

УДК 631.461

СООТНОШЕНИЕ ГРИБОВ И БАКТЕРИЙ В ТЕМНОГУМУСОВОЙ ЛЕСНОЙ ПОЧВЕ

© 2020 г. Л. М. Полянская^а, *, Д. Д. Юмаков^а, З. Н. Тюгай^а, А. Л. Степанов^а

^аМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

*e-mail: lpolyanskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 14.01.2020 г.

После доработки 17.01.2020 г.

Принята к публикации 26.02.2020 г.

Методами люминесцентной микроскопии и каскадной фильтрации проведена сравнительная оценка запасов грибной и бактериальной биомассы в темногумусовой лесной почве (Gleyic Umbrisol). Методом каскадной фильтрации показано, что в верхних горизонтах исследованной почвы биомасса бактерий сопоставима с биомассой грибов (на ее долю приходится 46%, а на долю грибов – 54%). Однако вниз по профилю это соотношение меняется в пользу бактерий (до 69% на глубине 100 см). Таким образом, использование метода каскадной фильтрации позволило переоценить запасы бактериальной биомассы в почве и впервые показать, что в верхних горизонтах данной почвы биомасса бактерий сопоставима с грибной, а в нижних горизонтах бактериальная биомасса превышает грибную. Метод каскадной фильтрации более точно определяет как численность, так и биомассу бактерий, что позволяет пересмотреть сложившиеся в почвенной микробиологии представления о значительном преобладании грибной биомассы в почвах.

Ключевые слова: биомасса грибов, биомасса бактерий, метод каскадной фильтрации, люминесцентная микроскопия, микробная экология

DOI: 10.31857/S0032180X20090129

ВВЕДЕНИЕ

Оценка численности и биомассы микроорганизмов в почве является одной из главных задач почвенной микробиологии поскольку этот показатель позволяет оценить состояние почвенного покрова, дает представление о скорости трансформации органического вещества и интенсивности биологического круговорота в почвах [4]. В последнее время определение численности и биомассы почвенных микроорганизмов осуществляется с помощью люминесцентной микроскопии. Этот метод имеет ряд недостатков. Так, учет грибов проводится в почвенной суспензии очень малого объема (0.04 мл под покровным стеклом), и при перерасчетах численности клеток на 1 мл возникает необходимость умножить подсчитанное число микробных зачатков на 25, что приводит к адекватному росту ошибки определения.

Известный способ прямого учета грибов на фильтрах [3] дает заниженные результаты определения в зависимости от типа почв из-за необходимости использования значительной аликвоты (не менее 10 мл), пропускаемой через фильтр и, как следствие, большого количества почвенных частиц, осаждаемых на фильтре, что экранирует гифы и споры грибов и приводит к их массовому

недоучету. Тем не менее, этот метод широко применяется в практике микробиологических исследований. Он прост в исполнении, зафиксированные препараты могут долго храниться, допускается осуществление учета в удобное для исследователя время, позволяет проводить анализ большого количества образцов [9].

Новый метод каскадной фильтрации [14] показал, что сравнительная численность бактерий, определяемая по методам люминесцентной микроскопии и фильтрации, примерно одинакова, а расчеты запасов микробной биомассы – существенно различаются [18]. Эта разница обусловлена тем, что при расчете микробной биомассы используется единый усредненный объем обнаруженных микробных клеток до 0.1 мкм³ [7]. Метод каскадной фильтрации лишен этого недостатка и позволяет дифференцированно учитывать бактериальные клетки разной величины.

Методом люминесцентной микроскопии было показано, что на долю бактерий в разных почвах приходится всего 1–10% от общей микробной биомассы, представленной преимущественно грибами (на 90–99%) [10]. Принимая во внимание небольшую биомассу бактерий, возникают вопросы по поводу масштабов процессов, имеющих исключи-

тельно бактериальную природу, например, азот-фиксации в почвах [21].

Цель работы – оценить соотношение грибной и бактериальной биомассы новым методом каскадной фильтрации на примере темногомусовой лесной почвы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила темногомусовая глееватая тяжелосуглинистая почва, лежащая на элювии глинистых отложений триасового возраста [6, 20]. Почва была отобрана на территории Костромской области в Пышугском районе.

