

1977

УДК 631.46→576.8

Т. В. АРИСТОВСКАЯ, А. ТЕН ХАК МУН, Т. Н. ЕФРЕМОВА,  
Л. В. ЗЫКИНА, О. М. ПАРИНКИНА

## О МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДАХ К ИЗУЧЕНИЮ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МИКРОФЛОРЫ ПОЧВЫ

Неравномерное распределение микроорганизмов в почве затрудняет получение надежных данных по количественной характеристике микрофлоры. Показано, что для снижения влияния пространственной неоднородности почвы целесообразно одновременное использование нескольких параллельно взятых смешанных образцов, составленных из большого количества индивидуальных проб, что обеспечивает получение статистически достоверных результатов.

В связи с развитием работ по исследованию кратковременных и сезонных колебаний численности микроорганизмов в почвах, а также по изучению количественных изменений почвенной микрофлоры под влиянием хозяйственной деятельности человека мы считаем своевременным обсудить некоторые методические вопросы почвенной микробиологии, наиболее важные, на наш взгляд, для правильного решения упомянутых выше проблем.

Принимая во внимание неоднородность почвы в пространственном отношении и очаговое развитие в ней микроорганизмов, необходимо уделять особое внимание методическим приемам, обеспечивающим получение наиболее доброкачественного первичного материала, и рассмотреть математические критерии, дающие возможность дифференцировать пространственные изменения микрофлоры от временных, случайные от закономерных.

Важность правильного методического подхода к оценке количественных изменений микрофлоры особенно бросается в глаза и чаще учитывается исследователями при изучении временных колебаний численности почвенных микроорганизмов в связи с необходимостью отличить эти изменения от пространственных. В других же случаях этим методическим вопросам обычно придается меньшее значение и они, если не полностью игнорируются, то сильно недооцениваются.

Следует заметить, что за сравнительно редкими исключениями в опубликованных работах полученные авторами данные даже по сезонным изменениям микрофлоры, не говоря уже о работах по изучению влияния тех или иных агротехнических мероприятий на микрофлору, до сих пор приводятся без какой-либо статистической оценки получаемых результатов, без приведения доказательств достоверности обнаруживаемых различий и часто даже без указания объема выборок, взятых для анализа. А между тем приведение всех этих данных является в равной мере обязательным как для подтверждения наличия временных изменений, так и изменений, вызванных влиянием тех или иных факторов среды на микрофлору, и, наконец, для доказательства различий между разными почвами в микробиологическом отношении.

При рассмотрении узловых методических вопросов мы хотим воспользоваться опытом, накопленным в процессе выполнения работ по Международной биологической программе в области почвенной микро-

биологии. Во время этих исследований методическим приемам уделялось большое внимание, так как в задачу входило изучение ритмики кратковременных колебаний численности и биомассы бактерий и водорослей с целью определения уровня продуктивности этих микроорганизмов в разных почвах. Скорость размножения этих микроорганизмов в природных условиях и суммарный вес продуцируемых ими за тот или иной период времени клеток вычисляли на основании результатов их ежедневного количественного учета методом прямого счета под микроскопом.

Несмотря на то что факт существования статистически достоверных кратковременных колебаний содержания бактерий в почвах давно установлен [11, 10 и др.], в каждом конкретном случае даже при обнаружении очень резких колебаний численности достоверность временных количественных изменений должна быть подтверждена математически.

Из-за пространственной неоднородности почвы для получения достаточно репрезентативных данных необходимо каждый раз анализировать образцы, взятые в разных частях изучаемого участка. Однако большая трудоемкость существующих методов количественного учета делает невозможным ежедневное проведение всех операций с большим числом повторностей. Поэтому влияние пространственной неоднородности почвы необходимо тем или иным путем снизить.

Торнтон и Грей [11], а затем Тейлор [10] и некоторые другие исследователи вместо большого количества параллельно взятых индивидуальных образцов использовали несколько смешанных проб, которые анализировали одновременно. Данные Тейлора [11] показали, что при исследовании 2 смешанных образцов, составленных из 6 индивидуальных проб (каждый), сходимость результатов оказывается достаточно высокой. Результаты работ по Международной биологической программе в Советском Союзе также подтвердили целесообразность работы со смешанными образцами при изучении временных изменений почвенной микрофлоры. Действительно, путем замены математического усреднения цифровых данных физическим усреднением параллельно взятых проб может быть достигнуто снижение влияния неравномерного распределения микроорганизмов в пространстве на результаты.

