

УДК 631.46

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА СТРУКТУРУ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ В ПОЧВЕННЫХ ОБРАЗЦАХ ПРИ ИХ ХРАНЕНИИ

© 2017 г. Д. А. Никитин^{1,2,*}, Т. И. Чернов¹,
А. К. Тхакахова¹, М. В. Семенов¹, Н. А. Бгажба^{1,2},
А. Д. Железова^{1,2}, О. Е. Марфенина², О. В. Кутовая¹

¹Почвенный институт им. В.В. Докучаева,
Россия, 119017 Москва, Пыжевский пер., 7, стр. 2

²МГУ им. М.В. Ломоносова,
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

*e-mail: dimnik90@mail.ru

Методом люминесцентной микроскопии проведена оценка структуры микробной биомассы в образцах горизонтов А и С чернозема, хранившихся при +5 и –70°C. Выявлено значительное уменьшение биомассы микроорганизмов при криохранении для образцов гумусового горизонта и в меньшей степени – для минерального горизонта. В образцах, хранившихся при температуре –70°C, отмечается сокращение длины грибного мицелия, уменьшение числа грибных спор большого диаметра ($d > 5$ мкм) и отсутствие самых крупных спор ($d > 7$ мкм). Длина мицелия чистой культуры гриба *Cadophora novi-eboraci* несколько сокращалась после хранения при +5°C, а при отрицательных температурах (–18 и –80°C) – уменьшалась на 28% в первые дни и на 32% на 14-е сутки инкубации. Полученные данные свидетельствуют, что хранение при отрицательных температурах приводит к потерям численности и биомассы микроорганизмов в почве. Таким образом, не рекомендуется использовать криохранение для почвенных образцов, в которых планируется оценивать структуру микробной биомассы прямым методом люминесцентной микроскопии.

Ключевые слова: структура биомассы, бактерии, грибы, *Cadophora novi-eboraci*, люминесцентная микроскопия, типичный чернозем

doi: 10.19047/0136-1694-2017-89-36-53

ВВЕДЕНИЕ

Одной из методических проблем почвенной микробиологии является изменение активности, численности и биомассы различных групп микроорганизмов при хранении отобранных почвенных образцов, которые могут приводить к искажению результатов

микробиологического анализа. Очевидно, что изменения структуры сообществ почвенных микроорганизмов относительно нативного состояния будут минимальны при немедленном анализе образцов после отбора ([Звягинцев, 1991](#); [Cui et al., 2014](#)). Однако не всегда имеется возможность одновременного исследования большого количества образцов, поэтому возникает необходимость их хранения.

В почвенной микробиологии отсутствует какая-либо единая методика сохранения образцов до анализа. Методы хранения в разных исследованиях могут значительно различаться. Может применяться как высушивание почвы до воздушно-сухого или абсолютно сухого состояния ([Ahmed et al., 1982](#); [Иванова и др., 2015](#)), так и поддержание ее естественной полевой влажности ([Звягинцев, 1991](#); [Cui et al., 2014](#); [Василенко и др., 2014](#)). Температура хранения почвы варьирует в широких пределах: от комнатной ([West, Sparling, 1986](#)) до -80°C ([Eiland, 1979](#)), $-18\dots-20^{\circ}\text{C}$ ([Christie, Bcattic, 1987](#); [Cui et al., 2014](#); [Мафенина и др., 2016](#); [Anderson, Domsch, 1980, 1989](#)), $+2^{\circ}\text{C}$ ([Cui et al., 2014](#)) или $+4\dots-5^{\circ}\text{C}$ ([Семенов и др., 2016](#), [Кутовая и др., 2017](#)).

Немногочисленные эксперименты по сравнению разных методик сохранения почвенных образцов для микробиологического анализа проводились только для гумусового горизонта ([Zelles et al., 1991](#); [Cui et al., 2014](#)).

Рекомендуемые условия хранения различаются в зависимости от метода исследования почвенных микроорганизмов. Сохранение образцов в замороженном виде является распространенным способом приостановки биохимических реакций и препятствует деградации нуклеиновых кислот и других биомолекул. Так, для молекулярно-генетических методов анализа образцы почвы хранят в замороженном состоянии при температуре $-70\dots-80^{\circ}\text{C}$ ([Кутовая и др., 2015](#); [Чернов и др., 2017](#); [Cui et al., 2014](#)). Однако процессы заморозки–оттаивания образца могут приводить к повреждению клеток микроорганизмов. При учете численности микробных клеток в почве образцы до анализа традиционно хранят в холодильной камере при положительной температуре, примерно $+5^{\circ}\text{C}$ ([Кутовая и др., 2017](#)). Насколько влияет хранение при отрицательных температурах на количественный учет длины мицелия микромицетов на данный момент неизвестно ([Maggi et al., 2013](#)).

Цель работы – количественная оценка биомассы микроорганизмов при хранении образцов в различных температурных условиях. В задачи исследования: оценка численности и биомассы бактерий, структуры биомассы пропагул грибов (определение соотношения спор и мицелия) в образцах чернозема (гор. А и С), хранившихся при температурах $+5^{\circ}\text{C}$ и -70°C , а также сравнительный анализ длины мицелия чистой культуры *Cadophora noviboraci*, выдержанной при разных температурах ($+25$, $+5$, -18 , -80°C).

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Образцы почвы отобрали из гор. А (AU 5(14)–21(53) см) и С (2Dmc,lc,nc 170(180–220(240) см)) разреза типичного чернозема, находящегося в 20 км к югу от Курска на Курской биосферной станции Института географии РАН, на слабо выпуклом водоразделе ($51^{\circ}32'23.4''$ с.ш., $36^{\circ}05'11.8''$ в.д.). Уклон составлял менее 0.5° . Растительность – разнотравно-злаковая, иногда используется для сенокосения или выпаса. По классификации 1977 г. почва относится к типичному чернозему, перерытому, среднемощному, тяжелосуглинистому на лёссовидных суглинках, подстилаемых лёссовидными суглинками с брянской палеопочвой. По классификации 2004, 2008 – это чернозем миграционно-мицелиарный зотурбированный среднемощный тяжелосуглинистый, подстилаемых лёссовидными суглинками с брянской палеопочвой; по WRB 2007: *Voronc Chernozem (Pachic, Clayic)* ([Хитров и др., 2013](#)).

