

УДК 631.445.24:551.577.38

ИЗМЕНЕНИЕ АГРОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ
ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЫ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ
ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И ЗАСУХИ*

Ю.В. КРУГЛОВ¹, ММ. УМАРОВ², МА. МАЗИРОВ³, Н.Ф. ХОХЛОВ³, Н. В. ПАТЫКА¹,
В.А. ДУМОВА¹, Е.Е. АНДРОНОВ¹, НВ. КОСТИНА², МВ. ГОЛИЧЕНКОВ²

¹ ГНУ ВНИИСХМ;² МГУ имени М.В. Ломоносова;
³ РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева, г. Москва)

Агрофизические и микробиологические исследования проведены в посевах озимой ржи, клевера и чистого пара севооборотного участка сверхдлительного полевого опыта в экстремально жарких и засушливых погодных условиях вегетации. На основании определения агрофизического состояния, биохимической активности (эмиссия CO₂, N₂O, CH₄, азотфиксация) и молекулярно-генетического анализа микрофлоры почвенных образцов установлена ключевая роль растений в формировании и поддержании структуры и высокого разнообразия прокариотических микроорганизмов, а также их функциональной активности в дерново-подзолистой легкосуглинистой почве при экстремально высокой температуре и засухе.

Ключевые слова: длительные агрономические опыты, агрофизические свойства, био-разнообразие прокариот, молекулярно-генетические методы, эмиссия микрогазов, экстремальные условия.

CHANGES IN BOTH AGRO-PHYSICAL PROPERTIES
AND MICROBIOLOGICAL PROCESSES OF SOD-PODZOLIC
SOILS UNDER EXTREME CONDITIONS
OF HIGH TEMPERATURE AND DROUGHT

Yu.V KRUGLOV¹, MM UMAROV², MA. MAZIROV³, N.F. KHOKHLOV³, N.V. PATYKA¹,
V.A. DUMOVA¹, E.E. ANDRONOV¹, N.V. KOSTINA², M.V. GOLICHENKOV²

(¹ Main scientific researcher All-Russia Institute of Agricultural Microbiology;
² Moscow Lomonosov State University;³ RTSAU, Moscow)

Agrophysical and microbiological researches are carried out into crops of winter rye, clover and pure fallow soil of crop rotation, a site of long-term field experiment under extremely hot and droughty weather conditions of vegetation. On the basis of determination of agro-physical properties, biochemical activity (emission CO₂, N₂O, CH₄, nitrogen fixation) and the molecular-genetic analysis of microflora of soil samples have demonstrated a key role of plants in formation and maintenance of structure and a high biodiversity of procaryotic microorganisms, and also their functional activity in sod-podzolic light loam soil at extreme temperature and drought.

Key words: long-term agronomical experiences, agro-physical properties, a biodiversity of procaryotic microorganisms, molecular-genetic methods, emission of microgases, extreme conditions.

* Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант 09-04-13730-офи_ц

Почва является постоянно меняющейся биогенной системой, которая зависит как от природных, так и техногенных факторов. Важным показателем этих изменений являются агрофизические свойства почвы, ее биологическая активность, масса, состав и биоразнообразие почвенной биоты. По этому вопросу накоплен значительный материал, который обобщен в сборнике статей, посвященных 90-летнему многофакторному полевому опыту ТСХА [3], и в ряде других публикаций [4].

Целью настоящих исследований является анализ состояния основных физических свойств почвы, биомассы и разнообразия прокариотических микроорганизмов, а также эмиссии микрогазов, формирующихся в дерново-подзолистой почве в процессе жизнедеятельности микроорганизмов, в условиях экстремально высокой температуры и засухи.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на базе сверхдлительного многофакторного полевого опыта РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева, заложенного в 1912 г. [3]. Почвы для анализа отбирали на севооборотном участке в фазу кущения (20 мая) и молочно-восковой спелости (26 июня) озимой ржи из верхнего 15 см пахотного слоя в следующих вариантах опыта: 1 — озимая рожь + NPK; 2 — клевер + NPK; 3 — чистый пар + NPK.

Агрофизические исследования включали определение строения, плотности, твердости, водопроницаемости, влажности почвы [1]. Эмиссию CO_2 , N_2O , CH_4 и азотфиксирующую активность анализировали газохроматографическим методом по стандартным схемам [6].

