ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ ОТДЕЛЬНЫХ ЭКОЛОГО-ТРОФИЧЕСКИХ ГРУПП ПРИ ХРАНЕНИИ ОБРАЗЦОВ СЕРОЙ ЛЕСНОЙ ПОЧВЫ

Малиновская И.М.

Национальный научный центр "Институт земледелия УААН", ул. Машиностроителей 26, пгт. Чабаны, Киевская обл., 08162, Украина

E-mail: zemledel@mail.ru

Изучали динамику численности микроорганизмов отдельных эколого-трофических групп при хранении образцов серой лесной почвы разноцелевого использования. Установлено, что хранение искажениям исходных образиов приводит К численности микроорганизмов. Масштабы и направленность искажений могут зависеть от влажности почвы, ее агрохимических и физико-механических свойств, способа хранения образцов, а также гидрофобно-гидрофильных особенностей поверхности клеток микроорганизмов определяемых групп. Наиболее вероятным механизмом возникновения искажений является изменение интенсивности протекания сорбционных направленности и процессов между клетками микроорганизмов и почвенными под воздействием абиотических стрессоров при частииами отборе почвенных образиов.

Ключевые слова: микроорганизмы, эколого-трофические группы, серая лесная почва, хранение.

При сравнительном изучении микробиоценозов почв различных типов и разноцелевого использования возникает вопрос о методических нюансах, связанных с временем хранения почвенных образцов. В литературе по данному вопросу существуют различные точки зрения. Д.Г. Звягинцев с соавт. [4] полагают, что микробиологические исследования должны быть проведены в день отбора почвенных образцов, т. к. при хранении влажных образцов состав микроорганизмов в них сильно изменяется, искажается соотношение между численностью микроорганизмов отдельных эколого-трофических групп. Е.З. Теппер [7] допускает увеличение срока хранения до 48 часов в холодильнике, а Э.А. Штина [8] – до нескольких суток при условии невысокой влажности образцов. На

практике же многие исследователи не придерживаются данных методических рекомендаций и хранят образцы достаточно долго.

В связи с необходимостью изучения микробиоценозов целинных почв, а также ризосферы растений, где существуют активные потоки вещества и энергии, возникает вопрос о сроках хранения таких почвенных образцов, поскольку с их отбором прекращается поступление корневых экссудатов от растений. Вследствие этого, по нашему мнению, должна измениться и физиологическая активность ризосферных микроорганизмов. Кроме того, изъятие образцов из общего монолита почвы увеличивает доступность атмосферного кислорода, что также должно повлиять на физиологическую активность и жизнеспособность микроорганизмов аэробных и анаэробных групп.

Материалы и методы. Почва — серая лесная на нескольких территориально близких участках: вариант 1 — выведенная из сельскохозяйственного использования в 2000 году; вариант 2 — выведенная из сельскохозяйственного использования в 1987 году; варианты 3-4 — агрозем стационарного опыта, заложенного в 1987 году. Исследовали варианты с традиционной для зоны системой обработки почвы, интегрированной защитой от вредителей, болезней, сорняков и разноинтенсивной агрохимической нагрузкой: вариант 3 — контроль — полевой севооборот без использования минеральных и органических удобрений; 4 — полевой севооборот с насыщенностью минеральными удобрениями $N_{96}P_{108}K_{112,5}$ по фону запахивания побочной продукции растениеводства.

Отбор почвенных образов проводили дважды — 25 мая 2005 года, в период затяжных дождей, когда почва была переувлажнена, и 12 июля — в течение засушливого периода длительностью 14 суток. Агрохимическая характеристика почвы приведена в табл. 1.

Первое исследование образцов осуществляли через 3-5 часов после отбора, затем — через 1, 5, 14 суток хранения в стерильных полиэтиленовых пакетах (с доступом кислорода) при температуре +25 °C в термостате и при +5 °C в холодильнике.

Численность микроорганизмов отдельных эколого-трофических групп определяли методом посева почвенной суспензии на специальные и элективные питательные среды: аммонификаторов — на мясо-пептонном агаре, иммобилизаторов минерального азота и стрептомицетов — на крахмало-аммиачном агаре, микромицетов — на среде Чапека со стрептомицином [4,5].

