

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НА ПОВЕРХНОСТИ И ВНУТРИ ПОЧВЕННЫХ АГРЕГАТОВ

УМЕР МУСТАФА ИСМАИЛ, АА. ВАНЬКОВА

(Кафедра микробиологии и иммунологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

**В статье приводятся результаты микробиологических исследований дерново-подзолистой и тёмно-серой лесной почв на агрегатном уровне. Выявлено, что содержание микробной биомассы, численность бактерий и грибов на поверхности почвенных агрегатов существенно выше, чем внутри. Полученные данные показали микробиологическую дифференциацию изученных почв на уровне агрегатов. Установлено, что поверхность почвенных агрегатов обладает большей биогенностью по сравнению с их внутрипедной частью. Микробное сообщество, обитающее на поверхности почвенных агрегатов, по величине микробного метаболического коэффициента характеризуется более стабильным состоянием и устойчивостью.**

*Ключевые слова:* почвенные агрегаты, микроорганизмы, субстрат-индуцированное дыхание, микробная биомасса, базальное дыхание, микробный метаболический коэффициент, численность колониеобразующих единиц.

Почва как среда обитания микроорганизмов представляет гетерогенную трехфазную систему с очень развитой твердой поверхностью, контактирующей с жидкой и газовой фазами [5]. Твердая фаза почвы состоит из элементарных почвенных частиц, которые объединяются в почвенные микроагрегаты [2]. Элементарные почвенные частицы представляют собой обломки пород и минералов, органические частицы, а также аморфные соединения, которые находятся в химической взаимосвязи [11]. Размер агрегатов составляет от долей до десятка миллиметров в зависимости от типа и состояния почвы. Формирование агрегатов происходит при участии микроорганизмов [4].

Устойчивость агрегатов определяется соотношением сил сцепления между частицами и разрушающим воздействием [20]. Водопрочность агрегатов связывают с химической природой почвенных коллоидов, анаэробными процессами внутри агрегатов, гидрофобностью внутриагрегатной поверхности, снижением «разрывного» действия заземленного воздуха. Удаление органического вещества вызывает немедленное разрушение водоустойчивых агрегатов [7]. Процессы, протекающие внутри агрегатов, локализованы преимущественно в сложной системе пор. При чередовании иссушения и увлажнения почв одни поры насыщаются водой и лимитированы по кислороду другие — претерпевают иссушение. В почвах вертисолей, например, наблюдается даже деформирование пор в период иссушения [23].

Почвенный агрегат — основная структурная и функциональная единица почвы — представляет микрокосм ассоциативно сосуществующих групп микроорганизмов, которые формируют закономерные эколого-трофические связи, образуя внутриагрегатный почвенный ценоз [18].

Распределение влаги в агрегате ведет к тому, что в его центральной части складываются восстановленные условия из-за медленной диффузии  $O_2$  по капиллярам и поглощения  $O_2$  в наружном слое аэробными органотрофами. Установление ана-

эробноза в центральной части агрегата зависит от диффузионных процессов и наличия легкодоступного органического вещества [4]. Клейн и Тайер [21] предложили различать три зоны: аэробную — на внешней стороне агрегата, микроаэробную — с порами, заполненными как воздухом, так и водой, и анаэробную, расположенную в центре агрегата и заполненную водой. Наличие анаэробных зон внутри почвенных агрегатов объясняет возможность протекания анаэробных процессов даже в аэрируемых почвах [25, 26]. Внутри почвенных агрегатов содержится заземленный воздух, который с большим трудом подвергается обменным процессам. Это дает возможность для развития в близком соседстве аэробных и анаэробных микроорганизмов, например, метанобразующих и метанооксиляющих бактерий [24].

Существуют различные модели распределения микроорганизмов в почвенных агрегатах. Наиболее известны модели, в которых почвенные агрегаты рассматриваются как совокупность бактериальных и грибных микроколоний внутри почвенных агрегатов [6, 19]. Эта модель основна на существовании микрозон с резко различающимися условиями: внутренней части агрегата, характеризующейся маленькими порами с доступной для микроорганизмов водой в хорошоувлажненных почвах; и внешней части, подверженной сильному высушиванию. При микроскопическом анализе агрегатов в их центральной части обнаруживаются скопления бактерий, а снаружи — мицелий грибов [4].

