

<https://doi.org/10.3176/biol.1981.3.08>

УДК 631.46:631.414.3

Эви ПЯРСИМ, Пауль РАХНО

СПОСОБЫ ДЕСОРБЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ИХ ЧИСЛЕННОСТИ В ПОЧВАХ МЕТОДОМ ВЫСЕВА

Как известно, бактерии в почве почти никогда не находятся в свободном состоянии, а в основном адсорбированы на почвенных частицах, откуда их очень трудно отделить простым отмыванием. Такое явление затрудняет определение численности почвенных микроорганизмов.

Способы количественного учета микроорганизмов почвы делятся на две принципиально разные группы: 1) методы прямого подсчета под микроскопом и 2) методы высева и учет количества микроорганизмов на питательных средах.

Прямым методом выявляется всегда значительно большее количество микроорганизмов, чем методом высева. Однако он имеет и некоторые недостатки. С помощью этого метода нельзя определить физиологические группы микробов, а только морфологические различия их.

Метод высева на разные селективные питательные среды позволяет учитывать только 1% или даже 0,1—0,01% общего количества микроорганизмов в почве.

С целью правильного подсчета количества микроорганизмов на питательных средах необходимо проводить посев из суспензии, в которой микроорганизмы находятся в виде одиночных свободноплавающих клеток. Для этого в почвенной микробиологии обычно применяют 5—15-минутное перемешивание или взбалтывание водной почвенной суспензии в колбе на мешалке. Однако такая обработка суспензии не обеспечивает полной десорбции клеток. Этот способ обработки нецелесообразно использовать для сравнения количества бактерий в почвах, резко отличающихся по агрегатному состоянию и по адсорбционной способности в отношении к клеткам микроорганизмов. При замерзании происходит диспергирование почвы и частичная десорбция микроорганизмов, поэтому в промерзшей почве при обычной обработке микроорганизмы учитываются гораздо полнее, чем в непромерзшей, что является результатом методической ошибки (Звягинцев, 1973).

При использовании прямых микроскопических методов подсчета клеток необходимо, чтобы клетки микроорганизмов были равномерно распределены в почвенной суспензии. Таким образом, названные методы не позволяют установить точной численности почвенных микроорганизмов главным образом из-за адсорбции микробов на почвенных частицах. Многие исследователи неоднократно пытались разработать более совершенные методы подготовки почв к микробиологическому анализу (Мишустин, 1958; Singh-Verma, 1967; Звягинцев, 1973 и др.).

Довольно большую работу по изучению десорбции микроорганизмов с поверхности почвенных частиц провел в 1961 г. П. Х. Рахно. Для подготовки почвенных образцов к микробиологическому анализу он использовал ряд химических веществ, ультразвук и специальный смеситель. Следует отметить, что полученные в ходе этой работы данные об изменении количества микроорганизмов были противоречивыми: в одних случаях наблюдалось значительное увеличение их числа, в других — уменьшение. Поэтому П. Рахно считал, что для более глубокого и полного изучения приемов десорбции следует продолжать исследования в этом направлении (Рахно, 1961).

Исходя из этого, целью настоящей работы было выяснение возможностей применения механических воздействий при подготовке проб почвы для микробиологического анализа, чтобы в возможно большей степени десорбировать микроорганизмы от почвенных частиц. Решение проблемы десорбции, несомненно, позволит в дальнейшем выделить новые виды почвенных микроорганизмов и создаст условия для культивирования их на искусственных питательных средах.

Материал и методика

Пробы для определения численности почвенных микроорганизмов брали из биометров с дерново-карбонатной типичной суглинистой (pH_{KCl} 6,8—7,1) и дерново-среднеподзолистой (pH_{KCl} 5,0—5,4) почвами с глубины 5—10 см. В первом варианте образцы брали из дерново-карбонатной почвы в мае 1979 г. (температура почвы 7,0°C; влажность 18,0%), во втором варианте — в апреле 1980 г. из той же почвы (температура 0,8°C; влажность 24,0%) и в третьем — из дерново-подзолистой почвы в январе 1980 г. (температура почвы -2,5°C; влажность 33,0%). Для подготовки почвенных образцов к микробиологическому анализу использовались следующие механические воздействия:

1. 15-минутное перемешивание почвенной суспензии на встряхивателе. Колбы Эрленмейера с почвенной суспензией (10 г почвы на 90 мл воды) вращаются по окружности диаметром 6 см в горизонтальной плоскости со скоростью 115 об/мин (контроль).
2. 10-минутная обработка почвенной суспензии (5 г почвы на 45 мл воды) на магнитной мешалке ММ 3М.
3. 5-минутная обработка почвенной суспензии (5 г почвы на 45 мл воды) на электрической пропеллерной мешалке (микроизмельчитель тканей РТ-2, 5000 об/мин).

