

УДК 633.2:577.486:581.524.34

К ВОПРОСУ О ВРЕМЕНИ ПРОВЕДЕНИЯ ПОЧВЕННЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

И.М. Малиновская

Национальный научный центр “Институт земледелия НААН”

Киевская обл., Киево-Святошинский р-н, п.г.т Чабаны, ул. Машиностроителей, 2б,
(*irina.malinovskaya.1960@mail.ru*)

Изучали состояние микробных сообществ темно-серой оподзоленной почвы в корневой зоне растений сои в период от конца цветения до начала налива бобов и после окончания вегетации. Установлено, что максимальные различия между исследованными вариантами опыта наблюдаются в период наивысшего вегетативного развития растений, затем они начинают уменьшаться и после окончания вегетации становятся минимальными. Делается вывод о необходимости проведения микробиологических исследований в фазу конца цветения – начала формирования генеративных органов.

Ключевые слова: азотобактер; вегетация; гумус; микробиологические процессы; стрептомицеты; органическое вещество.

Введение. В почвенной микробиологии не до конца решенным остается методический вопрос о том, когда правильнее изучать протекание микробиологических процессов: во время вегетации растений или же по окончании ее. Растения участвуют в формировании функциональной, таксономической и пространственной структуры микробного сообщества корнеобитаемого слоя почвы [1-4], причем, видовая принадлежность растения влияет на протекание микробиологических процессов [5, 6]. Характеристики почвы: содержание макро- и микроэлементов, pH, содержание гумуса, влажность и проницаемость для воздуха, пул фитотоксичных веществ, оставшихся от предыдущих вегетационных периодов, также существенно влияют на численность микроорганизмов отдельных функциональных и эколого-трофических групп. Однако те же самые факторы влияют и на развитие растений, которые в свою очередь выделяют корневые экссудаты, потребляемые ризосферной микрофлорой. Таким образом, направленность минерализационных и синтетических процессов в почве определяется множеством факторов: видом растения и составом его корневых выделений, агрохимическим фоном, который влияет на интенсивность развития растений, а значит, и количество корневых выделений, физико-химическими, сорбционными и фитотоксическими свойствами почвы, которые сформировались на протяжении ее длительной истории. Поэтому перед почвенными микробиологами встает вопрос о времени изучения состояния микробного сообщества какой-либо конкретной почвы: если это сделать во время вегетационного периода, то накладывается влияние со стороны растений, если же по окончании вегетации, можно избежать значительной части этого влияния. С целью частичного разъяснения этого вопроса проводились экспериментальные исследования структуры микробных сообществ темно-серой оподзоленной почвы в корневой зоне растений сои во время максимального вегетативного развития растений (фаза конца цветения – начала налива бобов) и по окончании вегетации – через 20 дней после уборки урожая.

Материалы и методы. Исследования проведены в системе локального мониторинга, созданного на базе стационарного опыта лаборатории интенсивных технологий зерновых колосовых культур и кукурузы ННЦ “Институт земледелия НААН”, размещенного на территории опытного хозяйства «Чабаны» в Киево-Святошинском районе Киевской области на правом берегу р. Днепр. Почва опытной делянки – темно-серая оподзоленная. До закладки опыта почва характеризовалась

следующими агрохимическими показателями: $pH_{(KCl)}$ – 5,2; гидролитическая кислотность – 2,9; сумма поглощенных оснований – 12,5 мэкв на 100 г почвы; общее содержание гумуса – 2,0 %; содержание подвижных фосфатов – 16,0, обменного калия – 14,0 мг/100 г почвы.

Объектом исследования были варианты стационарного опыта с запахиванием побочной продукции растениеводства (1 – внесение минеральных удобрений в дозе $N_{20}P_{30}K_{30}$; 2 – $N_{40}P_{60}K_{60}$; 3 – $N_{60}P_{90}K_{90}$; 4 – фосфор и калий внесены в запас + $N_{40}P_{60}K_{60}$; 5 – без удобрений - контроль) и варианты без запахивания побочной продукции (6 – внесение минеральных удобрений в дозе $N_{40}P_{60}K_{60}$; 7 – без удобрений - контроль). В исследуемых вариантах выращивалась соя сорта Легенда, предшественник – озимые зерновые. Площадь опытной делянки 420 м², учетной – 25,0 м². Повторность – четырехразовая.