Весьма ответственным моментом работы является выбор участка для проведения ежедневных наблюдений. Из биометрии известно, что для репрезентативности выборки необходим случайный отбор, т. е. рендомизация. Принимая во внимание то, что почвенный покров даже сравнительно небольшой территории может отличаться значительной пестротой, при изучении временных колебаний численности рендомизацию целесообразнее проводить на предварительно выбранном, по возможности однородном участке, где гетерогенность почвы и растительного покрова были бы выражены в наименьшей степени.

Территорию выбранного участка следует разбить на несколько площадок, и в дальнейшем с каждой из них ежедневно брать (желательно буром) пробы для приготовления смешанных образцов. В каждый образец должно входить по одной пробе с каждой площадки. Смешанные образцы следует брать в нескольких повторностях (3 и более). В некоторых случаях при хорошей сходимости результатов для всех параллельных образцов (по данным предварительных подсчетов) можно пользоваться несколькими навесками из одного образца, полученного путем смешения большого количества индивидуальных проб (10—15), взятых в разных частях территории участка, но при этом желательно увеличить число повторных навесок и препаратов. Каждый смешанный образец должен быть тщательно гомогенизирован и в тот же день использован для приготовления препаратов.

Принимая во внимание имеющиеся в литературе данные о наличии внутрисуточных колебаний численности бактерий в почвах [11, 10, 9,

4), образцы почв для анализа следует брать каждый день в одни и те же часы суток. Интервал времени между взятием образца и приготовлением препаратов должен быть тоже всегда одинаковым.

Для того чтобы влияние индивидуальных технических ошибок на протяжении всего эксперимента (особенно по выявлению временных различий в микрофлоре) было одинаковым, каждая операция по подготовке почвы к анализу, изготовлению препаратов и счету клеток под микроскопом должна выполняться одними и теми же лицами. Необходимое число параллельных стекол в каждой повторности следует определять индивидуально, но оно не должно быть менее двух. При работе по методу Виноградского в модификации Шульгиной обычно рекомендуется (при использовании объектива 90) на каждом препарате просчитывать клетки в 50 полях зрения, но при увеличении количества повторных препаратов число полей зрения можно сократить. Трольдене [12] с помощью вариационно-статистического анализа показал, что снижение числа параллельных препаратов в большей степени увеличивает ошибку опыта, чем уменьшение числа просчитываемых на них полей зрения. Автор рекомендует считать число клеток в шести полях зрения на каждом из 10 параллельных препаратов.

Математическую обработку полученных первичных цифр можно начать с вычисления среднего количества бактерий, находящегося в 1 г почвы каждого из параллельно взятых смешанных образцов, а затем на основании средних цифр путем математических расчетов получить количественную характеристику соответствующей микрофлоры всего участка. В этом случае общий объем выборки будет равен числу одновременно взятых смешанных образцов. Можно пользоваться и другим способом обработки данных. Следует отметить, что каждый индивидуальный образец даже очень незначительного объема, например, навеску, из которой готовится почвенная суспензия, можно рассматривать как смешанный образец, состоящий в свою очередь из  $n$  количества микрообразцов, распределяемых в виде суспензии на стекле для подсчета. Следовательно, общий объем выборки в этом случае можно считать равным произведению числа отобранных образцов на количество препаратов. При первом способе обработки данных точность вычисленных результатов будет несколько занижена, во втором — завышена. Расхождения между данными, получаемыми при подсчетах бактерий на параллельных препаратах, приготовленных из одной и той же суспензии, а также отчасти различия между одновременно взятыми смешанными образцами зависят от тщательности гомогенизации почвы и навыка работы оператора. Обычно при подготовке навески к посеву и приготовлении суспензии достигается более тщательная гомогенизация материала, чем при смешении параллельно взятых почвенных проб (приготовление смешанного образца). Поэтому варьирование количества микробных клеток на разных препаратах, приготовленных из одной суспензии, должно быть меньшим, чем варьирование их числа в параллельно взятых смешанных образцах. Однако в действительности это не всегда оказывается так. Для иллюстрации приводим полученные за несколько дней первичные результаты количественного учета бактерий в верхнем горизонте одной из болотных почв тундры (табл. 1).

