

Т.А. АСЕЕВА, Н.Е. САВЧЕНКО,
С.А. ШМИГИРИЛОВ, К.В. КИСЕЛЕВ

Сезонная динамика количественного состава и видовое разнообразие микроорганизмов в агроценозах Среднего Приамурья

*Определены основные группы микроорганизмов, населяющих наиболее характерные для региона лугово-бурые почвы под овсом, соей и травянистой растительностью. Чаще всего встречались представители родов *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Acinetobacter*, *Leifsonia*, *Luteibacter*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Massilia*, *Microbacterium*, *Aneurinibacillus*. Оценен количественный состав почвенной микрофлоры в разные фазы вегетационного периода. Изучена биологическая активность почв, затронутых сельскохозяйственной деятельностью, и почв природной экосистемы. Установлено, что антропогенная нагрузка оказывает негативный эффект на численность микроорганизмов, населяющих почвы агроценозов: содержание нитрификаторов составляло 50,2 млн ед./1 г абс. сух. почвы на лугу против 11,66 и 4,01 млн ед./1 г абс. сух. почвы под овсом и соей соответственно; содержание аммонификаторов – 21,2 млн ед./1 г абс. сух. почвы против 3,14 и 3,31 млн ед./1 г абс. сух. почвы соответственно. Коэффициент минерализации на лугу оказался почти в 2 раза выше, чем под соевыми посевами (2,34 против 1,2), что свидетельствует о более высокой скорости процессов трансформации органического азота. Самый высокий коэффициент минерализации отмечен в посевах овса.*

Ключевые слова: микробное сообщество, почвенные микроорганизмы, агроценоз, антропогенная нагрузка, нитрификаторы, аммонификаторы, коэффициент минерализации, Среднее Приамурье.

Seasonal dynamics of quantitative parameters and species diversity of microorganisms in agroecocenosis of the Middle Amur Region. T.A. ASEEVA, N.E. SAVCHENKO, S.A. SHMIGIRILOV (Far Eastern Agricultural Research Institute, Khabarovsk), K.V. KISELEV (Federal Scientific Center of the East Asia terrestrial Biodiversity, FEB RAS, Vladivostok).

*According to research results, the main groups of microorganisms inhabiting the meadow-brown soils under oats and soybean crops as well as under the herbage were determined that are most typical for the region. The most frequent were representatives of genera *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Acinetobacter*, *Leifsonia*, *Luteibacter*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Massilia*, *Microbacterium*, *Aneurinibacillus*. The quantitative composition of soil microflora in different vegetation stages was determined, and the biological activity of soils affected by the agricultural practices and of natural ecosystem was analyzed. The anthropogenic pressure was found to have a negative effect on the number of microorganisms inhabiting the soils of agroecocenoses: the content of nitrifiers was 50.2 million units/1 g abs. dry soil in the meadow against 11.66 and 4.01 million units/1 g abs. dry soil under oats and soybean respectively; the content of ammonifiers – 21.2 million units/1 g abs. dry soil against 3.14 and 3.31 million units/1 g abs. dry soil respectively. The coefficient of mineralization in the meadow was almost 2 times higher than under soybean crops (2.34 against 1.2), which indicates a higher rate of transformation processes of organic nitrogen. The highest mineralization coefficient was found in oats.*

Key words: microbial community, soil microorganisms, agroecocenosis, anthropogenic pressure, nitrifiers, ammonifiers, mineralization coefficient, Middle Amur Region.

*АСЕЕВА Татьяна Александровна – доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник, САВЧЕНКО Наталья Евгеньевна – научный сотрудник, ШМИГИРИЛОВ Сергей Андреевич – младший научный сотрудник (Дальневосточный научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Хабаровский край, с. Восточное), КИСЕЛЕВ Константин Вадимович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник (Федеральный научный центр Биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток).

*E-mail: aseeva59@mail.ru

Введение

Важное биологическое свойство почвы – ее регенеративная способность являющаяся основой сельскохозяйственного воспроизводства плодородия почвы. Она зависит не только от отдельных химических или физических показателей, но и от функционирования почвенной биоты, цикличности процессов в системе «растение–почва». Смена растительного покрова приводит к изменению состава почвенной биоты, нарушению круговорота веществ и снижению биопродуктивности.