Таблица 1. Агрохимическая характеристика серой лесной почвы при длительном разноцелевом использовании

Варианты опыта	Содержание легкогидро-	Содержание фосфора,	Содержание калия, мг	Степень подвижности	Содержание		Влажность, %	
	лизуемого азота, мг N/кг почвы	${\rm MFP_2O_5/100}{\Gamma}$ почвы	$K_2^{0/100}$ г почвы	фосфора, мг $P_2O_5/100$ г почвы	гумуса, %	pН	первый отбор	второй отбор
Целина с 2000 г	67,2	13,7	12,8	0,249	1,68	5,30	17,0	10,0
Целина с 1987 г	74,0	16,4	12,8	0,287	1,93	5,30	18,5	9,00
Агрозем, без удобрений	71,4	13,4	9,0	0,906	1,68	6,05	15,0	8,60
Агрозем, $N_{96} P_{108} K_{112,5}$	96,6	35,0	18,3	2,90	1,91	5,70	15,0	10,0

Количество микроорганизмов подсчитывали в течение 10 суток в зависимости от скорости роста колоний и физиологических особенностей культуры. Вероятность формирования бактериальных колоний (ВФК) определяли по методу, предложенному S.A. Ishikuri, Т. Hattori и описанному П.А. Кожевиным с соавт. [3].

Резульматы и их обсуждение. Как видно из данных табл. 2 и 3, в течение суток количество аммонификаторов при хранении почвы с повышенной влажностью изменяется несущественно, а при хранении образцов с пониженной влажностью увеличивается: в целинной почве в 1,7, в почве агрозема — в 2,7 раза. Эти данные получены при хранении образцов при температуре +25 °C, при уменьшении температуры до +5 °C для переувлажненной почвы сохраняются те же закономерности, что и при +25 °C: численность аммонификаторов изменяется в течение суток незначительно (табл. 2).

В пересушенной почве, хранящейся в холодильнике, происходят процессы, отличающиеся от тех, что происходят при температуре +25 °C: в целинной, по-видимому, преобладают процессы сорбции, а в агроземе наблюдается равновесие между сорбцией и десорбцией клеток аммонификаторов (табл. 3).

Следовательно, при хранении почвы с пониженной влажностью процессы десорбции аммонификаторов при температуре +25 °C становятся преобладающими, в отличие от переувлажненной почвы, где в основном наблюдается равновесие между сорбцией и десорбцией. Кроме того, можно сделать вывод, что агрохимические характеристики оказывают на процессы десорбции микроорганизмов при хранении почвы меньшее влияние, чем влажность, поскольку тенденции, описанные для целины и агрозема, аналогичны при одинаково низкой влажности и различаются для однотипных вариантов использования почв с разной влажностью (табл. 2, 3, 4).

При дальнейшем хранении (5-14 суток) переувлажненной почвы при +25 °C численность аммонификаторов в почве целины практически не изменяется, а в почве агроценоза увеличивается на 14-е сутки хранения (табл. 2). Иная динамика наблюдается для пересушенной почвы: на пятые сутки хранения количество аммонификаторов уменьшается в почве целины в 1,2 раза, в почве агроценоза – в 3,7 раза (табл. 3). Наблюдаемое уменьшение колониеобразующих единиц (КОЕ) аммонификаторов может быть

Таблица 2. Динамика количества микроорганизмов в образцах серой лесной почвы, отобранной в период затяжных дождей 25 мая 2005 года, при хранении в различных условиях, млн КОЕ/г абсолютно сухой почвы