Почвенные образцы после отбора хранили в течение шести недель в холодильной ($+5^{\circ}\text{C}$) и низкотемпературной морозильной (-70°C) камерах.

Оценку структуры микробной биомассы осуществляли методом люминесцентной микроскопии ([Звягинцев, 1991](#)). Учет бактериальных и грибных клеток проводили на люминесцентном микроскопе «Биомед-6» (Россия) при увеличении 10×40 для грибов и 10×100 для бактерий в тройной повторности для каждого образца или чистой культуры. Использовали следующие люминесцентные красители: калькофлуор белый (связывается с хитином клеточных стенок грибов) ([Звягинцев, 1991](#); [Полянская, Звягинцев, 2005](#); [Bloem et al., 1995](#)) и акридиновый оранжевый (свя-

зывается с ДНК микроорганизмов и чаще применяется для учета бактерий) ([Головченко и др., 2002](#); [Звягинцев, 1991](#)). Содержание грибной биомассы (мг сухой массы/г почвы) определяли с учетом, что плотность спор равна 0.837 г/см^3 , мицелия – 0.628 г/см^3 ([Полянская, Звягинцев, 2005](#)). Расчеты для оценки количества бактериальной биомассы проводили, учитывая, что масса одной клетки объемом 0.1 мкм^3 равна $2 \times 10^{-14} \text{ г}$ ([Полянская, Звягинцев, 2005](#)). Содержание микробной биомассы рассчитывали на грамм воздушно-сухой почвы.

Чистую культуру микромицета *Cadophora novi-eboraci* ([Travadon et al., 2015](#)) взяли из микологической коллекции кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ им. Ломоносова. Видовую идентификацию проводили по секвенированию участков ITS1 и ITS2 рДНК. Данный штамм выделен Д.А. Никитиным из антарктической почвы оазиса Холмы Ларсеманн (окрестности ст. «Прогресс», Антарктида), разр. NSM-10-30 на сапропелевых отложениях с альго-бактериальными матами, находящегося в 8 м от северного сезонно-затопляемого берега оз. Рейд, из оглеенного гор. В_{1g} (глубина 17 см). Штамм представлен исключительно мицелием без конидиогенных структур и спор. Проверку чистоты и жизнеспособности культуры проводили переливанием суспензии 10%-ного глицерина с биомассой микромицета, взятой из морозильной камеры (-80°C), на чашки Петри с агаризованной средой Чапека. Биомассу «оживленной» чистой культуры *Cadophora novi-eboraci* наращивали в колбах с жидкой стерильной средой Чапека (100 мл) со стрептомицином (100 мг/л) для предотвращения роста бактерий, помещая в каждую по два агаровых блока с культурой диаметром 5 мм. После 7-и суток инкубации биомассу гриба извлекали методом фильтрации, пропуская суспензию с культурой и средой через фильтр «белая лента» (диаметр пор 2–3 мкм) с использованием водоструйного насоса. Влажную грибную биомассу высушивали в закрытых пластиковых стерильных чашках Петри в течение трех суток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структура микробной биомассы в почве. Для анализа данных по биологической активности важны как показатели численности клеток, так и биомассы, поскольку пересчеты от одного

из этих параметров к другому разнятся в зависимости от методик. Сопоставление этих величин для бактерий представлено в табл. 1.

Биомасса бактерий гумусового гор. А изученной почвы, инкубированной при +5°C, составляет 1.41×10^{-3} мг/г почвы. Данные, полученные методом *in situ* гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами (FISH – fluorescence in situ hybridization), показывают на порядок большие значения для гумусового горизонта типичных черноземов Воронежской области ([Семенов и др., 2016](#)). Полагаем, что низкие значения в нашем эксперименте обусловлены гибелью части бактерий при температуре инкубации +5°C.

При –70°C величина бактериальной биомассы была на порядок меньше – 4.40×10^{-4} мг/г почвы, чем при +5°C (рис. 1). Вероятно, часть бактерий разорвалась в результате резкого замораживания и образования кристаллов льда внутри клеток ([Henry, 2007](#)). Окраска акридиновым оранжевым произошла и для разрушенных клеток бактерий, однако по морфологии не смогли отличить их от частиц почвенного органического вещества, которые также прокрашиваются и люминесцируют в ультрафиолетовом свете ([Bloem et al., 1995](#)). Поскольку почва – гетерогенная система с обилием микрон, благоприятных для сохранения и развития микроорганизмов ([Полянская и др., 2010](#)), большинство бактерий оказалось в благоприятных условиях, их клеточная стенка и ДНК сохранились в целостности, поэтому мы смогли их визуализировать и отметить при прямом подсчете под микроскопом.

Таблица 1. Численность и биомасса бактерий гумусово-аккумулятивного (А) и минерального (С) горизонтов типичного чернозема при +5 и –70°C

Горизонт	<i>t</i> , °C	Численность, шт./г почвы	Биомасса, мг/г
А	+5	$6.89 \times 10^7 \pm 1.84 \times 10^7$	$1.41 \times 10^{-3} \pm 0.29 \times 10^{-3}$
А	–70	$2.31 \times 10^7 \pm 0.62 \times 10^7$	$0.46 \times 10^{-3} \pm 0.09 \times 10^{-3}$
С	+5	$1.83 \times 10^5 \pm 0.48 \times 10^5$	$3.65 \times 10^{-6} \pm 0.81 \times 10^{-6}$
С	–70	$1.34 \times 10^5 \pm 0.35 \times 10^5$	$2.70 \times 10^{-6} \pm 0.60 \times 10^{-6}$

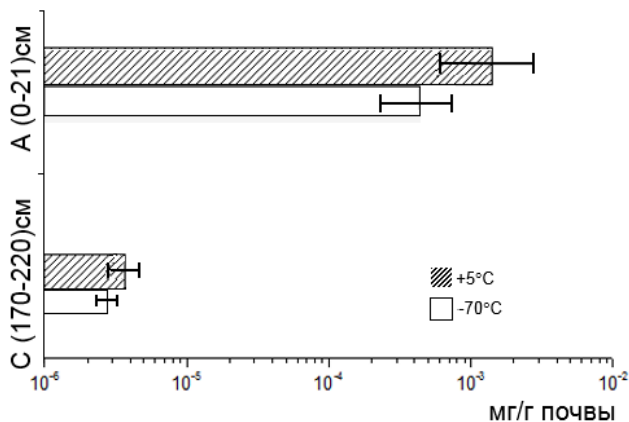


Рис. 1. Изменение биомассы бактерий гор. А и С типичного чернозема при +5 и -70°C.

