

Józef ZWOLIŃSKI*

OZNACZANIE UDZIAŁU GRZYBÓW I BAKTERII W BIOMASIE DROBNOUSTROJÓW GLEB LEŚNYCH

ESTIMATION OF FUNGAL AND BACTERIAL CONTRIBUTIONS
TO MICROBIAL BIOMASS IN FOREST SOILS

Abstract. *The method of selective inhibition of substrate-induced respiration (SIR) by antibiotics was adapted to measure fungal and bacterial contribution to microbial biomass in forest soils. To optimize the concentration of fungicide cycloheximide and bactericide streptomycin, dose-response experiments with pine forest soils were conducted. The results of SIR inhibition indicated that concentration of 90 mg cycloheximide and 25 mg streptomycin g^{-1} soil for organic horizons (Ofh), and 15 mg cyclohexamide and 10 mg streptomycin g^{-1} soil for mineral horizons (AE) caused maximum selective inhibition of SIR. The fungal to bacterial ratio in pine forest soils was found to be above 2.0 and about 1.5 in organic and mineral horizons, respectively.*

Key words: *pine forests, substrate-induced respiration (SIR), soil microbial biomass, selective inhibition of SIR, fungal: bacterial ratio.*

* Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Gospodarki Leśnej Rejonów Przemysłowych,
ul. Św. Huberta 35, 40-952 Katowice, e-mail: zwolinsj@ibles.waw.pl

1. WSTĘP

Grzyby i bakterie uważa się za najważniejsze grupy drobnoustrojów w glebach leśnych, ze względu na ich kluczową rolę w procesach mineralizacji substancji organicznej, gwarantujących stały obieg pierwiastków w ekosystemie. Udział grzybów i bakterii w procesach metabolicznych gleb jest zróżnicowany i zależy od jakości substancji organicznej i jej rozmieszczenia w glebie. Grzyby odznaczają się zdecydowanie większą efektywnością mineralizacji trudno rozkładanych związków, tj. lignin, polifenoli i wielocukrów (Rihani i in. 1995, Möller i in. 1999), natomiast bakterie – cukrów prostych (Nakas, Klein 1980, Stamatiadis i in. 1990) oraz zdolnością metabolizowania produktów pośrednich rozkładu lignin (Rüttiman i in. 1991). Szereg czynników, zarówno naturalnych jak i antropogenicznych, może pośrednio – poprzez zmianę właściwości chemicznych gleb (pH, jakość substancji organicznej, zawartość składników pokarmowych) – wpływać na skład ilościowo-jakościowy drobnoustrojów glebowych. Wcześniejsze badania wykazały, że struktura zespołów drobnoustrojów zmienia się wraz z upływem czasu (Ohtonen i in. 1999, Pennanen i in. 2001), zależąc od składu gatunkowego i wieku drzewostanów (Pennanen i in. 1999, Priha i in. 2001), a także od stosowanych zabiegów agrotechnicznych (Holland, Coleman 1987, Frostegård i in. 1993). Istotny wpływ na skład ilościowo-jakościowy drobnoustrojów glebowych mają również zanieczyszczenia przemysłowe (Bewley, Parkinson 1984, Pennanen i in. 1996). Z powyższych badań wynika, że udział grzybów i bakterii w biomase drobnoustrojów traktować można jako miarodajny wskaźnik stanu mikrobiologicznego gleb, przydatny w badaniach jakości gleb leśnych, zwłaszcza w kontekście ich reakcji na czynniki stresowe i działania gospodarcze.

Do oznaczeń biomasy drobnoustrojów glebowych stosowane są obecnie, oprócz metody bezpośredniej (mikroskopowej), metody chemiczne i fizjologiczne, dające na ogół porównywalne wyniki (Kaiser i in. 1992, Anderson, Joergensen 1997, Beck i in. 1997). Na szczególną uwagę zasługuje metoda SIR, polegająca na pomiarze respiracji indukowanej substratem (Anderson, Domsch 1978), ponieważ jest stosunkowo prosta, precyzyjna (niski współczynnik wariancji) i nie wymaga stosowania toksycznych związków chemicznych (Kaiser i in. 1992). Ponadto, w połączeniu z techniką selektywnej inhibicji – za pomocą specyficznych antybiotyków – pozwala na przybliżone określenie udziału grzybów i bakterii w oznaczonej biomase drobnoustrojów. W metodzie SIR założono, że w ustalonych warunkach, maksymalna respiracja drobnoustrojów w fazie stacjonarnej (tj. przed rozpoczęciem logarytmicznej fazy wzrostu), będąca reakcją na optymalną dawkę łatwo przyswajalnego źródła węgla (np. glukozy), jest wprost proporcjonalna do wielkości biomasy drobnoustrojów, niezależnie od typu gleby. Słuszność tego założenia potwierdziły m.in. cytowane powyżej prace.