Биомассу прокариот в почве определяли методом ПЦР — в реальном времени (Real-time PCR), используя флуоресцентные красители, обеспечивающие флуоресценцию, прямо пропорциональную количеству ПЦР-продукта — репортерной флуоресценции [8].

Для оценки филотипического разнообразия почвенных микроорганизмов использовали метод ТРФЛП (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов 16S rRNA [9]). Экстракцию ДНК микроорганизмов осуществляли методом, описанным [10], очистку ДНК от гумусовых веществ по [11].

Полимеразно-цепную реакцию проводили специфическими для 16S рPHK флуоресцентно-мечеными праймерами SSU-642-F HAATYGTGCCAGCAGC и SSU-1445-R GTCRTCCYDCCTTCCTC. Рестрикцию полученного ПЦР-продукта осуществляли синтетическими эндонуклеазами HaeIII, MspI. Анализ и построение профилей ТРФЛП проводили на автоматическом секвенаторе Beckman CEQ 8000. Для филогенетического анализа полученных результатов использовали компьютерные программы Fragsort и Vector VNTI.

Данные агрофизических анализов обрабатывали методами описательной (вариационной) статистики и регрессионного анализа на персональном компьютере с использованием программы Excel. При структурном анализе данных использовали оценки непараметрической статистики [5].

Результаты газохроматографических анализов CO_2 , N_2O , C_2H_4 и азотфиксирующей активности подвергались статистической обработке по программе Statistica 6.0 для Windows — Kruskal-Wallis ANOVA.

Результаты

В 2010 г. сложились экстремальные метеорологические условия (табл. 1). Высокая температура воздуха, достигающая 31-38°C, и низкая относительная влажность воздуха при дефиците поступления воды с осадками на протяжении 3 мес.

Т а б л и ц а 1

**Метеорологические условия (в среднем по декадам) вегетационного периода 2010 г.
(по данным обсерватории имени В. А. Михельсона)**

Показатель	Май			Июнь			Июль		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Температура воздуха, °С	17,3	18,4	15,4	17,3	16,6	23,5	23,7	26,9	26,5
Максимальная температура воздуха, °С	27,7	26,6	26,2	27,9	31,0	31,0	32,1	36,2	38,6
Сумма осадков, мм	12,9	20,2	23,2	33,0	21,2	0	0	6,9	1,2
Относительная влажность воздуха, %	63	65	72	75	74	53	61	58	57
Дефицит влажности воздуха, г/Па	8,5	8,4	6,0	5,5	6,1	15,7	12,8	16,6	19,7

привели к атмосферной и почвенной засухе, в результате чего у растений озимой ржи ускорилось развитие и уборка проведена на 3 недели раньше. Урожайность озимой ржи составила 3,39 т/га, тогда как урожай сена клевера в связи со значительным дефицитом осадков и чрезмерной солнечной инсоляцией был низким — 2,5-3,0 т/га.

Исследования агрофизических свойств почвы выявили значительную вариабельность основных показателей в зависимости от культуры растений и сроков наблюдения. Весной, при относительно удовлетворительной влагообеспеченности под озимой рожью, так же как и под клевером, складывается высокая плотность почвы. В парующем поле в результате механической обработки она была заметно ниже (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Агрофизические свойства почвы под покровом растений и в условиях чистого пара, сложившиеся в экстремально засушливом и жарком 2010 г.

Вариант	Месяц	Плотность, г/см ³		Твердость, Н/см ²		Влажность, %		Водопроницаемость, мм/ч	
		М	S	М	S	М	S	М	S
	Май	1,61	0,04	312	54	9,6	1,4	4,6	1,4
	Июнь	1,40	0,04	532	56	9,1	1,3	47,6	21,8
Клевер	Май	1,53	0,06	344	43	7,9	1,04	1,4	1,5
	Июнь	1,59	0,10	620	-	6,6	1,0	47,6	0,5
	Май	1,41	0,10	250	70	13,0	2,3	8,0/5,6*	12,1/8,4*
	Июнь	1,38	0,06	292	87	9,5	1,4	18,8/1*	6,8/2,8*

М — среднее арифметическое, **S** — стандартное квадратичное отклонение. * Числитель — 0-10, знаменатель 10-20 см.