Методика определения численности и биомассы микроорганизмов методом люминесцентной микроскопии. В качестве основного приема обработки образцов (просеянных через 0.25 мм) для микробиологического анализа использовали ультразвуковое диспергирование на низкочастотном диспергаторе типа УЗДН-1 (22 кГц, 0.44 Å, 2 мин) [8].

Для оценки запасов микробной биомассы методом люминесцентной микроскопии [7] готовили суспензии образцов почвы (1 : 100) и наносили микропипеткой на тщательно обезжиренные предметные стекла по 0.02 мл для определения численности бактерий и 0.04 мл – для учета мицелия грибов, равномерно распределяли стерильной микробиологической петлей на площади 4 см² и фиксировали на пламени горелки по 6 препаратов на каждом стекле – для учета клеток бактерий и для учета длины мицелия грибов. В каждом препарате просматривали по 60 полей зрения.

Для подсчета бактерий препараты окрашивали раствором акридина оранжевого в течение 2–3 мин (1 : 10000), а для учета мицелия грибов – в течение 15 мин калькофлуором белым [11].

Расчет количества клеток на 1 г почвы проводили по формуле:

$$N = S_1an/vS_2c,$$

где: N – число клеток (кл/г почвы) или длина мицелия грибов (мкм/г почвы); S_1 – площадь препарата (мкм²); a – количество клеток или длина мицелия (мкм) в одном поле зрения (усреднение производится по всем препаратам); n – показатель разведения почвенной суспензии (мл); v – объем капли, наносимой на стекло (мл); S_2 – площадь поля зрения микроскопа (мкм²); c – навеска почвы (г).

Расчеты запасов биомассы производили, исходя из имеющихся данных о том, что биомасса сухого вещества для одной бактериальной клетки объемом 0.1 мкм³ составляет 2×10^{-14} г [7], а с учетом замеренного диаметра мицелия грибов их биомассу вычисляли по формуле $0.628r^2 \times 10^{-6}$ г [12].

Методика определения численности и биомассы микроорганизмов методом каскадной фильтрации. После ультразвуковой обработки почвенную суспензию пропускали через фильтры с диаметром пор 1.85, 1.43, 0.43, 0.38, 0.23 и 0.2 мкм в колбе Бунзена, соединенной с водоструйным насосом. Собственную люминесценцию фильтров гасили окрашиванием насыщенным спиртовым раствором судана черного.

На поверхность сеточки металлического фильтра колбы Бунзена помещали четыре слоя фильтровальной бумаги, перекрывая их сверху бактериальным (ядерным) фильтром и, после фиксации с помощью металлического кольца, вносили почвенную суспензию. Фильтрацию проводили последовательно от фильтра с большим размером пор к меньшему.

Через установку пропускали 1 мл почвенной суспензии, окрашенной раствором акридина оранжевого (1 : 10000) в течение 3 мин. Учет клеток бактерий проводили с использованием микроскопа ЛЮМАМ И-3 (объектив 100×, масляная иммерсия) в 30-ти полях зрения, условно считая размеры клеток, равными диаметру пор фильтра, на котором они осаждались. В расчетах принимали, что клетки имеют шаровидную форму [13].

Определение числа клеток в 1 г почвы проводили по формуле:

$$N_b = \frac{S_1an}{VS_2c},$$

где: N_b – число клеток на 1 г почвы; S_1 – площадь фильтра, мкм²; a – количество клеток в одном поле зрения (усреднение производится по всем полям); n – показатель разведения почвенной суспензии, мл; V – объем профильтрованной суспензии, мл; S_2 – площадь поля зрения микроскопа, мкм²; c – навеска почвы, г. С учетом площади фильтра и площади поля зрения микроскопа уравнение для расчета численности приобретало вид: $N_b = 1.13 \times 10^7 a$.

Исходя из размеров пор каждого фильтра, находили биомассу одной клетки бактерии на каждом фильтре, а с учетом их численности – биомассу всех клеток по формуле:

$$B_b = \frac{\frac{4}{3}\pi r^3 2 \times 10^{-14}}{0.1N_b},$$

где r – радиус пор каждого фильтра, мкм; N_b – численность каждой фракции, кл/г почвы; B_b – биомасса каждой фракции, г.

