

Влияние на някои био-инокуланти (дъждовни червеи и азотфиксиращи бактерии) върху ризосферната микрофлора на люцерна

Костадинка Недялкова, Галина Петкова, Христо Вълчовски, Радка Донкова

Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията „Н. Пушкиarov”, София

E-mail: k_ned@yahoo.com

Резюме

Въздействието на био-инокулантите върху почвената среда е слабо проучено у нас. Настоящата работа се основава на пионерно изследване с дъждовни червеи в съдов опит с люцерна на Излужена канелена горска почва. В допълнение към основната цел си поставихме задача да установим влиянието на инокулацията с червеи от трите екологични групи и азотфиксиращи бактерии върху микрофлората в ризосферната почва. Заложени са самостоятелни инокулации с ендегик, анесик и епигеик червеи и със симбиотични азотфиксиращи бактерии *Rhizobium meliloti* щам 116. Включени са и смесени инокулации с червеи от трите екологични групи и с червеи от трите групи+ *Rhizobium meliloti* 116. Извършени са микробиологични анализи на проби от ризосферна почва в началото на опита (първи откос на надземната маса) и в края (четвърти откос). Числеността на микроорганизмите е представена като брой на колонии-образуващите единици на грам абсолютно суха почва (CFU/g). Установено е, че био-инокулантите оказват подчертан положителен ефект върху броя на хетеротрофните бактерии, както в началото, така и в края на опита. Въздействието върху актиномицетите, микроскопичните гъби и целулозоразлагащите микроорганизми е специфично в зависимост от етапа на изследването, но като цяло, преобладава тенденция към понижаване на числеността им. От самостоятелните инокулации с дъждовни червеи доказан положителен ефект върху повечето групи (хетеротрофни бактерии, микроскопични гъби и целулозоразлагащи микроорганизми) имат ендегик червеите. Двете смесени инокулации с червеи от трите екологични групи повишават общата биологична активност на почвата в края на опита.

Ключови думи: инокулация, дъждовни червеи, *Rhizobium meliloti*, люцерна, почвена микрофлора

Influence of bio-inoculants (earthworms and nitrogen-fixing bacteria) on rhizosphere microflora of alfalfa

Kostadinka Nedyalkova, Galina Petkova, Hristo Valchovski and Radka Donkova

Institute of Soil Science, Agrotechnologies and Plant Protection “N. Poushkarov”, Sofia

E-mail: k_ned@yahoo.com

Abstract

Nedyalkova, K., Petkova, G., Valchovski, H., Donkova, R. (2019). Influence of bio-inoculants (earthworms and nitrogen-fixing bacteria) on rhizosphere microflora of alfalfa, *Bulgarian Journal of Soil Science, Agrochemistry and Ecology*, 53(1), 27-34

The impact of bio-inoculants on soil environment is insufficiently studied in our country. The present work is based on a pioneer investigation on earthworm inoculation in Chromic-Vertic Luvisol in pot experiment with alfalfa. In addition to the main subject, we aimed to study the influence of inoculation with the three main ecological groups of Lumbricidae and with nitrogen-fixing bacteria on rhizosphere microflora of alfalfa. Single inoculations with endogeic, anecic and epigeic earthworms, and with the symbiotic nitrogen-fixing bacteria *Rhizobium meliloti* strain 116 were performed. Mixed inoculation with endogeic, anecic and epigeic individuals, and another with endogeic, anecic and epigeic earthworms+ *Rhizobium meliloti* 116 were also set. Analyses of rhizosphere soil were made at the beginning of the experiment (first alfalfa cut) and at the end (fourth alfalfa cut). Microbial counts were presented as CFU/g soil. It was found that bio-inoculants had markedly positive effect on the amount of heterotrophic bacteria at the beginning, as well as at the end of the experiment. Inoculation impact on the amount of actinomycetes, microscopic fungi and cellulolytic microorganisms in the investigated stages was characterized by specificity but, in general, a decreasing trend prevailed. Amongst the single earthworm inoculations, endogeic earthworms showed significantly positive effect on most microbial groups (heterotrophic bacteria, microscopic fungi and cellulolytic microorganisms). Both mixed inoculations increased basal soil respiration at the end of the experiment.