Данные о твердости (пенетрации) почвы в целом отражают картину физического состояния, описываемого с помощью плотности (см. табл. 2). Однако наблюдалось значительное варьирование этого показателя во всех вариантах опыта, что вызвано

не столько наличием локальных зон с повышенной твердостью, сколько появлением микроплощадей, взрыхленных лапами культиватора (в чистом пару) или биологической пористостью (в посевах озимой ржи).

Водопроницаемость почвы была наиболее высокой в парующей почве и уменьшалась под посевами ржи и клевера.

В июне клевер был скошен, озимая рожь находилась в стадии молочно-восковой спелости. Почва была сильно пересохшей. Дневная температура воздуха достигала 31°C (см. табл. 1). Результаты исследований в это время показали, что плотность почвы под покровом ржи заметно снижалась, тогда как в других вариантах практически оставалась на том же уровне, что и в мае.

Твердость почвы в период засухи и высокой температуры воздуха в июне по сравнению с маем возрастала в 1,5-2,0 раза во всех вариантах опыта.

Результаты определения твердости почвы (см. табл. 2) хорошо коррелировали с информацией о ее плотности и дифференциальной пористости, сложившейся на различных полях севооборота: она была наиболее высокой под покровом клевера и наименьшей в парующей почве.

В результате повышенной транспирации и физического испарения воды происходило быстрое иссушение почвы и уже во второй половине июня растения испытывали острый недостаток влаги. Влажность почвы составляла 6,7% под покровом клевера, 9,1% в посевах озимой ржи и 9,5% на делянках чистого пара (см. табл. 2).

Водопроницаемость «сухой почвы» в июне (см. табл. 2) вследствие микротрещин и биопор по ходу корней имела высокую вариабельность (коэффициент вариации от 10 до 87%) и в целом была выше, чем в мае, во всех вариантах опыта. Под покровом растений она была существенно выше, чем в парующей почве. Таким образом, установлено, что под культурами озимая рожь, клевер, в чистом пару шестипольного полевого севооборота такие агрофизические характеристики, как влажность, плотность, твердость, структура и водопроницаемость почвы изменяются в зависимости от культуры растений, температуры воздуха и влагообеспеченности.

В агроэкологических условиях лета наиболее высокий уровень эмиссии ССК наблюдался под посевами клевера. При этом уровень продуктивности диоксида углерода мало отличался по срокам отбора образцов (май, июнь). Потенциальная активность дыхания почвы (табл. 3) была выше под покровом культуры растений, чем в парующей почве, и существенно повышалась в процессе развития растений в июне во всех без исключения вариантах опыта.

Таблица 3

**Влияние культуры растений на эмиссию микрогазов
из кислой дерново-подзолистой почвы**

Показатель	Озимая рожь		Клевер		Чистый пар	
	май*	июнь*	май	июнь	май	июнь
Актуальное дыхание, мкг С-СО ₂ / г/сут.	63,89	65,50	76,47	84,66	60,98	50,91
Потенциальное дыхание, мкг С-СО ₂ /г/сут.	203,00	318,83	203,00	429,06	211,72	381,21
Азотфиксация, нгС ₂ Н ₄ /г/ч	24,51	115,50	24,51	111,75	24,511	1,23
Денитрификация, мкг Ы ₂ 0/г/сут.	28,60	62,70	26,83	42,43	49,89	43,80
Метаногенез, нг СН ₄ /г/сутки	0,37	0,94	0,370	0,96	0,37	0,90

* Максимальная температура в мае 27,7-26,2°C, в июне 31,0—32,1 °С; осадки в сумме за май — 66,1 мм, за июнь — 21,2 мм (за две декады до отбора образцов почвы осадки не выпадали).

Выделение метана из дерново-подзолистой почвы (см. табл. 3) было крайне низким и составляло 0,37 нг в мае и около 0,90 нг CH_4 на 1 г/сут. в июне независимо от варианта опыта.

Денитрифицирующая активность почвы варьирует от 26,8 до 62,7 мкг BI_2O /г/сут. (см. табл. 3). В мае наиболее интенсивные процессы эмиссии N_2O наблюдались в парующей почве.

В условиях водного дефицита и высокой температуры воздуха, которые были в июне, интенсивность денитрификации в почве под покровом растений возрастала в 1,5-2,2 раза, достигая на посевах озимой ржи 62,7 мкг BI_2O /г/сут.

