

А. Л. Ефремов, профессор; М. И. Антоник, аспирант

ОЦЕНКА ПРЯМЫМИ МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ БИОМАССЫ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ДУБРАВАХ ГПУ НП «БЕЛОВЕЖСКАЯ ПУЩА»

The results of a rating of number and biomass of soil microorganisms in Belovezskaja puscha oak-woods are indexes of a biological potency, diagnostics of the microbiologic processes of organic matter transformation, that is intimately connected to productivity of forest ecosystems.

Беловежская пуца является одним из уникальнейших лесных массивов в Европе, который расположен на территории Гродненской и Брестской областей Беларуси (88 тыс. га), а также в Польше (58 тыс. га). Согласно геоботаническому районированию, Беловежская пуца находится на юго-западе Неманско-Предполесского округа подзоны грабово-дубово-темнохвойных лесов и составляет особый Беловежский геоботанический район. Территория Беловежского лесного массива приурочена к Прибугской моренной равнине, кристаллический фундамент которой понижается с севера на юг от 400 до 900 м от уровня моря и является северной окраиной Брестской впадины с абсолютной глубиной 1,5 км.

Основная часть пуцы лежит на высоте 160–180 м над уровнем моря. Пуца занимает восточный выступ бассейна Вислы и притоков Буга, с севера и северо-востока к ней примыкают бассейны Немана и Припяти, водораздел проходит в непосредственной близости от границ Беловежского массива [6, 7].

Леса на территории Беловежской пуцы занимают 75 тыс. га. Болота расположены на площади 3,4 тыс. га. Хвойные леса составляют 68%, среди лиственных насаждений (32%) чернышники – 15%, березняки – 9%, дубравы – 5% [4].

Широколиственные насаждения представлены дубовыми, ясеневыми и грабовыми формациями. Беловежский массив принадлежит подзоне грабово-дубово-темнохвойных лесов, где преобладает субформация елово-грабовых дубрав.

Территория пуцы лежит у южных пределов сплошного распространения ели, где ее фитоценотическая устойчивость достаточно высока лишь в оптимальных по увлажнению эдафотопках.

Особенностью дубовых лесов Беловежской пуцы является то, что в составе древостоя, кроме доминанты – дуба черешчатого, часто сопутствующим элементом выступает дуб скальный, достигающий восточных пределов своего распространения. Эти популяции представлены различными фенологическими группами, характеризуются изменчивостью морфологических признаков гибридных форм в результате интрогрессивной гибридизации [5].

Под дубовыми лесами наиболее ярко выражен процесс буроземообразования – от типич-

ного, свойственного почвам Центральной Европы, до переходного к подзолистоу или псевдоподзолистоу, где последний ближе к почвам под еловыми дубравами. Бурые лесные почвы чаще всего встречаются на двучленных породах с моренным суглинком на глубине 40–70 см и более, прикрытом супесью с линзами песка и гравия.

Бурые лесные почвы встречаются в Беларуси пятнами среди дерново-палево-подзолистых почв, занимая относительно повышенные хорошо дренированные участки, сложенные преимущественно рыхлыми почвообразующими породами богатого минералогического состава. Мощность этих отложений на менее 1 м, и далее они подстилаются моренными суглинками.

Процесс буроземообразования характерен для умеренно теплого климата при наличии промывного водного режима в условиях широколиственных и хвойно-широколиственных насаждений, где господствуют аэробные процессы.

При таком состоянии почвообразовательные процессы не приводят к обеднению почв минеральными элементами, что обусловлено биологическим круговоротом веществ [4].

В результате этого круговорота в верхней части почвенного профиля идет накопление коллоидально-глинистых фракций и основных окислов, происходит оглинение и выветривание алюмосиликатов и других минералов материнской породы с образованием вторичных глинистых минералов. Это почвы с прогрессирующим глинообразованием, где соответствующие условия создаются преимущественно в средней части профиля, так как здесь более постоянны тепловая и водный режим. Бурые почвы отличаются скоростью разложения органики, накоплением биогенных элементов и качественного гумуса с благоприятными растительными свойствами.

