

АГРОХИМИЯ И ПОЧВОВЕДЕНИЕ

УДК 631.43

doi: 10.17223/19988591/53/1

Е.В. Шенин^{1,2}, Н.В. Верховцева¹, А.В. Суздалева¹, К.Н. Абросимов²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

²Почвенный институт им. В.В. Докучаева, г. Москва, Россия

Рентгеновская компьютерная томография структуры корней и динамика почвенной биоты на ранних стадиях роста ячменя (*Hordeum vulgare* L.)

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект No. 19–29–05112А, «Трансформация свойств и строения внутриагрегатных пор суглинистых почв при переменной влажности и внешней нагрузке», проекты фундаментальных научных исследований, 04 БИОЛОГИЯ, 04–180 Почвоведение; РНФ, проект No. 19–74–10070 «Универсальный метод сегментации томографических изображений порового пространства почв на основе машинного обучения: от современных локальных алгоритмов к синтетическим томограммам», а также с привлечением оборудования Центра коллективного пользования Почвенного института имени В.В. Докучаева «Функции и свойства почв и почвенного покрова».

Морфометрическое динамическое описание роста корней прорастающего семени и состава окружающей почвенной микробиоты в зависимости от архитектуры пахотного слоя почв является важной методической и практической проблемой в агропочвоведении, агрофизике и биологии почв. В модельном физическом опыте использованы семена ячменя (сорт Михайловский). Семена укладывали в специальные боксы из ПВХ объемом около 3 см³ на границе двух слоев различной плотности, насыпанных из гумусового горизонта (диапазон плотности почвы от 0,7 до 1,2 г/см³). Внутри бокса создавалась оптимальная для растений влажность. Гумусовый горизонт отобран из агродерново-подзолистой почвы – Albic Glossic Retisols (Lomic, Citanic). В период от посадки до 7 суток исследовали динамику развития корневой системы с помощью рентгеновского микротомографа «Bruker SkyScan 1172G» (Bruker, Бельгия). Созданная архитектура почвы по плотности существенно не влияла на рост и развитие корней во всех повторностях. Одновременно в динамике изучали состав почвенной микробиоты, который реконструировали по микробным маркерам (жирным кислотам и их производным). Маркеры определяли методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии. Общая численность бактерий увеличивалась к 5-м суткам при доминировании в биоте трех филумов: Actinobacteria, Proteobacteria и Firmicutes. В филуме Actinobacteria в наибольшем количестве представлены аэробные гидролитики сложных углеводов Rhodococcus equi, в филуме Firmicutes – анаэробный гидролитик

Ruminococcus sp. и анаэробный азотфиксатор *Clostridium pasteurianum*, а в филуме *Proteobacteria* – аэробный нитрификатор *Nitrobacter* sp. при последующем снижении численности на 7-е сутки. Увеличение обилия этих видов свидетельствует о первоначальном разрушении целлюлозной оболочки зерна, а также процессе фиксации и преобразовании азота в микробиоте прорастающего семени, необходимого для формирования C/N соотношения. Компьютерная томография позволила зафиксировать объемное распределение корней в различные периоды прорастания. На начальном этапе корни успешно осваивали все почвенное пространство вне зависимости от архитектуры пахотного слоя, созданной в экспериментах.

Ключевые слова: масс-спектрометрия; архитектура семенного ложа; агродерново-подзолистая почва; микробное сообщество; Albic; Glossic Retisols; Lomic; Cutanic.

Для цитирования: Шеин Е.В., Верховцева Н.В., Суздалева А.В., Абросимов К.Н. Рентгеновская компьютерная томография структуры корней и динамика почвенной биоты на ранних стадиях роста ячменя (*Hordeum vulgare* L.) // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 53. С. 6–21. doi: 10.17223/19988591/53/1

Введение

Ризосфера – поле исследования для ряда естественных наук, таких как земледелие, физика почв, микробиология, биофизика, биотехнология, молекулярная биология, экология и другие с интегрированными между собой комплексными фундаментальными и прикладными аспектами. Одним из важных начальных этапов жизни растения, играющих центральную роль в формировании урожая зерновых культур, является процесс прорастания семени. В этот период семя теряет состояние покоя, активируются генетические программы на развитие зародыша, мобилизуются запасы питательных веществ. Показано, что это строго координированный биохимический процесс [1, 2]. Важную роль в этой координации играют и сообщества микроорганизмов, которые находятся и на поверхности, и внутри семени [3], участвуя в гидролизе слоев семенной оболочки. Разнообразные ткани семени состоят из материалов, которые отличаются не только химическим составом, но и специфическими особенностями водопоглощения [4]. Научные проблемы, возникающие в этой определенной в пространстве и во времени системе почва – растение, являются весьма востребованными и информативными в отношении дальнейшей судьбы развития и роста растений, их функционирования, формирования продуктивности и ряда других биологических особенностей. Анализ системы почва – растение – почвенная биота является одной из задач современной агрофизики. В центре динамических взаимоотношений почва – микробиота – растение находятся вопросы и физики, и биофизики почв, так как структура семенного ложа и формирование корневой системы являются важнейшими параметрами, которые необходимо учитывать при совершенствовании агротехнологий [5, 6]. Именно в связи с этими особенностями формирования взаимодействий органов растений с окружающей почвенной средой в настоящее

время указанная проблематика является активно исследуемым направлением в агробиологии и, соответственно, в агрофизике и биофизике [6–8].

Почвенная структура и архитектура порового пространства представляет собой арену для развития почвенных процессов и физического, и биологического характера. В этой системе как агрегаты оказывают влияние на почвенную биоту, так и почвенные микроорганизмы участвуют в их формировании [9]. Отмечена необходимость сочетания томографического подхода с химическим и биологическим анализом. К такому выводу пришли М. Волотины с соавторами, исследуя потенциально благоприятные для развития микроорганизмов агрегаты с точки зрения морфологической доступности [10].

