
МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 631.436

Н.Н. Терещенко¹, А.Б. Бубина²

¹Биологический институт Томского государственного университета (г. Томск)

²Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
и торфа СО РАН (г. Томск)

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ПОЧВЫ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЧВОЗАЩИТНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Аннотация. Сравнительные исследования микробиологических свойств дерново-подзолистой легкосуглинистой почвы, в течение восьми лет находящейся под воздействием систем обработки, обеспечивающих противоположные стратегии ее экологической трансформации (от гумусонакопления до деградации), позволили выявить ряд значимых микробиологических критериев экологической устойчивости почвы и эффективности почвозащитных технологий: индексы разнообразия микробного сообщества Симпсона, рассчитанные как для ризосферы, так и для околоризосферной почвы; степень микотрофности корней растений; частота встречаемости микориз; соотношение уровней усредненной ростостимулирующей активности бактерий рода *Pseudomonas* в ризосфере и околоризосферной почве.

Ключевые слова: микробиологические критерии; экологическая устойчивость почвы; плодородие почвы; полевое вермикультивирование; системы обработки почвы; биоразнообразие.

Всесторонняя оценка современной сельскохозяйственной деятельности человека свидетельствует о том, что она превратилась в мощный экологический фактор, влияющий на характер почвообразовательного процесса и подчас необратимо меняющий не только свойства самой почвы, но и сопряженных с ней экосистем в целом. По самым скромным оценкам значительное ускорение технического прогресса обусловило деградацию более чем 40% мировых запасов сельскохозяйственно пригодных земель. По масштабам последствий данное явление сопоставимо только с глобальными изменениями климата [1]. Интенсивная вспашка, регулярное отторжение урожая и массовое применение средств химизации обусловили серьезные нарушения функций почвы по поддержанию баланса таких важных атмосферных газов, как двуокись углерода, оксиды азота и метан [2].

В связи с этим одним из основных вопросов современной почвенной экологии становится возможность оценки и прогнозирования изменений, происходящих в целинной почве после ее вовлечения в сельскохозяйственное и

промышленное освоение. Эксплуатация любой агроэкосистемы предполагает наличие постоянной антропогенной нагрузки, которая может быть разной по интенсивности и продолжительности. При этом почва является основным «базовым» компонентом агроэкосистемы, функционирование которой во многом обусловлено деятельностью микроорганизмов. Одним из важнейших свойств экосистем в целом и микробного комплекса почвы в частности являются сохранение и поддержание значений своих параметров и структуры в пространстве и времени, без изменения характера функционирования.

Снижение продуктивности сельскохозяйственных культур указывает на потерю стабильности агроэкосистемы. Однако это уже конечная стадия ее реакции на антропогенное воздействие, которой предшествовали изменения других показателей: физико-химических свойств почвы, сбалансированности биохимических процессов, фитотоксической активности микробных сообществ почвы и т.п. [3].

Биологическая активность почвы является важным фактором ее плодородия и чувствительным экологическим и агрономическим индикатором антропогенного воздействия на нее. В настоящее время еще не разработаны совершенные унифицированные критерии оценки микробиологических и биохимических показателей состояния почвы. Такие традиционно используемые в настоящее время показатели, как содержание подвижных и валовых форм питательных элементов, уровень кислотности, общая порозность и т.д., а также средние показатели биологической продуктивности свидетельствуют скорее об уровне эффективного плодородия почвы, а не об экологической стратегии ее трансформации в сторону деградации или повышения потенциального плодородия.

Для изучения длительного антропогенного воздействия на почву важно подобрать такие микробиологические индикаторы и методы их определения, которые дали бы возможность наиболее полно оценить экологическое состояние и плодородие конкретной почвы и, кроме того, были бы нетрудоемкими и недорогостоящими [4].

Кроме того, весьма актуальным является вопрос поиска критериев, позволяющих оценить эффективность конкретных почвозащитных агротехнологий и используемых для улучшения экологических характеристик почвы различных биологически активных органических субстратов, таких, например, как вермикомпост.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Основные методологические подходы к поиску микробиологических критериев

Поиск и отбор наиболее значимых микробиологических критериев экологической устойчивости почвы осуществляли путем сравнения микробиологических, биохимических, агрохимических, химических и др. свойств дерново-подзолистой легкосуглинистой почвы, находящейся длительное время под воздействием разных систем обработки, обусловивших различные тенденции ее экологической трансформации: от гумусонакопления до деградации.

Полевые опыты выполнялись на четырех пространственно совмещенных полях стационара, где на протяжении 8 лет проводили эксперимент по изучению влияния системы МАЛ (микроаглоландшафтов) и элементов почвозащитной технологии ПКВК (полевого круглогодичного вермикультивирования) на свойства почвы.

Основным объектом исследований были микробные сообщества ризосферы картофеля, возделываемого в системе зернопропашного севооборота при 3 различных способах обработки почвы, а также многолетних трав, высеваемых позднее для закрепления достигнутых эффектов. В экспериментах применялись следующие типы обработки почвы:

- 1) отвальная вспашка без применения органических удобрений (ОУ);
- 2) отвальная вспашка с внесением торфонавозной смеси (ТНС) в дозе 50 т/га;
- 3) безотвальная обработка почвы с локальным внесением ТНС в виде ленты между двумя рядами картофеля, высаживаемого в гребни одновременно с интродукцией в ТНС навозных червей (элемент технологии ПКВК, суть которого состоит в иницировании вермикомпостирования непосредственно в почвенной гряде под картофелем) (рис. 1).

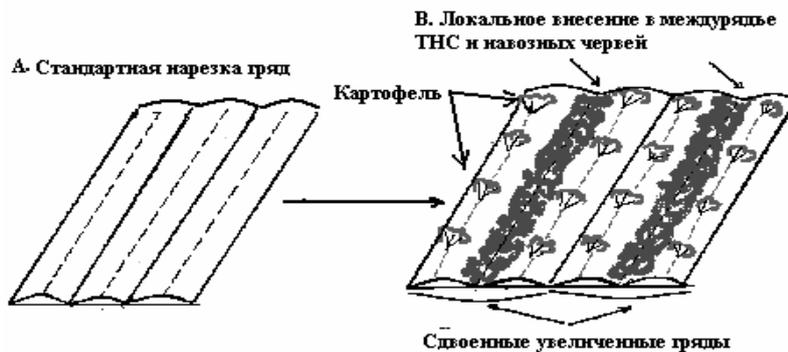


Рис. 1. Схема закладки сдвоенных увеличенных гряд с иницированным вермикультивированием

Предварительно проведенный анализ гумуса по Тюрину [5] показал, что в результате 8 лет применения системы МАЛ и ПКВК (4 лет зернопропашного севооборота и 4 лет последействия многолетних трав) содержание гумуса в почве варианта с иницированным вермикомпостированием увеличилось с 1,5 до 2,04%. Фракционный анализ гумуса по Пономаревой–Плотниковой [6] показал возрастание доли гуминовых кислот, в результате чего соотношение Сгк/Сфк увеличилось с 0,8 до 1,1. Данные изменения являются одними из наиболее убедительных свидетельств повышения уровня потенциального плодородия почвы в результате применения технологии грядового выращивания картофеля с элементами ПКВК. Отвальная обработка почвы без внесения органических удобрений привела к снижению содержания гумуса с 1,5 до 1,19%. Отвальная обработка почвы с внесением ТНС практически не повлияла на содержание органического вещества в почве (табл. 1).