Распределение бактерий внутри почвенных агрегатов во многом определяет их способность к выживанию в неблагоприятных условиях окружающей среды, активность и экологические функции [8]. Распределение микроорганизмов в почвенных агрегатах и их активность остаются малоизученными. Между тем биохимические процессы, осуществляемые почвенными микроорганизмами, оказывают существенное влияние на миграцию химических элементов, распределение элементов минерального питания растений и токсических веществ [10].

Цель исследования — изучить численность, состав и активность микроорганизмов на поверхности и внутри почвенных агрегатов.

### **Объекты и методы**

Объектами исследования служили воздушно-сухие агрегаты размером 10-20 мм двух типов почв — дерново-подзолистой и темно-серой лесной (Владимирская обл.). Разделение поверхностной и внутривредной массы проводили методом прямого соскабливания поверхностного слоя (~2 мм) почвенных агрегатов. Полученные образцы почв ( $t \sim 200$  г) измельчали и просеивали через сито ( $d$  пор — 1 мм). Инициацию микробного сообщества проводили увлажнением почвенных образцов до 60% ПВ и инкубацией в термостате при  $t$  22°C в течение 5 сут.

Изучение численности и состава микроорганизмов проводили методом питательных пластин (метод Коха) [9]. Для выявления бактерий использовали мясопептонный агар (МПА), грибов — среду Чапека для микромицетов, актиномицетов — среду Чапека для бактерий. Для учета численности бактерий использовали разведения  $10^5$  и  $10^6$ , грибов —  $10^3$  и  $10^4$ , актиномицетов —  $10^4$  и  $10^5$ . Посев производили в двух повторностях. Температура инкубации — 28°C. Подсчет колоний бактерий и актиномицетов проводили на 4-й день, грибов — на 8-й.

Изучение активности микроорганизмов проводили методом газовой хроматографии по интенсивности выделения почвой  $CO_2$  («дыхание» почвы) на хроматографе «Кристалл-5000-2» (Россия). В образцах почв определяли субстрат-индуцированное дыхание (СИД) методом, предложенным в работах [13, 14, 15, 17] в модификации Н.Д. Ананьевой [1]. Метод основан на измерении начальной скорости дыхания

микроорганизмов после обогащения почвы дополнительным источником углерода и энергии (глюкоза). СИД рассчитывали по формуле:

$$\text{СИД (мкг С-СО}_2\text{/г почвы} \cdot \text{час)} = (\% \text{ СО}_2 \text{ пробы} - \% \text{ СО}_2 \text{ воздуха)} \cdot V \text{ флакона (мл)} \times \\ \times 12 \text{ мкг/моль} \cdot 60 \cdot 10/22 \text{ мкмоль/мкл} \cdot m \text{ сухой навески} \cdot At \text{ (мин)}.$$

Микробную биомассу почвы определяли путём пересчёта скорости СИД по формуле:

$$C_{\text{мкк}} \text{ (мкг/г почвы)} = (\text{мкл СО}_2\text{/г почвы} \cdot \text{час)} \cdot 40,04 + 0,37.$$

Для этого СИД рассчитывали по формуле:

$$\text{СИД (мкл СО}_2\text{/г почвы} \cdot \text{час)} = (\% \text{ СО}_2 \text{ пробы} - \% \text{ СО}_2 \text{ воздуха)} \times \\ \times 1000 \cdot V \text{ флакона (мл)} \cdot 60 / 100 \cdot m \text{ сухой навески} At \text{ (мин)}.$$

Базальное (фоновое) дыхание (БД) определяли аналогично СИД, только вместо раствора глюкозы в почву вносили воду. Микробный метаболический коэффициент ( $Q_r$ ) рассчитывали как отношение скоростей БД и СИД:

$$Q_r = \text{БД} / \text{СИД}.$$

Статистический анализ данных проведен в Excel (2003).