Бактериальная биомасса в гор. С при +5°C составила 3.65×10^{-6} мг/г почвы, что ниже чем в гор. А при этих же условиях хранения более чем на три порядка. Такие значения соответствуют литературным данным ([Полянская и др., 1995](#); [Иванова и др., 2015](#)). Активное развитие микроорганизмов в столь глубоких слоях лимитировано низким содержанием органических веществ и свободной воды, а также зависит от физических и химических характеристик этого горизонта почвы.

При -70°C биомасса бактерий в гор. С была в 1.4 раз ниже (2.70×10^{-6} мг/г почвы), чем при относительно высокой температуре. Однако разница из-за большого разброса данных не является достоверной. Поэтому можно считать, что биомасса бактерий в исследованном минеральном горизонте практически не уменьшилась по отношению к значениям, полученным для +5°C. Таким образом, потеря в биомассе бактерий при хранении почвенных образцов гумусово-аккумулятивного горизонта при -70°C составила 68.8%, по сравнению с +5°C, а для минерального горизонта – всего 26%.

Такое расхождение в потере биомассы бактерий для гор. А и С при хранении образцов при разных температурах может быть объяснено несколькими причинами. В глубоких горизонтах черноземных почв в течение всего года преобладает незначительное

содержание кислорода и анаэробные условия, пониженные температуры, часто отмечается невысокий уровень влажности, повышена концентрация солей, высокий уровень рН, а также другие стрессовые факторы для микроорганизмов ([Полянская и др., 2010](#)). Кроме того, известно, что доля мелких форм стресс-толерантных прокариот в таких условиях больше, чем для поверхностных горизонтов, и такие бактерии более устойчивы к чрезвычайно низким отрицательным температурам ([Лысак и др., 2010](#)).

Для расчета биомассы грибов учтены такие показатели, как длина мицелия и численность спор различных размеров (от 2 до 7 мкм) (табл. 2).

Биомасса грибов при +5°C в гор. А составила около 0.436 мг/г почвы, а в гор. С – 0.106 мг/г почвы. Эти данные сходны по значениям, полученным другими авторами для типичных черноземов Центрально-Черноземного государственного заповедника методом люминесцентной микроскопии при моментальном анализе образцов, которые составили порядка 0.5 мг/г почвы ([Полянская и др., 2010](#)). Таким образом, можно считать, что длительное хранение почвы в условиях холодильной камеры не уменьшило количество грибных пропагул. Предполагаем, что часть грибов погибла, но некоторые виды, приспособленные к развитию в низкотемпературных условиях, смогли размножиться и увеличить свою биомассу. Эта гипотеза подтверждается работами, в которых показано успешное развитие грибов под снегом при около нулевых температурах ([Žifčáková et al., 2016](#); [Panikov, 2014](#)).

При хранении образцов в морозильной камере на –70°C, масса грибов в гор. А уменьшилась более чем в 2.5 раза по сравнению с температурой хранения +5°C, и составила 0.169 мг/г почвы (рис. 2). Наблюдаемое снижение биомассы грибов не столь резкое, как у бактерий в этих же условиях.

В гор. С, обладающем меньшей биологической активностью, грибная биомасса при +5°C составила 0.106 мг/г почвы, что ниже, чем в гор. А в четыре раза. Такие показатели соответствуют литературным данным для минеральных горизонтов различных типов почв: черноземов ([Полянская и др., 1995](#); [Кутовая и др., 2016](#)), серых лесных ([Железова и др., 2015](#)) и примитивных почв Антарктиды ([Марфенина и др., 2016](#)).

Таблица 2. Структура грибной биомассы гумусово-аккумулятивного (А) и минерального (С) горизонтов типичного чернозема при +5°C и -70°C

Горизонт, t хранения	Мицелий (d = 5 мкм)		Споры (диаметр)												Общая биомасса спор	Суммарная биомасса (мицелий + споры)
	биомас са, мг/г	длина, м	2 мкм			3 мкм			5 мкм			7 мкм				
			численност ь, шт./г	масса, мг/г	численнос ть, шт./г	масса, мг/г	численнос ть, шт./г	масса, мг/г	численнос ть, шт./г	масса, мг/г						
А, +5°C	0.239 ± ± 0.053	192.8 ± ± 24.7	3.03 × 10 ⁴ ± ± 0.61 × 10 ⁴	0.010 ± ± 0.002	4.92 × 10 ⁴ ± ± 1.14 × 10 ⁴	0.057 ± ± 0.010	1.79 × 10 ⁴ ± ± 0.40 × 10 ⁴	0.096 ± ± 0.020	2.30 × 10 ³ ± ± 0.52 × 10 ³	0.034 ± ± 0.009	0.197 ± ± 0.043	0.436 ± ± 0.090				
А, -70°C	0.073 ± ± 0.025	58.7 ± ± 15.2	4.58 × 10 ⁴ ± ± 0.92 × 10 ⁴	0.015 ± ± 0.003	3.70 × 10 ⁴ ± ± 0.70 × 10 ⁴	0.043 ± ± 0.008	0.45 × 10 ⁴ ± ± 0.10 × 10 ⁴	0.024 ± ± 0.006	0.92 × 10 ³ ± ± 0.23 × 10 ³	0.014 ± ± 0.004	0.096 ± ± 0.023	0.169 ± ± 0.039				
С, +5°C	0.070 ± ± 0.025	56.8 ± ± 15.3	3.31 × 10 ⁴ ± ± 0.69 × 10 ⁴	0.011 ± ± 0.002	1.63 × 10 ⁴ ± ± 0.38 × 10 ⁴	0.019 ± ± 0.004	0.19 × 10 ⁴ ± ± 0.04 × 10 ⁴	0.010 ± ± 0.002	0.46 × 10 ³ ± ± 0.12 × 10 ³	0.007 ± ± 0.001	0.047 ± ± 0.011	0.106 ± ± 0.026				
С, -70°C	0.047 ± ± 0.016	38.15 ± ± 10.3	2.71 × 10 ⁴ ± ± 0.57 × 10 ⁴	0.009 ± ± 0.001	1.47 × 10 ⁴ ± ± 0.35 × 10 ⁴	0.017 ± ± 0.004	0.08 × 10 ⁴ ± ± 0.01 × 10 ⁴	0.004	0	0	0.030 ± ± 0.008	0.077 ± ± 0.019				