Данная почва представляла собой один из наиболее неблагоприятных объектов для количественного изучения микрофлоры, так как торфяную массу взятого образца было значительно труднее гомогенизировать, чем пробу какой-либо минеральной почвы. Высокая влагоемкость торфа также не способствовала точности исследования. Все это не могло не отразиться на результатах. Сравнение выборочных дисперсий путем вычисления отношения дисперсии одной совокупности (расхождение количества клеток между повторными образцами) к дисперсии другой (различие между параллельными препаратами) показывает,

что достоверность более сильного варьирования численности микроорганизмов в разных образцах по сравнению с разными препаратами из одного образца доказывается не во всех случаях (в 4 случаях подчеркнуто волнистой линией —  $F < F_{st}$  с  $P=0,95$ ).

При статистической обработке результатов изучения кратковременных колебаний численности микробных клеток в почвах исследованных территорий для каждого объекта вычисляли общее среднее арифметическое из всего объема подсчетов  $M$  и соответствующую ошибку для каждого дня наблюдений. Величина ошибки среднего арифметического имела в данном случае факторное значение, так как отражала и степень влияния пространственной неоднородности почвы.

Достоверность различий между пробами, взятыми в разные дни (т. е. наличие временных изменений численности бактерий), оценивали по стандартным значениям критерия Стьюдента для двух смежных дат

(по формуле:  $t = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{m_1 + m_2}}$ , где  $x_1$  и  $x_2$  — среднее содержание бактерий

в почве в разные дни,  $m_1$  и  $m_2$  — соответствующие ошибки среднего

Таблица 1

Результаты подсчета числа клеток в трех параллельно взятых смешанных образцах (среднее количество клеток в поле зрения) из верхнего горизонта болотной почвы \*

Номер образца	18.VII		19.VII		20.VII		21.VII	
	1	2	1	2	1	2	1	2
I	12,4	11,4	18,6	18,1	16,6	18,4	37,2	38,2
II	15,8	16,4	19,9	20,0	17,1	17,4	21,8	33,5
III	16,9	16,5	18,2	18,8	21,0	18,7	32,0	33,3
$F^{**}$	52,62		15,70		2,88		2,23	
	22.VII		23.VII		24.VII		25.VII	
I	21,0	20,4	35,0	27,4	37,6	36,3	35,95	33,4
II	23,5	21,9	23,9	25,3	39,8	38,1	40,6	38,6
III	21,0	20,5	44,8	38,9	41,4	39,9	50,7	52,4
$F^{**}$	4,92		9,62		6,02		283,47	

\* Из каждого образца готовили по 2 препарата, на каждом препарате просчитывали по 50 полей зрения.

\*\*  $F_{st}=9,6$  при  $P=0,95$ .

арифметического). В большинстве случаев такая обработка оказывается достаточной для подтверждения наличия временных колебаний количества микробных клеток. Проведение математического анализа данных по расширенной программе следует считать излишним или по крайней мере необязательным, если доказывается достоверность различий средних величин. Если же полученные первичные цифры различаются пестротой и различия средних показателей по  $t$  не доказываются, то требуется более детальная обработка материала, к чему мы вернемся ниже.

Для подтверждения сказанного приведем результаты дополнительной математической обработки некоторых частично уже опубликованных ранее материалов по кратковременным колебаниям численности и биомассы бактерий в некоторых почвах СССР. Эти материалы были получены и в свое время обработаны в соответствии с приведенными выше методическими рекомендациями. В настоящее время мы дополнительно определили соответствующие доверительные интервалы для среднего арифметического с вероятностью  $P=0,95$  и провели дисперсионный анализ.