Современное преобразование почвенного покрова чаще всего осуществляется под антропогенным воздействием, в результате чего формируются антропогенно преобразованные экосистемы. Антропогенная нагрузка оказывает весомое влияние на микробное сообщество почвы, нарушая важные экологические функции в биосфере, связанные с круговоротом элементов питания, регуляцией газового состава атмосферы и формированием почвенной структуры [1, 11, 12, 14]. Микробиологические показатели почвы той или иной территории, в том числе с разными экосистемами, характеризуются высокой пространственной вариабельностью [15, 16], что затрудняет их использование для биологической оценки почв. Поэтому пространственное изменение микробиологических показателей почвы изучают часто вдоль трансекты (катены), обусловленной климатом [18], положением в ландшафте [17], землепользованием [20] или сукцессией растительности [21], что и позволяет рассматривать их вариабельность под влиянием этих факторов.

Почвенные микроорганизмы выполняют системообразующие функции в таких процессах, как почвообразование, разложение почвенного органического вещества, стимуляция роста и обеспечение защиты растений от патогенной микрофлоры [13, 19]. Почвенный микробиом (микробные сообщества) является непосредственным источником формирования микрофлоры, которая определяет питание растений, их устойчивость к патогенам и абиотическим стрессам. Достоверной информации, отражающей особенности микробиома в почвах сельскохозяйственных массивов Дальневосточного региона в целом и Среднего Приамурья в частности, не существует. Поэтому изучение специфики разнообразия растительно-микробного сообщества в агроэкосистемах региона представляется актуальным.

Цель исследования – изучить функционирование микробного сообщества почвы в пределах одной экосистемы и в градиенте их изменения от естественных к пахотным. В задачи исследования входило оценить влияние антропогенной нагрузки на изменение количественного и качественного состава микробных сообществ в зерно-соевых севооборотах и условиях луга.

Материалы и методы

Исследования по оценке влияния антропогенной нагрузки на количественный и качественный составы микрофлоры проводились в длительных стационарных опытах на полях под двумя тестовыми культурами – овсом и соей, а также в естественной экосистеме (луг).

Для соблюдения постоянных координат места отбора проб использовался GPS-прибор. Образцы почв отбирали до посева культур, в середине вегетационного периода и перед уборкой, в полном соответствии с методиками [3–10].

Из подготовленной по методике [10] почвы получили серию последовательных разведений. Затем осуществили посев аликвоты в 0,05 мл на ряд параллельных чашек Петри с плотными питательными средами. Оптимальными для микробиологического исследования почвы считаются разведения, при которых на чашках вырастает от 50 до 200 колоний. Эмпирическим путем установлено, что в наших опытах целесообразно использовать разведения 10^{-3} и 10^{-4} .

Для определения общей численности микроорганизмов в почве использовались следующие питательные среды:

мясо-пептонный агар (МПА) – для учета аммонифицирующих микроорганизмов, разлагающих азотсодержащее органическое вещество почвы;

крахмало-аммиачный агар (КАА) – для учета актиномицетов и амилотической микрофлоры, способной проводить деструкцию олиго- и полисахаридов и иммобилизацию азота;

среда Чапека – для учета бактерий и актиномицетов.

После посева чашки инкубировались в термостате при температуре +27 °С. Подсчет выросших колоний осуществлялся на 2–4-е сут инкубации на МПА, начиная с 4-х сут и по мере разрастания колоний – на КАА и среде Чапека.

Полученное число колоний на чашках Петри пересчитывали в число колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 г абсолютно сухой почвы по формуле:

$$\text{КОЕ} = \text{Чк} \cdot \text{Ка} \cdot \text{Рпс} / \text{M}_w,$$

где число КОЕ – численность колониеобразующих организмов в 1 г почвы; Чк – число подсчитанных колоний на 1 чашке, шт.; Ка – коэффициент посеянной аликвоты почвенной суспензии (для 0,05 мл = 20); Рпс – разведение засеянной почвенной суспензии (для 10^{-3} = 1000); M_w – масса абсолютно сухой почвы в 1 г свежей почвы, определяемая по формуле:

$$\text{M}_w = 1 - \text{W}/100,$$

где W – влажность почвы в %, рассчитываемая по формуле:

$$\text{W} = (m_1 - m_2) \cdot 100/m_0,$$

где m_1 и m_2 – масса бюкса с почвенной навеской до и после сушки соответственно, г; m_0 – исходная масса почвы, г; 100 – коэффициент пересчета в проценты.

Коэффициент минерализации определяли подсчетом соотношения количества микроорганизмов-аммонификаторов и числа микроорганизмов, усваивающих минеральный азот, т.е. число КОЕ на КАА делили на число КОЕ, обнаруженных на МПА, из одного и того же почвенного разведения.

Основываясь на данных о количественном составе микроорганизмов на разных питательных средах, делали вывод о степени обогащенности почвы микроорганизмами.

