

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОМАССЫ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ¹

И. В. Евдокимов

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
Россия, 142290, Пушкино, ул. Институтская, 2
E-mail: ilyaevd@yahoo.com

METHODS FOR MEASURING MICROBIAL BIOMASS IN SOIL

I. V. Evdokimov

I. V. - i vdokimov

RAS Institute of Physical and Biological Problems in Soil Science,
2 Institutskaya str., 142290, Pushchino, Moscow district, Russia
E-mail: ilyaevd@yahoo.com

Аннотация. Обзор посвящен описанию, сравнению и логике развития наиболее распространенных современных методов и принципов определения микробной биомассы в почве, не требующих владения навыками микроскопии, работы с чистыми культурами и других узкоспецифических навыков для «классической микробиологии». Эти методы могут применяться широким кругом исследователей, заинтересованных в информации о биомассе почвенного микробного сообщества, являющегося активной и наиболее лабильной частью почвенного органического вещества. Дается последовательное описание наиболее распространенных методов в соответствии со способом получения аналитического сигнала: 1) биоцидные методы; 2) методы, основанные на определении дыхательного отклика микробного сообщества на внесение глюкозы; 3) методы, основанные на анализе биомаркеров. При описании мы указываем на область применения и на ограничения, присущие каждому из рассматриваемых методов, а также описываем типичные ошибки, распространенные при их использовании.

Ключевые слова: почвенная микробная биомасса, фумигация-экстракция (FE), субстрат-индуцированное дыхание (SIR), кинетика микробного роста, жирные кислоты фосфолипидов (PLFA), биомаркеры, АТФ, ДНК, пересчетные коэффициенты.

Abstract. In this review we describe and compare the most common modern methods and approaches for measuring microbial biomass in soil. These methods do not require professional training in microscopy, work with pure cultures of microorganisms and other specific skills within «traditional microbiology». The methods under consideration can be applied by a wide range of researchers interested in getting information on microbial biomass that represents the most active and labile fraction of soil organic substance. The methods are grouped into three broad categories: 1) biocidal methods; 2) methods based on the respiratory response of soil microbial community to the addition of glucose; 3) methods that use various biochemical markers. We specify the application areas and limitations of each method as well as typical errors and miscalculations that arise in practical work.

Key words: soil microbial biomass, fumigation-extraction (FE), substrate-induced respiration (SIR), microbial growth kinetics, phospholipid fatty acids (PLFA), biomarkers, ATP, DNA, conversion factors.

Введение

Почвенные микроорганизмы являются одним из важнейших компонентов почвы, вносящим огромный вклад в формирование потоков вещества в системе почва – растения – атмосфера. Микробное сообщество почвы участвует во множестве биогеохимических процессов, преобразуя соединения углерода, азота, фосфора серы и других биофильных элементов. Поэтому в математических моделях, описывающих циклы азота и углерода в почве, микробную биомассу обычно концептуально относят к

активной и наиболее лабильной части почвенного органического вещества (ПОВ). Кроме того, почвенная микробная биомасса служит важным индикатором стрессов, вызванных сельскохозяйственной обработкой, изменением погодных условий, загрязнением почвы ксенобиотиками. Вот почему в последние десятилетия получили бурное развитие многочисленные методы определения микробной биомассы.

Почва представляет собой гетерогенную многофазную среду с крайне неравномерным распределением как микроорганизмов, так и питательных субстратов; взаимосвязи между мик-

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-04-01933).

роорганизмами крайне сложны и включают систему обмена химическими сигнальными веществами. Это создает огромные методические трудности при изучении жизни почвенного микробного сообщества как *in vitro*, так и *in situ*. Наряду с многообразием задач, стоящих перед почвенными микробиологами, фактор сложности такого объекта, как почва и ее микробное население, также способствует развитию разнообразия методов почвенной микробиологии.

Из всего многообразия методов мы выбрали в основном наиболее удобные и простые в исполнении, доступные почти для любой современной химико-аналитической лаборатории средней руки. Мы сознательно исключили из рассмотрения методы, требующие владения специальными узкоспецифическими навыками «чистой микробиологии» – микроскопии, работы с чистыми культурами и др. Но даже и при таких ограничениях объем обзора не позволяет остановиться на всех методах, отвечающих критериям простоты, доступности, воспроизводимости и надежности при определении почвенной микробной биомассы, поскольку к настоящему времени разработаны десятки таких методических подходов. Следует отметить, что единой (общепринятой) классификации методов определения биомассы микроорганизмов в почве не существует. Исходя из того, что данный обзор предназначен для широкого круга исследователей – специалистов в различных областях биологии и почвоведения, не всегда знакомых с тонкостями собственно почвенной микробиологии, мы выстроили изложение в соответствии с классификацией методов по принципу получения аналитического сигнала: 1) биоцидные методы; 2) методы, основанные на определении дыхательного отклика микробного сообщества на внесение глюкозы; 3) методы, основанные на анализе биомаркеров. При описании методов мы указываем на их область применения и присущие им недостатки и ограничения.

1. Биоцидные методы

1.1. Фумигационный метод

Идея количественного определения микробной биомассы в почве после биоцидной обработки, приводящей к гибели значительной части почвенного микробного сообщества, получила развитие благодаря трудам Д. С. Дженкинсона – одного из крупнейших почвенных микробиологов XX–XXI вв. Дженкинсоном и его сотрудниками был получен огромный массив данных о действии тех или иных неблагоприятных факторов на выживание микроорганизмов

в почве [1]. В результате ими был предложен новый метод определения общей микробной биомассы в почве, основанный на оценке количества подвижных углеродсодержащих органических веществ, поступающих из биомассы почвенных микроорганизмов после биоцидной обработки. В качестве биоцидной обработки авторы предложили 24-часовую экспозицию образцов в атмосфере, содержащей пары хлороформа [2]. Первоначальный вариант метода *Фумигации-инкубации* (ФИ, *chloroform fumigation incubation* (CFI, FI)) предусматривал определение «прироста С» («С flush») по интенсивности выделения углекислого газа из почвы в течение 10-суточной инкубации после окончания биоцидной обработки (инкубация началась сразу же после эвакуации хлороформа). В дальнейшем авторами был предложен и вариант метода определения азота микробной биомассы по «приросту» минерализуемого азота микробной биомассы, определяемого по концентрации аммония («N flush») [3]. Прирост минерализуемых С и N после окончания фумигации происходит за счет того, что микроорганизмы, выжившие во время фумигации (прежде всего это представители видов, образующих споры или цисты), используют убитую микробную биомассу в качестве ростового субстрата, минерализуя ее в течение инкубации до углекислого газа и аммония. Расчет углерода биомассы $C_{\text{мик}}$ производится по следующей формуле:

$$C_{\text{мик}} = (F_C - Uf_C) / k_C, \quad (1)$$

где F_C – количество CO_2 , выделившегося из фумигированной почвы в период 10-дневной инкубации; Uf_C – количество CO_2 , выделившегося из контрольной почвы – нефумигированной, либо же из фумигированной почвы в период 10–20 сут после фумигации; k_C – часть микробной биомассы, минерализованная до CO_2 , или, иначе говоря – пересчетный коэффициент для расчета биомассы. Содержание азота микробной биомассы рассчитывается по аналогичной формуле, где вместо органического углерода, минерализованного до углекислого газа, подставляют азот, минерализованный до NH_4^+ , с соответствующим пересчетным коэффициентом k_N .

В середине 80-х гг. XX в. авторами метода фумигации-инкубации был предложен новый вариант фумигационного метода – *Метод фумигации-экстракции* (ФЭ, *chloroform fumigation extraction* (CFE, FE)) [4], в настоящее время практически полностью вытеснивший метод ФИ. В методе фумигации-экстракции при сохранении базовой техники биоцидной обработки используются более быстрое определение

количеств углерода и азота в убитой микробной биомассе. Принцип метода фумигации-экстракции основан на экстрагировании раствором 0,5 М K_2SO_4 продуктов лизиса биомассы почвенных микроорганизмов, убитых в ходе 24-часовой фумигации почвы парами хлороформа. Вскоре после разработки метода ФЭ для определения углерода микробной биомассы появились и разновидности данного метода для определения не только углерода и азота, но и фосфора в составе почвенной микробной биомассы [5–7]. Расчет запасов углерода и азота микробной биомассы ($S_{мик}$ и $N_{мик}$) производится аналогично таковому в методе фумигации-инкубации, т. е. по приросту С или N («C flush» и «N flush») по сравнению с содержанием С в солевых экстрактах из контрольной нефумигированной почвы с учетом величин пересчетных коэффициентов (коэффициентов экстракции С и N убитой биомассы микроорганизмов) k_{EC} , k_{EN} и т.д. Помимо общего содержания углерода или азота в экстрактах может также определяться их изотопный состав.

Так как метод фумигации-инкубации в настоящее время практически вытеснен методами фумигации-экстракции и еще одним относительно экспрессным методом – субстрат-индуцированного дыхания (СИД), о котором пойдет речь ниже, мы приведем подробное описание только одного из наиболее распространенных вариантов ФЭ.

Свежую почву перед проведением анализа просеивают через сито 2 мм, вручную выбирают мелкие камешки и фрагменты корней растений и растительных остатков и отбирают навески из расчета 10–40 г (здесь и далее навески указаны в единицах сухого веса). Почвенные образцы делят на две серии: контрольную почву, из которой проводится экстракция растворимых соединений С и N в день начала фумигации, и почву для проведения фумигации. Почву, предназначенную для фумигации, помещают в открытые стеклянные химические стаканы, бутылки под завинчивающуюся пробку, фарфоровые чашки или чашки Петри, затем эти емкости с почвой ставят в эксикатор, дно которого выложено влажной фильтровальной бумагой (во избежание пересыхания почвы при фумигации). Целесообразнее всего использовать бутылки и колбы под завинчивающуюся или притертую пробку такого объема, чтобы в них мог поместиться экстрагент (раствор K_2SO_4) в массовой пропорции сухая почва : солевой раствор = 1:4. В эксикатор помещают также открытую емкость (чаще всего – химический стакан) с 50–100 мл хлороформа, не содержащего этанол. Если хлороформ содержит

этанол для стабилизации, то его следует очистить химической перегонкой. Все операции с хлороформом проводят только в вытяжном шкафу. На дно емкости с хлороформом помещают стеклянные или керамические гранулы, или просто кусочки стекла, которые препятствуют образованию крупных пузырьков при кипении хлороформа. Эксикатор вакуумируют с помощью насоса, присоединенного к выпускному крану в крышке, до тех пор, пока не закипает хлороформ, что визуально заметно по мелким пузырькам, образующимся в емкости с хлороформом. Кипение должно продолжаться около 1–2 мин, затем кран в крышке эксикатора перекрывают, и эксикатор оставляют на 24 ч при комнатной температуре. По окончании 24-часовой экспозиции почвы в атмосфере хлороформа кран эксикатора открывают и впускают атмосферный воздух. Затем снимают крышку эксикатора и удаляют из него емкость с хлороформом. После удаления емкости с хлороформом проводят «эвакуацию» остаточных количеств хлороформа из почвы путем 5–6-кратного вакуумирования эксикатора при помощи насоса с последующим периодическим наполнением новой порцией атмосферного воздуха через кран на крышке эксикатора. После окончания эвакуации снимают с эксикатора крышку и вынимают из него емкости с почвой. При выполнении этих манипуляций приходится прилагать немалые усилия, чтобы сдвинуть крышку с эксикатора. Поэтому крайне важно действовать аккуратно, стараясь не повредить эксикатор и крышку.

