

Галина ГРОССМАН, Хельда РИИС

## ЭФФЕКТ ОТ УДОБРЕНИЯ МИКРОЭКОСИСТЕМЫ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ МИНЕРАЛЬНЫМИ ЭЛЕМЕНТАМИ

Согласно существующему ныне положению, интенсивное использование минеральных удобрений снижает содержание органического вещества (ОВ) в почве сельскохозяйственных угодий (Гетманец, 1969 и др.). В работе Б. С. Носко (1987) показано, что ежегодные потери ОВ в неудобряемом на протяжении 13 лет пахотном слое составляют 0,7 т/га, а в случае внесения минеральных источников азота и фосфора — 2,1 т/га. Есть основание полагать, что это обусловлено изменением микробиологических процессов в почве под воздействием минеральных элементов питания. Проведенные исследования показывают значительное увеличение численности бактерий под воздействием азотных и фосфорных минеральных удобрений (Егорова, Стефурак, 1974 и др.).

Настоящая работа является исследованием структуры сообщества почвенных микроорганизмов в условиях лимитирования биогенными элементами, а также возникших при внесении минеральных форм азота и фосфора изменений.

### Объект и методы исследования

Объектом исследования служила аксеническая лабораторная микроэкосистема, полученная путем внесения 20 г нестерильной почвы в восемь 200 мл стеклянных колб, заполненных наполовину (100 мл) водой. Четыре микроэкосистемы служили контрольными (1 вариант). Сообщество в этих колбах развивалось в условиях лимитирования биогенными элементами. В остальные четыре колбы добавляли 490 мг/л  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и 58 мг/л  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (2 вариант). Расчет необходимых количеств азота и фосфора проводили по математической модели замкнутой экосистемы микроскопических организмов (Фиштейн и др., 1983) таким образом, чтобы содержание азота при малых количествах углерода (содержание углерода в почве устанавливали по агрохимическим данным) было несколько выше уровня лимитирования азотом, а содержание фосфора относительно углерода и азота — максимальным.

Колбы закрывали ватными пробками и устанавливали в люминисцентной камере с круглосуточным освещением при интенсивности света 2800 лк и температуре 28 °С.

Почва с микроорганизмами была отобрана из биометра, заложенного на опытном участке Института экспериментальной биологии АН ЭССР (Рахно, 1964), где она содержалась под паром без добавления удобрений. На момент составления микроэкосистемы в 100 г абсолютно сухой почвы содержалось 1,1 мг нитратов, 5,6 мг обменного аммония, 8,5 мг фиксированного аммония.  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  почвы была 6,4.

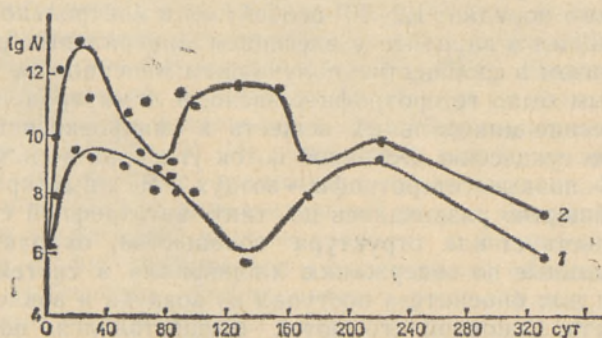
На протяжении опыта (340 сут) в развивающихся биоценозах следили за численностью гетеротрофных бактерий, грибов, простейших и водорослей методом посева на твердые и жидкие среды из серийных разведений и прямым подсчетом водорослей и простейших в камере Горяева с помощью светового микроскопа. По мере испарения жидкости в колбы добавляли дистиллированную воду. Для анализа структуры биоценоза пробы (2 мл) отбирали из одной и той же колбы. Остальные повторности были использованы для определения хлорофилла.