Следует отметить, что особое внимание в процессе формирования взаимоотношений прорастающего семени с окружающей почвой уделяется проблемам образования и развития вокруг него специфической микробиоты [11]. Считается, что группы микроорганизмов могут локально заселять корневую систему [12], иметь различный состав и существенную динамичность распределения вокруг прорастающего семени и развивающихся корней. Эта особенность – трудная для экспериментального исследования, в частности количественное ее решение в динамическом аспекте. Действительно, на данный момент практически не существует неразрушающих методов одновременного исследования формирования корневых систем, ризосферы и состава микробиоты в этой зоне. Отдельные попытки такого рода исследований пока лишь внушают надежду на проведение количественных экспериментов и получения стабильных взаимосвязей, в частности использование неразрушающих методов рентгеновской томографии [6, 13–15]. Однако даже применяя компьютерную томографию, остаются вопросы количественной характеристики распространения корней растений на начальном этапе, а также проблемы фиксации изменения микробиологической взаимосвязанной системы вокруг прорастающего семени и формирующейся ризосферы, что чрезвычайно важно для изучения и понимания проблем современной агробиологии, микробиологии и физики почв. Количественное решение обозначенных выше задач, особенно в их динамическом аспекте, – чрезвычайно сложная методическая проблема. В данной работе предпринята попытка методами рентгеновской компьютерной томографии изучить рост корней проростков ячменя на ранних стадиях развития при одновременном исследовании изменения численности и доминирующих групп микроорганизмов в прикорневой биоте.

Материалы и методики исследования

В качестве объектов изучения выбраны семена ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Михайловский. Средние значения для исследуемого объекта по энергии прорастания составляли 92%, по всхожести – 61%. Семена посажены в специальные рентген-прозрачные боксы с агродерново-подзоли-

стой почвой (по классификации WRB 2014 г. (версия 2015 г.)) – Albic Glossic Retisols (Lomic, Cutanic). Место отбора проб – Московская область, с. Ельдигино 56°07'23" северной широты, 37°48'16" восточной долготы. В бюксах создавалась определенная по плотности архитектура почвы: верхняя более рыхлая (надсеменная) часть семенного ложа состояла из просеянных агрегатов (3–5 мм), в нижней части – уплотненная неагрегированная та же самая почва, доведенная до плотности около 1,2 г/см³. Основные свойства агродерново-подзолистой почвы указаны в таблице.

Физические свойства пахотных гор дерново-подзолистой почвы
(Зеленоградский опорный пункт Почвенного института
имени В.В. Докучаева, Пушкинский р-н, Московская обл.)
[Physical properties of arable mountains of sod-podzolic soil (Zelenograd reference
point of V. V. Dokuchaev Soil Institute, Pushkinsky district, Moscow region)]

Глубина, см [Depth, cm]	Гранулометрический состав фракций, % масс. [Texture of soil, % mass]			НВ [FC], %	Коэффициент фильтрации, см/сут [Saturation con- ductivity, cm/day]	C _{org} , %
	< 0,002	0,002–0,05	> 0,05			
0–10	10,50	84,78	4,72	30,1	21,6	1,23

Примечание. НВ – наименьшая влагоемкость.

[Note. FC - field capacity].

В бюксах установлена оптимальная влажность (29–30%, близкая к наименьшей влагоемкости) для прорастания семени. Семя ячменя размещалось на границе двух слоев так, что оно лежало на плотном субстрате и укрывалось рыхлой агрегированной почвой.

Для томографической съемки использован рентгеновский микротомограф «Bruker SkyScan 1172G» (Bruker, Бельгия). Томографические исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования научным оборудованием «Функции и свойства почв и почвенного покрова» Почвенного института им. В.В. Докучаева. Томографическая съемка проведена на 1, 3, 4, 5, 6, 7-е сутки, несколько раз (в динамике) по мере роста семени при разрешении 16,1 μm. Параметры исследования, такие как размер образца и настройки съемки неоднократно отрабатывались в других исследованиях [16–22], но в данном случае важен приоритет скорости из-за быстрого роста корней. Томография одного сегмента (из пяти в образце) при оптимальных настройках занимает около 40–60 мин, но в нашем случае удалось сократить время до 10 минут за счет снижения количества накоплений и съемки объекта с поворотом на 180° вместо 360°. В результате обработки данных компьютерной томографии получена объемная структура с четко различимыми рентгенконтрастными фазами (почва, поровое пространство, зерно с проростком и корнями), но осложненное высокой шумностью изображения. Автоматическая

сегментация фаз в таких условиях оказалась частично работоспособной – методом Оцу [23] успешно можно сегментировать только почву. По этой причине в исследовании использована ручная сегментация с применением фильтров изображений, что с высокой степенью достоверности позволило разделить поровое пространство и органическое вещество прорастающего семени.

Помимо визуализации объемной структуры проросшего семени рассчитан объем семени и корней на каждом этапе исследования при помощи программного обеспечения Bruker CT analyzer (CTan).

Состав микробного сообщества реконструировали по микробным маркерам (жирным кислотам и их производным – жирным гидроксикислотам и альдегидам), которые определяли после кислого метанолиза почвенных образцов молекулярным методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС). Анализ проводили на ГХ-МС системе «HP-5973 Agilent» (Agilent Technologies Inc, США). Подробно методика анализа описана в [24, 25]. Анализировали следующие образцы: контрольный образец – исходная почва, в которой не производилось выращивание ячменя; почва из образцов с прорастающим семенем ячменя на 5-е и 7-е сутки. Измерения проведены в трехкратной повторности.

Гранулометрический состав исследуемых почвенных объектов определен методом лазерной дифракции, на лазерном анализаторе размера частиц «Analysette 22 comfort» (FRITCH, Германия). Определение содержания углерода в почвенных образцах проведено методом сухого сжигания в потоке воздуха – с помощью экспресс-анализатора «АН- 7529» (завод-изготовитель ПО «Измеритель», г. Гомель) [26]. Плотность почв, наименьшая влагоемкость, коэффициент фильтрации определены общепринятыми методами, подробно описанными в [27].

Результаты исследования и обсуждение

Анализ томографического изображения (рис. 1) экспериментального бокса с почвой показывает, что как на горизонтальном, так и на вертикальном срезах отчетливо различаются надсеменной и подстилающий подсеменной слои различной плотности. На снимках хорошо видно и положение семени ячменя в подготовленном боксе с двуслойной почвенной архитектурой, ясно выделяется различие в поровом пространстве двух слоев специально созданной архитектуры семенного ложа. Верхний, состоящий из водоустойчивых агрегатов агродерново-подзолистой почвы, имел высокую пористость с отдельными явно заметными макропорами. Межагрегатные поры в этом слое имели размер до 0,6–0,8 мм, что способствовало хорошей аэрации надсеменного слоя. Нижний, более плотный и однородный, представлял более близкую к однородной пористости массу, на которой находилось семя. Тонкие поры имели в основном диаметр 0,015–0,02 мм. Нижний, более плотный и однородный, слой представлял более близкую к однородности по пористости массу, на которой и находилось семя.