Key words: inoculation, earthworms, *Rhizobium meliloti*, alfalfa, soil microflora

Инокулацията на почвата с полезни организми влияе положително върху почвеното плодородие и добивите от културите. Микробиалните инокуланти повишават усвоимостта на хранителни елементи (Petkova et al., 2018) и устойчивостта на растенията към патогени. Дъждовните червеи подобряват структурата, въздушния и воден режим на почвата, ускоряват разлагането на растителните остатъци, с което влияят благоприятно върху храненето и развитието на растенията (Lavelle et al., 2004). Приложението на био-инокуланти е особено подходящо при биологичните системи на земеделие, където основната цел е получаване на екологично чиста растителна продукция.

През последните десетилетия се увеличиха изследванията във връзка с потенциалния ефект на био-инокулантите върху почвената екосистема. При инокулацията се въвеждат полезни организми във висока концентрация

в почвата, което неминуемо се отразява върху микрофлората и микробиологичните процеси. В зависимост от начина на приложение, ефектът върху почвените съобщества може да бъде краткотраен или преходен, а в някои случаи и дълготраен (Trabelsi and Mhamdi, 2013).

По данни на някои автори инокулантите предизвикват изменения в броя и състава на таксономичните групи микроорганизми (Bisht et al., 2003; Trabelsi and Mhamdi, 2013). Schwieger and Tebbe (2000) установяват, че инокулацията на люцерна с азотфиксиращите бактерии *Sinorhizobium meliloti* оказва влияние върху бактериалното разнообразие в ризосферата - намалява броя на γ -протеобактериите и повишава този на α -протеобактериите. В съдов експеримент с аспарагус, патладжан и домати Elmer (2009) инокулира почвата с червеи от вида *Lumbricus terrestris* и установява повишение на количеството на актиномицетите

и флуоресцентните псевдомонади (бактерии) в ризосферната почва на всички растения.

В нашата страна въздействието на инокулантите върху почвената среда е слабо проучено. Неотдавна бе проведено пионерно изследване с дъждовни червеи и бе установен положителен ефект от инокулацията върху почвената структура и биомасата на люцерна в условията на съдов опит (Valchovski et al., 2018). В настоящата работа представяме данни за влиянието на инокулацията върху местната микрофлора.

Целта на изследването бе да се проучи ефекта от интродукцията на дъждовни червеи и симбиотични азотфиксиращи бактерии в почвата върху основните таксономични групи микроорганизми и биологичната активност в ризосферата на люцерна.

Материали и методи

Изследването е проведено през 2017 г. с Излужена канелена горска почва от кв. Челопечене (Софийско), взета от повърхностния слой (0-20 cm). Почвата се характеризира със следните агрохимични показатели: хумус – 1,61 %; минерален азот – 8,6 mg/kg; подвижен фосфор (P_2O_5) – 13,5 mg/100 g; подвижен калий (K_2O) – 23,0 mg/100g; pH (H_2O) – 6,1. След изсушаване и хомогенизиране почвата е разпределена в съдове от 10 L. След това е добавен оборски тор (25 g/L) и е навлажнена до 70% ППВ. На повърхността на почвата, в центъра, са поставени 250 g оборски тор за подхранване на дъждовните червеи. Около оборския тор са засети семена на люцерна (*Medicago sativa*, L.), сорт „Плевен 6“. Предварително са събрани червеи от трите екологични групи от почви от Софийското поле и са внесени по 6 индивида на съд. Заложени са следните варианти, всеки в трикратно повторение: 1) Контрола (без инокулация); 2) Инокулация с ендегични червеи (*Aporrectodea rosea*, *Aporrectodea caliginosa* and *Octolasion lacteum*); 3) Инокулация с анесик червеи (*Lumbricus terrestris*); 4) Инокулация с епигейк червеи (*Eisenia fetida*); 5) Смесена инокулация с ендегич, анесик и епигейк червеи;

6) Смесена инокулация - ендегич, анесик и епигейк червеи+азотфиксираща бактерия *Rhizobium meliloti* щам 116; 7) Инокулация с *Rhizobium meliloti* щам 116. Бактериалната инокулация на семената във варианти 6 и 7 е извършена със суспензия с титър 1.108 cells/ml.