Результаты сравнительного анализа данных физического состояния почвы (влажность, плотность, строение, твердость, водопроницаемость) и эмиссии газов (CO_2 , N_2O , CH_4) не выявили четкой корреляции между ними в пределах тех параметров, которые сложились в условиях засушливого и жаркого лета. Это приводит к заключению, что определяющими факторами, оказывающими существенное влияние на эффективность эмиссии газов в агроэкосистемах, являются характер растительного покрова и температура почвы и воздуха.

Результаты анализа биомассы почвенных прокариот, определяемой молекулярным методом ПЦР в реальном времени, показали, что величина ее накопления зависит от сезонной динамики и культуры растений. В мае в процессе активной вегетации растений и использования органических и минеральных субстратов биомасса микроорганизмов была выше под покровом растений, чем в парующей почве, что хорошо коррелирует с индексом потенциального дыхания почвы (рис. 1).

В июне, в условиях водного дефицита и высокой температуры воздуха, достигающей 31°C , биомасса прокариотных микроорганизмов была на порядок выше, чем в мае при благоприятных для вегетации растений метеорологических условиях.

Это согласуется с данными по эмиссии закиси азота, метана и азотфиксации, что объясняется, по-видимому, микроаэрофильными условиями, благоприятными для этих процессов, которые складываются в почвенных макро- и микроагрегатах при подсыхании почвы.

Наиболее высокий уровень биомассы прокариот формируется под покровом озимой ржи, меньше под клевером и еще меньше — в парующей почве.

Молекулярно-генетический метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов 16S rRNA (Т-РФЛП) позволил выявить разнообразие и филогенетическую структуру прокариотного комплекса почвенных микроорганизмов, формирующихся под покровом озимой ржи, клевера и в условиях чистого пара (рис. 2-3). Как видно, филогенетическое разнообразие доминирующих форм прокариот самое высокое под покровом озимой ржи, меньше — под покровом клевера и в парующей почве. В условиях высокой температуры, засухи и низкой влажности почвы разнообразие микроорганизмов резко снижается во всех вариантах опыта. Изменяется структура

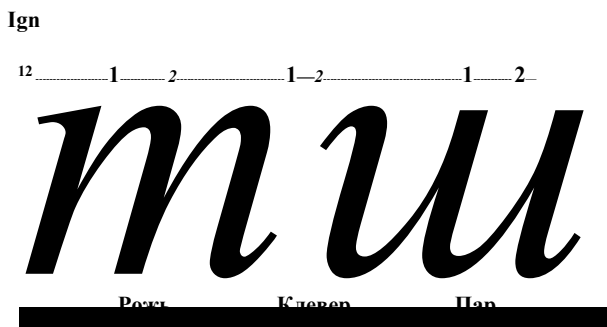


Рис. 1. Общая численность прокариотических микроорганизмов в дерново-подзолистой почве под различными культурами севооборота по результатам ПЦР с детекцией в реальном времени. Ось ординат имеет размерность численности рРНК оперонов на 1 г почвы. Отбор образцов почвы: 1 — май, 2 — июнь