Для определения флористического состава водорослей в исходной почвенной пробе произвели посев в жидкую среду Данилова (Новогрудский, 1956). Для подсчета общего количества гетеротрофных микроорганизмов использовали агаризованную и 10-кратно разбавленную почвенную вытяжку. Для выделения культур использовали минеральную среду с добавлением пептона, глюкозы и дрожжевой воды (Громов, Титова, 1983, среда № 3). Из доминирующих типов колоний производили выделение культур. После их очистки и проверки на чистоту с помощью просмотра под микроскопом и методом посева устанавливали их родовую принадлежность по определителю бактерий Берги (Bergey's Manual of..., 1974). При идентификации использовали следующую информацию: данные морфологического исследования живых и фиксированных препаратов, результаты окрашивания по Граму и на кислотоустойчивость, наличие жгутиков и спор, отношение к кислороду, гидролиз желатина, наличие липазы. В качестве культур для сравнения использовали *Bacillus subtilis* ВКМВ 428, *Pseudomonas fluorescens* ВКМВ 894, *Mycobacterium rubrum* ВКМА 1167. Идентификацию водорослей осуществляли до рода с использованием ряда руководств (Голлербах и др., 1952; Дедусенко-Щеголева, Голлербах, 1962; Андреева, 1975), идентификацию грибов — с помощью определителя низших растений (Курсанов и др., 1954).

Для определения хлорофилла выпаривали 5 мл суспензии, сухой остаток сохраняли при  $-4^{\circ}\text{C}$  в холодильнике. Пигменты экстрагировали ацетоном в конце эксперимента. В экстракте измеряли спектры поглощения в диапазоне длин волн 440—750 нм с помощью спектрофотометра СФ-10. Содержание хлорофилла определяли по показаниям прибора как разницу между длиной волн 680 и 745 нм и выражали в условных единицах.

## Результаты и обсуждение

За первые же сутки наблюдений в обоих вариантах значительно увеличилось общее количество бактерий. Это явилось следствием снятия по крайней мере двух возможных лимитирующих факторов, а именно, влажности и температуры. В удобренном варианте расцвет бактериальной флоры продолжался и достиг максимума на 20 сут эксперимента (рисунок). Численность доминирующих форм бактерий в это время в лимитированном по минеральным элементам питания варианте составляла  $6 \cdot 10^9$  клеток/мл, а в нелимитированном  $2 \cdot 10^{12}$  клеток/мл.



Динамика численности гетеротрофных микроорганизмов в микроэкосистеме (1 и 2 — номера вариантов,  $N$  — количество клеток в мл).

## Смена доминантных форм гетеротрофных микроорганизмов в микроэкосистеме

Время, сут	Вариант 1	Вариант 2
0	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>
8	<i>Pseudomonas</i> <i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>Nocardia</i>
17	<i>Bacillus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Streptomyces</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>Streptomyces</i>
24	<i>Bacillus</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Actinomyces</i> <i>Nocardia</i>	<i>Nocardia</i> <i>Streptomyces</i>
40	<i>Bacillus</i> <i>Nocardia</i>	<i>Mycobacterium</i> <i>Streptomyces</i>
64	<i>Bacillus</i> <i>Nocardia</i> <i>Streptomyces</i>	<i>Actinomyces</i> <i>Mortierella</i>
264	<i>Mycobacterium</i> <i>Bacillus</i>	<i>Mycobacterium</i> <i>Mortierella</i>

Таблица 2

## Содержание хлорофилла (ед. опт. плотн.) в микроэкосистеме

Вариант	Время, сут				
	1	20	64	130	225
1	0,00	0,08	0,08	0,12	0,12
2	0,00	0,00	0,02	0,02	0,02

За период эксперимента в удобренной микроэкосистеме наблюдали три периода вспышки численности бактерий, а в неудобренной — два (рисунок). В процессе сукцессии в обоих вариантах происходила смена доминантных форм гетеротрофов (табл. 1), причем смена при введении в среду удобрений происходила чаще. В варианте 1 среди гетеротрофов доминировали в основном бактерии, а в варианте 2 — актиномицеты и грибы. Численность водорослей в неудобренном варианте поднималась быстрее, чем в удобренном, за 64 сут соответственно до  $3,2 \cdot 10^4$  и  $1,3 \cdot 10^3$  особей/мл. К 170 сут значение численности водорослей в обоих вариантах было одного порядка:  $1,2 \cdot 10^5$  особей/мл в контрольном варианте и  $2,5 \cdot 10^5$  особей/мл в варианте с внесением минеральных удобрений.