Nieliczne dotąd doniesienia dotyczące oznaczeń biomasy grzybów i bakterii z wykorzystaniem metody SIR i selektywnej inhibicji wskazują na to, że miarodajność wyników wiąże się z koniecznością ustalenia optymalnych dawek

antybiotyków, ponieważ ich skuteczność w hamowaniu aktywności drobnoustrojów zależy od właściwości analizowanej gleby (Beare i in. 1990, Scheu, Parkinson 1994). Zbyt niska lub za wysoka dawka może bowiem powodować – odpowiednio – niecałkowitą lub niespecyficzną inhibicję.

Celem pracy* jest przedstawienie sposobu adaptacji metody SIR w połączeniu z techniką selektywnej inhibicji do oznaczeń biomasy grzybów i bakterii w glebach leśnych, na przykładzie badań wykonanych w borach sosnowych.

2. OBIEKT I METODYKA BADAŃ

Badania wykonano na 5 powierzchniach obejmujących lite drzewostany sosnowe (*Pinus sylvestris* L.) III klasy wieku na terenie RDLP Katowice, w nadleśnictwach Rudy Raciborskie, Kędzierzyn, Koszęcin, Świerklaniec i Chrzanów (tab. 1). Występują tam gleby bielcowe: z próchnicą typu moder-mor, stanowiące siedlisko boru mieszanego świeżego (nadleśnictwa Rudy Raciborskie i Kędzierzyn) lub z próchnicą typu mor – siedlisko boru świeżego (w pozostałych nadleśnictwach). Dokładną charakterystykę powierzchni przedstawiają wcześniejsze doniesienia Zwolińskiego i Orła (2000) i Zwolińskiego (2001).

We wrześniu 2004 r. z każdej powierzchni, o obszarze ok. 0,5 ha, pobrano (laską glebową o średnicy 5 cm) po jednej objętościowej próbie zbiorczej (z 10 punktów równomiernie rozmieszczonych na powierzchni) z poziomu organicznego (Ofh) i górnego mineralnego (AE).

Tabela 1. Biomasa drobnoustrojów glebowych w drzewostanach sosnowych

Table 1. Soil microbial biomass in pine forest stands

Pow. nr Plot No.	Nadleśnictwo Forest district	Leśnictwo-oddział Sub-district-compartment	Poziom Horizon	Biomasa drobnoustrojów Microbial biomass	
				mg C _{mic} g ⁻¹ gleby mg C _{mic} g ⁻¹ soil	kg C _{mic} ha ⁻¹
1	Rudy Raciborskie	Kuźnia Raciborska 124 b	Ofh	2,175	276,36
			AE	0,134	101,24
2	Kędzierzyn	Kędzierzyn 196 d	Ofh	1,134	158,91
			AE	0,084	61,57
3	Koszęcin	Dyrdy 39 d	Ofh	3,329	277,59
			AE	0,059	62,47
4	Koszęcin	Zielona 238 n	Ofh	3,226	250,39
			AE	0,058	65,02
5	Chrzanów	Pogorzyce 150 b	Ofh	1,395	164,22
			AE	0,041	40,79

*Badania zrealizowano w ramach tematu BLP-265 zleconego przez Dyрекcję Generalną Lasów Państwowych

Biomasę drobnoustrojów, wyrażoną jako C biomasy (C_{mic}), oznaczono metodą pomiaru respiracji indukowanej substratem (metoda SIR) (Anderson, Domsch 1978). Naważki gleby: z poziomu Ofh – 1 g przesianej przez sito o średnicy oczek 4 mm, a z poziomu AE – 5 g przesianej przez sito 2 mm, doprowadzano do 60% całkowitej pojemności wodnej i inkubowano w butelkach o pojemności 60 ml, w temp. 22°C przez 72 h. Następnie dodano glukozę w ilości powodującej maksymalną respirację drobnoustrojów (SIR), ustalonej wcześniej dla gleb borów sosnowych (Zwoliński 2004), tj. 30 mg i 5 mg glukozy na 1 g gleby, odpowiednio dla poziomów Ofh i AE. Po godzinnej inkubacji w temp. 22 °C, próby „przemywano” przez 2 minuty syntetycznym powietrzem (bez CO₂), butelki zamykano gumową septą, po czym mierzono ilość uwalnianego CO₂ przy użyciu chromatografu gazowego (Perkin Elmer – Clarus 500), stosując hel jako gaz nośny, przy temperaturze injektora, kolumny i detektora odpowiednio 120°C, 30°C i 150°C. Biomasa drobnoustrojów (C_{mic}) obliczono korzystając z równania przedstawionego przez Andersona i Domscha (1978):

$$x = 40,04y + 0,37$$

gdzie x wyraża się w mg $C_{mic} \times g^{-1}$ gleby, y – ml CO₂ $\times g^{-1}$ gleby $\times h^{-1}$.

