

УДК 631.46 579.69

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЧВЫ

© 2012 А.С. Савостьянова, А.А. Семиколенных

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

Поступила в редакцию 17.05.2012

Для определения биомассы микроорганизмов помимо прямого микроскопического учета применяются различные косвенные химические методы, такие как: субстрат индуцированное дыхание, фумигация парами хлороформа и последующая экстракция, гидролиз флюоресцеин диацетата и другие. В настоящей работе произведено сравнение данных получаемых разными методами при анализе стандартных образцов с известными характеристиками. Установлено, что все методы имеют свои ограничения и позволяют определить не более 15-80% от истинной биомассы, причем бактерии выделяются более полно, а микроскопические грибы в меньшей степени.

Ключевые слова: *субстрат индуцированное дыхание, фумигация, флюоресцеин диацетат, микробная биомасса, бактерии, грибы, почва*

Описание и количественная характеристика биологических свойств почвы является важным показателем биогеохимических процессов в окружающей среде. Кроме фундаментальных задач, таких, как описание структуры биотических сообществ и функционирования почвенных систем, данные о биологических свойствах почвы используются для решения большого количества прикладных проблем, например, определения качества сельскохозяйственных почв, антропогенно-нарушенных или конструированных почв и грунтов (плодородные грунты теплиц, грунты газонов, рекультивационные работы и др.).

Методы определения микробной биомассы можно условно разделить на расчетные (пересчет на микробную биомассу данных о количестве выросших учета), косвенные химические, построенные на условном пересчете показателей биологической активности на биомассу (субстрат индуцированное дыхание, различные показатели ферментативной активности) и прямые химические, основанные на разрушении микробных клеток и последующей экстракции всей биомассы или какого-то индикаторного компонента (различные методы фумигации-экстракции, выделения ДНК, липидных комплексов, грибного хитина и др.). Косвенные химические методы проще и быстрее, однако, из-за различного качественного состава микробоценозов, отдельные компоненты которого могут иметь

разную биологическую активность, эти данные могут трактоваться только как ориентировочные и приблизительные. Прямые методы точнее, кроме того, их преимущество состоит в том, что реально полученное вещество микробной биомассы может применяться для решения ряда иных задач, например, таких как определение химического или изотопного состава микроорганизмов, радиоуглеродного датирования микробной биомассы и других. Все указанные выше методы существуют в огромном количестве модификаций [2-4, 6]. Неоднократно проводилось их сравнение между собой при обработке одних и тех же проб почв [3, 4]. В настоящей работе мы предприняли попытку сравнения нескольких методов с использованием специально созданных модельных образцов с известными исходными характеристиками.

Объекты и методы. Для приготовления модельных образцов использовали известное количество стерильного субстрата и культуры. В качестве субстратов были использованы дополнительно измельченные до фракции крупной и мелкой пыли: кварцевый песок и вермикулит. В качестве культур микроорганизмов использовали штаммы из коллекции кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ: бактерии: *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp. и *Micrococcus* sp., мицелиальные грибы *Fusarium* sp. и *Kuehneromyces mutabilis* и неидентифицированный штамм дрожжей. Биомасса была получена осаждением суспензий (центрифугирование 2500 об/мин) организмов, полученных в накопительной жидкой культуре при встряхивании 120 об/мин. на 5-7 сутки. Использовались среды:

Савостьянова Анна, студентка. E-mail: ann-192@yandex.ru

Семиколенных Андрей, старший преподаватель кафедры географии почв. E-mail: aasemik@list.ru

глюкозо-пептон-дрожжевой бульон (10 г/л) для бактерий и среда Чапека (глюкоза 10 г/л) для грибов. Для приготовления образца брали соотношение на 1 г субстрата 1 мл концентрированной суспензии. Биомасса организмов определялась взвешиванием сухой аликвоты суспензии (высушивание при 105°C, 6 часов). Для перехода от веса к содержанию углерода в микробной биомассе исходили из его содержания 50%. Также в опыте использовались образцы природных черноземов выщелоченных, отобранных в Тульской области Щелковском районе.