	Аммонификаторы					ммобил неральн	Микромицеты				Стрептомицеты					
Варианты опыта	исходное	1 cyr.	5 cyr.	14 cyr.	исходное	1 сут.	5 cyr.	14 cyr.	исходное	1 сут.	5 cyr.	14 cyr.	исходное	1 cyr.	5 cyr.	14 cyr.
хранение при температуре +25 °C																
Целина с 2000 г	13,5	12,0	12,9	19,9	66,5	32,0	63,8	60,0	60,5	57,2	52,6	43,6	8,55	5,20	3,20	7,10
Целина с 1987 г	27,5	не опр.	17,3	18,3	81,9	не опр.	78,5	62,3	98,4	не опр.	39,7	36,3	16,0	не опр.	19,2	8,70
Агрозем, без удобрений	14,2	16,6	26,8	20,0	39,5	124,5	82,9	97,2	35,4	36,9	55,7	30,1	6,80	10,6	13,4	13,0
Агрозем, N ₉₆ P ₁₀₈ K _{112,5}	47,4	не опр.	24,7	34,1	238,1	не опр.	184,7	207,4	54,4	не опр.	60,7	48,1	27,2	не опр.	14,8	15,6
	хранение при температуре +5 °C															
Целина с 2000 г	13,5	14,0	15,5	7,45	66,5	55,1	61,1	116,3	60,5	58,3	27,6	15,4	8,55	7,90	9,50	12,8
Целина с 1987 г	27,5	не опр.	5,75	41,0	81,9	не опр.	58,9	187,4	98,4	не опр.	36,9	27,6	16,0	не опр.	9,10	18,8
Агрозем, без удобрений	14,2	16,2	19,7	16,5	39,5	50,4	173,6	149,3	35,4	32,2	38,7	37,7	6,80	10,8	15,6	12,4
Агрозем, N ₉₆ P ₁₀₈ K _{112,5}	47,4	не опр.	19,7	5,50	238,1	не опр.	98,2	41,9	54,4	не опр.	55,5	37,7	27,2	не опр.	15,9	2,55

Таблица 3. **Динамика количества микроорганизмов в образцах серой лесной почвы, отобранной в период засухи 12 июля 2005 года, при хранении в различных условиях**, млн КОЕ/ г абсолютно сухой почвы

	Аммонификаторы				Иммобилизаторы минерального азота				N	Ликро	мицетн	Ы	Стрептомицеты			
Варианты опыта	исходное	1 cyr.	5 cyr.	14 cyT.	исходное	1 cyT.	5 cyr.	14 cyr.	исходное	1 cyr.	5 cyr.	14 cyr.	исходное	1 cyT.	5 cyr.	14 cyr.
	хранение при температуре +25 °C															
Целина с 1987 г	24,8	42,6	36,6		42,7	104,1	119,8		41,8	50,2	44,3	36,3	6,04	10,7	12,2	
Агрозем,	105,1	278,5	74,6		225,7	1881	547,7		45,6	40,0	24,8	48,1	6,60	22,6	24,1	
$N_{96}P_{108}K_{112,5}$	105,1	270,3	74,0		223,7	1001	347,7		75,0	70,0	24,0	70,1	0,00	22,0	27,1	
	хранение при температуре +5 °C															
Целина с 1987 г	24,8	17,6	20,9		42,7	69,6	124,4		41,8	40,3	25,6		6,04	7,90	3,66	
Агрозем, N ₉₆ P ₁₀₈ K _{112,5}	105,1	106,4	42,7		225,7	327,0	258,3		45,6	42,1	21,8		6,60	14,5	6,09	

обусловлено как сменой процесса десорбции на сорбцию клеток микроорганизмов почвенными частицами, так и отмиранием клеток в условиях недостатка влаги. Вероятность последнего предположения, на наш взгляд, достаточно мала, т. к. клетки микроорганизмов устойчивы к высушиванию: в условиях контактно-конвентивного обезвоживания (в контакте с почвой и воздухом) до остаточной влажности 8-12 % жизнеспособность сохраняют до 96 % клеток [1].

При длительном хранении переувлажненной почвы при +5 °C в основном идет скачкообразное уменьшение численности аммонификаторов после 14 суток хранения (табл. 2). Поскольку при +25 °C уменьшения численности микроорганизмов на 14 сутки хранения не наблюдается, то можно предполагать, что песимальная температура (+5 °C) является стрессором и вызывает усиление процесса сорбции клеток почвенными частицами. При длительном хранении пересушенной почвы (табл. 3) уменьшение КОЕ аммонификаторов наблюдается несколько раньше: на первые сутки хранения (целина) и на пятые – в случае агроценоза. Вероятно, действие двух неблагоприятных факторов (недостатка влаги и пониженной температуры) ускоряет возникновение стрессового состояния клеток, и как следствие, усиление сорбционных процессов.