### Результаты и их обсуждение

Метод определения субстрат-индуцированного дыхания (СИД) является простым, быстрым и экономичным методом определения углерода микробной биомассы в почвах и органических остатках. Он основан на том, что начальная скорость продукции  $\text{CO}_2$  микроорганизмами в ответ на внесение в почву легкодоступного энергетического субстрата пропорциональна их массе [16]. В качестве легкодоступного субстрата использовали глюкозу как самый распространенный в природных полимерах мономер, превышающий количество других сахаров на два порядка [12, 22]. Основным источником глюкозы в почве является растительный опад, на 70-80% состоящий из целлюлозы. Этот полисахарид в почве утилизируется микроорганизмами в виде глюкозы, образующейся в результате внеклеточной ферментативной деполимеризации целлюлозным комплексом [3]. Поэтому потребление глюкозы рассматривается как модель минерализации органического опада почвенными микроорганизмами. К тому же потребление глюкозы микроорганизмами почвы *in situ* за время, в течение которого не происходит роста и размножения клеток (несколько часов), положено в основу определения содержания микробного углерода (биомассы) в почве. При температуре, равной  $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , выделение 1 мл  $\text{CO}_2$  в час соответствует 40 мг углерода микробной биомассы почв.

Полученные результаты показали, что СИД на поверхности агрегатов выше, чем внутри, в обеих почвах (табл. 1). В дерново-подзолистой почве скорость СИД на поверхности агрегатов превышает таковую внутри почти в 2 раза. Микробная биомасса соответственно достигает максимальных значений на поверхности почвенных агрегатов, где отмечена наибольшая активность микробного сообщества. БД существенно не отличается по зонам агрегатов в исследуемых почвах. Интегральным показателем состояния и устойчивости микробного сообщества почвы может служить микробный метаболический коэффициент ( $Q_r$ ), который в наших исследованиях рассчитан как отношение БД и СИД [14, 15].

Полученные данные показывают, что значение микробного метаболического коэффициента достоверно ниже на поверхности почвенных агрегатов по сравнению с

Таблица 1

**Скорость дыхания (СИД и БД), содержание микробной биомассы ( $C_{\text{мик}}$ ) и микробный метаболический коэффициент ( $Q_R$ ) в образцах дерново-подзолистой и темно-серой лесной почв на поверхности и внутри почвенных агрегатов**

Тип почвы	Зона агрегата	СИД мкг С-СО <sub>2</sub> /г почвы · час	БД мкг С-СО <sub>2</sub> /г почвы · час	$C_{\text{мик}}$ мкг С/г почвы	$Q_R$ БД/СИД
Дерново-подзолистая	Внутри	5,72 ± 1,20	3,83 ± 0,08	420 ± 88	0,7 ± 0,1
	Поверхность	10,74 ± 1,27	3,71 ± 0,34	789 ± 93	0,4 ± 0,1
Темно-серая лесная	Внутри	4,92 ± 0,35	4,24 ± 0,32	362 ± 26	0,9 ± 0,1
	Поверхность	6,55 ± 0,85	3,79 ± 0,75	481 ± 62	0,6 ± 0,1

внутрипедной частью и составляет одинаковую величину для обеих изучаемых почв (см. табл. 1). Между показателями  $Q_R$  и биогенностью (микробной биомассой  $C_{\text{мик}}$ ) отмечается обратная зависимость. Поверхность почвенных агрегатов с высоким содержанием микробной биомассы имеет низкие величины  $Q_R$ , а внутренняя часть с низким содержанием — высокие  $Q_R$ . Данные о выявленной зависимости согласуются с результатами других исследователей, которые отмечали тесную отрицательную корреляционную зависимость этих показателей. Состояние микробного сообщества почвы можно оценить микробным метаболическим коэффициентом, значения которого не зависят от температуры и влажности почвы. В соответствии с литературными данными [1] внесение различных поллютантов в почву приводит к возрастанию в несколько раз величины микробного метаболического коэффициента по сравнению с контрольной (без поллютантов) почвой. Длительное однотипное агроиспользование почв также вызывает увеличение (2-3 раза) метаболического коэффициента по сравнению с целинными аналогами. Микробный метаболический коэффициент как показатель экофизиологического статуса почвенных микроорганизмов может отражать устойчивость микробного сообщества почвы, в т.ч. и при различных антропогенных воздействиях. Таким образом, полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о более благоприятном и стабильном состоянии микробного сообщества поверхности почвенных агрегатов по сравнению с их внутрипедной частью.