Видовой состав почвенных микроорганизмов изучали молекулярно-генетическими методами: из наиболее типичных микроорганизмов была экстрагирована ДНК, амплифицирован участок гена 16S рибосомальной РНК методом ПЦР (полимеразная цепная реакция) и проведено секвенирование полученных продуктов по Сэнгеру.

Результаты и обсуждение

Установлено, что микрофлоры участков, подверженных и не подверженных антропогенной нагрузке, существенно различались как по количеству микроорганизмов, разлагающих минеральный азот (в среднем $50,2 \cdot 10^6$ на лугу против $4,01 \cdot 10^6$ – $11,66 \cdot 10^6$ под овсом и соей), так и по количеству деструкторов органического азота ($21,2 \cdot 10^6$ против $3,14 \cdot 10^6$ – $3,31 \cdot 10^6$) (табл. 1).

В ходе вегетационного периода колония микроорганизмов разрасталась, но к уборке она снова становилась меньше, чем до посева культур (рис. 1).

Таблица 1
Среднее содержание микроорганизмов в почвах, затронутых (овес, соя) и не затронутых (луг) антропогенной нагрузкой

Тип почв	Количество микроорганизмов, млн ед./1 г абсолютно сухой почвы	
	МПА	КАА
Луг	21,20	50,20*
Почва под овсом	3,14	11,66
Почва под соей	3,31	4,01

* По результатам двух отборов.

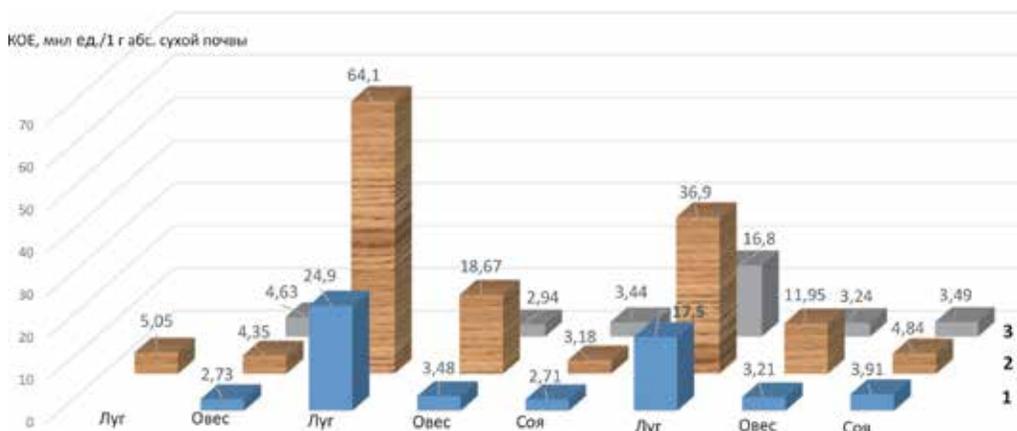


Рис. 1. Динамика количества микроорганизмов по фазам отбора на разных питательных средах: 1 – МПА, 2 – КАА, 3 – среда Чапека

В целом наблюдается заметное преобладание нитрификаторов над аммонификаторами на участках, как подверженных, так и не подверженных антропогенной нагрузке ($50,2 \cdot 10^6$ против $21,2 \cdot 10^6$ на лугу, $4,01 \cdot 10^6$ против $3,31 \cdot 10^6$ под соей, $11,66 \cdot 10^6$ против $3,14 \cdot 10^6$ под овсом). На лугу и под овсом разница в количестве этих групп микроорганизмов достигает 2–3-кратного размера, в почвах под соевыми посевами доминирование нитрификаторов не столь существенное.

По степени обогащенности микроорганизмами (табл. 2) почвы луга, не вовлеченные в сельскохозяйственную деятельность, относятся к очень богатым, в то время как длительное антропогенное воздействие негативно сказывается на микрофлоре почв опытных участков: они становятся среднеобогаченными.

Коэффициент минерализации показывает интенсивность протекания в почве процессов трансформации органического вещества растительных и животных остатков, а также разнообразных органических удобрений [19]. Данный коэффициент свидетельствует о степени развития амилотической части почвенного микробиоценоза и, соответственно, о ее активности в трансформации углеводов почвы и связывании свободного азота. Чем он выше (>1), тем интенсивнее протекают иммобилизационные процессы, что говорит либо об очень высокой обеспеченности почвы аммиачным азотом (это может быть следствием сильного развития аммонификаторов), либо о появлении в почве бедного азотом органического вещества (солома, кора и т.п.). Последнее, в свою очередь, может активизировать развитие олиготрофной и автохтонной групп микробиоценоза, что в итоге приведет к повышению численности амилотиков, так как в результате работы олиготрофов в почвенный раствор высвобождается определенное количество аммиака. В условиях агроценоза слишком большое значение этого коэффициента ($>3-5$) может косвенно свидетельствовать о повышении скорости разложения специфического органического вещества почвы – гумуса [5].