Количество микроорганизмов, ассимилирующих минеральный азот, при хранении в течение суток переувлажненной почвы уменьшается в 2,0 раза в целинной почве и увеличивается в 3,2 раза в почве агроценоза (табл. 2). Несмотря на то, что в данном случае речь идет о почве контрольного варианта, куда минеральные и органические удобрения не вносили с 1987 года, в ней преобладают процессы десорбции в отличие от почвы целины, где активизируются процессы сорбции. Поскольку эти два варианта несущественно отличаются по содержанию азота, можно предположить, что разница в протекании сорбционнодесорбционных процессов иммобилизаторов азота обусловлена влажностью и физико-механическими свойствами образцов: в почве целины влажность и плотность почвы более высокие, чем в почве агроценоза, подвергающейся периодическому рыхлению [6]. Большую роль влажности почвы в процессе сорбции подтверждают результаты, полученные для почвы, которая испытала длительную засуху и недостаточно увлажнена на момент отбора образцов: в 94

ней преобладают процессы десорбции — как в целинной почве, так и в почве агроценоза: количество КОЕ иммобилизаторов минерального азота увеличивается при хранении соответственно в 2,4 и 8,4 раза. При дальнейшем хранении переувлажненной почвы количество микроорганизмов несколько снижается — на 11-31 %, за исключением агрозема без внесения удобрений, где количество КОЕ иммобилизаторов азота превышает исходное на 110-150 %.

При хранении в холодильнике суточные закономерности изменения численности иммобилизаторов минерального азота аналогичны тем, что описаны выше для почвы, хранящейся при +25 °C, однако на 14-е сутки хранения наблюдается скачкообразное увеличение численности в 1,9-3,2 раза – для целины, образованной в 2000 и 1987 гг, соответственно. При этом в почве агроценоза на 14-е сутки наблюдается противоположная тенденция – уменьшение КОЕ иммобилизаторов минерального азота в 1,2 и 2,3 раза (табл. 2). Длительное хранение пересушенной почвы (табл. 3) при +5 °C приводит к увеличению численности этих микроорганизмов в почве целины через сутки – в 1,6 раза и на пятые сутки – в 2,9 раза, в почве агроценоза – на 45 и 14 %, соответственно. К 14-м суткам наблюдается усиление процессов сорбции.

В наименьшей степени при хранении образцов подвержена колебаниям численность микромицетов. Эти наблюдения справедливы как для переувлажненной, так и пересушенной почвы. Возможно, это обусловлено гидрофобными свойствами поверхностности грибного мицелия и спор. Закономерности изменения КОЕ стрептомицетов в почвах различной влажности аналогичны таковым, установленным для микроорганизмов, ассимилирующих минеральный азот (табл. 2, 3).

Таким образом, хранение почвенных образцов приводит к искажениям исходных показателей численности микроорганизмов различных эколого-трофических групп. Масштабы и направленность (ассимметрия) искажений предположительно зависят от генезиса почвы, ее влажности, способа хранения образцов, а также гидрофильно-гидрофобных свойств поверхности клеток микроорганизмов определяемых групп.

Дополнительным показателем, позволяющем оценить физиологическую активность клеток в почвенном микробиоценозе, является вероятность формирования колоний микроорганизмов (ВФК) [3]. По утверждению авторов метода, вероятность образования колоний в лаборатории зависит от состояния родительской клетки в природе: клетки в более активном физиологическом состоянии быстрее начинают потреблять субстраты питательной среды и формировать колонии. Согласно П.А. Кожевину с соавт. [3], клетки, имеющие значение вероятности формирования колоний меньше 0.02ч⁻¹ находятся в пассивном состоянии, клетки с вероятностью формирования колоний, равной 0.04ч⁻¹ – физиологически активны.

Наиболее общая закономерность, установленная в проведенных исследованиях, состоит в увеличении ВФК после суточного хранения образцов: ВФК аммонификаторов увеличивается в 2,2 и 3,2-2,2 раз для переувлажненной и пересушенной почв, соответственно (табл. 4, 5). ВФК иммобилизаторов минерального азота увеличивается в переувлажненной почве в 1,4-1,5 раза, в пересушенной — в 2,7-3,0 раза. Причем, увеличение ВФК происходит и при хранении образцов в холодильнике, однако не так существенно, как при комнатной температуре. При дальнейшем хранении в холодильнике (5 суток) ВФК иммобилизаторов минерального азота значительно уменьшается по сравнению с хранением при комнатной температуре.

