

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОЧАРА С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ СВОБОДНОЖИВУЩИМИ АЗОТФИКСАТОРАМИ В КАЧЕСТВЕ УДОБРЕНИЯ (ВЕГЕТАЦИОННЫЕ ОПЫТЫ)

КУРЫНЦЕВА Полина Александровна, Казанский (Приволжский) федеральный университет

ГАЛИЦКАЯ Полина Юрьевна, Казанский (Приволжский) федеральный университет

СЕЛИВАНОВСКАЯ Светлана Юрьевна, Казанский (Приволжский) федеральный университет

Проведена иммобилизация свободноживущих N-фиксирующих бактерий на двух типах биочара (из куриного помета и из осадка сточных вод), которые в дальнейшем были внесены в почву для улучшения ее качества и повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. Эффективность иммобилизации была доказана с помощью метода сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Эффективность применения 1% по массе биочара со свободноживущими N-фиксирующими бактериями в качестве удобрения оценивалась в течение 30-дневного вегетационного эксперимента в тепличных условиях путем оценки химического состава почвы (рН, ЕКО, ОВ, $S_{\text{общ}}$, $N_{\text{общ}}$), изменения функциональной активности микробного сообщества почвы (респираторная активность почвы, активность экзоферментов лейцин-аминопептидазы), изменения структуры количества общебактериальных и *nifH* генов, изменения характеристик растений (содержание хлорофилла, всхожесть, длина корней и побегов, биомасса). Установлено, что применение биочара с иммобилизованными свободноживущими N-фиксирующими бактериями приводило к более высокому содержанию $N_{\text{общ}}$ (0,11–0,19 %) в почве в конце эксперимента по сравнению с таковым для образцов почвы с минеральными удобрениями (0,09 %) и контрольной почвы (0,08 %). Применение биочара со свободноживущими N-фиксирующими бактериями приводило к значительному увеличению количества копий *nifH* генов в почве. Использование биочара в качестве удобрения способствовало увеличению содержания хлорофилла (13–22 %) и биомассы (10–84 %) ячменя *Hordeum vulgare* по сравнению с контролем.

Введение. Достаточно часто лимитирующим фактором для получения максимально возможного урожая является недостаток питательных элементов в почве, в частности азота и фосфора [1]. Применение минеральных удобрений для восполнения запаса недостающих питательных элементов в почве – широко распространенная практика. Однако избыточное внесение минеральных удобрений приводит к загрязнению окружающей среды [2]. Полностью или частично заменить минеральные удобрения позволит внесение в почву биочара, а также использование биопрепаратов.

Биопрепараты могут включать в себя бактерии, способные фиксировать атмосферный азот, – свободноживущие азотфиксаторы. Например, бактерии родов *Azotobacter*, *Rhizobium* или *Azospirillum* [3, 4]. Широко применяются для данной цели грамм-негативные свободноживущие бактерии рода *Azotobacter*, так как они способны не только фиксировать атмосферный азот, но и синтезировать ауксины, гиббереллины, цитокинины, витамины и аминокислоты, которые повышают системную устойчивость растений. Кроме того, они могут участвовать в процессе перевода фосфора из нерастворимых в доступные для растений соединения. Одной из важнейших проблем, связанных с применением биопрепаратов, является их низкая выживаемость. В связи с этим бактерии рекомендовано вносить на носителе, который может выступать в качестве укрытия для микробов; может обеспечивать микробы питательными веществами [5]. Таким носителем может быть биочар – богатый углеродом продукт, полученный в результате термической обработки органического материала (древесины, по-

мета, осадков сточных вод) при недостатке или отсутствии кислорода воздуха [6].

Методика исследований. Из почвенных образцов, отобранных на территории республики Татарстан, были выделены согласно ГОСТ 54653-2011 свободноживущие азотфиксаторы (А). Нарастивали культуру свободноживущих азотфиксаторов в инкубаторе Eppendorf INNOVA® 44/44R SERIES на жидкой среде Эшби (28 °С, 120 г/мл, 7 суток). Свободноживущие азотфиксаторы концентрировали методом центрифугирования (30 мин, 3000g). Для инокуляции были выбраны два образца биочара: 1-й получали методом быстрого пиролиза при температуре 550 °С и времени пиролиза 8 мин из осадка сточных вод (ОСВ); 2-й – методом медленного пиролиза при температуре 400 °С и времени пиролиза 2 ч из куриного помета (КП). Далее биочар каждого вида перемешивали с концентрированной культурой свободноживущих азотфиксаторов (1:3 по массе); инокулированный биочар перемешивали 5 раз в течение 24 ч и оставляли на 48 ч в стерильных условиях до полного высыхания.