Для почв в наших опытах коэффициент минерализации составляет 1,2 для сои, 2,34 для луга и 3,56 для овса (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о

Таблица 2

Шкала оценки степени обогащенности почвы микроорганизмами (по Д.Г. Звягинцеву [2])

Степень обогащенности почвы микрофлорой	Количество микроорганизмов, млн ед./1 г абсолютно сухой почвы	
	МПА	КАА
Очень бедная	<1	<2
Бедная	1–2	2–4
Средняя	3–5	5–10
Богатая	6–10	11–20
Очень богатая	>11	>21

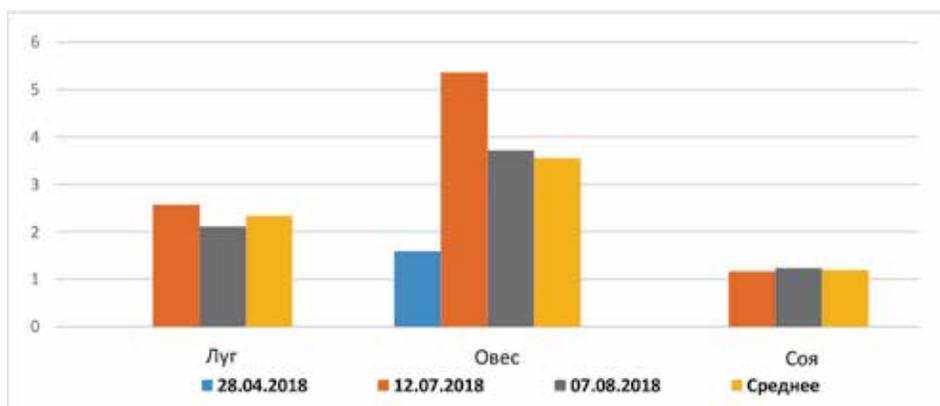


Рис. 2. Динамика коэффициента минерализации почв луга и почв под посевами овса и сои

том, что скорость процессов трансформации органического азота на участке, не затронутом сельскохозяйственной деятельностью, примерно в 2 раза выше, чем в почвах под соевыми посевами. Самый высокий коэффициент у почв под овсом, причиной чего может быть их длительное переувлажнение в течение вегетационного периода (продолжительное затопление способствовало накоплению больших объемов аммиачного азота). В соевых посевах такой ситуации не наблюдалось ввиду использования гребне-грядовой технологии возделывания, которая обеспечивает лучший водный режим почв под культурой в условиях избытка влаги.

По данным секвенирования были определены наиболее характерные для почв региона микроорганизмы. Чаще всего встречались представители родов *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Acinetobacter*, *Leifsonia*, *Luteibacter*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Massilia*, *Microbacterium*, *Aneurinibacillus*.

Вывод

В результате исследования установлены основные группы микроорганизмов, населяющих лугово-бурые почвы под овсом и соей, а также под травянистой растительностью. Наиболее характерны для региона представители родов *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Acinetobacter*, *Leifsonia*, *Luteibacter*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Massilia*, *Microbacterium*, *Aneurinibacillus*. Выявлено, что антропогенная нагрузка оказывает негативный эффект на численность микроорганизмов, населяющих почвы агроценозов: содержание нитрификаторов составляло 50,2 млн ед./1 г абс. сух. почвы на лугу против 11,66 и 4,01 млн ед./1 г абс. сух. почвы под посевами овса и сои соответственно; содержание аммонификаторов 21,2 млн ед./1 г абс. сух. почвы против 3,14 и 3,31 млн ед./1 г абс. сух. почвы соответственно. Коэффициент минерализации на лугу оказался почти в 2 раза выше, чем под соевыми посевами (2,34 против 1,2), что свидетельствует о более высокой скорости процессов трансформации органического азота. Самый высокий коэффициент минерализации отмечен в посевах овса.