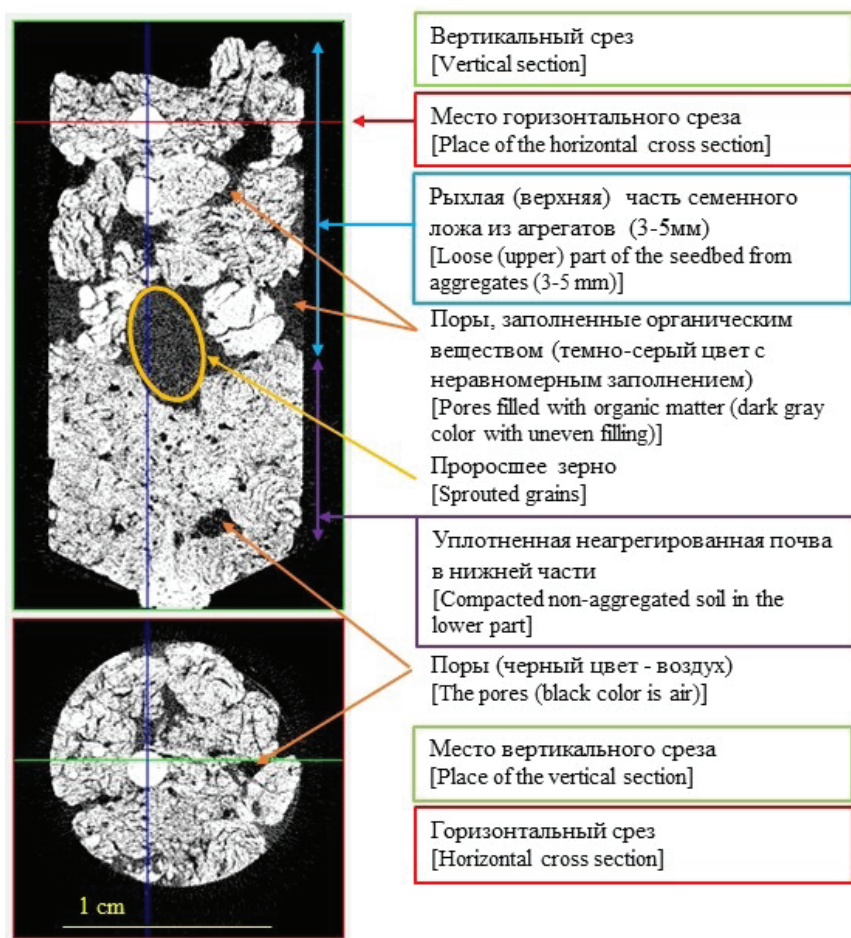


Рис. 1. Томографическое изображение почвы в боковых вертикальном и горизонтальном срезах. Видно положение семени и границы между уплотненным и рыхлым (агрегатными) слоями.

В центре вертикального среза отмечено положение семени

[Fig. 1. Tomographic image of the soil in the lateral vertical and horizontal sections.

Visible position of the seed and the border between the compacted and loose (aggregation) layers. In the center of the vertical section, the position of the seed is marked]

На рис. 2 показана томографическая реконструкция прорастающего семени ячменя на 4-й день после посадки. На томограмме хорошо различаются coleoptile и растущие корни. Развитие корней происходило во всех повторностях идентичным образом. Созданная архитектура почвы по плотности не оказала существенного пагубного влияния на рост корней. Видимо, в этот начальный период роста во влажных условиях доминировали биологические программы роста растений, в которых геотропизм и необходимость освоения почвенного пространства играют главенствующую роль.

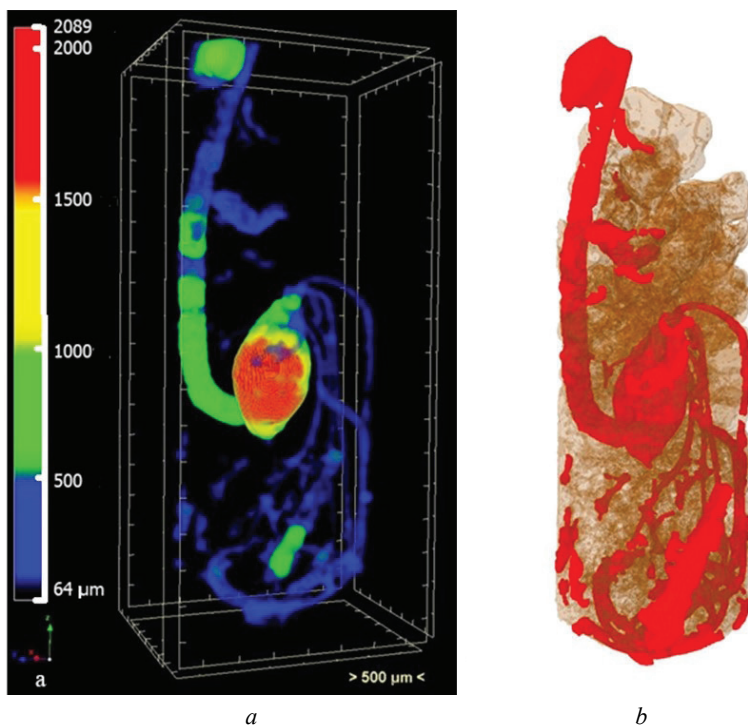


Рис. 2. Томографическая объемная реконструкция прорастания зерна ячменя на плотном зерновом ложе. Толщина семени, проростка и корней (а); моделирование проросшего семени (красный цвет) на фоне почвы (коричневый цвет) (b)

[Fig. 2. Tomographic reconstruction (3-D) of barley grain germination on a dense soil grain bed. The thickness of the seed, seedling and roots (a); modeling of sprouted seed (red) against the background of the soil (brown) (b)]

При помощи томографической съемки наблюдалось сокращение объемов семени за период с 3-х по 7-е сутки с 50 до 36% от общего объема растения, находящегося в зоне наблюдения. При этом изменение доли объема, занимаемой корневой массой, составило от 22 до 61%.

Реконструированный состав микробного комплекса по жирнокислотному анализу мембранных структур бактерий с использованием баз этих микробных маркеров («Sherlock MIDI Inc» (США) и «Entire Collection» (Швеция)) показал, что он включает 38 видов микроорганизмов, относящихся к пяти филумам.

На рис. 3 приведена статистика количества бактерий основных групп микроорганизмов. По оси абсцисс указаны виды в различные сроки наблюдений: К – контроль, исходная почва, в которой не производилось выращивание ячменя; 5 – на пятый день; 7 – на седьмой день опыта; через нижнее подчеркивание указаны виды бактерий, для которых приведена статистика. Следует отметить явное и статистически значимое доминирование рода *Ruminococcus* и филума Actinobacteria, в особенности на 5-й день эксперимента.

