

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ ПОЧВ, ОПРЕДЕЛЯЕМОЙ МЕТОДАМИ ПРЯМОГО МИКРОСКОПИРОВАНИЯ И СУБСТРАТ-ИНДУЦИРОВАННОГО ДЫХАНИЯ

© 2008 г. Н. Д. Ананьева*¹, Л. М. Полянская**, Е. А. Сусьян*, И. В. Васенкина**,
С. Вирт***, Д. Г. Звягинцев**

*Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пушкино

**Московский государственный университет, факультет почвоведения

***Центр сельскохозяйственных и ландшафтных исследований, Мюнхенберг, Германия

Поступила в редакцию 26.08.2007 г.

В образцах серой лесной, каштановой и тундровой почв с различными физико-химическими свойствами (0.4–22.7% $C_{орг}$; 8.4–26.8% илестых частиц; pH 4.3–8.4) было определено содержание микробной биомассы (МБ) методами субстрат-индуцированного дыхания (МБ_{СИД}) и прямого микроскопирования (МБ_М). Были проанализированы образцы двух верхних слоев почвы 0–5 и 5–10 см (без растительной подстилки) разных экосистем (лес, лесополоса, луг, залежь, пашня) и элементов рельефа плакорной тундры (плакор, понижение между плакорами). Содержание микробной биомассы в слое 0–5 см почв составило 216–8134 и 348–7513 мкг С/г почвы, измеренное методами субстрат-индуцированного дыхания и микроскопирования соответственно. Величины МБ_{СИД} и МБ_М тесно коррелировали между собой, $r = 0.90$ и 0.74 для 0–5 и 5–10 см соответственно. Отношение МБ_{СИД}/МБ_М составило, в среднем, 90 и 60% для 0–5 и 5–10 см соответственно. Доля микробного углерода в общем органическом углероде почв составила, в среднем, 4 и 3% (СИД метод), 5 и 7% (прямое микроскопирование) для 0–5 и 5–10 см соответственно. Обсуждены возможные причины различий между величинами МБ_{СИД} и МБ_М в исследуемых почвах.

Ключевые слова: почва, микробная биомасса, прямое микроскопирование, субстрат-индуцированное дыхание.

Микробная биомасса является важным живым и лабильным компонентом почвы. Ее запасы, активность и структура – основные характеристики в экологических исследованиях. Микробную биомассу почвы определяют прямыми микроскопическими и непрямими (биохимический, физиологический) методами. Первые направлены на определение числа и объемов микроорганизмов (микроскопирование), вторые – на оценку их активности, например, дыхательной: после фумигации или внесения дополнительного субстрата (субстрат-индуцированное дыхание, СИД). Исследователи уделяют большое внимание результатам оценки микробной биомассы почв этими двумя группами методов [1–4].

В ряде работ показано, что величины микробной массы, полученные методами прямой микроскопии и СИД тесно и положительно коррелировали между собой [4, 5]. Установлено также, что соотношения грибы/бактерии, определяемые прямой микроскопией и селективным ингибированием СИД, были близки на растительных остатках [6] и в почве [4]. Однако некоторыми исследователями отмечены и различия между величинами микробной

биомассы почв, определяемыми “непрямыми” и “прямыми” методами. Так, микробная биомасса, измеренная методом фумигации [7] или СИД [8, 9], была значительно больше, чем таковая по прямой микроскопии. Другие авторы отмечали, что микробная биомасса, полученная фумигационным методом, была, напротив, меньше, чем прямым микроскопированием [1, 2, 10]. В этих исследованиях прямое микроскопирование было выполнено преимущественно с применением агаровых [1, 2, 8, 10] или мембранных [9] пленок, а окрашивание клеток – дианилином голубым [1, 2, 10], флюоресцеин диацетатом [7] или калькофлуором белым [9].

Метод люминесцентной микроскопии, который применен в настоящей работе, позволяет определять длину мицелия грибов и актиномицетов, численность бактерий и грибных спор, а также измерять диаметр мицелия и спор грибов в почвенной суспензии на стеклянной подложке, окрашенной калькофлуором белым (для эукариот) или акридином оранжевым (для прокариот) [12, 13]. К тому же методом люминесцентной микроскопии были получены обширные сведения о микробном пуле почв нашей страны [13]. Метод субстрат-индуцированного дыхания (физиологический метод), позволяю-

¹ Адресат для корреспонденции (e-mail: ananyeva@rambler.ru).

Таблица 1. Характеристика исследуемых почв

Почва	Область (пункт)	Экосистема (элемент рельефа*)	Растительность	Слой (см)	C _{орг} (%)	pH _{водн}	Гранулометрический состав (частицы/мм), в %		
							Песок (1–0.05)	Глина (0.05–0.001)	Ил (<0.001)
Тундровая глеевая (1)	Воркутинская (Тальник)	Пмп* Плакор	Кустарник Мох, кустарничек	0–5	22.65	5.75	Н.о.**	Н.о.	Н.о.
				0–5	13.25	4.3	Н.о.	Н.о.	Н.о.
Серая лесная (2)	Московская (Пушино)	Лес	Осина, береза	0–5	2.42	5.95	18.80	70.80	10.40
				5–10	1.31	5.5	12.68	74.12	13.20
		Луг	Злаково-разнотравная	0–5	1.76	6.6	31.20	56.64	12.16
				5–10	1.62	6.85	13.60	75.20	11.20
		Пашня	Пшеница	0–5	0.96	5.85	8.40	78.00	13.60
				5–10	0.92	6.05	17.60	65.04	17.36
Темно-каштановая (3)	Волгоградская (Неткачево)	Лесополоса	Дуб	0–5	1.55	6.45	65.20	25.20	9.60
				5–10	0.73	6.3	81.48	9.72	8.80
		Юная залежь	Сорные травы	0–5	0.49	6.05	76.40	15.20	8.40
				5–10	0.36	6.1	76.80	14.00	9.20
		Пашня	Горчица	0–5	1.03	6.3	75.60	13.20	11.20
				5–10	0.96	6.4	76.80	12.00	11.20
Каштановая (4)	Волгоградская (Племхоз)	Лесополоса	Вяз	0–5	1.57	7.7	38.40	38.20	23.40
				5–10	1.49	8.4	39.60	38.20	22.20
		Залежь	Типчак, полынь	0–5	1.99	6.25	42.88	36.12	21.00
				5–10	1.10	6.9	36.40	38.92	24.68
		Пашня	Подсолнечник	0–5	0.96	8.2	38.40	34.80	26.80
				5–10	0.92	8.4	43.20	30.00	26.80

* Для тундровой почвы: Пмп – понижение между плакорами.