К фумигированной и контрольной почве добавляют 0,5 М раствор K_2SO_4 в пропорции 1:4 и получившуюся суспензию встряхивают на качалке в течение 30–60 мин. В некоторых случаях, например, когда требуется снижение концентрации сульфата калия при анализе на ТОС-анализаторе (приборе для анализа общего органического растворимого углерода), либо при анализе углерода в пробе на содержание изотопов ^{13}C и ^{15}N , концентрация экстрагента может быть снижена в 2–10 раз. Однако необходимо следить, чтобы уменьшение концентрации соли не вызвало критического уменьшения действия сульфата калия как электролита-коагулятора. Иначе говоря, после встряхивания на качалке солевой раствор должен хорошо фильтроваться через бумажные фильтры (для быстроты процесса лучше всего использовать складчатые фильтры). После фильтрования полученные экстракты анализируют на содержание общего С, N, P.

До проведения анализа фильтрат лучше всего хранить в холодильнике при температуре 4 °С, а при длительном хранении (более 1 сут) –

в замороженном виде в морозильнике. Выбор методов определения содержания углерода и азота зависит от приборной базы лаборатории: возможно либо проведение цветных реакций с определением концентраций окрашенных продуктов реакции на фотоколориметре/спектрофотометре, либо определение на автоматических анализаторах ТОС, ТОН, СНН и т.д. В конце раздела приводятся рекомендации по расчету содержания углерода, азота и фосфора в микробной биомассе по формуле (1) с подстановкой соответствующих величин пересчетных коэффициентов.

Процедура вакуумирования довольно утомительна: удаление хорошо притертой крышки после вакуумирования требует значительных физических усилий, осторожности и сноровки, а также травмоопасна: можно пораниться при растрескивании стеклянной крышки эксикатора. Поэтому коллективом австралийских авторов [8] была предложена замена процедуры экспозиции в парах хлороформа на экстракцию с эмульсией хлороформа в растворе K_2SO_4 . Длительность экстракции – 1 час, дозировка хлороформа 1 мл на 10 г почвы. Авторы предложили данную процедуру для определения микробного углерода, откалибровав ее по обычному методу фумигации-экстракции. Данная модификация фумигационного метода пока не нашла широкого применения и не стала общепризнанным методом – отчасти потому, что авторы не провели определений соответствующих пересчетных коэффициентов для биофильных элементов.

В последние два десятилетия был предпринят ряд попыток оптимизировать определение микробного фосфора в почве. Вариант, первоначально предложенный Бруксом в 1982 г. [6], оказался слишком ненадежным ввиду недоучета быстрой сорбции фосфатов, выделившихся при фумигации на поверхности глинистых минералов и органо-минеральных комплексов, а также из-за использования постоянного пересчетного коэффициента $k_p = 0,4$ вне зависимости от почвенного типа. В качестве альтернативы было предложено использование анионообменных мембран с поверхностями, насыщенными анионом слабой кислоты (бикарбонатом) [7, 9, 10], с определением пересчетных коэффициентов для каждого типа почвы в калибровочных экспериментах с радиоактивной изотопной меткой ^{33}P [11].

Определение микробного фосфора в почве производится следующим образом. Сначала мембраны готовятся к работе: происходит разрезание исходных мембран (промышленная выпускаемая упаковка) на полоски $1,5 \times 6,25$ см,

2-кратное встряхивание с 200 мл 0,5 М $NaHCO_3$ по 24 ч (25 полосок на одну 250-мл пластиковую колбу), затем все полоски мембран переносятся в дистиллированную воду и хранятся в ней вплоть до использования. Собственно процедура сорбции Р на мембранах проводится встряхиванием в течение 24 ч на автоматической качалке (160 оборотов/мин) 3 г навески почвы в 50-мл пластиковой пробирке с закручивающейся пробкой с 30 мл воды (контроль без фумигации), либо с суспензией 0,3 мл хлороформа в 30 мл воды (фумигация). Перед встряхиванием во все пробирки вносят по одной мембране. По окончании сорбции мембраны ополаскиваются водой, а затем встряхиваются в течение 3 ч с 0,25 М H_2SO_4 ; кислый экстракт анализируется на содержание общего и меченого фосфора. По окончании эксперимента мембраны отмывают повторным встряхиванием с 0,25 М H_2SO_4 в течение 1 ч и 2-кратным встряхиванием с дистиллированной водой по 1 ч каждое. Затем повторяется процедура «зарядки» поверхности мембран с 0,5 М $NaHCO_3$. Визуально экстракция с мембранами приводит к разрушению поверхностных слоев ткани мембран. Однако экспериментально показана возможность использования мембран по крайней мере еще 8–10 раз [9, 11].

Определение общего количества фосфора возможно при помощи как анализаторов общего фосфора в жидких пробах, так и более дешевым способом – посредством проведения цветных реакций с последующим колориметрическим окончанием. Если в лаборатории имеется планшетный ридер для считывания информации с 96-ячеистых планшеток, оптимальным является колориметрический экспресс-метод определения растворимого фосфора в почвенных экстрактах с малахитовым зеленым (МГ) [12].

1.2. Метод регидратации

В 80-х гг. XX в. предпринимался ряд попыток модифицировать/упростить процедуру биоцидной обработки. Российскими исследователями был создан *регидратационный метод*, в котором в качестве биоцидной обработки было предложено высушивание почвы при 65–70 °С вместо фумигации [13]. Подобно фумигационному методу, авторами регидратации были апробированы оба основных способа определения количества биомассы микроорганизмов, убитых высушиванием – *регидратация-инкубация* (ПИ, *rehydration-incubation* (RI)) и *регидратация-экстракция* (ПЭ, *rehydration-extraction* (RE)), которые показали похожие результаты. В последующие годы исследователи в нашей стране использовали в основном вариант ре-

гидратации-экстракции [14, 15]. В целом определение методом регидратации-экстракции проводят по схеме, напоминающей схему для метода фумигации-экстракции. Подготовленные навески из расчета 10–40 г (сухой вес) делят на две серии: 1) контрольную почву, из которой проводится экстракция растворимых соединений С и N в день начала операции высушивания; 2) почву для проведения процедуры высушивания-регидратации. Эту почву помещают в открытых стеклянных или фарфоровых емкостях в сушильный шкаф и высушивают в течение 24 ч при температуре 65–70 °С. В качестве открытых емкостей для образцов почвы часто используют чашки Петри, но целесообразнее всего использовать колбы или закрывающиеся стеклянные бутылки с объемом, достаточным для последующего внесения в высушенную почву раствора 0,5 М K_2SO_4 . Процедура экстракции соединений С и N проводится по той же схеме, что и в методе фумигации-экстракции. Расчет производят по формуле (1), но с использованием других пересчетных коэффициентов k_{EC} и k_{EN} (см. ниже).

Преимущества регидратационного метода по сравнению с фумигационным:

- не нужно использовать токсические вещества (фумиганты);
- меньшая трудоемкость, отсутствие манипуляций с вакуумным эксикатором;
- возможность хранить высушенные пробы длительное время, «накапливая» их для экстракции и анализа на С и N.

Недостатки метода по сравнению с фумигационным:

- большее количество растворенных органических веществ в экстракте, имеющих немикробное происхождение (различные компоненты ПОВ становятся более растворимыми в результате высушивания);
- невозможно использование этого метода для определения микробного фосфора из-за интенсивной фиксации фосфора убитой биомассы на глинистых минералах в процессе высушивания почвы;
- отсутствие апробации метода в широком ряду почв и экологических условий – этот метод так и не стал «стандартным», общепризнанным в мире.

1.3. Проблема пересчетных коэффициентов в биоцидных методах

Недостатки и ограничения всех биоцидных методов связаны прежде всего с необходимостью использования пересчетных коэффициен-

тов для перехода от величин «приростов» углерода, азота и фосфора к величинам собственно углеродного и азотного пулов в составе микробной биомассы. Величина пересчетного коэффициента отражает долю убитой биомассы и полноту извлечения соевым раствором веществ убитой микробной биомассы. Она может сильно варьировать в зависимости от поступления в почву свежей органики (в виде растительного опада, при удобрении почв навозом и торфом и т.д.), от внесения минеральных азотных удобрений (для k_{EN}), от величины рН, состава обменных оснований, влажности и других экофизиологических факторов.

Чтобы представить себе, насколько сложна проблема правильного определения пересчетных коэффициентов, достаточно привести список *способов определения пересчетных коэффициентов:*

- сравнение с результатами прямого микрокопирования [2] – «непрямой метод»;
- по результатам определения С или N в биомассе микроорганизмов, выращенных на искусственных средах [16] – «непрямой метод»;
- для k_{EN} – расчет по усредненному значению С:N в «приросте» после фумигации [17] – «непрямой метод»;
- «Прямая калибровка» с внесением ^{13}C или ^{14}C меченого углеродного субстрата (при определении k_{EC}), ^{15}N меченого источника N (при определении k_{EN}) или источников ^{32}P или ^{33}P (при определении k_P) с последующим определением полного баланса метки, поступающей в почву, биомассу микроорганизмов и в состав газообразных потерь изотопа в форме CO_2 (для изотопов углерода) [3, 4, 11]. При определении полного баланса радиоактивных изотопов фосфора необходимо не только учесть эффективность экстракции фосфатов как таковую, но и определить коэффициенты изотопного обмена и сорбции на почвенных частицах [11];
- «Прямая калибровка» изотопами с широким интервалом величин С/N во вносимом субстрате, либо при значительном варьировании других факторов (рН, почвенная влажность и т.д.). При этом появляется возможность получить эмпирические уравнения зависимости пересчетных коэффициентов от вышеперечисленных экофизиологических факторов. Например, в калибровочном эксперименте с буроземом для микробного углерода было получено следующее эмпирическое уравнение зависимости пересчетного коэффициента от соотношения С/N в «приросте» экстрагируемых углерода и азота (величина $X_{C/N}$):

$$k_{EC} = 0,2 \times (X_{C/N})^{0,3}. \quad (2)$$

Соотношение C/N в «приростах» колебалось от 3,4 до 36,2, при этом величины k_{EC} варьировали от 0,18 (при максимальной величине C/N в «приросте») до 0,62 (при минимальной) [18]. В экспериментах с серой лесной почвой и черноземом было получено эмпирическое уравнение, учитывающее соотношение C/N в структурных компонентах клеток (γ) и цитоплазме (α), причем последний показатель фактически был равен величине C/N в «приростах» экстрагируемого вещества убитых микробных клеток, определяемой экспериментально для каждой конкретной почвы [15]:

$$k_{EN} = (\gamma \times (1 - k_{EC}) + \alpha \times k_{EC}) \times k_{EC} / \alpha. \quad (3)$$

Аппроксимирование экспериментальных данных по этому уравнению дает наилучшую сходимость при $\gamma = 4,72$ и $k_{EC} = 0,21$, причем вне зависимости от того, какой метод – фумигации-экстракции или регидратации-экстракции – используется. Чем выше величина α , т.е. соотношение C:N в «приросте» экстрагируемых веществ из убитой микробной биомассы, тем ниже пересчетный коэффициент. Что касается пересчетных коэффициентов для микробного фосфора, то недавно были проведены определения корреляционных связей между величиной k_p и свойствами почвы (общее содержание фосфора в почве, pH, содержание физической глины, содержание почвенного органического вещества) [19]. На практике при определении микробного фосфора все еще используется постоянная величина $k_p = 0,4$, предложенная Бруксом в 1982 г. [6].