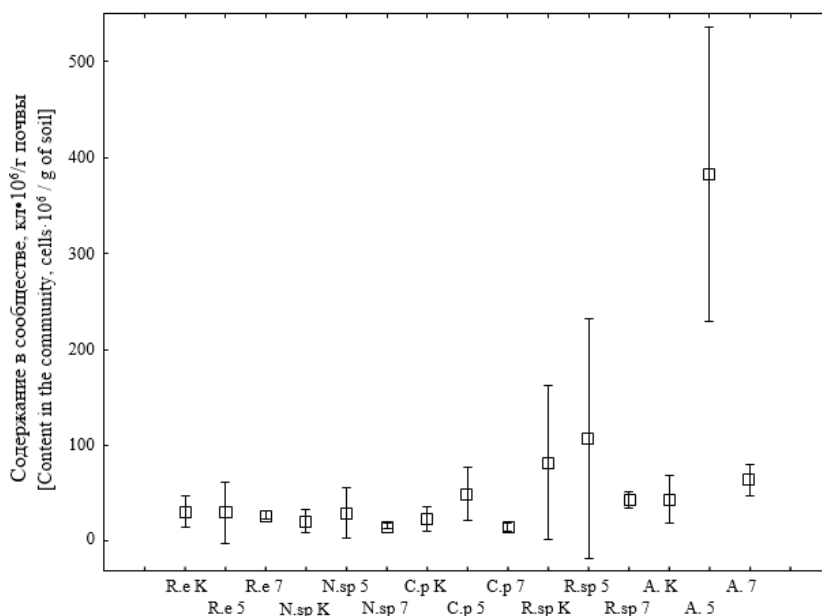


Рис. 3. Статистика количества микроорганизмов (кл·10⁶/г) различных видов в почвенных образцах: исходная почва, без растений (К) и на 5-е и 7-е сут. К – исходная почва без выращивания растений ячменя; 5 и 7 – почва из образцов с прорастающим семенем ячменя на 5-е и 7-е сутки соответственно
[Fig. 3. Statistics of the number of microorganisms, cells·10⁶ /g of different types of soil samples. K - The original soil in which no barley plants were grown; 5 and 7 - Sample soils with the germinating barley seed on the 5th and the 7th days]

(□ Mean □ Mean±SD ⊥ Mean±1,96*SD):

R.e – *Rhodococcus equi*, N.sp – *Nitrobacter* sp., C.p – *Clostridium pasteurianum*,
 R.sp – *Ruminococcus* sp., A. – *Actinobacteria*

Следует отметить, что общая численность бактерий также увеличивалась к 5-м суткам при постоянном доминировании в микробиоте трёх филумов – *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Firmicutes*, два других – *Bacteroidetes* и *Cyanobacteria* – представлены в незначительном количестве. На рис. 4 представлена динамика основных пяти филумов бактерий на 5-е и 7-е сутки проращивания. Статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение численности бактерий отмечено на 5-е сутки проращивания для филума *Actinobacteria*.

В филуме *Actinobacteria* в наибольшем количестве на 5-е сутки представлены аэробные гидролитики сложных углеводов *Rhodococcus equi*, в филуме *Firmicutes* – анаэробный азотфиксатор *Clostridium pasteurianum*, в филуме *Proteobacteria* – аэробный нитрификатор *Nitrobacter* sp. при последующем снижении численности на 7-е сутки. Увеличение этих видов свидетельствует о первоначальном разрушении целлюлозной оболочки зерна и процессах фиксации и преобразования азота в микробиоте прорастающего семени, необходимого для формирования C/N соотношения.

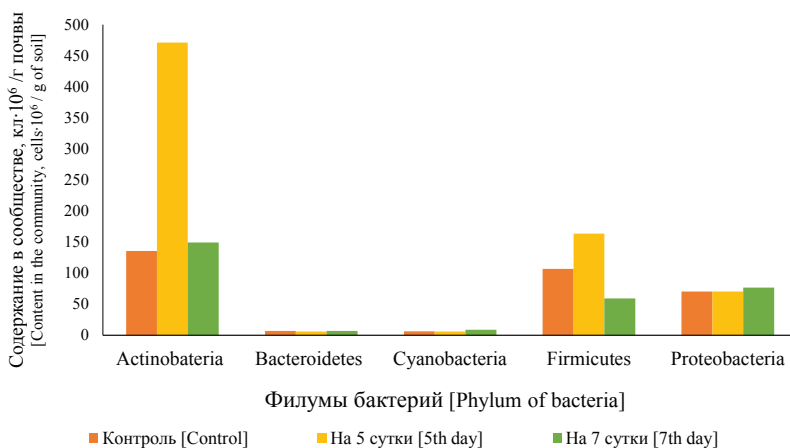


Рис. 4. Относительное обилие филумов бактерий
[Fig. 4. Relative abundance of bacterial phyla]

Увеличивалась численность *Cellulomonas* sp. на 5-е сутки с последующим снижением на 7-е. Этот вид является представителем факультативно анаэробных целлюлозолитиков, так же как и другой представитель филума Actinobacteria, *Pseudonocardia* sp. – активный целлюлозолитик с комплексом целлюлозолитических ферментов. Увеличение их численности на 5-е сутки, предположительно, связано с активным прорастанием семени и проявлением их функции, способствующей разрушению семенной оболочки. Продуктами гидролиза целлюлозы могут быть углекислый газ, вода.

Тенденция пика численности на 5-е сутки со значительным ее сокращением к 7-м суткам проявляется и у анаэробных азотфиксаторов *C. pasteurianum*, что предположительно связано с иссушением почвы и сменой условий в сторону аэробных.

Наблюдаемое обилие анаэробных *Ruminococcus* sp. и видов железоредукторов можно объяснить химизмом дерново-подзолистой почвы, присутствием $\text{Fe}(\text{OH})_3$ в почвенно-поглощающем комплексе, который восстанавливается анаэробными железоредукторами. Так же как и у других анаэробов, их численность снижается к 7-м суткам. Эти виды в процессе своего анаэробного метаболизма образуют такие газообразные компоненты почвенного воздуха, как водород, углекислый газ, кислород.

Постепенное увеличение численности к 7-м суткам происходило у аэробных видов, таких как *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. vesicularis*, *Sphingomonas adgesiva*, что также косвенно свидетельствует об изменении газового состава в сторону аэробных условий. По мере изменения газового режима изменялась численность аэробных и анаэробных микроорганизмов, соответственно.