Для увеличения диспергирования почвы и десорбции микроорганизмов применялся 1%-ный раствор пирофосфата натрия. Химическую обработку почвы проводили на фоне механических воздействий.

Из каждой пробы почвы брали по три навески. Микробиологический анализ каждой навески проводили в трех повторностях. Определяли численность семи групп микроорганизмов — аммонифицирующих, нитрифицирующих, денитрифицирующих, аэробно-целлюлозоразлагающих бактерий, актиномицетов, грибов, водорослей.

Для определения микроорганизмов использовали обычные селективные питательные среды, за исключением аммонифицирующих бактерий, для анализа которых применяли питательную среду x_3 (Рахно, 1964). Численность водорослей определяли на твердой и жидкой среде Данилова (Рийс, Рахно, 1975).

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием четырехфакторного дисперсионного анализа (Урбах, 1963).

Результаты исследований

Результаты сравнительных опытов с использованием различных способов подготовки почвенных образцов для микробиологического анализа приведены в табл. 1. В качестве контрольного варианта взята серия, в которой почвенные образцы были обработаны традиционным методом (15-минутное перемешивание почвенной суспензии в колбе на встряхивателе).

Полученные результаты показывают, что все использованные способы обработки почвенных образцов приводят к увеличению определяемого количества микроорганизмов, однако наибольшее увеличение наблюдалось при диспергировании почвы в микроизмельчителе. Численность некоторых групп бактерий (нитрифицирующие и денитрифицирующие) увеличивалась в 3 раза; 1,5—2-кратное увеличение отмечалось многократно.

Эффективность обработки зависит от типа исследуемой почвы. В дерново-карбонатной почве определяемое количество микроорганизмов увеличилось в 1,0—10,0 раз, а в дерново-подзолистой почве в 1,0—8,5 раза.

Аналогичные данные были получены в вариантах с использованием магнитной мешалки. Наибольшее увеличение (больше чем в 2 раза) численности почвенных микроорганизмов получено при определении аэробно-целлюлозоразлагающих, нитрифицирующих и денитрифицирующих бактерий в дерново-карбонатной почве. В образцах из дерново-подзолистой почвы увеличение определяемого количества микроорганизмов оказалось не столь значительным, как в карбонатных почвах.

Проведенные исследования показали также, что обработка почвенных суспензий в колбах с магнитной и пропеллерной мешалками не дает сколько-нибудь значительного увеличения количества грибов по сравнению с 15-минутным взбалтыванием на встряхивателе. В образцах из дерново-карбонатной типичной суглинистой почвы наблюдаемое увеличение составляло 60%, а в образцах из дерново-подзолистой почвы наблюдалось даже уменьшение числа грибов по сравнению с контролем. Таким образом, при определении численности грибов в дерново-подзолистой почве применение сложных обработок или не дает положительного эффекта, или оказывается даже отрицательным. Для наиболее полного учета грибов в этой почве достаточно обычной «мягкой» предварительной обработки с применением детергента. В случае актиномицетов наблюдались примерно такие же закономерности, как и в случае грибов, с той лишь разницей, что ни в одном варианте не наблюдалось уменьшения численности актиномицетов по сравнению с контролем.

Следовательно, для мицелиальных микроорганизмов (грибы, актиномицеты) способы предварительного диспергирования имеют относительное значение, так как нет четкого представления, что в таком случае следует считать единицей учета. Для бактерий единицей служит клетка или спора, для грибов и актиномицетов это может быть микроколония или кусок мицелия, цепочка спор. Поэтому разрушение почвенных агрегатов этих микроорганизмов жесткими приемами диспергирования и десорбции не дает положительного эффекта, как у бактерий, и может быть даже нежелательным.

Очень хорошие результаты были получены в вариантах, где кроме механического воздействия использовали пирофосфат натрия в качестве диспергирующего и десорбирующего вещества. Уже применение пирофосфата натрия при перемешивании почвенной суспензии на встряхивателе обуславливало 3-кратное увеличение численности бактерий.

Таблица 1

Влияние способа обработки почвенных суспензий на определяемое число микроорганизмов