Следует отметить, что в подавляющем большинстве случаев исследователи не определяют пересчетные коэффициенты для микробного углерода и азота экспериментально для конкретных почв, а выбирают более простой путь – используют наиболее часто встречающиеся в литературе величины $k_{EC} = 0,45$ и $k_{EN} = 0,54$ для фумигации-экстракции и 0,25 и 0,22 соответственно – для регидратации-экстракции [15]. *Это является главным источником ошибок при применении биоцидных методов!* Ведь величина $k_{EC} = 0,45$ была получена одним из авторов метода фумигации-экстракции Йоргенсенем как усредненная для широкого ряда сельскохозяйственных почв, а для прочих почв этот коэффициент было предложено определять в дополнительных калибровочных экспериментах [20]. В принципе, определения микробного углерода или азота фумигационным и регидратационным методами должны совпадать (оба метода предназначены для определения *общего пула микробной биомассы*), и любые несовпадения указывают

на неточности и несовершенство в определении соответствующих пересчетных коэффициентов.

Что касается определений микробного фосфора, то, как мы уже сказали выше, регидратация оказалась совершенно непригодной для этой цели, а удовлетворительные результаты достигаются только при использовании метода с анион-обменными мембранами. Было показано, что в ряду 4 российских почв (подзол, серая лесная, чернозем, каштановая) пересчетные коэффициенты k_p , определенные индивидуально для каждого типа почв при помощи мечения изотопом ^{33}P , варьировались от 0,19 до 0,38 [11]. Таким образом, использование для этих почв пересчетного коэффициента 0,4, предложенного Бруксом [6], привело бы к занижению количеств микробного фосфора в почве на 5–50 %.

Несмотря на вышеуказанные недостатки, метод фумигации-экстракции остается основным методом определения общей микробной биомассы в почве, не требующим сложного оборудования для проведения экстракции и анализов.

2. Методы, основанные на определении дыхательного отклика микробного сообщества на внесение глюкозы

2.1. Метод субстрат-индуцированного дыхания

Исследования, направленные на поиск и апробацию простых и удобных методов определения общей микробной биомассы, привели в конце 70-х гг. XX в. к разработке еще одного метода определения микробной биомассы – *метода субстрат-индуцированного дыхания, СИД (substrate induced respiration, SIR)*. Авторы СИД – немецкие ученые Андерсон и Домш [21] – в основу метода заложили три принципиальных методологических допущения: 1) дыхательный отклик почвенных микроорганизмов на внесение легкодоступного субстрата (глюкозы) постоянен в течение всего периода измерения; 2) дыхательный отклик прямо пропорционален размеру общей микробной биомассы в почве; 3) отсутствует рост микробной биомассы в почве в течение первых нескольких часов после внесения глюкозы. Углерод микробной биомассы рассчитывается с использованием пересчетного коэффициента, при этом из дыхательного отклика вычитается «базальное дыхание» (дыхание почвенного микробного сообщества до внесения углеродного субстрата).

В принципе, все имеющиеся в настоящее время модификации метода очень похожи. Приведем наиболее распространенный вариант

для СИД с использованием газохроматографического определения концентраций CO_2 . Свежую почву просеивают через сито 2 мм (в некоторых описания указывается, что достаточно просеивания через 3 мм – [22]), вручную выбирают мелкие камешки и фрагменты корней растений и растительных остатков, и отбирают навески почвы в стеклянные сосуды с плотными резиновыми или силиконовыми пробками из примерного расчета 1 объем почвы на 10 объемов воздуха. Практически размер почвенной навески может варьировать в широких пределах: при использовании в качестве инкубационных сосудов 15 или 20 мл пенициллиновых флаконов навеска почвы не должна превышать 1–1,5 г (сухой вес), в сосудах большего объема (100–500 мл) она может достигать 10–50 г. Чем больше навеска, тем более репрезентативным будет образец, и тем меньше будет разброс между повторностями. Если позволяют условия эксперимента (например, не определяется кратковременная динамика микробной биомассы), почву в сосудах лучше предварительно пре-инкубировать в термостате при температуре 22 °C в течение 1–3 сут, чтобы прошли возмущения, привнесенные в систему почва–микроорганизмы при перемешивании, просеивании и смене температуры [22, 23]. Затем в почву вносят глюкозу из расчета 10 мг глюкозы на 1 г почвы либо в виде водного раствора, либо в сухом виде в смеси с тальком или прокаленным песком (пропорция «глюкоза:инертный наполнитель» 1:1,5 – 1:2). Итоговая влажность в почве должна составлять 60 ± 5 % полной влагоемкости (ПВ). При необходимости перувлажненную почву перед внесением глюкозы слегка подсушивают медленным перемешиванием в вытяжном шкафу или с феном. Обогащенную глюкозой почву перемешивают и инкубируют в течение часа при комнатной температуре. Затем открытые сосуды проветривают в вытяжном шкафу, чтобы избавиться от избытка углекислого газа, образовавшегося при внесении глюкозы и при перемешивании почвы. Затем сосуды плотно закрывают резиновыми или силиконовыми пробками и на 2–3 ч ставят в термостат при 22 °C. По истечении этого срока из сосудов отбирают газовые пробы, прокалывая пробки шприцом. Расчет объема выделившегося углекислого газа производится в соответствии со следующей формулой [22]:

$$A [\text{мл CO}_2] = \% \text{CO}_2 \times 44 \times V_{\text{фл}} / 22,4 / 100, \quad (4)$$

где A [мл CO_2] – объем выделившегося CO_2 в мл; 44 – молярный вес углекислого газа; $V_{\text{фл}}$ – объем флакона; 22,4 – объем 1 миллимоля газа,

мл. Затем производится расчет скорости дыхания (интенсивности выделения CO_2):

$$v [\text{мкл CO}_2 / (\text{г} \times \text{час})] = A \times 1000 / \text{масса почвы} / [\text{г}] / \text{время} [\text{ч}]. \quad (5)$$

Расчет количества углерода микробной биомассы производится по следующей формуле:

$$C_{\text{мик}} (\text{мкг C} / \text{г}) = K_{\text{SIR}} \times v. \quad (6)$$

Первоначально авторы метода откалибровали СИД по методу фумигации-инкубации [21] и предложили $K_{\text{SIR}} = 40,04$, а оригинальное уравнение для расчета углерода микробной биомассы $C_{\text{мик}}$ (мкг C / г) в зависимости от скорости выделения v [мкл $\text{CO}_2 / (\text{г} \times \text{час})$] выглядело следующим образом:

$$C_{\text{мик}} = 40,04 \cdot v + 0,37. \quad (7)$$

Позднее немецким почвенным микробиологом Кайзером было выполнено впечатляющее по масштабам исследование, в котором он откалибровал метод СИД по результатам фумигации-инкубации на широком ряде сельскохозяйственных почв и показал, что в среднем для почв больше подходит $K_{\text{SIR}} = 30$, а инкрементом 0,37 можно пренебречь [24]. Калибровка СИД по методу фумигации-экстракции при тех же условиях температуры и влажности дала схожие величины – 27,6 [25]; 35,2 [26], хотя данные авторы и использовали инкременты в калибровочных уравнениях. Тем не менее, большинство исследователей для перехода от величины дыхательного отклика сообщества к величине общей микробной биомассы предпочитает использовать пересчитанный коэффициент 40,04, предложенный авторами метода [21].

Описанная выше методика определения микробной биомассы методом СИД с отбором газовых проб вручную может быть автоматизирована, а газохроматографическое измерение концентраций CO_2 в автоматических системах пробоотбора и измерения во многих случаях заменяется на измерение методом инфракрасной спектроскопии. В этом химико-аналитическом методе определяется интенсивность поглощения света молекулами CO_2 в инфракрасной области, т.е. проводится определение концентрации углекислого газа на инфракрасном газоанализаторе – infrared gas analyzer (IRGA). В Западной Европе получила распространение автоматизированная система Хайнемайера [27]. Существует две основных комплектации установки – на 12 и 24 пробы почвы. Навески почвы (чаще всего 10–30 г) помещают в пластиковые трубки между двумя поролоновыми прокладками, позволяющими свободно продувать воздух через всю массу анализируемой

почвы. Трубки с почвой герметично соединены при помощи гибких силиконовых трубок с прочими элементами автоматической системы: 1) насосами, обеспечивающими непрерывную продувку воздуха через систему; 2) флаконами с 0,5 М HCl (продувка через водный раствор обеспечивает непрерывное увлажнение проб и предохраняет их от пересыхания, соляная кислота предохраняет жидкость во флаконах от обрастания водорослями); 3) инфракрасным газоанализатором; 4) блоком-переключателем каналов, переключающим детектор на анализ очередной газовой пробы; этот блок управляется через компьютер. Установка должна работать в хорошо термостатируемой комнате. Система позволяет делать до 60 отборов и замеров CO₂ в час, что существенно выше производительности автоматических систем с газохроматографическим детектированием – не более 20–25 анализов в час.

Альтернативу автоматическому измерению концентрации CO₂ в газовой фазе предоставляют системы, основанные на абсорбции CO₂ щелочью (определение эмиссии CO₂ *адсорбционным методом*). Современный уровень автоматического определения CO₂ адсорбционным методом воплощен в установках RESPICOND, выпускаемых шведской фирмой A. Nordgren Innovations AB. Эта система позволяет добиться хорошей сходимости и большей производительности, чем система Хайнмайера – до 3 определений в минуту в варианте установки на 96 проб, т.е. почти 300 определений в час. Почва помещается в пластиковые стаканчики, стаканчики герметически изолируют в микрокосме с емкостью, содержащей раствор KOH. Микрокосмы погружены в 0,1 н раствор HCl, который является наполнителем для гигантского жидкостного термостата. RESPICOND, как и установка Хайнмайера, должна работать в хорошо термостатируемой комнате. Измерения электропроводности раствора щелочи производятся автоматически через заранее установленные интервалы времени. Уменьшение электропроводности прямо пропорционально поглощению CO₂ из атмосферы микрокосма, весь процесс считывания и запоминания полностью автоматизирован. Функциональным аналогом системы RESPICOND является система непрямого измерения потоков CO₂ – Rapid Automated Bacterial Impedance technique (RABIT, Don Whitley Scientific Ltd.). Система RABIT также основана на определениях падения электропроводности в растворе щелочи при поглощении CO₂ с последующим образованием карбоната. Оригинальная методика использования системы RABIT была описана в работе Ритца с соавторами в 2006 г.

[28]. Приведем модифицированную методику, описанную в недавней работе Гильмуллиной с соавторами [29]. В стерилизованные ячейки прибора вносили по 3 мл 0,1 М NaOH и оставляли на ночь для стабилизации. После внесения глюкозы в почву почвенные образцы помещали в прибор рядом с соответствующими ячейками с щелочью и оставляли на 2 часа с целью выравнивания температуры термостатирования. Раствор NaOH меняли каждые 52 часа, определения электропроводности раствора щелочи в процессе адсорбции углекислого газа определяли каждые 0,5 часа при 25 °С. Единицы электропроводности пересчитывали в единицы скорости дыхания (мкг С-CO₂ /час), используя пересчетный коэффициент, определяемый в отдельных экспериментах [29].

Преимущества СИД по сравнению с биоцидными методами:

- не нужно использовать токсические вещества (фумиганты), не нужно производить измерения растворимых соединений С – для определения микробной биомассы достаточно иметь в лаборатории только газометрическое оборудование;

- меньшая трудоемкость при использовании автоматической установки с IRGA, RESPICOND или RABIT, возможность параллельного определения микробной биомассы в большем числе повторностей и вариантов опыта;

- возможность определять микробную биомассу параллельно с определением базального дыхания почвенного микробного сообщества на той же установке;

- возможность селективного определения доли грибов и бактерий путем подавления соответствующих групп организмов – бактерий с помощью антибиотиков (например, стрептомицина), грибов – с помощью циклогексимида (актидиона), подавляющего синтез белков у эукариотов [23].