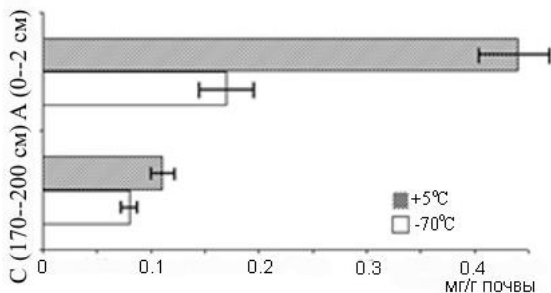


Рис. 2. Изменение биомассы грибов гор. А и С типичного чернозема при +5°C и -70°C.

При -70°C биомасса грибов в гор. С всего в 1.4 раза ниже, чем при +5°C и составляет 0.077 мг/г почвы, потеря биомассы грибов при -70°C минерального горизонта составила всего 27.4%, тогда как для гор. А этот показатель был выше – 61.2%.

Соотношение пропагул – важная характеристика пула грибов, показывающая долю активной (мицелий) и покоящейся (споры) биомассы ([Марфенина и др., 2016](#)). Доля грибных спор в условиях хранения при +5°C в обоих горизонтах составляет примерно 44% от общей грибной биомассы. При температуре -70°C в гор. А доля спор возрастает до 56%, а в гор. С, наоборот, уменьшается до 36%.

Интересно отметить, что численность мелких спор диаметром 2–3 мкм в гор. А при криохранении увеличилась на 51% по сравнению с данными для образца этого горизонта, хранящегося при +5°C. Число крупных спор ($d > 5$ мкм) в гор. С резко уменьшается в процессе хранения как при +5°C, так и при -70°C. Такая же закономерность отмечена при исследовании экстремально холодных почв ([Марфенина и др., 2016](#)). Необходимо отметить, что крупные споры диаметром 7 мкм при -70°C разрываются, поэтому не обнаружены в образцах нижних минеральных горизонтов типичного чернозема. По-видимому, грибные споры малых размеров так же, как мелкие бактерии, лучше переносят сверхнизкие температуры по сравнению с крупными формами.

Масса мицелия в гор. А при хранении образцов в холодильной камере (+5°C) больше по сравнению со значением для гор. С на 70%, в то время как в условиях криохранения (-70°C) этот раз-

ница была не столь высока – всего около 30%. То есть мицелий грибов гумусового горизонта разрушается при чрезвычайно низких температурах интенсивнее по сравнению с мицелием минерального горизонта, что может быть связано с видовой спецификой грибов разных генетических горизонтов типичного чернозема.

Сравнивая массу мицелия в одном и том же горизонте, но при разных температурах, подчеркнем, что в гумусовом горизонте она меньше на 70% при хранении -70°C , тогда как в минеральном горизонте – всего на 30%.

Изменения длины мицелия *Cadophora novi-eboraci* в зависимости от температуры. Поскольку наиболее значительные изменения грибной биомассы при низких температурах произошли из-за сокращения длины мицелия, решено проанализировать его динамику на примере чистой культуры микромицета *Cadophora novi-eboraci*.

Длина мицелия практически не менялась с течением времени в процессе инкубации микромицета при $+25^{\circ}\text{C}$ (рис. 3). При $+5^{\circ}\text{C}$ длина мицелия постепенно уменьшалась, достигнув значения биомассы в 1811 мг/г на 14-е сутки, что составило 95% от начальной массы (табл. 3). Незначительное уменьшение длины при $+25^{\circ}\text{C}$ и $+5^{\circ}\text{C}$, сравнимое с погрешностью, могло произойти вследствие недоучета мицелия из-за сокращения его объема и наложения гиф друг на друга после сушки.

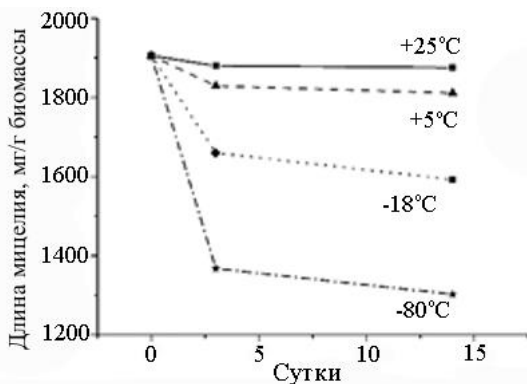


Рис. 3. Зависимость длины мицелия *Cadophora novi-eboraci* от температуры и времени хранения.

