

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЗИРОВАННОГО СВЕЖЕГО ПОМЕТА КУР КЛЕТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МАЛОПЛОДОРОДНОЙ ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЫ

¹Н.Н. Щукин, кандидат сельскохозяйственных наук

²Н.Ю. Пухова, кандидат биологических наук

³В.Д. Соболев, кандидат биологических наук

⁴Е.А. Бражник, аспирант

¹Верхневолжский федеральный аграрный научный центр

²Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова

³ООО «Биотроф»

⁴Волгоградский государственный аграрный университет

E-mail: 9159803437@yandex.ru

Ключевые слова: дерново-подзолистая почва, куриный помет, бактерии, таксон, секвенирование, микробное сообщество, микроорганизмы, патогены.

Реферат. Применение биологизированного свежего помета кур клеточного содержания в растениеводстве, после тщательного изучения его экологической безвредности для окружающей среды, позволит снизить затраты птицефабрик на утилизацию помета и использовать его для более эффективного возделывания сельскохозяйственных культур на малоплодородных землях. В опыте использована высокая доза органики – 120 т/га, внесенной путем разбрасывания (контроль – без удобрений). Секвенирование метагеномов почвенных образцов показало, что в результате внесения ферментированного бактериями пробиотиков помета филогенетический состав почвенного микробиома сохранялся, но изменялись его таксономическая структура и функциональность в связи с ростом численности бактерий (при различной активности таксонов): в пахотном горизонте отмечено увеличение их обилия в 1-й срок отбора образцов с $6,9 \cdot 10^7$ до $1,3 \cdot 10^8$ копий/г почвы гена 16S рРНК бактерий, а через 30 дней – с $1,6 \cdot 10^7$ до $1,3 \cdot 10^8$ копий/г. В указанных целях исследовалось и наличие в удобренной почве условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, которые обнаружены во всех почвенных образцах: более высокая доля энтеробактерий отмечена в контрольном образце (0,6 %), а с пометом – не превышала 0,15 %; содержание патогенных бактерий на удобренном фоне в 1-й срок отбора почвы практически не изменялось (0,7 – 0,8 %), но во 2-й – резко снизилось (с 2,5 до 1,1 %). Однако снижение содержания патогенных бактерий сопровождалось увеличением их численного обилия (с $3,9 \cdot 10^5$ до $1,4 \cdot 10^6$ копий/г), преимущественно бактерий *Pseudomonas* sp. (с $2,1 \cdot 10^5$ до $9,3 \cdot 10^5$ копий/г), что является следствием общего роста обилия бактерий в микробиоме на фоне обогащения почвы органикой и повышения почвенного плодородия. На указанном этапе исследований существенного негативного микробиологического влияния последствий биологизированного свежего куриного помета на экологическое состояние почвы не выявлено.

INFLUENCE OF FRESH BIOLOGICAL CHICKEN DROPPINGS ON THE MICROBIOLOGICAL INDICATORS OF LOW-PRODUCTIVE SODDY PODZOLIC SOIL

¹N.N. Shchukin, PhD in Agricultural Sciences

²N.Yu. Pukhova, PhD in Biological Sciences

³V.D. Sobolev, PhD in Biological Sciences

⁴E.A. Brazhnik, PhD student

¹Upper Volga Federal Agrarian Research Center

²P.G. Demidov Yaroslavl State University

³Biotroph LLC

⁴Volgograd State Agrarian University

Keywords: soddy-podzolic soil, chicken droppings, bacteria, taxon, sequencing, microbial community, microorganisms, pathogens.

Abstract. *The article presents fresh biological dropping of caged chickens in crop production. After a thorough study of its environmental friendliness to the environment, this new biological dropping will reduce the cost of poultry farms for the disposal of dropping and use for more efficient cultivation of crops on marginal lands. The experiment used a high dose of organic matter - 120 t/ha, applied by spreading (control - without fertilisers). Sequencing of the metagenomes of soil samples showed that the soil microbiome's phylogenetic composition was preserved due to the introduction of bacterial-fermented probiotic dropping.*

*The authors also note that its taxonomic structure and functionality changed due to increased bacteria (with the different activity of taxa). Thus, the authors report an increase in the abundance of bacteria in the 1st sampling period from $6.9 \cdot 10^7$ to $1.3 \cdot 10^8$ copies/g of the soil of the 16S rRNA gene of bacteria in the plough horizon, and after 30 days - from $1.6 \cdot 10^7$ to $1.3 \cdot 10^8$ copies/g. For these purposes, opportunistic and pathogenic microorganisms in the fertilised soil found in all soil samples were also studied. A higher proportion of enterobacteria was noted in the control sample (0.6%), and with dropping, it did not exceed 0.15%. The content of pathogenic bacteria on a fertilised background in the 1st period of soil sampling practically did not change (0.7–0.8%), but in the 2nd period, it decreased sharply (from 2.5 to 1.1%). However, the authors note a decrease in the content of pathogenic bacteria. This decrease was accompanied by an increase in their abundance (from $3.9 \cdot 10^5$ to $1.4 \cdot 10^6$ copies/g), mainly *Pseudomonas* sp bacteria (from $2.1 \cdot 10^5$ to $9.3 \cdot 10^5$ copies/g), which is a consequence of a general increase in the abundance of bacteria in the microbiome against the background of enrichment of the soil with organic matter and an increase in soil fertility. The authors did not reveal a significant negative microbiological effect after the action of fresh biological chicken dropping on the soil's ecological state at the specified research stage.*

Методами классической микробиологии основательно изучены различные аспекты влияния куриного помета на культивируемую почвенную микробиоту при применяемых технологиях производства и утилизации органических отходов в разнообразных экологических условиях.

Исследованиями установлена зависимость микробиологических свойств почвенных прокариотных сообществ от антропогенных абиотических факторов [1]. Обогащение почвы органическим веществом, проведение сельскохозяйственных обработок и различных культуртехнических мероприятий наряду с высеваемыми культурами изменяют физико-химические свойства почв – среду обитания микроорганизмов [2, 3]. В свою очередь, активность тех или иных таксонов микробиома формирует его функциональность. Поэтому микробиомы обрабатываемых и используемых в сельском хозяйстве земель по своим микробиологическим характеристикам значительно отличаются от естественных биоценозов [4]. Улучшение их функций в благоприятном для растений направлении (например, в результате внесения органоминеральных удобрений) способствует повышению продуктивности малоплодородной почвы [5].

Внедрение в молекулярную экологию методов секвенирования нуклеотидных последовательностей позволило полнее исследовать почвенные микроорганизмы и изучить микробиологические особенности прокариотных сообществ почвы [6, 7].

Выявлено, что в почве, включая ризосферу растений, существуют так называемые некультивируемые микроорганизмы, присутствие которых невозможно детектировать традиционными методами на питательных средах. По различным оценкам, обилие некультивируемой микрофлоры составляет 90 – 99 % состава почвенных микробиомов [8]. К ним относятся ранее не известные виды и формы микроорганизмов, прекращающих рост на питательных средах под влиянием неблагоприятных факторов, но сохраняющих жизнеспособность и возобновляющих пролиферацию при улучшении условий культивирования. Некультивируемое состояние (реакция на среду обитания) обнаружено у многих видов бактерий, включая патогенные [9].