Эффективность внесения инокулированных биочаров в почву оценивали в вегетационном эксперименте длительностью 30 суток, который осуществляли на базе «Фитокомплекса КФУ» в контролируемых условиях (температура 20–22 °С, режим освещения 16:8, относительная влажность 60–70 %). Для этого в темно-серую лесную почву вносили биочар, инокулированный азотфиксаторами (варианты КП + А, ОСВ + А), исходный биочар (варианты КП, ОСВ). Контрольные варианты – исходная почва (П) и почва с минеральным удобрением – диаммофоска (П+М).



Доза внесения биочара составляла 1 % (содержание $N_{\text{общ}}$ в КП составляло 6,5 %, в ОСВ – 4,1 %), доза внесения диаммофоски (5,5 г/кг) выбрана как среднее количество азота, внесенное с биочаром – 0,55 г/кг. Все варианты засевали семенами ячменя *Hordeum vulgare* – по 40 семян на один вегетационный сосуд. На 1-е и 30-е сутки вегетационного эксперимента оценивали изменение физико-химических характеристик: pH и электропроводности (ГОСТ 26483-85), емкости катионного обмена (метод Бобко-Аскинази-Алешина в модификации ЦИНАО по ГОСТ 17.4.4.01-84), содержания органического вещества (ГОСТ 27753.10-88), $C_{\text{общ}}$ и $N_{\text{общ}}$ (по методу Дюма на приборе VarioMaxCube согласно ISO 10694 и ISO 13878) и аммонийного азота (на приборном комплексе VELD UDK 159 согласно ГОСТ 26716-85). На 1, 3, 7, 14, 30-е сутки оценивали респираторную активность почв (в системе Oxitor согласно ISO 16072:2002), активность внеклеточного фермента лейцин-аминопептидазы [7], учитывали общее количество бактерий и свободноживущих азотфиксаторов методом ПЦР в реальном времени.

Выделение тотальной ДНК из образцов почвы массой 0,3 г проводили с использованием набора Fast DNA Spin Kit For Soil (MP Bio, Германия). Для очищения ДНК применяли QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Германия). Реакцию РВ-ПЦР осуществляли на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, Мюнхен, Германия). Для оценки количества бактерий использовали общебактериальные праймеры (341F: CCTACGGGAGGCAGCAG, 534R: ATTACCGCGGCTGCTGGCA) с температурой плавления 58 °С. Для оценки количества свободноживущих азотфиксаторов оценивали количество *nifH* гена, который кодирует белок Fe нитрогеназы (праймеры F: AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC R: TTGTTSGCSGCRATACATSGCCATCAT; температура плавления 72 °С). Амплификация проводилась при следующих режимах: первичная денатурация при 95 °С в течение 5 мин, далее 39 трехступенчатых циклов при температуре плавления каждого праймера в течение 45 с, при 95 °С в течение 15 с и при 72 °С в течение 30 с. Рабочий раствор для амплификации имел следующий состав (25 мкл): матричная ДНК – 1 мкл, праймеры (10 мкмоль) – по 0,5 мкл, dNTP (10 ммоль) – 2,5 мкл, Taq Buffer с SYBR Green 1(10×) – 2,5 мкл, MgCl₂ (25 мМоль) – 2,5 мкл, Taq polymerase (5 ед./мкл) – 0,2 мкл и ddH₂O – 15,3 мкл. Количество общебакте-

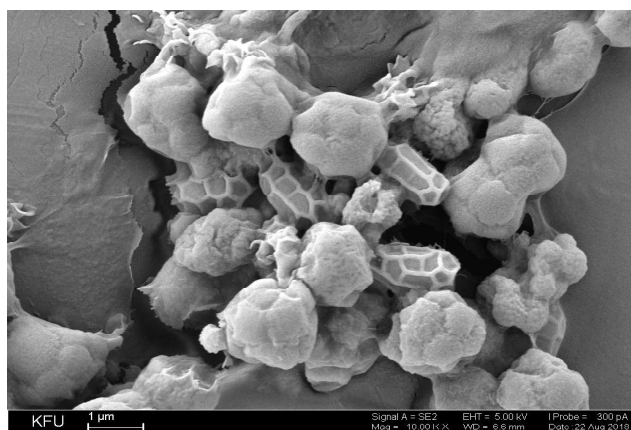
риальных и *nifH* генов вычисляли по уравнениям калибровочных кривых, построенных для нескольких разведений известных концентраций положительных клонов для *nifH* гена и стандарта из *Pseudomonas putida* для общебактериальных генов. Клонирование гена *nifH* осуществляли с помощью TA Cloning Kit (Invitrogen Corporation, США). Плазмиды с геном *nifH* экстрагировали с использованием PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen Corporation, США).