Таблица 3. Длина мицелия и биомасса чистой культуры *Cadophora noviboraci*, выдержанной при разных температурах

Сутки	t, °C	Длина мицелия	Биомасса мицелия
		мг/г биомассы культуры со средой	
0	+25	1905.5 ± 323.8	2.362 ± 0.397
3	+25	1880.0 ± 319.5	2.330 ± 0.392
	+5	1829.2 ± 310.9	2.268 ± 0.381
14	-18	1659.8 ± 275.6	2.057 ± 0.345
	-80	1367.4 ± 220.2	1.019 ± 0.169
	+25	1875.3 ± 318.8	2.325 ± 0.390
	+5	1811.0 ± 307.9	2.245 ± 0.377
	-18	1592.5 ± 270.7	1.974 ± 0.332
	-80	1302.4 ± 221.4	1.614 ± 0.271

Значительно большие изменения произошли с микромицетом при его инкубации в морозильных камерах. Так, при -18°C снижение длины мицелия на 3-и сутки составило 12.9%, а на 14-е – 16.4%. При выдерживании в криоусловиях -80°C эти показатели еще увеличились – 28.2% на 3-и и 31.7% на 14-е сутки. При помещении культуры в морозильные камеры происходит моментальное падение температуры в отличие от природных условий, где снижение идет постепенно. При этом часть клеток разрывается, уничтоженная образовавшимися и увеличивающимися в них кристаллами льда ([Maggi et al., 2013](#); [Panikov, 2014](#)). Однако большинство клеток сохраняется по различным причинам: наличию криопротекторов (белков-антифризов, сахаро-спиртов, многоатомных спиртов, трегалозы), а также ризоморф, синнем и хламидоспор, часто отмеченных у грибов из экстремально-холодных местообитаний ([Maggi et al., 2013](#)).

Таким образом, основное уменьшение длины мицелия наблюдается на ранних этапах инкубации (на третьи сутки). Наибольшая потеря в массе происходит у чистой культуры микромицета при отрицательных температурах. Значимое (больше чем погрешность измерения, около 15–18%) сокращение мицелия отмечали исключительно при -80°C . Во всех остальных случаях можно говорить только о тенденции к уменьшению величины биомассы мицелия. Из результатов эксперимента видно, что даже при длительном (14 суток) хранении чистой культуры микромицета его биомасса уменьшается максимум на треть при чрезвычайно суровых условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Температура хранения образцов является важным фактором при изучении биологической активности почв. Низкие температуры ($-70...-80^{\circ}\text{C}$), обычно используемые в метагеномных исследованиях для сохранения ДНК, уменьшают микробную биомассу клеток и являются причиной изменения ее структуры. Наибольшее (на порядок) сокращение массы бактерий и грибов из-за разрыва части клеток происходит при -70°C в гумусовом горизонте. В минеральном гор. С потери биомассы после криохранения менее значимы. У грибов при этих условиях нарушается соотношение спор и мицелия. Доля последнего резко сокращается уже в первые сутки инкубации в криохранилище.

Таким образом, оценка бактериальной и грибной биомассы в почвенных образцах, хранящихся в условиях, подходящих для метагеномных исследований (-70°C), может быть проведена классическими методами почвенной микробиологии (люминесцентной микроскопией и посевом на селективные питательные среды) для минеральных горизонтов почв практически без искажения результатов. А данные по биомассе микроорганизмов (особенно грибов) органогенных гумусово-аккумулятивных горизонтов могут быть значительно занижены.

Поэтому образцы для исследования классическими и молекулярно-биологическими методами почвенной микробиологии необходимо отбирать в различные емкости. Желательно проводить манипуляции с ними непосредственно в день отбора, а при необходимости хранения, помещать в холодильные ($+5...+8^{\circ}\text{C}$) или морозильные ($-18...-20^{\circ}\text{C}$) камеры для традиционных методов и закладывать на криохранение ($-70...-80^{\circ}\text{C}$) при метагеномных исследованиях сообществ почвенных микроорганизмов.

Если хранить образцы при более высоких, но все же отрицательных температурах ($-18...-20^{\circ}\text{C}$), которые приемлемее для классических, но недостаточны для молекулярно-биологических методов микробиологии, возникает другая проблема. Физиологическая активность некоторых групп микроорганизмов (психрофилов или криофилов) не уменьшается, а напротив, возрастет. Это, конечно, изменит соотношение таксономических групп в почве и приведет к неверной трактовке результатов, полученных молеку-

лярно-биологическими методами выделения ДНК из почвы. Следовательно, дилемма единообразного хранения образцов для принципиально различных методов почвенной микробиологии практически не может быть решена.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда. Исследования микроорганизмов почвы выполнены по проекту № 17-16-01057, исследования чистой культуры микромицета *Cadophora novi-eboraci* – по проекту № 14-50-00029.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Василенко Е.С., Кутовая О.В., Тхакахова А.К., Мартынов А.С.* [Изменение численности микроорганизмов в зависимости от величины агрегатов миграционно-мицелярного чернозема](#) // Бюл. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. 2014. Вып. 73. С. 85–97.
2. *Головченко А.В., Добровольская Н.Г., Инишева Л.И.* Структура и запасы микробной биомассы в олиготрофных торфяниках Южной тайги Западной Сибири // Почвоведение. 2002. № 12. С. 1468–1473.
3. *Железова А.Д., Кутовая О.В., Дмитренко В.Н., Тхакахова А.К., Хохлов С.Ф.* [Оценка количества ДНК разных групп микроорганизмов в генетических горизонтах темно-серой почвы](#) // Бюл. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. 2015. Вып. 78. С. 87–98.
4. *Звягинцев Д.Г.* Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во Моск. ун-та. 1991. С. 302.
5. *Иванова Е.А., Кутовая О.В., Тхакахова А.К., Чернов Т.И., Першина Е.В., Маркина Л.Г., Андронов Е.Е., Козут Б.М.* Структура микробного сообщества агрегатов чернозема типичного в условиях контрастных вариантов сельскохозяйственного использования // Почвоведение. 2015. № 11. С. 1367–1382. doi: [10.7868/S0032180X15110088](#)
6. *Кутовая О.В., Гребенников А.М., Чевердин Ю.И., Маркина Л.Г.* [Влияние длительности использования агрочерноземов в земледелии на мезофауну и активность микрофлоры](#) // Аграрная Россия. 2017. № 1. С. 2–9.
7. *Кутовая О.В., Лебедева М.П., Тхакахова А.К., Иванова Е.А., Андронов Е.Е.* Метагеномная характеристика биологического разнообразия крайнеаридных пустынных почв Казахстана // Почвоведение. 2015. № 5. С. 554–561. doi: [10.7868/S0032180X15050044](#)
8. *Кутовая О.В., Тхакахова А.К., Чевердин Ю.И.* [Влияние поверхностного переувлажнения на биологические свойства лугово-черноземных почв Каменной Степи](#) // Бюл. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. 2016. Вып. 82. С. 56–70. doi: [10.19047/0136-1694-2016-82-56-70](#)
9. *Лысак Л.В., Лапыгина Е.В., Конова И.А., Звягинцев Д.Г.* [Численность и таксономический состав наночастиц бактерий в некоторых почвах России](#) // Почвоведение. 2010. № 7. С. 819–824.