Численность микроорганизмов основных эколого-трофических групп оценивали методом посева почвенной суспензии на соответствующие питательные среды [7]. Показатели интенсивности процессов минерализации и фитотоксические качества почвы определяли в соответствии с описанным ранее методом [6]. Коэффициент удельной фосфатрастворяющей активности (Кг) определяли на агаризованных средах по разработанному нами методу [8]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием современных программ *Microsoft Excel*.

Результаты и их обсуждение. Анализ полученных экспериментальных данных показывает, что по окончании вегетационного периода численность и физиолого-биохимическая активность микроорганизмов основных эколого-трофических групп, по сравнению с периодом максимального вегетативного развития растений, существенно изменилась. Так, численность аммонификаторов в почве всех исследованных вариантов сократилась в 1,2-4,6 раза, максимально – в почве варианта с минимальной дозой минеральных удобрений (табл.1 и 2). Количество нитрификаторов, которые следуют за аммонификаторами в цикле превращений соединений азота, также уменьшилось по окончании вегетации в среднем в 1,9 раза. Напротив, численность иммобилизаторов минерального азота увеличилась в 1,5-4,0 раза, что свидетельствует об активизации иммобилизации соединений азота в биомассе микроорганизмов.

Количество и физиолого-биохимическая активность денитрификаторов в фазе максимального вегетативного развития растений сои зависели от внесенной дозы азотных минеральных удобрений, и были наивысшими в вариантах с максимальными дозами удобрений (табл. 1). По окончании вегетационного периода количество и физиолого-биохимическая активность денитрификаторов увеличились до максимальных значений во всех вариантах опыта независимо от внесенной дозы удобрений (табл. 2). Причиной этого является, вероятно, исчезновение из агроценоза растений, которые были основными потребителями азота, фиксированного микрофлорой корневой зоне. Именно этот азот становится доступным денитрификаторам, следствием чего является вспышка активности денитрификационного процесса, что подтверждает данные, полученные для сои ранее [9]. Является ли эта закономерность общей для всех фитоценозов, или же касается только зерно-бобовых культур – задача для дальнейших исследований.

На основе многолетних наблюдений над монокультурами и травосмесями бобовых было показано, что в ризосфере растений, особенно бактериализованных комплексными препаратами полифункционального действия, ингибируется развитие свободноживущих азотфиксаторов, в частности, азотобактера [5, 6, 9]. Количество азотобактера в ризосфере сои постепенно уменьшается по фазам онтогенеза: в фазу начала цветения – в 1,3 раза, в фазу формирования бобов – в 14,4 раза (по сравнению с периодом посева).

1. Численность микроорганизмов в темно-серой оподзоленной почве в корневой зоне растений сои (конец цветения и начало налива бобов)