** Н.о. – не определяли.

ций оценивать содержание углерода микробной биомассы разных почв, широко применяется исследователями многих зарубежных стран [3–5, 8, 11].

Цель работы – дать сравнительную оценку величин микробной биомассы (МБ) почвы, измеренных методами прямого люминесцентного микроскопирования и субстрат-индуцированного дыхания в: а) разных типах почв и экосистемах; б) двух верхних слоях (0–5 и 5–10 см) почвы. Исследование было сфокусировано также на установлении корреляционной связи между величинами МБ, полученными разными методами, а также между МБ и физико-химическими характеристиками почвы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор и подготовка образцов почвы. Образцы тундровой, серой лесной и каштановой почв разных экосистем были отобраны из верхних слоев (0–5 и 5–10 см), растительный опад в анализ не включали (табл. 1). Смешанный образец почвы (естественная влажность) каждой экосистемы просеивали через сито (диаметр ячеек 2 мм), помещали в полиэтиленовый пакет с ватной пробкой (для газообмена) и

хранили в холодильнике до использования в экспериментах.

Содержание органического углерода почвы определяли бихроматным окислением, pH – в водной суспензии (соотношение почва : вода = 1 : 2.5) и гранулометрический состав – весовым методом с пирофосфатом натрия.

Предынкубация образцов. До начала анализов образцы почвы (0.5 кг) были увлажнены до 50–60% полной влагоемкости и проинкубированы при 22°C в течение 7 сут в полиэтиленовых пакетах с воздухообменом. Навески почвы для определения субстрат-индуцированного дыхания и прямого микроскопирования были отобраны из предынкубированных образцов. Измерения почвенной микробной биомассы двумя методами были выполнены одновременно.

Субстрат-индуцированное дыхание (СИД) почвы оценивали по скорости начального максимального дыхания микроорганизмов после обогащения почвы дополнительным источником углерода и энергии (глюкоза). Навеску почвы (1 г) помещали во флакон (объем 15 мл), добавляли раствор глюкозы (0.1 мл; результирующая концентрация 10 мг/г поч-

вы), герметично закрывали и фиксировали время. Обогащенный образец почвы инкубировали (3–5 ч при 22°C), затем отбирали пробу воздуха из флакона и анализировали ее с помощью газового хроматографа. Время отбора газовой пробы также фиксировали. Предварительные эксперименты показали, что внесение 10 мг глюкозы на 1 г исследуемых почв обеспечивало наибольшую скорость СИД за 4 ч их инкубации. Скорость СИД выражали в мкг CO₂-C г⁻¹ сухой почвы ч⁻¹. Определение СИД выполнено в 5 повторностях.

Микробную биомассу рассчитывали по формуле: $C_{\text{мик}}$ (мкг C г⁻¹ почвы) = (мкл CO₂ г⁻¹ сухой почвы ч⁻¹) 40.04 + 0.37 [11].

Прямое микроскопирование. Общее количество микроорганизмов в почве определяли с помощью метода люминесцентной микроскопии. Для приготовления почвенной суспензии 1 г почвы (3 повторности для каждого образца почвы) помещали в 100 мл воды и диспергировали ультразвуком (22 кГц, 0.44 А, 2 мин). Затем из суспензии отбирали аликвоты 0.01 и 0.02 мл для подсчета клеток прокариот и эукариот соответственно, которые помещали на предметные стекла (4 повторности для каждой группы микроорганизмов) и распределяли петлей на площади 4 см². Приготовленные таким образом препараты подсушивали на воздухе до полного высыхания, а затем фиксировали (2–3 с) на пламени горелки. Для подсчета бактерий и мицелия актиномицетов препараты окрашивали раствором акридина оранжевого (1 : 10000, 2–3 мин), для спор и мицелия грибов – калькофлуором белым (15 мин).

Количество клеток (мицелия) в 1 г почвы определяли по формуле: $N = S_1an/VS_2C$, где N – число клеток (длина мицелия, мкм) в 1 г почвы; S_1 – площадь препарата, мкм²; a – количество клеток (длина мицелия, мкм) в одном поле зрения (усреднение по 4 препаратам); n – разведение почвенной суспензии, мл; V – объем капли, наносимой на стекло, мл; S_2 – площадь поля зрения микроскопа, мкм²; C – навеска сухой почвы, г.

Для подсчета бактерий просматривали 20 полей зрения препарата, а для мицелия актиномицетов и грибов, а также спор грибов – 50. Численность бактерий, спор грибов и длины мицелия грибов/актиномицетов в 1 г почвы были документированы как средние значения результатов просмотра 12 предметных стекол.

Сухую биомассу бактериальной клетки объемом 0.1 мкм³ принимали равной 2×10^{-14} г, 1 м мицелия актиномицетов диаметром 0.5 мкм – 3.9×10^{-8} г. Диаметр грибных гиф и спор в исследуемых почвах определяли с помощью микролинейки окуляра микроскопа. Биомассу грибного мицелия рассчитывали с учетом биообъема цилиндра (L – длина, r – радиус), а грибной споры – шара (A – число спор, r – радиус) по формулам: $0.628L r^2 \times 10^{-6}$ г и $0.0836Ar^3 \times 10^{-11}$ г соответственно. Удельную массу (плотность) гриб-

ного мицелия и спор принимали равной 1 г/см³. Для расчета микробной биомассы содержание воды и углерода в клетках почвенных микроорганизмов принимали равными 80 и 50% [12, 13], а также 85 и 45% соответственно [8].

