

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXVII, 25

SECTIO C

1972

Instytut Biologii UMCS
Zakład Systematyki i Geografii Roślin

Jacek MALICKI

**Szybka metoda bezpośredniego określania liczby komórek bakterii
w glebie**

Метод быстрого и прямого определения числа клеток бактерий в почве

A Method of Quick and Direct Determination of the Number of Bacterial Cells
in Soil

Wiele zagadnień związanych z biologią gleby wymaga określenia liczby komórek bakteryjnych. Metoda bezpośrednia, uznana ogólnie za obiektywną, wymaga: oddzielenia komórek bakteryjnych od cząstek gleby i odróżnienia bakterii od cząstek gleby o takiej samej wielkości, określenia liczby bakterii w stosunku do dowolnego punktu odniesienia (grama gleby, grama substancji organicznej, objętości gleby itd.).

Oddzielenie komórek bakterii od cząstek gleby można uzyskać różnymi sposobami (4, 6, 8, 11, 14, 15, 16, 17), każdy z nich ma swoje dobre i złe strony, wybór zależy od celu badań.

Zróznicowanie może być przeprowadzone metodami: barwienia kwaśnymi barwnikami i przeglądu preparatów w świetle przechodzącym, barwienia barwnikami fluoryzującymi i użycia UV, barwienia fluorochromami sprzęgniętymi z surowicami lub enzymami (lizozym), przy użyciu mikroskopu z oświetleniem epi, a nawet przy pomocy mikroskopii elektronowej (3, 4, 7, 8, 10, 11, 13, 18).

Z barwników fluoryzujących za najlepszy uznany jest ostatnio izotiocjanat fluoresceiny FITC (1, 13), pozwalający na prawie pewne odróżnienie bakterii od cząstek koloidalnych i substancji świecących niespecyficznie.

Określanie liczby bakterii przeprowadza się zazwyczaj przez: liczenie w rozmacie ustalonej objętości zawiesiny na powierzchni o znanej wielkości, liczenie w rozmacie zawiesiny z dodatkiem agaru i określanie głębokości preparatu śrubą mikrometryczną mikroskopu (przy wyznaczonej powierzchni pola widzenia mikroskopu), użycie specjalnych komór o określonej objętości, użycie lateksowych kuleczek średnicy 1, 2 μ o znanej liczbie w określonej objętości itd. (2, 5, 8, 11, 14). Uzyskane wyniki po podstawieniu do odpowiednich wzorów dają poszukiwaną wielkość.

Wspomniane metody są dosyć kłopotliwe, wymagają bowiem wyjątkowej dokładności w powtórzeniach prób, co decyduje o ich pracochłonności, a tym samym

uniemożliwia masowe zastosowanie. Poza tym trzeba w nich morfologicznie odróżniać bakterie od cząstek gleby, co daje duży rozrzut wyników. Wydawało się zatem wskazane opracowanie metody pozwalającej na szybką ocenę liczby bakterii i umożliwiającej przeprowadzanie badań wymagających wielu porównywalnych prób.

METODA

Sporządzanie zawiesiny gleby i preparatów: W celu uzyskania zawiesiny 50 cm³ gleby w stanie naturalnym (pobiera się cienkościenną, metalową rurką o objętości 10 cm³ w ten sposób, aby zapewnić średnią próbę z określonej powierzchni), rozciera się w móżdżerku z 100 ml jałowej wody destylowanej. Po dokładnym roztarciu całość splukuje się 100 ml wody do płaskodennej kolby o objętości 1500 ml, tak aby rozcieńczenie wynosiło 1:5. Dolewa się 250 ml utrwalonej mertiolatem zawiesiny drożdży (wolnej od bakterii albo z uwzględnioną poprawką na liczbę komórek bakterii), liczbę komórek drożdży (ok. 1×10^7 komórek w cm³) określa się przy pomocy hemocytometru i mikroskopu z kontrastem fazowym. Kolbę z zawiesiną gleby i drożdży wytrząsa się przez 30 min. z częstotliwością 60 cykli na minutę, po czym po 10-minutowej przerwie z dowolnej objętości płynu znad osadu sporządza się rozmazy na dowolnych powierzchniach szkiełek przedmiotowych. Powierzchnia, z której pobiera się próbki gleby, liczba próbek z powierzchni i preparatów z próbki zależy od przyjętej dokładności badań i może być ustalona dowolną metodą.

