATED SOIL

V.P. Shabayev¹, **V.E. Ostroumov**¹, **I.O. Plekhanova**², **V.O. Kulikov**², **M.P. Volokitin**³

¹Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Moskovskaya obl., ul. Institutskaya 2
E-mail: vpsh@rambler.ru

²Soil Science Department Moscow State University, 119991, Moskva, Leninskie gory, 1

³Institute Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Moskovskaya obl., ul. Institutskaya 2

Impact of genus Pseudomonas bacteria on fractional composition of nickel compounds in artificially contaminated agro-gray soil and yield of spring wheat was studied in pot experiment. Plants were grown up to booting stage with NiCl₂·6H₂O contamination at a rate of 300 Ni/kg of soil against background of NPK fertilization. Distribution of nickel in soil fractions isolated by the method of successive selective extractions has been established. Nickel content in plants after combustion in mixture of HNO₃:HClO₄ (2:1) and in soil fractions was determined by inductively coupled plasma emission-optical spectrometry. Application of bacteria increased plant resistance to elevated nickel concentration and increased yield, significantly reducing heavy metal phytotoxicity. Bacteria increased nickel content in exchangeable and specifically sorbed fractions and, to a lesser extent, in fractions associated with organic matter and ferruginous minerals, and reduced metal content in residual fraction. Bacteria increased nickel uptake from soil by plant shoots due to increase in yield, without changes or increase in plant metal content. Thus, bacteria increased phytoextraction – cleaning soil from heavy metal. Nickel uptake by plants was increased due to increase in its bioavailability, mainly in exchangeable and specifically sorbed fractions.

Ключевые слова: бактерии Pseudomonas, яровая пшеница (Triticum aestivum L.), агросерая почва, NiCl₂·6H₂O, фракции Ni

Key words: bacteria Pseudomonas, spring wheat (Triticum aestivum L.), agro-gray soil, NiCl₂·6H₂O, Ni fractions

В последние годы исследователи много внимания уделяют изучению стимулирующих рост растений ризосферных бактерий (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) для повышения продуктивности

сельскохозяйственных культур [1, 2], а также для ремедиации загрязненных тяжелыми металлами (ТМ) почв [3, 4, 5], включая никель (Ni) [6]. Представители PGPR рода Pseudomonas привлекают особое внимание

благодаря широкой распространенности и присущим им полезным для растений свойствам [7, 8]. Созданы биопрепараты на основе бактерий рода *Pseudomonas*, позволяющие увеличить урожай и минимизировать применение агрохимикатов [9]. Использование PGPR рода *Pseudomonas* существенно уменьшало фитотоксичность Ni и повышало устойчивость различных растений к токсическому действию ТМ [6, 10, 11]. В литературе имеются многочисленные данные, свидетельствующие о значительной стимуляции роста растений под влиянием PGPR, однако исследований, направленных на изучение растительных и в особенности почвенных механизмов ремедиации загрязненных ТМ почв, в том числе Ni, под влиянием этих бактерий, проведено недостаточно.

Цель исследований – изучение влияния внесения PGPR рода *Pseudomonas* на фракционный состав соединений Ni в почве, урожай яровой пшеницы и накопление в растениях Ni при выращивании на агросерой почве, загрязненной ТМ.