На 30-е сутки оценивали состояние растений, а именно определяли всхожесть, длину корня, роста, биомассу согласно ISO 18763:2016 и содержание хлорофилла с помощью портативного флуороид- и хлорофиллометра Dualox Scientific™ от Force-A как показатели удобрительных свойств биочара, инокулированного азотфиксаторами.

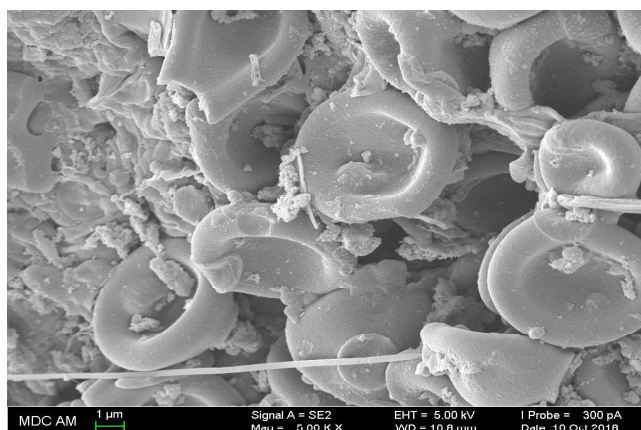
Результаты исследований. На первом этапе была показана возможность инокуляции биочара выделенными консорциумами свободноживущих азотфиксаторов, в частности установлено образование биофильных пленок на поверхности биочара (рис. 1).

Поскольку биочар, инокулированный свободноживущими азотфиксаторами, планируется использовать как экологически чистое удобрение, разрешенное при выращивании продукции класса «Органик», то важно было оценить его влияние не только на растения, но и на физико-химические свойства почвы, на микробные сообщества.

Кислотность почвы влияет на растворимость и усвояемость растениями различных питательных веществ: доступность фосфора, калия, железа, цинка, марганца, бора увеличивается в кислых почвах. При этом резкое изменение pH способно привести к гибели растений и стрессу для микробного сообщества почв. Внесение биочара ОСВ и КП привело к увеличению pH почв по сравнению с контрольным вариантом в 1,08 и 1,15 раза соответственно. Это связано с исходными характеристиками биочаров: pH ОСВ ниже pH КП. Инокуляция биочара привела к снижению его щелочности и, как следствие, внесение такого биочара в почву не привело к ее защелачиванию (табл. 1). При этом к 30-м суткам вегетационного эксперимента образцы почвы с внесенными биочарами (ОСВ, КП, ОСВ+А, КП+А) были более щелочными по сравнению с образцами почв без биочара (П, П+М).



а



б

Рис 1. Изображения биочаров с иммобилизованными свободноживущими азотфиксаторами (а – ОСВ+А; б – КП+А), полученных методом СЭМ



Изменение физико-химических показателей почв при проведении вегетационного эксперимента