На приведенных ниже графиках (рис. 1—3) даны кривые временных изменений численности бактерий на фоне соответствующих дове-

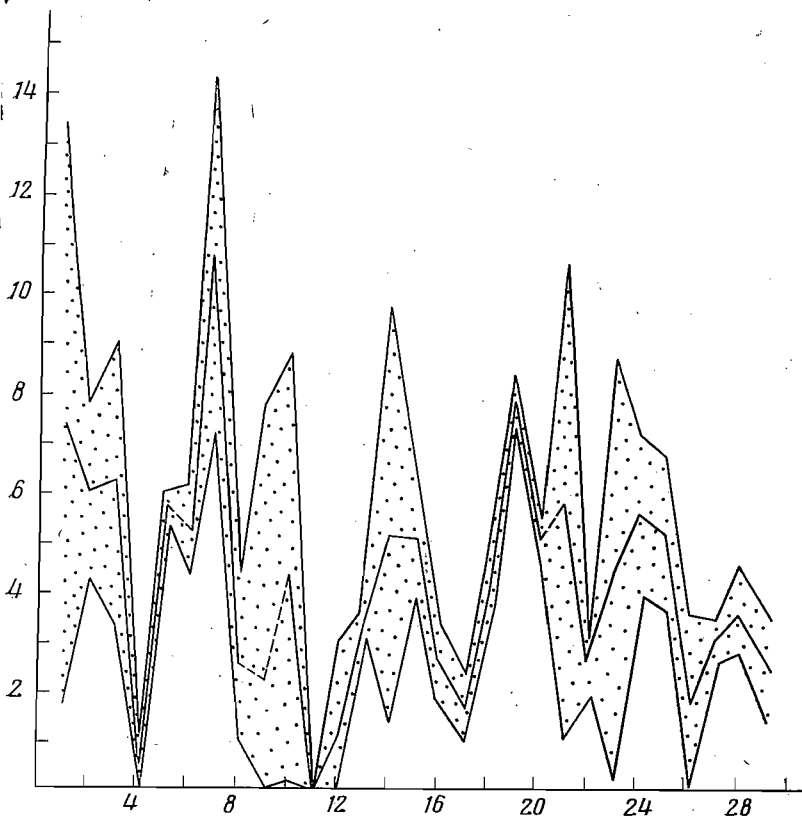


Рис. 1. Кратковременные колебания численности бактерий в тундровой остаточно-глеевой пропитанно-гумусовой почве корки пятна дриадово-осоково-моховой пятнистой тундры п-ва Таймыр

Сплошная линия в центре заштрихованной зоны — численность бактерий (прерывистой линией обозначены недостоверные по критерию  $t$  изменения); заштрихованная зона — доверительные интервалы значений среднего арифметического. По оси абсцисс — дни наблюдений, по оси ординат — количество бактерий (в млрд/г почвы)

рительных интервалов. Эти графики подтверждают сделанные ранее выводы о реальности обнаруженных кратковременных колебаний в дерново-подзолистой почве Карельского перешейка [6], в тундровой почве п-ва Таймыр [7, 8] и в темноцветной почве полупустыни Западного Казахстана [5]. Кроме того, они более наглядно иллюстрируют степень влияния пространственной неоднородности почвы на полученные в разных случаях данные.

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа всего комплекса данных ежедневного подсчета микробных клеток (табл. 1) показывают, что фактор времени, так же как и пространственная неоднородность почвы, оказывают достоверное влияние на изменение численности микроорганизмов ( $F > F_{st}$  при  $P = 0,999$ ). Однако влияние фактора времени оказывается более сильным, чем пространственная вариабельность распределения микроорганизмов, о чем свидетельствуют приводимые в табл. 2 показатели силы влияния.

Вычисление показателей силы влияния с помощью однофакторного дисперсионного анализа данных, полученных для ряда других почв, (при котором пространство рассматривалось как случайный фактор) также показывает более сильное влияние времени на изменения количества микроорганизмов (табл. 3). В соответствии с высокими значениями дисперсий временных колебаний численности микроорганизмов коэффициенты вариации их значительно больше, чем в случае пространственного варьирования (табл. 4).