Методика. Эксперименты проводили при выращивании растений сорта яровой пшеницы (*T. aestivum* L.) Злата (Московский НИИСХ «Немчиновка») в вегетационном опыте при искусственном загрязнении агросерой почвы (Luvisol) юга Московской области водорастворимым соединением Ni. Использовали пахотную, среднесуглинистую агросерую почву (слой 0...20 см). В сосудах диаметром 10 см и высотой 11 см, содержащих 800 г почвы, выращивали по 10 растений в течение 26 дней до фазы трубкования при внесении 300 мг Ni/kg почвы, что в 7,5 раз превышает ориентировочную допустимую концентрацию (ОДК) для аналогичных почв. Схема опыта включала следующие варианты: без внесения никеля и бактерий – контроль; внесение никеля без бактерий; внесение никеля и 20-го штамма бактерий *P. fluorescens*; внесение никеля и 21-го штамма бактерий *P. fluorescens*; внесение никеля и 23-го штамма бактерий *P. putida*. Использованные микроорганизмы стимулировали рост и повышали урожай зерновых, бобовых, корнеплодных культур и ярового рапса [12]. Семена перед посевом стерилизовали 10%-ным раствором гипохлорита натрия, затем промывали стерильной водой. При посеве их раскладывали на почве и инокулировали водными суспензиями чистых культур бактерий в водопроводной воде из расчета 10^6 на растение (10 мл суспензии на сосуд) и засыпали 3 см слоем почвы. В варианте без использования бактерий применяли аналогичным образом автоклавируемые бактериальные суспензии. В почву за 10 дней до посева семян, вносили $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ в виде раствора, на фоне внесения NPK солей из расчета по 100 мг каждого элемента на 1 кг почвы в виде азотнокислого аммония, двухзамещенного

фосфорнокислого калия и сернокислого калия, все соли были квалификации не ниже «хч» (Реахим, Россия). Влажность почвы в сосудах в течение вегетации растений поддерживали поливами на уровне не ниже 60 % полной полевой влагоемкости.

Вегетативную массу (листья и стебли) после срезания растений высушивали при 70 °С и озоляли (0,5 г) в смеси концентрированных кислот $HNO_3:HClO_4$ (2:1). Соединения Ni в почве фракционировали методом последовательных селективных экстракций [13]. Выделяли следующие фракции Ni: водорастворимую, обменную (экстрагент – $Ca(NO_3)_2$) специфически сорбированную, связанную с карбонатами (CH_3COOH), связанную с органическим веществом ($K_4P_2O_7$) и связанную с железистыми минералами (реактив Тамма). Содержание Ni в остаточной фракции, прочно связанной с глинистыми минералами, определяли по разности между внесенным в почву количеством ТМ и его суммой во фракциях, выделенных перечисленными экстрагентами. Содержание Ni в почвенных фракциях и в растениях определяли методом эмиссионно-оптической спектроскопии индуктивно-связанной плазмы на спектрометре ICP OES Optima 5300 DV (Perkin Elmer, США). Используя функцию F.TEST статистического пакета MS Excel 2010, оценивали уровень значимости различий между контролем и опытными данными, который всегда был не ниже 95 %. Статистические ошибки определений не превышали 15 %.

Результаты и обсуждение. Анализ распределения соединений Ni в загрязненной почве показал его присутствие во всех выделенных фракциях (табл. 1). Вне зависимости от применения бактерий в водорастворимой фракции содержалось около 3 % от внесенного количества Ni. Основная его часть была сосредоточена в остаточной фракции, связанной с глинистыми минералами, составляя по вариантам 44...57 % от внесенного количества. В модельном эксперименте при внесении $NiNO_3$ в дерново-подзолистую почву и чернозем Ni был представлен во всех фракциях, выделенных используемым методом, что объясняется достаточно высоким средством этого элемента ко всем основным почвенным компонентам, вне зависимости от типа почв [14]. Фракционный состав Ni в почвах отличался значительным преобладанием остаточной фракции над подвижными [14, 15]. Остаточный Ni был преобладающей фракцией в аллювиальных почвах и достигал 64 % от валового содержания ТМ [16].

Внесение бактерий оказывало существенное влияние на распределение Ni в почве, за исключением водорастворимой фракции. Под воздействием бактерий после проведения учета урожая было обнаружено максималь-