Barwienie: Preparaty utrwala się w płomieniu i barwi w temperaturze pokojowej przez 2 min. roztworem FITC. Po zabarwieniu zlewa się nadmiar barwnika i płucze preparat przez 10 min. 0,5 M buforem węglanowym. Po opłukaniu preparat zamyka się w zbuforowanym (bufor węglanowy) do pH 9,6 glicerolu.

Sporządzanie barwnika: 3,0 ml 0,5 M buforu węglanowego o pH 9,6, 12,0 ml 0,01 M roztworu soli fizjologicznej o pH 7,2, 15,0 ml 0,85% roztworu NaCl, 10 mg krystalicznego FITC miesza się w temperaturze pokojowej do całkowitego rozpuszczenia fluorochromu i przechowuje w lodówce (barwnik nie traci aktywności w ciągu 15 dni).

Bufor węglanowy: 3,7 g NaHCO₃, 0,6 g Na₂CO₃ bezwodnego, 100 ml wody, pH 9,6.

Zbuforowany płyn fizjologiczny: 8,5 g NaCl, 1,7 g Na₂HPO₄ bezwodnego, 0,39 g NaH₂PO₄ × 2H₂O, wody do 1000 ml, pH 7,2.

Preparat obserwuje się w mikroskopie z kondensorem ciemnego pola (apertura 1,4), obiektywem immersyjnym z przesłoną (olejek immersyjny do fluorescencji) i okulariem o powiększeniu 5-, 7-krotnym z założoną do wnętrza przesłoną, ograniczającą pole widzenia.

Źródło światła: lampa HBO 200, filtr UG 1 (2 mm) i pomarańczowy dwuwarstwowy filtr zaporowy OG 1; GG 9.

Liczbę bakterii w 1 cm³ gleby otrzymuje się według wzoru:

$$x = \frac{a \cdot c \cdot Y}{b}$$

gdzie: x — liczba bakterii w 1 cm³ gleby, a — liczba bakterii w preparacie, b — liczba drożdży w preparacie, c — liczba drożdży w 1 cm³ zawiesiny wyjściowej, Y — pierwsze rozcieńczenie gleby (w opisywanej metodzie 1:5).

W przypadku zbyt dużej gęstości preparatu mieszaninę bakterii z drożdżami można dowolnie rozcieńczać przed sporządzeniem rozmazu, nie uwzględniając tego rozcieńczenia w obliczeniach.

Dla porównania opisanej metody z najczęściej stosowanymi w zestawieniu podano obliczone współczynniki zmienności. Liczba komórek bakterii z hodowli określona w komorze Bürkera — współczynnik zmienności 6,28%, liczba komórek bakterii z hodowli określona metodą rozmazu znanej objętości na znanej powierzchni — 23,14%. Liczba bakterii z gleby w komorze Bürkera — 29,48%, liczba bakterii z gleby metodą rozmazu 31,02%, liczba bakterii z hodowli opisaną metodą w UV — 12,36%, liczba bakterii z gleby — 16,00%.

Zalety metody: 1. Nie istnieje konieczność zachowania dokładnej objętości zawiesiny pobranej do rozmazu i dokładnego rozprowadzenia jej po określonej powierzchni szkiełka przedmiotowego. 2. Nie ma konieczności morfologicznego odróżniania komórek bakterii od cząstek gleby. 3. Omija się konieczność używania komór przeznaczonych do światła UV; komory takie mają bardzo małą wysokość, z czym wiąże się zły rozkład zawiesiny gleby w polu, poza tym wymagają barwników przyżyciowych. 4. Dokładnie przestrzegając proporcji pomiędzy glebą, wodą a zawiesiną drożdży można sporządzić wiele preparatów, w ten sposób skraca się czas badania. 5. Można jednocześnie sporządzić zawiesiny z kilku badanych gleb i jednocześnie barwić preparaty (intensywność świecenia nie maleje w ciemności do 24 godz. od momentu barwienia). 6. Użycie kondensora ciemnego pola pozwala na wygodniejsze liczenie świecących punktów, a także powoduje skonstrastowanie obrazu i wyrównanie tła. 7. Równoczesne wytrząsanie zawiesiny drożdży z zawiesiną gleby powoduje równy rozkład komórek w preparacie. 8. Określanie liczby bakterii w stosunku do cm³ gleby w jej naturalnym stanie (9) jest bliższe prawdy niż odnoszenie tej wartości do grama gleby lub substancji organicznej.