Точка отбора	Образец	pH	ЕС, мСм/см	ЕКО, мг-экв./100 г	ОВ, %	ОУ, %	Общий азот, мг/кг	Аммонийный азот, мг/кг
1-е сутки	ОСВ+А	5,24±0,30	265,03±17,64	14,60±1,64	8,92±2,95	3,45±0,67	2153,33±382,80	4,01±1,81
	КП+А	5,93±0,14	314,63±33,61	24,47±4,13	7,78±0,82	3,52±0,29	2220,00±151,33	2,70±0,34
	ОСВ	6,32±0,16	121,37±9,03	13,87±4,20	6,16±0,08	2,95±0,94	1346,67±282,90	1,98±0,30
	КП	6,74±0,12	221,95±5,73	12,90±3,25	7,35±1,32	3,03±0,71	1713,33±550,85	1,82±0,55
	П+М	5,93±0,06	145,15±3,18	10,80±2,53	4,55±1,25	2,04±0,13	1565,00±63,64	1,90±0,03
	П	5,85±0,04	108,60±1,12	8,70±2,40	6,48±0,40	2,00±0,43	875,00±106,07	1,39±0,02
30-е сутки	ОСВ+А	5,94±0,03	96,73±14,38	32,47±3,86	7,02±0,75	3,13±0,22	1906,67±105,99	4,16±1,52
	КП+А	6,16±0,12	125,30±17,37	43,45±2,44	6,03±1,20	2,67±0,38	1671,67±264,97	2,28±0,42
	ОСВ	6,26±0,09	61,30±5,97	41,27±1,98	6,13±1,31	2,54±0,14	1111,67±62,92	1,57±0,11
	КП	6,50±0,08	125,23±7,31	48,60±4,85	5,61±0,64	2,66±0,16	1335,00±132,57	1,64±0,47
	П+М	5,45±0,24	77,00±9,62	31,30±3,42	4,15±1,36	1,62±0,48	757,50±194,45	1,24±0,08
	П	5,97±0,05	55,80±3,25	19,10±2,03	4,11±1,50	1,73±0,41	755,00±176,78	1,18±0,27

Электропроводность почвы (ЕС) является хорошим индикатором количества растворенных в ней солей. Так, высокие концентрации солей могут привести к снижению прорастания семян и замедлению роста растений. На 1-е сутки эксперимента электропроводность была выше в образцах с азотфиксаторами (ОСВ+А, КП+А) в 2,4 и 2,9 раза по сравнению с контролем (П). Внесение биочара из куриного помета приводило к существенному увеличению электропроводности по сравнению с биочаром из осадка сточных вод в 1,2 и 1,5 раза для образцов с азотфиксаторами и без них соответственно. К 30-м суткам максимальной электропроводностью характеризовалась почва с внесенным биочаром из куриного помета (образцы КП+А, КП). При этом произошло как снижение электропроводности во всех вариантах (в 1,8–2,5 раза), так и снижение различий между образцами и контрольной почвой (в 1,1–2,2 раза).

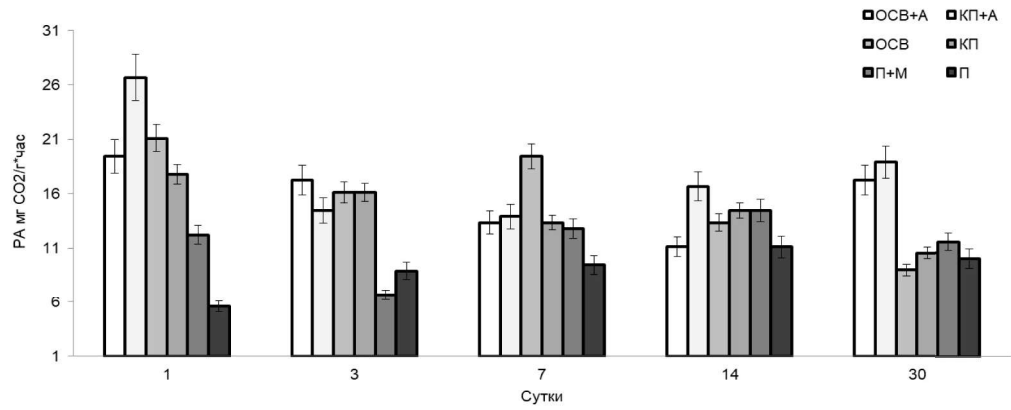
Емкость катионного обмена (ЕКО) характеризует физико-химическую поглотительную способность почв и зависит от минералогического и гранулометрического состава почв, а также от содержания в них гумуса. ЕКО аналогично электропроводности на 1-е сутки эксперимента была выше в образцах с внесенным биочаром (12,9–24,5 мг-экв./100 г) по сравнению с контрольной почвой (8,7 мг-экв./100 г). Однако к 30-м суткам эксперимента ЕКО увеличивалась. Достоверное увеличение в 1,3–3,8 раза было установлено только для образцов почвы с внесенным биочаром. Органический углерод (ОУ) является источником питания для почвенного микробиома, обеспечивая тем самым его разнообразие и устойчивость [8]. Внесение биочара с азотфиксаторами привело к максимальному увеличению ОВ на 20,0 и 37,5 % и $C_{\text{общ}}$ на 72 и 75 % в почве в образцах ОСВ+А и КП+А по сравнению с контролем соответственно. Вероятно, это связано с увеличением ОВ в целом и $C_{\text{общ}}$ в частности за счет среды, на которой культивировали азотфиксаторы, содержащей как питательные элементы, так и метаболиты. Внесение исходных биочаров, а также диаммофоски не привело к существенно-