Метагеномное пиросеквенирование микробиомов различных типов почвы по регионам России показало доминирование бактерий, относящихся к филам *Proteobacteria* (до 59,3 %), *Actinobacteria* (до 55,4 %), *Acidobacteria* (до 26,5 %), *Verrucomicrobia* (до 13,6 %), *Bacteroidetes* (до 10,5 %), *Firmicutes* (до 8,2 %), *Gemmatimonadetes* (до 6,9 %), *Chloroflexi* (до 5,7 %). Подтвердилась зональность таксономической структуры микробиомов: преобладание представителей филы *Proteobacteria* в почвах северных регионов и *Actinobacteria* – в южных. В почвах с низкими значениями pH отмечено увеличение численности бактерий филы *Acidobacteria*, а в щелочных почвах – филы *Firmicutes* [6, 7].

Полученные данные иллюстрируют зависимость распространения представителей различных бактериальных фил от экологических условий, из которых основное влияние на структуру почвенного сообщества микроорганизмов оказывают влажность и кислотно-щелочной баланс почвы [6, 7, 10, 11].

Приведем примеры функциональности таксономически значимых бактерий, распространенных в почвенных прокариотических сообществах. Протеобактерии, преобладающие в микробиомах дерново-подзолистой почвы различной степени кислотности – сложная и разнообразная фила бактерий среди прокариотических организмов – охватывают около 1600 таксонов грамотрицательных бактерий, или примерно треть от всех известных видов бактерий.

Согласно филогенетической классификации, фила *Proteobacteria* включает специфический порядок бактерий *Rhizobiales*, многие из которых обладают способностью к азотфиксации в симбиозе с бобовыми растениями, образуя корневые клубеньки. Свободноживущие ризобии (в отсутствие растения-хозяина), подобно другим почвенным микроорганизмам, используют для питания вещества, растворенные в почве [12].

Известно, что благоприятные почвенно-экологические условия жизнедеятельности бактерий с целлюлозоразлагающей эколого-физиологической функцией близки к оптимальным для произрастания полевых культур, поэтому изменение их численности служит показателем влияния определенных агротехнических мероприятий (в том числе внесения органики) на биологическую активность и уровень плодородия почвы [8, 9, 13].

Патогенные свойства бактерий связаны с особенностями их ферментов и токсинов, которые обладают не только определенной патогенностью по отношению к растениям и животным, но и пестицидной активностью против сорняков, грибов, насекомых и нематод. В полной мере это относится к бактериям *Burkholderia* sp. Одни штаммы этого вида (таксона) вызывают бактериозы зерновых, овощных культур и картофеля, а другие – выделяют продукты, обладающие гербицидной (против двудольных и осоковых сорняков), фунгистатической (против грибных заболеваний) или инсектицидной (против насекомых и нематод) активностью.

Высокой фитопатогенностью для многих сельскохозяйственных культур обладают бактерии видов *Pseudomonas* sp. и *Xanthomonas* sp. – возбудители бактериальных заболеваний, которые в сочетании с грибными инфекциями, например зерновых культур, являются причинами слабого кущения (с признаками, напоминающими азотно-фосфорное голодание растений), карликовости стеблей, стерилизации колоса, почернения зерен у основания, неразвитости корневой системы и корневых гнилей, неустойчивости растений к засухе, снижения зимостойкости и полегания; падения урожайности и устойчивости к неблагоприятным природным (абиотическим) факторам и др.

В обычных условиях совместная бактериально-грибная инфекция трудно распознаваема, а признаки болезней часто приписываются одним грибам или недостаткам элементов питания в почве. При этом использование фунгицидов только против грибных инфекций усиливает бактериальные, а внесение минеральных удобрений не приносит желаемого результата.

Кроме того, бактерии *Pseudomonas* могут снижать эффективность ряда гербицидов и инсектицидов, а также обладают редкой способностью выделять белок – активатор заморзания воды, который снижает ее температуру в период зимовки озимых зерновых.

В результате этого даже успешно перезимовавшие растения могут погибнуть весной после возобновления вегетации [14, 15].

Задачей данных исследований является изучение таксономического состава, численности и функциональных изменений почвенного микробиома в результате внесения свежего биологизированного помета (путем включения пробиотиков в рацион кормления птицы клеточного содержания) в малопродуктивную дерново-подзолистую почву, исключая стадию обеззараживания и доработки (компостирования или высушивания помета) в навозохранилищах, при соблюдении норм экологической безопасности окружающей среды.

Применение биологизированного свежего помета кур клеточного содержания в растениеводстве после тщательного изучения его экологической безвредности для окружающей среды может снизить затраты птицефабрик на утилизацию помета, а также использовать его для более эффективного возделывания сельскохозяйственных культур, особенно на малопродуктивных землях.

Биологизацию помета кур клеточного содержания производили путем включения в рацион их кормления пробиотиков. Свежий помет из птичников вывозили в течение 1 – 2 дней на поля прицепом-разбрасывателем (емкостью 25 м³), исключая стадию промежуточного хранения и обеззараживания в навозохранилище. Далее помет в дозе 120 т/га разбрасывали под весновспашку, которую провели через 7 дней после внесения органики. Опыт закладывали в двух вариантах (контроль – без удобрений и удобрённый – 120 т/га биологизированного помета), а участок засеяли яровой пшеницей. Размещение опытных делянок (площадью 1 га) – систематическое.

Образцы почвы отбирали методом «конверта» по 5 проб с каждого варианта в 2 срока: 1 июля (в слоях 0 – 20 и 20 – 40 см) – в фазу трубкования пшеницы и 30 июля (в слое 0 – 20 см) – в фазу молочной спелости зерна. Для исследований использовались смешанные образцы проб, которые подсушивали при комнатной температуре и хранили в морозильной камере при –70 °С.

В молекулярно-генетической лаборатории ООО «БИОТРОФ» (г. Санкт-Петербург) проведено изучение таксономической структуры бактериального сообщества почвы с использованием NGS-секвенирования нуклеотидных последовательностей и подсчет численности копий бактерий в реальном времени (real-time PCR) при помощи количественной ПЦР препаратов ДНК, выделенных из образцов суглинистой дерново-подзоистой почвы под посевами яровой пшеницы по вариантам – без удобрений (контроль) и на фоне последствия внесения биологизированного свежего помета кур.

Амплификация проведена с использованием ДНК-амплификатора Verity (Life Technologies, Inc., США) с помощью эубактериальных праймеров (IDT) 343F (CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3) и 806R (GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3), фланкирующих участок V1V3 гена 16S рПНК.

Метагеномное секвенирование осуществляли на геномном секвенаторе MiSeq (Illumina, Inc., США) с набором MiSeq Reagent Kit V3 (Illumina, Inc., США). Максимальная длина полученных последовательностей составила 2 x 300 нт. Химерные последовательности были исключены из анализа с помощью программы USEARCH 7.0.