Таблица 1

Групповой и фракционный состав гумуса почвы под многолетними травами после ее обработки различными способами в течение 8 лет

Система обработки	$C_{\text{общ}}, \%$	$C_{\text{ГК}}, \%$ % к $C_{\text{общ}}$	$C_{\text{ФК}}, \%$ % к $C_{\text{общ}}$	$C_{\text{ГК}+C_{\text{ФК}}}$	$\frac{C_{\text{ГК}}}{C_{\text{ФК}}}$	НО*, % к $C_{\text{общ}}$
1. Отвальная обработка без органических удобрений (ОУ)	1,19±0,01	28,3±0,6	30,4±1,0	58,73	0,9	41,3±0,3
2. Отвальная обработка + ТНС	1,47±0,01	32,0±1,0	28,4±0,4	60,38	1,1	39,6±0,8
3. Локальная обработка + ТНС+ дождевые черви (ИВК)	2,04±0,04	34,4±0,8	30,6±0,2	65,04	1,1	35,0±0,6
4. Целинная почва (лес)	2,43±0,03	25,6±1,2	29,1±1,0	54,69	0,9	45,3±1,7

Примечание. НО* – негидролизуемый остаток.

Таким образом, восьмилетнее применение вышеуказанных систем обработки обеспечило принципиально различное влияние на свойства дерново-подзолистой почвы: от негативного в варианте без внесения удобрений до положительного в варианте с локальным внесением органических удобрений и интродукцией дождевых червей.

При этом нужно отметить, что средние за три года показатели урожайности картофеля в варианте с инициированным вермикомпостированием (ИВК) были на 90–95% выше, чем в варианте без применения удобрений, урожайности зерновых – на 60–70%, а многолетних трав – на 80% (табл. 2). Следовательно, данный способ обработки почвы обеспечивает высокий уровень ее эффективного плодородия.

Таблица 2

Средние по годам (2002–2004 гг.) показатели урожая картофеля сорта Луговской, яровой пшеницы сорта Новосибирская-22 и многолетних трав (тимофеевка, клевер) в вариантах полевого опыта с различными системами обработки почвы, т/га

Способ обработки почвы	Картофель	Пшеница	Многолетние травы
1. Отвальная обработка без ОУ	22,8 ± 5,9	1,3 ± 0,12	5,4 ± 1,3
2. Отвальная обработка + ТНС	34,5 ± 4,3	1,8 ± 0,24	7,6 ± 2,5
3. Локальная обработка + ТНС + дождевые черви (ИВК)	47,5 ± 5,6	2,4 ± 0,3	13,3 ± 4,1

Таким образом, исследование микробиологических и биохимических свойств «живой фазы» почвы при всех использованных системах обработки, особенно обуславливающих наиболее контрастные экологические стратегии ее трансформации, позволяет установить основные различия между ними и выделить наиболее значимые, ключевые. В качестве эталона сравнения исследовали свойства целинной дерново-подзолистой почвы под лесом.

Методы анализа

1. **Определение индексов видового разнообразия микробного почвенного сообщества.** Поскольку определение систематической принадлежности микроорганизмов до вида, а иногда даже и до рода довольно трудоемко и требует либо колоссальных затрат времени, либо дорогостоящего оборудования, такой весьма показательный критерий экологической устойчивости микробноценоза почвы, как уровень видового разнообразия, очень редко используется на практике. Учитывая вышеперечисленные трудности, в исследованиях были использованы общепринятые индексы Симпсона, Бергера–Паркера и Шеннона [7], рассчитываемые, как обычно, по частоте встречаемости представителей отдельных микробиологических таксонов, формирующих на стандартной селективной среде морфологически различные колонии, но *без идентификации их до вида*. Разумеется, в этом случае существует вероятность некоторого сужения спектра выявляемых видов микроорганизмов из-за потери части серотипов, однако значительное упрощение метода и сокращение сроков анализа компенсируют данный недостаток.

2. **Определение индекса RS_f / RP_1 (соотношение численности микроорганизмов в ризосфере и ризоплане).** Индекс RS_f / RP_1 хорошо отражает степень обогащенности почвы свежим органическим веществом, а также степень ее увлажнения. Кроме того, данный индекс можно использовать для косвенной оценки развития патогенного процесса на корнях.

Для расчета данного показателя проводили анализ общей численности микроорганизмов в ризосфере (почве, прилегающей к корням растений) и в ризоплане, т.е. непосредственно на поверхности корней. Учет численности бактерий в ризосфере проводили путем прямого посева на МПА из 3, 4 и 5-го разведений исходной почвенной суспензии, полученной путем суспендирования 1 г почвы из 1–2 мм прикорневого слоя [8]. Отличительной особенностью посева из ризосферы является предварительное аккуратное отделение основной массы почвы от корней и последующее стряхивание стерильной кисточкой прилегающих к поверхности корней мелких почвенных частичек. Посев проводили в день отбора образцов для предотвращения риска изменения состава микробного сообщества ризосферы после прекращения корневых выделений вследствие извлечения растения из почвы.

Особенностью посева из ризопланы – с поверхности корней растений, является тщательное отмывание предварительно измельченных до 1–2 см фрагментов корней в нескольких порциях стерильной воды. После 6–7-кратного промывания корней в стерильной воде навеску корней (1 г) растирали в стерильной ступке и помещали во флакон со 100 мл стерильной воды [8]. Посев на МПА проводили по стандартной методике из 1, 2 и 3-го рабочих разведений.

С учетом максимального объема корневых выделений у растений в фазу их цветения отбор почвенных проб для микробиологического анализа во всех опытах осуществляли во 2-й декаде июля.