Дубравы в Беловежской пуце представляют собой сложные типы древостоев с заметно выраженным вторым ярусом из граба, клена, сосны, липы, ели, примесь которых обычна в первом ярусе.

Подлесок состоит из лещины, бересклета бородавчатого, европейского, волчьего лыка, рябины, при полной сомкнутости древесный ярус разрежен. Свыше половины дубрав (60%) занимает кисличная серия грабовых и елово-

грабовых дубовых лесов. Напочвенный покров состоит из кислицы, ясенника пахучего, желенчука желтого, сныти обыкновенной, ветреницы дубравной, перелески благородной, подлесника обыкновенного, европейского, чины весенней и других мезофитных растений.

В старовозрастных грабово-кисличных дубравах с сомкнутым вторым ярусом травяной покров заметно изрежен, запас фитомассы достигает 410 т/га абсолютно сухого вещества. Черничная серия субформации елово-грабовых дубрав занимает 32% площади дубовых лесов. Остальные типы дубрав (папоротниковая, снытевая, крапивная и др.) занимают 8% площади. В орляковых и черничных дубравах, кроме ели и граба, часто встречается примесь сосны, в крапивных и папоротниковых – ясеня и ольхи черной.

Оценка биомассы микроорганизмов определялась по численности бактериальных клеток и длине мицелия микроскопических грибов прямыми микроскопическими методами с применением микроскопа Axio imager A1 (лампы галогеновая HAL 100, ртутная HBO 103 W12), широко используемого в биологии и медицине (рис. 1).

Прямая микроскопия проводилась при увеличении $\times 40$ для учета микроскопических грибов с окраской препаратов диацетом флуоресцеина и при увеличении $\times 100$ для учета бактериальных клеток с окраской акридиновым оранжевым в пробах, отобранных по генетическим горизонтам в почвенных разрезах насаждений дуба черешчатого и дуба скального (дубравы грабово-кисличные, черничная, орляковая, снытевая) на глубину почвенного профиля.

Учет количества и биомассы почвенных микроорганизмов составляет важный элемент характеристики почвы, тесно связанный с проблемой оценки продуктивности микробных сообществ.

Все количественные методы, применяемые в почвенной микробиологии, относятся не к общему, а к относительному выборочному учету.

Микроскопический метод сводится к просматриванию препаратов почвенной суспензии, окрашенных флуорохромами в падающем свете.

Технология зависит не только от избранной методики, но и от способа предварительной подготовки образцов к анализам. Эффективна обработка образцов ультразвуком (3 мин, 0,4 А, 15 кГц), она сочетает десорбцию клеток почвенных частиц с их разрушением и дезагрегацию микроколоний.

Численность бактерий в почве чаще всего определяется методом люминисцентной микроскопии или на универсальных микроскопах с фазово-контрастными объективами и рефлекторными модулями флуоресцентных фильтров. Фазово-контрастные методы основываются

на согласованности позиций конденсора и рефлектора.

Почвенная суспензия (1 : 10) отстаивается в мерном цилиндре на 100 мл. После 2 мин отстаивания пипеткой отбирается 2 мл суспензии из средней фракции и переносится в колбу с 18 мл воды, после встряхивания суспензию наносят на обезжиренное предметное стекло (0,01 мл на 1 препарат), равномерно распределяя петлей на площади 4 см² (по три микропрепарата на стекле).

Фрагменты полей зрения препаратов почвенной суспензии сканировались LEICA DLMB с фиксацией фотокамеры на дисплее (рис. 2).