Обработка полученных ридов 2 x 300 нт происходила с помощью биоинформатической платформы CLC Bio GW 7.0 (Qiagen, Нидерланды) и включала в себя перекрытие, фильтрацию по качеству (QV>15) и триммирование праймеров. Определение таксономической принадлежности микроорганизмов до рода проводили с применением программы RDP Classifier.

Погрешность прибора MiSeq, на котором проводили NGS-секвенирование, составляла 5 %.

Результаты секвенирования нуклеотидных последовательностей и подсчета методом ПЦР численности копий гена 16S рПНК бактерий из различных почвенных горизонтов по вариантам опыта представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние последствия помета на обилие бактерий в почве
Influence of dropping after effect on the abundance of bacteria in the soil

№ п/п	Сроки отбора образцов	Удобрение	Слой почвы, см	Количество копий бактерий, копий/г (lg копий/г)
1	1 июля	Без удобрений (контроль)	0-20	$6,9 \cdot 10^7$ (7,84)
2			20-40	$6,3 \cdot 10^5$ (5,80)
3		Последствие 120 т/га	0-20	$1,3 \cdot 10^8$ (8,11)
4			20-40	$1,5 \cdot 10^6$ (6,17)
5	30 июля	Без удобрений (контроль)	0-20	$1,6 \cdot 10^7$ (7,20)
6		Последствие 120 т/га	0-20	$1,3 \cdot 10^8$ (8,11)

Распределение бактерий по горизонтам почвы отличалось неравномерностью: в пахотном слое (0 – 20 см) численность бактерий варьировала в пределах $6,9 \cdot 10^7$ – $1,3 \cdot 10^8$ копий/г почвы и снижалась примерно на 2 порядка с глубиной (в слое 20 – 40 см).

Внесение помета способствовало росту обилия микроорганизмов в почве по сравнению с контролем: в образцах от 1 июля с $6,9 \cdot 10^7$ до $1,3 \cdot 10^8$ в слое 0 – 20 см и с $6,3 \cdot 10^5$ до $1,5 \cdot 10^6$ копий/г в слое 20 – 40 см. Вместе с тем через 30 дней в пахотном слое контрольного варианта наблюдалось снижение численности бактерий (до $1,6 \cdot 10^7$ копий/г) и их стабильность – на удобренном фоне (в начале и конце опыта – по $1,3 \cdot 10^8$ копий/г).

Заметное увеличение (на 1 порядок) обилия бактерий в удобренной почве – показатель активности процессов, инициируемых, как известно, определенными группами микроорганизмов углеродного и азотного циклов в аэробных и анаэробных условиях вследствие повышения содержания в почве питательных веществ (запасов минерального азота – от низкого до очень высокого), а также снижением кислотности (рН – от слабокислой до близкой к нейтральной) в результате внесения помета.

Согласно проведенному филогенетическому анализу (рис. 1), таксономический состав микробного сообщества бактерий сформирован преимущественно представителями 10 фил бактерий (Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Verrucomicrobia, Parcubacteria и Planctomycetes), суммарная доля которых в образцах пахотного слоя почвы оставалась постоянной (около 91 – 93 %), но резко уменьшалась с глубиной: с 93 до 67 % – на удобренном фоне и с 92 до 48 % – в контроле (при ухудшении условий аэрации почвы с глубиной).

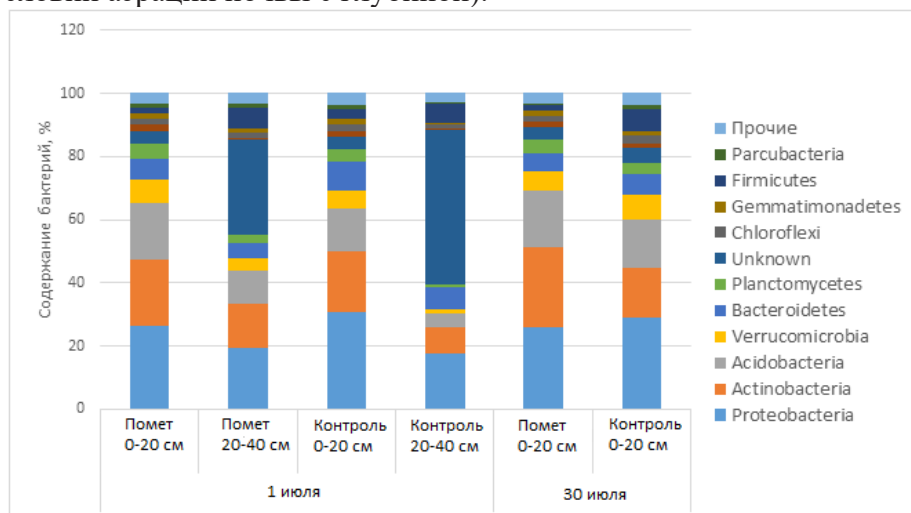


Рис. 1. Влияние последствия помета на разнообразие бактериального сообщества на уровне фил
Fig. 1. Influence of the dropping aftereffect on the diversity of the bacterial community at the phylum level

Глубже по профилю почвы возрастала доля неопределенных последовательностей ДНК (с 4 – 5 % в слое 0 – 20 см до 30 – 49 % в слое 20 – 40 см). В разнице содержания неидентифицируемых микроорганизмов в подпахотном горизонте на фоне последствия помета (30 %) и в контроле (49 %), также усматривается взаимосвязь с плодородием почвы.

Наиболее широко в таксономическом составе микробиома представлена фила Proteobacteria со вкладом в сообщество 18 – 31 %, далее следуют Actinobacteria (8 – 25 %), Acidobacteria (4 – 18 %), Bacteroidetes (5 – 9 %), Verrucomicrobia (2 – 7 %), Firmicutes (1 – 7 %) и Plantomicetis (1 – 5 %). Обозначенные филы включают в себя широкий спектр бактерий с разными эколого-физиологическими функциями, а динамика их долевого участия в сообществе бактерий зависит от плодородия, температуры, влажности и глубины отбора почвенных образцов.

Последствие внесения помета сопровождалось повышением таксономического значения представителей одних фил и подавлением – других. Усилением активности на улучшение плодородия почвы отзывались бактерии Actinobacteria (их доля возросла с 15 – 19 до 21 – 25 %) и Acidobacteria (с 13 – 16 до 18 %). Подобная реакция характерна и для представителей Bacteroidetes и Firmicutes. При этом доленое участие в микробиоме протеобактерий несколько снижалось (с 29 – 31 до 26 %).

На уровне порядков в почвенном микробиоме доминировали: Actinomycetales (7,3 – 13,9 %, фила Actinobacteria), Burkholderiales (2,4 – 9,2 %, фила Proteobacteria), Rhizobiales (2,6 – 7,3 %, фила Proteobacteria), Xanthomonadales (1,3 – 7,3 %, фила Proteobacteria), Gaiellales (2,4 – 4,5 %, фила Actinobacteria), Planctomycetales (1,8 – 4,3 %, фила Planctomycetes), Sphingobacteriales (1,7 – 4,3 %, фила Bacteroidetes), Solirubrobacterales (0,7 – 3,5 %, фила Actinobacteria), Sphingomonadales (0,5 – 3,0 %, фила Proteobacteria) (рис. 2).