Статистическая обработка данных была выполнена в программе Statistica 6.0 (“StatSoft Inc.”, Tulsa, США). Для средних значений было рассчитано стандартное отклонение (с.о.). Для суммарных значений микробной биомассы (прямое микроскопирование) с.о. рассчитывали как ошибку функций случайных величин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследуемые почвы имели широкий диапазон содержания органического вещества (0.4–22.6%), ила (8.4–26.8%) и значений pH (4.3–8.4) (табл. 1). Наибольшее количество органического вещества было выявлено в почве плакорной тундры, а наименьшее – в темно-каштановой почве юной залежи. Наибольшее значение микробной биомассы, определенной СИД методом (МБ_{СИД}), обнаружено в тундровой почве понижения между плакорами (8134 мкг C г⁻¹ почвы), а наименьшее (163 мкг C г⁻¹ почвы) – в темно-каштановой почве юной залежи (рис. 1). В понижении между плакорами величина МБ_{СИД} была почти в 6 раз больше, чем на возвышенном элементе рельефа – плакоре. В естественных экосистемах серой лесной (лес), темно-каштановой (лесополоса) и каштановой (залежь) почв МБ_{СИД} (0–5 см) была в 3.9, 3.0 и 3.6 раза больше, чем в пахотных аналогах соответственно. Нижний слой исследованных почв (5–10 см) характеризовался значительно меньшими величинами МБ_{СИД} по сравнению с верхним. В естественных ценозах серой лесной почвы МБ_{СИД} верхнего слоя была в 1.4 (луг) и 2.4 (лес) раза больше, чем соответствующего нижнего, темно-каштановой – в 1.7 (лесополоса) и 3.5 (юная залежь), а каштановой почвы – в 2.4 (лесополоса) и 2.8 (залежь) раза. В верхнем слое пахотных почв МБ_{СИД} была лишь в 1.6, 1.0 и 1.6 раза больше, чем в нижнем – серой лесной, темно-каштановой и каштановой соответственно.

Основные характеристики компонентов микробной биомассы почв, определяемые прямым микроскопированием, представлены в табл. 2. Длина грибного мицелия в почвах естественных экосистем составляла от 260 (юная залежь) до 4830 м/г почвы (понижение между плакорами) в слое 0–5 см. В тундровой почве весомая доля грибного мицелия принадлежала базидиомицетам (51 и 24% от общей длины мицелия в понижении между плакорами и плакоре соответственно), которые связаны с микоризой растений. Диаметр гиф базидиомицетов в исследуемых почвах составлял 5.1–5.3 мкм, а беспряжковых грибов – менее 5 мкм (3.75–4.15 мкм). Содержание грибных спор изменялось в пределах 5–25 млн/г, причем их диаметр был более 5 мкм

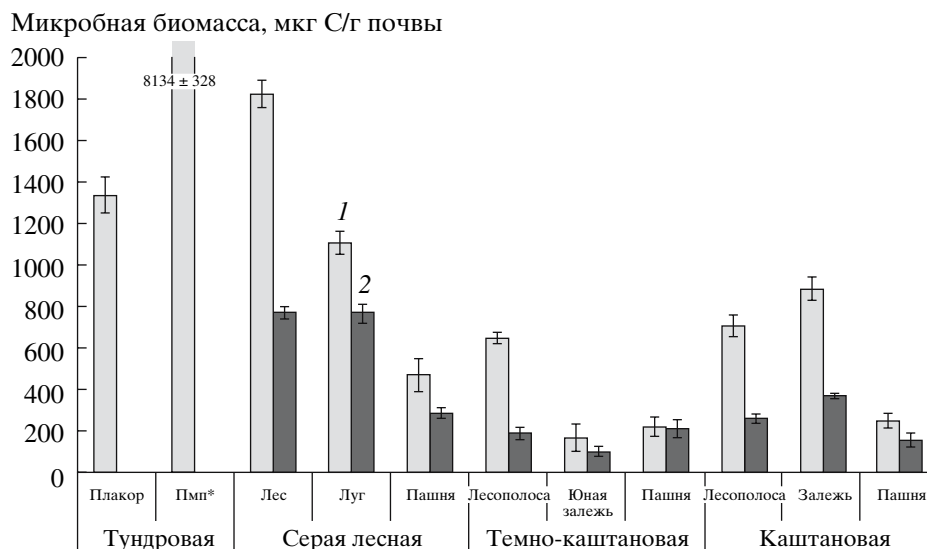


Рис. 1. Микробная биомасса тундровой, серой лесной, темно-каштановой и каштановой почв разных экосистем, измеренная методом субстрат индуцированного дыхания (* пмп, понижение между плакорами): 1 – 0–5 см, 2 – 5–10 см.

(5.35–6.50 мкм). Прокариотные микроорганизмы составляли 1.4–13.9 млрд./г и 131–412 м/г почвы для бактерий и актиномицетов соответственно. Почвы естественных экосистем содержали больше грибного мицелия, чем соответствующие пахотные.

В табл. 3 приведены значения сухой микробной биомассы ($МБ_M$) с учетом 80%-го содержания воды в клетках. Наибольшая величина $МБ_M$ (сухое вещество) отмечена в тундровой (15027 мкг/г), а наименьшая (697 мкг/г) – темно-каштановой почвах. Биомасса грибных спор составляла от 3.2 до 26.5% от $МБ_M$, причем ее наибольшая доля (20–26% $МБ_M$) была отмечена в темно-каштановой почве юной залежи и пашни. В пахотных почвах биомасса грибных спор составляла большую долю от общей (10–26% $МБ_M$) по сравнению с почвами естественных ценозов (3.2–12.1% $МБ_M$). Весомая доля в $МБ_M$ принадлежала мицелию грибов (73–96% и 69–94% в слоях 0–5 и 5–10 см соответственно). В пахотных серой лесной, темно-каштановой и каштановой почвах (0–5 см) биомасса грибного мицелия была в 7.5, 4.0 и 2.6 раза меньше, чем в лесу и лесополосах соответственно.