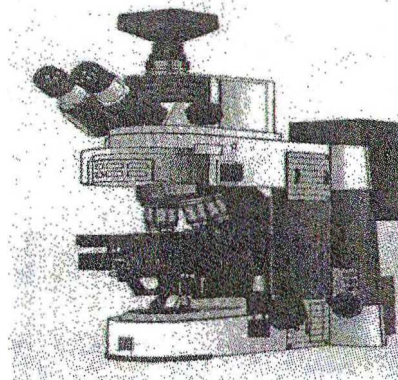


Рис. 1. Axio imager A1 Carl Zeiss

Предметные стекла высушивают при комнатной температуре и окрашивают водным раствором акридина оранжевого (1 : 10000, 2–5 мин). Численность бактерий учитывается на препаратах сеткой микрометра 12,5×12,5 мм, D = 26 мм.

Бактериальные клетки считают в 20 или 50 полях зрения. Количество бактерий, содержащихся в 1 г почвы M , определяется по формуле

$$M = \frac{4an}{R} 10^{10}, \quad (1)$$

где 4 – коэффициент диафрагмы по окуляру; a – среднее число клеток, мкм²; n – показатель разведения; R – площадь поля зрения, мкм². [3].

Прямую микроскопию гиф грибного мицелия проводят на препаратах, окрашенных диацетатом флуоресцеина, флуоресцентным осветителем HBO 100 и флуоресцентными фильтрами со свободной апертурой ≥ 22 мм. Фиксацию длины проводят сеткой-микрометром с точностью до ± 1 мкм, где длину грибного мицелия в метрах на 1 г почвы вычисляют по той же формуле, но в этом случае a – средняя длина гиф в поле зрения.

Бактериальную и грибную биомассу рассчитывают, исходя из удельного веса бакте-

риальной клетки, равного $1,08 \text{ г/см}^3$, и ее объема $0,1 \text{ мкм}^3$.

Учитывая, что содержание воды в бактериальной клетке составляет 80%, то биомасса одной бактериальной клетки в расчете на сухой вес, соответственно, составляет $0,2 \cdot 10^{13} \text{ г}$.

Расчет биомассы микроскопических грибов ведется, исходя из удельного веса мицелия — $1,05 \text{ г/см}^3$ и среднего диаметра гиф 5 нм , в соответствии с этим биомасса 1 м мицелия грибов составляет $3,9 \cdot 10^{-6} \text{ г}$ сухого вещества.

Запасы микробной биомассы в почвах рассчитываются в г/м^2 почвенной поверхности с учетом мощности генетических горизонтов, их плотности на глубину почвенного профиля и в процентном отношении с органической массой.

Запасы микроорганизмов M в почвах рассчитываются по формуле

$$M = abc, \quad (2)$$

где a — количество микроорганизмов в 1 г почвы; b — мощность генетического горизонта, см ; c — плотность почвы, г/см^3 .

Общее количество микроорганизмов в почве определяется их суммарной численностью по генетическим горизонтам почвенного профиля:

$$M_{\Sigma} = \Sigma M, \quad (3)$$

где M_{Σ} — суммарное количество микроорганизмов в почвенном профиле.

Прямые микроскопические методы принято считать наиболее удовлетворительными для общего количественного учета почвенных микроорганизмов. В число этих способов входит метод С. Н. Виноградского, люминисцентная микроскопия, иммунофлуоресцентные методы, электронная микроскопия, инфракрасная спектроскопия с использованием спектрзональных материалов, а также методы прямого микроскопического измерения длины гиф грибного мицелия на окрашенных флуорохромами предметных стеклах, мембранных фильтрах и агаровых пленках [3].

Несмотря на отдельные недостатки, присущие этим методам: неполную дифференциацию клеток от почвенных частиц, невозможность разграничения живых и мертвых микробных клеток, неполный учет адсорбированных клеток, трудности выделения микроорганизмов, покрытых окислами железа и марганца, — результаты прямых микроскопических методов отражают более точное и правильное представление о численности почвенных микроорганизмов, чем методы посевов или чашечные [3].