В составе микробиоты доминировал филум Actinobacteria, а из видов – *Rhodococcus equi* на всем промежутке исследования. При этом к 5-м суткам экс-

перимента содержание актинобактерий возрастало, по-видимому, из-за участия этих микроорганизмов в распаде семенной оболочки. В дальнейшем, вплоть до окончания эксперимента на 7–10-е сутки содержание актинобактерий несколько уменьшилось, практически достигнув исходного уровня.

Таким образом, даже в первый этап прорастания семени численность и состав почвенной биоты подвергалась динамическим изменениям, протекающим физиологически согласованно с процессом прорастания. Иссущение почвы приводит к увеличению численности аэробных видов к 7-м суткам и уменьшению анаэробных видов. Представленное на томографической съемке снижение объема семени за период с 3-х по 7-е сутки с 50 до 36% от общего объема растения происходило при постоянном доминировании в микробиоте актинобактерий (аэробные *Rhodococcus equi*) – «активных гидролитиков», разлагающих сложные органические соединения (оболочку семени) в аэробных условиях. При этом суммарная численность бактерий увеличивалась к 5-м суткам. В последующие 2 суток она снижалась (уменьшается численность актинобактерий), что связано, по-видимому, с окончанием разрушения оболочки семени.

В ходе прорастания семени формируются поры, заполненные водой, газом или органическим веществом. Структура микробного сообщества изменяется в ответ на происходящие процессы, при этом происходит накопление продуктов метаболизма аэробных и анаэробных видов микроорганизмов. Количественное исследование комплекса микроорганизмов молекулярным методом позволяет отобразить реакцию микробиома на структурные изменения в почве, так как определенные условия стимулируют увеличение доли в сообществе видов с соответствующими экологическими функциями. Сочетание с компьютерной визуализацией, полученной в результате применения метода рентгеновской томографии, позволяет яснее охарактеризовать происходящие в ризосфере процессы.

Выводы

1. Компьютерная томография может быть успешно использована для визуализации роста корней в агрегированных негомогенных средах, в частности в агрегированном и уплотненном слоях агродерново-подзолистой почвы. К недостаткам метода можно отнести отсутствие отработанных методик съемки живых объектов и затруднения при сегментации проросшего семени и порового пространства.

2. На первых стадиях проростков ячменя (7 дней после посадки) корни успешно осваивают все почвенное пространство вне зависимости от исследованной в экспериментах плотности (в диапазоне 1,2–0,7 г/см³).

3. Общая численность бактерий увеличивается к 5-м суткам при постоянном доминировании в микробиоте активных гидролитиков филума *Actinobacteria* (аэробные *Rhodococcus equi*) с последующим её снижением на 7-е сутки, что связано, по-видимому, с разрушением семенной оболочки.

Литература

1. He H., Willems LAJ., Batushansky A., Fait A., Hanson J., Nijveen H., Hilhorst HWM., Bentsink L. Effects of Parental Temperature and Nitrate on Seed Performance are Reflected by Partly Overlapping Genetic and Metabolic Pathways // *Plant and Cell Physiology*. 2016. Vol. 57, No. 3. PP. 473–487. doi: [10.1093/pcp/pcv207](https://doi.org/10.1093/pcp/pcv207)
2. Kai Shu, Xiao-dong Liu, Qi Xie, Zu-hua He. Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination // *Molecular plant*. 2016. Vol. 9. PP. 34–45. doi: [10.1016/j.molp.2015.08.010](https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.010)
3. Artursson V., Finlay R.D., Jansson J.K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth // *Environmental microbiology*. 2006. No. 8. PP. 1–10. doi: [10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x)
4. Steinbrecher T., Leubner-Metzger G. The biomechanics of seed germination // *Journal of Experimental Botany*. 2017. Vol. 68, No. 4. PP. 765–783. doi: [10.1093/jxb/erw428](https://doi.org/10.1093/jxb/erw428)
5. Круглов Ю.В., Умаров М.М., Мазиров М.А., Хохлов Н.Ф., Патыка Н.В., Думова В.А., Андронов Е.Е., Костина Н.В., Голиченков М.В. Изменение агрофизических свойств и микробиологических процессов дерново-подзолистой почвы в экстремальных условиях высокой температуры и засухи // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2012. Вып. 3. С. 79–87.
6. Mawodza T., Burca G., Casson S., Menon M. Wheat root system architecture and soil moisture distribution in an aggregated soil using neutron computed tomography // *Geoderma*. 2020. Vol. 359. 113988 doi: [10.1016/j.geoderma.2019.113988](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.113988)
7. Li W.Z., Zhou H., Chen X.M., Peng X.H., Yu X.C. Characterization of aggregate microstructures of paddy soils under different patterns of fertilization with synchrotron radiation micro-CT // *Acta Pedologica Sinica*. 2014. Vol. 51, No. 1. PP. 67–74. doi: [10.11766/trxb201307160340](https://doi.org/10.11766/trxb201307160340)
8. Daly K.R., Tracy S.R., Crout N.M.J., Mairhofer S., Pridmore T.P., Mooney S.J., Roose T. Quantification of root water uptake in soil using X-ray computed tomography and image-based modelling // *Plant Cell Environ*. 2018. Vol. 41, No. 1. PP. 121–133. doi: [10.1111/pce.12983](https://doi.org/10.1111/pce.12983)
9. Zhou H., Peng X., Peth S. Xiao T.Q. Effects of vegetation restoration on soil aggregate microstructure quantified with synchrotron-based micro-computed tomography // *Soil and Tillage Research*. 2012. Vol. 124. PP. 17–23. doi: [10.1016/J.STILL.2012.04.006](https://doi.org/10.1016/J.STILL.2012.04.006)
10. Voltolini M., Taş N., Wang S., Brodie E.L. Ajo-Franklin Quantitative characterization of soil microaggregates: New opportunities from sub-micron resolution synchrotron X-ray microtomography // *Geoderma*. 2017. Vol. 305. PP. 382–393. doi: [10.1016/j.geoderma.2017.06.005](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.06.005)
11. Marilley L., Aragno M. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots // *Applied soil ecology*. 1999. Vol. 13. PP. 127–136. doi: [10.1016/S0929-1393\(99\)00028-1](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(99)00028-1)
12. Yang C.H., Crowley D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location plant iron nutritional status // *Applied and environmental microbiology*. 2000. Vol. 66. PP. 345–351. doi: [10.1128/AEM.66.1.345-351.2000](https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.345-351.2000)
13. Gerke K.M., Skvortsova E.B., Korost D.V. Tomographic method of studying soil pore space: current perspectives and results for some Russian soils // *Eurasian Soil Sci*. 2012. Vol. 45, No. 7. PP. 700–709. doi: [10.1134/S1064229312070034](https://doi.org/10.1134/S1064229312070034)
14. Ivanov A.L., Shein E.V., Skvortsova E.B. Tomography of soil pores: from morphological characteristics to structural–functional assessment of pore space // *Eurasian Soil Sci*. 2019. Vol. 52, No. 1. PP. 50–57. doi: [10.1134/S106422931901006X](https://doi.org/10.1134/S106422931901006X)
15. Jiang Z., van Dijke M.I.J., Geiger S., Ma J., Couples G.D., Li X. Pore network extraction for fractured porous media // *Advances in Water Resources*. 2017. Vol. 107. PP. 280–289. doi: [10.1016/j.advwatres.2017.06.025](https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2017.06.025)