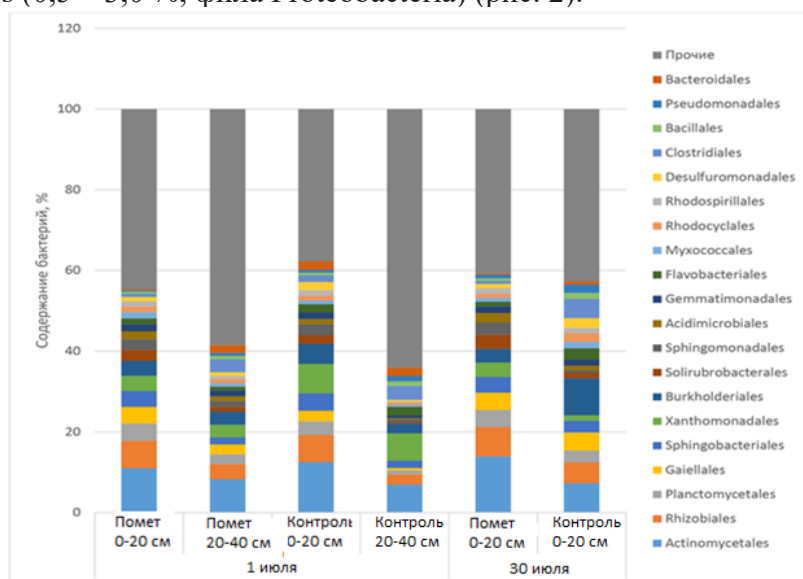


Рис. 2. Влияние помета на разнообразие бактериального сообщества на уровне порядков
Fig. 2. Effect of droppings on the diversity of the bacterial community at the order level

Улучшение плодородия почвы по-разному отражалось на реакции представителей отдельных порядков. Например, возросшая активность доминирующих видов как следствие внесения помета подавляла развитие бактерий порядка Burkholderiales (многие виды которых вызывают вспышки патогенных инфекций), поэтому в контрольном образце пахотного слоя почвы их содержалось значительно больше (5,0 – 9,2 %), чем на удобренном фоне (3,4 – 3,7 %). Положительной отзывчивостью на внесение органики выделялись бактерии порядка Actinomycetales, доленое участие которых возросло с 7,2 – 11,0 до 12,5 – 13,9 %.

Несколько иная реакция наблюдалась у представителей порядка Rhizobiales: в образцах почвы 1-го срока отбора в слое 0 – 20 см доля ризобий по вариантам не отличалась (около

6,7 %), через 30 дней наблюдалось их снижение в контроле (до 5,1 %) и долевое постоянство (даже некоторое повышение) – в удобренной почве (7,3 %) (рис. 3). В данном случае также основным фактором активности ризобий по вариантам является обеспеченность почвы минеральным азотом, запасы которого в удобренном образце почти в 3 – 7 раз (в зависимости от сроков отбора) превышали контроль. Дополнительным «стрессором» для развития ризобий в контрольном варианте послужил недостаток влаги в почве при повышении среднесуточной температуры воздуха с 1 по 30 июля (с 16,0 до 19,6 °С), под влиянием которой возрастающая потребность бактерий в минеральном питании не покрывалась их запасами в почве для сохранения их таксономической доли в микробиоме.

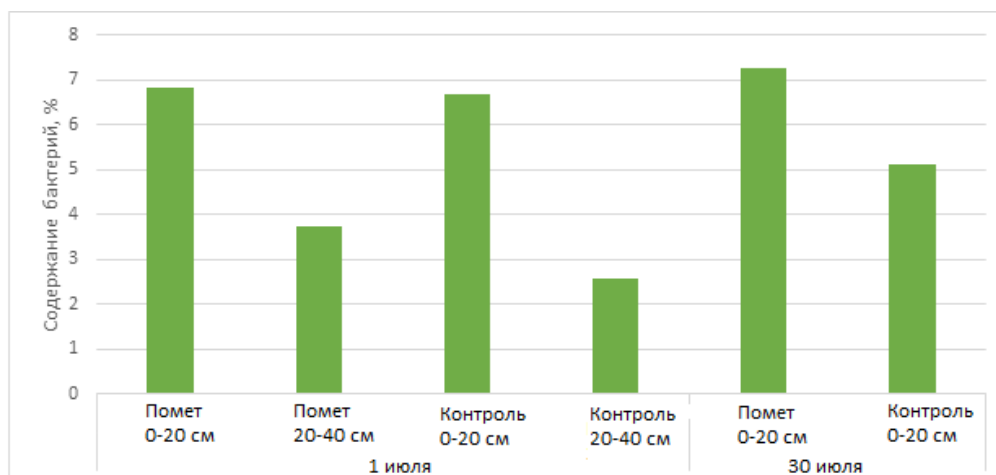


Рис. 3. Влияние помета на содержание в почве бактерий Rhizobiales
Fig. 3. Effect of dropping on the content of Rhizobiales bacteria in the soil

Снижение ризобий с глубиной (от 0 – 20 до 20 – 40 см) подтверждается и реальным (численным) выражением их обилия: в контроле – с $4,7 \cdot 10^6$ до $1,6 \cdot 10^4$ копий/г и на удобренном фоне – с $8,9 \cdot 10^6$ до $5,6 \cdot 10^4$ копий/г, или на 2 порядка (рис. 4). В пахотном слое почвы в 1-й срок отбора образцов обилие ризобий в контрольном и удобренном вариантах отличалось мало ($4,7 \cdot 10^6$ и $8,9 \cdot 10^6$ копий/г), но через 30 суток их количество в контрольном варианте снизилось на 1 порядок (до $8,2 \cdot 10^5$ копий/г), а в удобренном – сохранилось (около $9,6 \cdot 10^6$ копий/г). Почвенное плодородие – основной фактор изменения численности ризобий при прочих равных условиях среды.

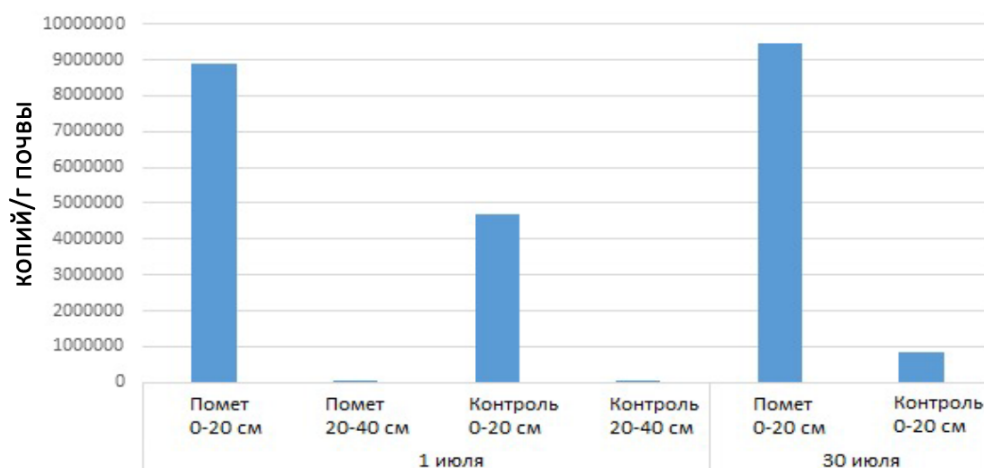


Рис. 4. Влияние помета на обилие в почве бактерий Rhizobiales
Fig. 4. Effect of dropping on the abundance of Rhizobiales flora in the soil

Рассмотрим группу бактерий, различающихся таксономически, но в большинстве объединенных физиологически источником и процессом питания – разложением целлюлозы (клетчатки) растительных остатков и поэтому условно называемых целлюлозолитическими. Из секвенированных многие целлюлозолитические таксоны относятся к порядкам Flavobacteriales (фила Bacteroidetes), Clostridiales (фила Firmicutes), Cytophagales (фила Bacteroidetes), Bacteroidales (фила Bacteroidetes) Actinomycetales, Gaiellales, Solirubrobacterales (фила Actinobacteria) и др.