10. *Марфенина О.Е., Никитин Д.А., Иванова А.Е.* Структура грибной биомассы и разнообразие культивируемых микросцистов в почвах Антарктиды (станции Прогресс и Русская) // Почвоведение. 2016. № 8. С. 991–999. doi: [10.7868/S0032180X16080074](https://doi.org/10.7868/S0032180X16080074)
11. *Полянская Л.М., Гейдебрехт В.В., Звягинцев Д.Г.* [Биомасса грибов в различных типах почв](#) // Почвоведение. 1995. №5. С. 566–572.
12. *Полянская Л.М., Горбачева М.А., Милановский Е.Ю., Звягинцев Д.Г.* [Развитие микроорганизмов в аэробных и анаэробных условиях в черноземе](#) // Почвоведение. 2010. № 3. С. 356–360.
13. *Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г.* [Содержание и структура микробной биомассы как показатель экологического состояния почв](#) // Почвоведение. 2005. № 6. С. 706–714.
14. *Семенов М.В., Манучарова Н.А., Степанов А.Л.* Распределение метаболически активных представителей прокариот (архей и бактерий) по профилям чернозема и бурой полупустынной почвы // Почвоведение. 2016. № 2. С. 239–248. doi: [10.7868/S0032180X16020106](https://doi.org/10.7868/S0032180X16020106)
15. *Хитров Н.Б., Герасимова М.И., Бронникова М.А., Завская Э.П.* Центрально-черноземный государственный природный биосферный заповедник имени профессора В.В. Алехина // Путеводитель научных экскурсий XII Международного симпозиума и полевого семинара по паеопочвоведению. 2013. С. 122.
16. *Чернов Т.И., Лебедева М.П., Тхакахова А.К., Кутковая О.В.* Профильный анализ микробиомов сопряженных почв солонцового комплекса Прикаспийской низменности // Почвоведение. 2017. № 1. С. 71–76. doi: [10.7868/S0032180X1701004X](https://doi.org/10.7868/S0032180X1701004X)
17. *Ahmed M., Oades J.M., Ladd J.N.* Determination of ATP in soil: effect of soil treatments // Soil Biol. Biochem. 1982. V. 14. P. 273–279. doi: [10.1016/0038-0717\(82\)90037-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(82)90037-2)
18. *Anderson J.P.E., Domsch K.H.* Quantities of plant nutrients in the microbial biomass of selected soils // Soil Science. 1980. V. 130. P. 211–216.
19. *Anderson T.H., Domsch K.H.* Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils // Soil Biol. Biochem. 1989. V. 21. P. 471–479. doi: [10.1016/0038-0717\(89\)90117-X](https://doi.org/10.1016/0038-0717(89)90117-X)
20. *Bloem J., Bolhuis P.R., Veninga M.R., Wieringa J.* Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil // Methods Appl. Soil Microbiol. Biochem. 1995. P. 162–173.
21. *Christie P., Beattie J.A.M.* Significance of sample size in measurement of size microbial biomass by the chloroform fumigation-incubation method // Soil Biol. Biochem. 1987. V. 19. P. 149–152. doi: [10.1016/0038-0717\(87\)90074-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90074-5)
22. *Cui H., Wang C., Gu Z., Zhu H., Fu S., Yao Q.* Evaluation of soil storage methods for soil microbial community using genetic and metabolic fingerprints // Eur. J. f Soil Biol. 2014. V.63. P. 55–63. doi: [10.1016/j.ejsobi.2014.05.006](https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.05.006)

23. *Eiland F.* An improved method for determination of adenosine triphosphate (ATP) in soil // *Soil Biol. Biochem.* 1979. V. 11(3). P. 1–35.
24. *Henry H.A.* Soil freeze–thaw cycle experiments: trends, methodological weaknesses and suggested improvements // *Soil Biol. Biochem.* 2007. V. 39(5). P. 977–986. doi: [10.1016/j.soilbio.2006.11.017](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.11.017)
25. *Maggi O., Tosi S., Angelova M., Lagostina E., Fabbri A.A., Pecoraro L., Turchetti B.* Adaptation of fungi, including yeasts, to cold environments // *Plant Biosystems-An Int. J. Dealing with all Aspects of Plant Biol.* 2013. V. 147(1). P. 247–258. doi: [10.1080/11263504.2012.753135](https://doi.org/10.1080/11263504.2012.753135)
26. *Panikov N.S.* Subzero Activity of Cold-Adapted Yeasts. In *Cold-adapted Yeasts*. Berlin Heidelberg, Springer, 2014. P. 295–323.
27. *Travadon R., Lawrence D.P., Rooney-Latham S., Gubler W.D., Wilcox W.F., Rolshausen P.E., Baumgartner K.* Cadophora species associated with wood-decay of grapevine in North America // *Fungal Biol.* 2015. V. 119(1). P. 53–66.
28. *West A.W., Sparling G.P.* Modifications to the substrate-induced respiration method to permit measurement of microbial biomass in soils of-differing water contents // *J. Microbiol. Methods.* 1986. V. 5. P. 177–189. doi: [10.1016/0167-7012\(86\)90012-6](https://doi.org/10.1016/0167-7012(86)90012-6)
29. *Zelles L., Adrian P., Bai Q.Y., Stepper K., Adrian M.V., Fischer K., Maier A., Ziegler A.* Microbial activity measured in soils stored under different temperature and humidity conditions // *Soil Biol. Biochem.* 1991. V. 23(10). P. 955–962. doi: [10.1016/0038-0717\(91\)90176-K](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90176-K)
30. *Žiřčáková L., Větrovský T., Howe A., Baldrian P.* Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter // *Environ. Microbiol.* 2016. V. 18(1). P. 288–301. doi: [10.1111/1462-2920.13026](https://doi.org/10.1111/1462-2920.13026)