Табл. 1. Фракционный состав соединений Ni в почве

Вариант	Фракции Ni в почве*					
	водорастворимая	обменная	специфически сорбированная	связанная		
				с органическим веществом	с железистыми минералами	с глинистыми минералами (остаточная)
Ni без внесения бактерий	<u>9</u> 3,0	<u>32</u> 10,7	<u>25</u> 8,3	<u>25</u> 8,3	<u>38</u> 12,7	<u>171</u> 57,0
Ni + <i>P. fluorescens</i> 20	<u>9</u> 3,0	<u>56</u> 18,7	<u>36</u> 12,0	<u>28</u> 9,3	<u>40</u> 13,3	<u>131</u> 43,7
Ni + <i>P. fluorescens</i> 21	<u>10</u> 3,3	<u>71</u> 23,7	<u>40</u> 13,3	<u>32</u> 10,7	<u>49</u> 16,3	<u>98</u> 32,7
Ni + <i>P. putida</i> 23	<u>11</u> 3,7	<u>50</u> 16,7	<u>29</u> 9,7	<u>31</u> 10,3	<u>41</u> 13,7	<u>138</u> 46,0

*в числителе – мг/кг почвы, в знаменателе – % от внесенного количества.

ное в опыте увеличение содержания ТМ в обменной фракции и в специфически сорбированной или связанной с карбонатами фракции, относительно контроля, соответственно в 1,6...2,2 и в 1,2...1,6 раза. Доля Ni в обменной фракции возросла с 11 до 17...24%, в специфически сорбированной – с 8 до 13 %. Эти закономерности были выражены в наибольшей степени при внесении *P. fluorescens* 21. Под влиянием этой бактерии также больше всего (в 1,3 раза) повысилось содержание Ni во фракциях, связанных с органическим веществом и с железистыми минералами. В вариантах с *P. fluorescens* 20 и *P. putida* 23 величины этих показателей не изменились или изменились незначительно. При внесении всех бактерий доля Ni во фракциях, связанных с органическим веществом и железистыми минералами, увеличилась менее значительно, соответственно с 8 до 11% и с 13 до 16 % от внесенного количества. Доля ТМ в остаточной фракции уменьшилась с 57 % в контроле до 33...46 % при использовании бактерий. В варианте с *P. fluorescens* 21 обнаружено минимальное в опыте содержание Ni в остаточной фракции вследствие наибольшего нахождения ТМ в подвижных фракциях, за исключением водорастворимой. В вариантах с *P. fluorescens* 20 и *P. putida* 23 в остаточной фракции содержалось 44...46 % Ni. Уменьшение доли Ni в остаточной фракции при ее увеличении в обменной и в меньшей степени в специфически сорбированной фракции с ростом количества внесенного NiNO₃ в почву отмечали и ранее [14]. Повышение содержания Ni в составе относительно подвижных обменной и специфически сорбированной фракций при внесении исследуемых бактерий рода *Pseudomonas*, вероятно, можно объяснить продуцированием бактериальных сидерофоров, которые образуют растворимые комплексы с Ni [17]. Бактериальные сидерофоры оказывают влияние на подвижность в почве и биодоступность металлов [18].

При загрязнении почвы Ni установлено существенное ингибирование роста яровой пшеницы в фазе трубкования (табл. 2). Это выразилось в уменьшении более чем вдвое массы вегетативных органов (суммы листьев и стеблей), относительно варианта без загрязнения ТМ и бактериальных инокуляций. Использование всех бактерий уменьшало токсическое действие ТМ на растения и стимулировало их рост в загрязненных условиях. При внесении *P. fluorescens* 20 вегетативная масса растений, подвергнутых Ni стрессу, была более чем в полтора раза выше, чем в варианте с загрязнением ТМ без бактериальных инокуляций. При этом растения, инокулированные