В начале исследований (1 июля) доля целлюлозолитических бактерий в верхнем горизонте (0 – 20 см) составляла 24,3 % по последствию помета и 25,7 % – в контроле (рис. 5). В нижнем слое (20 – 40 см) их долевое участие в микробиоме снижалось до 20,5 % на удобренном фоне и до 16,5 % – без удобрений, в том числе и потому, что содержание органического субстрата (целлюлозы) после внесения помета больше в верхнем слое почвы. Через 30 дней (30 июля) в слое почвы 0 – 20 см в удобренном образце доля целлюлозолитических бактерий возросла до 28 %, а в контрольном – упала до 24 %.

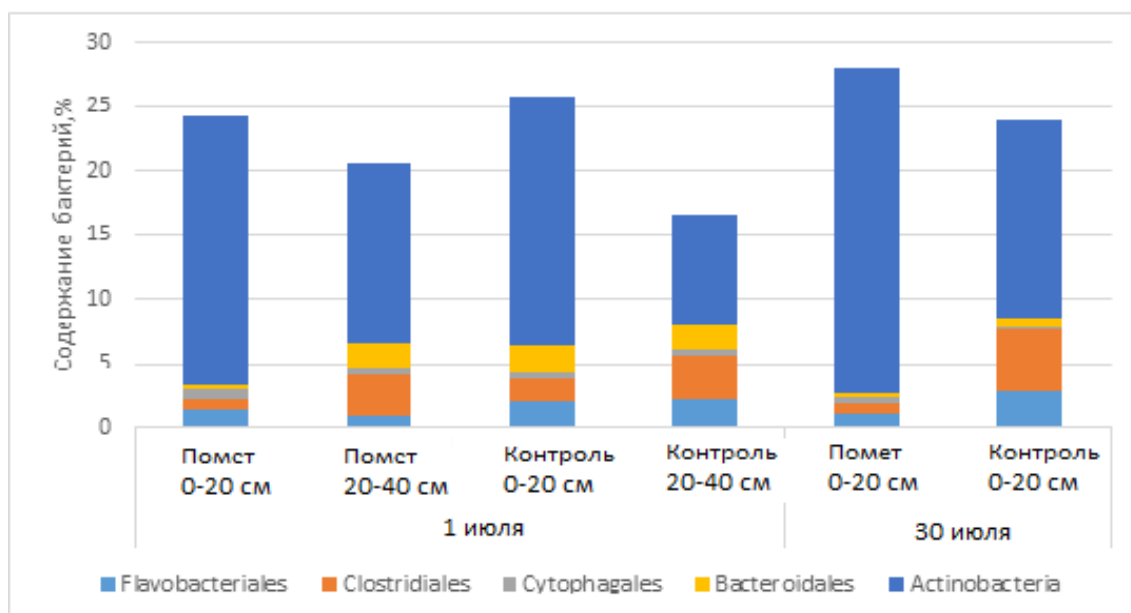


Рис. 5. Влияние помета на содержание в почве целлюлозолитических бактерий
Fig. 5. Influence of dropping on the content of cellulolytic bacteria in the soil

Среди условно целлюлозолитических наибольшим таксономическим значением выделялись представители фило Actinobacteria (долевое участие 8,3 – 25,3 %), далее порядки бактерий по убыванию располагались следующим образом: Clostridiales (0,7 – 4,7 %), Flavobacteriales (0,9 – 2,9 %), Bacteroidales (0,3 – 2,2 %) и Cytophagales (0,3 – 0,6 %). Последствие внесения помета способствовало повышению активности этих бактерий в пахотном горизонте, особенно представителей фило Actinobacteria: в 1-й срок отбора образцов почвы с 19,4 до 21,0 %, во 2-й – с 15,5 до 25,3 %. Невысокая доля бактерий прочих порядков, как правило, снижалась: на удобренном фоне в 1-й (с 0,4 – 2,2 до 0,3 – 1,6 %) и 2-й (с 0,3 – 4,7 до 0,2 – 0,7 %) сроки наблюдений. Несмотря на общую тенденцию к снижению содержания идентифицированных аэробных представителей целлюлозолитиков в микробиоме подпахотного слоя присутствие анаэробных (порядки Clostridiales и Bacteroidales) – повышалось (с 0,3 – 2,2 до 2,0 – 3,4 %), указывая на смещение аэробно-анаэробного равновесия в анаэробную сторону с глубиной почвы.

В реальном исчислении обилие целлюлозолитиков в 1-й срок учета в контрольном и удобренном образцах в слое 0 – 20 см отличалось незначительно – $1,8 \cdot 10^7$ и $3,4 \cdot 10^7$

копий/г (рис. 6). К концу опыта их обилие в контроле снизилось на 1 порядок (до $4,1 \cdot 10^6$ копий/г), а на фоне органики – не изменилось ($3,8 \cdot 10^7$ копий/г почвы), что также объясняется добавлением в почву доступных соединений азота и углерода из состава органических веществ помета, стимулировавших разложение бактериями целлюлозы.

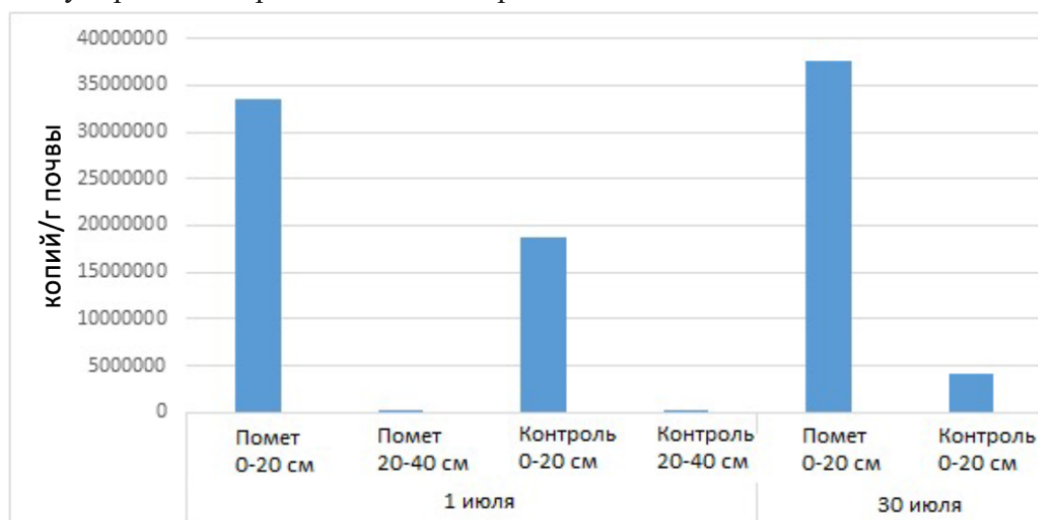


Рис. 6. Влияние помета на обилие в почве целлюлозолитических бактерий
Fig. 6. Effect of dropping on the abundance of cellulolytic bacteria in the soil