Группа микроорганизмов	Способ обработки										Контроль			
	Встряхиватель с $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$				Магнитная мешалка				Измельчитель тканей				Встряхиватель без $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	
	без $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$		с $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$		без $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$		с $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$		без $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$		с $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$			
	Π_1	Π_2	Π_1	Π_2	Π_1	Π_2	Π_1	Π_2	Π_1	Π_2	Π_1	Π_2	Π_1	Π_2
Аммонифицирующие бактерии	1,2±0,2	1,3±0,2	1,2±0,2	1,1±0,2	1,3±0,2	1,4±0,2	1,5±0,3	1,3±0,2	1,4±0,2	2,7±0,2	1,4±0,2	(3,6±0,2)×10 ⁷	(4,9±0,5)×10 ⁷	
	1,2±0,4		1,2±0,4		1,2±0,3		1,1±0,4			1,5±0,4		(5,4±1,4)×10 ⁷		
Денитрифицирующие бактерии	1,8±0,5	3,0±0,8	2,3±0,5	1,0±0,4	3,1±0,9	2,0±0,8	3,3±1,1	1,3±0,3	3,2±0,9	4,5±0,9	3,2±0,9	(1,8±0,6)×10 ⁶	(0,8±0,02)×10 ⁶	
	3,2±0,7		1,8±0,4		2,1±0,6		2,5±0,5			6,1±1,1		(0,3±0,05)×10 ⁶		
Нитрифицирующие бактерии	2,9±0,6	2,0±0,7	2,0±0,5	1,3±0,6	2,7±0,3	3,0±1,1	2,9±0,6	1,9±0,4	3,4±0,9	6,1±1,4	3,4±0,9	(2,5±0,5)×10 ³	(21,6±6,7)×10 ³	
	1,0±0,1		1,1±0,2		1,1±0,1		1,1±0,1			1,3±0,2		(89,0±8,3)×10 ³		
Аэробно-целлюлозоразлагающие бактерии	1,8±0,4	1,8±0,7	1,1±0,4	1,6±0,5	1,6±0,4	5,4±1,8	2,4±0,4	2,0±0,6	8,6±2,2	9,0±1,7	8,6±2,2	(3,3±0,2)×10 ⁴	(0,1±0,02)×10 ⁴	
	5,4±1,3		3,1±0,9		5,0±0,9		5,0±1,2			8,1±2,0		(0,1±0,02)×10 ⁴		
Актиномицеты	1,3±0,1	1,9±0,1	1,3±0,1	1,6±0,2	1,4±0,3	1,8±0,4	1,3±0,3	1,6±0,1	1,9±0,2	1,6±0,4	1,9±0,2	(6,3±0,3)×10 ⁶	(6,2±0,4)×10 ⁶	
	1,5±0,3		1,6±0,2		1,6±0,2		1,7±0,8			2,1±0,2		(8,6±0,9)×10 ⁶		
Грибы	1,4±0,1	1,3±0,2	1,1±0,2	0,8±0,2	1,6±0,2	1,2±0,1	1,6±0,1	0,8±0,1	1,6±0,2	1,7±0,1	1,6±0,2	(0,9±0,03)×10 ⁴	(1,5±0,2)×10 ⁴	
	1,1±0,2		1,2±0,2		1,1±0,2		1,3±0,2			1,4±0,2		(1,9±0,3)×10 ⁴		
Водоросли	10,1±3,4	1,3±0,1	1,6±0,4	1,3±0,1	8,2±2,1	1,3±0,1	1,6±0,5	1,3±0,1	1,4±0,1	8,5±2,0	1,4±0,1	(3,6±0,9)×10 ⁴	(12,0±0)×10 ⁴	
	4,8±1,8		1,0±0,1		6,3±1,5		1,1±0,1			10,7±1,6		(8,0±0,8)×10 ⁴		

Примечание: Π_1 — дерново-карбонатная почва; Π_2 — дерново-подзолистая почва.

Таблица 2

Влияние различных факторов на численность почвенных микроорганизмов
(по четырехфакторному дисперсионному анализу)

Факторы	Критерий Фишера	
	Варианты 1 и 2	Варианты 1 и 3
Сезоны (A)	0,44	
Тип почвы (A)		38,66**
Пирофосфат натрия (B)	53,08**	183,15**
Тип механического воздействия (C)	12,48**	37,29**
Группы микроорганизмов (L)	14,97**	28,23**
Взаимодействие факторов:		
A×B	0,34	13,38**
A×C	0,04	4,97*
B×C	2,69	6,95**
A×L	2,76	23,11**
B×L	12,65**	20,95**
C×L	1,39	7,94**
A×B×C	0,01	1,04
A×B×L	0,56	22,44**
A×C×L	0,77	1,79
B×C×L	0,32	4,83**
Остаточное: A×B×C×L	1,3749625	0,288317

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

При обработке почвенных образцов на магнитной и пропеллерной мешалках с пирофосфатом натрия численность бактерий возрастала больше всего: у аэробно-целлюлозоразлагающих бактерий в 9 раз по сравнению с исходным (дерново-карбонатная почва), у других физиологических групп бактерий в 3—4 раза. Хорошие результаты получены также у почвенных грибов и актиномицетов: число грибов возрастало в 1,7 (дерново-карбонатная почва) и в 1,6 раза (дерново-подзолистая), а число актиномицетов — в 2,1 (дерново-карбонатная) и в 1,9 раза (дерново-подзолистая). Добавление пирофосфата натрия увеличивало численность почвенных водорослей в зависимости от вида обработки и типа почвы от 4,8 до 10,7 раза.