3. **Определение суммарной ростостимулирующей активности бактерий рода *Pseudomonas* в ризосфере и околоризосферной почве.** Для определения ростостимулирующей активности бактерий в ризосфере и околоризо-

сферной почве осуществляли посев на МПА по стандартной методике [9]. Колонии, морфологически схожие с колониями бактерий рода *Pseudomonas*, после предварительного микроскопирования использовали для выделения бактериальных изолятов в чистую культуру пересевом на косой агар (МПА). В качестве ризосферной рассматривали почву, непосредственно прилегающую к корням и отделяющуюся посредством механического очищения стерильной кистью. В качестве околоризосферной почвы рассматривали фракции почвы, не скрепленные с корнем экссудатами и потому отделяющиеся от корней простым встряхиванием.

Уровень ростостимулирующей активности выделенных бактериальных культур определяли в биотесте с семенами пшеницы. Для этого семена пшеницы (Новосибирская-22) на 20 мин замачивали в разбавленной (до титра 10^6 кл./мл) 4-суточной накопительной культуре бактерий, полученной на мясопептонном бульоне (МПБ). В качестве контроля использовали питательную среду МПБ, разбавленную аналогично накопительной бактериальной культуре.

Обработанные накопительной бактериальной культурой семена пшеницы проращивали в течение 7 сут в чашках Петри между слоями стерильной фильтровальной бумаги при 22°C. Ростостимулирующую активность бактериальных изолятов оценивали по разнице сухой массы корней и зеленых проростков семян, обработанных накопительной культурой бактерий, и в контроле, выраженной в процентах по отношению к показателям в контроле.

4. Частоту встречаемости микориз на корнях многолетних трав и степень микотрофности корней оценивали по общепринятой методике [10]. В каждом варианте опыта просматривали не менее 20 фрагментов корней и 10 полей зрения в каждом. Для дифференцированной окраски корней и гиф грибов использовали кристаллический фиолетовый.

Математическую обработку экспериментальных данных проводили методом многомерного шкалирования при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ отечественной и зарубежной литературы свидетельствует о том, что большинство микробиологических критериев экологической устойчивости почв основывается на показателях видового разнообразия микробного сообщества и уровня взаимосвязи между элементами сообщества [11, 12]. Широко используются также такие показатели, как общая биомасса микроорганизмов, интенсивность дыхания, активность ферментов и метаболический коэффициент qCO_2 [13, 14].

Кроме того, весьма перспективными являются методы, основанные на получении многомерных функциональных характеристик микробных сообществ, выделяемых из природных местообитаний. Так, например, запатентованная отечественная разработка «Эколог» на основе метода мультисубстратного тестирования (МСТ) специально предназначена для получения функциональных портретов микробных сообществ почв. При этом одним из

основных методов, широко применяемых для анализа сукцессионных изменений, является метод инициированных микробных сообществ, разработанный на кафедре биологии почв МГУ под руководством проф. Д.Г. Звягинцева [15], а в качестве критерия устойчивости почвенного сообщества выступает величина зоны гомеостаза. Резкая перестройка структуры микробного сообщества почвы, сопровождающаяся сужением видового разнообразия и появлением новых доминант, является показателем того, что антропогенная нагрузка на почву превысила некий критический уровень и микробное сообщество почвы вышло за пределы зоны гомеостаза и сместилось в зону стресса.

Продолжающееся увеличение нагрузки будет способствовать дальнейшему изменению структуры микробного сообщества со сдвигом его в зону резистентности, а затем и репрессии, характеризующейся почти полным подавлением жизнедеятельности микроорганизмов в почве. Это, в свою очередь, приведет к прекращению всех биохимических процессов в почве, обуславливающих ее функционирование как ключевого элемента любой открытой природной экосистемы.

Влияние различных систем обработки почвы на уровень структурного и функционального разнообразия микробного сообщества почвы

В настоящее время уже накоплен богатый фактический материал, свидетельствующий о том, что уровень видового разнообразия микробного сообщества почвы можно рассматривать в качестве одного из наиболее важных критериев устойчивости основных экологических функций почвы.

Так как наиболее интенсивно микробиологические процессы в почве протекают в зоне распространения корней растений, поиск основных критериев видового разнообразия микроорганизмов проводили посредством микробиологического анализа ризопланы и ризосферы. Результаты исследований структурного и функционального разнообразия микробных сообществ ризосферы картофеля, возделываемого при различных системах обработки почвы, представлены в табл. 3. В качестве эталона устойчивой почвенной системы была взята целинная дерново-подзолистая почва под лесом, отличающаяся максимальными показателями гумусированности и хорошо выраженной зернисто-комковатой структурой (см. табл. 1).

Согласно данным табл. 3 максимальная численность микроорганизмов была обнаружена в ризосфере картофеля при локальной обработке почвы в варианте с инициированным вермикомпостированием (ИВК). Минимальной численностью характеризовались вариант с применением NPK и почва леса.

Отличительной особенностью целинной почвы леса является явное доминирование в структуре ризосферного микробного сообщества спорообразующих бактерий, причем как в вегетативной форме, так и в состоянии покоящихся спор. Численность покоящихся форм бацилл в данном варианте в 5–10 раз выше, чем в других вариантах опыта. Эти данные свидетельствуют о ярко выраженной *K*-стратегии микробного сообщества лесной почвы и, соответственно, о его довольно высокой экологической устойчивости.

Еще одной отличительной особенностью почвы леса является крайне низкая численность в ризосфере лесных трав дрожжей, что свидетельствует о резком дефиците в составе корневых выделений сахаров. С другой стороны, микроорганизмы, продуцирующие аминокислоты, как в ризосфере, так и ризоплане лесных трав на 80–90% представлены целлюлозолитическими микромицетами родов *Penicillium* и *Trichoderma*. Дефицит легкодоступных источников углерода и доминирование в составе грибного населения ризосферной почвы леса активных целлюлозолитиков над сахаромицетами является еще одним подтверждением ярко выраженной *K*-стратегии микробоценоза целинной почвы леса.

Данные микробиологического анализа ризосферной почвы в остальных вариантах опыта показали, что при всех исследованных способах обработки почвы микробное сообщество характеризуется *r*-стратегией, соответствующей менее устойчивому состоянию микробоценоза. Это подтверждается относительно невысокой численностью спорообразующих микроорганизмов и доминированием в их составе дрожжей. В составе ризосферных микроорганизмов, продуцирующих аминокислоты, доминирующее положение занимают бактерии (см. табл. 3).

Следовательно, анализ основных систематических и функциональных групп микроорганизмов в ризосфере картофеля, возделываемого при исследованных способах обработки, показывает, что ни один из них не приводит микробоценоз почвы в устойчивое состояние по типу *K*-стратегии. Однако необходимо заметить, что данный тип устойчивости, как правило, характеризует именно целинные ненарушенные почвы с относительно равномерным поступлением свежих энергетических субстратов без «залповых» нагрузок. С другой стороны, длительность воздействия на почву исследуемых систем обработки на рассматриваемом втором поле стационара не превышала двух лет. Возможно, что их влияние на изменение экологической стратегии микробоценоза почвы начнет сказываться только после закрепляющего воздействия многолетних трав.