Результаты анализа численности микроорганизмов показали (табл. 2), что в структуре микробного сообщества на поверхности и внутри почвенных агрегатов преобладают бактерии. Количество клеток бактерий во внутренней части почвенных агрегатов изучаемых типов почв (80,0 млн/г в дерново-подзолистой и 2,5 млн/г в темно-серой лесной) меньше по сравнению с их периферической (поверхностной) частью (141,25 млн/г и 130,0 млн/г соответственно). Исходя из этих данных, можно предполагать, что внутри почвенных агрегатов складываются более анаэробные условия, поэтому численность аэробных бактерий там ниже, чем в более аэрированной поверхности агрегатов. Численность микроскопических грибов на поверхности агрегатов (0,16 млн/г в обеих почвах) также оказалась значительно выше, чем в их центральной части (0,07 и 0,02 млн/г в дерново-подзолистой и темно-серой лесной почве соответственно). Как известно, грибы являются основными деструкторами органического вещества в окислительных условиях и их биомасса выше на поверхности почвенных агрегатов [4]. Численность актиномицетов на поверхности агрегатов выше, чем внутри в темно-серой лесной почве (43,0 и <0,1 млн/г соответственно). Внутри агрегатов темно-серой лесной почвы актиномициты в разведениях  $10^{-4}$  и  $10^{-5}$

**Численность микроорганизмов на поверхности и внутри почвенных агрегатов**  
(млн КОЕ/г абс. сух. почвы)

Тип почвы	Зона агрегата	Грибы	Актиномицеты	Бактерии
Дерново-подзолистая	Внутри	0,07 ± 0,01	32,13 ± 2,13	80,00 ± 15,00
	Поверхность	0,16 ± 0,04	24,88 ± 0,13	141,25 ± 33,75
Темно-серая лесная	Внутри	0,02 ± 0,01	< 0,1	2,50 ± 2,50
	Поверхность	0,16 ± 0,02	43,00 ± 7,00	130,00 ± 5,00

не выявлены. Однако в дерново-подзолистой почве наблюдается обратная тенденция. Количество актиномицетов оказалось больше во внутренней части агрегатов.

Результаты проведенных экспериментальных исследований позволяют заключить, что поверхность почвенных агрегатов изученных почв обладает большей биогенностью по сравнению с внутренней частью. Микробное сообщество поверхности почвенных агрегатов более многочисленно и характеризуется стабильным состоянием и устойчивостью.

### Выводы

1. Выявлена микробиологическая дифференциация дерново-подзолистой и темно-серой лесной почв на агрегатном уровне.
2. Установлено, что поверхность почвенных агрегатов обладает большей биогенностью по сравнению с внутривредной частью: на поверхности агрегатов обеих почв выявлена наибольшая микробная биомасса.
3. Численность грибов и аэробных бактерий на поверхности почвенных агрегатов выше, чем во внутренней их части, что связано, вероятно, с большим содержанием кислорода в межагрегатном пространстве почвы по сравнению с внутривредными порами.
4. Микробное сообщество, обитающее на поверхности почвенных агрегатов, по величине микробного метаболического коэффициента характеризуется более стабильным состоянием и устойчивостью по сравнению с микроорганизмами внутренней части агрегатов.

### Библиографический список

1. *Ананьева Н.Д.* Микробиологические аспекты самоочищения и устойчивости почв. М.: Наука, 2003. 223 с.
2. *Воронин А. Д.* Основы физики почв. М.: МГУ 1986. 243 с.
3. *Готтишилк Г.* Метаболизм бактерий. М.: Мир, 1982, 310 с.
4. *Заварзин Г.А.* Лекции по природоведческой микробиологии. М., Наука, 2003, 348 с.
5. *Звягинцев Д.Г., Бабьева П.Л., Зенова Г.М.* Биология почв. М.: МГУ, 2005. 445 с.
6. *Красильников Н.А.* Микроорганизмы почвы и высшие растения. М.: Изд-во АН СССР, 1958. 464 с.
7. *Милановский Е.Ю., Шейн Е.В.* Функциональная роль амфифильных компонентов гумусовых веществ в процессах гумусо- и структурообразования и генезисе почв// Почвоведение, 2002. №10. С. 1201-1213.
8. *Степанов А.А.* Микробное образование и поглощение парниковых газов в почвах. М.: МГУ 2009. 225 с.
9. *Тептер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.П.* Практикум по микробиологии. М.: Дрофа, 2004. 256 с.
10. *Торшин С.П., Фокин А.Д.* Особенности первичного распределения токсикантов на профилном и агрегатном уровнях дерново-подзолистой почвы на примере <sup>137</sup>Cs и <sup>90</sup>Sr // Известия ТСХА, 2009. Вып. I. С. 128-135.