Вариант		Количество микроорганизмов, млн КОЕ ¹⁾ /г абсолютно сухой почвы														
		Аммонификаторы	Иммобилизаторы минерального азота	Олигонитрофилы	Азотобактер, % обростающих почвенных комков	Денитрификаторы	Нитрификаторы	Педотрофы	Целлюлозо-разлагающие	Полисахарид-синтезирующие	Авотхтонные	Стрептомицеты	Микромицеты	Мобилизаторы минеральных фосфатов	Кислотообразующие	Общая численность
Запахивание побочной продукции растениеводства	N ₂₀ P ₃₀ K ₃₀	880,1	17,7	14,8	9,00	8,30	0,17	66,8	14,4	0,10	2,1	4,10	0,347	1,80	0,10	1019,8
	N ₄₀ P ₆₀ K ₆₀	937,2	39,8	27,9	2,01	10,6	0,56	163,3	55,4	2,21	10,5	8,91	1,369	5,21	1,86	1267,8
	N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀	747,4	20,7	26,7	2,67	152,4	0,50	100,5	27,8	1,10	8,8	9,82	1,543	11,6	2,54	1119,4
Без запахивания побочной продукции	N ₄₀ P ₆₀ K ₆₀ +PK 40 мг на 100 г почвы ²⁾	476,7	58,9	52,7	0,20	119,1	0,26	132,2	67,2	2,21	9,0	16,3	0,256	10,8	19,5	965,3
	Без удобрений	402,4	42,1	34,9	97,3	23,9	0,25	101,3	57,5	3,42	9,1	12,8	0,331	5,30	14,7	905,3
	N ₄₀ P ₆₀ K ₆₀	412,7	44,9	33,3	76,0	48,8	0,30	59,0	60,8	2,20	9,2	14,8	0,148	9,10	9,40	780,6
HCP ₀₅	Без удобрений	470,2	44,7	47,9	41,3	21,6	0,24	66,7	84,0	7,61	12,4	11,2	2,102	10,5	6,81	873,4
	Итого	5,05	2,54	4,15	0,92	2,00	0,02	5,04	2,01	0,45	0,68	1,03	0,01	0,76	1,06	

¹⁾ КОЕ – колониальнообразующая единица;

²⁾ 40 мг РК на 100 г почвы – искусственно созданный фон по содержанию подвижных соединений фосфора и обменного калия путем их разового внесения в виде минеральных удобрений

2. Численность микроорганизмов в темно-серой оподзоленной почве после окончания вегетирования сои

Вариант		Количество микроорганизмов, млн КОЕ ¹⁾ /г абсолютно сухой почвы														
		Аммонификаторы	Иммобилизаторы минерального азота	Олигонитрофилы	Азотобактер, % обростающих почвенных комков	Денитрификаторы	Нитрификаторы	Педотрофы	Целлюлозо-разлагающие	Полисахарид-синтезирующие	Авотхтонные	Стрептомицеты	Микромицеты	Мобилизаторы минеральных фосфатов	К _т	Общая численность
Запахивание побочной продукции растениеводства	N ₂₀ P ₃₀ K ₃₀	191,7	71,6	38,0	32,0	120,5	0,13	22,6	33,2	2,56	11,9	26,3	0,106	40,5	0,640	591,17
	N ₄₀ P ₆₀ K ₆₀	356,7	59,7	35,0	3,00	154,7	0,28	81,8	28,7	4,42	13,5	16,6	0,413	27,3	0,757	782,1
	N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀	270,1	71,7	39,9	8,01	154,3	0,25	51,8	29,4	0,74	10,0	13,2	0,209	15,9	0,625	665,5
Без запахивания побочной продукции	N ₄₀ P ₆₀ K ₆₀ +PK 40 мг на 100 г почвы ²⁾	208,2	58,8	40,5	9,33	120,5	0,14	103,7	31,8	5,11	9,8	12,0	0,137	11,7	0,571	611,7
	Без удобрений	203,3	39,2	24,3	99,3	49,0	0,20	30,1	22,5	3,99	8,6	7,63	0,120	21,8	0,706	510,0
	N ₄₀ P ₆₀ K ₆₀	355,1	64,1	21,6	9,33	153,7	0,11	23,6	29,6	1,46	9,9	10,3	0,152	19,4	0,726	698,4
HCP ₀₅	Без удобрений	225,6	83,3	16,4	83,3	120,1	0,12	18,6	28,0	1,09	7,3	16,4	0,075	5,82	1,214	606,1
	Итого	5,00	5,45	1,95	4,62	10,2	0,04	6,52	2,14	0,22	1,90	2,85	0,030	3,48		