Учитывая, что в опытах изучалось последствие внесения в почву высокой дозы свежего биологизированного помета (при клеточном содержании птицы) без предварительной специальной обработки (обеззараживания в хранилищах, компостирования или высушивания), в целях проверки экологической безопасности окружающей среды проводились исследования на присутствие в почве условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

Условно-патогенные энтеробактерии (семейство Enterobacteriaceae и др.) распространены повсеместно: в почве, воде, входят в состав микробиоты животных и человека. Во всех исследованных образцах почвы выявлены представители энтеробактерий с незначительной в бактериальном сообществе долей, которая слабо изменялась по вариантам (рис. 7). Относительно большее содержание энтеробактерий обнаружено в контрольных образцах почвы в конце июля (0,6 %). В остальных образцах доля энтеробактерий не превышала 0,15 %.

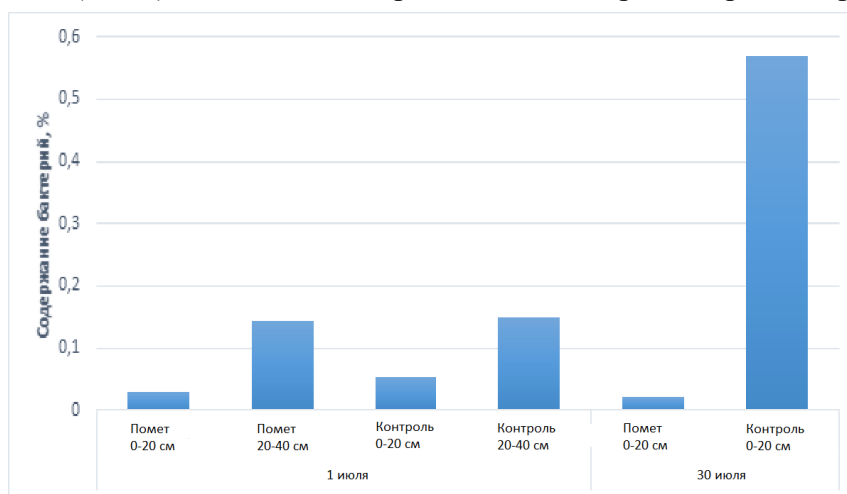


Рис. 7. Влияние помета на содержание в почве энтеробактерий
Fig. 7. Effect of dropping on the content of enterobacteria in the soil

В начале опыта обилие энтеробактерий в слое почвы 0 – 20 см в удобренном и контрольном образцах не отличалось и составляло около $3,9 \cdot 10^4$ копий/г почвы (рис. 8). Нижний слой почвы (20 – 40 см) характеризовался значительно меньшим (на 2 порядка) обилием условно-патогенных бактерий ($9,1 \cdot 10^2$ – $2,1 \cdot 10^3$ копий/г). К концу опыта доля энтеробактерий в верхнем горизонте почвы несколько снизилась на фоне последствия помета (до $2,6 \cdot 10^4$ копий/г почвы), но повысилась в контроле (до $9,1 \cdot 10^4$ копий/г почвы).

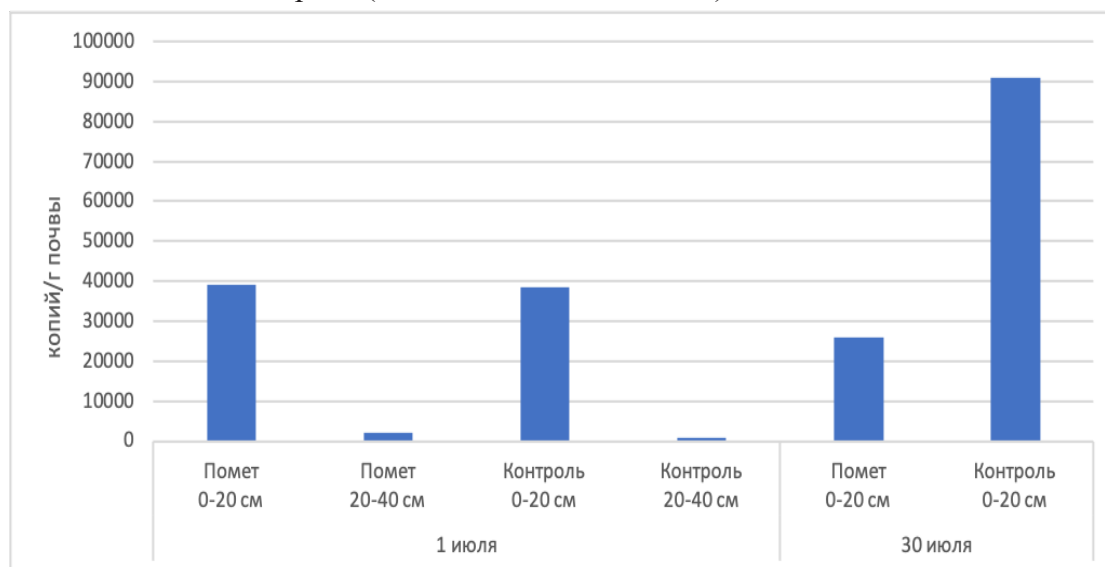


Рис. 8. Влияние помета на обилие в почве энтеробактерий
Fig. 8. Influence of dropping on the abundance of enterobacteria in the soil

В почве выявлены патогенные таксоны животных и растений, принадлежащие семействам Peptococcaceae, Pasteurellaceae, Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Peptococcaceae (фила Firmicutes), Mycoplasmataceae (фила Tenericutes) и Campylobacteraceae (фила Proteobacteria), а также относящиеся к видам *Xanthomonas* sp. (семейство Xanthomonadaceae), *Pseudomonas* sp. (семейство Pseudomonadaceae) и *Burkholderia* sp. (семейство Burkholderiaceae).

Обнаруженные в почве патогены составляли незначительную долю в микробиомах – 0,7 – 2,5 % (рис. 9). В начале опыта в верхнем горизонте почвы отмечена наименьшая доля патогенных бактерий, которая по вариантам практически не отличалась (0,7 – 0,8 %). На глубине 20 – 40 см их содержание несколько повышалось (до 1,3 % в удобренном варианте и до 1,0 % – в контроле), в основном вследствие активности анаэробных патогенов (Peptococcaceae и Streptococcaceae). Во 2-й срок отбора образцов (в сравнении с 1-м) в слое почвы 0 – 20 см содержание патогенов в удобренной почве изменилось незначительно (повысилось с 0,7 до 1,1 %), а в контроле – резко возросло (с 0,8 до 2,5 %) с преобладанием представителей семейств Peptococcaceae и Burkholderiaceae, но особенно Pseudomonadaceae. Предположительно, стимулирование микробного ценоза органическим веществом помета подавляет развитие патогенов при возрастании активности других эколого-физиологических групп микроорганизмов.