Недостатки и ограничения СИД по сравнению с биоцидными методами:

- нельзя определять содержание N, P в микробной биомассе;

- невозможно определить изотопный состав микробной биомассы;

- невозможно «напрямую» определить пересчетный коэффициент K_{SIR} изотопными методами;

- ненадежность определений углерода микробной биомассы в почвах, обогащенных свежеснесенной органикой – в этих случаях не выполняется условие постоянства;

- ненадежность определений углерода микробной биомассы в почвах с рН почвенного

раствора выше 6,5 (т.е. нейтральных и щелочных). В этих почвах происходит аналитически значимое растворение углекислого газа в почвенном растворе. Для таких почв нужно вводить поправку на растворимость CO_2 .

Как видно из перечисленного, методу СИД присущи, в том числе, и недостатки метода фумигации-инкубации. Однако СИД – более быстрый метод (не требует инкубаций длительностью 10–20 сут), не требует сложных манипуляций с вакуумированием и фумигацией, обладая при этом важным преимуществом ФИ метода – возможностью определять углерод микробной биомассы в лаборатории, оснащенной только газометрическим оборудованием; нет необходимости в оснащении, предназначенном для «мокрой» химии. Поэтому в настоящее время метод фумигации-инкубации практически вышел из употребления: трудно представить себе ситуацию, когда ФИ метод был бы удобнее, чем СИД.

2.2. Кинетический метод

Простота химико-аналитических принципов, лежащих в основе СИД, с одной стороны, и ряд существенных недостатков этого метода, с другой, натолкнули российского микробиолога Н. С. Паникова на разработку *кинетического* метода, основывающегося на определении дыхательного отклика почвенного микробного сообщества [30]. В англоязычной литературе этот метод называют *substrate induced growth response (SIGR)* или *kinetics of substrate-induced response (KSIR)*. Метод основан на определении кинетики выделения углекислого газа после внесения в почву N-, P- и K-содержащих минеральных солей и избыточного количества углеродного субстрата – глюкозы. Экспоненциальный рост микробной биомассы в период 6–20 ч с момента внесения вышеперечисленных питательных субстратов описывается математической моделью. Важным отличием от СИД является обязательное внесение минеральных источников азота, фосфора и калия в количестве, обеспечивающем *нелимитированный рост* микроорганизмов в течение примерно 1 сут. Отбор и подготовка почвы проводятся по той же схеме, что в методе СИД, скорости выделения CO_2 из почвы определяются на том же оборудовании. Приведем описание методики в варианте с отбором газовых проб вручную и с газохроматографическим окончанием. Почвенные навески помещают в стеклянные флаконы с пропорциями между объемами почвы и воздуха, описанными выше для метода СИД. Затем в них вносят заранее приготовленную смесь из расчета на 1 г почвы: 10 мг глюкозы,

15 мг талька, 1,9 мг $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,25 мг K_2HPO_4 , 3,8 мг MgSO_4 . Альтернативой может служить внесение смеси в виде раствора или суспензии, причем итоговая влажность не должна превышать $60 \pm 5\%$ ПВ. Массовое соотношение C:N:P в смеси равно 10:1:1. Эквивалентное количество фосфора может вноситься в виде смеси K_2HPO_4 и KH_2PO_4 для обеспечения буферности смеси и недопущения сдвига pH в почвенном растворе свыше 0,1 относительно естественного уровня для данной почвы. Кинетический метод позволяет определить общую и активную микробную биомассу в почве в соответствии со следующими формулами [31]:

$$v(t) = v_u + v_c \times \exp(\mu_{\max} \times t), \quad (8a)$$

$$x_0 = (v_c \times 0,9 \times Y_{x/p}) / (r_0 \times \mu_{\max}), \quad (8б)$$

$$r_0 = (v_c \times 0,1) / (v_u + v_c \times 0,1), \quad (8в)$$

$$x' = x_0 \times r_0, \quad (8г)$$

где $v(t)$ – скорость продукции CO_2 , мкг $\text{CO}_2\text{-C}$ / (г × ч); t – время, ч; x_0 – общая микробная биомасса в момент времени 0, мкг C/г; x' – активная микробная биомасса мкг C/г; r_0 – фракция активной микробной биомассы в почве (доля от общей); v_c – скорость продуктивного дыхания, мкг $\text{CO}_2\text{-C}$ /(г×ч); v_u – скорость непродуктивного дыхания, мкг $\text{CO}_2\text{-C}$ / (г×ч); μ_{\max} – максимальная удельная скорость роста микроорганизмов, ч⁻¹; $Y_{x/p}$ – экономический коэффициент, равный 1,5 [31]. Подбор параметров в уравнении (8а) производится с помощью математических программ, предназначенных для поиска численных решений в уравнениях по методу наименьших квадратов (MatLab, Model Maker и др.). Так как данная математическая модель (уравнения 8а – 8г) описывает экспоненциальный нелимитированный рост в условиях отсутствия дефицита питательных элементов, для аппроксимации следует использовать только ту часть экспериментальной кривой, которая максимально соответствует экспоненте, причем критерием максимального соответствия экспериментальных данных являются максимальные значения статистических критериев Q и R^2 [32].

Скорость выделения CO_2 из почвы определяют по накоплению углекислого газа в флаконах. Пробы газа отбирают шприцом 1 раз в час, после предварительной 30-минутной инкубации образцов с плотно закрытыми крышками. В промежутках между отборами проб резиновые или силиконовые пробки с флаконов снимают, и почвенные образцы проветривают вплоть до следующего измерения скорости накопления CO_2 . Использование автоматиче-

ских респирометрических систем Хайнемайера RESPICOND или RABIT кардинально уменьшает трудоемкость определений микробной биомассы кинетическим методом и дает возможность получить лучшую сходимость повторностей при большей частоте отбора проб – до нескольких измерений в час, что положительно сказывается на точности определения биомассы кинетическим методом.

Преимущества KSIR перед другими методами определения микробной биомассы:

– определение не только *общей*, но и *активной* микробной биомассы;

– определение *параметров микробной кинетики*, что особенно важно при моделировании микробного роста в почве;

– большая чувствительность по сравнению с СИД при определении быстрой динамики микробной биомассы в почве и ризосфере;

– не требуется дополнительных операций по сравнению с СИД – кинетику выделения CO_2 можно изучать в тех же пробах, в которых определяется СИД, отбирая для расчета СИД начальный участок кинетической кривой, соответствующий отсутствию микробного роста (лаг-фаза).

Недостатки KSIR по сравнению с другими методами определения микробной биомассы:

– привлечение довольно сложного математического аппарата, высокая трудоемкость расчетов;

– параметры μ_{\max} и v_c часто бывают скоррелированными между собой – результаты расчетов микробной биомассы поэтому получаются не свободными от субъективизма исследователя;

– использование фиксированных значений коэффициента CN-резистентного дыхания и экономического коэффициента $Y_{x/p}$;

– отсутствие апробации на широком ряде почв и экосистем.

2.3. Проблема пересчетных коэффициентов в методах, основанных на определении дыхательного отклика микробного сообщества

Основная проблема, общая для всех методов определения микробной биомассы в почве – проблема неоднозначности связи между измеряемыми показателями и микробной биомассой как таковой (проблема пересчета полученного аналитического сигнала в единицы микробной биомассы). Эта проблема усугубляется не всегда адекватным пониманием, что же именно (какие пулы почвенной микробной биомассы)

определяется тем или иным методом. При определении почвенной микробной биомассы исследователи часто говорят об «общей» и «активной» ее части. Однако в реальности ситуация еще сложнее – фактически комплекс современных методов учитывает три пула микробной биомассы: 1) растущую биомассу; 2) биомассу, реагирующую на внесение глюкозы увеличением скорости дыхания (дающую дыхательный отклик, как и биомасса из пула 1), но не способную на немедленный рост; 3) биомассу, находящуюся в состоянии покоя. Предположительно, в пул 1 входят вегетативные клетки, в пул 2 – вегетативные клетки и цисты и споры, способные к быстрому (в течение нескольких часов) прорастанию в присутствии дополнительных количеств глюкозы, в пул 3 – споры, не способные к быстрому прорастанию [30]. Параллельные определения микробной биомассы кинетическим методом дают несколько более низкие результаты, чем методом СИД в тех же почвенных образцах [33]. Вероятно, кинетический метод определяет в основном сумму пулов 1 и 2, в то время как методы СИД и фунигационный (во всех модификациях) откалиброваны для определения *общего пула микробной биомассы*, в том числе и пула 3.

Другой важной проблемой является использование в методе СИД постоянного коэффициента, определенного при калибровке по методам фунигации-инкубации и фунигации-экстракции (из-за невозможности «прямой калибровки» с внесением субстратов, меченных ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N или ^{33}P). Кроме того, проблема неоднозначности пересчетного коэффициента в методе СИД усугубляется следующим обстоятельством. Неопытные исследователи для расчетов берут величину дыхательного отклика, приведенную к «весовой» размерности $\text{мкг CO}_2\text{-C}/(\text{г}\times\text{ч})$, но микробную биомассу рассчитывают по уравнению 6 с использованием коэффициента $K_{SIR} = 30$, который выведен для дыхательного отклика, выраженного в $\text{мкл CO}_2\text{-C}/(\text{г}\times\text{ч})!$ В этом случае происходит занижение расчетной величины микробной биомассы почти вдвое. Фактически нужно подставлять коэффициент $K_{SIR} = 56$, стехиометрически эквивалентный соотношению $22,4/12\times 30$, где 22,4 – объем микромоля газа, мл, а 12 – атомарная масса углерода. На том основании, что *неверно* (!) посчитанная микробная биомасса в методе СИД ниже правильно определенной фунигационным методом, а также в связи с тем, что в нем определяется дыхательная *активность* микробного сообщества, некоторые авторы до сих пор утверждают, что метод СИД определяет «активную микробную биомассу». Это *распро-*

страненная ошибка. И биоцидные методы, и СИД предназначены и откалиброваны для определения одного и того же пула – общей микробной биомассы.

3. Методы, основанные на анализе биомаркеров

Некоторые из химических веществ, входящих в состав микробных клеток, могут быть использованы в качестве маркеров для оценки микробной биомассы в почве (обозначение в англоязычной литературе – *biomarkers, biochemical indicators, signature molecules*). Такие вещества – биомаркеры могут быть: 1) «универсальными», позволяющими оценить общее количество живой биомассы микроорганизмов в почве – в этом случае биомаркеры позволяют произвести количественную оценку микробной биомассы в почве, но не дают представления о структуре микробного сообщества; 2) специфическими для тех или иных таксономических групп микроорганизмов.

3.1. Определение содержания АТФ в почве

Одним из часто используемых биомаркеров из первой группы является аденозинтрифосфат (АТФ), вещество – неперенный участник метаболических процессов, при помощи которого осуществляется «запасание» энергии в живых клетках. АТФ присутствует в составе любых живых клеток вне зависимости от их таксономической принадлежности и быстро разлагается после гибели клеток, что делает его удобным маркером живой биомассы микроорганизмов. Важно отметить, что концентрация АТФ в почве служит как индексом микробной биомассы, так и показателем метаболической активности почвенного микробного сообщества [34] – как уже было сказано выше, разделение этих двух параметров довольно условно. В основе количественного определения АТФ лежит реакция люциферина с АТФ и люциферазой в присутствии ионов Mg^{2+} . Расчет микробной биомассы на основе концентрации АТФ в почве производится с помощью пересчетного коэффициента, как и в других методах определения микробной биомассы.