16. Skvortsova E.B., Shein E.V., Abrosimov K.N., Romanenko K.A., Yudina A.V., Klyueva V.V., Khaidapova D.D., Rogov V. V. The Impact of Multiple Freeze–Thaw Cycles on the Microstructure of Aggregates from a Soddy-Podzolic Soil: A Microtomographic Analysis // *Eurasian Soil Science*. 2018. Vol. 51, No. 2. PP. 190–199. doi: [10.1134/S1064229318020102](https://doi.org/10.1134/S1064229318020102)
17. Ivanov A.L., Shein E.V., Skvortsova E.B. Tomography of soil pores: from morphological characteristics to structural–functional assessment of pore space // *Eurasian Soil Science*. 2019. Vol. 52, No. 1. PP. 50–57. doi: [10.1134/S106422931901006X](https://doi.org/10.1134/S106422931901006X)
18. Müller K., Katuwal S., Young I., McLeod M., Moldrup P., de Jonge L.W., Clothier B. Characterising and linking X-ray CT derived macroporosity parameters to infiltration in soils with contrasting structures // *Geoderma*. 2018. Vol. 313. PP. 82–91. doi: [10.1016/j.geoderma.2017.10.020](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.10.020)
19. Helliwell J.R., Sturrock C.J., Grayling K.M., Tracy S.R., Flavel R.J., Young I.M., Whalley W.R., Mooney S.J. Applications of X-ray computed tomography for examining biophysical interactions and structural development in soil systems: a review // *European Journal of Soil Science*. 2013. Vol. 64. PP. 279–297. doi: [10.1111/ejss.12028](https://doi.org/10.1111/ejss.12028)
20. Borges J.A.R., Pires L.F., Cássaro F.A.M., Roque W.L., Heck R.J., Rosa J.A., Wolf F.G. X-ray microtomography analysis of representative elementary volume (REV) of soil morphological and geometrical properties // *Soil Tillage Research*. 2018. Vol. 182. PP. 112–122. doi: [10.1016/j.still.2018.05.004](https://doi.org/10.1016/j.still.2018.05.004)
21. Wildenschild D., Rivers M.L., Porter M.L., Iltis G.C., Armstrong R.T., Davit Y., Anderson S.H., Hopmans J.W. Using synchrotron-based X-ray microtomography and functional contrast agents in environmental applications In: *Soil–Water–Root Processes: Advances in Tomography and Imaging* // The Soil Science Society of America, Inc. 2013. PP. 1–22. doi: [10.2136/sssaspecpub61.c1](https://doi.org/10.2136/sssaspecpub61.c1)
22. Wildenschild D., Sheppard A.P. X-ray imaging and analysis techniques for quantifying pore-scale structure and processes in subsurface porous medium systems // *Advances in Water Resources*. 2013. Vol. 51. PP. 217–246. doi: [10.1016/j.advwatres.2012.07.018](https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2012.07.018)
23. Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms // *IEEE Trans. Sys., Man., Cyber.: journal*. 1979. Vol. 9. PP. 62–66. doi: [10.1109/TSMC.1979.4310076](https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076)
24. Verkhovtseva N.V., Osipov G.A. Comparative Investigation of Vermicompost Microbial Communities // *Microbiology of composting*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2002. PP. 99–108. doi: [10.1007/978-3-662-08724-4_8](https://doi.org/10.1007/978-3-662-08724-4_8)
25. Shekhovtsova N.V., Marakaev O.A., Pervushina K.A., Osipov G.A. The underground organ microbial complexes of moorland spotted orchid *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae) // *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2013. Vol. 4, No. 7B. PP. 35–42 doi: [10.4236/abb.2013.47A2005](https://doi.org/10.4236/abb.2013.47A2005)
26. Практикум по физике твердой фазы почв : учеб. пособие / Е.В. Шеин, Е.Ю. Милановский, Д.Д. Хайдапова, А.И. Поздняков, З.Н. Тюгай, Т.Н. Початкова, А.В. Дембовецкий. М. : Буки-Веди, 2017. 119 с.
27. Теории и методы физики почв / под ред. Е.В. Шеина, Л.О. Карпачевского. М. : Гриф и К., 2007. 616 с.

Поступила в редакцию 10.07.2020 г.; повторно 29.12.2020 г.;
принята 21.02.2021 г.; опубликована 31.03.2021 г.

Авторский коллектив:

Шеин Евгений Викторович, д-р биол. наук, профессор кафедры физики и мелиорации почв, факультет почвоведения, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Россия, 119991, г. Москва, Ленинские Горы, 1, стр. 12).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0101-5293>

E-mail: evgeny.shein@gmail.com

Верховцева Надежда Владимировна, д-р биол. наук, профессор кафедры агрохимии и биохимии растений, факультет почвоведения, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Россия, 119991, г. Москва, Ленинские Горы, 1, стр. 12).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-6830-4295>

E-mail: verh48@list.ru

Суздалева Ангелина Владимировна, аспирант кафедры физики и мелиорации почв, факультет почвоведения, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Россия, 119991, г. Москва, Ленинские Горы, 1, стр. 12).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1525-8605>

E-mail: avsuzdaleva@gmail.com

Абросимов Константин Николаевич, канд. геогр. наук, с.н.с. отдела физики, гидрологии и эрозии почв, Почвенный институт им. В.В. Докучаева (Россия, 119017 г. Москва, Россия, Пыжевский пер., 7, стр. 2).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-3552-8054>

E-mail: kv2@bk.ru

For citation: Shein EV, Verkhovtseva NV, Suzdaleva AV, Abrosimov KN. X-ray computed tomography of the structure of roots and dynamics of soil biota in the early growth stages of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;53:6-21. doi: 10.17223/19988591/53/1 In Russian, English Summary

**Evgeny V Shein^{1,2}, Nadezhda V Verkhovtseva¹,
Angelina V Suzdaleva¹, Konstantin N Abrosimov²**

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

²VV Dokuchaev Soil Science Institute, Moscow, Russian Federation

X-ray computed tomography of the structure of roots and dynamics of soil biota in the early growth stages of barley (*Hordeum vulgare* L.)