Таким образом в сообществе, получившем минеральное питание, наиболее активным было гетеротрофное звено, в лимитированном — автотрофное. Внесение минеральных веществ в микроэкосистему вызвало гетеротрофную сукцессию. Основной поток углерода в системе был следующий: ОВ почвы → гетеротрофы → воздух. В лимитированном же варианте сообщество развивалось по типу автотрофной сукцессии. Об этом свидетельствует как структура сообщества, охарактеризованная выше, так и данные по содержанию хлорофилла в системах (табл. 2). Здесь углерод для биосинтеза поступал из воздуха и вовлекался в круговорот веществ. Основной его поток осуществлялся по следующей схеме: воздух → автотрофы → гетеротрофы → ОВ почвы. В варианте 1 из-за недостатка минеральных элементов питания ОВ почвы не может быть использовано гетеротрофами и сообщество функционирует за счет фото-

Список наименований водорослей и простейших, доминирующих в микроэкосистеме в конце эксперимента и в исходной почве

Вариант 1	Вариант 2	Исходная почва
Синезеленые водоросли		
<i>Phormidium</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc</i>
<i>Anabaena</i>	<i>Phormidium</i>	<i>Phormidium</i>
<i>Nostoc</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Cylindrospermum</i>
<i>Spirulina</i>		
<i>Oscillatoria</i>		
<i>Lyngbya</i>		
<i>Arthrospira</i>		
<i>Anabaenopsis</i>		
<i>Synechococcus</i>		
<i>Rhabdoderma</i>		
Зеленые водоросли		
<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i>
<i>Scenedesmus</i>	<i>Dictyosphaerium</i>	
Желто-зеленые водоросли		
<i>Botrydiopsis</i>		
Диатомовые водоросли		
<i>Nitzschia</i>		
Простейшие		
<i>Mastigophora</i>	<i>Mastigophora</i>	
<i>Ciliata</i>		

синтеза автотрофов, а в варианте 2 основным поставщиком энергии и углерода для биосинтеза является ОВ почвы.

Исследования гнотобиотических микроэкосистем (Фиштейн, Ковров, 1985; Гроссман, 1989) показали возможность антибиотического воздействия одного трофического звена системы на другое при получении ими дополнительных ресурсов развития. В микроэкосистеме, рассмотренной в данной статье, имелся некоторый запас ОВ в виде гумуса почвы. Сообщество оказалось лимитированным минеральными элементами питания. Введение азота и фосфора дало гетеротрофным микроорганизмам возможность реализовать свою более высокую скорость роста по сравнению с фотосинтезирующими водорослями и тем самым увеличить свою плотность. Это привело к антибиотическому торможению роста водорослей растущими популяциями гетеротрофов.

Ранее в гнотобиотических микроэкосистемах при создании условий для вспышки численности одного из видов организмов наблюдали обеднение видового состава биоценоза (Фиштейн, 1984). В настоящем эксперименте проявился такой же эффект. Он хорошо демонстрируется небольшим разнообразием водорослей и простейших в варианте 2 по сравнению с контролем (табл. 3). Из полученных данных вытекает следующий вывод. Любое внешнее воздействие на естественное сообщество микроорганизмов, дающее дополнительный ресурс для развития отдельных видов или трофических звеньев приводит к вспышке численности этих видов или трофических звеньев и к временному обеднению видового разнообразия сообщества. Восстановление разнообразия в природных условиях, видимо, осуществляется в основном интродукцией видов. Этот интересный и практически важный вопрос требует дополнительных исследований.

Одним из внешних воздействий на сообщества почвенных микроорганизмов в культурных агроценозах являются минеральные удобрения.