Для всех образцов проводился также прямой микроскопический учет бактерий и мицелия грибов с использованием камеры Горяева. Дополнительно численность бактерий в природных почвах определялась методом учета колоний после посева разведений суспензий почв на глюкозо-пептон-дрожжевой агар. Для всех методов применяли парную повторность, при отсутствии отклонений более чем на 10% вычисляли простое среднее.

Субстрат-индуцированное дыхание (СИД). Метод основан на наблюдении за непрерывным выделением CO₂ после внесения в образец раствора глюкозы. В модификации Бека вносится 400 или 800 мг глюкозы на 100 г для пахотных и лесных почв эквивалента абсолютно сухой почвы соответственно [3]. Мы проводили измерение следующим образом. Во флаконы объемом 125-150 мл с герметичными резиновыми крышками помещалось по 5 г свежей почвы. Во флакон вносится раствор глюкозы из расчета 400 мг глюкозы на 100 г почвы (на 5 г – 0,5 мл рабочего раствора содержащего 40 мг/мл). Из флаконов отбирались шприцом газовые пробы с интервалом в 15 минут в течение 2 часов. Содержание CO₂ определялось на анализаторе с инфракрасным оптическим датчиком. Результаты могут быть пересчитаны на биомассу C_{микробный} (мг С на 1 г почвы) умножением СИД в мг С-CO₂/1 г х 1 час на коэффициент 30 [4] или 50,4 [6].

Гидролиз флюоресцеин диацетата (ФДА). Метод основан на способности ферментных комплексов эстераз микроорганизмов осуществлять гидролиз бесцветного реактива флюоресцеин диацетата с образованием ярко окрашенного

флюоресцеина [5]. Определение выполняли в следующей модификации. К 5 г свежего образца прибавляли 25 мл дистиллированной воды и по 5 капель (0,15 мл) рабочего раствора ФДА в ацетоне (для достижения концентрации в пробе 100 мкг ФДА на 1 мл суспензии). Флаконы закрывали крышками и инкубировали при температуре 24 градуса 4 часа при периодическом однократном взбалтывании раз в час. После инкубации суспензию фильтровали, аликвоту фильтрата помещали в пластиковые кюветы и фотоколориметрировали при длине волны 470 нм (490 нм по [5]). Контрольный раствор – 0,15 мл рабочего раствора ФДА в стерильной дистиллированной воде.

Метод фумигации-экстракции. Метод предполагает обработку образцов почв парами хлороформа, в результате которой происходит лизис микробных клеток, приводящий к образованию дополнительного количества органических соединений углерода и азота, переходящих в раствор экстрагента [2]. Оценка содержания С и N микробной биомассы проводится по разности концентраций С и общего N в фуигированном и исходном образцах. В качестве экстрагента может использоваться K₂SO₄ или KCl в концентрации 0,5 М [3], однако было показано, что снижение молярности экстрагента в 10 раз не влияет существенно на эффективность экстракции [1]. В настоящей работе использовали фумигацию образцов парами хлороформа без этанола в темноте в течение 5 суток и последующую экстракцию 0,05 М раствором K₂SO₄. Экстракция проводилась для контрольной (не фумигированной) и фумигированной части пробы. Определение содержания С и N в растворах проводили на автоматическом анализаторе Elementar Vario EL III. Содержание микробного углерода находили по разнице проб. В работах Бека [3] был предложен поправочный коэффициент показывающий полноту экстракции углерода из почв 0,45. В наших расчетах коэффициент не использовали.

Результаты. Полученные результаты рассчитанной микробной биомассы для модельных образцов с культурами микроорганизмов в субстрате приведены в таблице 1.

Таблица 1. Сравнительные данные микробной биомассы определенной различными методами (абсолютно сухой вес, С микробное мг).