Jako specyficznych inhibitorów grzybów i bakterii użyto odpowiednio aktidion (cycloheximide) i streptomycynę (siarczan streptomycyny) firmy Fluka. Optymalne dawki tych antybiotyków ustalono na podstawie oznaczeń stopnia inhibicji SIR powodowanej przez dawki 30–110 mg aktidionu na 1 g gleby i 20–40 mg streptomycyny na 1 g gleby w poziomie Ofh oraz przez dawki 5–20 mg aktidionu i streptomycyny na 1 g gleby w poziomie AE, a także oznaczeń addytywnej inhibicji SIR, tj. powodowanej przez łączne działanie różnych dawek obu antybiotyków. W powyższym teście wykorzystano próby glebowe pobrane na pow. nr 5 (tab. 1), które – podobnie jak w przypadku oznaczeń C_{mic} – inkubowano przez 72 h w temp. 22°C, z dodatkiem różnych dawek aktidionu i streptomycyny, oddzielnie lub razem, dalej inkubowano w temp. 5°C przez 4 h, po czym dodano glukozę i oznaczono ilość uwalnianego CO₂, postępując identycznie jak opisano wcześniej.

Udział grzybów i bakterii w biomacie drobnoustrojów obliczono ze stosunku wartości respiracji grzybów (SIR_F) do respiracji bakterii (SIR_B), indukowanych substratem, oznaczając w glebach wszystkich powierzchni SIR (indukowana substratem respiracja bez antybiotyków), SIR_F = SIR- A (SIR po dodaniu optymalnej dawki aktidionu) i SIR_B = SIR- S (SIR po dodaniu optymalnej dawki streptomycyny).

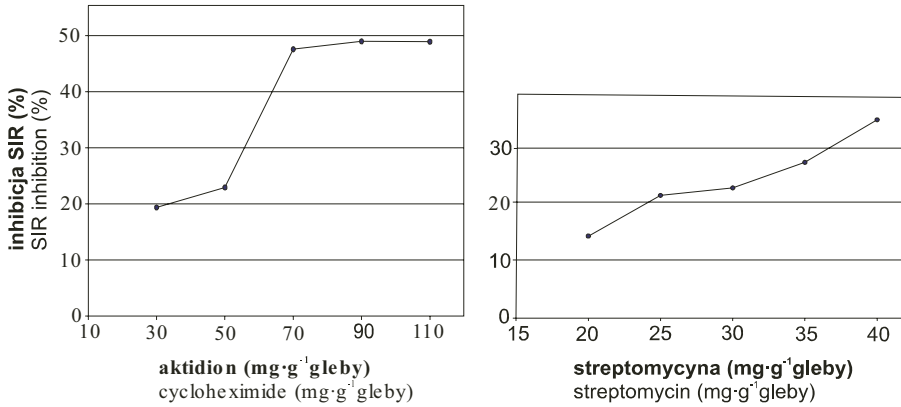
Wszystkie testy i oznaczenia mikrobiologiczne wykonano w trzech powtórzeniach.

3. WYNIKI I Dyskusja

Rozwój drobnoustrojów glebowych jest ściśle związany z zasobnością gleb w substancję organiczną i w podstawowe składniki pokarmowe (Insam, Domsch 1988, Vesterdal 1998, Leirós i in. 2000, Zwoliński 2004). Oznaczona metodą SIR biomasa drobnoustrojów (C_{mic}) w badanych drzewostanach sosnowych była zatem zdecydowanie wyższa w poziomie organicznym (Ofh) niż w poziomie mineralnym AE gleb, w przeliczeniu zarówno na jednostki wagowe gleby, jak i na jednostki powierzchni. W poziomie Ofh biomasa drobnoustrojów kształtowała się w granicach 1,134–3,339 mg C_{mic} na 1 g gleby i 159–278 kg C_{mic} na 1 ha, natomiast w poziomie AE, odpowiednio, 0,041–0,134 mg C_{mic} na 1 g gleby i 41–101 kg C_{mic} na 1 ha (tab. 1).