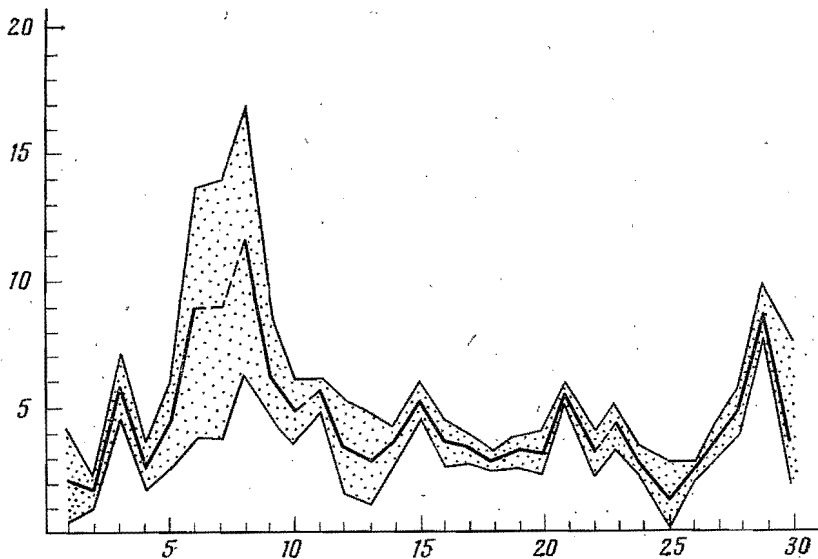


Рис. 2. Кратковременные колебания численности бактерий в дерново-подзолистой супесчаной почве под лугом на Карельском перешейке  
Обозначения см. рис. 1

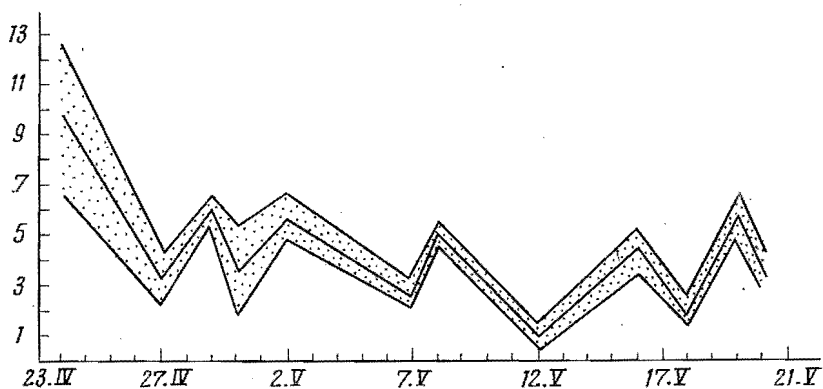


Рис. 3. Кратковременные колебания численности бактерий в темноцветной почве западин в полупустыне Западного Казахстана  
Обозначения см. рис. 1

Какие же минимальные требования следует предъявлять исследователям в отношении уровня необходимой математической обработки? Ответ на этот вопрос не может быть однозначным, так как многое зависит от целей и методов исследования. В рассмотренных нами случаях большей частью не было особой необходимости в проведении громоздких дополнительных вычислений, так как стоявший перед нами вопрос о наличии или отсутствии достоверных кратковременных колебаний численности бактерий мог быть решен значительно более простыми средствами, подтверждающими достоверность различий между средними данными для двух смежных дат. Более тщательная математическая обработка становится необходимой лишь в случае обнаружения значительных расхождений в результатах параллельных анализов.