Состав	Исходная биомасса	Фумигация экстракция	Гидролиз ФДА	СИД
Fusarium + вермикулит	1,57	0,27	12,5	0,37
дрожжи + песок	25,1	14,4	2,5	0,15
Rhodococcus + песок	3,22	2,47	4,1	5,51
Micrococcus + песок	2,45	2,53	не опр.	3,88
Kuehneromyces mutabilis + песок	243	75,2	более 50	12,74

Дополнительно был построен калибровочный график для метода гидролиза ФДА. Для этого определялась численность не мицелиальных микроорганизмов и готовились разведения пробы с различной численностью. Измерение оптической плотности проводилось в два

временных срока 4 и 16 часов. Результаты представлены на рис. 1. Сравнительные результаты для образцов природных почв, где численность и биомасса определялась различными методами, приведены в таблице 2.

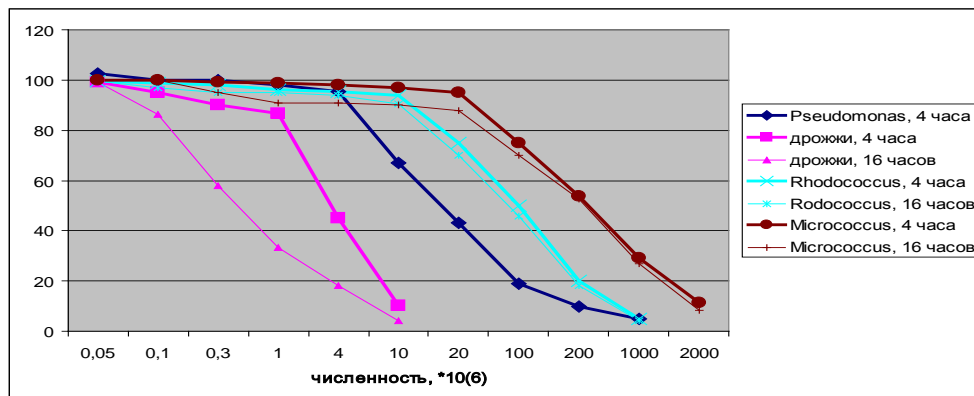


Рис. 1. График зависимости оптической плотности раствора флюоресцеина (вертикальная ось) от численности микроорганизмов, определяемых методом гидролиза флюоресцеин диацетата

Таблица 2. Сравнительные данные о численности и биомассе микроорганизмов в природных почвах (выщелоченный чернозем) определенные различными методами.

Образец	Численность и биомасса по данным посева и прямого учета			Фумигация-экстракция, мг		СИД, мг С _{микр.} ****
	бактерии, КОЕ* на 1 г почвы, 10 ⁹	биомасса, мг/1 г мицелия		**	***	
		спор				
разрез 1, 0-5 см	0,9	9,1	2,66	0,380	0,520	4,23
разрез 1, 40-50 см	1,2	0,39	0,15	0,118	0,144	0,04
разрез 2, 0-10 см	6	0,49	0,54	0,212	0,360	0,54
разрез 2, 40-50 см	2,2	0,35	0,19	0,118	0,205	0,12

Примечания: * - колонии образующих единиц, ** - раздельное определение в экстракте фумигированной и не фумигированной пробе, *** - последовательное определение, когда после первой экстракции проба подсушивалась, ставилась на фумигацию и затем повторно экстрагировалась, **** - использовали поправочный коэффициент 50,4 [3].

Обсуждение. Сравнение различных методов определения микробной биомассы в модельных образцах с известными параметрами показало, что метод фумигации-экстракции позволяет определить биомассу микроорганизмов точнее в сравнении с другими методами (субстрат-индуцированного дыхания и гидролиза флюоресцеин диацетата). Полнота выделения этим методом для бактерий составила от 77 до 100%, для дрожжей 56%, и существенно меньше для мицелиальных грибов – 18-30%. Субстрат индуцированного дыхания и гидролиз ФДА дают несколько завышенные данные для бактерий и существенно заниженные данные для грибов. Бактерии реагируют на гидролиз ФДА в целом более чувствительно, чем грибы, наименьшая активность получена для дрожжей. По графику на рис. 1 хорошо видно, что интенсивность

гидролиза ФДА отличается в начальной стадии (особенно у грибов наблюдается запаздывание), но затем через несколько часов достигает стабильных значений и изменяется мало, однако метод гидролиза ФДА крайне чувствителен к видовому составу организмов.