Средний объем одной клетки рассчитывали как

$$V = \frac{B_{\text{общ}}}{N_{\text{общ}}a},$$

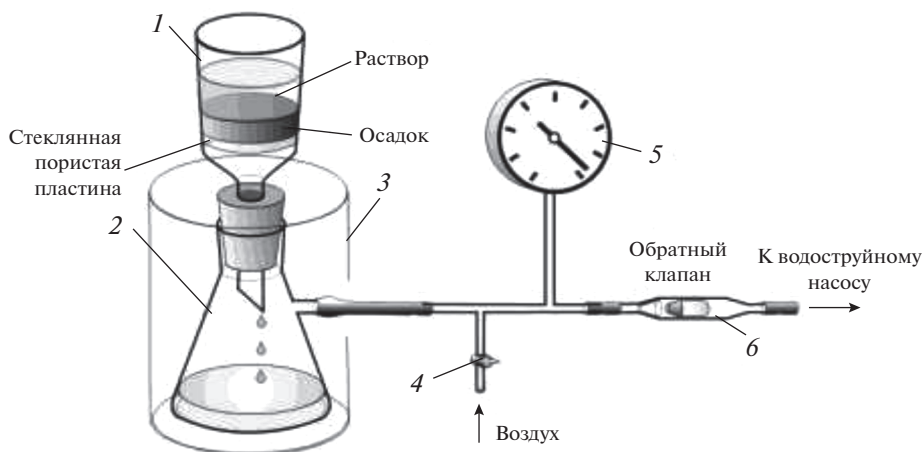


Рис. 1. Фильтрация под уменьшенным давлением. Условные обозначения: 1 – воронка, 2 – колба Бунзена, 3 – защитный кожух, 4 – кран, 5 – манометр, 6 – обратный клапан.

где $V_{\text{общ}}$ и $N_{\text{общ}}$ – биомасса (г) и численность (кл/г почвы) всех фракций, a – плотность одной клетки, $a = 1 \times 10^{-12}$ г/см³, V – средний объем одной клетки, мкм³ [17].

Результаты определения численности (N) и сухой биомассы (мкг), полученные методом каскадной фильтрации, рассчитывали на 1 г воздушно-сухой почвы. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ Statistica 10.0 и Microsoft Excel 2010. Среднее квадратичное отклонение (δ_{n-1}) для значений численности бактерий в образце не превышало 5–10%.

В ходе выполнения работы возникла необходимость разработки дополнительной методики, позволяющей учитывать не только бактерии, но и длину мицелия грибов методом “каскадной” фильтрации. Оказалось, что при стандартном способе фильтрации грибной мицелий сильно разрушается. Поэтому помимо имеющихся элементов, в установку для фильтрации был включен манометр, который позволял сохранять постоянную скорость фильтрации и необходимое разрежение в пределах 110–120 мм рт. ст. [19] (рис. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из полученных данных (рис. 2), численность бактерий по методу каскадной фильтрации составляла 0.5×10^9 клеток/г почвы в слое 0–20 см и постепенно уменьшалась вниз по профилю в 2 раза. Численность бактерий, определенная методом люминесцентной микроскопии, оказалась в 4 раза больше (2×10^9 кл/г почвы в горизонте 0–20 см) и это превышение сохранялось во всех точках отбора образцов до глубины 100 см.

При сравнении двух методов по оценке запасов прокариотной биомассы, оказалось (рис. 3), что данные по методу каскадной фильтрации (650 мкг/г

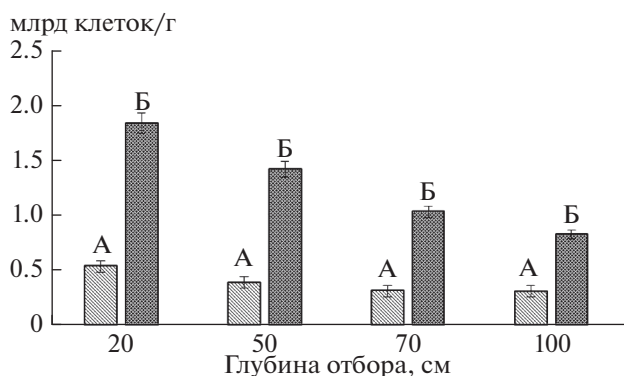


Рис. 2. Численность клеток бактерий по методу каскадной фильтрации (А) и по методу люминесцентной микроскопии (Б).