Принципиальная схема определения почвенного АТФ включает в себя следующие этапы:

1. Экстракция АТФ из почвы с помощью органических экстрагентов.

2. Проведение реакции с энзимной системой «люциферин-люцифераза» с образованием комплекса с аденозинмонофосфатом (АМФ) и последующим распадом комплекса с выделением световой энергии в процессе флюоресценции.

3. Измерение флюоресценции, определение количества АМФ по интенсивности флюоресценции.

4. Расчет концентрации АТФ в пробе по стандартной калибровочной кривой. Альтернативой этапам 3) и 4) служит обработка буферами на основе этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) и Na_3PO_4 с последующим определением АМФ, АДФ (промежуточный продукт распада АТФ до АМФ – как естественно присутствующий в биомассе почвенных микроорганизмов, так и появляющийся на этапе 2) и АТФ на жидкостном хроматографе высокого разрешения (*high performance liquid chromatography – HPLC*).

5. Расчет микробной биомассы с использованием пересчетных коэффициентов. Обычно 1 моль АТФ считают эквивалентным 0,1 г сухой массы микроорганизмов, не находящихся в состоянии экспоненциального роста. Кроме того, в условиях отсутствия экспоненциального роста (в «состоянии поддержания») у микробного сообщества можно провести пересчет от количества АТФ к количествам биофильных элементов, исходя из известного соотношения для АТФ:С:N:P:S, равного 1:250:40:9:2,6. Однако следует подчеркнуть, что в условиях резких изменений в количестве микробной биомассы (например, при быстром росте микроорганизмов, вызванном внесением легкоразлагаемых субстратов) соотношение С:АТФ может изменяться с 1000:1 до 40:1 [34].

Существует множество модификаций протокола данного метода в зависимости от объекта и задач исследований. Результаты определения АТФ зависят от полноты извлечения АТФ и ее производных из убитой биомассы микроорганизмов, от типа экстракции (щелочная или кислотная), от времени преинкубации почвы перед анализом (чем дольше преинкубация, тем ниже доля активно растущих клеток и, соответственно, АТФ в почвенной биомассе) [35]. Огромную роль в разработке методов определения АТФ в почве сыграл американский исследователь Уэбстер [36, 37]. В качестве примера приведем подробное описание одной из методик, разработанной им в 1984 г. [36]. Почву, отобранную для анализа, освобождают вручную от мелких камней, корней растений, растительных остатков, просеивают, а затем из нее отбирают образцы весом 1–2 г в стерильные пробирки 18×150 мм. Экстрактант (сложносоставной раствор H_3PO_4 , ЭДТА, аденозина, мочевины, диметилсульфоксида (DMSO), реагентов Antifoam A и Zwittergent 3,10 [36] добавляют в почву в объеме 9 мл, пробирки со смесью почвы и экстрагента подвергают обработке ультразвуком при средней мощности в

течение 1 мин, затем закрывают пленкой Parafilm и охлаждают в емкости со льдом. Далее их встряхивают на качалке при скорости 180 об./мин в течение 30 мин при температуре 4 °С, после чего смесь переносят в центрифужные пластиковые пробирки и центрифугируют при скорости 15 000 об./сек. Супернатант отделяют от осадка почвы, переносят в стерильные пробирки 18×150 мм и смешивают в объемной пропорции 1:10 с 0,1 М трицинового буфера с рН 11,2, доводя рН в образце до величин 7–8. Нейтрализованные таким образом образцы хранят при небольших отрицательных температурах («на льду») вплоть до начала собственно химического определения АТФ. Допускается хранение экстрактов в течение недели при температуре 4 °С. Определение концентраций АТФ проводят методом Уэбстера–Лича [37]. 100 мкл люциферин-люциферазной смеси Firelight® смешивают с 50 мкл буфера (рН 7,8), состоящего из 25 мМ трицина, 5 мМ MgSO₄, 1 мМ ЭДТА и 1 мМ реактива Келланда (дитиотреитол, DTT), и с 50 мкл определяемого образца. Флюоресценцию определяют на спектрофотометре – флюориметре 3M/Lumac модель 2010A Bio-counter в течение 10 сек.

Как видим, для определения АТФ в почве требуется химическая лаборатория, оснащенная оборудованием для экстракции, центрифугирования и спектрофотометром с функцией определения флюоресценции. При проведении определения АТФ методом жидкостной хроматографии (см. выше) требуется жидкостной хроматограф высоко разрешения (HPLC). На рубеже 70-х – 80-х гг. XX в. определение АТФ в почве представлялось разумной альтернативой фумигационному методу. Однако этот метод все же не получил такого же распространения, как метод фумигации-экстракции – прежде всего из-за необходимости в использовании довольно дорогостоящих реактивов. Кроме того, применимость метода ограничивается и неоднозначностью пересчета от количества определенного АТФ к биомассе микроорганизмов с использованием пересчетного коэффициента, определенного для усредненных величин концентраций АТФ. Реальные величины содержания АТФ в клетках могут варьировать в широких пределах в зависимости от физиологического состояния клеток микроорганизмов («время полужизни» для АТФ составляет всего лишь около 1 сек).

Преимущества метода определения АТФ:

– быстрая (не требуется 24-часовая экспозиция, как в фумигационном методе);

– высокая чувствительность (порядка нескольких фемтограммов/г почвы);
– высокая производительность.

Недостатки и ограничения метода определения АТФ:

– сильная зависимость результата определения от обеспеченности почвы фосфором; дефицит Р приводит к неустойчивости результатов определения АТФ в почве;

– нестабильность результатов в почве с высоким содержанием растущих микроорганизмов (например, недавно обогащенной углеродным субстратом);

– большая чувствительность люциферин-люциферазной реакции к экстрагентам, используемым при выделении АТФ.

3.2. Определение содержания жирных кислот фосфолипидов

К специфическим биомаркерам для тех или иных таксономических групп микроорганизмов относятся мурамовая кислота (маркер бактерий), эргостерол (маркер грибов), хиноны (маркер, позволяющий разделять вклад грамотрицательных и грамположительных бактерий). В последние два десятилетия почвенные микробиологи широко используют важнейшие компоненты клеточных мембран – *жирные кислоты фосфолипидов (ЖКФ) (phospholipid fatty acids, PLFA)* – для определения структуры микробного сообщества и специфической активности отдельных групп микроорганизмов в почве. Данные вещества используются в качестве хорошего маркера для определения количества живой биомассы, так как: а) не входят в состав запасных веществ в микробных клетках; б) подвергаются относительно быстрой биохимической деградации после отмирания соответствующих микроорганизмов [38], [39]. Различия в химической структуре ЖКФ (длина углеродной цепочки, положение радикала или двойной связи, наличие и положение циклических структур) служат индикатором разных таксономических групп почвенных микроорганизмов. Для того чтобы ориентироваться среди нескольких десятков наиболее распространенных ЖКФ, желательно освоить *основы номенклатуры ЖКФ*. Итак, в названиях ЖКФ:

– число слева от «:» обозначает количество атомов С в цепочке;

– число справа от «:» обозначает количество двойных (ненасыщенных) связей; если это число не равно 0, то после него всегда идет знак ω;

– число справа от знака ω обозначает положение двойной связи относительно карбоксильного конца молекулы;

– префикс обозначает особенности ветвления углеродного скелета: *n* – «normal» («нормальный»), *i* – iso, *a* – antiso, *br* – «branched chain» («ветвление» углеродного скелета);

– число+ME в начале названия означает метилирование;

– число+OH – замещение на гидроксильную группу.

Среди наиболее распространенных жирных кислот фосфолипидов выделяют следующие основные классы:

I. SATFA (*saturated fatty acids*, насыщенные жирные кислоты). Как правило, являются маркерами *грамположительных бактерий*.

Исключения:

– циклические PLFA (с префиксом Cy) – являются маркерами *грамотрицательных бактерий*;

– n14:0, n15:0 – неспецифические бактериальные маркеры (встречаются и у *грамотрицательных*, и у *грамположительных бактерий*);

– длинноцепочечные (длиннее C20) – маркеры эукариот (простейшие, растения).

II. MUFA (*mono-unsaturated fatty acids*, мононенасыщенные жирные кислоты с одной двойной связью в углеродном скелете). Как правило, являются маркерами *грамотрицательных бактерий*.

Исключения:

– 16:1 ω 5 – маркер для арбускулярных микоризных грибов;

– 18:1 ω 9 – маркер для грибов.

III. PUFA (*poly-unsaturated fatty acids*, полиненасыщенные жирные кислоты). Как правило, являются маркерами для *грибов*.

Наиболее распространенный в почве маркер для грибов – 18:2 ω 6,9.

Прочие маркеры:

– 18:1 ω 7 – маркер для метанотрофов;

– 10Me18:0, 10Me17:0, 10Me16:0 – маркеры для актиномицетов.

Таким образом, определение ЖКФ в почве обеспечивает оценку структуры микробного сообщества с расчетом «вклада» биомассы той или иной группы микроорганизмов в общий пул микробного углерода по величине концентрации тех или иных ЖКФ-биомаркеров. Метод ЖКФ характеризует структуру микробного сообщества только на уровне больших физиологических групп микроорганизмов. Однако комбинация этого метода с мечением стабильным изотопом ^{13}C позволяет идентифицировать часть микробного сообщества, ответственную за переработку ^{13}C -меченых углеродных субстратов. Этот подход (stable isotope probing, SIP)

незаменим при исследовании пищевых цепочек в почве, а также интенсивности тех или иных составляющих почвенного цикла углерода. Большая производительность и дешевизна комбинации методов ЖКФ и SIP делает его во многих случаях предпочтительней, чем использование методов, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР) (polymerase chain reaction, PCR).