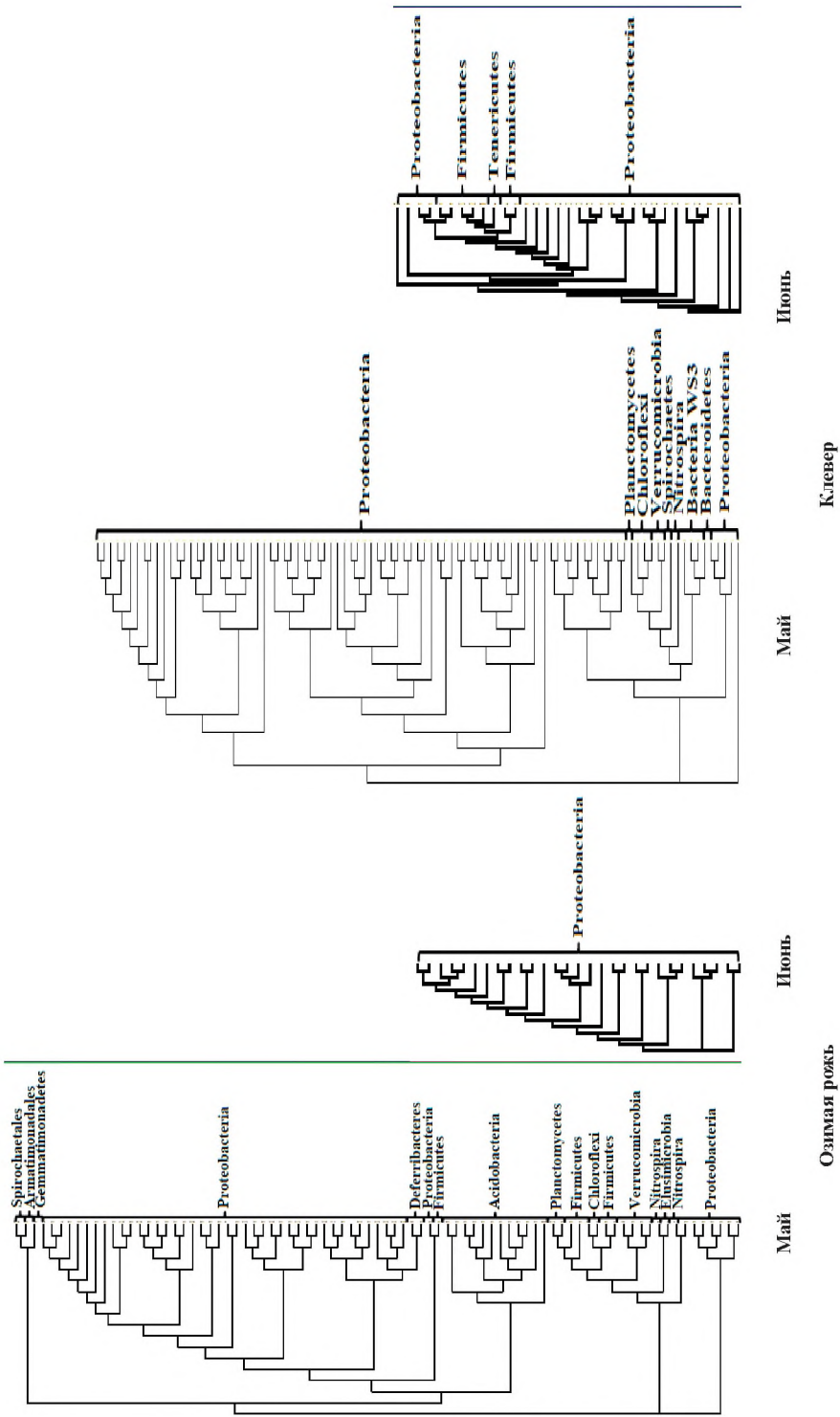


Рис. 2. Дендрограммы биоразнообразия прокариотических микроорганизмов в почве под покровом озимой ржи и клевера