Почвени проби от ризосферата на люцерната (0-10 cm дълбочина) са изследвани в периода на цъфтеж на растенията в началото (първи откос на надземната маса) и в края на опита (четвърти откос). Количеството на основните групи микроорганизми е определено върху селективни агарови среди и е представено като брой на колонии-образуващите единици на грам абсолютно суха почва (CFU/g). Хетеротрофните бактерии са отчетени на месо-пептонна среда, актиномицетите – на скорбяло-амонячна среда, микроскопичните гъби – на среда на Чапек и целулозоразлагащите микроорганизми – на среда на Хътчинсон (Grudeva et al., 2007). Продукцията на въглероден диоксид като показател за общата биологична активност на почвата е определена чрез инкубация в затворени съдове (Alef, 1995) в края на експеримента. Статистическата обработка на данните включва определяне на стандартното отклонение между повторенията на вариантите (STATGRAPHICS. Plus 2.1).

Резултати и обсъждане

От литературни източници е известно, че червеите оказват влияние върху популационната плътност, разнообразие, структура и активност на почвената микрофлора, което се проявява по различен начин и в различна степен в зависимост от условията на средата (Brown, 1995). Вследствие на дейността на червеите – хранене, прокаране на ходове, отделяне на слюз и копролити настъпват физико-химични и биологични изменения на почвата. В зависимост от способността да се адаптират към тези промени, числеността на едни организми се увеличава, а на други намалява. Една от причините за временно понижаване на числеността на микроорганизмите може да бъде селективния

подбор на някои микробиални видове като хранителен източник за червеите. Различните видове червеи могат да въздействат по различен начин върху микрофлората в зависимост от вида, количеството и състава на органичните вещества, почвения тип и сезона.

В нашето изследване също е установено специфично въздействие на приложените инокулации върху микроорганизмите. В началото на опита броят на хетеротрофните бактерии се увеличава трикратно при самостоятелните инокулации с епигейк червеи и с азотфиксиращите бактерии *Rh. meliloti* 116, и 1,6-1,8 пъти при двете смесени инокулации (фиг. 1). В края на опита броят на хетеротрофните бактерии се запазва по-висок в почти всички инокулирани варианти. Установено е трикратно увеличение спрямо контролата при самостоятелната инокулация с ендегейк червеи и смесената инокулация с трите групи червеи. При самостоятелната инокулация с *Rh. meliloti* 116 броят на бактериите се повишава 2,5 пъти, а при анесик червеите и смесения вариант на трите групи червеи + *Rh. meliloti* 116 – 1,7 пъти (фиг. 1). Данните от настоящото изследване потвърждават резултатите на други автори. Lv et al. (2016) установяват, че червеите променят структурата на микробиалното съобщество в почвата в полза на бактериите, които стават доминираща група. Бактериите се размножават в храносмилателния тракт и се отделят в много по-голямо количество с копролитите, докато голяма част от видовете гъби не оцеляват и количеството им се понижава.

Самостоятелно внесените симбиотични азотфиксиращи бактерии променят почвената среда пряко в качеството си на хетеротрофни обитатели на почвата. Освен това те влияят и косвено чрез взаимодействие с корените при образуване на грудките, промяна на вида и количеството на абсорбираните хранителни елементи и на отделяните от корените метаболити (Nyoki and Ndakidemi, 2018).