Одним из возможных объяснений увеличения ВФК микроорганизмов в процессе хранения может быть усиление процесса десорбции клеток с частиц почвы, которое не сопровождается физиологической vвеличением активности процессами деления. Другим возможным объяснением наблюдаемого явления может быть переход клеток в стрессовое состояние в результате извлечения образцов почвы из природной экониши. Увеличение ВФК микроорганизмов через сутки после извлечения почвенных образцов свидетельствует, возможно, о попытке микроорганизмов нивелировать негативное влияние абиотических стрессоров, на что используется дополнительная энергия, увеличивается физиологобиохимическая активность клеток. В качестве стрессоров может выступать повышение концентрации молекулярного кислорода, прекращение поступления органических и минеральных субстратов и кофакторов ферментов от корней растений и пр. Дальнейшее уменьшение ВФК при хранении образцов может быть обусловлено двумя причинами: первая – истощаются внутриклеточные запасы субстратов; и вторая – микроорганизмы приспосабливаются к изменившимся условиям окружающей среды и выходят из стрессового состояния.

Таблица 4. Динамика изменения вероятности формирования колоний микроорганизмов в образцах серой лесной почвы, отобранной в период затяжных дождей 25 мая 2005года, при хранении в различных условиях, λ , ч⁻¹· 10^{-2}

	ВФК	аммониф	икатор	ОВ		К иммоби инерально			ВФК микромицетов				
Варианты опыта	исходное	1 сут.	5 cyr.	14 cyr.	исходное	1 сут.	5 cyr.	14 cyr.	исходное	1 сут.	5 cyr.	14 сут.	
хранение при температуре +25°C													
Целина с 2000 г	3,37	7,26	7,74	3,27	3,35	5,05	5,59	3,77	8,22	9,98	8,66	5,20	
Целина с 1987 г	не опр.	не опр.	3,41	3,74	3,68	не опр.	7,56	2,91	8,16	не опр.	6,52	5,00	
Агрозем, без удобрений	4,51	4,09	4,53	5,78	3,91	5,28	5,06	2,83	3,32	5,86	6,31	4,80	
Агрозем, N ₉₆ P ₁₀₈ K _{112,5}	не опр.	не опр.	4,56	7,19	5,73	не опр.	2,99	3,70	4,64	не опр.	7,33	4,68	
хранение при температуре +5°C													
Целина с 2000 г	3,37	5,60	6,38	2,48	3,35	4,02	3,81	3,48	8,22	9,16	9,63	5,50	
Целина с 1987 г	не опр.	не опр.	0,11	5,88	3,68	не опр.	4,80	3,08	8,16	не опр.	7,24	5,25	
Агрозем, без удобрений	4,51	5,00	8,47	8,10	3,91	5,35	5,13	2,82	3,32	6,55	6,75	4,00	
Агрозем, N ₉₆ P ₁₀₈ K _{112,5}	не опр.	не опр.	4,89	3,19	5,73	не опр.	3,46	1,14	4,64	не опр.	7,46	4,15	

Таблица 5. Динамика изменения вероятности формирования колоний микроорганизмов в образцах серой лесной почвы, отобранной в период засухи 12 июля 2005года, при хранении в различных условиях, λ , ч⁻¹ · 10^{-2}

	ВФК аммонификаторов						билиза ного аз		ВФК микромицетов				
Вариант опыта	исходное	1 cyr.	5 cyr.	14 cyT	исходное	1 cyr.	5 cyr.	14 cyr.	исходное	1 cyr.	5 cyr.	14 cyr.	
хранение при температуре +25°C													
Целина с 1987 г	1,44	4,54	6,83	3,50	2,31	6,23	2,54	2,05	3,81	6,22	3,50	2,45	
Агрозем, $N_{96}P_{108}K_{112,5}$	4,20	9,05	4,88	1,98	2,07	6,22	3,38	2,54	4,45	4,09	2,40	1,67	
хранение при температуре +5°C													
Целина с 1987 г	1,44	5,88	5,81	3,84	2,31	3,59	0,94	0,08	3,81	6,10	3,82	2,89	
Агрозем, N ₉₆ Р ₁₀₈ К _{112,5}	4,20	4,15	6,99	2,45	2,07	3,91	0,49	0,12	4,45	5,36	2,84	2,00	