Микробная биомасса по данным прямой микроскопии была рассчитана на основе разного содержания воды (80 и 85%) и углерода (45 и 50%) в клетках (табл. 3). При меньшем содержании в клетках воды (85%) и большем – углерода (45%) были получены меньшие величины микробной биомассы (примерно на 30% по сравнению с 80 и 50% содержанием воды и углерода соответственно). Расчет содержания углерода $МБ_M$ был выполнен также и без учета вклада грибных спор. Сравнение величин углерода микробной биомассы, полученной методами СИД ($C_{мик}-МБ_{СИД}$) и прямой микроскопии ($C_{мик}-МБ_M$), приведено в табл. 4. Отношение $C_{мик}-$

$МБ_{СИД}/C_{мик}-МБ_M$ в исследуемых почвах составило 36–108% и 14–57% в слоях 0–5 и 5–10 см соответственно (80% H_2O и 50% C). Расчет микробной биомассы на основе большего содержания воды (85%) и меньшего – углерода (45%) приводил к возрастанию отношений $C_{мик}-МБ_{СИД}/C_{мик}-МБ_M$, которые составили 53–160% и 21–85% для 0–5 и 5–10 см соответственно. Величины $МБ_{СИД}$ и $МБ_M$ были более близкими в варианте расчета 85% H_2O и 45% C в клетках (в среднем $МБ_{СИД}/МБ_M = 88%$, для 0–5 см).

Следует отметить, что микробная биомасса по методу СИД исключает, с очевидностью, вклад грибных спор. Биомасса спор в исследуемых почвах превышала таковую прокариотных микроорганизмов (табл. 3). Была рассчитана величина $C_{мик}-МБ_M$ без грибных спор (табл. 4). Доля $C_{мик}-МБ_{СИД}$ от $C_{мик}-МБ_M$ (без спор) существенно возрастала и составила 39–112% и 15–72% для 0–5 и 5–10 см соответственно ($C_{мик}$ из расчета 80% воды и 50% C). Расчет $C_{мик}-МБ_M$ с большим содержанием воды и меньшим – углерода приводил к возрастанию отношения $МБ_{СИД}/МБ_M$, которое составило 58–166% и 23–106% в слоях 0–5 и 5–10 см соответственно. В среднем, величина углерода биомассы, измеренная СИД методом, составила 88 и 58% от таковой по прямой микроскопии (85% H_2O , 45% C , без спор).

Было рассчитано также отношение содержания углерода микробной биомассы, измеренной двумя методами, к общему органическому углероду почвы. Наиболее высокое содержание микробного углерода (СИД метод) в $C_{орг}$ выявлено в серой лесной почве: 4.8–7.5% для 0–5 см (табл. 4). Наименьшая доля $C_{мик}$ в $C_{орг}$ (1%) была в тундровой почве плакора. Показано, что микробный углерод в пахотных почвах составлял меньшую долю от общего органического по сравнению с естественными аналогами. В

Таблица 2. Длина мицелия грибов и актиномицетов, численность бактерий и спор грибов, средний диаметр гиф и спор грибов в почвах

Почва*	Экосистема (элемент рельефа*)	Слой (см)	Длина мицелия грибов, актиномицетов и численность бактерий, спор грибов (среднее в 1 г почвы \pm С.о.**)					
			Мицелий грибов		Споры грибов		Бактерии (млрд./г)	Актиномицеты (м/г)
			Длина (м/г)	Диаметр (мкм)	млн./г	Диаметр (мкм)		
1	Пмп	0–5	2368 \pm 188	3.40	16.8 \pm 1.8	6.50	9.3 \pm 1.3	184 \pm 26
			2462 \pm 240 (бм***)	5.10				
	Плакор (пл)	0–5	1777 \pm 123	3.80	19.0 \pm 1.2	6.0	13.9 \pm 0.69	412 \pm 45
			573 \pm 47 (бм***)	5.30				
2	Лес (лс)	0–5	4228 \pm 670	3.70	25.2 \pm 3.4	5.95	7.85 \pm 0.43	248 \pm 19
		5–10	4330 \pm 460		22.5 \pm 2.7		4.25 \pm 0.45	194 \pm 25
	Луг (лг)	0–5	1318 \pm 121	4.10	6.48 \pm 0.96	5.85	7.50 \pm 0.34	351 \pm 30
		5–10	1189 \pm 93		5.28 \pm 0.96		3.60 \pm 0.41	168 \pm 33
	Пашня (пш)	0–5	537 \pm 85	3.90	8.2 \pm 0.8	5.70	3.45 \pm 0.18	236 \pm 50
		5–10	670 \pm 65		9.7 \pm 1.4		4.60 \pm 0.33	291 \pm 32
3	Лесополо-са (лп)	0–5	1199 \pm 168	4.05	15.0 \pm 1.8	5.35	2.60 \pm 0.26	212 \pm 25
		5–10	558 \pm 162		10.8 \pm 1.2		2.00 \pm 0.30	164 \pm 27
	Юная залежь (юзж)	0–5	260 \pm 32	4.05	11.6 \pm 1.0	5.55	1.40 \pm 0.45	304 \pm 27
		5–10	189 \pm 23		9.1 \pm 1.6		1.70 \pm 0.14	347 \pm 37
	Пашня (пш)	0–5	316 \pm 10	3.80	11.9 \pm 1.0	5.40	1.80 \pm 0.16	191 \pm 23
		5–10	237 \pm 65		12.6 \pm 1.6		1.50 \pm 0.19	170 \pm 26
4	Лесополо-са (лп)	0–5	1191 \pm 119	4.15	13.0 \pm 1.3	6.0	4.00 \pm 0.30	247 \pm 20
		5–10	1213 \pm 127		10.8 \pm 1.6		2.60 \pm 0.10	197 \pm 18
	Залежь (зж)	0–5	603 \pm 69	4.15	9.4 \pm 0.9	5.45	2.10 \pm 0.10	239 \pm 18
		5–10	399 \pm 60		9.2 \pm 0.7		2.10 \pm 0.20	131 \pm 18
	Пашня (пш)	0–5	497 \pm 49	3.75	8.3 \pm 0.9	5.65	2.70 \pm 0.20	197 \pm 18
		5–10	290 \pm 79		67.1 \pm 0.7		2.00 \pm 0.10	160 \pm 22

* Обозначения см. в табл. 1.