Таким образом, тип экологической стратегии микробного сообщества, безусловно, являясь одним из наиболее перспективных критериев устойчивости почвы как экосистемы, тем не менее не позволяет оценить эффективность конкретной агротехнологии непосредственно **в действии**.

Одними из наиболее важных функциональных групп в составе ризосферного микробного сообщества почвы являются микроорганизмы, способные мобилизовать фосфор органических соединений и азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter*. На наш взгляд, не менее важным показателем является также уровень видового разнообразия микроорганизмов, входящих в состав конкретной функциональной группы. Чем более разнообразно она представлена, тем выше вероятность дублирующих биохимических реакций, обеспечивающих устойчивое эффективное плодородие почвы. По мнению ряда исследователей, только функциональные характеристики микробного сообщества почвы в полной мере отражают степень устойчивости почвы к антропогенному воздействию [16, 17].

Численность микроорганизмов в ризосфере и ризоплане картофеля при различных способах обработки почвы и в целинной почве под лесом, № 10^н КОЕ в I г.а.в.

Вариант опыта	Общая численность микроорганизмов, N·10 ⁵	Неспорообразующие бактерии, N·10 ⁵	Бациллы		Дрожжи, N·10 ²	Фосфатом-близущие микроорганизмы, N·10 ⁴	Азотобактер		Микроорганизмы, продуцирующие аминокислоты, N·10 ³			
			Вегетативные формы, N·10 ⁵	Спores, N·10 ³			Актуальная активность, %	Потенциальная активность, %	Общая численность	Бактерии	Грибы	
РИЗОСФЕРА												
1. Отв. обр-ка без ОУ	233,0	38,0	1,2	25,7	234,5	74,4	0	2,4	524,0	197,0	328,1	
2. Отв. обр-ка + ТНС	283,7	52,6	14,9	26,7	74,7	149,3	25,4	36,8	1077,0	633,0	443,2	
3. Лок. обр-ка + ТНС + дождевые черви (ИВК)	348,6	57,4	11,2	37,7	256,0	378,0	15,2	31,1	385,0	287,5	96,0	
4. Целинная почва (лес) НСР ₀₅ ¹	73,2	12,9	16,9	295,9	10,2	122,0	0	0	1725,0	288,1	1438,3	
РИЗОПЛАН												
1. Отв. обр-ка без ОУ	209,9	17,9	14,5	- ²	-	-	-	-	8,3	<10 ³	8,3	
2. Отв. обр-ка + ТНС	27,7	7,5	1,1	-	-	-	-	-	41,7	41,7	<10 ³	
3. Лок. обр-ка + ТНС + дождевые черви (ИВК)	22,1	3,2	<10 ³	-	-	-	-	-	16,7	16,7	<10 ³	
4. Целинная почва (лес) НСР ₀₅	160,6	25,4	17,3	-	-	-	-	-	91,7	42,0	49,7	

Примечание. 1 – наименьшая существенная разница при p < 5%, 2 – определение не проводили.

Для оценки уровня видового разнообразия ризосферных микробных сообществ почв в исследуемых вариантах опыта мы использовали индексы разнообразия Шеннона и Симпсона. Индекс Шеннона используется довольно широко при изучении самых разных биологических объектов. Однако в последнее время в специальной литературе появляется все больше критических высказываний в адрес данного индекса из-за сложности его расчета и непригодности для целого ряда объектов [7]. Вероятно, поэтому все большее число исследователей начинают отдавать предпочтение индексу Симпсона.

Так как одним из главных показателей смещения микробного сообщества почвы в неустойчивое состояние, характерное для зоны стресса, является появление новых доминантных видов, интересно было проверить структуру исследуемых микробных сообществ при помощи еще одного индекса – Бергера–Паркера. Данный индекс позволяет обнаружить изменения в доминировании тех или иных организмов и оценить уровень видового разнообразия: чем более выражены доминанты в составе конкретного биоценоза, тем ниже уровень биоразнообразия.

Расчет индексов Шеннона и Симпсона для таких экологически важных функциональных групп микроорганизмов, как азотфиксаторы и фосфатмобилизирующие микроорганизмы, показал максимальный уровень разнообразия в варианте с ИВК при локальной обработке. Анализ разнообразия ризосферного микробного сообщества в целом при помощи данных индексов также показал наибольший уровень разнообразия в варианте с ИВК и в почве леса (табл. 4). Поскольку значения уровней видового разнообразия исследованных микробиоценозов, выраженные при помощи индекса Симпсона, различались в большей степени, мы полагаем его более чувствительным и, соответственно, более приемлемым для микробиологических объектов.

Таблица 4

Сравнение индексов разнообразия Шеннона, Симпсона и Бергера–Паркера, а также значения коэффициента RS_f/RP_1 для микробных сообществ почвы в исследованных вариантах полевого опыта

Вариант опыта	$\frac{RS_f}{RP_1}$	Для микроорганизмов ризосферы			Для фосфатмобилизирующих бактерий			Для азотфиксирующих бактерий		
		Шеннона	Симпсона	Бергера–Паркера	Шеннона	Симпсона	Бергера–Паркера	Шеннона	Симпсона	Бергера–Паркера
1. Отв. обр-ка без ОУ	1,11	1,78	3,50	2,23	0	1,0	1,0	0,56	2,46	1,33
2. Отв. обр-ка + ТНС	10,2	1,75	4,90	3,08	0,69	2,04	1,84	0	1,0	1,0
3. Лок. обр-ка + ТНС + ИВК	15,8	2,10	5,53	5,78	1,14	4,07	3,07	1,1	3,18	2,92
4. Целинная почва (лес)	0,46	2,05	5,93	3,18	1,45	2,32	1,6	– ²	–	–

Примечание. 1 – отношение численности бактерий в ризосфере к численности бактерий в ризоплане; 2 – микроорганизмы не обнаружены.

Индекс Бергера–Паркера также отразил максимальный уровень видового разнообразия для микробного сообщества почвы в варианте с ИВК. Однако для остальных вариантов опыта убывающий ряд разнообразия имел характер, не совпадающий с данными индексов Шеннона и Симпсона (см. табл. 4).