Сопоставление методов определения биомассы для природных образцов показало, что метод фумигации-экстракции показало, что дает более адекватные данные для бедных почв и заниженные данные для верхнего горизонта, богатого преимущественно грибами. Данные СИД оказались ближе по значениям для образца содержащего много мицелия. Качественные соотношения образцов между собой по принципу «больше-меньше» оказались одинаковыми для всех использованных методов.

Выводы: практически проанализированные методы определения микробной биомассы имеют системные ошибки и могут давать отклонения в 2-4 раза от истинных значений, а в ряде случаев и более. Наибольшую ошибку в результате может вносить качественный состав микробного сообщества, в частности доля микроскопических грибов, которые при существенном вкладе в биомассу имеют показатели биохимической активности ниже, чем бактерии. При использовании метода фумигации-экстракции для количественного выделения микробного углерода из почв следует учитывать, что в действительности извлекается только часть микробного углерода (в случае с мицелиальными грибами по нашим данным только 18%).

Благодарности. Авторы выражают благодарность коллегам за предоставленные культуры микроорганизмов и помощь в работе д.б.н. Добровольской Т.Г., к.б.н. Ивановой А.Е., д.б.н. Макарову М.И., Шлыковой Ю.В.

Работы выполнялись при поддержке гранта РФФИ 12-04-01786.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Макаров, М.И. Растворимость лабильных форм углерода и азота почв в K_2SO_4 / М.И. Макаров, М.С. Шулева, Т.И. Мальшева, О.В. Меняло // Почвоведение. 2012. В печати.
2. Anderson, J.P.E. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil / J.P.E. Anderson, K.H. Domsch // Soil Biol. Biochem., 1978. N10. P. 215-221.
3. Beck, T. An inter-laboratory comparison of ten different ways of measuring soil microbial biomass C / T. Beck, G. Joergensen, E. Kandeler et al. // Soil Biology and Biochemistry. 1997. N29(7). P. 1023-1032.
4. Kaiser, E.A. Evaluation of methods to estimate the soil microbial biomass estimations and the relationship with soil texture and organic matter / E.A. Kaiser, T. Mueller, R.G. Joergensen et al. // Soil Biology & Biochemistry. 1992. N24. P. 675-683.
5. Schnurer, J. Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter / J. Schnurer, T. Rosswall // Applied and Environmental Microbiology. June 1982. P. 1256-1261.
6. Sparling, G.P. The substrate induced respiration method // In K. Alef and P. Nannipieri (ed.), Methods in applied soil microbiology and biochemistry. – Academic Press, London, United Kingdom, 1995. P. 397-404.

COMPARISON THE METHODS OF MICROBIAL BIOMASS DEFINITION FOR THE ASSESSMENT OF SOIL BIOLOGICAL PROPERTIES

© 2012 A.S. Savostyanova, A.A. Semikolennykh

Moscow State University named after M.V. Lomonosov

For definition the microorganisms biomass besides the direct microscopic account various indirect chemical methods, such as are applied: substratum induced respiration, fumigation by pairs of chloroform and subsequent extraction, hydrolysis fluorescein diacetate and others. In the real work comparison of data received by different methods is made in the analysis of standard samples with known characteristics. It is established that all methods have restrictions and allow to define no more than 15-80% from the true biomass, and bacteria are allocated more fully, and microscopic fungi to lesser extent.

Key words: *substratum induced respiration, fumigation, fluorescein diacetate, microbial biomass, bacteria, fungi, soil*