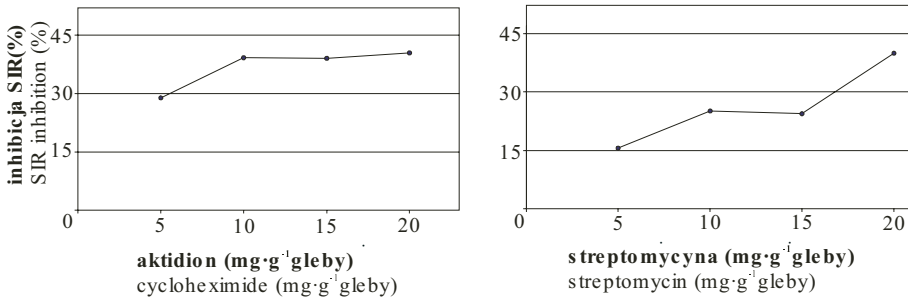
Stosowanie metody SIR wraz z użyciem swoistych antybiotyków (np. aktidionu i streptomycyny), powodujących selektywną inhibicję rozwoju grzybów i bakterii, daje możliwość określenia ich udziału w całkowitej biomacie drobnoustrojów. Wskazuje na to istotna zależność pomiędzy stopniem hamowania SIR przez aktidion i streptomycynę a biomasa grzybów i bakterii, stwierdzona we wcześniejszych doniesieniach (Bewley, Parkinson 1984, West 1986, Wardle, Parkinson 1990, Beare i in. 1990, Sheu, Parkinson 1994). Antybiotyki te inhibują syntezę białek, w tym – wchodzących w skład enzymów biorących udział w procesach oddechowych (Wardle, Parkinson 1990, Sheu, Parkinson 1994).

Uzyskanie miarodajnych wyników inhibicji SIR przez antybiotyki wiąże się z koniecznością optymalizacji metody dla konkretnych warunków glebowych. Właściwości fizykochemiczne gleb leśnych, w tym skład ilościowo-jakościowy substancji organicznej, są zróżnicowane w całym profilu. Ma to zasadniczy wpływ na strukturę zespołów drobnoustrojów w poszczególnych poziomach genetycznych, co w konsekwencji decyduje o efektywności działania użytej dawki antybiotyku. Niewłaściwe dawki mogą powodować niekompletną lub niespecyficzną inhibicję drobnoustrojów. Niezbędne jest zatem ustalenie optymalnych dawek antybiotyków dla poziomów mających szczególne znaczenie dla funkcjonowania ekosystemu, tj. charakteryzujących się wysoką aktywnością mikrobiologicznych procesów rozkładu substancji organicznej. W przypadku gleb bielcowych pod drzewostanami sosnowymi, dotyczy to poziomu organicznego oraz wierzchniego poziomu mineralnego AE (poziom próchniczno-eluwialny). Ważne jest także ustalenie czasu i temperatury inkubacji prób po dodaniu antybiotyku. Nieodpowiednio dobrane prowadzi do szybszej inaktywacji antybiotyku oraz/lub wykorzystania go jako substratu przez drobnoustroje niewrażliwe na jego działanie. W niniejszej pracy, korzystając z wcześniejszych ustaleń Sheu i Parkinsona (1994), zastosowano inkubację prób glebowych – po dodaniu różnych dawek aktidionu i streptomycyny – w temp. 5°C przez 4 godziny, oznaczając stopień inhibicji SIR po dodaniu glukozy.



Ryc. 1. Wpływ antybiotyków na SIR w poziomie organicznym gleb

Fig. 1. Influence of antibiotics on SIR in the organic horizon



Ryc. 2. Wpływ antybiotyków na SIR w poziomie mineralnym gleb

Fig. 2. Influence of antibiotics on SIR in the mineral horizon

W poziomie organicznym (Ofh) aktidion spowodował około 20% inhibicję SIR przy dawkach 30 i $50 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ gleby oraz prawie 50% inhibicję przy dawkach 70 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ gleby i wyższych. Inhibicja SIR przez streptomycynę wzrastała natomiast liniowo wraz z wielkością dawki, od 14 do 34% (ryc. 1). W poziomie mineralnym AE, reakcja SIR na aktidion była podobna do obserwowanej w poziomie organicznym, z maksymalną inhibicją, około 35%, przy dawkach $10 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ gleby i wyższych. W przypadku streptomycyny stwierdzono niewielki, wynoszący od 15 do 25%, wzrost inhibicji SIR po zastosowaniu dawek 5 – $15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ gleby oraz gwałtowny jej wzrost do 40% przy dawce $20 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ gleby (ryc. 2), prawdopodobnie na skutek niespecyficznego zahamowania aktywności grzybów.

Aby ustalić optymalne dawki antybiotyków, wykonano testy pozwalające na określenie ich selektywnej inhibicji, polegające na zastosowaniu dawek aktidionu powodujących maksymalną i na zbliżonym poziomie inhibicję SIR w poziomach organicznym i mineralnym gleb (ryc. 1 i 2) oraz różne dawki streptomycyny, oznaczając zarówno oddzielny, jak i łączny wpływ obu antybiotyków na SIR (tab.

2). Wyniki tych pomiarów wykorzystano do obliczenia wskaźnika inhibicji addytywnej (IAR) wg wzoru:

$$IAR = [(G - A) + (G - S)] / (G - AS)$$

gdzie:

G – indukowana respiracja po dodaniu jedynie glukozy (SIR),

A – SIR po dodaniu aktidionu,

S – SIR po dodaniu streptomycyny,

AS – SIR po dodaniu aktidionu + streptomycyny.