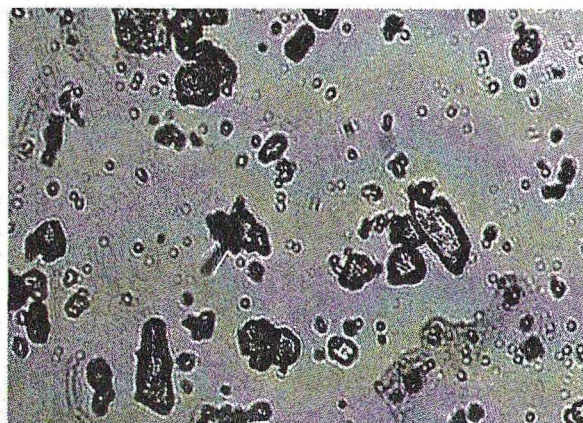
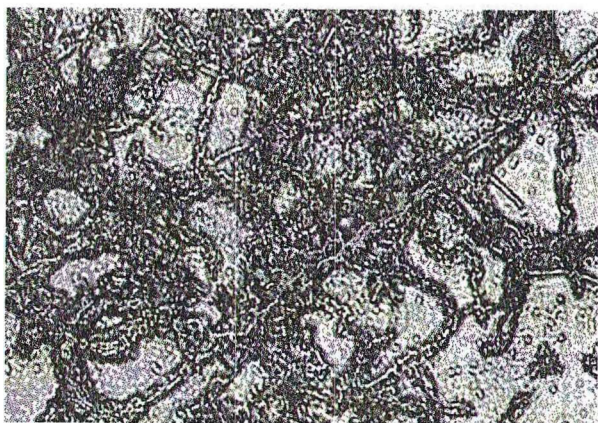
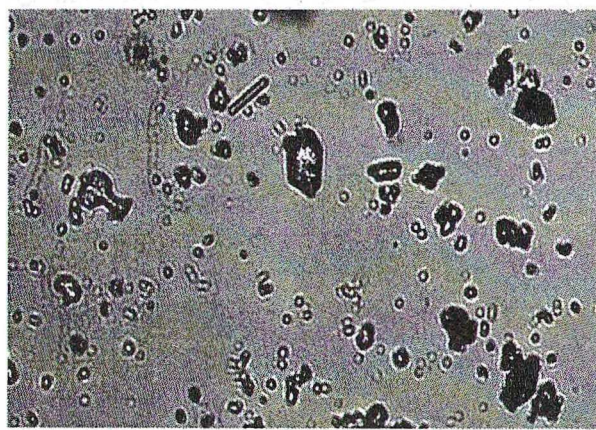
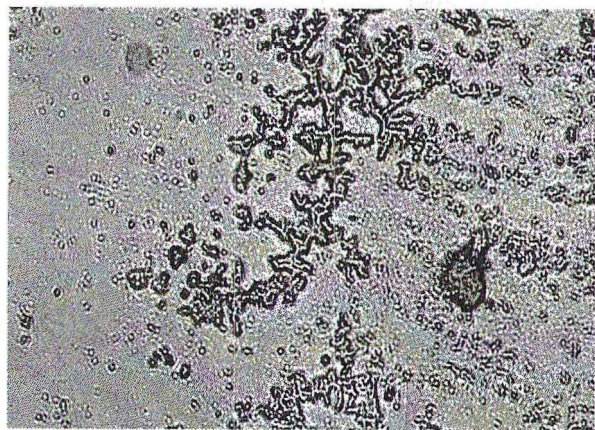


Рис. 2. Фрагменты полей зрения прямой микроскопии почвенной суспензии

Характерной особенностью прямых методов является микроскопирование препаратов почвенной суспензии, окрашенных флуорохромами: карболовым эритрозинном, акридиновым оранжевым, диацетатом флуоресцеина. Сущность метода состоит в том, что при окраске почвенной суспензии флуорохромами яркие зеленые клетки хорошо выделяются на темном и красном фоне почвенных частиц препарата, что позволяет учитывать адсорбированные клетки, не видимые в проходящем свете.