Количеството на актиномицетите се повишава в началото на опита при самостоятелните инокулации с епигейк червеи и с азотфиксиращите бактерии *Rh. meliloti* 116, както и при смесената

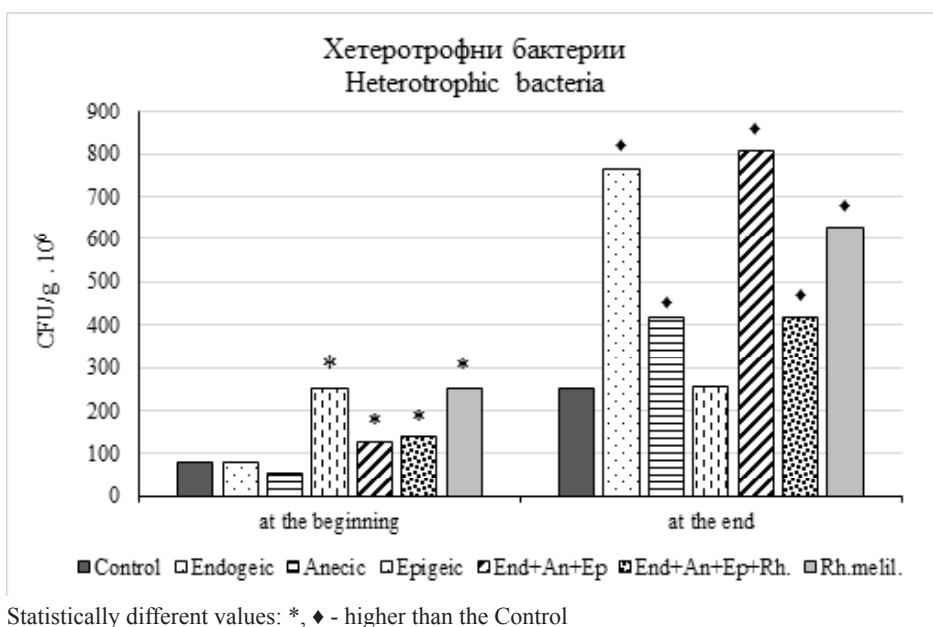
инокулация на трите групи червеи + *Rh. meliloti* 116. В края на опита броят им се повишава многократно в сравнение с началото. Спрямо контролата актиномицетите намаляват 2-4 пъти във всички инокулирани с червеи варианти (фиг. 2).

Броят на микроскопичните гъби в началото на опита не се променя чувствително под влияние на инокулациите, освен във варианта с ендегейк червеи, където е установено понижение. В края на опита самостоятелните инокулации с червеите показват тенденция на повишение на броя на микроскопичните гъби, която е доказана във варианта с ендегейк червеи. При двете смесени инокулации и при самостоятелната инокулация с *Rh. meliloti* 116 броят им се понижава почти два пъти (фиг. 3).

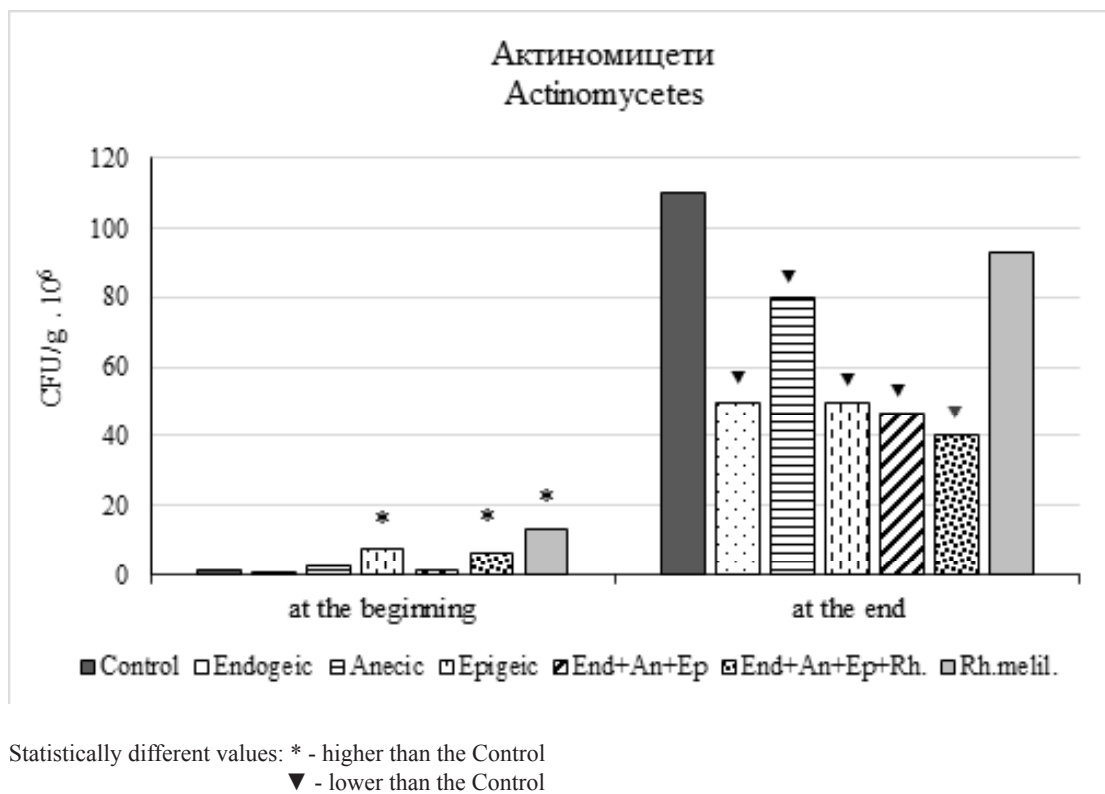
При целулозоразлагащите микроорганизми в началния етап се наблюдава тенденция на намаляване на общия брой спрямо контролата, което е най-силно изразено при смесената инокулация червеи + *Rh. meliloti* 116 и при самостоятелната инокулация с *Rh. meliloti* 116. Количеството им се повишава само във варианта с ендегейк червеи. В края на опита броят на целулозоразлагащите микроорганизми намалява с 1-2 порядъка в сравнение с началото (фиг. 4). В инокулираните варианти не са установени значителни изменения спрямо контролата, с изключение на смесената инокулация с представители на трите групи червеи, при която повишението е почти два пъти.