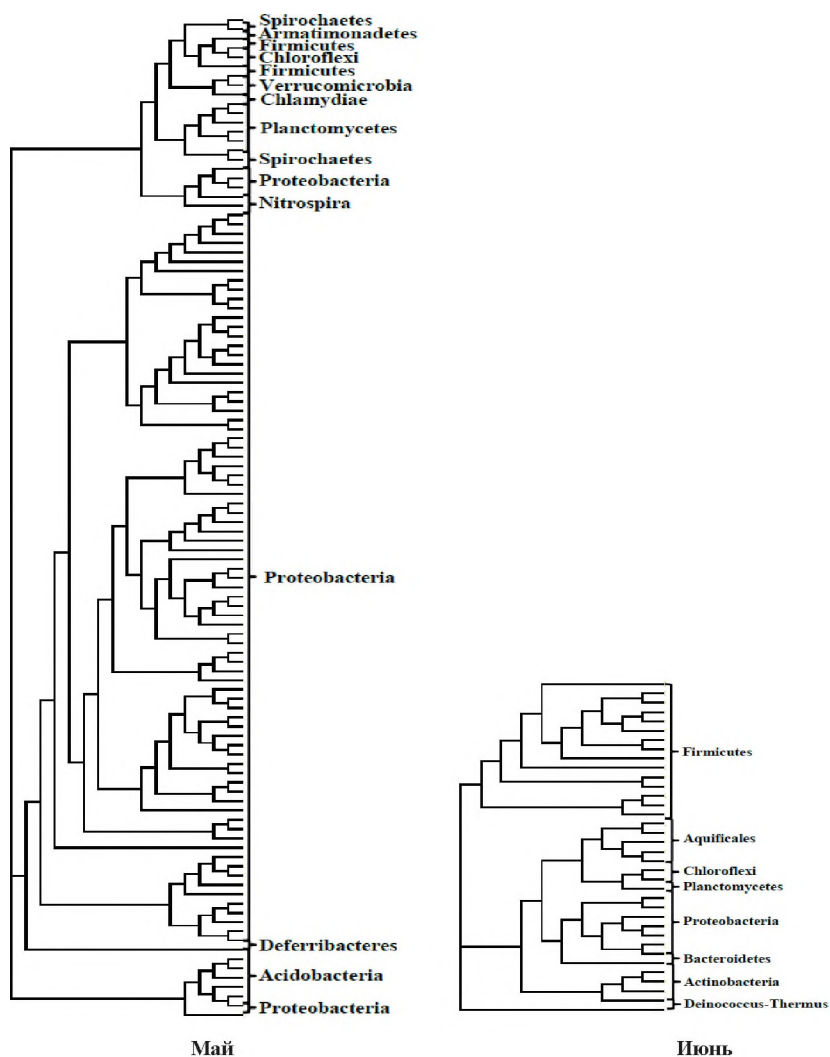


Рис. 3. Дендрограмма филотипической структуры прокариот дерново-подзолистой почвы в условиях чистого пара

сообщества прокариот. Это означает существенное изменение активности микрофлоры, возможное появление термофильных форм микроорганизмов и интенсификацию ферментативных процессов по градиенту температуры почвы, обеспечивающих высокую эмиссию газов.

Выводы

1. Проведенные исследования показали, что за столетний период применения системы земледелия, включающей шестипольный полевой севооборот и минеральные удобрения, сложились относительно стабильные физические свойства дерново-подзолистой легкосуглинистой почвы, которые характеризуются высокой плотностью и низкой водопроницаемостью. Под покровом культур озимой ржи и клевера после весеннего уплотнения

и последующей вегетации почва имеет более высокую плотность и меньшую влажность, чем в чистом пару.

2. Установлено, что в условиях водного дефицита, достигающего в июне критических значений, физические свойства почвы, в рамках варибельности тех параметров, которые сложились, не оказывали заметного влияния на эмиссию газов. Объем выделения газов из почвы, как правило, был выше под покровом растений, чем в парующей почве.

3. У исследуемых нами культур севооборота биомасса прокариот была наиболее высокой в почве под посевом озимой ржи и далее убывала под клевером и в условиях чистого пара, что, по-видимому, обусловлено разной массой и качеством поступающего в почву органического субстрата. При этом следует подчеркнуть, что по сравнению с маем в июне при дефиците влаги и высокой температуре воздуха биомасса прокариот и соответственно потенциальное дыхание, денитрификация и метаногенез существенно возрастают.

4. Выявлено, что весной в период активной вегетации озимой ржи и клевера наблюдалось достаточно высокое разнообразие прокариотических микроорганизмов во всех вариантах опыта.

5. Наиболее сложный и разнообразный по филотипической структуре комплекс прокариот сформировался под культурой озимой ржи, менее — в посевах клевера и в парующей почве.

6. Высокая температура и засуха в июне по-разному отразилась на филотипической структуре прокариот в почве. Под покровом озимой ржи с мощной, хорошо развитой и глубоко уходящей в почву корневой системой эти изменения носили наиболее существенный характер. В посевах клевера количество доминирующих филотипов снижалось наполовину. Под обеими культурами доминировали бактерии, относящиеся к филе Proteobacteria. В парующей почве в условиях засухи эти микроорганизмы оказались в миноре.

