

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ОПЫТАХ ПО УСТОЙЧИВОМУ БИОЛОГИЧЕСКОМУ МИНИЗЕМЛЕДЕЛИЮ

Доктор биол. наук, профессор **Ю.Д. Сосков**  
Кандидат фарм. наук **А.А. Кочегина**

Растительный слой Земли по Чарльзу Дарвину [1] возник благодаря жизнедеятельности дождевых червей. Огромная роль в переработке растительных и животных остатков в почве и создании почвенного плодородия принадлежит и различным группам микроорганизмов из царств грибов и дробянок – различным видам грибов и бактерий. По данным отечественных микробиологов, количество клеток микроорганизмов в 1 г почвы достигает нескольких миллиардов [2, 5]. Особенно актуальным нам представлялось выявление живых почвенных микроорганизмов, реально участвующих в обеспечении почвенного плодородия.

Цель нашего исследования – определить количество клеток микроорганизмов в почвах в опытах по биологическому миниземледелию при возделывании картофеля. Для этого были заложены опытные делянки на двух различных по составу почвах. Картофель немецкого сорта Гранола возделывали двумя различными методами устойчивого биологического миниземледелия: по В.П. Ушакову (Россия) и методу Джона Джевонса (США). Метод В.П. Ушакова демонстрировался на ВДНХ в 90-х гг. XX века. Метод Д. Джевонса успешно используют садоводы 108 стран мира. Однако научных исследований по внедрению этих методов в нашем регионе мы не встречали. Оба метода позволяют повысить урожайность картофеля в первые 3 года возделывания до 2-3, а затем и более раз по сравнению с контролем при одновременном росте почвенного плодородия. Севооборот для возделывания такой требовательной к почвенному плодородию культуры, как картофель, при этом не требуется. Оба метода базируются на использовании компостов в качестве удобрений.

Выращивание картофеля на опытных делянках по методу В.П. Ушакова проводили в течение 6 лет, Джона Джевонса - в течение 3 лет, одновременно изучали образцы почв на контрольных делянках с использованием только минеральных удобрений и традиционном возделывании картофеля, а также различные варианты компоста в течение 3 лет.

В 2000 г. с помощью электронного микроскопа было изучено 13 образцов почв, в 2001 г. - 5 образцов методом электронной микроскопии и одновременно методом высева водных суспензий почв на питательные среды с последующим традиционным микроскопическим изучением.

Опыты по биологическому миниземледелию проводили в Санкт-Петербурге на Агрэкологическом комплексе «Живая Земля» (АЭК ЖЗ) СПб городского Дворца творчества юных (СПб ГДТЮ) на городских окультуренных почвах с

высоким содержанием гумуса (12,5 %) и в Пушкине (СПб) на Северном поле ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВНИИР) на типичных дерново-подзолистых тяжело- и легкосуглинистых почвах с содержанием гумуса 4,0-5,5 % [3,8]. Изучение образцов почв проводили во ВНИИ защиты растений (ВНИИЗР) в лаборатории электронной микроскопии (кандидат биол. наук Е.В. Моржина) и одновременно на питательных средах в лаборатории микробиологической защиты растений (кандидат биол. наук И.В. Бойкова).