Установеното многократно увеличение на количеството на бактериите, актиномицетите и микроскопичните гъби при всички варианти в края на опита в сравнение с началния етап, най-вероятно, се дължи на нарастването на общата коренова маса на растенията в крайния етап и, съответно, на увеличаване на количеството на кореновите ексудати, които са лесно усвоим субстрат за микроорганизмите.

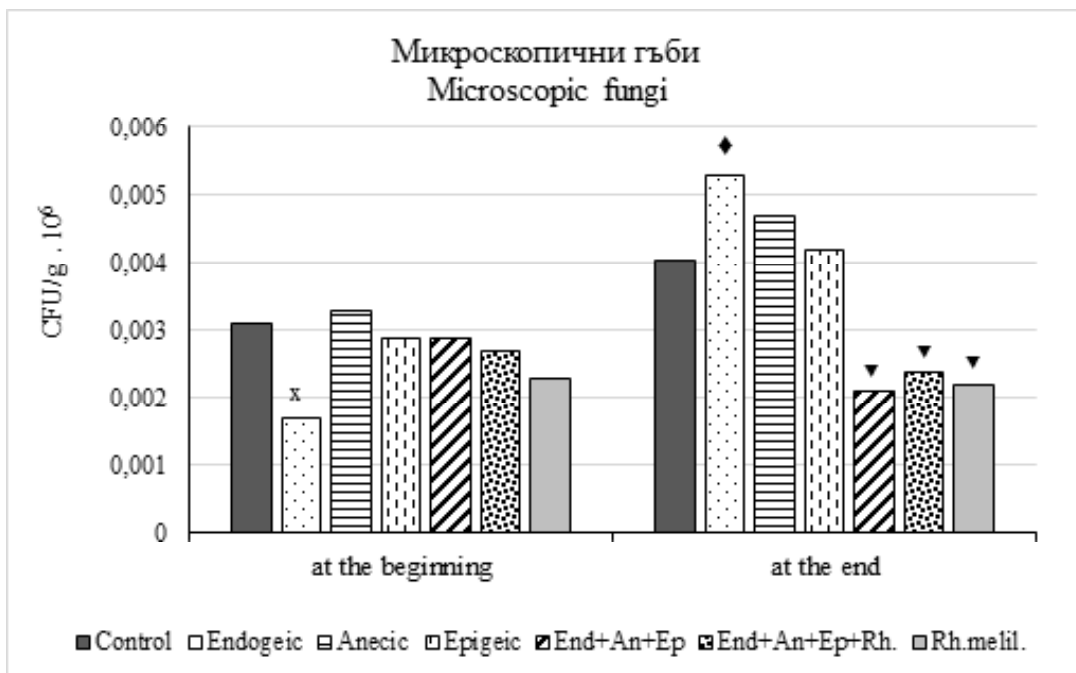
От приложените самостоятелни инокулации с червеи, най-висок положителен ефект върху микрофлората оказват ендегейк видовете. Инокулацията с ендегейк червеи води до най-голямо увеличение на броя на хетеротрофните бактерии и на микроскопичните гъби в края