Практическим выводом из проведенного исследования может быть подтверждение тех методических рекомендаций [4], согласно которым микробиологические посевы необходимо проводить в день отбора образцов, или, в крайнем случае, проводить анализ образцов при условии равной длительности их хранения в одинаковых условиях, поскольку фактор времени, влажность образцов и температура хранения существенно влияют на определяемый показатель количества микроорганизмов.

- 1. Беккер М. Е. Ксеро- и термочувствительность некоторых эпифитных бактерий / М. Е. Беккер, М. Маруска. Рига : Зинантне, 1969. 254 с.
- 2. Демкина Т. С. Микробиологические процессы в почвах при различных уровнях интенсификации земледелия / Т. С. Демкина, Б. Н. Золотарева // Микробиологические процессы в почвах и урожайность сельскохозяйственных культур. Вильнюс, 1986. С. 101–103.
- 3. Кожевин П. А. Определение состояния бактерий в грунте / П. А. Кожевин, Л. С. Кожевина, И. Н. Болотина // Докл. АН СССР. 1987. Т. 297, № 5. С. 1247–1249.
- 4. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д. Г. Звягинцева. М. : МГУ, 1991. 304 с.
- 5. Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов / под ред. Н. А. Красильникова. М.: МГУ, 1966. 162 с.
- 6. Скурятін Ю. М. Оптимізація фізичного стану грунту перелогів / Ю. М. Скурятін // Вісник аграрної науки 2003. № 8. С. 14–16.
- 7. Теппер Е. 3. Практикум по микробиологии / Е 3. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. М. : Дрофа, 2004. 256 с.
- 8. Штина Э. А. Методы изучения почвенных водорослей / Э. А. Штина // Микроорганизмы как компоненты биогеоценоза. М. : Наука, 1984. С. 58–74.

ДИНАМІКА ЧИСЕЛЬНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ДЕЯКИХ ЕКОЛОГО-ТРОФІЧНИХ ГРУП ЗА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ СІРОГО ЛІСОВОГО ҐРУНТУ

Малиновська І.М.

Національний науковий центр "Інститут землеробства УААН", смт. Чабани

Вивчали динаміку чисельності мікроорганізмів деяких еколого-трофічних груп за зберігання зразків сірого лісового грунту різноцільового використання. Встановлено, що зберігання зразків грунту призводить до викривлення вихідних показників чисельності мікроорганізмів. Масштаби і направленість викривлень можуть залежати від вологості грунту, його агрохімічних й фізіко-механічних властивостей, способів зберігання зразків, атакож гідрофільногідфобних властивостей поверхні клітин мікроорганізмів груп, які визначають. Вірогідним механізмом виникнення викривлень є зміна напряму й інтенсивності перебіг сорбційних процесів між клітинами мікроорганізмів і часточками грунту під дією абіотичних стресорів в результаті відбору грунтових зразків.

Ключові слова: мікроорганізми, еколого-трофічні групи, сірий лісовий грунт, зберігання.

DYNAMICS OF MICROORGANISM QUANTITY OF SOME ECOLOGICAL-TROPHIC GROUPS AT THE STORAGE OF GRAY-FOREST SOIL SAMPLES Malynovska I.M.

National Scientific Center "Institut of Agriculture UAAS", Chabani

Dynamics of microorganism quantity of some ecological-trophic groups at the storage of gray-forest soil samples was investigated. It was established that isolation from the agricultural land and storage of gray-forest soil samples resulted in distortion of quantity of its microorganisms. The scope of distortion can depend on soil humidity, its agrochemical, physical and mechanical properties, methods of storage, as well as hydrophilic - hydrophobic characteristics of surfaces of microorganism cells. The most possible mechanism of the distortion is change of direction and intensity of sorption processes between microorganism cells and soil particles influenced by abiotic stressors when selection of the soil samples.

Key words: microorganisms, ecological-trophic groups, gray-forest soil, storage.