Tabela 2. Redukcja indukowanej substratem respiracji (SIR) przez łączne oddziaływanie aktidionu i streptomycyny

Table 2. Reduction in substrate induced respiration (SIR) by combined effect of cycloheximide and streptomycin

Poziom gleby Soil horizon	Aktidion (mg g gleby ⁻¹) Cycloheximide (mg g soil ⁻¹)	Streptomycyna (mg g gleby ⁻¹) Streptomycin (mg g soil ⁻¹)	IAR ¹	TCI ² (%)
Organiczny Organic	70	15	0,98	66,41
		20	0,96	72,93
		25	1,00	70,42
		30	1,29	63,39
	90	15	1,01	65,81
		20	0,98	72,86
		25	1,00	71,81
		30	1,19	69,88
	110	15	1,02	65,11
		20	1,02	69,94
		25	1,05	68,33
		30	1,21	68,68
Mineralny Mineral	10	5	0,88	62,25
		10	0,97	66,31
		15	1,03	61,77
		20	1,29	61,47
	15	5	1,04	52,51
		10	0,97	66,13
		15	0,98	64,74
		20	1,19	66,43
	20	5	0,96	58,33
		10	1,09	60,13
		15	1,16	55,90
		20	1,34	60,03

¹ wskaźnik inhibicji addytywnej (suma inhibicji SIR przez aktidion i streptomycynę oddzielnie/łączna inhibicja SIR powodowana przez oba antybiotyki)

inhibitor additivity ratio (sum of separated inhibition of SIR by cycloheximide and streptomycin/combined inhibition of SIR caused by both antibiotics)

² całkowita addytywna inhibicja SIR total combined inhibition of SIR

Wyraża on stosunek sumy inhibicji powodowanej przez aktidion i streptomycynę stosowane oddzielnie do inhibicji powodowanej przez oba antybiotyki łącznie. Wartość IAR zbliżona do 1,00 wskazuje, że stężenie aktidionu i streptomycyny mieści się w granicach ich selektywnej inhibicji, natomiast wartość powyżej 1,00 świadczy o inhibicji niespecyficznnej, powodowanej przez jeden lub oba antybiotyki (np. inhibicji grzybów przez streptomycynę). Ogólnie zakłada się (np. Beare i in. 1990, Sheu, Parkinson 1994), że przy optymalnej dawce antybiotyków, powodującej maksymalną selektywną inhibicję, wartość IAR jest zbliżona do 1,00, przy jednocześnie najwyższej łącznej inhibicji SIR przez oba antybiotyki (TCI), obliczonej wg wzoru:

$$TCI = [(G - AS) / G] \times 100$$

Z przedstawionych w tabeli 2 wartości IAR i TCI wynika, że zakres dawek obu antybiotyków spełniających powyższe kryteria jest dość szeroki. Za optymalną do oznaczeń udziału grzybów i bakterii w biomacie drobnoustrojów glebowych w drzewostanach sosnowych przyjęto zatem dawkę 90 mg aktidionu i 25 mg streptomycyny na 1 g gleby dla poziomu organicznego (Ofh) oraz 15 mg aktidionu i 10 mg streptomycyny na 1 g gleby dla poziomu mineralnego AE. Wartości TCI dla powyższych dawek wynoszą 72 i 66%, odpowiednio dla poziomów organicznego i mineralnego, co świadczy o niepełnej inhibicji SIR przez te antybiotyki. Na niekompletną inhibicję grzybów i bakterii przez aktidion i streptomycynę wskazują także wcześniejsze prace wykonane w różnych typach gleb (Anderson, Domsch 1975, Poovarodom i in. 1988, Beare i in. 1990, Tate 1991, Sheu, Parkinson 1994). Wynika to z częściowej inaktywacji antybiotyków na skutek ich adsorpcji na cząstkach glebowych, degradacji przez niespecyficzne grupy drobnoustrojów oraz tworzenia się form drobnoustrojów opornych na antybiotyki (Alexander 1975, Martin, Haider 1986). Pomiaru respiracji indukowanej substratem wykonane w poziomie organicznym i mineralnym badanych drzewostanów sosnowych, z użyciem ustalonych, optymalnych dawek aktidionu i streptomycyny (tab. 3) wykazały, że addytywna inhibicja SIR spowodowana przez te antybiotyki wynosiła od 67 do 82%.