Так как почвы Среднего Приамурья характеризуются кислой реакцией среды, это создает благоприятные условия для массового развития почвенных микроскопических грибов, в том числе фитопатогенных, что затрудняет диагностику бактериального состава агроценоза. В связи с этим дальнейшие исследования должны быть направлены на поиски биологических агентов-микроорганизмов, являющихся естественными антагонистами наиболее распространенных возбудителей грибных болезней сельскохозяйственных культур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Заварзин Г.А., Кудеяров В.Н. Почва как главный источник углекислоты и резервуар органического углерода на территории России // *Вестн. РАН*. 2006. Т. 76, № 1. С. 14–29.
2. Звягинцев Д.Г., Асеева И.В., Бабьева И.П., Мирчинк Т.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии: учеб. пособие. М.: Изд-во МГУ, 1980. 224 с.
3. Зенова Г.М., Степанов А.Л., Лихачева А.А., Манучарова Н.А. Практикум по биологии почв: учеб. пособие. М.: Изд-во МГУ, 2002. 120 с.
4. Казеев К.Ш., Колесников С.И., Вальков В.Ф. Биологическая диагностика и индикация почв: методология и методы исследований. Ростов н/Д.: Изд-во РГУ, 2003. 216 с.
5. Казеев К.Ш., Колесников С.И., Акименко Ю.В., Даденко Е.В. Методы биодиагностики наземных экосистем / отв. ред. К.Ш. Казеев. Ростов н/Д.: Изд-во Юж. федер. ун-та, 2016. 356 с.
6. Прунтова О.В., Сахо О.Н. Лабораторный практикум по общей микробиологии. Владимир: Изд-во Владимир. гос. ун-та, 2005. 76 с.
7. Теплер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для вузов. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Дрофа, 2004. 256 с.
8. Терещенко Н.Н., Акимова Е.Е., Минаева О.М. Практикум по микробиологии для оценки плодородия почвы и качества грунтов: учеб.-метод. пособие. Томск: ТГУ, 2011. 96 с.
9. Титова В.И., Козлов А.В. Методы оценки функционирования микробсообщества почвы, участвующего в трансформации органического вещества: науч.-метод. пособие / Нижегород. с.-х. акад. Нижний Новгород, 2012. 64 с.
10. Титова В.И., Козлов А.В. Методы учета численности и биомассы микроорганизмов почвы: учеб.-метод. пособие / Нижегород. с.-х. акад. Нижний Новгород, 2011. 40 с.
11. Умаров М.М. Роль микроорганизмов в круговороте химических элементов в наземных экосистемах // Структурно-функциональная роль почвы в биосфере. М.: Наука, 2003. С. 125–139.
12. Anderson T.-H., Domsch K.H. Soil microbial biomass: The eco-physiological approach // *Soil Biol. Biochem.* 2010. Vol. 42, iss. 12. P. 2039–2043.
13. Condron L., Stark C., O'Callaghan M., Clinton P., Huang Z. The Role of Microbial Communities in the Formation and Decomposition of Soil Organic Matter // *Soil Microbiology and Sustainable Crop Production*. L.; N.Y.: Springer Science + Business Media B.V., 2010. P. 81–117.
14. Dilly O. Regulation of the respiratory quotient of soil microbiota by availability of nutrients // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2003. Vol. 43. P. 375–381.
15. Morris S.J. Spatial distribution of fungal and bacterial biomass in southern Ohio hardwood forest soils: fine scale variability and microscale patterns // *Soil Biol. Biochem.* 1999. Vol. 31, N 10. P. 1375–1386.
16. Parkin T.B. Spatial variability of microbial processes in soil: a review // *Environ. Quality*. 1993. Vol. 22, N 3. P. 409–417.
17. Ruess R.W., Seagle S.W. Landscape patterns in soil microbial processes in the Serengeti national park, Tanzania // *Ecology*. 1994. Vol. 75, N 4. P. 892–904.
18. Raubuch M., Beese F. Pattern of microbial indicators in forest soils along an European transect // *Biol. Fertil. Soils*. 1995. Vol. 19, N 4. P. 362–368.
19. Schulz S., Brankatschk R., Dumig A., Kogel-Knabner I., Schloter M., Zeyer J. The role of microorganisms at different stages of ecosystem development for soil formation // *Biogeosciences*. 2013. Vol. 10. P. 3983–3996.
20. Yan T., Yang L., Campbell C.D. Microbial biomass and metabolic quotient of soils under different land use in Three Gorges Reservoir area // *Geoderma*. 2003. Vol. 115. P. 129–138.
21. Zak D.R., Tilman D., Parmenter R.R., Rice C.W., Fisher F.M., Vose J., Milchunas D., Martin C.W. Plant production and soil microorganisms in late-successional ecosystems: a continental-scale study // *Ecology*. 1994. Vol. 75, N 8. P. 2333–2347.