¹⁾ и ²⁾ смотри табл. 1

В конце вегетации растений (фаза полной спелости) количество азотобактера снова увеличивается [9]. В представленных данных мы также наблюдаем увеличение количества азотобактера после окончания вегетации во всех вариантах опыта, предусматривающих запахивание побочной продукции предшественника в севообороте, в 1,5-46,7 раза (табл. 1, 2). Единственным вариантом, в почве которого количество азотобактера не увеличилось, а уменьшилось в 8,2 раза – это вариант с внесением $N_{40}P_{60}K_{60}$ без запахивания побочной продукции. Возможно, имеет место какая-то флуктуация численности в исследованиях первого периода, поскольку внесение минеральных удобрений, особенно азотсодержащих, закономерно приводит к угнетению азотобактера, чего мы не зафиксировали в этом варианте опыта (табл.1). Количество азотобактера в корневой зоне растений аналогичного варианта с запахиванием побочной продукции было минимальным и в период максимального вегетативного развития и по окончании вегетации. Те же самые наблюдения можно сделать относительно распространения азотобактера в почве других вариантов с внесением минеральных удобрений – они подавляют развитие азотобактера, и их последствие сохраняется по окончании вегетационного периода.

Можно предположить, что развитие азотобактера в течение вегетационного периода в ризосфере бобовых растений сдерживается азотофиксирующими микроорганизмами, находящимися с растением в ассоциативных взаимоотношениях, и развитие которых растение специфично стимулирует изменением состава корневых выделений. В качестве таковых могут выступать как представители ассоциативных азотофиксаторов, населяющие данную почву, так и клетки биоагентов инокуляционных препаратов, изготавливаемых на основе *Bradyrhizobium japonicum* и используемых для предпосевной бактеризации семян сои. Известно, что при формировании элементов симбиотического аппарата в растение проникает только незначительная часть интродуцированных клеток. Большая часть из 200000 клеток, которые используют для бактеризации одного семени, остаются в окружающей почве, которая впоследствии становится корневой зоной и в которой брадиоризобии развиваются, выполняя функцию ассоциативной фиксации атмосферного азота и популяция которых целенаправленно поддерживается растением. Таким образом, вытеснение азотобактера из почвы корневой зоны бобовых относится к области конкурентных взаимоотношений между микроорганизмами близких по физиологии групп – свободноживущих и ассоциативных азотофиксаторов.

Анализ экспериментальных данных также показывает, что численность азотобактера максимальна в почве многолетних контролей, куда органические и минеральные удобрения не вносятся с 1987 года (табл.1 и 2). Это позволяет, с одной стороны, говорить о невозможности использования этого микроорганизма как индикаторного эффективного плодородия почвы, поскольку в контролях получают минимальные урожаи; с другой стороны, можно рассматривать этот микроорганизм как индикатор экологического благополучия агроценозов, что согласуется с мнением других исследователей, поскольку именно с минеральными и органическими удобрениями в почву попадают многие поллютанты [11, 12].

По окончании вегетационного периода в почве существенно (в 5,3-22,5 раза) возрастает количество микроорганизмов, мобилизующих фосфор из его нерастворимых минеральных форм (табл. 1, 2). Максимально количество мобилизаторов минеральных фосфатов возрастает в варианте с наименьшей дозой минеральных удобрений ($N_{20}P_{30}K_{30}$). Вариант опыта с внесением фосфора и калия в запас и обеспечением 40 мг/100 г почвы подвижных фосфора и калия характеризуется средним количеством фосфатмобилизующих бактерий как в период максимального вегетативного развития растений, так и по окончании вегетации (табл.1, 2). При этом коэффициент удельной фосфатрастворяющей активности в

этом варианте опыта минимален в отличие от контролей, которые характеризуются высоким уровнем удельной фосфатрастворяющей активности.

Согласно исследованиям Головченко и Полянской [10], плотность стрептомицетного мицелия возрастает к осеннему периоду в 4-7 раз. Эта закономерность подтверждена нами только отчасти: в части вариантов опыта численность КУО стрептомицетов возрастает в 1,4-6,4 раза, а в трех вариантах опыта она снижается. Поскольку в работе Головченко и Полянской дата проведения исследований не детализирована (весна-лето-осень), то возможно, речь идет о глубокой осени, и в преддверье количество стрептомицетов резко возрастет. Опубликованы также данные Шурхо с соавт. [13], согласно которым, в ризосфере многолетних бобовых трав к концу полевого сезона (сентябрь) численность актиномицетов и бактерий снижается, а численность микромицетов увеличивается. Нам не удалось подтвердить эту закономерность – согласно приведенным результатам, численность микромицетов резко снизилась после окончания вегетации (табл. 2).