### Методы исследований

#### 1. Метод количественного учета микроорганизмов в почвах с использованием электронной микроскопии.

За основу был взят метод электронной микроскопии для количественного определения микроорганизмов в суспензиях почв по Д.И. Никитину и Е.Д. Макарьевой [6, 4]. Образцы почвы отбирали в контейнеры для выращивания растений буром Некрасова, каждый образец из 15 мест одного и того же варианта, на глубину 20 см, общей массой около 200 г. В этот же день были приготовлены препараты для просмотра на электронном микроскопе (анализы были выполнены в 2000 и 2001 гг.) и для посева на питательные среды (анализ 2001 года). С этой целью 1 г свежей почвы каждого образца увлажняли несколькими каплями воды и перетирали в фарфоровой чашечке в течение 3 минут до пастообразного состояния. Почву смывали в пробирку 10 мл водопроводной воды, которая была предварительно проверена на отсутствие микроорганизмов. После тщательного перемешивания жидкости, 1 мл суспензии из средней части первой пробирки переносили пипеткой во вторую пробирку с 9 мл воды, из второй – в третью и т.д. Было сделано десять десятичных разведений. В 6-7 разведениях было много «грязи», а в 9 разведении – мало клеток, поэтому за основу было взято восьмое ( $10^{-8}$ ) разведение и линейное увеличение в 1000 раз. Из средней части восьмой пробирки микропипеткой объемом в 0,1 мл отбирали для анализа небольшой объем суспензии, из которой одну капельку объемом  $5 \text{ мм}^3$  (5 микролитров) перенесли на сеточку (бленду) диаметром 3 мм ( $7,065 \text{ мм}^2$ ). После высыхания капельки на бленде ее оттеняли окисью вольфрама и затем просматривали под электронным микроскопом. Смотровые поля каждого образца со средним количеством клеток микроорганизмов фиксировали на 5 негативах с увеличением в 1000, 3000, 7000, 10000 и 20000 раз.

Для определения количества смотровых полей (f) в бленде сначала вычисляли площадь смотрового поля ( $S_2$ ) путем деления площади негатива ( $5780 \text{ мм}^2$ ) на величину линейного увеличения (m) микроскопа в квадрате ( $5780 \text{ мм}^2 : 1000^2 = 0,00578 \text{ мм}^2$ ). Затем, площадь бленды ( $S_1 = 7,065 \text{ мм}^2$ ) делили на площадь смотрового поля ( $S_2$ ) и получали количество смотровых полей в бленде ( $f = 7,065 \text{ мм}^2 : 0,00578 \text{ мм}^2 = 1220$  полей). Количество смотровых полей в бленде (f) составило: при увеличении в 1000 раз – 1220, в 3000 раз – 9429, в 5000 раз – 26170, в 8000 раз – 64230, в 20000 раз – 353250 полей.

В отличие от метода Д.И. Никитина, во избежание занижения численности микроорганизмов в почвенных образцах, мы не проводили гомогенизацию суспензии почвы на магнитной мешалке в течение часа и не подвергали ее диализу в стерильной дистиллированной воде в течение 3-12 ч. Почвенные образцы отбирали поздно осенью во 2-3 декадах октября, когда однолетние растения прекращали вегетацию и у них отмирала корневая система, в результате чего появлялось много пищи и почвенная микрофлора активизировалась. Таким образом, сам процесс подготовки почвы до фиксации препаратов окисью вольфрама был равен времени одного деления почвенных микроорганизмов, то есть составлял не более 20-30 мин. Дистиллированную воду для разведения суспензии почвы также не применяли, так как она могла воздействовать на микроорганизмы неблагоприятным образом.

Известно также [2: 233], что при повышении плотности микроорганизмов в почве свыше  $10^6$  клеток, при недостатке пищи, начинают активно действовать механизмы антибиоза – поедание микроорганизмов клеточными паразитами из простейших и других групп.

Расчет количества клеток микроорганизмов (М) в 1 г почвы при электронной микроскопии производили по формуле:

$$M = n \times f : v : p, \text{ где}$$

(1)

n - количество клеток микроорганизмов в смотровом поле электронного микроскопа, штук (то есть на негативе, например, 10 клеток)

f - количество смотровых полей в сеточке (бленде), штук (например, 1220 полей)

v - объем капли микропипетки, мл (например, 0,005 мл или 200 капель в 1 мл)

p - разведение водой 1 г почвенного образца (например,  $10^{-8}$  или в 0,00000001 раз)

$$f = S_1 : S_2, \text{ где}$$

(2)

$S_1$  - площадь сеточки (бленды),  $\text{мм}^2$  (например,  $7,065 \text{ мм}^2$ , определяется по формуле  $\pi r^2 = 3,14 \times 1,5 \text{ мм}^2$ )

$S_2$  - площадь смотрового поля в бленде,  $\text{мм}^2$  (например,  $0,00578 \text{ мм}^2$ , определяется делением площади негатива на величину квадрата линейного увеличения микроскопа,  $5780 \text{ мм}^2 : 1000^2$ )

В преобразованном виде формула выглядит следующим образом:

$$M = n \times S_1 : S_2 : v : p$$

(3)

В формуле Д.И. Никитина и Е.Д. Макарьевой [6] для количественного учета микроорганизмов в суспензиях почв использованы несколько иные параметры, чем в нашей методике. Когда же мы под понятием «n» (количество клеток в 1 мл суспензии) указанных авторов приняли количество клеток в

смотровом поле микроскопа, то получили те же результаты, что и по нашей формуле.