Существует большое количество вариантов метода ЖКФ, используемых для определения структуры почвенного микробного сообщества. Приведем в качестве примера слегка модифицированный вариант метода Фростегарда [36]. Навески почвы по 6 г (влажный вес) отбирают в стеклянные центрифужные пробирки с завинчивающейся пробкой, добавляют в них при помощи стеклянного ручного или автоматического микрошприца аликвоту раствора, содержащего 25 мкг ЖКФ 19:0 в качестве первого внутреннего стандарта в концентрации 1 мкг/мл. Этот стандарт показывает процент извлекаемости ЖКФ при экстракции из данного почвенного образца после всех процедур экстракции и очистки (internal standard 1, IS1). Для экстракции используется смесь хлороформа, метанола и 0,15 М лимонной кислоты (кислота доводится до pH = 4,0 \pm 0,1), соотношение объемов 1:2:0,8 соответственно. Экстракция проводится дважды – первый раз с объемом экстрагента 18 мл (встряхивание на качалке в течение 2 ч, центрифугирование при 500 об./мин), во второй раз – с 6 мл той же смеси (длительность встряхивания можно уменьшить до 1 ч). Затем надосадочную жидкость переносят при помощи пастеровских пипеток на делительные воронки и добавляют к ней 6 мл хлороформа и 6 мл 0,15М раствора лимонной кислоты. Воронки закрывают притертыми крышками, взбалтывают вручную в течение 1 мин и оставляют встряхиваться на качалке в течение 30 мин, соблюдая все предосторожности, чтобы воронки не разбились при встряхивании. По окончании встряхивания делят смесь на две фазы, тяжелую фазу (в нижней части воронки) отбирают в стеклянные колбы с притертым горлом. В оставшуюся в воронках смесь добавляют еще по 12 мл хлороформа и повторяют процедуру, на конечной стадии отбирая тяжелую фазу в те же колбы с притертым горлом. Тяжелая фаза, содержащая экстрагированные ЖКФ, упаривается на ротационном испарителе примерно до 0,5 мл. Далее проводят очистку ЖКФ от нейтральных липидов и гликолипидов на стеклянных колонках с активированным силикагелем методом твердофазной сорбции-десорбции /экстракции (Silica gel Merck, размер частиц 0,063–0,200 мм, активируется прокаливанием при 120 °C в течение 12 ч). Жидкость из колб переносится при помощи пастеровских

пипеток на колонки с силикагелем, медленно, буквально по капле, хлороформ с нейтральными липидами элюируется, а гликолипиды и фосфолипиды осаждаются на геле. Затем колонку промывают еще 5 мл хлороформа – для удаления остатков нейтральных липидов. Все операции с элюированием проводятся в очень медленном темпе, не более 2 капель в секунду. Гликолипиды удаляют элюированием с 20 мл ацетоном, по окончании элюирования краны на колонках закрывают. Затем проводят элюирование оставшихся на колонках ЖКФ 4-кратным дробным внесением метанола по 5 мл. Раствор ЖКФ в метаноле упаривают на роторном испарителе до 0,5 мл, переносят в специальные 5 мл пробирки из термостойкого стекла с горлом под завинчивающиеся пластиковые пробки (Reactivials) и высушивают в потоке газообразного азота. Высушенные таким образом пробы хранят в тех же пробирках в морозильнике при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Следующим этапом является дериватизация ЖКФ – проведение реакций гидроксирования и метилирования, приводящих к образованию *метиловых эфиров жирных кислот (fatty acid methyl esters, FAMES)*. Гидроксирование проводят путем внесения в стеклянные пробирки Reactivials 0,5 мл 0,5 М NaOH раствора в чистом (обезвоженном) метаноле (Sigma-Aldrich, assay $\geq 99,9\%$), 10-минутной экспозиции на ультразвуковой бане и последующего нагрева при $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин на масляной бане (пробирки должны быть плотно завинчены, выпаривание «досушка» допускается). Затем ЖКФ подвергаются метилированию с 0,75 мл раствора BF_3 в метаноле (10 %, 1,3 М, Fluka) в течение 15 мин при $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. По окончании операции пробирки остужают до комнатной температуры. Избыток BF_3 гидролизуют добавлением 0,5 мл насыщенного раствора NaCl, а затем проводят жидкостную экстракцию метиловых эфиров из раствора метанола 3-кратным дробным внесением гексана по 1 мл. После встряхивания смеси метанол осаждают центрифугированием, а верхнюю фракцию, содержащую раствор эфиров в гексане, отбирают в чистые пробирки Reactivials при помощи пастеровских пипеток. Суммарная аликвота около 3 мл раствора ЖКФ в гексана высушивается в потоке газообразного азота. После этого в пробирки Reactivials добавляют по 185 мкл толуола и по 15 мкл метилового эфира 13:0 в концентрации 1 мкг/мл, который служит вторым внутренним стандартом (на полноту и извлекаемость после дериватизации) – second internal standard (IS2). Затем пробирки с пробами подвергают 10-минутной обработке ультразвуком, после чего пробы переносят в 1,5 мл флаконы с резиновой или силиконовой пробкой и специаль-

ным пластиковым вкладышем для введения пробы. После переноса проб с помощью пастеровских пипеток флаконы запечатывают и хранят при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. ЖКФ анализируют методами комбинированной газовой хроматографии – масс-спектрометрии (GC-MS), либо на жидкостном хроматографе высокого разрешения (HPLC).

Преимущества метода жирных кислот фосфолипидов:

– позволяет «напрямую» применить изотопный анализ (SIP) с целью выявления групп микроорганизмов, ответственных за определенные процессы/последовательности реакций цикла углерода;

– может быть использован не только для качественного (структура микробного сообщества), но и количественного (доля тех или иных групп микроорганизмов в общей биомассе) анализа микробной биомассы в почве;

– удобен для биоиндикации стрессов в почве. В качестве индексов стресса используют: 1) соотношение «грамположительные бактерии/грамотрицательные бактерии»; 2) соотношение «насыщенные ЖКФ/мононенасыщенные ЖКФ» как *аналог* данного индекса; 3) соотношение «циклические ЖКФ/их моноеновые предшественники»; 4) соотношение «грибы/бактерии»; 5) относительное обилие тех или иных специфических ЖКФ – маркеров микромицетов, бактерий, простейших и т.д.

Недостатки и ограничения метода жирных кислот фосфолипидов:

– невозможно определять микроорганизмы до вида;

– необходимость сложных экстракций с токсическими растворителями – по сути дела, это сложный метод органической химии и биохимии с газохроматографическим окончанием;

– сложность с идентификацией пиков и однозначной привязкой их к стандартам ЖКФ.

Следует подчеркнуть, что профили ЖКФ занимают как бы промежуточное положение между методами, предназначенными для количественного определения общей микробной биомассы, и молекулярно-биологическими методами определения структуры почвенного микробного сообщества, основанными на реакции ПЦР, позволяя оценить и общую микробную биомассу, и вклад тех или иных групп микроорганизмов. Метод профилей ЖКФ долгое время не считался перспективным из-за того, что эти профили не вполне соответствовали 4 критериям «хорошего индикатора микробной биомассы», сформулированным Дженкинсоном и Ладдом [40], согласно которым индикаторное вещество должно: 1) присутствовать во всех компонентах почвенной микробной биомассы с одной и той же (известной, измеряемой) кон-

центрацией при любом отборе; 2) находиться только в живых организмах, а не в микробной некромассе или других составляющих почвенного органического вещества; 3) быть количественно экстрагируемым из почвы; 4) быть количественно определяемым химико-аналитическими методами. Но постепенно метод ЖКФ занял свою «экологическую нишу», тем более что и широко распространенный метод фумигации-экстракции также далеко не идеален в смысле соответствия этим критериям. Оказалось, что, хотя метод ЖКФ обеспечивает идентификацию структуры почвенного микробного сообщества только до уровня родов (в лучшем случае) или (чаще всего) больших физиологических групп микроорганизмов, он относительно полезен при анализе распределения изотопа ^{13}C между группами почвенных микроорганизмов. Это дает возможность оценить относительный вклад некоторых групп микроорганизмов в процессы углеродного цикла, не прибегая к крайне трудоемким и дорогостоящим процедурам определения метки в составе ДНК или РНК. Кроме того, по общему количеству выделенных ЖКФ (PLFA) можно рассчитать общую микробную биомассу $C_{\text{мик}}$, умножив на пересчетный коэффициент $F_{\text{PLFA}} = 5,8$ [41]:

$$C_{\text{мик}} (\text{мкг/г почвы}) = F_{\text{PLFA}} \times \text{PLFA} (\text{нмоль/г почвы}). \quad (9)$$

Существенным фактором, сдерживающим распространение метода ЖКФ, все еще является необходимость в использовании дорогостоящего оборудования и предъявлении высоких требований к техническому персоналу, работающему на этом оборудовании, а также неоднозначность в интерпретации полученных данных о концентрации индивидуальных жирных кислот фосфолипидов [38, 39].

3.3. ДНК в почве как индекс почвенной микробной биомассы

В последние три десятилетия в почвенной микробиологии наблюдается бурное развитие молекулярно-биологических методов, позволяющих перейти от определения общей биомассы к определению таксономической структуры микробного сообщества. Необходимым шагом в таких методах является выделение, очистка и определение концентрации ДНК из почвенных образцов. В связи с этим время от времени предпринимаются попытки использовать величины общего количества (концентрации ДНК) в качестве индекса общей микробной биомассы.

Основные этапы выделения ДНК из почвы:

- разрушение почвенных агрегатов и клеточных стенок при сочетании механического воздействия силикатных гранул и фосфатного буфера;
- очистка экстракта от фрагментов клеточных стенок;

- очистка экстракта от белков, гумусовых веществ, других органических соединений;
- сорбция ДНК из раствора на матриксе для очистки от органических растворителей и буферов, использованных на предыдущих стадиях;
- промывка ДНК при помощи растворов, содержащих этанол;
- десорбция ДНК с матрикса, перевод ДНК в водный раствор;
- определение концентрации ДНК в экстракте.

Выделение ДНК или РНК из почвы может производиться либо при помощи коммерческих готовых наборов («kits»), либо с реактивами и одноразовой пластиковой посудой, приобретаемыми по отдельности (второй подход, как правило, позволяет удешевить процедуру, но требует больших навыков). Для тех, кто предпочитает второй подход, предлагаем описание методики ВНИИСХМ для выделения ДНК.

Выделение ДНК из почвы согласно методике ВНИИСХМ (2011) [42]

Основные этапы выделения:

1) к образцу почвы весом 0,2 г добавляют фосфатный экстрагирующий буфер, смесь фенола с хлороформом и стеклянные (как вариант керамические, циркониевые, гранатовые, металлические) шарики;

2) разрушение образца производится механическим способом с использованием высокоскоростного встряхивания по орбите, исключаяющей возникновение стационарно закрученных потоков в пробирке;

3) после центрифугирования водную фазу отбирают и осаждают ДНК изопропанолом, затем окончательную очистку проводят с использованием электрофореза с последующим выделением из легкоплавкой агарозы, сорбцией-десорбцией на диоксиде кремния или ультрацентрифугирования (для получения большого количества высокоочищенных препаратов почвенной ДНК);

4) качество препарата оценивают с использованием электрофореза, количественно ДНК определяют либо по анализу электрофореграмм со стандартами концентраций, либо с использованием измерения флюоресценции при добавлении чувствительных интеркалирующих красителей.

Для тех, кто предпочитает пользоваться фирменными наборами реактивов и одноразовой посуды, авторы недавнего исследования по сравнению определений ДНК с другими методами определения микробной биомассы рекомендуют набор Qiagen DNeasy PowerSoil Kit (прежнее название MO Bio) [43]. Данные авторы показали, что пересчет от количеств (концентрации) ДНК (dsDNA) к микробной биомас-

се $C_{\text{мик}}$ можно проводить в соответствии со следующей формулой:

$$C_{\text{мик}} (\text{мкг/г почвы}) = F_{\text{DNA}} \times \text{dsDNA} (\text{мкг/г почвы}), \quad (10)$$

где F_{DNA} – пересчетный коэффициент. Величины пересчетного коэффициента составили 4,4 и 5,1 при калибровке по методу фумигации-экстракции и методу СИД. Несовпадение связано с несовершенством постоянных пересчетных коэффициентов в этих методах (см. выше). В любом случае тесная корреляция между величинами $C_{\text{мик}}$, полученными методом ДНК, и общепринятыми СИД и ФЭ методами ($R^2 = 0,96-0,97$) свидетельствует о том, что общее количество ДНК может быть успешно использовано для определения общей микробной биомассы. Йоргенсен и Эммерлинг определили величину $F_{\text{DNA}} = 6$ [41]. Такое расхождение с данными Семенова с соавторами [43] еще раз говорит о сложности проблемы пересчетных коэффициентов во всех методах определения почвенной микробной биомассы.