11. Шейн Е.В. Курс физики почв. М.: МГУ, 2005. 430 с.
12. Щербакова Т.А. Ферментативная активность почв и трансформация органического вещества. Минск: Наука и техника, 1983. 222 с.
13. Anderson J.P.E., Domsch K.H. Physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils // *Soil Biol, and Biochem.*, 1978. Vol. 10. № 3. P. 215-221.
14. Anderson T.H., Domsch K.H. Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in a dormant state // *Biol. Fertil. Soils*, 1985a. Vol. 9. № 1. P. 81-89.
15. Anderson T.H., Domsch K.H. Maintenance requirements of actively metabolizing microbial populations under in situ conditions // *Ibid.*, 1985b. Vol. 17. № 2. P. 197-203.
16. Carter M. R., Gregorich E.G. Soil sampling and method of analysis // *Can. Soc. of Soil Sci.*, 2008. P. 515-517.
17. Domsch K.H., Jagnow G., Anderson J.P.E. et al. A comparison of methods for soil microbial population and biomass studies // *Ztschr.Pflanzenemachr. Bodenkn*, 1979. Bd. 142. P. 520-533.
18. Elliot E.T., Anderson R.V., Coleman D.C., Cole C.V. Habitable pore space and microbial trophic interactions // *Oikos*, 1980. V. 35. P. 327-335.
19. Hattori T. Soil aggregates as microhabitats for microorganisms // *Rep. Inst. Agric. Res., Tohoku Univ.*, 1988. V. 37. P. 23-26.
20. Kember W.D., Rosenau R.C. Methods of soil analysis. Physical and mineralogical methods. Am. Soc. of Agron. Soil Sci. Soc. of Am., 1986. 2<sup>nd</sup> ed.
21. Klein A.D., Thayer J.S. Interaction between soil microbial communities and organometallic compounds // *Soil Biochemistry J.*, 1990. V. 6. P. 431-481.
22. Lynch J.M. Products of soil microorganisms in relation to plant growth // *Crit. Rev. Microbial.*, 1976. V. 5. P. 67-87.
23. Robertson K. Nitrous oxide emission from soil on extrapolation from soil environmental factors // *Linköping Univer.*, 1995. P. 9-44.
24. Wagner D.M., Pfeiffer a E., Aland E., Bockb E. Methane production in aerated marshland and model soils: effects of microflora and soil texture // *Soil Biol, and Biochem.*, 1999. V. 31. P. 999-1006.
25. Wang B., Neue H. ( Samonte H.P. Factors controlling diel patterns of methane emission patterns via rice plants // *Nutr. Cycling in Agroecosyst.*, 1999. V. 53. P. 229-235.
26. Wang F.L., Bettanv J.R. Methane emission from a usually well-drained prairie soil after snowmelt and precipitation // *Can. J. Soil Sci.*, 1995. V 75. P. 239-241.

*Рецензент* — д. б. н. С.П. Торшин

#### SUMMARY

Results of microbiological research into both soddy-podzolic and dark-grey forest soil at aggregate level are provided in the article. It has been discovered that microbial biomass content and the number of bacteria and fungi on the surface of soil aggregates are much higher than on the inside. It has been established that the surface of soil aggregates is more biogenic than their inside part. Microbial community that lives on the surface of soil aggregates, by microbial metabolic coefficient value, is characterized by both more stable state and resistance.

**Key words**, soil aggregates, microorganisms, induced soil respiration microbial biomass, basal respiration, microbial metabolic coefficient, number of colony forming units.

Умер Мустафа Исмаил — асп. кафедры микробиологии и иммунологии и кафедры агрономической и биологической химии и радиологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Эл. почта: artoshy72@yahoo.com

Ванькова Анна Андреевна — к. б. н., доцент кафедры микробиологии и иммунологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Эл. почта: anna.vankova@gmail.com.