Нами обнаружено также, что флористический состав водорослей в значительной мере зависит от способа обработки суспензий почвы. В результате дисперсионного анализа полученных данных (табл. 2) выяснилось, что существенные различия наблюдаются как между типами почв и физиологическими группами микроорганизмов, так и между вариантами механической обработки, что было отмечено и при анализе начальных данных. Статистически подтверждается также совместное влияние различных факторов — типа почвы и способа механической обработки, типа почвы и вида микроорганизмов, типа почвы, пирофосфата натрия и группы микроорганизмов, т. е. эффективность подготовки проб почвы к микробиологическому анализу в существенной мере зависит от того, какой способ обработки используется для десорбции микроорганизмов почвы, какая физиологическая группа микроорганизмов исследуется, каков тип почвы и добавлен ли в почвенную суспензию пирофосфат натрия или нет.

Большое значение совместного воздействия многих факторов показывает, что влияние каждого из них в отдельности зависит от действия

остальных. Например, разные методы диспергирования дают разные результаты на различных типах почвы в случае различных физиологических групп микроорганизмов, а также в зависимости от того, в какое время года взяты для анализа образцы почвы. Существенны также интеракции ряда факторов более высокого уровня, которые показывают, что количество микроорганизмов в почве находится в очень сложной и многосторонней зависимости от большого числа факторов. Это необходимо учитывать при анализе объективных показателей численности микроорганизмов.

Таким образом, наши опыты показали, что при применении более интенсивных диспергирующих методов обработки почвенных суспензий определяемое количество микроорганизмов увеличивается. Эффективность обработки в значительной степени зависит от группы микроорганизмов и типа почвы, поскольку почвы различаются адсорбционной способностью по отношению к клеткам микроорганизмов. Традиционные методы отмывания микробов от почвенных частиц (5—15-минутное перемешивание) десорбируют только незначительную часть почвенных микроорганизмов (которые слабо адсорбированы). Использование детергента (пирофосфата натрия) при обычном взбалтывании может уже существенно увеличить количество десорбируемых микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

- Звягинцев Д. Г. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями. М., 1973.
- Звягинцев Д. Г., Питрюк А. П. Развитие микроорганизмов в проточных и непроточных капиллярах разной толщины. — Микробиология, 1973, 42, 60—96.
- Мишустин Е. Н. Симпозиум по микробиологическим методам изучения почвы в Бельгии, 3—6 VI 1957. — Микробиология, 1958, 27, 137—140.
- Рахно П. Х. Сезонная количественная динамика почвенных бактерий и факторы, обуславливающие ее. Таллин, 1964.
- Рийс Х. А., Рахно П. Х. Количественная динамика почвенных водорослей. Таллин, 1975.
- Урбах В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. М., 1963.
- Rahno, P. Mullaosakeste adsorbeerivast toimest bakteritele. — ENSV TA Toim. Biol., 1961, 10, 302—310.
- Singh-Verma, S. On the problem of quantitative estimation of microorganisms in soil by Koch's plate method. — Biol. Sol., 1967, 7, 14—17.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
19/XII 1980

Evi PARSIM, [Paul RAHNO]

MULLA MIKROORGANISMIDE DESORPTSIOONI MEETODITEST NENDE ARVUKUSE MÄÄRAMISEKS

Artiklis on käsitletud erinevaid dispergeerimismeetodeid mullaproovide ettevalmistamiseks mikrobioloogiliseks analüüsiks. Kätsed on näidanud, et mullaproovide ettevalmistamise efektiivsus sõltub oluliselt sellest, millist töötlemisviisi mulla mikroorganismide desorptsiooniks kasutatakse, millist mikroorganismide gruppi uuritakse, millise mullatüübiga on tegemist, kas mullasuspensioonile on lisatud dispergeerivat ainet. On tehtud järeldus, et mikroorganismide arvukuse andmed on väga keerulises ja mitmepalgelises sõltuvuses paljudest teguritest, mida tuleb objektiivsete näitajate analüüsimisel arvestada.

Еви PARSIM, Paul RAHNO

ON METHODS OF DESORPTION OF SOIL MICROORGANISMS FOR DETERMINING THEIR ABUNDANCE

The article deals with different desorption methods of preparing soil samples for microbiological analysis. Tests have shown that the efficiency of the preparation of soil samples eminently depends on the desorption methods on the particular group of the microorganisms under study, on the soil type, as well as on the fact whether a dispersive agent has been added to the soil suspension or not. It has been concluded that the data on the abundance of microorganisms are in an extremely complicated and manysided dependence on a number of factors that have to be considered at analysing the objective results of tests concerning the abundance of the microorganisms under study.