The architecture of the seed bed, a certain alternation of compacted and loose sections of the arable horizon, largely determines the development of the root system of plants. The morphology and growth of the root system of the germinating seed in the created seed bed is also determined by the composition of the surrounding soil biota. Dynamic studies of the development of the root system and composition of the surrounding soil biota is an essential methodological and practical problem in soil cultivation, agrophysics, and soil biology. This task is especially important in the first few days when the root system is laid and the plant rhizosphere is formed. Modern tomography makes it possible to carry out such studies that do not violate the soil-root biological system, in particular, in model mesoscale experimental physical models. The aim of this research was to use x-ray computed tomography to study the structure of the roots of barley seedlings in the early stages of development, while simultaneously studying changes in the number and dominant groups of microorganisms in the basal biota.

Barley seeds (variety Mikhailovsky) in a model physical experiment with a two-layer soil bed density (soil density range from 0.7 to 1.2 g / cm³) Albic Glossic Retisols (Lomic, Cutanic), WRB, 2014 were laid for germination at the layer boundary in a special cylindrical box with a volume of about 3 cm³ at optimal humidity. The position of the seed in the soil of the seedbed model is shown in the tomographic image (See Fig. 1). During the period from planting to 7 days, the dynamics of the root system was studied using a Bruker X-ray microtomography “SkyScan 1172G” (Bruker, Belgium) while studying the composition of soil biota, which was reconstructed by microbial markers (fatty acids and their derivatives). Markers were determined by molecular gas

chromatography - mass spectrometry. Computer tomography allowed to record the volume distribution of roots at different periods of germination in the aggregated and compacted layers of agro-sod-podzolic soil. In this case, the roots successfully mastered the entire soil space, regardless of the plowing architecture of soil density created at the initial stage of germination. The total number of bacteria also increased by the 5th day with the constant dominance of 3 phyla: Actinobacteria, Proteobacteria and Firmicutes in the biota; the other two, Bacteroidetes and Cyanobacteria, were represented in relatively small numbers. In the phylum Actinobacteria, aerobic hydrolytics of complex carbohydrates *Rhodococcus equi* were presented in the largest amount on the 5th day, in the Firmicutes phylum it is anaerobic hydrolytic *Ruminococcus* sp. and the anaerobic nitrogen fixator *Clostridium pasteurianum*, in the phylum Proteobacteria-the aerobic nitrifier *Nitrobacter* sp. with a subsequent decrease in the number on the 7th day. The increase in these species indicates the initial destruction of the cellulose shell of the grain and the processes of fixation and conversion of nitrogen in the microbiota of the germinating seed, necessary for the formation of the C/N ratio.

During the germination of the seed, pores are formed that are filled with water, gas, or organic matter. The structure of the microbial community changes in response to the ongoing processes, while the accumulation of metabolic products of aerobic and anaerobic species of microorganisms occurs. The quantitative study of the complex of microorganisms by the molecular method allows us to display the reaction of the microbiome to structural changes in the soil, since certain conditions stimulate an increase in the share of species with appropriate ecological functions in the community. The combination with the computer visualization obtained as a result of the application of the X-ray tomography method makes it possible to more clearly characterize the processes occurring in the rhizosphere.

The paper contains 3 Figures, 1 Table and 27 References.

Keywords: soil structure; seed bed architecture; soil biota; agro-soddy-podzolic soil; Albic Glossic Retisols; Lomic; Cutanic.

Funding: The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Project No. 19-29-05112A, “Transformation of properties and structure of intra-aggregate pores of loamy soils under variable humidity and external load”, projects of basic scientific research, 04 BIOLOGY, 04-180 soil science; Russian Science Foundation, Project No.19-74-10070 “Universal method of segmentation of tomographic images of soil pore space based on machine learning: from modern local algorithms to synthetic tomograms”, as well as with the involvement of the equipment of the Center for collective use of VV Dokuchaev Soil Institute “Functions and properties of soils and soil cover”.

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. He H, Willems LAJ, Batushansky A, Fait A, Hanson J, Nijveen H, Hilhorst HWM, Bentsink L. Effects of parental temperature and nitrate on seed performance are reflected by partly overlapping genetic and metabolic pathways. *Plant and Cell Physiology*. 2016;57(3):473-487. doi: [10.1093/pcp/pcv207](https://doi.org/10.1093/pcp/pcv207)
2. Kai Shu, Xiao-dong Liu, Qi Xie, Zu-hua He. Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Molecular Plant*. 2016;9:34-45. doi: [10.1016/j.molp.2015.08.010](https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.010)
3. Artursson V, Finlay RD, Jansson JK. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology*. 2006;8:1-10. doi: [10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x)
4. Steinbrecher T, Leubner-Metzger G. The biomechanics of seed germination. *J Experimental Botany*. 2017;68(4):765-783. doi: [10.1093/jxb/erw428](https://doi.org/10.1093/jxb/erw428)