** С.о. – стандартное отклонение.

*** Бм – базидиомицеты.

верхнем слое почв содержание $C_{\text{мик}}\text{-МБ}_{\text{СИД}}$ было, в основном, в 1.3–2.6 раза больше, чем в нижнем.

Доля микробного углерода в общем органическом по результатам прямого микроскопирования была, в целом, больше, чем таковая по методу СИД (табл. 4). Величина $C_{\text{мик}}\text{-МБ}_{\text{М}}/C_{\text{орг}}$ в изученных почвах (0–5 см) составила 1.9–13.7% с учетом спор и немногим меньше (1.7–12.9%) – без спор. В слое 5–10 см отношение $C_{\text{мик}}\text{-МБ}_{\text{М}}/C_{\text{орг}}$ было, в среднем, выше на 2.0–2.2%, чем для 0–5 см. В пахотных почвах этот показатель был в 2.7, 2.8 и 1.7 раза меньше, чем в естественных аналогах под древесной растительностью серой лесной, темно-каштановой и каштановой почв (0–5 см) соответственно.

На рис. 2 показана регрессионная зависимость между значениями МБ по методу СИД и прямого микроскопирования. Коэффициент детерминации

между рядами этих значений наиболее высок для верхнего слоя почвы ($R^2 = 0.88$) по сравнению с нижним ($R^2 = 0.67$). Коэффициенты корреляции (r) между микробной биомассой и физико-химическими свойствами почв ($C_{\text{орг}}$, рН, содержание ила) показаны в табл. 5. Наиболее тесная корреляционная связь была обнаружена между содержанием $\text{МБ}_{\text{СИД}}$ и $C_{\text{орг}}$ ($r = 0.90$ и 0.74 для 0–5 и 5–10 см соответственно), а также между $\text{МБ}_{\text{СИД}}$ и $\text{МБ}_{\text{М}}$ /без спор ($r = 0.90$ для 0–5 см), однако в нижнем слое эта связь была менее тесной ($r = 0.78$). Корреляция между $\text{МБ}_{\text{М}}$ (со спорами и без) и $C_{\text{орг}}$ была также тесной, однако значение r было меньше, чем для $\text{МБ}_{\text{СИД}}$ и $C_{\text{орг}}$. Была установлена также корреляционная зависимость между $\text{МБ}_{\text{СИД}}$, $\text{МБ}_{\text{М}}$ и содержанием илестых частиц ($r = 0.70$) только для верхнего слоя исследованных

Таблица 3. Микробная биомасса (МБ) групп микроорганизмов и содержание углерода МБ при разных значениях содержания воды и углерода в клетках (прямое микроскопирование)

Почва*	Эко-система*	Слой (см)	Микробная биомасса сухая (80% H ₂ O), мкг/г почвы (среднее ± С.о.*)					Углерод МБ, мкг С/г почвы			
			Мицелий грибов	Споры грибов	Бактерии	Актиномицеты	Сумма	80% H ₂ O, 50% С		85% H ₂ O, 45% С	
								Со спорами	Без спор	Со спорами	Без спор
1	Пмп	0–5	4298 ± 250	482 ± 50	186 ± 30	7 ± 1	15027 ± 966	7513	7272	5072	4909
			10054 ± 930								
	Пл	0–5	4029 ± 850	429 ± 60	278 ± 60	16 ± 2	7279 ± 1080	3639	3425	2457	2312
			2527 ± 620								
2	Лс	0–5	9087 ± 1200	555 ± 60	157 ± 8	10 ± 1	9809 ± 1202	4904	4627	3310	3123
			9307 ± 1160	495 ± 74	85 ± 9	8 ± 1	9894 ± 1162	4947	4700	3339	3172
	Лг	0–5	3478 ± 300	136 ± 20	150 ± 7	14 ± 11	3778 ± 302	1889	1821	1275	1229
			3138 ± 260	110 ± 18	72 ± 8	7 ± 1	3327 ± 262	1663	1608	1123	1086
	Пш	0–5	1282 ± 230	159 ± 15	69 ± 4	9 ± 2	1519 ± 212	760	680	513	459
			1600 ± 210	188 ± 29	92 ± 6	11 ± 1	1891 ± 232	946	852	638	575
3	Лп	0–5	3088 ± 470	240 ± 30	52 ± 5	8 ± 1	3388 ± 472	1694	1574	1143	1062
			1437 ± 400	173 ± 30	40 ± 6	6 ± 1	1656 ± 402	828	742	559	501
	Юзж	0–5	670 ± 80	207 ± 15	28 ± 9	12 ± 1	917 ± 82	458	355	309	239
			487 ± 60	163 ± 3	34 ± 3	14 ± 1	697 ± 60	348	267	235	180
	Пш	0–5	716 ± 200	196 ± 16	36 ± 3	7 ± 1	956 ± 202	478	380	323	256
			537 ± 150	207 ± 26	30 ± 4	7 ± 1	781 ± 152	391	287	264	194
4	Лп	0–5	3220 ± 330	293 ± 38	80 ± 6	10 ± 1	3603 ± 332	1802	1655	1216	1117
			3280 ± 320	244 ± 40	52 ± 2	8 ± 1	3583 ± 322	1792	1670	1209	1127
	Зж	0–5	1630 ± 160	159 ± 15	42 ± 2	9 ± 1	1840 ± 132	920	841	621	567
			1079 ± 130	156 ± 12	42 ± 4	5 ± 1	1281 ± 162	641	563	433	380
	Пш	0–5	1097 ± 120	156 ± 16	54 ± 4	8 ± 1	1315 ± 122	658	579	444	391
			640 ± 210	134 ± 18	40 ± 2	6 ± 1	820 ± 212	410	343	277	232

* См. обозначения в табл. 1 и 2.