Библиографический список

1. Вадюнина А.Ф., Корчагина З.А. Методы исследования физических свойств почв. М.: Наука, 1986. 416 с.
2. Волков О.И. Влияние корневых выделений прорастающих семян ячменя (*Hordeum vulgare* L.) на качественный и количественный состав органических компонентов почвы // Журнал общей биологии, 2010. Т. 71. № 4. С. 359-368.
3. Длительному полевому опыту ТСХА 90 лет: итоги научных исследований, (ред. Сафонов А.Ф). М.: Изд-во МСХА, 2002. 262 с
4. Доспехов Б.А. Некоторые итоги стационарного полевого опыта Тимирязевской академии за 60 лет // Известия ТСХА, 1972. Вып. 6. С. 28-47.
5. Дмитриев Е.А. Математическая статистика в почвоведении. М: МГУ, 1995, 319 с.
6. Звягинцев Д.Г., Асеева И.В., Бабьева И.П., Мирчинк Т.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во МГУ, 1992.
7. Красильников Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения. М: Изд. Академии Наук СССР, 1958. 463 с.
8. Gochhai S., Bukhari S.I., and Bamezai R.N.K. mRNA Quantitation Using Real Time PCR // Advanced Techniques in Soil Microbiology (A. Varma, R. Oelmuller (Eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007. P. 54-72.
9. Marsh T.L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplicons // Curr. Opin Microbiol., 1999. №2. P 323-327.
10. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus., 1987. № 12. P 13-15.
11. Moreira D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations // Nucleic Acids Research, 1998. Vol. 26. № 13. P 3309-3310.

Информация об авторах

Круглов Юрий Владимирович — д. б. и., проф., гл. науч. сотр., Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии; тел. 8 (812) 476-28-02, e-mail: yuvkruglov@yandex.ru.

Умаров Марат Мутагарович — д. б. н., проф., кафедра биологии почв факультета Почвоведения МГУ имени МВ.Ломоносова.

Мазиров Михаил Арнольдович — д. б. н., проф., зав. каф. земледелия и агрометеорологии ФГОУ ВПО РГАУ — МСХА имени КА. Тимирязева; тел. 8 (495) 976-16-42; e-mail: mazirov@mail.ru.

Хохлов Николай Федорович — д. с.-х. н., проф., ФГОУ ВПО РГАУ — МСХА имени КА. Тимирязева; тел. 8 (495) 976-08-51, e-mail: hohlov@timacad.ru.

Патыка Николай Владимирович — к. с.-х. н., ст. науч. сотр., Государственный научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии; тел. 8 (812) 476-28-02, e-mail: n_patyka@mail.ru.

Думова Валентина Анатольевна — инженер-микробиолог, Государственный научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии; тел. 8 (812) 476-28-02.

Андронов Евгений Евгеньевич — к. б. н., зав. лабораторией Государственного научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии; тел. 8 (812) 466-59-79, e-mail: eeandr@gmail.com.

Костина Наталья Викторовна — к. б. н., ст. преи., кафедра биологии почв факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова; тел. 8 (495) 939-35-46, e-mail: nvkostina@mail.ru

Голиченков Максим Владимирович — к. б. н., кафедра биологии почв факультета Почвоведения МГУ имени МВ.Ломоносова; тел. 8 (495) 939-35-46.

Information about the authors

Kruglov Yury Vladimirovich — Doctor of Biological Sciences, Prof., Main scientific researcher All-Russia Institute of Agricultural Microbiology; e-mail: yuvkruglov@yandex.ru.

Umarov Marat Mutagarovich — Doctor of Biological Sciences, Prof. Moscow Lomonosov State University, Faculty of Soil Science, Department of Soil Biology; 8 (495) 939-44-46, mumarov@mail.ru.

Mazirov Mikhail Arnoldovich — Doctor of Biological Sciences, Prof., RTSAU, Moscow; e-mail: mazirov@mail.ru.

Khokhlov Nikolai Fjodorovitch — Doctor of agricultural Sciences, Prof., RTSAU, Moscow; e-mail: hohlov@timacad.ru.

Patyka Nikolai Vladimirovich — PhD, Senior researcher, All-Russia Institute of Agricultural Microbiology; e-mail: n_patyka@mail.ru.

Dumova Valentina Anatolevna — Engineer microbiologist, All-Russia Institute of Agricultural Microbiology; 8 (812) 476-28-02.

Andronov Evgeny — PhD, Head of lab, All-Russia Institute of Agricultural Microbiology; e-mail: eeandr@gmail.com.

Kostina Natalya Viktorovna — Ph.D, Senior Lecturer, Moscow Lomonosov State University, Faculty of Soil Science, Department of Soil Biology; e-mail: nvkostina@mail.ru.

Golichenkov Maxim Vladimirovich — Ph.D., Research associate, Moscow Lomonosov State University, Faculty of Soil Science, Department of Soil Biology; e-mail: affen@mail.ru.