Численность бактериальных клеток в подстилках дубовых насаждений составляет 6–7 млрд. на 1 г подстилочного субстрата, в гумусовых горизонтах количество бактерий колеблется в пределах 3–5 млрд. клеток на 1 г почвы, а в иллювиально-оглеенных горизонтах их наличие снижается от 800 млн. клеток до 1,5 млрд. бактерий в 1 г почвы, что по бактериальной массе равняется в подстилках 0,120–0,140 мг/г воздушно-сухого подстилочного материала, в гумусовых горизонтах эти величины составляют 0,060–0,100 мг/г почвы, а со снижением по генетическому профилю биомасса бактерий уменьшается до 0,016–0,030 мг/г почвы (таблица).

Длина гиф микромицетов грибов варьируется в подстилках дубрав от 450 до 870 м/г под-

стилочного материала, в гумусовых горизонтах, длина мицелия достигает 410–680 м/г, в иллювиальных изредка обнаруживались фрагменты живого мицелия и обрывки мертвых мицелиальных чехлов до 10–40 м/г почвы.

Биомасса микобиоты в дерново-подзолистых и бурых лесных почвах составляла в подстилках 1,70–3,40 мг/г подстилочного фитосубстрата, в гумусовых горизонтах 1,60–2,65 мг/г почвы, а со снижением по генетическому профилю этих почв она заметно уменьшается до низких величин (0,017–0,030 мг/г почвы).

Преимущественно заселены микроскопическими грибами подстилки и гумусовые горизонты бурых лесных почв, черничных с дубом черешчатым и кисличных с дубом скальным насаждений (ТПП 31, 35). В дубравах, развитых на дерново-подзолистых, слабоподзоленных, связно-песчаных и супесчаных почвенных разновидностях, подстилаемых моренными легкими суглинками и водноледниковыми супесями, относительно снижается насыщенность подстилок и гумусовых горизонтов мицелиальными организмами, но заметно возрастает обогащенность бактериальной микрофлорой этих почв в черешчатых орляковой, кисличной и снытевой дубравах (ТПП 32, 33, 34).

Таблица

Численность и биомасса микроорганизмов в дубовых насаждениях Беловежской пуши

№ ТПП, дубравы	Горизонт, глубина, см	Длина мицелия, м/г	Количество бактерий, млрд. клеток на 1 г	Биомасса, мг/г почвы		
				грибов	бактерий	Сумма
31 – Кисличная <i>Quercus petraea</i>	A ₀ 0–2	710	5850,0	2,77	0,117	2,89
	A ₁ 2–10	550	3540,0	2,14	0,071	2,21
	A ₂ B _{1m} 10–40	236	2150,0	0,92	0,043	0,96
	B _{2m} 40–110	52	1690,0	0,20	0,034	0,23
32 – Орляковая <i>Quercus robur</i>	A ₀ 0–2	750	6200,0	2,92	0,124	3,04
	A ₁ 2–11	510	3730,0	1,99	0,075	2,06
	A ₂ 11–60	298	1350,0	1,16	0,027	1,19
	B ₁ 60–75	75	1176,0	0,29	0,023	0,31
33 – Кисличная <i>Quercus robur</i>	B _{2g} 75–120	30	968,0	0,12	0,019	0,14
	A ₀ 0–2	655	6540,0	2,55	0,131	2,68
	A ₁ 2–28	535	4625,0	2,09	0,093	2,18
	A ₂ 28–68	277	3420,0	1,08	0,068	1,15
34 – Снытевая <i>Quercus robur</i>	B _{1g} 68–120	40	1650,0	0,16	0,033	0,19
	A ₀ 0–2	450	6830,0	1,75	0,137	1,89
	A ₁ 2–22	408	4510,0	1,60	0,090	1,69
	A ₂ 22–55	295	3115,0	1,15	0,062	1,21
35 – Черничная <i>Quercus robur</i>	B ₁ 55–78	175	2800,0	0,68	0,056	0,74
	B _{2f} 78–115	10	12250	0,04	0,024	0,06
	A ₀ 0–5	870	6230,0	3,39	0,125	3,51
	A _{1t} 5–25	680	4800,0	2,65	0,096	2,75
35 – Черничная <i>Quercus robur</i>	A _{2g} 25–50	420	2320,0	1,64	0,046	1,69
	B _{mg} 50–80	50	1550,0	0,19	0,031	0,22
	G 80–150	15	900,0	0,06	0,018	0,08