По результатам количественной ПЦР в 1-й срок отбора образцов из верхнего слоя почвы существенных различий в обилии патогенных бактерий по вариантам не выявлено: $6,7 \cdot 10^5$ копий/г почвы в контроле и $8,9 \cdot 10^5$ – на фоне последствия помета (рис. 10). В конце опыта обилие патогенов в удобренной почве возросло (до $1,4 \cdot 10^6$ копий/г почвы, в их числе бактерий *Pseudomonas* sp. – с $2,1 \cdot 10^5$ до $9,3 \cdot 10^5$), но несколько снизилось в контроле (до $3,9 \cdot 10^5$ копий/г). Высокой активностью в пахотном слое выделялись и представители *Burkholderia* sp. и Peptococcaceae.

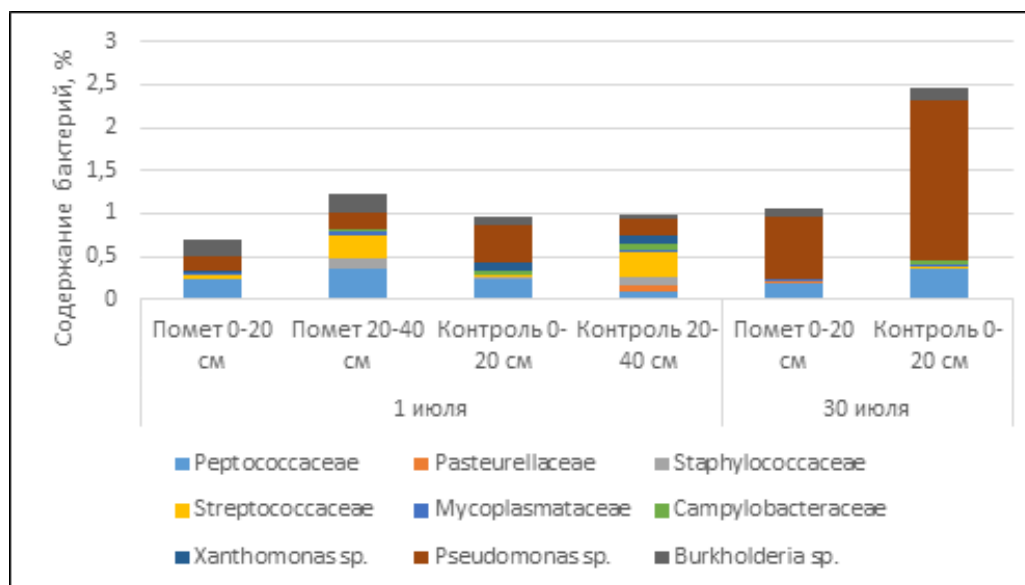


Рис. 9. Влияние помета на содержание в почве патогенных бактерий
Fig. 9. Effect of dropping on the content of pathogenic bacteria in the soil

Относительно низкое обилие патогенных бактерий характерно для образцов, отобранных в подпахотном слое: в удобренном и контрольном вариантах соответственно $1,8 \cdot 10^4$ и $6,2 \cdot 10^3$ копий/г почвы с преобладанием бактерий *Pseudomonas* sp. и *Xanthomonas* sp. – фитопатогенов, возбудителей бактериальных заболеваний сельскохозяйственных растений, которые обнаружены во всех почвенных образцах.

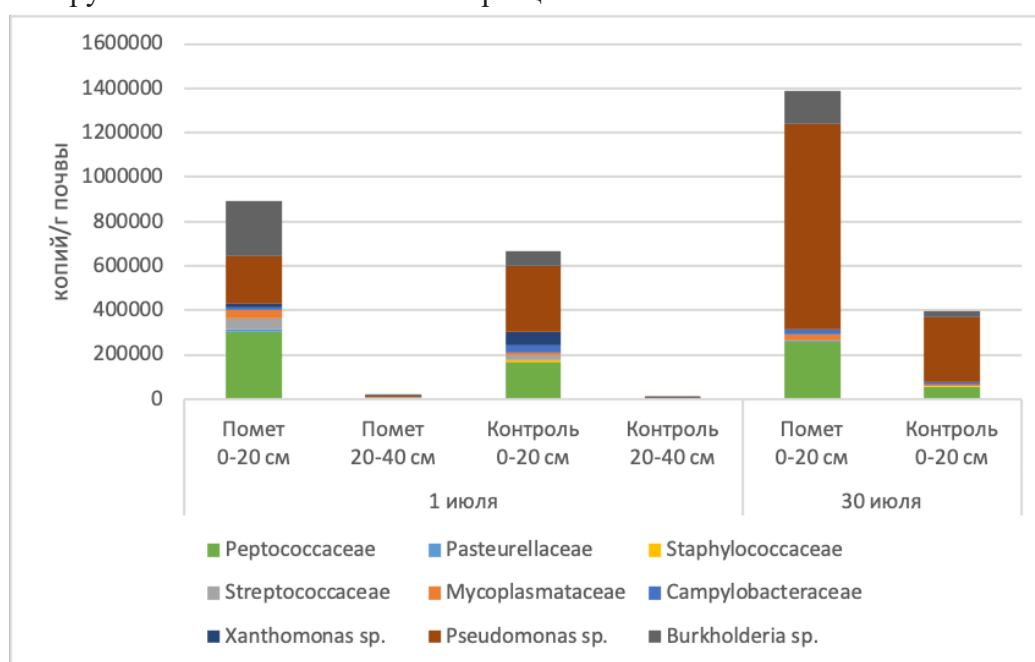


Рис. 10. Влияние помета на обилие в почве патогенных бактерий
Fig. 10. Effect of dropping on the abundance of pathogenic bacteria in the soil

Таким образом, в процессе анализа взаимосвязи обилия патогенных бактерий в почве с применением куриного помета отмечено снижение относительной (долевой) и повышение численного обилия микроорганизмов под влиянием обогащения почвы органикой. В контрольных образцах почвы наблюдалось обратная зависимость: увеличение относительного (долевого) участия патогенов (анаэробов) при снижении их численного обилия в условиях бедного агрофона – недостатка органических веществ.

В заключение отметим, что филогенетический состав микробиома изучаемой дерново-подзолистой почвы отличался постоянством независимо от плодородия почвы, но под влиянием последствий органики (улучшения пищевого режима и снижения кислотности почвы) на активность таксонов изменялась структура микробиома со сменой доминант и соответствующей им функциональности.