му изменению содержания ОВ, однако содержание $C_{\text{общ}}$ в образцах КП и ОСВ было выше на 47 и 51 % по сравнению с таковым у образцов П и П+М. К 30-м суткам произошло снижение содержания ОВ во всех вариантах, вероятно, за счет активизации микробного сообщества почв. При этом максимальное снижение отмечено для вариантов КП и КП+А на 31 и 29 % соответственно. Содержание $C_{\text{общ}}$ снижалось во всех образцах на 10–19 %, за исключением образца П+М, для которого установлено максимальное снижение содержания $C_{\text{общ}}$ за 30 суток вегетационного эксперимента.

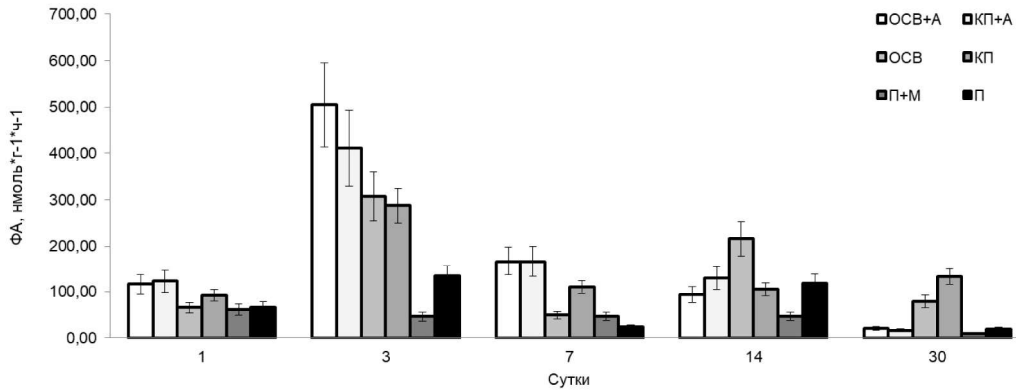
Внесение биочаров, инокулированных азотфиксаторами, привело к увеличению $N_{\text{общ}}$ в почве за 1 сутки эксперимента в 2,5 раза, внесение исходных биочаров и диаммофоски – в 1,5–1,9 раза. Содержание $N_{\text{общ}}$ к 30-м суткам вегетационного эксперимента снизилось, максимальное снижение на 52 % отмечено для варианта П+М, минимальное – на 12 % для варианта ОСВ+А. При этом к 30-м суткам вегетационного эксперимента содержание $N_{\text{общ}}$ в 1,3–1,7 раза выше в образцах ОСВ+А и КП+А по сравнению с образцами ОСВ и КП и в 2,5 и 2,2 раза выше по сравнению с образцами П+М и П. К 30-м суткам достоверной разницы в содержании $N_{\text{общ}}$ в контрольной почве (П) и почве с внесением минеральных удобрений (П+М) установлено не было. Изменение содержания аммонийного азота аналогично изменению содержания общего азота, при этом для образца ОСВ+А показано недостоверное увеличение содержания аммонийного азота к концу эксперимента. Таким образом, внесение азотфиксаторов, иммобилизованных на биочаре приводит к снижению потерь азота в ходе вегетационного эксперимента.

На следующем этапе было оценено влияние биочара и биочара, инокулированного азотфиксаторами, на почвенное микробное сообщество: на его функционирование (по изменению респираторной активности и активности фермента лейцин-аминопептидазы) и численность (на количество гена *nifH* и бактерий). Данные изменения респираторной активности представлены на рис. 2.