К сказанному можно добавить, что, приступая к изучению каждого нового природного объекта, полезно начинать с выяснения степени пространственной неоднородности подлежащей изучению почвы. Для этого необходимо предварительно проанализировать несколько одновре-

Таблица 2

## Результаты двухфакторного дисперсионного анализа

Показатели	Фактор времени А	Фактор пространства В	Сочетание факторов АВ	Общая факториальная Х	Случайный фактор Z	Сумма у
Дисперсия С	4499,29	213,56	567,0	5279,86	129,74	5407,17
Показатель силы влияния $n^2$	0,832	0,039	0,105	0,976	0,024	1,0
Число степеней свободы V	7	2	14	23	24	47
Варианты $\sigma^2$	642,8	106,8	40,5	229,6	5,6	—
Достоверность по Фишеру F	118,81	19,74	7,49	42,43	—	—
Стандартное значение Fst P=0,999	5,3	9,3	4,2	3,8	—	—

Таблица 3

## Степень влияния факторов пространства и времени на численность бактерий

Почва, пункт, год	Влияние фактора времени, %	Влияние фактора пространства, %	Источник
Дерново-подзолистая супесчаная под лугом, Карельский перешеек, 1969	83	17	Зыкина [6]
Там же, суглинистая, 1969	84	16	»
Корка пятна дриадово-осоково-моховой пятнистой тундры, Таймыр, 1968	93	7	Паринкина [7]
То же, 1969	99	1	Паринкина [8]
То же, 1971	73	27	»
Там же, основная поверхность, 1971	96	4	»
Тундровая перегнойно-глеевая почва бугорка дриадово-осоково-моховой мелкобугорковатой тундры, Таймыр, 1971	98	2	»
Там же, тундровая глеевая почва ложбинки, 1971	90	10	»
Тундрово-дерновая глееватая иллювиально-гумусовая супесчаная береговых яров, 1969	97	3	»
Болотная мерзлотная торфяно-глеевая почва полигонального болота, Таймыр, 1970	67	33	»
Темноцветная черноземовидная почва западин глинистой полупустыни, Западный Казахстан, 1973	91	9	Ефремова [5]
Там же, солончаковый солонец, 1973	97	3	»
	94	6	»
	85	15	»

Таблица 4

## Сопоставление коэффициентов вариации

Почва	Пространственное варьирование	Временное варьирование
Дерново-подзолистая суглинистая почва, Карельский перешеек	23	60
Тундрово-дерновая глееватая иллювиально-гумусовая супесчаная почва береговых яров, Таймыр, 1969	13	140
Корка пятна дриадово-осоково-моховой пятнистой тундры	12	160
Болотная мерзлотная торфяно-глеевая почва полигонального болота, Таймыр	13	38

менно взятых в разных частях соответствующего участка образцов и после проведения их анализа математически вычислить, из какого числа индивидуальных проб должны состоять смешанные образцы и в каком количестве повторностей их следует брать для обеспечения надежности результатов. При этом для определения объема выборки можно использовать формулы, приведенные в руководствах Ашмарина и Воробьева [2], Дмитриева [3] и др. Следует заметить, что в практике почвенно-микробиологических исследований микробиологи редко прибегают к проведению предварительных опытов, а обычно страхуют себя от неудач, смешивая произвольно взятое и большей частью вполне достаточное количество проб для получения средних образцов.

Предварительное определение необходимого числа повторностей особенно важно в том случае, когда сходимость данных для параллельных подсчетов очень низкая и достоверность разности средних данных, получаемых в разное время, не доказывается по критерию Стьюдента  $t$ .

Обсуждая вопрос о количественной характеристике микрофлоры почвы, мы считаем целесообразным коснуться особенностей пространственного распределения почвенных микроорганизмов, в частности рассмотреть, в каких соотношениях находится микроочаговость их развития с общими закономерностями формирования микрофлоры в экологических условиях той или иной однородной территории. Пространственная изоляция отдельных микроколоний друг от друга, наблюдаемая при микроскопическом исследовании почвы, может создать иллюзию автономности функционирования изолированных очагов и независимости их развития от развития других компонентов экосистемы.

Не следует, однако, забывать, что каждый изолированный очаг является частью целого и обитающие в нем микроорганизмы испытывают влияние не только микролокальных факторов, но и факторов, действующих на всей территории, занятой соответствующей почвой со всеми присущими ей особенностями сложения, растительного покрова и т. д. Микрофлору каждой почвы можно рассматривать как своеобразную мозаику, сложенную многократно повторяющимися в пространстве структурными единицами, распределение которых на данной территории подчинено определенным закономерностям. Отдельные микроколонии представляют собой как бы первичные структурные единицы экосистемы. Качественный состав этих единиц, частота их встречаемости и ритмика жизнедеятельности зависят от многих причин. Среди действующих на них факторов можно дифференцировать факторы микролокального значения и общие факторы, оказывающие влияние на все очаги развития микроорганизмов в той или иной почве.