THE IMPACT OF LOW TEMPERATURES ON THE STRUCTURE OF THE MICROBIAL BIOMASS DURING THE SOIL SAMPLES STORAGE

**D. A. Nikitin^{1,2,*}, T. I. Chernov¹, A. K. Tkhakakhova¹,
M. V. Semenov¹, N. A. Bgazhba^{1,2}, A. D. Zhelezova^{1,2},
O. E. Marfenina², O. V. Kutovaya¹**

¹*V.V. Dokuchaev Soil Science Institute,
Russia, 119017, Moscow, Pyzhevskii per. 7-2*

²*Lomonosov Moscow State University,
Russia, 119991, Moscow, Leninskie Gory, 1*

The assessment of the microbial biomass structure in the soil samples from A and C horizons, stored at the temperature of +5 and –70°C was conducted by a luminescence method. For the samples from the humus layer a significant de-

crease of biomass during the cryostorage was revealed. However, in the sample from the mineral layer at the same storage conditions such a decrease occurred in a lesser degree. The decrease of fungi mycelium length was observed in the sample, which was stored at the temperature -70°C . Also, the decrease of the number of fungi spores with large diameter ($d > 5 \text{ mkm}$) and the absence of the largest spores ($d > 7 \text{ mkm}$) was observed. The mycelium length of the pure culture of *Cadophora novi-eboraci* fungi was a bit decreased after the storage of samples at $+5^{\circ}\text{C}$. Under conditions of negative temperatures (-18 and -80°C) the mycelium length was decreased by 28% during the first days, and by 32% on the 14-th day of the incubation. The data obtained stipulate that the storage of samples under conditions of negative temperatures leads to the decrease of biomass and number of microorganisms within the soil. Therefore, it is not recommended to store soil samples under conditions of negative temperatures if it is planned to assess the structure of microbial biomass by the direct method of luminescent microscopy.

Keywords: biomass structure, bacteria, fungi, *Cadophora novi-eboraci*, luminescent microscopy, typical chernozem, storage of samples

REFERENCES

1. Vasilenko Ye.S., Kutovaya O.V., Tkhakhova A.K., Martynov A.S. Changes in the intensity of soil-biological processes caused by different-sized aggregates of migratory-mycelial chernozems, *Byulleten Pochvennogo instituta im. V.V. Dokuchaeva*, 2014, V. 73, pp. e70-e81.
2. Golovchenko A.V., Dobrovolskaya N.G., Inisheva L.I. Structure and reserves of microbial biomass in oligotrophic peat bogs of the Southern taiga of Western Siberia, *Pochvovedenie*, 2002, No. 12, pp. 1468-1473.
3. Zhelezova A.D., Kutovaya O.V., Dmitrenko V.N., Tkhakhova A.K., Khohlov S.F. Estimation of dna quantity in different groups of microorganisms within genetic horizons of the dark-gray soil, *Byulleten Pochvennogo instituta im. V.V. Dokuchaeva*, 2015, V. 78, pp. e72-e81.
4. Zvyagintsev D.G. *Methods of soil microbiology and biochemistry*. Moscow: Izd-vo Mosk. University, 1991, pp. 302. (in Russian)
5. Ivanova E.A., Kutovaya O.V., Tkhakhova A.K., Chernov T.I., Pershina E.V., Markina L.G., Andronov E.E., Kogut B.M. The Structure of Microbial Community in Aggregates of a Typical Chernozem Aggregates under Contrasting Variants of Its Agricultural Use, *Eurasian Soil Science*, 2015. V. 48 (11), pp. 1242-1256. doi: 10.1134/S1064229315110083
6. Kutovaya O.V., Grebennikov A.M., Cheverdin Yu.I., Markina L.G. Influence of duration of use of agrochernozems in agriculture on mesofauna and activity of microflora, *Agrarian Russia*, 2017, № 1, pp. 2-9. (in Russian)
7. Kutovaya O.V., Lebedeva M.P., Tkhakhova A.K., Ivanova E.A., Andronov E.E. Metagenomic Characterization of Biodiversity in the Extremely Arid Desert

Soils of Kazakhstan, *Eurasian Soil Science*, 2015, V. 48 (5), pp. 493-500. doi: 10.1134/S106422931505004X

8. Kutovaya O.V., Tkhakakhova A.K., Cheverdin Yu. I. Effects of surface flooding on biological properties of meadow-chnozems in Kamennaya steppe, *Byulleten Pochvennogo instituta im. V.V. Dokuchaeva*, 2017, V. 82, pp. 56-71. doi: 10.19047/0136-1694-2016-82-56-70 (in Russian)

9. Lysak L.V., Lapygina E.V., Konova I.A., Zvyagintsev D.G. Population Density and Taxonomic Composition of Bacterial Nanoforms in Soils of Russia, *Eurasian Soil Science*, 2010, V. 43(7), pp. 765-770. doi: 10.1134/S1064229310070069

10. Marfenina O.E., Nikitin D.A., Ivanova A.E. The Structure of Fungal Biomass and Diversity of Cultivated Micromycetes in Antarctic Soils (Progress and Russkaya Stations), *Eurasian Soil Science*, 2016. V. 49(8), pp. 934-941. doi: 10.1134/S106422931608007X