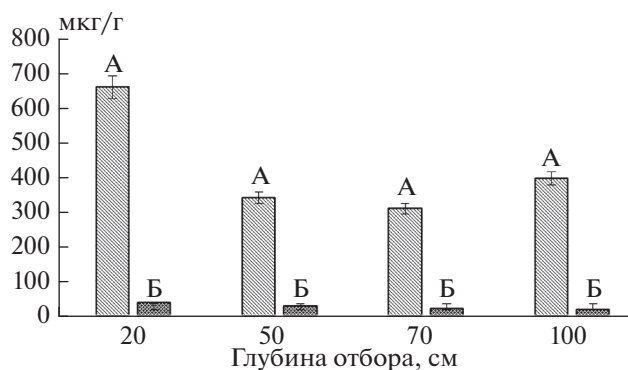


Рис. 3. Биомасса клеток бактерий по методу каскадной фильтрации (А) и по люминесцентному методу (Б).

во слое 0–20 см) значительно превышали аналогичные результаты определения методом люминесцентной микроскопии, как в верхнем горизонте – (36 мкг/г на глубине 0–20 см), так и по всему профилю почвы. Распределение размерных

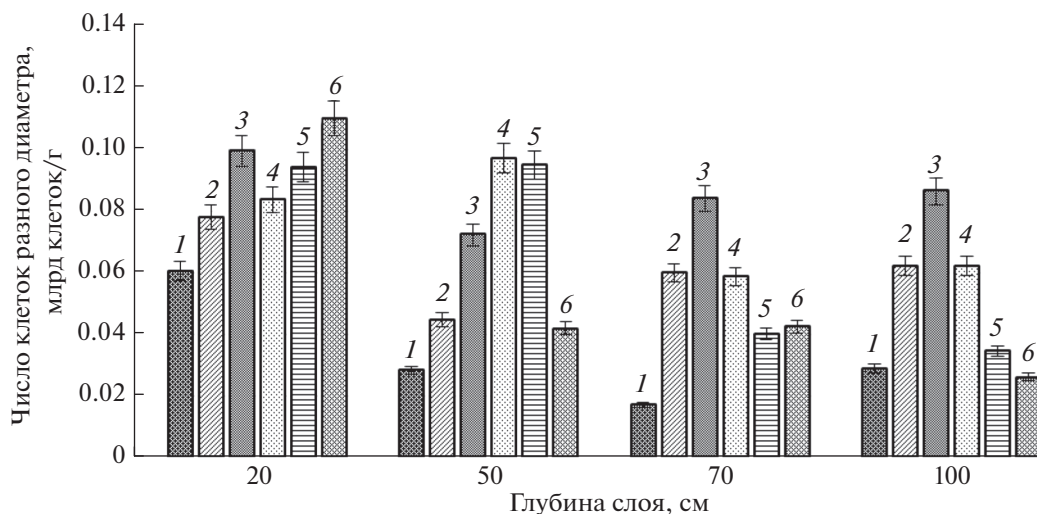


Рис. 4. Численность бактерий различного диаметра (1 – 1.85; 2 – 1.43; 3 – 0.43; 4 – 0.38; 5 – 0.23; 6 – 0.2 мкм) с разных глубин профиля темногогумусовой почвы (20, 50, 70 и 100 см).

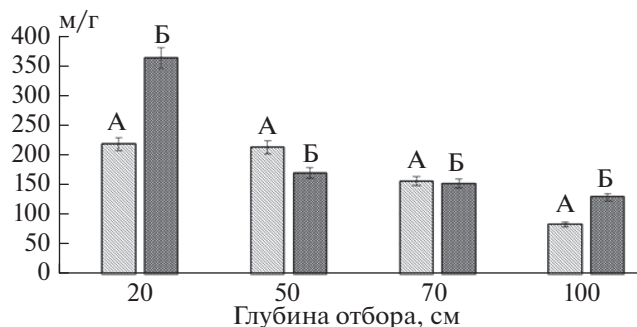


Рис. 5. Длина грибного мицелия по методу каскадной фильтрации (А) и люминесцентной микроскопии (Б).

групп бактерий по почвенному профилю представлено на рис. 4, откуда следует, что в верхних горизонтах почвы обнаруживаются бактерии многих размерных групп (от 0.2 до 1.9 мкм в диаметре). Вниз по профилю наблюдается некоторый рост численности мелких групп бактерий. При этом большая часть бактериальных клеток имеет диаметр более 1.4 мкм.