Некоторые авторы для оценки характера ризосферных процессов рекомендуют использовать показатель соотношения численности микроорганизмов в ризосфере и ризоплане. Высокая обсемененность корней растений при относительно низкой плотности микроорганизмов в ризосфере, по их мнению, может служить показателем неблагоприятной фитосанитарной обстановки в ризосфере и смещения весьма неустойчивого трофического равновесия во взаимоотношениях растения и ризосферных микроорганизмов от симбиоза в сторону явного паразитизма [18].

Анализируя соотношение численности микроорганизмов в ризосфере (RS_f – ризосфера) и непосредственно на поверхности корней (RP_1 – ризоплана) лесных трав, а также картофеля, возделываемого при различных системах обработки почвы, мы установили, что минимальными значениями данного показателя (RS_f/RP_1) отличались варианты без удобрений, с применением минеральных удобрений и почва леса. В вариантах с применением органических удобрений наблюдалось заметное доминирование ризосферных микроорганизмов над микрофлорой ризопланы, что свидетельствует о благоприятной для растений фитосанитарной обстановке в зоне ризосферы (см. табл. 3).

Если для объяснения низких значений коэффициента RS_f/RP_1 в почве вариантов без удобрений и с минеральными удобрениями из-за низких значений индексов разнообразия можно допустить наличие инфекционных агентов, то в лесной почве высокие значения индекса Шеннона и Симпсона свидетельствуют о занятости основных экологических ниш и небольшой вероятности развития инфекций в ризосфере лесных трав (см. табл. 4). Неоднозначность полученных данных в настоящий момент не позволяет сделать окончательные выводы о пригодности данного показателя для оценки состояния микробного сообщества почвы в целом. Однако для анализа воздействия на микробоценоз почвы того или иного вида удобрения коэффициент RS_f/RP_1 вполне может быть использован.

Таким образом, исследование микробных пейзажей дерново-подзолистой почвы, находящейся на протяжении двух лет под воздействием систем обработки, обеспечивающих экологическую трансформацию почвы в диаметрально противоположных направлениях (деградации и гумусонакопления), позволило установить ряд микробиологических критериев **уровня разнообразия структуры микробного сообщества** почвы:

- индекс разнообразия Симпсона для микроорганизмов ризосферы в целом, а также отдельно для таких экологически важных физиологических групп, как азотфиксаторы и фосфатмобилизующие микроорганизмы;
- для целинных ненарушенных почв – хорошо выраженный *K-тип экологической стратегии* микробного сообщества ризосферы;
- для почв, вовлеченных в сельскохозяйственное использование, – высокие значения коэффициента RS_f/RP_1 .

Микробиологические критерии уровня взаимосвязей в системе «почва–растение»

Для поиска критериев уровня взаимосвязи в системе «почва–растение» был использован сравнительный анализ микробных пейзажей в ризосфере и околоризосферной почве многолетних трав (клевера и тимофеевки). Образцы для анализа отбирали с первого и четвертого полей стационара, которые отличались друг от друга только длительностью возделывания многолетних трав.

Сравнительный микробиологический анализ образцов дерново-подзолистой почвы, отобранных из ризосферы и околоризосферной почвы многолетних трав на третьем и четвертом полях севооборота, показал, что в целом по вариантам опыта везде численность микроорганизмов в ризосфере была значительно выше, чем в почве без корней (табл. 5).

Таблица 5
Численность микроорганизмов в ризосфере многолетних трав
и околоризосферной почве в вариантах полевого опыта; $N \times 10^5$ кл. в 1 г а.с.в.

Вариант опыта	Ризосфера				Околоризосферная почва			
	ОЧМ	Индекс Симпсона	Бактерии рода <i>Pseudomonas</i>		ОЧМ	Индекс Симпсона	Бактерии рода <i>Pseudomonas</i>	
			Числ-ть	% от общей числ-ти			Числ-ть	% от общей числ-ти
Целинная почва (лес)	112,9	17,1	17,3	15,3	29,5	14,1	8,8	30,0
Поле № 3 (четыре года последействия многолетних трав)								
1. Отв. обр-ка без ОУ	223,4	4,7	21,5	9,7	26,8	9,9	9,2	34,3
2. Отв. обр-ка + ТНС	187,1	4,1	12,0	6,4	33,6	11,5	9,6	28,6
3. Лок. обр-ка + ТНС + черви	131,5	12,6	40,7	30,8	51,3	15,3	16,3	31,8
Поле № 4 (пять лет последействия многолетних трав)								
1. Отв. обр-ка без ОУ	248,2	4,8	80,6	32,5	36,7	9,7	7,2	19,6
2. Отв. обр-ка + ТНС	213,2	6,4	44,1	20,7	29,3	7,7	15,3	52,2
3. Лок. обр-ка + ТНС + черви	154,5	13,9	14,22	9,2	28,7	11,1	6,2	21,6
НСР ₀₅	23,6		6,9		5,8		3,5	

Примечание. ОЧМ – общая численность микроорганизмов.

Сопоставление данных о количестве микроорганизмов в ризосфере и околоризосферной почве в разных вариантах полевого опыта показало, что в ва-

риантах с применением органических удобрений и в почве под лесом численность микроорганизмов в почве, прилегающей к ризосфере, закономерно увеличивается, тогда как численность микроорганизмов в ризосфере несколько снижается (рис. 2).

Возможно, данное явление обусловлено расширением зоны влияния ризосферы в вариантах с применением органических удобрений и в целинной почве леса. Предварительная подготовка почвенных образцов выявила довольно заметные отличия образцов почвы леса, а именно – хорошо выраженную зернисто-комковатую структуру целинной почвы. При микробиологическом анализе лесной почвы было довольно трудно разделить ее на ризосферу и околоризосферную область, поскольку все почвенное пространство представляло собой довольно плотное переплетение корней лесных трав, облепленных почвенными комочками, отрывающимися часто только вместе с корнями. В вариантах с локальной обработкой и интродукцией червей плотность корней многолетних трав также была выше, чем в остальных вариантах полевого опыта.