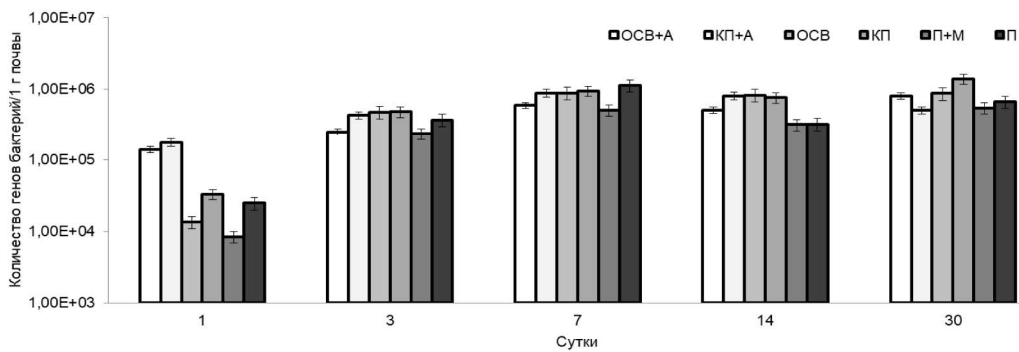




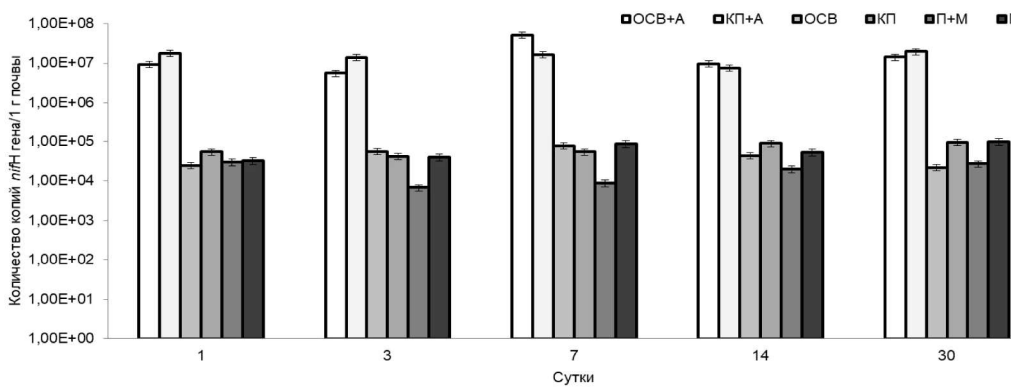
а



б



в



г

Рис. 2. Влияние биоцара, инокулированного свободноживущими азотфиксаторами, на почвенное микробное сообщество: а – на респираторную активность, б – на лейцин-аминопептидазную активность; в – на количество бактерий, г – на количество rifN гена



Наименьшим уровнем респираторной активности на протяжении всего вегетационного эксперимента характеризовался контрольный образец (П) – 5,55–11,11 мг CO₂/г·ч. Это связано с изначально бедной питательными веществами почвой и отсутствием дополнительной стимуляции микробного сообщества. Наибольшее влияние на респираторную активность оказало внесение биочара из куриного помета с азотфиксаторами – образец КП+А, для которого установлена максимальная респираторная активность в 1-е сутки эксперимента (26,67 мг CO₂/г·ч). Внесение минеральных удобрений привело к меньшему увеличению респираторной активности (в 2,2 раза) по сравнению с внесением биочара (в 3,2–4,8 раза). На протяжении всего вегетационного эксперимента происходило волнообразное изменение респираторной активности. Минимальной респираторной активностью характеризовался контрольный образец (П) – 5,6–11,1 мг CO₂/г·ч. К 30-м суткам эксперимента респираторная активность во всех образцах достоверно не отличалась и составила 9,0–11,6 мг CO₂/г·ч, исключение представляли образцы с внесенными азотфиксаторами ОСВ+А и КП+А – 17,2 и 18,9 мг CO₂/г·ч соответственно.

Наибольшее значение лейцин-аминопептидазной активности установлено на 3-и сутки для всех образцов, однако максимальными величинами характеризовались образцы с азотфиксаторами ОСВ+А, КП+А (504,69 и 411,34 нмоль/г·ч соответственно). Минимальной лейцин-аминопептидазной активностью характеризовался образец П+М на протяжении всего эксперимента.

Внесение биочара с азотфиксаторами ОСВ+А и КП+А привело к увеличению количества бактерий на 1-е сутки в 5,6 и 7,1 раза соответственно; минимальное количество бактерий отмечали для образца П+М. Было установлено увеличение количества бактерий во всех образцах с 1-х по 7-е сутки вегетационного эксперимента, далее происходила адаптация бактериального сообщества и существенного изменения числа бактерий на 14-е и 30-е сутки не происходило.