Количество целлюлозоразлагающих бактерий существенно уменьшилось после прекращения вегетации, а количество автохтонных – напротив, увеличилось. Причиной чего является прекращение притока в почву легкодоступного материала корневых экссудатов, которые потреблялись бактериями цикла углерода. В результате исчезновения легкодоступных субстратов активизируются микроорганизмы, разлагающие труднодоступные молекулы, в том числе, гумусовые. Это подтверждается также результатами расчета активности минерализации гумуса: летом она в 1,4-5,3 раза ниже, чем осенью (табл. 3). Такие же выводы можно сделать относительно индекса педотрофности, которым описывается интенсивность расходования почвенного органического вещества. Таким образом, с исчезновением растений из агрофитоценоза активность минерализации общего органического вещества почвы, и особенно гумуса, резко возрастает.

3. Показатели интенсивности минерализационных процессов и фитотоксические свойства темно-серой оподзоленной почвы в корневой зоне растений сои

Вариант		Индекс педотрофности		Коэф-фициент олиготрофности		Коэф-фициент минерализации азота		Активность минерализации гумуса, %		Масса 100 растений тест-культуры – озимой пшеницы, г					
		1	2	1	2	1	2	1	2	стебли		корни		общая	
										1	2	1	2	1	2
Запахивание побочной продукции расте- ниеводства	N ₂₀ P ₃₀ K ₃₀	0,076	0,373	0,017	0,198	0,020	0,373	3,14	16,6	7,77	6,10	7,31	8,34	15,1	14,4
	N ₄₀ P ₆₀ K ₆₀	0,174	0,155	0,030	0,066	0,042	0,113	6,43	16,5	9,02	7,58	7,88	9,59	16,9	17,2
	N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀	0,134	0,192	0,036	0,148	0,028	0,265	8,76	19,3	8,89	8,27	6,71	9,93	15,6	18,2
	N ₄₀ P ₆₀ K ₆₀ ⁺ РК 40 мг на 100 г почвы	0,277	0,498	0,111	0,195	0,123	0,282	6,81	9,40	8,71	8,38	7,52	11,7	16,2	20,1
	Без удобрений	0,252	0,148	0,087	0,120	0,105	0,193	8,98	28,6	8,38	6,98	7,01	10,4	15,4	17,4
Без запахивания побочной продукции	N ₄₀ P ₆₀ K ₆₀	0,143	0,066	0,081	0,061	0,109	0,180	15,6	41,9	7,58	7,94	7,64	10,9	15,2	18,9
	Без удобрений	0,142	0,082	0,102	0,073	0,095	0,369	18,6	39,2	7,45	7,17	6,67	10,1	14,1	17,2
HCP ₀₅		-	-	-	-	-	-	-	-	0,08	0,03	0,05	0,04	-	-

Примечание: 1 – фаза конца цветения и начала налива бобов, 2 – фаза окончания вегетирования сои

Вывод. Таким образом, процессы, происходящие в сложных многофакторных системах, каковой является почва корневой зоны растений в агроценозах, развиваются в динамике соответственно фазам роста растений, выделяющих корневые экссудаты, которые являются субстратами для роста микроорганизмов многих функциональных групп. Изменение интенсивности синтетических и минерализационных микробиологических процессов во многом определяется количеством и составом этих корневых

выделений. Поэтому максимальные различия между почвой исследуемых вариантов наблюдаются именно в фазу максимального вегетативного развития растений, затем они начинают уменьшаться. Для объективной микробиологической оценки, например, элементов технологий, агрофонов и пр., нужно исследовать почвенные образцы именно в период, предшествующий началу формирования генеративных органов. Требования многих оппонентов почвенных микробиологических работ приводят усредненные данные за вегетационный период, на наш взгляд, необоснованны, как с точки зрения объема публикуемого материала, так и закономерностей развития микробных сообществ по фазам вегетации культур.