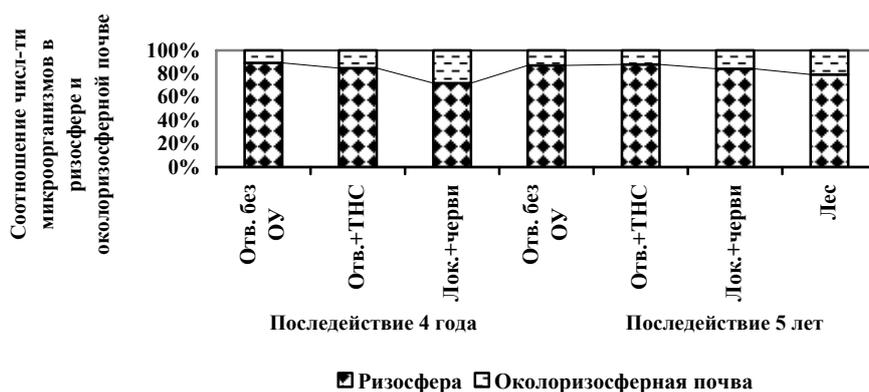


Рис. 2. Соотношение численности микроорганизмов в ризосфере и почве, непосредственно прилегающей к ризосфере, по вариантам полевого опыта

Расчет коэффициента видового разнообразия микробных сообществ (индекс Симпсона) в ризосфере и околоризосферной области показал, что максимальным уровнем микробного разнообразия характеризуется почва леса (см. табл. 5). Причем это правило справедливо как для ризосферы лесных трав, так и для почвы, прилегающей к корням. Соотношение индексов Симпсона в ризосфере и околоризосферной почве многолетних трав по вариантам опыта выявило относительное увеличение уровня видового разнообразия в ризосфере по сравнению с окружающей почвой в вариантах с применением органических удобрений и в почве леса (рис. 3).

На основании данных о численности микроорганизмов и о значениях индексов разнообразия в ризосфере и околоризосферной почве можно сделать предположение о том, что в вариантах с внесением органических удобрений

и в целинной ненарушенной почве леса наблюдается относительное уменьшение численности микрофлоры в ризосфере при заметном увеличении уровня видового разнообразия. При этом увеличение численности микроорганизмов в почве, непосредственно прилегающей к ризосфере, может свидетельствовать о расширении зоны влияния ризосферного эффекта на объем почвы, не занятой корнями.

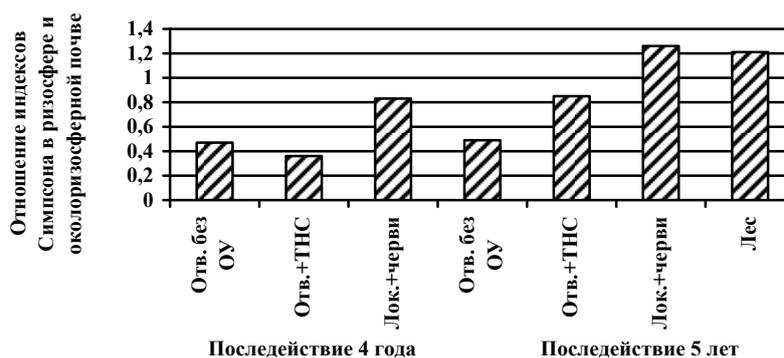


Рис. 3. Отношение показателей индекса Симпсона в ризосфере к показателям индекса в околоризосферной почве по вариантам опыта

Урожай растений, как известно [18], в большой степени обусловлен присутствием в их ризосфере так называемой «микрофлоры биоконтроля», большинство которой представлено бактериями рода *Pseudomonas*, являющимися продуцентами широкого спектра биологически активных веществ. По-видимому, именно численность и активность псевдомонад во многом определяют фитосанитарное состояние ризосферы, а также режим питания растений, что, в свою очередь, обуславливает устойчивость растений к неблагоприятным внешним условиям [19, 20].

Поэтому для оценки уровня взаимосвязей в ризосфере многолетних трав был выбран анализ численности псевдомонад и уровня ростостимулирующей активности отдельных изолятов в ризосфере и околоризосферной почве. Для этого из ризосферы многолетних трав и околоризосферной почвы методом посева на МПА выделяли отдельные изоляты бактерий рода *Pseudomonas*. Чистые культуры псевдомонад хранили на косяках со средой Кинга В. Уровень ростостимулирующей активности выделенных бактериальных культур определяли в биотесте с семенами пшеницы Новосибирская-22.

Анализ усредненных показателей уровня ростостимулирующей активности бактериальных изолятов бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из ризосферы многолетних трав и околоризосферной зоны в исследованных вариантах полевого опыта, показал, что внесение органических удобрений способствует увеличению ростостимулирующей активности псевдомонад не только в ризосфере, но и в почве, непосредственно к ней прилегающей. Особенно отчетливо это проявляется при анализе ростостимулирующей активности бактерий по отношению к корням проростков (рис. 4). При этом нужно

заметить, что сколько-либо четких зависимостей между численностью псевдомонад в ризосфере и околоризосферной почве многолетних трав 4 и 5 лет их последствия обнаружено не было (табл. 5).

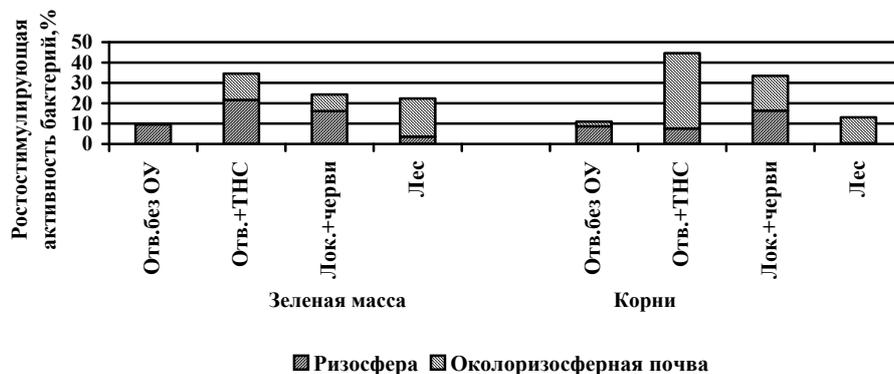


Рис. 4. Соотношение уровней ростостимулирующей активности бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из ризосферы и околоризосферной почвы вариантов полевого опыта

Из варианта с отвальной вспашкой без применения органических удобрений выделить активных продуцентов стимуляторов роста из околоризосферной почвы не удалось совсем. Согласно данным биотеста с выделенными из почвы бактериальными изолятами рода *Pseudomonas* почва под лесом отличалась от почвы всех вариантов с многолетними травами тем, что псевдомонады, выделенные из ризосферы лесных трав, характеризовались очень низким уровнем активности, тогда как активность бактерий из околоризосферной почвы, особенно по отношению к зеленой массе проростков, была максимальной по опыту (см. рис. 4). Подобное соотношение показателей активности бактерий, возможно, обусловлено спецификой состава корневых выделений лесных трав, в частности, дефицитом легкодоступного органического вещества.

Полученные данные подтверждают высказанное выше предположение о том, что регулярное применение органических удобрений способствует расширению зоны ризосферного влияния на прилегающую к ризосфере почву и более активному распространению положительных ризосферных эффектов на весь объем почвы.