Связь между пространственно изолированными очагами обеспечивается как физико-химическим, так и биологическим путями. Изменения напряженности абиотических факторов, ритмики жизнедеятельности растений и животных находят свое отражение в характере жизнедеятельности микроорганизмов, и реакция микрофлоры на эти изменения в однотипных очагах должна быть более или менее однозначной.

### Выводы

1. При изучении количественных изменений почвенной микрофлоры необходимо по возможности снижать влияние пространственной неоднородности почвы на результаты количественного учета.

2. Параллельное использование нескольких смешанных образцов, составленных из большого числа индивидуальных проб, обеспечивает получение статистически достоверных данных.

3. При незначительном расхождении результатов параллельных анализов статистическую обработку можно ограничить вычислением



средних арифметических со статистической оценкой разности выборочных средних. При значительной пестроте первичных цифр их следует подвергнуть более основательному математическому анализу.

4. До начала изучения количественных изменений микрофлоры целесообразно первоначально определить необходимый объем выборки, обеспечивающий получение результатов с требуемой вероятностью.

#### Литература

1. *Аристовская Т. В.* Теоретические аспекты проблемы численности, биомассы и продуктивности почвенных микроорганизмов. В сб.: Вопросы численности биомассы и продуктивности почвенных микроорганизмов. «Наука», 1972.
2. *Ашмарин И. П., Воробьев А. А.* Статистические методы в микробиологических исследованиях. Медгиз, 1962.
3. *Дмитриев Е. А.* Математическая статистика в почвоведении. Изд. МГУ, 1972.
4. *Евдокимова Г. А.* Численность и продуктивность микроорганизмов в ризосфере некоторых злаков в Заполярье. Автореф. дис. Л., 1974.
5. *Ефремова Т. Н.* Динамика кратковременных колебаний численности бактерий в некоторых почвах полупустыни. В сб.: Закономерности развития почвенных микроорганизмов. Л., 1975.
6. *Зыкина Л. В.* Ежедневная динамика численности бактерий в дерново-подзолистых почвах под луговыми угодьями. В сб.: Вопросы численности, биомассы и продуктивности почвенных микроорганизмов. «Наука», 1972.
7. *Паринкина О. М.* К вопросу о продуктивности микробных сообществ в некоторых почвах Западного Таймыра. Л., 1972.
8. *Паринкина О. М.* (Parinkina O. M.). Determination of bacterial growth rates in tundra soils. Bull. Ecol. Res. Comm., 17, Stockholm, 1973.
9. *Clarholm M.* Direct count of bacteria in tundra peat for estimation generation time and biomass production. Techn. Report № 16 Intern. Biol. Progr., Swedish Tundra Biome Project., 1973.
10. *Taylor C. B.* Short-period fluctuations in the numbers of bacterial cells in soil. Proc. Roy. Soc., Ser. B, v. 119, № 814, 1936.
11. *Thornton H. G., Gray P. H.* The fluctuations of bacterial numbers and nitrate content of field soils. Proc. Roy. Soc., London, B, v. CVI, № 746, 1930.
12. *Trolldenier G.* The use of fluorescence microscopy for counting soil microorganisms. Bull. Ecol. Res. Comm., 17, Stockholm, 1973.

Центральный музей  
почвоведения им. В. В. Докучаева

Дата поступления  
16.III.1976 г.

---

#### T. V. ARISTOVSKAYA, A. TEN HAK MUN, T. N. EFREMOVA, L. V. ZYKINA, O. M. PARINKINA ON METHODOLOGICAL APPROACHES TO THE STUDY OF QUANTITATIVE CHANGES OF SOIL MICROFLORA

The attention is paid to the spatial heterogeneity of soil and the ways of decreasing the effect of this heterogeneity on the results of quantitative determination of microflora.

It is suggested to use several simultaneously taken mixed samples composed of a large number of individual samples.

---