Список использованной литературы

1. *Азарова Т.С.* Корневые выделения злаковых и бобовых культур и их влияние на состав модельного микробиоценоза ризосферы / Т.С. Азарова. - Дис.....канд. биол. наук: 03.00.07 // ВНИИСХМ. – Ленинград, 1986. – 188 с.
2. *Звягинцев Д. Г.* Растения как центры бактериальных сообществ/ Д.Г. Звягинцев, Т.Г. Добровольская, Л.В. Лысак // Журнал общей биологии. – 1993. – Т. 54. – №2. – С. 183-199.
3. *Steer J., Harris J.A.* Shifts in the microbial community in rhizosphere and non-rhizosphere soils during the growth of *Agrostis stolonifera*/ J. Steer, J.A. Harris // *Soil Biology&Biochemistry*. – 2000. – V. 32. – P. 869-878.
4. *Самцевич С.А.* Корневые выделения растений и их значение/ С.А. Самцевич // Микробиологические процессы в почвах и урожайность сельскохозяйственных культур. - Вильнюс, 1986. - С. 301-303.
5. *Малиновская И.М.* Микробиологические процессы в ризосфере растений разных сельскохозяйственных культур/ И.М. Малиновская // Матеріали Всеукраїнської наукової конференції «Сільськогосподарська мікробіологія: здобутки та перспективи», Чернівці, 27-30 вересня – 2011. – С.250-255.
6. *Малиновская И.М.* Структура микробных сообществ корневой зоны фитоценозов разного типа/ И.М. Малиновская // Мікробіологія і Біотехнологія, Одеса. – 2011. – №4 – С.60-68
7. *Теппер Е.З.* Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И.Переверзева. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.
8. *Малиновская И.М.* Определение фосфатрастворяющей активности микроорганизмов на жидкой и агаризованных средах Муромцева / И.М. Малиновская // Агроекологічний журн. - 2002. - №3. – С.68-71
9. *Малиновская И.М.* Динамика формирования микробиоценоза ризосферы растений сои, бактериализованных азотфиксирующими и фосфатмобилизующими микроорганизмами/ И.М. Малиновская // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2007. – вип.6 – С.51-66.
10. *Головченко А.В.* Сезонная динамика численности и биомассы микроорганизмов по профилю почвы/ А.В. Головченко, Л.М. Полянская // Почвоведение. – 1996. - №10. – С.1227-1233.
11. *Селивановская С.Ю.* Влияние осадков сточных вод, содержащих металлы, на микробные сообщества серой лесной почвы / С.Ю. Селивановская, С.Н. Киямова, В.З. Латыпова, Ф.К. Алимova // Почвоведение. – 2002. - №5. – С.588-594.
12. *Kolosvary I.* Data concerning the possibility of using the abundance of the *Azotobacter* cells as bioindicator of soil pollution / I. Kolosvary // *Stud. Univ. Babeş-Bolyai. Biol.* – 1998. – N 1-2. – P.137-141.
13. *Шурхно Р.А.* Биологические свойства корнеобитаемой зоны многолетних бобовых трав/ Р.А. Шурхно, Н.В. Королева, Р.П. Наумова // Доклады Рос. академии с.-х. наук. – 2006. - №3. – С.31-36.

Статья поступила в редколлегия 20.12.2013.

THE QUESTION ABOUT TIME OF SOIL MICROBIOLOGICAL STUDIES

I.M. Malinovskaya

National Scientific Centre "Institute of Agriculture NAAS"

Kiev region , Kiev Svyatoshinsky district, s.m.t Shepherds str. Mashinostroiteley 2b,
(irina.malinovskaya.1960@mail.ru)

The state of microbial communities of dark gray podzolized soil in the rhizosphere of soybean plants was studied. The study was conducted during the end of flowering, start pouring in the beans and after the growing season. It was investigated that the maximum difference between the variants of experience observed during vegetative growth of plants, and they started to decrease and after the end of the growing season melts vegetation was minimal. Thus there is a need microbiological testing phase late flowering or beginning of formation of generative organs.

Key words: *microbiological processes; vegetation; Azotobacter; streptomycetes; organic matter; humus.*