Известно, что одним из наиболее ярких проявлений симбиотрофизма является микориза, довольно широко распространенная в природных экосистемах. Большинство дикоросов способно в той или иной степени вступать в симбиоз с почвенными грибами и формировать экто- или эндомикоризу. В почвах, длительное время испытывающих воздействие интенсивных агротехнологий, как правило, наблюдается подавление жизнедеятельности грибов-микоризообразователей. По этой причине степень микотрофности корней культурных растений можно рассматривать в качестве одного из показателей экологической эффективности агротехнологий.

Микроскопирование окрашенных корней многолетних трав и лесного разнотравья показало, что максимальной частотой встречаемости микориз и наибольшей степенью микотрофности отличаются растения, выращиваемые в вариантах с локальной обработкой почвы и интродукцией дождевых червей (табл. 6), в то время как в экспериментах с отвальной обработкой и применением органических удобрений растения отличались меньшей плотностью микориз. Минимальная степень микотрофности корней многолетних трав была отмечена в варианте без применения органических удобрений. Полученные результаты соответствуют данным Т.С. Балзер [21] о тяготении микоризообразующих грибов к почвам с высоким содержанием органического вещества.

Таблица 6

Показатели частоты встречаемости микориз и степень микотрофности корней растений в вариантах полевого опыта

Вариант опыта	Поле № 3 (4 года последействия многолетних трав)		Поле № 4 (5 лет последействия многолетних трав)	
	Частота встречаемо- сти микориз	Степень мико- трофности корней расте- ний	Частота встречаемости микориз	Степень мико- трофности кор- ней растений
1. Отв. обр-ка без ОУ	15,1	0,15	25,0	0,25
2. Отв. обр-ка + ТНС	56,3	0,74	12,7	0,16
3. Лок. обр-ка + ТНС + черви	93,8	2,18	75,8	1,60
4. Целинная почва (лес)	77,0	–	–	1,69

Кроме того, довольно высокой степенью микотрофности отличались и лесные травы (табл. 6). При этом в процессе отбора образцов в поле было замечено, что целинная ненарушенная почва под лесом так же, как и вариант с инициированным вермикомпостированием, отличалась весьма высокой плотностью дождевых червей. Несмотря на то, что грибные гифы являются одним из основных пищевых субстратов почвенных червей [22], полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии прямой зависимости между степенью микотрофности корней растений и численностью дождевых червей в почве. Аналогичные результаты были получены Xiezhí Yua [23], а также D. Gorgmsen с соавт. [24], проводившими интродукцию дождевых червей и эндомикоризы в почву под рейграссом и подорожником и установившими положительное влияние червей на степень микоризации растений. Очевидно, что дождевые черви, а возможно и другие представители почвенной мезофауны, выполняют в почве ряд системных функций, направленных на поддержание необходимого уровня взаимосвязей в почвенном биоценозе, в частности способствуют улучше-

нию фосфатного питания растений за счет повышения степени микотрофности корней.

Таким образом, исследование микробных пейзажей дерново-подзолистой почвы, находящейся на протяжении 4 лет под воздействием систем обработки, обеспечивающих экологическую трансформацию почвы в диаметрально противоположных направлениях (деградации и гумусонакопления), и 4–5 лет последствия многолетних трав позволило установить ряд микробиологических критериев уровня взаимосвязей в системе «почва–растение».

Среди показателей *величины «ризосферного эффекта»* можно выделить:

- соотношение численности микроорганизмов в ризосфере и почве, непосредственно прилегающей к ризосфере;
- соотношение индексов разнообразия Симпсона, рассчитываемых для микробных сообществ ризосферы и прилегающей к ризосфере почвы;
- соотношение суммарных показателей ростостимулирующей активности бактериальных изолятов рода *Pseudomonas*, выделяемых из зоны ризосферы и прилегающей к ризосфере почвы;
- частоту встречаемости микориз и степень микотрофности корней многолетних трав.

Отбор значимых микробиологических критериев, наиболее точно отражающих уровень экологической устойчивости почвы

Результаты сравнительных исследований микробных пейзажей дерново-подзолистой легкосуглинистой почвы, в течение 8 лет находящейся под воздействием систем обработки, обусловивших противоположные стратегии ее экологической трансформации (от гумусонакопления в результате интродукции дождевых червей до деградации в результате применения отвальной вспашки без внесения органических удобрений), позволили установить следующие наиболее значимые микробиологические критерии биоразнообразия и уровня взаимосвязи в системе «почва–растение»:

- индекс разнообразия Симпсона, рассчитываемый для микроорганизмов ризосферы и околоризосферой почвы;
- RS_r/RP_1 (соотношение численности микроорганизмов в ризосфере и ризоплане);
- абсолютная численность микроорганизмов в ризосфере и околоризосферной почве;
- численность микрофлоры биоконтроля (бактерий рода *Pseudomonas*) в ризосфере и ризоплане;
- отношение усредненных показателей ростостимулирующей активности бактерий рода *Pseudomonas*, выделяемых из зоны ризосферы и околоризосферной почвы;
- частота встречаемости микориз (F);
- степень микотрофности корней (M).

Для выделения из числа полученных критериев, наиболее плотно связанных с уровнем плодородия почвы, использовали метод многомерного шкалирования [25]. При этом в качестве эталонных критериев, достоверно связан-

ных с плодородием, выбрали содержание гумуса (Гумус, %) в почве и процент гуминовых кислот (ГК, %).

Согласно результатам анализа по первому фактору (плодородие) показатели гумусированности почвы (Гумус, % и ГК, %) в большей степени коррелируют с такими микробиологическими критериями, как индексы Симпсона, рассчитываемые для ризосферы и околоризосферной почвы, степень микотрофности корней (F), частота встречаемости микориз (M), и в меньшей степени – с ростостимулирующей активностью псевдомонад (см. рис. 5). Такие критерии, как общая численность микроорганизмов в ризосфере и околоризосферной почве, количество бактерий рода *Pseudomonas* в ризосфере и ризоплане, а также соотношение общей численности микроорганизмов в ризосфере и ризоплане (RS_f/RP_f), в большей степени оказались связанными со вторым фактором – уровнем увлажнения почвы.

Анализ пространственного расположения повторностей исследуемых вариантов на полевом стационаре позволил сделать предположение, что фактор 2 с большой вероятностью не связан непосредственно с плодородием, а отражает особенности рельефа стационара, обуславливающего различный уровень увлажнения почвы по повторностям опыта (см. рис. 5).