## 2. Метод количественного учета жизнеспособных микроорганизмов в почвах с использованием питательных сред.

Пять образцов (2001 г.) были изучены одновременно методами электронной микроскопии и традиционной микроскопии с использованием культивирования микроорганизмов на питательных средах.

Взвешивали 1 г почвы, увлажняли, растирали навеску, производили 8-е десятичное разведение ( $10^{-8}$ ), как это описано выше при электронной микроскопии, но только уже в стерильных условиях. Один миллилитр исследуемой суспензии 8-го разведения вносили в колбы Эрленмейера на 750 мл, содержащие 100 мл стерильной водопроводной воды. Колбы ставили на качалку на 20 мин. В стерильные пробирки помещали некоторое количество почвенной суспензии из колбы. Суспензию в пробирке отстаивали в течение одного часа. Из пробирки отбирали стерильной пипеткой пробы из верхнего прозрачного слоя, пипеткой вносили по 0,05 мл отобранной пробы на одну стерильную чашку Петри с питательными средами: МПА (мясо-пептонный агар), сусло-агар, среда Чапека. В эксперименте использовали по три чашки каждой среды на одну пробу. Тщательно растирали пробу шпателем на поверхности среды. Чашки ставили в термостат на 2-7 дней при температуре + 28°C.

После появления колоний на чашках Петри подсчитывали число микроорганизмов в 1 г почвы следующим образом. Так как 1 мл суспензии из 8-го десятичного разведения разводили в 100 мл воды, а на одну чашку вносили по 0,05 мл, то в одной чашке Петри вырастали микроорганизмы, содержащиеся в  $5 \times 10^{-4}$  мл суспензии. Рассчитывали среднее количество колоний микроорганизмов на одну чашку и делили на  $5 \times 10^{-4}$ , и затем на  $10^{-8}$ . Таким образом, получали среднее количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г почвы.

## 3. Метод компостирования сорняков на АЭК ЖЗ.

В течение вегетационного периода ежегодно прополотую массу сорняков с участка, с остатками земли на корнях, постоянно складывали в три равных компостных бурта высотой 70-80 см. Каждый бурт делили пополам на 2 части с расстоянием между ними 40-50 см. В одну часть бурта вносили навоз из расчета 60 кг/га действующего вещества (д.в.) азота, в другую часть – только минеральное удобрение азофоска, также из расчета 60 кг/га д.в. азота. В 2000 г. удобрения были внесены за один месяц до отбора образцов и в 2001 г. - за три месяца. Отбор образцов производили на глубину 20 см от верхнего, переработанного биотой, созревшего компоста.

Таблица 1

Учет микроорганизмов в образцах почв по данным электронной

микроскопии в опытах по биологическому миниземледелию : 1 – выращивание картофеля по методу В.П. Ушакова на дерново-подзолистых легкосуглинистых почвах (Пушкин); 2 – компостирование сорняков в буртах на городских окультуренных почвах (Санкт-Петербург).

Размер делянки и бурта по 3 кв.м. Число повторений 3. Разведение образца почвы 8-е ( $10^{-8}$ ). Дата 28.10.2000 г.

Вариант опыта	В поле микроскопа, штук			В 1 г свежей почвы, штук	
	бактерии		мицелий		всего
	кокки	бациллы			
1. Северное поле ВНИИ растениеводства (6-й год)					
1.1. Опыт: метод Ушакова с органическими удобрениями	9	0	1	10	$244 \times 10^{12}$
1.2. Контроль с минеральными удобрениями	668	2	7	677	$16519 \times 10^{12}$
2. Агроэкологический комплекс «Живая Земля» СПб ГДТЮ (3-й год)					
2.1. Опыт: компост: сорняки + навоз ( $N_{60}$ кг/га действующего вещества)	338	2	1	341	$8320 \times 10^{12}$
2.2. Контроль: компост: сорняки + минеральное удобрение азофоска ( $N_{60}$ кг/га д.в.)	9800	24	1	9825	$239730 \times 10^{12}$

Таблица 2

Учет живых и мертвых микроорганизмов в образцах почв по данным электронной микроскопии в опытах по биологическому земледелию, в компостах и контрольных вариантах. Размер делянки и бурта по 3 кв. м. Санкт-Петербург, Агроэкологический комплекс «Живая Земля», СПб ГДТЮ. Дата 15.10.2001 г.