Они вызывают существенные изменения в характере питания сообщества, в численности популяций и в видовом разнообразии. Наблюдаемое на практике уменьшение гумуса в почве при долговременном использовании минеральных удобрений является следствием стимуляции развития гетеротрофного звена сообщества почвенных микроорганизмов.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Андреева В. М. Род *Chlorella*. Л., 1975.
- Гетманец А. Я. Качественный состав гумуса выщелоченного чернозема при длительном применении удобрений // Вестн. с.-х. науки. 1969, № 2, 116—118.
- Голлербах М. М., Косинская Е. К., Полянский В. И. Определитель пресноводных водорослей СССР. Зеленые водоросли. М.—Л., 1952.
- Громов Б. В., Титова Н. Н. Коллекция культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического института Ленинградского университета // Культивирование коллекционных штаммов водорослей. Л., 1983.
- Гроссман Г. Н. Функционирование микробных сообществ в условиях замкнутых микроэкосистем // Изв. АН СССР. Серия биол., 1989 (в печати).
- Дедусенко-Шеголева Н. Т., Голлербах М. М. Определитель пресноводных водорослей СССР. Желто-зеленые водоросли. М.—Л., 1962.
- Егорова С. Ф., Стефурак В. П. Динамика численности и биомассы бактерий в лесных почвах и влияние на нее влажности, температуры и удобрений // Динамика микробиологических процессов в почве. Ч. 2. Таллинн, 1974, 95—97.
- Курсанов Л. И., Наумов Н. А., Красильников Н. А., Горленко М. В. Определитель низших растений. Грибы. Т 3. М., 1954.
- Новоградский Д. М. Почвенная микробиология. Алма-Ата, 1956.
- Носко Б. С. Изменение гумусного состояния чернозема типичного под влиянием удобрений // Почвоведение, 1987, № 5, 26—32.
- Рахно П. Х. Сезонная динамика почвенных бактерий. Таллинн, 1964.
- Фиштейн Г. Структура сообщества микроскопических организмов в замкнутых микроэкосистемах // Изв. АН ЭССР. Биол., 1984, 33, № 2, 137—143.
- Фиштейн Г. Н., Ковров Б. Г. Микроэкосистемы и опыт их использования для изучения жизни простейших в сообществе микроскопических организмов // Ж. общ. биол., 1985, 46, № 3, 336—344.
- Фиштейн Г. Н., Ковров Б. Г., Губанов В. Г., Аброров Н. С. Моделирование экосистем на основе одноклеточных организмов // Человек и биосфера. Вып. 8. М., 1983, 186—223.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. Baltimore, 1974.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
23/XI 1988

Galina GROSSMAN, Helda RIIS

#### MINERAALAINETEGA VÄETAMISE TOIME MULLA MIKROORGANISMIDE MIKROÖKOSUSTEEMILE

Uurimisobjektiks oli mikroökosüsteem 200 ml klaaskolvis ööpäevase valgustuse juures. Ammooniumnitraadi ja kaaliumfosfaadi (vastavalt 490 mg/l ja 58 mg/l) lisamine mikroökosüsteemile kutsus esile heterotroofsete mikroorganismide vohamise. Variandis, kuhu ei lisatud mineraalset lämmastikku ega fosforit, domineerisid vetikad. Stagnatsiooniprotsesside tagajärjel esinesid väetatud süsteemis autotroofidest vaid sini- ja rohevetikad (5 perekonda), väetamata süsteemis sini-, rohe-, räni- ja eriviburvetikad (14 perekonda). Heterotroofidest domineerisid väetatud variandis perekond *Actinomyces* ja seed-, väetamata variandis bakterid perekondadest *Bacillus* ja *Nocardia*.

Galina GROSSMAN, Helda RIIS

#### AN EFFECT OF MINERAL FERTILIZERS ON THE MICROECOSYSTEM OF SOIL MICROORGANISMS

A self-supporting microecosystem in 200 ml glass flask was studied. Addition of 490 mg/l ammonium nitrate and 58 mg/l potassium phosphate in the medium caused the bloom of heterotrophic microorganism. In the absence of nitrogen and phosphorus the bloom of algae was observed. In a steady state of the fertilized system the autotrophic link consists of blue-green and green algae of 5 genera, but the unfertilized one consists of blue-green, green, golden and diatoms of 14 genera. In the fertilized version *Actinomyces* and *Mortierella* and in the unfertilized one *Bacillus* and *Nocardia* prevailed among heterotrophs of their system.