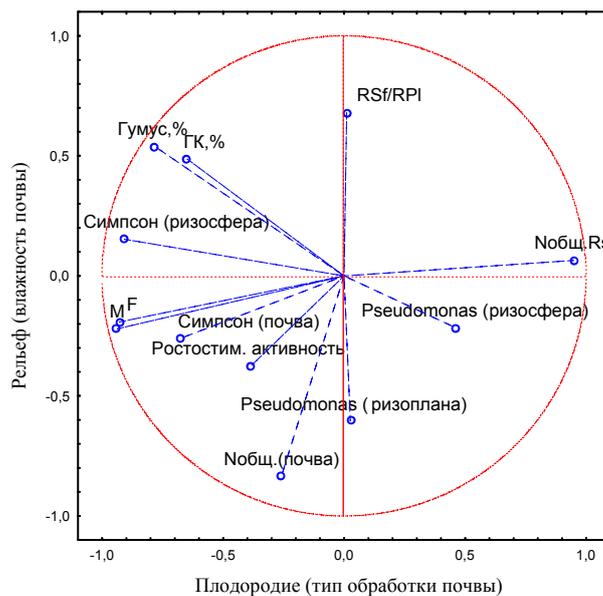


Рис. 5. Корреляция микробиологических критериев со значимыми показателями плодородия почвы (гумус, %; ГК, %) по двум наиболее важным факторам

Из рис. 6 видно, что по первому фактору вариант с локальной обработкой почвы и интродукцией червей (ТНС+черви) заметно смещается в сторону целинной почвы под лесом (Лес), отличающейся максимальными запасами гумуса и наилучшей структурой. Варианты с отвальной обработкой в целом образуют единую группу, хотя и не смешиваются друг с другом. При этом

В целом можно сказать, что все вышеперечисленные признаки, за исключением последнего, непосредственно относятся к показателям биоразнообразия почвы.

Литература

1. Lal R. Basic concepts and global issues: soil quality and agricultural sustainability // Soil Quality and Agricultural Sustainability. Ann Arbor Science, Chelsea, MI, USA, 1998. P. 3–12.
2. Mosier A.R. Soil processes and global change // Biology and Fertility of Soils. 1998. № 27. P. 221–229.
3. Ананьева Н.Д., Благодатская Е.В., Демкина Т.С. Оценка устойчивости микробных комплексов почв к природным и антропогенным воздействиям // Почвоведение. 2002. № 5. С. 580–587.
4. Свирикене А. Микробиологические и биохимические показатели при оценке антропогенного воздействия на почвы // Почвоведение. 2003. № 2. С. 202–210.
5. ГОСТ 26213–84. Общий гумус по Тюрину.
6. Определение фракционного состава гумуса минеральных почв по Пономаревой и Плотниковой (методические указания). Л., 1975.
7. Мэгарран Э. Экологическое разнообразие и его измерение. М.: Мир, 1992. 181 с.
8. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. М.: Дрофа, 2004. 256 с.
9. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. М.: АСАДЕМА, 2005. 608 с.
10. Селиванов И.А. Микосимбиотрофизм как форма консортивных связей в растительном покрове Советского Союза. М.: Наука, 1981. 230 с.
11. Schimel J.P., Gullledge G.M., Clein-Curley G.S. et al. Moisture effects on microbial activity and community structure in decomposing birch litter in the Alaskan taiga // Soil Biology & Biochemistry. 1999. Vol. 31. P. 831–838.
12. Алехина Л.К., Добровольская Т.Н., Початкова Д.Г., Звягинцев Д.Г. Оценка бактериального разнообразия в почвенных микроекосмах при разной влажности // Микробиология. 2001. Т. 70, № 6. С. 847–854.
13. Anderson J.P.E., Domsch K.H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil // Soil Biology & Biochemistry. 1978. Vol. 10, № 10. P. 215–221.
14. Izquierdo I.F., Caravaca M.M., Alguacil G., Fernandez A. Rolda // Applied Soil Ecology. 2005. № 30. P. 3–10.
15. Экологическая роль микробных метаболитов / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1986. С. 66–81.
16. Dighton J. Is it possible to develop microbial test systems to evaluate pollution effects on soil nutrient cycling? // Ecological Risk Assessment of Contaminants in Soil. Chapman & Hall, London, 1997. P. 51–69.
17. Griffiths B.S., Bonkowski M., Dobson G., Caul S. Changes in soil microbial community structure in the presence of microbial-feeding nematodes and protozoa // Pedobiologia. 1999. № 43. P. 297–304.
18. Микроорганизмы почвы и растение. Минск: Наука и техника, 1972. 243 с.
19. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев: Наукова думка, 1987. 148 с.
20. Боронин А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Соросовский журнал. 1998. № 20. С. 25–31.
21. Balsler T.S., Treseder K.K., Ekenler M. Using lipid analysis and hyphal length to quantify AM and saprotrophic fungal abundance along a soil chronosequence // Soil Biology & Biochemistry. 2005. Vol. 37, № 3. P. 601–604.
22. Marhan S., Scheu S. The influence of mineral and organic fertilizers on the growth of the endogeic earthworm *Octolasion* // Pedobiologia. 2005. Vol. 49. P. 239–249.

23. Xiezhai Yua, Cheng J., Wong M.H. Earthworm-mycorrhiza interaction on Cd uptake and growth of ryegrass // *Soil Biology & Biochemistry*. 2005. Vol. 37. P. 195–201.
24. Gormsen D., Olsson P.A., Hedlund K. The influence of collembolans and earthworms on AM fungal mycelium // *Applied Soil Ecology*. 2004. № 27. P. 211–220.
25. Ефимов В.М., Ковалева В.Ю. Многомерный анализ биологических данных. СПб., 2008. 96 с.

Tereshchenko Natalia N.¹, Bubina Alla B.²

¹*Biological Institute of Tomsk State University, Tomsk, Russia*

²*Siberian Research Institute of Agriculture and Peat of SB RAS, Tomsk, Russia*

MICROBIOLOGICAL CRITERIA OF SOIL ECOLOGICAL STABILITY AND EFFICIENCY OF SOIL-PROTECTING TECHNOLOGIES

The comparative researches of microbiological properties of sod-podzolic light loamy soil, within 8 years taking place under influence of cultivation systems ensuring opposite strategy of soils ecological transformation (from the degradation to the humus accumulation) have allowed to reveal a number of significant microbiological criteria of ecological soil stability and efficiency of soil-protecting technologies: Simpson's index of a variety of microbial community, designed both for rhizosphere, and for nearby rhizosphere area; a mycotrophic degree of plant roots; frequency of mycorrhiza occurrence; parity of average levels of *Pseudomonas* growth stimulating activity in rhizosphere and in nearby rhizosphere area.

Key words: microbiological criteria; soil ecological stability; soil fertility; field vermicultivation; soil cultivation systems; a biodiversity.