	Количество клеток микроорганиз-	Количе-
--	---------------------------------	---------

№ образца	Вариант опыта	мов в поле зрения микроскопа, штук				ство клеток микроорганизмов в 1 г свежей почвы, штук
		бактерии		грибы (мицелий)	всего клеток	
		кокки	бациллы			
1	Метод Джона Джевонса	207	11	5	223	$544 \times 10^{12}$
2	Традиционный метод (контроль)	149	23	8	180	$439 \times 10^{12}$
3	Метод В.П. Ушакова	196	52	76	324	$790 \times 10^{12}$
4	Земле - травяной компост с навозом (N <sub>60</sub> кг/га)	113	30	78	221	$539 \times 10^{12}$
5	Земле - травяной компост с минеральным азотом (N <sub>60</sub> кг/га )	117	31	93	241	$588 \times 10^{12}$

Учет живых микроорганизмов в 1 г свежей почвы при посеве ее на питательных опытах по м биологическому земледелию, в компостах и контрольных вариантах. Пл. лянок и буртов 3 м<sup>2</sup>, число повторений 3. Санкт-Петербург. Дата 15.10.2001 г.

№ образца	Вариант опыта	Бактерии, млрд. штук (мясо-пептонный агар)	Грибы, тыс. штук (сусло-агар)	Актиномицеты, тыс. штук (0,9×10 <sup>12</sup> (среда Чапека)	Всего живых клеток, штук
1	Метод Джона Джевонса, 3-й год	880	40	60	$880000100 \times 10^3$
2	Традиционный метод, 6-й год (контроль)	8000	120	40	$800000160 \times 10^3$
3	Метод В.П. Ушакова, 6-й год	470	360000	34	$470360034 \times 10^3$
4	Земле - травяной компост с	3000	40000	210	$3000040210 \times 10^3$

	навозным азотом ( $N_{60}$ кг/га д.в.)				
5	Земле – травяной компост с минеральным азотом ( $N_{60}$ кг/га д.в.)	1000	400	120	$1000000520 \times 10^3$

### Результаты и обсуждение

Поздней осенью, 28.10.2000 г. были взяты пробы 13 образцов почв в опытах по биологическому земледелию для количественного учета микроорганизмов. В Санкт-Петербурге на Агроэкологическом комплексе «Живая Земля» СПб ГДТЮ на городских окультуренных почвах диапазон изменчивости по количеству клеток микроорганизмов в 1 г почвы по образцам составил  $2,0 \times 10^{15}$  –  $239,7 \times 10^{15}$  и на Северном поле ВНИИР на типичных дерново-подзолистых легкосуглинистых почвах -  $0,2 \times 10^{15}$  -  $21,6 \times 10^{15}$  живых и мертвых клеток микроорганизмов. На всех типах почв, во всех опытах обнаружены сотни – сотни тысяч триллионов клеток микроорганизмов в 1 г свежей почвы. Аналогично высокие показатели, до  $17 \times 10^{17}$  клеток в 1 г почвы, были обнаружены в компостах Италии [9]. Из 13 образцов резко выделился по количеству клеток только один образец из АЭК ЖЗ СПб ГДТЮ – компост из сорняков с азофоской ( $N_{60}$  кг/га). В среднем, по всем остальным 12 образцам количество клеток в 1 г почвы составило  $12,2 \times 10^{15}$  при диапазоне изменчивости  $0,2 \times 10^{15}$  –  $26,8 \times 10^{15}$  клеток в 1 г почвы. Почвы в опытах по методам биологического земледелия мало отличаются друг от друга по количеству содержащихся в них микроорганизмов.