Фиг. 1. Численост на хетеротрофните бактерии в ризосферата на люцерна
Fig. 1. Heterotrophic bacteria amount in alfalfa rhizosphere

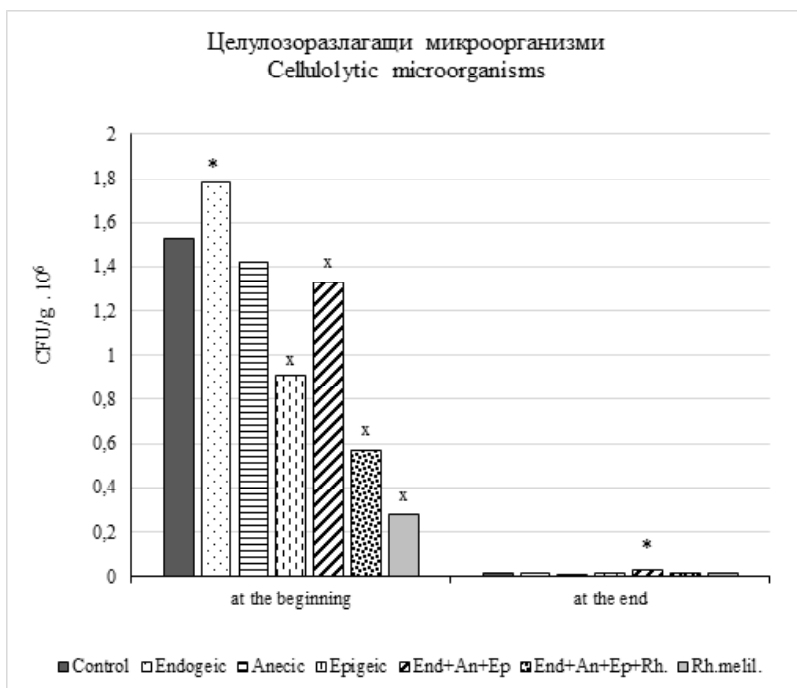


Фиг. 2. Численост на актиномицетите в ризосферата на люцерна
Fig. 2. Amount of actinomycetes in alfalfa rhizosphere



Statistically different values: x, ▼ - lower than the Control
♦ - higher than the Control

Фиг. 3. Численост на микроскопичните гъби в ризосферата на люцерна
Fig. 3. Amount of microscopic fungi in alfalfa rhizosphere



Statistically different values: x - lower than the Control
* - higher than the Control

Фиг. 4. Численост на целулозоразлагащите микроорганизми в ризосферата на люцерна
Fig. 4. Amount of cellulolytic microorganisms in alfalfa rhizosphere

Таблица 1. Обща биологична активност (продукция на CO₂) в ризосферата на люцерна в края на опита

Table 1. Basal respiration (CO₂-production) at the end of the experiment

Варианти Variants	mg CO ₂ /100 g soil/24 h
1. Контрола / Control	5,74 ±0,58
2. Ендогеик червеи / Endogeic earthworms	4,92±0,09
3. Анесик червеи / Anesic earthworms	5,08±1,06
4. Епигеик червеи / Epigeic earthworms	5,72±0,36
5. Смесена инокул. с видове от трите екол. групи/ Mixed inoculation - End.+An.+Ep.	6,70±0,36
6. Смесена инокул. с видове от трите групи + <i>Rh. meliloti</i> 116 /Mixed inoculation - End.+An.+Ep.+ <i>Rh. meliloti</i> 116	7,58±0,25
7. <i>Rh. meliloti</i> 116	5,16±0,09

на опита, и на броя на целулозоразлагащите микроорганизми в началото на опита.