Длина грибного мицелия в верхнем горизонте почвы составляла по методу каскадной фильтрации 216 м/г почвы и уменьшалась на глубине

Таблица 1. Доля (%) грибов (над чертой) и бактерий (под чертой) в микробной биомассе на разной глубине почвенного профиля

Метод	0–20 см	70–100 см
Люминесцентной микроскопии	99/1	98/2
Каскадной фильтрации	54/46	31/69

100 см до 82 м/г (рис. 5, А). По методу люминесцентной микроскопии длина грибного мицелия на глубине 0–20 см была в полтора раза больше, достигая 360 м/г, а на глубине 100 см уменьшалась до 128 м/г (рис. 5, Б).

Важно отметить, что при сравнении биомассы грибного мицелия по методу каскадной фильтрации и по методу люминесцентной микроскопии, было выявлено, что в верхних горизонтах биомасса грибов была в 6–10 раз больше в первом случае.

В ходе проведенных исследований показано, что определение численности и биомассы микроорганизмов в почвах в значительной степени зависит от выбранного метода исследования. Так, при использовании метода люминесцентной микроскопии грибная биомасса значительно доминирует над бактериальной во всех горизонтах исследуемой почвы: на долю грибной биомассы по этому методу приходилось 99–98% (в зависимости от глубины отбора проб), а биомасса бактерий составляла 1–2% (табл. 1). Этот вывод полностью совпадает с данными многих исследователей [10–12, 17, 21, 22].