почв. Значения рН имели слабую отрицательную корреляцию с величинами микробной биомассы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Прямое микроскопирование – уникальный метод для определения общего пула микроорганизмов в почве, позволяющий к тому же, четко дифференцировать прокариоты и эукариоты, а также их компоненты (мицелий, споры). Субстрат-индуцированное дыхание регистрирует отклик микроорганизмов после обогащения почвы глюкозой. Скорость СИД, умноженная на экспериментально установленную величину (40.04), преобразуется в общую микробную биомассу, выраженную в единицах микробного углерода [11].

В изученных почвах величины МБ_{СИД} были, в целом, меньше, чем таковые по прямому микроскопированию, причем наименьшие различия между ними были с учетом содержания 85% воды и 45% углеро-

да в клетках (табл. 4). Доля МБ_{СИД} от МБ_М составила, в среднем, почти 90 и 60% в слоях 0–5 и 5–10 см соответственно. Иными словами, в верхнем слое контрастных по физико-химическим свойствам почв величины МБ, измеренные методами прямого микроскопирования и СИД, были более близкими, чем в нижнем. Одна из причин такого факта может быть связана с различным метаболическим состоянием грибов в исследуемых слоях (субстратах) почвы. Показано, например, что в лесной почве, содержащей 313 ± 140 м грибного мицелия/г почвы, ингибирование грибного дыхания циклогексимином составляло только 12% от общего СИД [14]. Кроме того, обнаружена высокая корреляция между селективным ингибированием СИД циклогексимином и содержанием активной грибной биомассы, выявляемой красителем флуоресцеин диацетатом [8]. Показано также, что в почве прерий около 60% грибной биомассы было с пустыми гифами [15].

Таблица 4. Соотношение углерода микробной биомассы ($C_{\text{мик}}$), определенной методом субстрат-индуцированного дыхания ($\text{МБ}_{\text{СИД}}$) и микрокопированием ($\text{МБ}_{\text{М}}$), содержание микробного углерода ($C_{\text{мик}}$, в % от $C_{\text{орг}}$) в исследованных почвах

Почва*	Эко-система*	Отношение, % (расчет***)				$C_{\text{мик}}/C_{\text{орг}}$, %			
		$C_{\text{мик}}\text{-МБ}_{\text{СИД}} / C_{\text{мик}}\text{-МБ}_{\text{М}}$, со спорами		$C_{\text{мик}}\text{-МБ}_{\text{СИД}} / C_{\text{мик}}\text{-МБ}_{\text{М}}$, без спор		СИД		Микрокопирование (85% H_2O , 45% С) (со спорами/без спор)	
		0–5 см	5–10 см	0–5 см	5–10 см	0–5 см	5–10 см	0–5 см	5–10 см
1	Пмп	108 (160)	Н.о.**	112 (166)	Н.о.	3.6	Н.о.	2.2/2.2	Н.о.
	Пл	37 (54)	Н.о.	39 (58)	Н.о.	1.0	Н.о.	1.9/1.7	Н.о.
2	Лс	37 (55)	16 (23)	39 (58)	16 (24)	7.5	5.9	13.7/12.9	25.5/24.2
	Лг	58 (87)	46 (68)	61 (90)	47 (70)	6.3	4.7	7.2/7.0	6.9/6.7
	Пш	61 (91)	30 (44)	68 (101)	33 (49)	4.8	3.1	5.3/4.8	6.9/6.2
3	Лп	38 (56)	22 (33)	41 (61)	25 (37)	4.2	2.5	7.4/6.9	7.7/6.9
	Юзж	36 (53)	27 (40)	46 (68)	36 (53)	3.3	2.6	6.3/4.9	6.5/5.0
4	Пш	45 (67)	53 (78)	57 (84)	72 (106)	2.1	2.1	3.1/2.5	2.7/2.0
	Лп	39 (58)	14 (21)	43 (63)	15 (23)	4.5	1.7	7.7/7.1	8.1/7.6
	Зж	96 (142)	57 (85)	105 (155)	65 (97)	4.4	3.3	3.1/2.9	3.9/3.5
Среднее	Пш	38(56)	37 (55)	43 (63)	44 (66)	2.6	1.7	4.6/4.1	3.0/2.5
		54 (80)	34 (50)	60 (88)	39 (58)	4.0	3.1	5.7/5.2	7.9/7.2

* См. табл. 1.

** Не определяли.

*** При расчете углерода сухой биомассы использовали: 80% H_2O , 50% С (85% H_2O , 45% С).

Ряд исследователей указывал, что метод прямой микроскопии имеет тенденцию переоценивать, прежде всего, содержание грибов в почве. Значительную ошибку при подсчете клеток (до 100%) может вносить и субъективность наблюдателя [8, 16], а

также выбор красителя. Калькофлуор, например, окрашивает грибной мицелий независимо от его метаболического состояния [15]. Имеются сведения, что только около половины общей микробной биомассы в почве находится в активном состоянии [7, 17]. Кроме того, показано, что величина МБ, измеренная прямой микроскопией (коричневые гифы грибов, не окрашенные анилином голубым, были учтены), была, примерно, в 2 раза больше, чем таковая – фумигационно-инкубационным методом [10].