P. fluorescens 21 и *P. putida* 23, формировали на 44...47 % большую вегетативную массу.

Внесение бактерий *P. fluorescens* 20 не оказало влияния на содержание Ni в вегетативной массе. В варианте с *P. fluorescens* 21 величина этого показателя возросла на 28 %, с *P. putida* 23 – на 49 %. При загрязнении почвы установлено значительное увеличение выноса Ni (в мкг/сосуд) вегетативной массой. Использование бактерий способствовало дальнейшему его росту в 1,7...2,3 раза, по сравнению с вариантом с загрязнением Ni без бактерий, в наибольшей степени – при инокуляции *P. putida* 23. Под влиянием бактерий *P. fluorescens* 20 вынос Ni повысился вследствие увеличения массы вегетативных органов, без существенных изменений содержания ТМ. При применении *P. fluorescens* 21 и *P. putida* 23 накопление Ni возрастало вследствие повышения как массы растений, так и содержания в них Ni. Увеличение урожайности и выноса Ni из загрязненной почвы вегетативными органами растений в фазе выхода в трубку при внесении бактерий свидетельствует о том, что, с одной стороны, их использование повышает устойчивость растений к токсическому действию Ni, с другой – усиливает фитоэкстракцию ТМ и, следовательно, способствует ремедиации загрязненной почвы. Ранее было установлено, что эффективность фиторемедиации в условиях загрязнения ТМ можно усилить использованием стимулирующих рост растений бактерий, которые увеличивают растворимость и биодоступность ТМ вследствие образования сидерофоров, органических кислот и других соединений [19]. Большее накопление Ni в растениях при внесении бактерий, а, следовательно, усиление фитоэкстракции, вероятно, было обусловлено увеличением биодоступности ТМ вследствие увеличения его содержания в подвижных, прежде всего, в обменной и специфически сорбированной фракциях. Количество Ni в обменной форме оказывало наибольшее влияние на содержание ТМ в растениях люпина и овса [20].

Выводы. Внесение PGPR рода *Pseudomonas* усилило ремедиацию загрязненной Ni почвы. Внесение бактерий повысило устойчивость растений яровой пшеницы к повышенным концентрациям Ni и увеличило массу растений, значительно уменьшая фитотоксичность ТМ. Применение бактерий повысило вынос никеля надземными органами растений из почвы, тем самым, усилило фитоэкстракцию – очистку почвы от ТМ. Применение бактерий увеличило содержание Ni в почве в обменной и специфически сорбированной фракциях, в меньшей мере во фракциях, связанных с органическим веществом и с железистыми минералами, и уменьшило содержание металла в остаточной фракции. Повышение накопления Ni растениями при внесении бактерий соответствовало увеличению подвижности металла в почве, в основном его содержания в составе обменной и специфически сорбированной фракций.

Литература

1. *Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. Review article / R. Backer, J.S. Roken, G. Ilangumaran, et al. // Front. Plant Sci., 23 October. 2018. URL: <http://www.mdpi.com/2223-7747/12/3/629> (дата обращения: 20.02.2023). doi: 10.3389/fpls.2018.01473.*
2. *Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture / G. Gupta, S.S. Parihar, N.K. Ahirwar, et al. // Journal of Microbial and Biochemical Technology.*

Табл. 2. Урожай яровой пшеницы и вынос Ni растениями

Вариант	Вегетативная масса, г/сосуд	Содержание Ni в растениях, мг/кг	Вынос Ni растениями, мкг/сосуд
Без внесения Ni и бактерий – контроль	2,44	8	20
Ni без внесения бактерий	1,20	254	305
Ni + <i>P. fluorescens</i> 20	2,00	265	530
Ni + <i>P. fluorescens</i> 21	1,73	325	562
Ni + <i>P. putida</i> 23	1,76	395	695
НСР ₀₅	0,37		91