Одним из важных показателей эффективности интродукции в почвенное аборигенное сообщество азотфиксаторов является сохранение их численности и азотфиксирующей активности. В данном исследовании мы предположили, что оба этих параметра можно оценить по количеству *nifH* гена, ко-

дирующего гидрогеназную субъединицу или Fe-белок, входящий в комплекс нитрогеназы [9]. Данный ген является наименее вариативным, в связи с этим его используют для оценки наличия и количества бактерий, способных фиксировать атмосферный азот [10]. Установлено, что с 1-х суток для образцов ОСВ+А и КП+А количество *nifH* гена было выше в 140–590 раз. Следует отметить, что изменение количества *nifH* гена было волнообразным на протяжении всего эксперимента и тренда к его снижению не установлено.

Основной целью применения как минеральных, так и органических удобрений является увеличение урожайности растений. В связи с этим важно было оценить влияние биочара, инокулированного азотфиксаторами, на растения и сравнить с аналогичным влиянием минеральных удобрений. Результаты представлены в табл. 2. Наиболее чувствительным морфометрическим показателем ячменя была биомасса: минимальные значения отмечены для контрольной почвы (П), максимальные – для вариантов КП+А, КП, П+М (на 47; 84 и 82 % выше контрольного образца).

Таким образом, установлены стимулирующий эффект биочара из КП, сравнимый с таковым у минеральных удобрений, и отсутствие токсичного воздействия на растения биочара из ОСВ. При этом дополнительный фактор инокуляции азотфиксаторами биочара не оказал достоверного воздействия. Как видно из полученных данных (см. табл. 2), содержание хлорофилла изменялось в зависимости от типа обработки почвы. Максимальным содержанием хлорофилла характеризовались растения, выросшие в образце КП+А (39,4 мкг/см²) и в образце ОСВ+А (38,6 мкг/см²). Минимальное содержание хлорофилла установлено для растений из образца П – 32,2 мкг/см².

Заключение. Результаты внесения азотфиксаторов, иммобилизованных на биочаре, показали, что происходит снижение потерь почвенного азота (общего и аммонийного) в динамике вегетационного эксперимента.

Внесение биочара с азотфиксаторами привело к увеличению количества бактерий на 1-е сутки в 5,6–7,1 раза по сравнению с контрольной почвой. При этом количество *nifH*-гена было выше. Несмотря на волнообразное изменение количества *nifH* гена на протяжении всего эксперимента тренда к его снижению не установлено.

Таблица 2

Морфометрические показатели растений и содержание в них хлорофилла при проведении вегетационного эксперимента

Образец	Всхожесть, % от контроля	Длина ростка, % от контроля	Длина корня, % от контроля	Биомасса, % от контроля	Содержание хлорофилла, мкг/см ²
ОСВ+А	94,2	96,5	67,1	109,6	38,6
КП+А	100,4	93,7	67,5	147,3	39,4
ОСВ	89,8	100,8	97,4	120,1	36,5
КП	84,4	98,3	117,3	184,4	36,0
П+М	82,7	103,0	112,0	142,3	33,0
П	100,0	100,0	100,0	100,0	32,2



Содержание хлорофилла было выше в растениях, выросших на почве с внесением биочара с иммобилизованными свободноживущими азотфиксаторами.

Результаты вегетационного опыта позволяют утверждать, что применение биочаров из осадка сточных вод и куриного помета с иммобилизованными на них свободноживущими азотфиксаторами в качестве удобрительного средства является перспективным направлением. Максимальный положительный эффект на агрохимические характеристики, микробное сообщество и растения установлен при использовании биочара из куриного помета.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-25054.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ягодин Б.А., Жуков Ю.П., Кобзаренко В.И. Агрохимия. – М.: Колос, 2002. – 585 с.
2. Dimkpa C.O., Fugice J., Singh U., Lewis T.D. Development of fertilizers for enhanced nitrogen use efficiency – Trends and perspectives // *Science of the Total Environment*, 2020, Vol. 731, P. 113–139.
3. Din M., Nelofer R., Salman M., Abdullah, Khan F.H., Khan A., Ahmad M., Jalil F., Din J.U., Khan M. Production of nitrogen fixing *Azotobacter* (SR-4) and phosphorus solubilizing *Aspergillus niger* and their evaluation on *Lagenaria siceraria* and *Abelmoschus esculentus* // *Biotechnol. Reports*. Elsevier B.V., 2019, Vol. 22, P. 323–329.
4. Oldroyd G., Dixon R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem / Oldroyd G., Dixon R. // *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, Vol. 26, P. 19–24.
5. Tu C., Wei J., Guan F., Liu Y., Sun Y., Luo Y. Biochar and bacteria inoculated biochar enhanced Cd and Cu

immobilization and enzymatic activity in a polluted soil // *Environ. Int.* Elsevier Ltd, 2020, Vol. 137, P. 105576.