Indukowana substratem respiracja grzybów (SIR_F) i bakterii (SIR_B), obliczona wg wzorów: $SIR_F = SIR - A$ (SIR po dodaniu aktidionu) i $SIR_B = SIR - S$ (SIR po dodaniu streptomycyny), w poziomach organicznych kształtowała się, odpowiednio, w granicach: 13,46–41,76 ml $CO_2 \times g^{-1} \text{gleby} \times h^{-1}$ i 6,45–18,48 ml $CO_2 \times g^{-1} \text{gleby} \times h^{-1}$. W poziomie mineralnym wartości te były zdecydowanie niższe i wynosiły, odpowiednio: $SIR_F - 0,40 - 1,35$ ml $CO_2 \times g^{-1} \text{gleby} \times h^{-1}$, $SIR_B - 0,29 - 0,89$ ml $CO_2 \times g^{-1} \text{gleby} \times h^{-1}$. Stosunek SIR_F do SIR_B odzwierciedla udział grzybów i bakterii w biomacie drobnoustrojów glebowych, czego uzasadnieniem jest wcześniej wspomniana istotna zależność pomiędzy SIR grzybów i bakterii a ich biomasa. Z wykonanych badań i obliczeń wynika, że w glebach drzewostanów sosnowych grzyby są dominującą grupą drobnoustrojów, zwłaszcza w poziomie organicznym, gdzie ich udział w biomacie jest od 2,05 do 2,32 raza wyższy niż

Tabela 3. Udział grzybów i bakterii w biomase drobnoustrojów glebowych w borach sosnowych
 Table 3. Fungal and bacterial contribution to microbial biomass in pine forest soils

Pow. nr Plot No.	Poziom Horizon	SIR ¹			SIR _F /SIR _B	TCI ² (%)
		całkowita total	grzybów (SIR _F) fungal (SIR _F)	bakterii (SIR _B) bacterial (SIR _B)		
1	Ofh	54,32	26,76	11,54	2,32	70,51
	AE	3,33	1,35	0,89	1,52	67,27
2	Ofh	28,31	13,46	6,45	2,09	70,33
	AE	2,08	0,86	0,57	1,51	68,75
3	Ofh	83,14	41,76	18,48	2,26	73,43
	AE	1,46	0,73	0,47	1,55	82,19
4	Ofh	80,56	39,68	18,3	2,17	71,97
	AE	1,44	0,59	0,41	1,44	69,44
5	Ofh	34,83	17,17	8,37	2,05	73,33
	AE	1,02	0,40	0,29	1,38	67,65

¹indukowana substratem respiracja ($\text{OICO}_2 \times \text{g}^{-1} \text{gleby} \times \text{h}^{-1}$)
 substrate induced respiration ($\text{mlCO}_2 \times \text{g}^{-1} \text{gleby} \times \text{h}^{-1}$)

²całkowita addytywna inhibicja SIR
 total combined inhibition of SIR

bakterii. W poziomie mineralnym stosunek biomasy grzybów do bakterii waha się od 1,38 do 1,55. Na dominujący udział grzybów w biomase drobnoustrojów w ekosystemach leśnych oraz spadek wartości stosunku grzyby/bakterie w głębszych poziomach (mineralnych) gleb, wskazują także niektóre doniesienia (np. Tate 1991, Sheu, Parkinson 1994). Wynika to ze składu i rozmieszczenia substratów odżywczych w glebach leśnych, gdzie przeważająca ich część, w postaci związków opornych na dekompozycję (głównie lignin), gromadzona jest w górnych, organicznych poziomach. Związki te są łatwiej przyswajalne i efektywniej rozkładane przez grzyby niż bakterie (Rihani i in. 1995, Møller i in. 1999).

4. STWIERDZENIA I WNIOSKI

1. Biomasa drobnoustrojów glebowych (C_{mic}) w borach sosnowych, w przeliczeniu na jednostki wagowe gleby i powierzchnię, kształtowała się odpowiednio w granicach: 1,13–3,33 mg $C_{\text{mic}} \times \text{g}^{-1}$ gleby i 159–278 kg $C_{\text{mic}} \times \text{ha}^{-1}$ w poziomie organicznym (Ofh) oraz 0,04–0,13 mg $C_{\text{mic}} \times \text{g}^{-1}$ gleby i 41–101 kg $C_{\text{mic}} \times \text{ha}^{-1}$ w poziomie mineralnym AE.

2. Dostosowanie metody SIR do oznaczeń stosunku grzybów do bakterii w glebach leśnych, w połączeniu z selektywną ich inhibicją, wymaga oddzielnego ustalenia dawki antybiotyków optymalnej dla różnych poziomów glebowych, charakteryzujących się znaczącą aktywnością mikrobiologiczną. W przypadku sied-

lisk borowych dotyczy to poziomu organicznego oraz wierzchniego poziomu mineralnego.

3. Optymalna dawka antybiotyków, powodująca maksymalną selektywną inhibicję indukowanej substratem respiracji grzybów (SIR_F) i bakterii (SIR_B) w glebach borów sosnowych, to 90 mg aktidionu i 25 mg streptomycyny na 1 g gleby – dla poziomu Ofh, oraz 15 mg aktidionu i 10 mg streptomycyny 1 g gleby – dla poziomu AE.