2015. Vol. 7. No. 2. P. 96–102. doi: 10.4172/1948-5948.1000188
3. Review paper: Plant growth promoting microorganisms helping in sustainable agriculture: current perspectives / D. Mitra, S. Anđjelković, P. Panneerselvam, et al. // *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*. 2019. Vol. 7. No. 2. P. 50–74.
 4. Phytoremediation of heavy metals contaminated soil using plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A current perspective / A. Handsa, V. Kumar, A. Anshumali, et al. // *Recent Research in Science and Technology*. 2014. Vol. 6. No. 1. P. 131–134.
 5. *Microbes for Sustainable Development and Bioremediation* / Eds Chandra R., Sobti R.C. Boca Raton: CRC Press. 2020. 386 p. doi: 10.1201/9780429275876
 6. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas* в современных агробиотехнологиях / Т.О. Анохина, Т.В. Сиунова, О.И. Сизова и др. // *Аэрохимия*. 2018. № 10. С. 54–66. doi: 10.1134/S0002188118100034.
 7. Dorjey S., Dolkar D., Sharma R. Plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas*: A review // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2017. Vol. 6. No. 7. P. 1335–1344. doi: 10.20546/ijcmas.2017.607.160.
 8. Pattnaik S., Mohapatra B., Gupta A. Plant growth-promoting microbe mediated uptake of essential nutrients (Fe, P, K) for crop stress management: microbe-soil-plant continuum. Review article // *Frontiers in Agronomy*. Vol. 09. August. 2021. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fagro.2021.689972/full> (дата обращения 12.10.2022). doi: 10.3389/fagro.2021.689972.
 9. Novel bioformulations developed from *Pseudomonas putida* BSP9 and its biosurfactant for growth promotion of *Brassica juncea* (L.) / I. Mishra, T. Fatima, D. Egamberdieva, et al. // *Plants*. 2020. Vol. 9. No. 10. 1349. <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/10/1349> (дата обращения: 22.02.2023). doi: 10.3390/plants9101349.
 10. Ma Y., Rajkumar M., Freitas H. Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPR from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica* spp. // *Chemosphere*. 2009. Vol. 75. No. 6. P. 719–725. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.056
 11. Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants-effects on plant growth and Ni uptake / Y. Ma, M. Rajkumar, Y. Luo, et al. // *Journal of Hazardous Materials*. 2011. Vol. 195. P. 230–237. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.034
 12. Шабает В.П. Микробиологическая азотфиксация и рост растений при внесении ризосферных микроорганизмов и минеральных удобрений // *Почвенные процессы и пространственно-временная организация почв*. М.: Наука, 2006. С. 195–211.
 13. Теория и практика химического анализа почв / Под ред. Л.А. Воробьевой. М.: ГЕОС, 2006. 400 с.
 14. Ладонин Д.В. Формы соединений тяжелых металлов в техногенно-загрязненных почвах. М.: Издательство Московского университета, 2019. 312 с.
 15. Ладонин Д.В., Карпунин М.М. Фракционный состав соединений никеля, меди, цинка и свинца, загрязненных оксидами и растворимыми солями металлов // *Почвоведение*. 2011. № 8. С. 953–965.
 16. Chemical fractions and bioavailability of nickel in alluvial soils / M. Barman, S.P. Datta, R.K. Rattan, et al. // *Plant, Soil and Environment*. 2015. Vol. 61. No. 1. P. 17–22. doi: 10.17221/613/2014-PSE.
 17. Zawadzka A.M., Paszczyński A.J., Crawford R.L. Transformations of toxic metals and metalloids by *Pseudomonas stutzeri* strain KC and its siderophore pyridine-2,6-bis (thiocarboxylic acid) // *Advances in Applied Bioremediation (Soil Biology 17)* / Eds. Singh A., Kuhad R.C., Ward O.P. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. P. 221–238. doi: 10.1007/978-3-540-89621-0_12.
 18. Mishra J., Singh R., Arora N. K. Alleviation of heavy metal stress in plants and remediation of soil by rhizosphere microorganisms // *Frontiers in Microbiology*. 2017. Vol. 8. URL: <http://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01706/full>. (дата обращения: 15.11.2022). doi: 10.3389/fmicb.2017.01706.
 19. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review / A. Ullah, S. Heng, M.F.H. Munis, et al. // *Environmental and Experimental Botany*. 2015. Vol. 117. P. 28–40. doi: 10.1016/j.envexpbot.2015.05.001.
 20. Jakubus M., Graczyk M. Availability of nickel in soil evaluated by various chemical extractants and plant accumulation // *Agronomy*. 2020. Vol. 10. No. 11. 1805. URL: [http://www.mdpi.com/2073.4395/10/11/1805](http://www.mdpi.com/2073-4395/10/11/1805). (дата обращения: 20.02.2023). doi: 10.3390/agronomy10111805.

Поступила в редакцию 03.10.2022

После доработки 23.02.2023

Принята к публикации 09.03.2023