Использование концентраций ДНК в качестве индекса микробной биомассы находит всё более широкое применение. Так, данным методом получены надежные и непротиворечивые результаты при сравнительных исследованиях пулов микробной биомассы в современных и погребенных почвах (палеопочвах) – фактически, расчеты биомассы по ДНК калибровались по данным кинетического метода [44, 45]. Применялся этот метод и для определения экономического коэффициента (carbon use efficiency, CUE) – важнейшей ростовой характеристики микробного сообщества в почве [46]. Семенов с соавторами получили интересные данные по изменениям пулов в щелочных почвах, что особенно важно ввиду ограниченности применения кинетического метода и метода субстрат-индуцированного дыхания в таких

почвах (см. выше) [43]. Важно подчеркнуть, что использование определений концентрации ДНК в качестве индекса микробной биомассы в почвах дает хорошие результаты как при применении готовых коммерческих наборов посуды и точно отмеренных доз реагентов (“kits”) [43], так и при более дешевых методах выделения [44–46] с соответствующими реагентами и буферами, подобно тому, как это делается в методике ВНИИСХМ [42]. Что же касается исследователей, занимающихся выделением ДНК для последующего использования в реакции ПЦР и секвенировании, то общий пул микробной биомассы они могут легко рассчитать без каких-то дополнительных лабораторных работ – просто по концентрации ДНК в уже выделенных препаратах.

Заключение

Мы рассмотрели наиболее распространенные современные методы определения микробной биомассы в почве, не требующие владения специфическими навыками «классической микробиологии». Выбор конкретного метода будет определяться целым рядом факторов, важнейшими из которых нам представляются: 1) приборная база и уровень материально-технического обеспечения лаборатории; 2) квалификация персонала; 3) специфические задачи исследования – иначе говоря, требуемая степень детализации данных о микробном сообществе почвы; 4) физико-химические свойства почвы; 5) запас времени для проведения исследований; 6) необходимость в использовании радиоактивных или стабильных изотопов. Приведем концептуальную схему, охватывающую свойства всех вышеописанных методов, которая, как мы надеемся, поможет при выборе того или иного методического подхода (рис. 1).

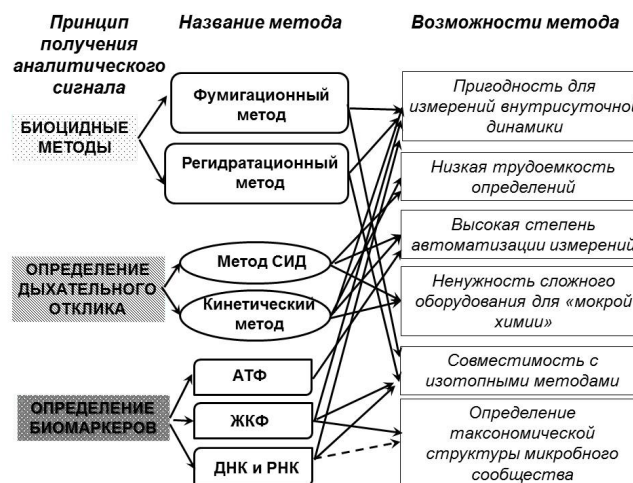


Рис. 1. Концептуальная схема методов определения биомассы почвенных микроорганизмов

Fig. 1. Conceptual scheme of methods for determining the biomass of soil microorganisms

Например, если принципиальный момент для исследователя – проследить судьбу/оценить поток того или иного биофильного элемента, то это означает, что следует использовать только те методы, для которых возможна комбинация с использованием стабильных или радиоактивных изотопов – методы фумигации-экстракции, профилей ЖКФ, концентрации ДНК. Если в лаборатории отсутствует оборудование для «мокрой» химии, но при этом необходимо определить микробную биомассу, то в этом

случае вне конкуренции будут методы СИД и кинетический, причем последний более пригоден для частых определений динамики микробной биомассы, включая и внутрисуточную динамику. Надеемся, что мы дали если не исчерпывающий ответ на все вопросы относительно современных методов определения микробной биомассы в почве, то достаточно подробное освещение наиболее принципиальных методологических проблем и главных источников ошибок.

Библиографический список

1. Jenkinson, D. S. Studies on the decomposition of plant material in soil. II. Partial sterilization of soil and soil biomass / D. S. Jenkinson // *Journal of Soil Science*. – 1966. – Vol. 17. – P. 280–302.
2. Jenkinson, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass / D. S. Jenkinson, D. S. Powlson // *Soil Biology & Biochemistry*. – 1976. – Vol. 8. – P. 209–213.
3. Jenkinson, D. S. Determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil / D. S. Jenkinson // *Advances in nitrogen cycling in agriculture ecosystems* / ed by J. R. Wilson. – CAB International, Wallingford, UK, 1988. – P. 368–386.
4. Vance, E. D. An extraction method for measuring soil microbial biomass C / E. D. Vance, P. C. Brookes, D. S. Jenkinson // *Soil Biology & Biochemistry*. – 1987. – Vol. 19 – P. 703–707.
5. Ross, D. J. Influence of *Fusarium oxysporum* age on proportion of C, N, and P mineralized after chloroform fumigation in soil / D. J. Ross, G. P. Sparling, A. W. West // *Australian Journal of Soil Research*. – 1987. – Vol. 25. – P. 563–566.
6. Brookes, P. C. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil / P. C. Brookes, D. S. Powlson, D. S. Jenkinson // *Soil Biology & Biochemistry*. – 1982. – Vol. 14. – P. 319–329.
7. Kouno, K. Measurement of soil microbial biomass phosphorus by an anion exchange membrane method / K. Kouno, Y. Tuchiya, T. Ando // *Soil Biology & Biochemistry*. – 1995. – Vol. 27. – P. 1353–1357.
8. Setia, R. Measuring microbial biomass carbon by direct extraction – Comparison with chloroform fumigation-extraction / R. Setia, S. L. Verma, P. Marschner // *European Journal of Soil Biology*. – 2012. – Vol. 53. – P. 103–106.
9. Cheesman, A. W. Interaction of phosphorus compounds with anion-exchange membranes: implications for soil analysis / A. W. Cheesman, B. L. Turner, K. R. Reddy // *Soil Science Society of America Journal*. – 2010. – Vol. 74. – P. 1607–1612.
10. Rapid microbial phosphorus immobilisation dominates gross phosphorus fluxes in a grassland soil with low inorganic phosphorus availability / E. K. Bünemann, A. Oberson, F. Liebisch, F. Keller, K. E. Annaheim, O. Huguenin-Elie, E. Frossard // *Soil Biology & Biochemistry*. – 2012. – Vol. 51. – P. 84–95.
11. Yevdokimov, I. Microbial immobilisation of phosphorus in soils exposed to drying-rewetting and freeze-thawing cycle / I. Yevdokimov, A. Larionova, E. Blagodatskaya // *Biology and Fertility of Soils*. – 2016. – Vol. 52. – P. 685–696.
12. D'Angelo, E. Rapid, sensitive, microscale determination of phosphate in water and soil / E. d'Angelo, J. Crutchfield, M. J. Vandiviere // *Environmental Quality*. – 2001. – Vol. 30. – P. 2206–2209.
13. Благодатский, С. А. Регидратационный метод определения микробной биомассы в почве / С. А. Благодатский, Е. В. Благодатская, А. Ю. Горбенко, Н. С. Паников // *Почвоведение*. – 1987. – № 4. – С. 64–71.
14. Yevdokimov, I. V. Nitrogen immobilization and remineralization by microorganisms and nitrogen uptake by plants: interactions and rate calculations / I. V. Yevdokimov, S. A. Blagodatsky // *Geomicrobiology Journal*. – 1993. – Vol. 11. – P. 185–193.
15. Blagodatsky, S. A. Extractability of microbial N as influenced by C:N ratio in the flush after drying or fumigation / S. A. Blagodatsky, I. V. Yevdokimov // *Biology and Fertility of Soils*. – 1998. – Vol. 28. – P. 5–11.
16. Van Veen, J. A. Turnover of carbon, nitrogen and phosphorus through the microbial biomass in soils incubated with ¹⁴C-, ¹⁵N- and ³²P-labelled bacterial cells / J. A. Van Veen, J. N. Ladd, J. K. Martin, M. Amato // *Soil Biology & Biochemistry*. – 1987. – Vol. 19. – P. 559–565.
17. Joergensen, R. G. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the k_{EN} value / R. G. Joergensen, N. Mueller // *Soil Biology & Biochemistry*. – 1996. – Vol. 28. – P. 33–37.
18. Microbial immobilization of ¹³C rhizodeposits in rhizosphere in rhizosphere and root-free soil under continuous ¹³C labelling of oats / I. Yevdokimov, R. Ruser, F. Buegger, M. Marx, J. C. Munch // *Soil Biology & Biochemistry*. – 2006. – Vol. 38. – P. 1202–1211.
19. Bilyera, N. Towards a conversion factor for soil microbial phosphorus / N. Bilyera, E. Blagodatskaya, I. Yevdokimov, Ya. Kuzyakov // *European Journal of Soil Biology*. – 2018. – Vol. 87. – P. 1–8.
20. Joergensen, R. G. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the k_{EC} value / R. G. Joergensen // *Soil Biology & Biochemistry*. – 1996. – Vol. 28. – P. 25–32.