4. W borach sosnowych grzyby stanowią grupę dominującą w składzie drob-noustrojów glebowych. Ich stosunek do bakterii (SIR_F/SIR_B) w biomase drob-noustrojów wynosił na badanych powierzchniach ponad 2,0 (2,05–2,32) w poziomie Ofh i około 1,5 (1,38–1,55) w poziomie AE.

Praca została złożona 18.04.2005 r. i przyjęta przez Komitet Redakcyjny 8.07.2005 r.

ESTIMATION OF FUNGAL AND BACTERIAL CONTRIBUTIONS TO MICROBIAL BIOMASS IN FOREST SOILS

Summary

Total microbial biomass and fungal to bacterial ratios in soils were estimated in monoculture Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) stands of age class III on plots located in southwestern Poland. Microbial biomass (C_{mic}) was estimated by the substrate-induced respiration (SIR) method. In the organic horizons (Ofh), microbial biomass calculated per unit soil mass ranged from 1.134 to 3.339 mg $C_{mic} \times g^{-1}$ soil, and measured per unit area ranged from 159 to 278 kg $C_{mic} \times ha^{-1}$. Accordingly, in mineral horizons (AE) C_{mic} ranged from 0.041 to 0.134 mg $\times g^{-1}$ soil and from 41 to 101 kg $\times ha^{-1}$ (table 1). To determine the fungal to bacterial ratios, the SIR method with selective inhibitors was adapted for organic (Ofh) and mineral (AE) horizons. The dose-response experiments were carried to assess the effects of fungicide cycloheximide and bactericide streptomycin on the substrate-induced respiration (fig. 1, 2). Inhibitor selectivity was found by calculating the inhibitor additivity ratio (IAR), i.e., the sum of SIR inhibition caused by addition of cycloheximide and streptomycin to soil separately, divided by SIR inhibition caused by combined addition of both antibiotics. It is accepted, that the maximum selective paired concentrations of both antibiotics are indicated when the IAR approaches 1.00 and total combined inhibition of SIR is maximized. As a wide range of combination of different doses of cycloheximide and streptomycin fulfilled the above criteria (table 2), the following concentration of antibiotics were chosen and used in investigation of pine forest soils: 90 mg cycloheximide and 25 mg streptomycin $\times g^{-1}$ soil for organic (Ofh) horizon; 15 mg cyclohexamide and 10 mg streptomycin $\times g^{-1}$ soil for mineral (AE) horizon. The results of SIR inhibition by specific antibiotics revealed the fungal dominance in pine forest soils, more pronounced in organic horizons. Assessed fungal to bacterial biomass ratios were found to be within the range of 2.05–2.32 in the Ofh, and of 1.38–1.55 in the AE horizons (table 3).

Forest soils show a marked gradient down the profile with regard to quality of organic matter – the main determinant of soil microbial community structure and activity. Thus, the SIR method with selective inhibitors should be adjusted to various soil conditions and employed in

important zones of microbial activity, e.g. in the organic (Ofh) and in the upper mineral horizons (AE) – in the case of pine forests. Determination of fungal to bacteria ratios may be widely used in forest studies as a valid indicator of ecosystem changes caused by stress factors or by management practices.