Из 13 образцов почв заслуживают внимания только две пары образцов, где выявлены существенные различия между опытом и контролем (табл. 1). Так, на Северном поле ВНИИР (Пушкин - Санкт-Петербург) на шестом году выращивания картофеля по методу В.П. Ушакова, в опыте количество клеток микроорганизмов в 1 г почвы составило  $0,2 \times 10^{15}$ , а в контроле с использованием только минеральных удобрений ( $N_{60}$  кг/га д. в.) в 68 раз больше ( $16,5 \times 10^{15}$ ). На АЭК ЖЗ СПб ГДТЮ в земле - травяном навозном компосте (навоз: 60 кг/га д. в. азота) количество клеток в 1 г почвы составило  $8,3 \times 10^{15}$ , а в контроле только с минеральным удобрением (азофоска: 60 кг/га д. в. азота) в 29 раз больше –  $239,7 \times 10^{15}$ . В обоих случаях внесение азотных минеральных удобрений вызывало резкое увеличение клеток микроорганизмов в 1 г почвы в 29 - 68 раз. В контрольных образцах (табл. 1), где использовали только минеральные удобрения (азофоска:  $N_{60}$  кг/га д.в.) преобладали мелкие кокки, диаметром менее 1 мкм. Количество мелких клеток составило в этих

образцах 93,0-99,7 %. В двух других образцах (1,1; 2,1) были обнаружены как мелкие, так и крупные кокки, диаметром 3-7 мкм.

Поздней осенью, 15.10.2001 г., было изучено содержание клеток микроорганизмов в пяти образцах свежей почвы АЭК ЖЗ СПб ГДТЮ двумя методами: электронной микроскопии и традиционной микроскопии с использованием культивирования микроорганизмов на питательных средах. Как известно, клетки почвенных микроорганизмов могут делиться каждые 20-30 мин и еще быстрее погибать от различных факторов. По нашему мнению, время подготовки образцов почв для высева на питательные среды можно было бы еще сократить на 1 час 20 мин, то есть не ставить суспензию на качалку и не отстаивать ее. Согласно таблицы 2 по данным электронной микроскопии в 2001 г. количество клеток микроорганизмов сократилось в опытах по сравнению с 2000 г. в среднем в 51 раз и оставило  $0,4 \times 10^{15} - 0,8 \times 10^{15}$  клеток.

На питательных средах (табл.3) получены также высокие показатели по численности живых клеток в 1 г почвы, в среднем  $2,7 \times 10^{12}$  клеток. По Д.Г. Звягинцеву [2: с.225] на любой питательной среде прорастает обычно 0,1% клеток микроорганизмов от их общего количества, обитающих в почве, то есть в 1000 раз меньше. Если учитывать этот фактор, то можно видеть, что данные по численности микроорганизмов, полученные двумя разными способами, мало различаются. Численность живых клеток микроорганизмов в образцах почвы при традиционном методе возделывания картофеля (контроль) превысила опытные образцы по Джону Джевонсу и В.П. Ушакову в 9-16 раз и содержала  $8 \times 10^{12}$  клеток в 1 г почвы. Во всех 5 образцах преобладали бактерии, численность которых составила 99,9 % по отношению к грибам и актиномицетам. В земле-травяном компосте (образец №5) с минеральным азотом (азофоска: N60 кг/га д.в.) преобладали очень мелкие бактерии, а также мелкие колонии на питательной среде, диаметром, 2-5 мм с маслянистой поверхностью. В других вариантах опыта (1-4 образцы) бактерии были крупными. Их колонии на питательной среде были также более крупными, диаметром 15-30 мм.

Наши исследования показали, что численность микроорганизмов в почвах намного выше, чем считалось ранее и составляет не миллиарды клеток в 1 г почвы, а многие триллионы. Это подтверждается одновременным использованием двух различных методов - электронной микроскопии и посевом суспензий почв на питательные среды. Почвы в опытах по биологическим методам земледелия мало отличаются друг от друга по количеству клеток микроорганизмов. В то же время численность микроорганизмов в почвах имеет тенденцию возрастать в десятки раз при использовании только одних минеральных азотных удобрений, которые могут быть причиной снижения плодородия почвы за счет минерализации и поглощения гумуса микроорганизмами.