21. Anderson, J. P. E. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils / J. P. E. Anderson, K. H. Domsch // *Soil Biology & Biochemistry*. – 1978. – Vol. 10. – P. 215–221.
22. Благодатская, Е. В. Характеристика состояния микробного сообщества по величине метаболического коэффициента // Е. В. Благодатская, Н. Д. Ананьева, Т. Н. Мякшина // *Почвоведение*. – 1995. – № 2. – С. 205–210.
23. Благодатский, С. А. Динамика микробной биомассы и соотношение эукариотных и прокариотных микроорганизмов в серой лесной почве / С. А. Благодатский, Е. В. Благодатская // *Почвоведение*. – 1996. – № 12. – С. 1485–1490.
24. Evaluation of methods to estimate the soil microbial biomass and the relationship with soil texture and organic matter / E. A. Kaiser, T. Müller, R. G. Joergensen, H. Insam, O. Heinemeyer // *Soil Biology & Biochemistry* – 1992. – Vol. 24. – P. 675–683.
25. Anderson, J. P. E. Relationship between SIR and FE estimates of microbial biomass by kinetic respiration analysis / J. P. E. Anderson, R. Joergensen // *Soil Biology & Biochemistry*. – 1997. – Vol. 29. – P. 1033–1042.
26. Cheng, W. Measurement of microbial biomass in arctic soils using fumigation-extraction and substrate-induced respiration procedures / W. Cheng, R. A. Virginia // *Soil Biology & Biochemistry*. – 1993. – Vol. 25. – P. 135–141.
27. Heinemeyer, O. Soil microbial biomass and respiration measurements: an automated technique based on infra-red gas analysis / O. Heinemeyer, H. Insam, Kaiser E.A., G. Walenzik // *Plant and Soil*. – 1989. – Vol. 116. – P. 191–195.
28. Ritz, K. Catabolic Profiles as an Indicator of Soil Microbial Functional Diversity / K. Ritz, J. A. Harris, M. Pawlett, D. Stone. – Bristol, UK, 2006. – 72 p.
29. Partitioning of active soil microbial population revealed by labile C inputs / A. Gilmullina, S. Blagodatsky, P. Galitskaya, S. Selivanovskaya, E. Blagodatskaya // *Soil Biology & Biochemistry*. – 2019, under revision.
30. Паников, Н. С. Кинетические методы определения биомассы и активности различных групп почвенных микроорганизмов / Н. С. Паников, М. В. Палеева, С. Н. Дедыш, А. Г. Дорофеев // *Почвоведение*. – 1991. – № 8. – С. 109–120.
31. Blagodatsky, S. A. Estimating the active and total soil microbial biomass by kinetic respiration analysis / S. A. Blagodatsky, O. Heinemeyer, J. Richter // *Biology and Fertility of Soils*. – 2000. – Vol. 32. – P. 73–81.
32. Wutzler, T. Soil microbial biomass and its activity estimated by kinetic respiration analysis – Statistical guidelines / T. Wutzler, S. Blagodatsky, E. Blagodatskaya, Y. Kuzyakov // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2012. – Vol. 45. – P. 102–112.
33. Благодатский, С. А. Определение содержания микробного углерода в почве на основе дыхательного отклика микроорганизмов на внесение глюкозы / С. А. Благодатский, Е. В. Благодатская // *Методы исследований органического вещества почв : сб. / под ред. А. И. Еськова, В. А. Черникова, С. М. Лукина, И. В. Рукаковой*. – Владимир, 2005. – С. 385–400.
34. Paul, E. A. *Soil microbiology, ecology, and biochemistry* / E. A. Paul. – Academic Press and Elsevier, 2007. – 532 p.
35. Blagodatskaya, E. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches / E. Blagodatskaya, Y. Kuzyakov // *Soil Biology & Biochemistry*. – 2013. – Vol. 6. – P. 192–211.
36. Webster, J. ATP in Soil: A New Extractant and Extraction Procedure / J. Webster, G. J. Hampton, F. R. Leach // *Soil Biology & Biochemistry*. – 1984. – Vol. 16. – P. 335–342.
37. Webster, J. Optimization of the Firefly Luciferase Assay for ATP / J. Webster, F. R. Leach // *Journal of Applied Biochemistry*. – 1980. – Vol. 2. – P. 469–479.
38. Zelles, L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review / L. Zelles // *Biology and Fertility of Soils*. – 1999. – Vol. 29. – P. 111–129.
39. Frostegård, A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty-acid analysis / A. Frostegård, E. Bååth, A. Tunlid // *Soil Biology & Biochemistry*. – 1993. – Vol. 25. – P. 723–730.
40. Jenkinson, D. S. *Microbial biomass in soil: measurement and turnover* / D. S. Jenkinson // *Soil Biochemistry 5th edition* / ed. by E. A. Paul, J. N. Ladd. – Marcel Decker, Inc, New York and Basel, 1981. – P. 415–471.
41. Joergensen, R. G. Methods for evaluating human impact on soil microorganisms based on their activity, biomass, and diversity in agricultural soils / R. G. Joergensen, C. Emmerling // *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. – 2006. – Vol. 169. – P. 295–309.
42. Андронов, Е. Е. Научно-методические рекомендации по выделению высокоочищенных препаратов ДНК из объектов окружающей среды / Е. Е. Андронов, А. Г. Пинаев, Е. В. Першина, Е. П. Чижевская. – СПб. : ВНИИСХМ РАСХН, 2011. – 23 с.
43. Semenov, M. DNA-based determination of soil microbial biomass in alkaline and carbonaceous soils of semi-arid climate // M. Semenov, E. Blagodatskaya, A. Stepanov, Y. Kuzyakov // *Journal of Arid Environment*. – 2017. – Vol. 150. – P. 54–61.
44. Blagodatskaya, E. V. Quantitative isolation of microbial DNA from different types of soils from natural and agricultural ecosystems / E.V. Blagodatskaya, S. A. Blagodatsky, T.-H. Anderson // *Microbiology*. – 2003. – Vol. 72. – P. 840–846.
45. Blagodatskaya, E. V. Extractable microbial DNA pool and microbial activity in paleosols of Southern Urals / E. V. Blagodatskaya, O. S. Khokhlova, T.-H. Anderson, S. A. Blagodatsky // *Microbiology*. – 2003. – Vol. 72. – P. 847–853.
46. Blagodatskaya, E. Microbial growth and carbon use efficiency in the rhizosphere and root-free soil / E. Blagodatskaya, S. Blagodatsky, T.-H. Anderson, Y. Kuzyakov // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. DOI:10.1371/journal.pone.0093282.

References

1. Jenkinson D. S. *Journal of Soil Science*. 1966, vol. 17, pp. 280–302.
2. Jenkinson D. S., Powlson D. S. *Soil Biology & Biochemistry*. 1976, vol. 8, pp. 209–213.
3. Jenkinson D. S. *Advances in nitrogen cycling in agriculture ecosystems*. CAB International, Wallingford, UK, 1988, pp. 368–386.
4. Vance E. D., Brookes P. C., Jenkinson D. S. *Soil Biology & Biochemistry*. 1987, vol. 19, pp. 703–707.
5. Ross D. J., Sparling G. P., West A. W. *Australian Journal of Soil Research*. 1987, vol. 25, pp. 563–566.
6. Brookes P. C., Powlson D. S., Jenkinson D. S. *Soil Biology & Biochemistry*. 1982, vol. 14, pp. 319–329.
7. Kouno K., Tuchiya Y., Ando T. *Soil Biology & Biochemistry*. 1995, vol. 27, pp. 1353–1357.
8. Setia R., Verma S. L., Marschner P. *European Journal of Soil Biology*. 2012, vol. 53, pp. 103–106.
9. Cheesman A. W., Turner B. L., Reddy K. R. *Soil Science Society of America Journal*. 2010, vol. 74, pp. 1607–1612.
10. Bünemann E. K., Oberson A., Liebisch F., Keller F., Annaheim K. E., Huguenin-Elie O., Frossard E. *Soil Biology & Biochemistry*. 2012, vol. 51, pp. 84–95.
11. Yevdokimov I., Larionova A., Blagodatskaya E. *Biology and Fertility of Soils*. 2016, vol. 52, pp. 685–696.
12. D'Angelo E., Crutchfield J., Vandiviere M. J. *Environmental Quality*. 2001, vol. 30, pp. 2206–2209.
13. Blagodatskiy S. A., Blagodatskaya E. V., Gorbenko A. Yu., Panikov N. S. *Pochvovedenie [Soil science]*. 1987, no. 4, pp. 64–71.
14. Yevdokimov I. V., Blagodatsky S. A. *Geomicrobiology Journal*. 1993, vol. 11, pp. 185–193.
15. Blagodatsky S. A., Yevdokimov I. V. *Biology and Fertility of Soils*. 1998, vol. 28, pp. 5–11.
16. Van Veen J. A., Ladd J. N., Martin J. K., Amato M. *Soil Biology & Biochemistry*. 1987, vol. 19, pp. 559–565.
17. Joergensen R. G., Mueller N. *Soil Biology & Biochemistry*. 1996, vol. 28, pp. 33–37.
18. Yevdokimov I., Ruser R., Buegger F., Marx M., Munch J. C. *Soil Biology & Biochemistry*. 2006, vol. 38, pp. 1202–1211.
19. Bilyera N., Blagodatskaya E., Yevdokimov I., Kuzyakov Ya. *European Journal of Soil Biology*. 2018, vol. 87, pp. 1–8.
20. Joergensen R. G. *Soil Biology & Biochemistry*. 1996, vol. 28, pp. 25–32.
21. Anderson J. P. E., Domsch K. H. *Soil Biology & Biochemistry*. 1978, vol. 10, pp. 215–221.
22. Blagodatskaya E. V., Anan'eva N. D., Myakshina T. N. *Pochvovedenie [Soil science]*. 1995, no. 2, pp. 205–210.
23. Blagodatskiy S. A., Blagodatskaya E. V. *Pochvovedenie [Soil science]*. 1996, no. 12, pp. 1485–1490.
24. Kaiser E. A., Müller T., Joergensen R. G., Insam H., Heinemeyer O. *Soil Biology & Biochemistry*. 1992, vol. 24, pp. 675–683.
25. Anderson J. P. E., Joergensen R. *Soil Biology & Biochemistry*. 1997, vol. 29, pp. 1033–1042.
26. Cheng W., Virginia R. A. *Soil Biology & Biochemistry*. 1993, vol. 25, pp. 135–141.
27. Heinemeyer O., Insam H., Kaiser E. A., Walenzik G. *Plant and Soil*. 1989, vol. 116, pp. 191–195.
28. Ritz K., Harris J. A., Pawlett M., Stone D. *Catabolic Profiles as an Indicator of Soil Microbial Functional Diversity*. Bristol, UK, 2006, 72 p.
29. Gilmullina A., Blagodatsky S., Galitskaya P., Selivanovskaya S., Blagodatskaya E. *Soil Biology & Biochemistry*. 2019, under revision.
30. Panikov N. S., Paleeva M. V., Dedysh S. N., Dorofeev A. G. *Pochvovedenie [Soil science]*. 1991, no. 8, pp. 109–120.
31. Blagodatsky S. A., Heinemeyer O., Richter J. *Biology and Fertility of Soils*. 2000, vol. 32, pp. 73–81.
32. Wutzler T., Blagodatsky S., Blagodatskaya E., Kuzyakov Y. *Soil Biology and Biochemistry*. 2012, vol. 45, pp. 102–112.
33. Blagodatskiy S. A., Blagodatskaya E. V. *Metody issledovaniy organicheskogo veshchestva pochv: sb. [Methods for studying the organic matter of soils: collection of works]*. Vladimir, 2005, pp. 385–400.
34. Paul E. A. *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*. Academic Press and Elsevier, 2007, 532 p.
35. Blagodatskaya E., Kuzyakov Y. *Soil Biology & Biochemistry*. 2013, vol. 6, pp. 192–211.
36. Webster J., Hampton G. J., Leach F. R. *Soil Biology & Biochemistry*. 1984, vol. 16, pp. 335–342.
37. Webster J., Leach F. R. *Journal of Applied Biochemistry*. 1980, vol. 2, pp. 469–479.
38. Zelles L. *Biology and Fertility of Soils*. 1999, vol. 29, pp. 111–129.
39. Frostegård A., Bååth E., Tunlid A. *Soil Biology & Biochemistry*. 1993, vol. 25, pp. 723–730.
40. Jenkinson D. S. *Soil Biochemistry 5th edition*. Marcel Decker, Inc, New York and Basel, 1981, pp. 415–471.
41. Joergensen R. G., Emmerling C. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 2006, vol. 169, pp. 295–309.
42. Andronov E. E., Pinaev A. G., Pershina E. V., Chizhevskaya E. P. *Nauchno-metodicheskie rekomendatsii po vydeleniyu vysokoochishchennykh preparatov DNK iz ob"ektov okruzhayushchey sredy [Scientific and methodological recommendations for the outflow of highly purified DNA specimen from environmental samples]*. Saint-Petersburg: VNIISKhM RASKhN, 2011, 23 p.
43. Semenov M., Blagodatskaya E., Stepanov A., Kuzyakov Y. *Journal of Arid Environment*. 2017, vol. 150, pp. 54–61.



44. Blagodatskaya E. V., Blagodatsky S. A., Anderson T.-H. *Microbiology*. 2003, vol. 72, pp. 840–846.
45. Blagodatskaya E. V., Khokhlova O. S., Anderson T.-H., Blagodatsky S. A. *Microbiology*. 2003, vol. 72, pp. 847–853.
46. Blagodatskaya E., Blagodatsky S., Anderson T.-H., Kuzyakov Y. *PLoS ONE*. 2014, vol. 9. DOI:10.1371/journal.pone.0093282.

Евдокимов, И. В.

Методы определения биомассы почвенных микроорганизмов / И. В. Евдокимов // *Russian Journal of Ecosystem Ecology*. – 2018. – Vol. 3 (3). DOI 10.21685/2500-0578-2018-3-5.