Расчет $\text{МБ}_{\text{М}}$ в изученных нами почвах выполнен с учетом разного содержания воды (80 и 85% H_2O в клетках – расчет веса сухой биомассы) и углерода (45 и 50% от веса сухой биомассы) в клетках микроорганизмов. В многочисленных работах отечественных исследователей расчет микробной биомассы почв (прямой учет под люминесцентным микроскопом) выполнен на основе содержания 80% воды и 50% углерода [12]. В тундровой почве (понижение между плакорами) величина $\text{МБ}_{\text{СИД}}$ была даже больше, чем таковая по прямому микрокопированию (табл. 4). Это можно объяснить высоким содержанием органического вещества и грибного мицелия в этой почве по сравнению с другими, что, по-видимому, и привело к недооценке МБ прямым микрокопированием. Ранее было показано, что для точного подсчета грибного мицелия в богатых органическим веществом [8] или ризосферной [18] почвах, следует использовать большие разведе-

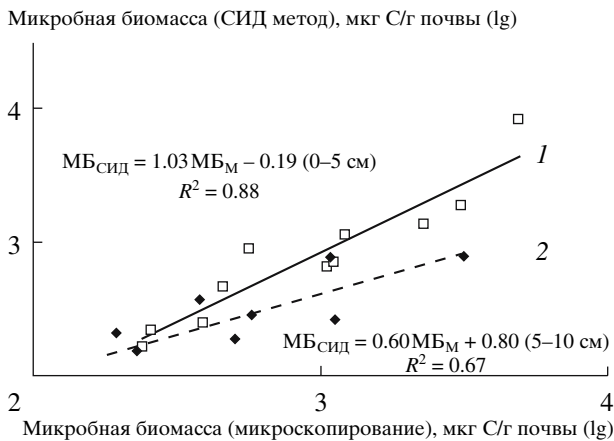


Рис. 2. Линейная регрессия между величинами микробной биомассы (МБ), полученными методами прямого микрокопирования ($\text{МБ}_{\text{М}}$ без спор, 85% воды и 45% С) и субстрат-индуцированного дыхания ($\text{МБ}_{\text{СИД}}$), в тундровой, серой лесной, темно-каштановой и каштановой почвах естественных и пахотных экосистем: 1 – 0–5 см, 2 – 5–10 см.

Таблица 5. Коэффициент корреляции (r) между величинами микробной биомассы (МБ), определенной методами СИД (МБ_{СИД}) и микроскопированием (МБ_М, 85% воды и 45% С), и физико-химическими свойствами почв (коэффициенты, выделенные курсивом, значимы при $p < 0.05$; $n = 11$ и 9 для слоев 0–5 и 5–10 см соответственно)

	<i>C_{орг}</i>	<i>pH</i>	<i>ил</i>	<i>МБ_{СИД}</i>	<i>МБ_М</i>	<i>МБ_М*</i>
0–5 см						
<i>МБ_{СИД}</i>	<i>0.90</i>	<i>–0.27</i>	<i>0.70</i>	–	<i>0.89</i>	<i>0.90</i>
<i>МБ_М</i>	<i>0.85</i>	<i>–0.41</i>	<i>0.70</i>	<i>0.89</i>	–	<i>1.00</i>
<i>МБ_М*</i>	<i>0.85</i>	<i>–0.40</i>	<i>0.70</i>	<i>0.90</i>	<i>1.00</i>	–
5–10 см						
<i>МБ_{СИД}</i>	<i>0.74</i>	<i>–0.30</i>	<i>–0.16</i>	–	<i>0.77</i>	<i>0.78</i>
<i>МБ_М</i>	<i>0.53</i>	<i>–0.33</i>	<i>–0.13</i>	<i>0.77</i>	–	<i>1.00</i>
<i>МБ_М*</i>	<i>0.54</i>	<i>–0.32</i>	<i>–0.13</i>	<i>0.78</i>	<i>1.00</i>	–

* Без учета биомассы спор грибов.

ния почвенной суспензии. Кроме того, с другой стороны, температура инкубации и измерения СИД для тундровой почвы была повышенной по сравнению с природными условиями, что могло также способствовать увеличению скорости СИД и, соответственно, величине МБ_{СИД}. Более того, базальное дыхание исследованных почв, измеренное в предынкубированных образцах (7 сут, 22°C), было наибольшим для тундровой почвы (данные не приведены).

Величины МБ_{СИД} более четко диагностировали исследуемые слои почвы, верхний 5 см слой содержал больше микробной биомассы, чем соответствующий нижний. Это согласуется и с наблюдениями других авторов [3, 19]. Следует отметить также, что прямое микроскопирование выявило не столь четкое различие в величинах микробной биомассы исследуемых слоев.

В изученных почвах доля углерода микробной биомассы в общем органическом углероде составила, в среднем, 4 и 3% (СИД метод) для 0–5 и 5–10 см соответственно, а по прямому микроскопированию (85% H₂O, 45% С, без спор) примерно в 2 раза больше (табл. 4). Это может быть обусловлено тем, что калькофлуор окрашивает как метаболически активные, так и неактивные гифы грибов [15].

Для исследованного ряда почв найдена тесная корреляционная связь между величинами микробной биомассы, определяемой методами СИД и прямой микроскопии. Другими исследователями также отмечена достоверная корреляция между величинами МБ, определенными фумигационно-инкубационным [1] или СИД [4–6] методами и прямой микроскопией. Однако есть информация и об отсутствии такой корреляции [7, 20].