11. Polyanskaya L.M., Geidebrecht V.V., Zvyagintsev D.G. Biomass of fungi in different types of soils, *Pochvovedenie*, 1995, No. 5, pp. 566-572. (in Russian)

12. Polyanskaya L.M., Gorbacheva M.A., Milanovskii E.Yu., Zvyagintsev D.G. Development of Microorganisms in the Chernozem Under Aerobic and Anaerobic Conditions, *Eurasian Soil Science*, 2010. V. 43(3), pp. 328-332. doi: 10.1134/S1064229310030117

13. Polyanskaya L.M., Zvyagintsev D.G. The content and structure of microbial biomass as an indicator of the ecological state of soils, *Pochvovedenie*, 2005, No. 6, pp. 706-714. (in Russian)

14. Semenov M.V., Manucharova N.A., Stepanov A.L. Distribution of Metabolically Active Prokaryotes (Archaea and Bacteria) throughout the Profiles of Chernozem and Brown Semidesert Soil, *Eurasian Soil Science*, 2016. V. 49 (2), pp. 217-225. doi: 10.1134/S1064229316020101

15. Khitrov N.B., Gerasimova M.I., Bronnikova M.A., Zazovskaya E.P. Central Black Earth State Natural Biosphere Reserve named after Professor V.V. Alekhina, *Guidebook of scientific excursions of the XII International Symposium and Field Seminar on Paleo-Soil Science*, 2013, pp. 122. (in Russian)

16. Chernov T.I., Lebedeva M.P., Tkhakakhova A.K., Kutovaya O.V. Profile Analysis of Microbiomes in Soils of Solonetz Complex in the Caspian Lowland, *Eurasian Soil Science*, 2017. V. 50(1), pp. 64-69. doi: 10.1134/S1064229317010045

17. Ahmed M., Oades J.M., Ladd J.N. Determination of ATP in soil: effect of soil treatments, *Soil Biol. Biochem.* 1982. V. 14. P. 273-279. doi: 10.1016/0038-0717(82)90037-2

18. Anderson J.P.E., Domsch K.H. Quantities of plant nutrients in the microbial biomass of selected soils, *Soil Science*. 1980. V. 130. P. 211-216.

19. Anderson T.H., Domsch K.H. Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils, *Soil Biol. Biochem.* 1989. V. 21. P. 471-479. doi: 10.1016/0038-0717(89)90117-X

20. Bloem J., Bolhuis P.R., Veninga M.R., Wieringa J. Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil, *Methods Appl. Soil Microbiol. Biochem.* 1995. P. 162-173.

21. Christie P., Beattie J.A.M. Significance of sample size in measurement of size microbial biomass by the chloroform fumigation-incubation method, *Soil Biol. Biochem.* 1987. V. 19. P. 149–152. doi: 10.1016/0038-0717(87)90074-5
22. Cui H., Wang C., Gu Z., Zhu H., Fu S., Yao Q. Evaluation of soil storage methods for soil microbial community using genetic and metabolic fingerprintings, *Eur. J. Soil Biol.* 2014. V.63. P. 55–63. doi: 10.1016/j.ejsobi.2014.05.006
23. Eiland F. An improved method for determination of adenosine triphosphate (ATP) in soil, *Soil Biol. Biochem.* 1979. V. 11(3). P. 1–35.
24. Henry H.A. Soil freeze–thaw cycle experiments: trends, methodological weaknesses and suggested improvements, *Soil Biol. Biochem.* 2007. V. 39(5). P. 977–986. doi: 10.1016/j.soilbio.2006.11.017
25. Maggi O., Tosi S., Angelova M., Lagostina E., Fabbri A.A., Pecoraro L., Turchetti B. Adaptation of fungi, including yeasts, to cold environments, *Plant Bio-systems-An Int. J. Dealing with all Aspects of Plant Biol.* 2013. V. 147(1). P. 247–258. doi: 10.1080/11263504.2012.753135.
26. Panikov N.S. *Subzero Activity of Cold-Adapted Yeasts.* In Cold-adapted Yeasts. Berlin Heidelberg, Springer, 2014. P. 295–323.
27. Travadon R., Lawrence D.P., Rooney-Latham S., Gubler W.D., Wilcox W.F., Rolshausen P.E., Baumgartner K. Cadophora species associated with wood-decay of grapevine in North America, *Fungal Biol.* 2015. V. 119(1). P. 53–66.
28. West A.W., Sparling G.P. Modifications to the substrate-induced respiration method to permit measurement of microbial biomass in soils of differing water contents, *J. Microbiol. Methods.* 1986. V. 5. P. 177–189. doi: 10.1016/0167-7012(86)90012-6
29. Zelles L., Adrian P., Bai Q.Y., Stepper K., Adrian M.V., Fischer K., Maier A., Ziegler A. Microbial activity measured in soils stored under different temperature and humidity conditions, *Soil Biol. Biochem.* 1991. V. 23(10). P. 955–962. doi: 10.1016/0038-0717(91)90176-K
30. Žifčáková L., Větrovský T., Howe A., Baldrian P. Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter, *Environ. Microbiol.* 2016. V. 18(1). P. 288–301. doi: 10.1111/1462-2920.13026

Ссылки для цитирования

Никитин Д. А., Чернов Т. И., Тхакахова А. К., Семёнов М. В., Бгажба Н. А., Железова А. Д., Марфенина О. Е. Влияние низких температур на структуру микробной биомассы в почвенных образцах при их хранении // Бюл. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. 2017. Вып. 89. С. 36-53. doi: 10.19047/0136-1694-2017-89-36-53

Nikitin D. A., Chernov T. I., Tkhakakhova A. K., Semenov M. V., Bgazhba N. A., Zhelezova A. D., Marfenina O. E., Kutovaya O. V. The impact of low temperatures on the structure of the microbial biomass during the soil samples storage, *Byulleten Pochvennogo instituta im. V.V. Dokuchaeva*, 2017, Vol. 89, pp. 36-53. doi: 10.19047/0136-1694-2017-89-36-53