На данном этапе исследований существенного негативного влияния биологизированного свежего помета кур на экологическое состояние почвы не выявлено, а некоторое повышение обилия патогенов при снижении их долевого участия в почвенном микробиоме сопряжено с общей активностью бактерий.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Пухова Н.Ю., Верховцева Н.В., Ларина Г.Е. Структура микробного сообщества чернозема выщелоченного в зависимости от антропогенной нагрузки // Проблемы агрохимии и экологии. – 2011. – № 4. – С. 42–49.
2. Новиков В.М. Влияние агротехнологических приемов и погодных условий на биологическую активность темно-серой почвы при возделывании зернобобовых и крупяных культур // Зернобобовые и крупяные культуры. – 2016. – № 4. – С. 116–120.
3. Карпина Т.А., Лисицина Н.А., Муравин Э.А. Микробное сообщество дерново-подзолистой почвы после длительного применения удобрений // Плодородие. – 2012. – № 5. – С. 29–31.
4. Long-term land use effects on soil microbial community structure and function / A. Bissett, A.E. Richardson, G. Baker, P.H. Thrall // Appl. Soil Ecol. – 2011. – Vol. 51. – P. 66–78. – DOI: 10.1016/i.apsoil.2011.08.010.
5. Особенности возделывания зерновых культур по интенсивной технологии с применением свежего куриного помета на дерново-подзолистой почве Ярославской области / Н.Н. Щукин, В.В. Окорков, Л.А. Окоркова, А.Д. Железова // Биологический круговорот питательных веществ при использовании удобрений и биоресурсов в системах земледелия различной интенсивности. – Суздаль-Иваново: ПресСто, 2021. – С. 166–178.
6. Таксономическая структура микробных сообществ в почвах различных типов по данным высокопроизводительного секвенирования библиотек гена 16S-rРНК / Е.Л. Чирак, Е.В. Першина, А.С. Дольник [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2013. – № 3. – С. 100–109.
7. Основные тенденции в формировании почвенного микробного сообщества в условиях стационарного полевого опыта по данным высокопроизводительного секвенирования библиотек гена 16S-rРНК / В.А. Думова, Е.В. Першина, Я.В. Мерзлякова [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2013. – № 5. – С. 85–92.
8. Генное досье микробиома / Е.В. Першина, Е.Е. Андронов, Г.Г. Самосоров, А.Н. Семенов // Наука из первых рук. – Новосибирск: ИНФОЛИО, 2013. – Т. 49, № 1. – С. 68–75.
9. Соколенко А.В. Некультивируемые формы бактерий: распространение в природе, индукторы некультивируемого состояния и реверсии // Современные наукоемкие технологии. – 2006. – № 2. – С. 11–15.
10. Таксономическая структура прокариотных сообществ почв разных биоклиматических зон / И.А. Тихонович, Т.И. Чернов, А.Д. Железова [и др.] // Бюллетень Почвенного института им. В.В. Докучаева. – 2018. – Вып. 95. – С. 125–153.
11. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale / C.L. Lauber, M. Hamady, R. Knight, N. Fierer // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 75 (15). – P. 5111–5120. – DOI: 10.1128/AEM.00335-09.
12. Абрамова А.В., Топаж А.Г., Хворова Л.А. Агентный подход в моделировании симбиотической азотфиксации: от пассивных объектов к активным субъектам взаимодействия // Агрофизика. – 2015. – № 4. – С. 49–62.

13. Влияние способа сельскохозяйственной обработки на микробиологические характеристики дерново-подзолистой почвы / А.Д. Железова, Д.И. Пассова, Д.А. Никитин [и др.] // Бюллетень Почвенного института имени В.В. Докучаева. – 2019. – Вып. 99. – С. 117–144.

14. Горобей И.М., Осипова Г.М. Проблемы бактериозов растений и подходы к ее решению // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2017. – Т. 47, № 4. – С. 94–102.

15. Новые возбудители бактериозов и прогноз их распространения в России / А.Н. Игнатов, Н.В. Пунина, Е.В. Матвеева [и др.] // Защита и карантин растений. – 2009. – № 4. – С. 38–41.

REFERENCES

1. Puhova N.Yu., Verhovceva N.V., Larina G.E., *Problemy agrohimii i ekologii*, 2011, No. 4, pp. 42–49. (In Russ.)

2. Novikov V.M. *Zernobobovye i krupyanye kul'tury*, 2016, No. 4, pp. 116–120. (In Russ.)

3. Karepina T.A., Lisicina N.A., Muravin E.A., *Plodorodie*, 2012, No. 5, pp. 29–31. (In Russ.)

4. Bissett A., Richardson A.E., Baker G., Thrall P.H., Long-term land use effects on soil microbial community structure and function, *Appl. Soil Ecol.*, 2011, Vol. 51, P. 66–78, DOI: 10.1016/i.apsoil.2011.08.010.

5. Shchukin N.N., Okorkov V.V., Okorkova L.A., Zhelezova A.D., *Biologicheskij krugovorot pitatel'nyh veshchestv pri ispol'zovanii udobrenij i bioresursov v sistemah zemledeliya razlichnoj intensivnosti*, Suzdal'-Ivanovo: PresSto, 2021, pp. 166–178. (In Russ.)

6. Chirak E.L., Pershina E.V., Dol'nik A.S., Kutovaya O.V., Vasilenko E.S., Kogut B.M., Merzlyakova Ya.V., Andronov E.E., *Sel'skohozyajstvennaya biologiya*, 2013, No. 3, pp. 100–109. (In Russ.)

7. Dumova V.A., Pershina E.V., Merzlyakova Ya.V., Kruglov Yu.V., Andronov E.E., *Sel'skohozyajstvennaya biologiya*, 2013, No. 5, pp. 85–92. (In Russ.)

8. Pershina E.V., Andronov E.E., Samosorov G.G., Semenov A.N., *Nauka iz pervyh ruk*, Novosibirsk: INFOLIO, 2013, vol. 49, No. 1, pp. 68–75. (In Russ.)

9. Sokolenko A.V. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii*, 2006, No. 2, pp. 11–15. (In Russ.)

10. Tihonovich I.A., Chernov T.I., Zhelezova A.D., Thakahova A.K., Andronov E.E., Kutovaya O.V., *Byulleten' Pochvennogo instituta im. V.V. Dokuchaeva*, 2018, Issue 95, pp. 125–153. (In Russ.)

11. Lauber C.L., Hamady M., Knight R., Fierer N., Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, Vol. 75 (15), P. 5111–5120, DOI: 10.1128/AEM.00335-09.

12. Abramova A.V., Topazh A.G., Hvorova L.A., *Agrofizika*, 2015, No. 4, pp. 49–62. (In Russ.)

13. Zhelezova A.D., Passova D.I., Nikitin D.A., Yashin M.A., Zhelezova S.V., *Byulleten' Pochvennogo instituta imeni V.V. Dokuchaeva*, 2019, Issue 99, pp. 117–144. (In Russ.)

14. Gorobej I.M., Osipova G.M., *Sibirskij vestnik sel'skohozyajstvennoj nauki*, 2017, Vol. 47, No. 4, pp. 94–102. (In Russ.)

15. Ignatov A.N., Punina N.V., Matveeva E.V., Kornev K.P., Pekhtereva E.Sh., Polityko V.A., *Zashchita i karantin rastenij*, 2009, No. 4, pp. 38–41. (In Russ.)