5. Kruglov YuV, Umarov MM, Mazirov MA, Khokhlov NF, Patyka NV, Dumova VA, Andronov EE, Kostina NV, Golichenkov MV. Changes in both agro-physical properties and microbiological processes of sod-podzolic soils under extreme conditions of high temperature and drought. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2012;3:79-87. In Russian
6. Mawodza T, Burca G, Casson S, Menon M. Wheat root system architecture and soil moisture distribution in an aggregated soil using neutron computed tomography. *Geoderma*. 2020;359:113988. doi: [10.1016/j.geoderma.2019.113988](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.113988)
7. Li WZ, Zhou H, Chen XM, Peng XH, Yu XC. Characterization of aggregate microstructures of paddy soils under different patterns of fertilization with synchrotron radiation micro-CT. *Acta Pedologica Sinica*. 2014;51(1):67-74. doi: [10.11766/trxb201307160340](https://doi.org/10.11766/trxb201307160340)
8. Daly KR, Tracy SR, Crout NMJ, Mairhofer S, Pridmore TP, Mooney SJ, Roose T. Quantification of root water uptake in soil using X-ray computed tomography and image-based modelling. *Plant Cell Environ*. 2018;41(1):121-133. doi: [10.1111/pce.12983](https://doi.org/10.1111/pce.12983)
9. Zhou H, Peng X, Peth S, Xiao TQ. Effects of vegetation restoration on soil aggregate microstructure quantified with synchrotron-based micro-computed tomography. *Soil and Tillage Research*. 2012;124:17-23. doi: [10.1016/J.STILL.2012.04.006](https://doi.org/10.1016/J.STILL.2012.04.006)
10. Voltolini M, Taş N, Wang S, Brodie EL, Ajo-Franklin JB. Quantitative characterization of soil microaggregates: New opportunities from sub-micron resolution synchrotron X-ray microtomography. *Geoderma*. 2017;305:382-393. doi: [10.1016/j.geoderma.2017.06.005](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.06.005)
11. Marilley L, Aragno M. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Applied Soil Ecology*. 1999;13:127-136. doi: [10.1016/S0929-1393\(99\)00028-1](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(99)00028-1)
12. Yang CH, Crowley DE. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66:345-351. doi: [10.1128/AEM.66.1.345-351.2000](https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.345-351.2000)
13. Gerke KM, Skvortsova EB, Korost DV. Tomographic method of studying soil pore space: current perspectives and results for some Russian soils. *Eurasian Soil Sci*. 2012;45(7):700-709. doi: [10.1134/S1064229312070034](https://doi.org/10.1134/S1064229312070034)
14. Ivanov AL, Shein EV, Skvortsova EB. Tomography of soil pores: from morphological characteristics to structural-functional assessment of pore space. *Eurasian Soil Sci*. 2019;52(1):50-57. doi: [10.1134/S106422931901006X](https://doi.org/10.1134/S106422931901006X)
15. Jiang Z, van Dijke MIJ, Geiger S, Ma J, Couples GD, Li X. Pore network extraction for fractured porous media. *Advances in Water Resources*. 2017;107:280-289. doi: [10.1016/j.advwatres.2017.06.025](https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2017.06.025)
16. Skvortsova EB, Shein EV, Abrosimov KN, Romanenko KA, Yudina AV, Klyueva VV, Khaidapova DD, Rogov VV. The Impact of multiple freeze-thaw cycles on the microstructure of aggregates from a Soddy-Podzolic soil: A Microtomographic Analysis. *Eurasian Soil Science*. 2018;51(2):190-198. doi: [10.1134/S1064229318020102](https://doi.org/10.1134/S1064229318020102)
17. Ivanov AL, Shein EV, Skvortsova EB. Tomography of soil pores: from morphological characteristics to structural-functional assessment of pore space. *Eurasian Soil Science*. 2019;52(1):50-57. doi: [10.1134/S106422931901006X](https://doi.org/10.1134/S106422931901006X)
18. Müller K, Katuwal S, Young I, McLeod M, Moldrup P, de Jonge LW, Clothier B. Characterising and linking X-ray CT derived macroporosity parameters to infiltration in soils with contrasting structures. *Geoderma*. 2018;313:82-91. doi: [10.1016/j.geoderma.2017.10.020](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.10.020)
19. Helliwell JR, Sturrock CJ, Grayling KM, Tracy SR, Flavel RJ, Young IM, WhalleyWR, Mooney SJ. Applications of X-ray computed tomography for examining biophysical interactions and structural development in soil systems: a review. *European J Soil Science*. 2013;64(3):279-297. doi: [10.1111/ejss.12028](https://doi.org/10.1111/ejss.12028)
20. Borges JAR, Pires LF, Cássaro FAM, Roque WL, Heck RJ, Rosa JA, and Wolf FG. X-ray microtomography analysis of representative elementary volume (REV) of soil morphological and geometrical properties. *Soil and Tillage Research*. 2018;182:112-122. doi: [10.1016/j.still.2018.05.004](https://doi.org/10.1016/j.still.2018.05.004)

21. Wildenschild D, Rivers ML, Porter ML, Iltis GC, Armstrong RT, Davit Y, Anderson SH, Hopmans JW. Using synchrotron-based X-ray microtomography and functional contrast agents in environmental applications In: *Soil-Water-Root Processes: Advances in Tomography and Imaging*. The Soil Science Society of America, Inc. 2013;61:1-22. doi: [10.2136/sssaspecpub61.c1](https://doi.org/10.2136/sssaspecpub61.c1)
22. Wildenschild D, Sheppard AP. X-ray imaging and analysis techniques for quantifying pore-scale structure and processes in subsurface porous medium systems. *Advances in Water Resources*. 2013;51:217-246. doi: [10.1016/j.advwatres.2012.07.018](https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2012.07.018)
23. Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*. 1979;9(1):62-66. doi: [10.1109/TSMC.1979.4310076](https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076)
24. Verkhovtseva NV, Osipov GA, Bolysheva TN, Kasatnikov VA, Kuzmina NV, Antsiferova EJ, Alexeeva AS. Comparative Investigation of Vermicompost Microbial Communities. *Microbiology of Composting*. 2002:99-108. doi: [10.1007/978-3-662-08724-4_8](https://doi.org/10.1007/978-3-662-08724-4_8)
25. Shekhovtsova NV, Marakaev OA, Pervushina KA, Osipov GA. The underground organ microbial complexes of moorland spotted orchid *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae). *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2013;4(7B):35-42 doi: [10.4236/abb.2013.47A2005](https://doi.org/10.4236/abb.2013.47A2005)
26. Shein EV, Milanovskii EYu, Khaydapova DD, Pozdnyakov AI, Tyugai ZN, Pochatkova TN, Demboveckii AV. Workshop on solid phase physics of soils. tutorial. Moscow: Buki-Vedi Publ.; 2017. 119 p. In Russian
27. *Theories and Methods of Soil Physics*. Shein EV and Karpachevskiy LO, editors. Moscow: Grif and K Publ.; 2007. 616 p. In Russian

*Received 10 July 2020; Revised 29 December, 2020;
Accepted 21 February 2021; Published 31 March, 2021.*

Author info:

Shein Evgeny V, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Soil Physics and Reclamation, Soil Science Faculty, Lomonosov Moscow State University, GSP-1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0101-5293>

E-mail: evgeny.shein@gmail.com

Verkhovtseva Nadezhda V, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Agrochemistry and Biochemistry, Soil Science Faculty, Lomonosov Moscow State University, GSP-1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-6830-4295>

E-mail: verh48@list.ru

Suzdaleva Angelina V, Postgraduate Student, Department of Soil Physics and Reclamation, Soil Science Faculty, Lomonosov Moscow State University, GSP-1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1525-8605>

E-mail: avsuzdaleva@gmail.com

Abrosimov Konstantin N, Cand. Sci. (Geogr.), Senior Researcher, Department of Soil Physics and Hydrology, VV Dokuchaev Soil Science Institute, 7 Pyzhevskii Per., Moscow 119017, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-3552-8054>

E-mail: kv2@bk.ru