Заклучение

Самостоятелните и смесените инокулации с дъждовни червеи и симбиотични азотфиксиращи бактерии *Rhizobium meliloti* на Излужена канелена почва в съдов опит с люцерна оказват подчертан положителен ефект върху броя на хетеротрофните бактерии, което се проявява още в началото на опита и се запазва до края. При актиномицетите, микроскопичните гъби и целулозоразлагащите микроорганизми ефектът е специфичен в зависимост от етапа на изследването, като преобладаващата тенденция е към намаление на числеността им.

От самостоятелните инокулации с дъждовни червеи доказан положителен ефект върху повечето групи (хетеротрофни бактерии, микроскопични гъби и целулозоразлагащи микроорганизми) имат ендогеик червеите. Двете смесени инокулации с червеи от трите екологични групи повишават общата биологична активност на почвата, като ефектът е по-висок във варианта с трите групи червеи + симбиотични азотфиксиращи бактерии.

Литература

- Alef, K.** (1995). Soil respiration. In: Alef, K. & Nannipieri, P. (eds), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 214-218.
- Bhadauria, T., & Saxena, K. G.** (2010). Role of earthworms in soil fertility maintenance through the production of biogenic structures. *Applied and Environmental Soil Science*, 2010.
- Bisht D., Pandey, A., & Palni, L. M. S.** (2003). Influence of microbial inoculations on *Cedrus deodara* in relation to survival, growth promotion and nutrient uptake of seedlings and general soil microflora. *J. Sustainable Forestry*, 17, 37-54.
- Brown, G. G.** (1995). How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? *Plant Soil*, 170(1), 209-231.
- Elmer, W. H.** (2009). Influence of earthworm activity on soil microbes and soilborne diseases of vegetables. *Plant Disease*, 93, 175-179.
- Grudeva, V., Moncheva, P., Nedeva, S., Gocheva, B., Antonova-Nedeva, S., & Naumova, S.** (2007). Handbook of microbiology. University edition SU "St. Kl. Ohridski", p. 356 (Bg)
- Lavelle, P., Charpentier, F., Villenave, C., Rossi J.P., Derouard, L., Pashanasi, B., Andre, J., Ponge, J. F., & Bernier, N.** (2004). Effects of earthworms on soil organic matter and nutrient dynamics at a landscape scale over decades. *Earthworm ecology*, 2, 145-160.
- Ly, M., Shao, Y., Lin, Y., Liang, C., Dai, J., Liu, Y., Fan P., Zhang W., & Fu, S.** (2016). Plants modify the effects of earthworms on the soil microbial community and its activity in a subtropical ecosystem. *Soil Biology and*

Biochemistry, **103**, 446-451.

Nyoki, D., & Ndakidemi, P. A. (2018). Selected Chemical Properties of Soybean Rhizosphere Soil as Influenced by Cropping Systems, Rhizobium Inoculation, and the Supply of Phosphorus and Potassium after Two Consecutive Cropping Seasons. *International Journal of Agronomy*, vol. 2018, Article ID 3426571.

Petkova, G., Nedyalkova, K., Perfanova, J., & Eftimova, D. (2018). Effect of Microbial Inoculants on Plant Biomass of Lucerne. *Journal of Balkan Ecology* 21(4), 370-377.

Schwieger, F., & Tebbe, C. C. (2000). Effect of field inoculation with *Sinorhizobium melliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*) - linking of 16S rRNA gene-based-single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(8), 3556-3565.

Trabelsi, D., & Mhamdi, R. (2013). Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. *BioMed research international*, 2013.

Valchovski, H., Kercheva, M., Perfanova, J., Nedyalkova, K., & Hodjev, J. (2018). Effect of Inoculation of Earthworms and Soil Microorganisms on Soil Structure and Productivity of Alfalfa. *Eurasian Journal of Agricultural Research*, **2** (8), 22-29.