LITERATURA

- Alexander M. 1975: *Ekologia mikroorganizmów*. PWN, Warszawa, 638.
- Anderson J. P. E., Domsch K. H. 1975: Measurement of bacterial and fungal contributions to respiration of selected agricultural soils. *Can. J. Microbiol.*, 21: 314-322.
- Anderson J. P. E., Domsch K. H. 1978: A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 10: 215-21.
- Anderson T. H., Joergensen R. G. 1997: Relationship between SIR and FE estimates of microbial biomass C in deciduous forest soils at different pH. *Soil Biol. Biochem.*, 29: 1033-1042.
- Beare M. H., Neely C. L., Coleman D. C., Hargrove W. L. 1990: A substrate-induced respiration (SIR) method for measurement of fungal and bacterial biomass on plant residues. *Soil Biol. Biochem.*, 22: 585-594.
- Beck T., Joergensen R. G., Kandeler E., Makeschin F., Nus E., Oberholtzer H. R., Scheu S. 1997: An inter-laboratory comparison of ten different ways of measuring soil microbial C. *Soil Biol. Biochem.*, 29: 1023-1032.
- Bewley R. J. F., Parkinson D. 1984: Bacterial and fungal activity in sulphur dioxide polluted soils. *Can. J. Microbiol.*, 31: 13-15.
- Frostegård Å., Bååth E., Tunlid A. 1993: Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biol. Biochem.*, 25: 723-730.
- Holland A. E., Coleman D. C. 1987: Litter placement effects on microbial and organic matter dynamics in an agroecosystems. *Ecology*, 68: 425-433.
- Insam H., Domsch K. H. 1988: Relationship between soil organic carbon and microbial biomass on chronosequences of reclamation sites. *Microbial Ecology*, 15: 177-188.
- Kaiser E. A., Mueller T., Joergensen R. G., Insam H., Heinemeyer O. 1992: Evaluation of methods to estimate the soil microbial biomass and the relationship with soil texture and organic matter. *Soil Biol. Biochem.*, 24: 675-683.
- Leirós M.C., Trasar-Cepeda C., Seoane S., Gil-Sotres F. 2000: Biochemical properties of acid soils under climax vegetation (Atlantic oakwood) in an area of European temperature-humid zone (Galicia, NW Spain): General parameters. *Soil Biol., Biochem.*, 32: 733-745.
- Martin J. P., Haider K. 1986: Influence of mineral colloids on turnover rates of organic carbon. [W:] *Interaction of soil minerals with natural organics and microbes* (eds. P. M. Huang and M. Schnitzer). SSSA Publication No. 17, Soil Science of America, Madison, 283-304.
- Møller J., Miller M., Kjølter A. 1999: Fungal-bacterial interaction on beech leaves: influence on decomposition and dissolved organic carbon quality. *Soil Biol. Biochem.*, 31: 367-374.
- Nakas J. P., Klein D. A. 1980: Mineralization capacity of bacteria and fungi from rhizosphere-rhizoplane of semiarid grassland. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 113-117.
- Ohtonen R., Pennanen T., Fritze H., Jumpponen A., Trappe J. 1999: Ecosystem properties and microbial community changes in primary succession on a glacier forefront. *Oecologia*, 119: 239-246.
- Pennanen T., Frostegård Å., Fritze H., Bååth E. 1996: Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 420-428.

- Pennanen T., Liski J., Bååth E., Kitunen V., Uotila J., Westman C. J., Fritze H. 1999: Structure of the microbial community in coniferous forest soils in relation to site fertility and tree stand development stage. *Microb. Ecol.*, 38: 169-178.
- Pennanen T., Strömmer R., Markkola A. 2001: Microbial and plant community structure across a primary succession gradient. *Scand. J. For. Res.*, 16: 37-43.
- Poovarodom S., Tate R. L., Bloom R. A. 1988: Nitrogen mineralization rates of the acidic, xeric soils of the New Jersey Pinelands: field rates. *Soil Sci.*, 145: 257-263.
- Priha O., Hiukka S. J., Pennanen T., Smolander A. 2001: Microbial community structure and characteristics of the organic matter in soils under *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* at two forest sites. *Biol. Fertil. Soils*, 33:17-24.
- Rihani M., Kiffer E., Botton B. 1995: Decomposition of beech litter by microflora and mesofauna. I. In vitro action of white-rot fungi on beech leaves and foliar component. *Eur. J. Soil Biol.*, 31: 56-66.
- Rüttimann C., Vicuña R., Mozuch M.D., Kirk T.K. 1991: Limited bacterial mineralization of fungal degradation intermediates from synthetic lignin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 3652-3655.
- Scheu S., Parkinson D. 1994: Changes in bacterial and fungal biomass C, bacterial and fungal biovolume and ergosterol content after drying, remoistening and incubation of different layers of cool temperate forest soils. *Soil Biol. Biochem.*, 26: 1515-1525.
- Stamatidis B. R., Doran J. W., Ingham E. R. 1990: Use of staining and inhibitors to separate fungal and bacterial activity in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 22: 81-88.
- Tate R. L. 1991: Microbial biomass measurement in acidic soil: effect of fungal:bacterial activity ratios and of soil amendment. *Soil Sci.*, 152: 20-225.
- Vesterdal L. 1998: Potential microbial nitrogen and phosphorus availability in forest floors. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 2031-2041.
- Wardle D. A., Parkinson D. 1990: Response of soil microbial biomass to glucose, and selective inhibitors, across a soil moisture gradient. *Soil Biol. Biochem.*, 22: 825-834.
- West A. W. 1986: Improvement of the selective inhibition technique to measure eucaryote: prokaryote ratios in soils. *J. Microbiol. Methods*, 5: 125-138.
- Zwoliński J., Orzeł S. 2000: Produkcyjność drzewostanów sosnowych (*Pinus sylvestris* L.) w gradiencie skażeń przemysłowych. *Prace Inst. Bad. Leś.*, A, 892: 75-98.
- Zwoliński J. 2001: Reakcja borów sosnowych na kwaśne opady. I. Gleba i aparat asymilacyjny drzew. *Prace Inst. Bad. Leś.*, A, 912: 113-137.
- Zwoliński J. 2004: Microbial biomass versus soil fertility in forest sites. *Pol. J. Ecol.*, 52: 553-561.