Методом каскадной фильтрации установлено, что в верхнем горизонте почвы биомасса бактерий сопоставима с биомассой грибов (на ее долю приходится 46%, а на долю грибов – 54%). Таким образом, использование метода каскадной фильтрации позволило переоценить запасы бактериальной биомассы в почве и впервые показать, что в верхних горизонтах почвы биомасса бактерий сопоставима с грибной. В нижних горизонтах биомасса грибов существенно уменьшается (от 650 до 174 мкг/г), а биомасса бактерий, меняется незначительно (от 560 до 400 мкг/г), что сохраняет тенденцию доминирования бактериальной биомассы над грибной и в нижних горизонтах почвы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод каскадной фильтрации более точно определяет, как численность, так и биомассу разных групп бактерий, в том числе численность и биомассу грибов, что позволяет пересмотреть сложившиеся в почвенной микробиологии представления о тотальном преобладании грибной биомассы в почвах и подтвердить важную роль прокариот в ключевых процессах трансформации природных полимеров в окружающей среде.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают глубокую признательность М.Я. Мельникову (главному научному сотруднику) и В.И. Пергушовой (ведущему научному сотруднику) химического факультета МГУ, а также Т.Н. Початковой (старшему научному сотруднику) факультета почвоведения МГУ за консультации и помощь в работе.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по теме госзадания “Биоразнообразие и ценоотические связи почвенных микроорганизмов в наземных экосистемах”. ЦИТИС: 115122210099-9.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Богатырев Л.Г., Иванов А.В., Матышак Г.В., Степанов А.А.* Особенности формирования органо-профиля темногумусовых лесных почв северо-востока Костромской области // *Лесоведение*. 2006. № 3. С. 8–14.
2. *Виноградский С.Н.* Микробиология почвы. М.: Изд-во АН СССР, 1952. 350 с.
3. *Демкина Т.С., Мирчинк Т.Г.* Определение грибной биомассы в почвах методом мембранных фильтров // *Микология и фитопатология*. 1983. Т. 17. № 6. С. 517–520.
4. *Добровольская Т.Г., Звягинцев Д.Г., Чернов И.Ю., Головченко А.В., Зенова Г.М., Лысак Л.В., Манучарова Н.А., Марфенина О.Е., Полянская Л.М., Степанов А.Л., Умаров М.М.* Роль микроорганизмов в экологических функциях почв. Роль микроорганизмов в экологических функциях почв // *Почвоведение*. 2015. № 9. С. 1087–1096.
5. *Звягинцев Д.Г.* Подготовка почв с помощью ультразвука к количественному учету микроорганизмов // *Вестник Московского ун-та. Серия 16. Биология*. 1968. № 3. С. 127–129.
6. *Классификация и диагностика почв России*. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.
7. *Кожевин П.А., Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г.* Динамика развития различных микроорганизмов в почве // *Микробиология*. 1979. Т. 48. № 4. С. 490–494.
8. *Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Звягинцева Д.Г.* М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 304 с.: ил.
9. *Мирчинк Т.Г.* Почвенная микология. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. 224 с.
10. *Полянская Л.М.* Микробная сукцессия в почве. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 1996. 96 с.
11. *Полянская Л.М.* Прямой микроскопический подсчет спор и мицелия грибов в почве // *Изучение грибов в биогеоценозах*. Свердловск, 1988. С. 30.
12. *Полянская Л.М., Гейдебрехт В.В., Степанов А.Л., Звягинцев Д.Г.* Распределение численности и биомассы микроорганизмов по профилям зональных типов почв // *Почвоведение*. 1995. № 3. С. 322–328.
13. *Полянская Л.М., Горбачева М.А., Звягинцев Д.Г.* Размеры бактерий в черноземе в ходе микробной сукцессии при инкубировании почвы в аэробных и анаэробных условиях // *Почвоведение*. 2012. № 11. С. 1181–1187.
14. *Полянская Л.М., Городничев Р.Б., Звягинцев Д.Г.* Размеры клеток бактерий в почвах, определяемые методом “каскадной” фильтрации // *Известия РАН. Сер. биол.* 2013. № 1. С. 144–151.
15. *Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г.* Содержание микробной биомассы как показатель экологического состояния почв // *Почвоведение*. 2005. № 6. С. 706–714.
16. *Полянская Л.М., Пинчук И.П., Звягинцев Д.Г.* Оценка численности, биомассы и размеров клеток бактерий методом “каскадной” фильтрации в различных почвах // *Почвоведение*. 2015. № 3. С. 330–336.
17. *Полянская Л.М., Приходько В.Е., Ломакин Д.Г., Чернов И.Ю.* Численность и биомасса микроорганизмов в древних погребенных и современных черноземах разного землепользования // *Почвоведение*. 2016. № 10. С. 1191–1204.
18. *Практикум по неорганическому синтезу повышенной сложности*. Кафедра неорганической химии. Химфак МГУ. 2011. URL: <http://vle.chem.msu.ru/oroks22X/upload/normal/003v3t8r3tc4qs/p8.pdf>
19. *Шваров А.П., Тюгай З., Иванов А.В., Лебедев И.Е.* Поверхностные свойства твердой фазы темногумусовых почв Костромской области, сформированных на глинистых отложениях триаса // *Сб. научных трудов Междунар. научной конф., посвященной 90-летию со дня рождения А.Д. Воронина: “Фундаментальные концепции физики почв: развитие, современные приложения и перспективы”*. М., 27–30 мая, 2019. С. 232–237.
20. *Шлегель Г.* Общая микробиология. М.: Мир, 1987. С. 50, 53–54, 415.
21. *Bailey V.L., Smith J.L., Bolton H., Jr.* Fungal to bacterial biomass ratios in soils investigated for enhanced carbon sequestration // *Soil Biol. Biochem.* 2002. V. 34. № 7. P. 997–1007
22. *Hobbie J.E., Daley R.J., Jasper S.* Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy // *Appl. Environ. Microbiol.* 1977. May. V. 33(5). P. 1225–1228.
23. *Lamberger K.T., Chiu C.Y.* Spatial changes of soil fungal and bacterial biomass from a subalpine coniferous forest to grassland in a humid, subtropical region // *Biol. Fertil. Soils*. 2001. V. 33. № 3. P. 105–110.

Fungi and Bacteria Ratio in the Dark Humus Forest Soil

L. M. Polyanskaya^{1,*}, D. D. Yumakov¹, Z. N. Tyugay¹, and A. L. Stepanov¹

¹*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: lpolyanskaya@mail.ru*

Using luminescent microscopy and cascade filtration, a comparative assessment of the reserves of fungal and bacterial biomass in dark humus forest soil has been carried out. Cascade filtration has shown that in the upper horizons of the investigated soil, the bacterial biomass is compatible to the fungal biomass (31–54% for bacteria, and 46–69% for fungi). However, down the profile, this ratio changes in favor of bacteria (up to 69% at the depth of 100 cm). Thus, the use of the cascade filtration method made it possible to overestimate the reserves of bacterial biomass in the soil and to show for the first time that in the upper horizons of a given soil, the biomass of bacteria is compatible to that of fungi, and in the lower horizons, the bacterial biomass exceeds it. The method more provides a more precise assessment of both the population and the biomass of bacteria, which allows revising the opinion of many soil microbiologists on the significant prevalence of fungal biomass in soils.

Keywords: soil profile, biomass, cascade filtration method