Таким образом, величины микробной биомассы разных почв, измеренные прямой люминес-

центной микроскопией и СИД методами, были, в целом, близки для верхнего слоя (0–5 см) исследованных почв. В нижнем слое (5–10 см) почв различия между измеряемыми величинами были обусловлены, по-видимому, разной активностью, прежде всего грибного мицелия.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 07-04-00628 и 07-04-00631; научной школы № 3096.2006.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jenkinson D.S., Powlson D.S., Wedderburn R.W.* The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. III. The relationship between biovolume measured by optical microscopy, and the flush of decomposition caused by fumigation // *Soil Biol. Biochem.* 1976. V. 8. № 2. P. 189–202.
2. *Brookes P.C., Heijnen C.E., McGrath S.P., Vance E.D.* Soil microbial biomass estimates in soils contaminated with metals // *Soil Biol. Biochem.* 1986. V. 18. № 4. P. 383–388.
3. *Beck T., Joergensen R.G., Kandeler E., Makeschin F., Nuss E., Oberholzer H.R., Scheu S.* An inter-laboratory comparison of ten different ways of measuring soil microbial biomass // *Soil Biol. Biochem.* 1997. V. 29. № 7. P. 1023–1032.
4. *Lin Q., Brookes P.C.* Comparison of substrate-induced respiration, selective inhibition and biovolume measurements of microbial biomass and its community structure in unamended, regrass-amended, fumigated and pesticide-treated soils // *Soil Biol. Biochem.* 1999. V. 31. № 14. P. 1999–2014.
5. *West A.W., Sparling G.P.* Modification to substrate-induced respiration method to permit measurement of microbial biomass of different water contents // *J. Microbiol. Meth.* 1986. V. 5. P. 177–189.
6. *Neely C.L., Beare V.H., Hargrove W.L., Coleman D.C.* Relationship between fungal and bacterial substrate-induced respiration, biomass and plant residue decomposition // *Soil Biol. Biochem.* 1991. V. 23. № 10. P. 947–954.
7. *Ingham E.R., Horton K.A.* Bacterial, fungal and protozoan responses to chloroform fumigation in stored soil // *Soil Biol. Biochem.* 1987. V. 19. № 5. P. 545–550.
8. *Domsch K.H., Beck Th., Anderson J.P.E., Soderstrom B., Parkinson D., Trolldenier G.* A comparison of methods for soil microbial population and biomass studies // *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* 1979. № 142. P. 520–533.
9. *Kaiser E.A., Muller T., Joergensen R.G., Insam H., Heinemeyer O.* Evaluation of methods to estimate the soil microbial biomass and the relationship with soil texture and organic matter // *Soil Biol. Biochem.* 1992. V. 24. P. 675–683.
10. *Schnurer J., Clarholm M., Rosswall T.* Microbial biomass and activity in an agricultural soil with different organic carbon contents // *Soil Biol. Biochem.* 1985. V. 17. № 6. P. 611–618.
11. *Anderson J.P.E., Domsch K.H.* A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils // *Soil Biol. Biochem.* 1978. V. 10. № 3. P. 215–221.

12. Кожевин П.А. Микробные популяции в природе. М.: Изд-во МГУ. 1989. 175 с.
13. Полянская Л.М., Головченко А.В., Звягинцев Д.Г. Микробная биомасса в почвах // Доклады АН. 1995. Т. 344. № 6. С. 846–848.
14. Velvis H. Evaluation of the selective respiratory inhibition method for measuring the ratio of fungal: bacterial activity in acid agricultural soils // Biol. Fertil. Soils. 1997. V. 25. P. 354–360.
15. Stahl P.D., Parkin T.B. Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass // Soil Biol. Biochem. 1996. V. 28. P. 845–855.
16. Stahl P.D., Parkin T.B., Eash N.S. Sources of error in direct microscopic methods for estimation of fungal biomass in soil // Soil Biol. Biochem. 1995. V. 27. P. 1091–1097.
17. Ingham E.R., Klein D.A. Soil fungi: relationships between hyphal activity and staining with fluorescein diacetate // Soil Biol. Biochem. 1984. V. 16. P. 273–278.
18. Полянская Л.М., Оразова М.К., Бурканова О.А., Звягинцев Д.Г. Микронавески ризосферной почвы и лабораторные артефакты // Микробиология. 2000. Т. 69. № 4. С. 586–589.
19. Евдокимова Г.А., Мозгова Н.П. Микрофлора почв тундровой зоны Кольского полуострова // Почвоведение. 1995. № 12. С. 1487–1497.
20. Wardle D.A., Yeates G.W., Watson R.N., Nicholson K.S. Response of soil microbial biomass and plant litter decomposition to weed management strategies in maize and asparagus ecosystems // Soil Biol. Biochem. 1993. V. 25. P. 857–868.

Comparative Assessment of Soil Microbial Biomass Determined by the Methods of Direct Microscopy and Substrate-Induced Respiration

N. D. Anan'eva^{a,1}, L. M. Polyanskaya^b, E. A. Sus'yan^a, I. V. Vasenkina^b,
S. Wirt^c, and D. G. Zvyagintsev^b

^a Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 2, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

^b Moscow State University, Faculty of Soil Science, Vorobyevy Gory 1, 119992 Moscow

^c ZALF, Leibniz-Centre for Agricultural Landscape Research, Institute of Landscape Matter Dynamics,
Muncheberg, Germany

¹E-mail: ananyeva@rambler.ru

Abstract—The content of microbial biomass (MB) was determined in samples of gray forest, chestnut, and tundra soils with different physicochemical properties (0.4–22.7% C_{org}; 8.4–26.8% silt particles; pH 4.3–8.4) by the methods of substrate-induced respiration (MB_{SIR}) and direct microscopy (MB_M). The samples of two upper soil layers, 0–5 and 5–10 cm (without plant litter), from different ecosystems (forest, forest shelter belt, meadow, fallow, and arable land) and elements of relief of interfluvial tundra (block/upper land plateau, depression between blocks) have been analyzed. The content of microbial biomass in the 0–5-cm soil layer was 216–8134 and 348–7513 µg C/g soil as measured by the methods of substrate-induced respiration and direct microscopy, respectively. The MB_{SIR} and MB_M values closely correlated with each other: $r = 0.90$ and 0.74 for 0–5 and 5–10 cm, respectively. The average MB_{SIR}/MB_M ratio was 90 and 60% for 0–5 and 5–10 cm, respectively. The portion of microbial carbon in total organic soil carbon was, on average, 4 and 3% (SIR) and 5 and 7% (direct microscopy) for 0–5 and 5–10 cm, respectively. Possible reasons for the differences between MB_{SIR} and MB_M values in the soils under study are discussed.

Key words: soil, microbial biomass, direct microscopy, substrate-induced respiration.