Максимальная микробная биомасса в подстилках дубовых насаждений составляет 3,04–3,51 мг/г подстилочного субстрата, в минеральных горизонтах максимум 2,06–2,75 мг/г почвы и минимум в иллювиальных слоях и подстилающих грунтах от 0,10 до 0,25 мг/г почвы.

В иллювиальных супесчаных и рыхлопесчаных горизонтах почв беловежских дубрав биомасса микроскопических грибов и бактерий сравнительно низкая вследствие их слабой биогенности и обедненности органическим веществом, хотя встречаемость бактериальных популяций достигает известных пределов даже в оглеенных слоях и подстилающих породах.

Биомасса микроскопических грибов составляет основную часть микробного комплекса почв дубовых насаждений (92–97%), бактериальная часть всего лишь 3–8%. В сравнении с биогенной структурой почвы суммарная микробная биомасса составляет 0,6–0,8% от углеродорганической массы и 5–10% от азоторганического вещества, а также 0,02–0,05% от веса минеральной части почвы.

Показатели микробного комплекса почв по биомассе микробиоты подтверждают ферментативный потенциал микробного метаболизма, что позволяет судить о состоянии биогенных ресурсов почв старовозрастных дубрав Беловежской пуши [1, 2]. Эти данные отмечают диагностическую роль микроорганизмов по условиям природных местообитаний: органоминеральной структуре, гидрологическому режиму, характеру напочвенного покрова, типам насаждений, продуктивности и устойчивости лесных экосистем.

Поскольку мертвая микробная ткань составляет значительную часть органической массы и гумуса почв, то результаты оценки численности и биомассы микроорганизмов могут быть не только показателями их биологической активности, биогенности почвенного про-

филя, специфики метаболических процессов трансформации свежего органического вещества, поступающего с растительным опадом, но и рассматриваться как потенциальный источник энергетического материала для роста, функционирования микробиоты и энзиматической активности почв, что тесно связано с продуктивностью лесных биогеоценозов.

Литература

1. Ефремов А. Л. Биогенная характеристика почвенных микробоценозов высоковозрастных лесов // Докл. Академии наук БССР. – 1991. – Т. 35. – № 1. – С. 85–87.
2. Ефремов А. Л. Микрофлора почв лиственных и хвойных насаждений ГНП «Беловежская пуца» // Фауна и флора Прибужья на рубеже XXI столетия: Материалы Междунар. конф.: Брест – Каменюки, 2002. – С. 202–204.
3. Ефремов А. Л. Методические особенности определения биогенности почв фитоценозов: Учеб.-метод. пособие. – Могилев: МГУ им. А. А. Кулешова, 2002. – 72 с.
4. Корочкина Л. Н., Ковальков М. П., Толкач В. Н. Беловежская пуца. – Мн.: Ураджай, 1980. – 230 с.
5. Парфенов В. И. Изменчивость дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) и дуба скального (*Quercus petraea* Liebl.), произрастающих в Беловежской пуце, и возможность интрогрессивной гибридизации между ними // Беловежская пуца. Исследования. – 1969. – № 3. – С. 70–78.
6. Сохранение биологического разнообразия лесов Беловежской пуши / Ред. кол. А. И. Лучков, В. Н. Толкач, В. И. Парфенов и др. – Минск – Каменюки: Изд-во ГНП «Беловежская пуца», 1996. – 354 с.
7. Belovezhskaya Pushcha: Forest Biodiversity conservation / Edited by: A. Luchkov, V. Tolkach, S. Berwick, Ph. Brylski. – Мн.: Изд-во «Белорусский Дом печати», 1997. – 297 с.