## Выводы

1. По данным электронной микроскопии, в 6 образцах городских окультуренных почв (Санкт-Петербург) и в 5 образцах дерново-подзолистых легко- и тяжелосуглинистых почв (Пушкин-СПб), в опытах по биологическим методам миниземледелия и контрольных вариантах выявлено в среднем  $10580 \times 10^{12}$  клеток микроорганизмов в 1 г почвы с диапазоном изменчивости  $244 \times 10^{12}$  -  $26791 \times 10^{12}$  клеток.

2. Наибольшее количество клеток в 1 г почвы обнаружено методом электронной микроскопии в 7 образцах компоста: в среднем  $38988 \times 10^{12}$  с диапазоном изменчивости  $539 \times 10^{12}$  -  $239730 \times 10^{12}$  клеток.

3. В 2000 г. при изучении 13 образцов почв методом электронной микроскопии выявлено два образца из четырех, когда в контроле с использованием только минеральных азотных удобрений  $N_{60}$  кг/га д. в., количество клеток микроорганизмов в 1 г почвы превысило опытные варианты с органическими удобрениями в 29-68 раз (табл.1).

4. Представлена более подробная и понятная формула для расчета количества клеток микроорганизмов в 1 г почвы при электронной микроскопии, чем формула Д.И. Никитина и Е.Д. Макарьевой [6].

5. В 2001 г. при изучении пяти образцов почв с использованием питательных сред выявлено в среднем  $2,7 \times 10^{12}$  жизнеспособных клеток микроорганизмов в 1 г почвы с диапазоном изменчивости  $0,5 \times 10^{12}$  -  $8,0 \times 10^{12}$  клеток. Образцы почвы в опытах с использованием только минеральных удобрений содержали в 9 раз больше жизнеспособных клеток, чем образцы в опытах с использованием органических удобрений.

6. В образцах почвы и компоста в опытах с использованием только минеральных удобрений преобладали мелкие бактерии, диаметром 1 мкм и меньше (до 93,0-99,7 %).

7. Образцы почвы в опытах с использованием органических удобрений содержат как крупные (3-7 мкм), так и мелкие бактерии (0,5-1,0 мкм). Мелкие бактерии на питательных средах образовывали в 3-6 раз более мелкие колонии, чем крупные.

Финансирование осуществлено по гранту Research Support Scheme 1041/2000, Институт Открытое общество.

### Литература

1. Дарвин Ч. Образование растительного слоя Земли деятельностью дождевых червей и наблюдения над образом жизни последних.- М.: А.А.Васильев, 1882.- 186 с.
2. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы.- М.: МГУ, 1987.- 256 с.
3. Кочегина А.А., Сосков Ю.Д., Петрова Е.А., Москалева Н.С., Осипов С.М. Возделывание картофеля и других культур по методу Джона Джевонса // Гумус и почвообразование: Сборник научных трудов СПб ГАУ.- СПб, 2003.- С. 172-178.

4. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д.Г. Звягинцева.- М.: МГУ, 1991.- 304 с.
5. Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. Микробиология.- 3-е изд.- М.: Агропромиздат, 1987.- 368 с.
6. Никитин Д.И., Макарьева Е.Д. Применение электронного микроскопа для количественного учета микроорганизмов в суспензиях почв // Почвоведение. 1970. № 10. С. 51-56.
7. Покровская С.Ф. Переработка органических отходов с использованием дождевых червей // Сел. хозяйство за рубежом. 1984. № 5. С.10-14.
8. Сосков Ю.Д., Кочегина А.А., Осипов С.М., Москалева Н.С., Петрова Е.А., Сапунов Л.С. Выращивание картофеля по методу В.П. Ушакова в Санкт-Петербурге // Гумус и почвообразование: Сборник научных трудов СПб. ГАУ.- СПб., 2002.- С.. 158-164.
9. Mizia G. Mondo agricolo.- 1982. Vol. 33, n 10-11. P. 26-27. (Цитировано по С.Ф. Покровской, 1984 г. В ЦНСХБ журнал изъят из фондов).