6. Lehmann J., Rillig M.C., Thies J., Masiello C.A., Hockaday W.C., Crowley D. Biochar effects on soil biota - A review // *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, P. 1812–1836.

7. Kumar A., Dorodnikov M., Spletstößer T., Kuzyakov Y., Pausch J. Effects of maize roots on aggregate stability and enzyme activities in soil // *Geoderma*. Elsevier B.V., 2017, Vol. 306, P. 50–57.

8. Clara L., Fatma R., Viridiana A., Liesl W. Soil organic carbon the hidden potential [Electronic resource] // *Food and agriculture organization of the united nations*, 2017, P. 90. – URL: <http://www.fao.org/3/a-i6937e.pdf> (accessed: 11.08.2020).

9. Gaby J.C., Buckley D.H. A Comprehensive Evaluation of PCR Primers to Amplify the nifH Gene of Nitrogenase // *PLoS One* / ed. Balcazar J.L. Public Library of Science, 2012, Vol. 7, No. 7, P. 142–149.

10. Poly F., Ranjard L., Nazaret S., Gourbière F., Jocteur Monrozier L. Comparison of nifH Gene Pools in Soils and Soil Microenvironments with Contrasting Properties // *Appl. Environ. Microbiol.* American Society for Microbiology (ASM), 2001, Vol. 67, No. 5, P. 2255–2262.

Курынцева Полина Александровна, канд. биол. наук, доцент кафедры «Прикладная экология», Казанский (Приволжский) федеральный университет. Россия.

Галицкая Полина Юрьевна, д-р биол. наук, проф. кафедры «Прикладная экология», Казанский (Приволжский) федеральный университет. Россия.

Селивановская Светлана Юрьевна, д-р биол. наук, проф. кафедры «Прикладная экология», Казанский (Приволжский) федеральный университет. Россия.

420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

Тел.: (843) 233-75-25.

Ключевые слова: биочар; свободноживущие азотфиксирующие бактерии; почвенные удобрения.

THE STUDY OF ADAPTIVE ABILITY OF VARIETIES OF WINTER SOFT WHEAT BY YIELD AND QUALITY OF GRAIN IN THE CONDITIONS OF FOREST STEPPE OF THE MIDDLE VOLGA REGION

Kuryntseva Polina Alexandrovna, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the chair “Applied Ecology”, Kazan Federal University, Russia.

Galitskaya Polina Yurievna, Doctor of Biological Sciences, Professor of the chair “Applied Ecology”, Kazan Federal University, Russia.

Selivanovskaya Svetlana Yurievna, Doctor of Biological Sciences, Professor of the chair “Applied Ecology”, Kazan Federal University, Russia.

Keywords: biochar; soil fertilizer; free-living N fixing bacteria.

It is known that biochar application as soil fertilizer lead to reduce N loss. At the same time because of its porosity biochar is high quality substrate for immobilization microorganisms. The practice of using free-living N fixing bacteria (FLNFB) in organic farming is widely used to increase the nitrogen content in the soil. In this study immobilisation FLNFB on two types of biochar (made of chicken manure and sewage sludge) was applied to increase soil quality and crop productivity. The effectiveness of immobilization has been proven using SEM method: biofilms of FLNFB on the porous surface of both types of biochars are visible in the SEM images.

The effectiveness of application 1% by mass biochar with FLNFB was estimated during 30 days vegetation experiment in greenhouse conditions by estimating the chemical composition of the soil (pH, CEC, OM, Corg, Ntot), by estimating change the functional activity of the soil microbial community (soil respiration activity, leucine aminopeptidase enzyme activity), by estimating change the structure of the microbial community (qPCR were used to analyze nifH and 16S rRNA genes in order to study the total count of bacterial and fungi), by estimating change the plants characteristics (chlorophyll content, germination, root and shoot length, biomass). It was found that application biochar with FLNFB lead to higher content of Ntot (0.11-0.19%) in soil in the end of the experiment as comparing than that for soil samples with mineral fertilizer (0.09%) and control soil (0.08%). The application biochar with FLNFB lead to significantly increase nifH-genes in soil. The soil leucine aminopeptidase and respiration activity have a similar trend for samples with and without biochar. The use of biochar as fertilizer led to increase chlorophyll content (13-22%) and barley biomass (10-84%) and decrease the length of the root (3-33%) in comparison with the control soil.