Podanie ciężaru właściwego badanej gleby, jej wilgotności oraz zawartości substancji organicznej umożliwia porównywanie wyników z danymi z piśmiennictwa.

PIŚMIENNICTWO

1. Babiuk L. A., Paul E. A.: The Use of Fluorescein Isothiocyanate in the Determination of the Bacterial Biomass of Grassland Soil. *Canad. J. Microbiol.* **16**, 2, 57—62 (1970).
2. Black C. A., Evans D. D., White J. L., Eusminger L. E., Clark F. E.: *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties.* Number 9 in the Series Agronomy. American Society of Agronomy, Inc. Publisher Madison, Wisconsin 1965.
3. Casida L. E.: Observation of Microorganisms in Soil and other Natural Habitats. *Appl. Microbiol.* **18**, 6, 1065—1071 (1969).
4. Hähnel W.: Eine Fluoreszenzmethode zur Erfassung von Mikroorganismen des Bodens. *Albrecht-Thaer-Arch.* **8**, 1—2, 139—152 (1964).
5. Harris P. J.: Errors in Direct Counts of Soil Organisms Due to Bacteria in Agar Powders. *Soil. Biol. and Biochem.* **1**, 1, 103—104 (1969).
6. Hattor Tsutomu: Fractionation of Microbial Cells in Soil Aggregates. *Biol. Sol.* **11**, 30—31 (1969).
7. Hagen C. A., Hawrylewicz E. J., Anderson B. T., Tolkacz Vivian K., Cephus Marjorie L.: Use of the Scanning Electron Microscope for Viewing Bacteria in Soil. *Appl. Microbiol.* **16**, 6, 932—934 (1968).
8. Krasilnikow N. A.: *Miethody izuczenija poczwiennych mikroorganizmow i ich mietabolitow.* Izd. MGU Moskwa 1966, 22—43.
9. Kuźniar K.: O przyrodniczych podstawach obliczania ilości drobnoustrojów w glebie. *Ekol. Pol.* **1**, 1, 57—66 (1953).
10. Millar W. N., Casida L. E.: Microorganisms in Soil as Observed by Staining with Rhodamine-labeled Lysosyme. *Canad. J. Microbiol.* **16** (5), 395—307 (1970).
11. Miśustin E. N., Nikitin D. I., Wostrow I. S.: *Mikroorganizmy w selskom hoziajstwie.* Izdat. MGU 30—38 (1970).
12. Nikitin D. I., Makariewa E. D.: Primienienije elektronowego mikroskopa dla koliczestwiennogo uczeta mikroorganizmow w suspenczijach poczw. *Poczwo-wiedienije* **10**, 51—56, 1970.
13. Pital A., Janowitz S. L., Hudak C. E., Lewis E. E.: Direct Fluorescent Labeling of Microorganisms as a Possible Life-detection Technique. *Appl. Microbiol.* **14** (1), 119—123 (1966).
14. Prasad M.: Vergleichende Untersuchungen über verschiedene Methoden zur quantitativen Erfassung der Bodenmikroflora. *Zbl. Bakteriologie. Parasit. Infektionskrankh. und Hyg.* **2**, 122, 4, 341—356 (1968).
15. Singh-Verma S. B.: Zum Problem des quantitativen Nachweises der Mikroflora des Bodens mit der Methode Koch. I. Einfluss der verschiedenen Dispergierungsmittel und Verdünnungsmedien auf Bodendispersion und Gesamtkeimzahl. *Zbl. Bakteriologie. Parasit. Infektionskrankh. und Hyg.* **2**, 122, 4, 357—385 (1968).
16. Singh-Verma S. B.: Zum Problem des quantitativen Nachweises der Mikroflora des Bodens mit der Methode Koch. II. Einfluss der Schütteldauer auf Bodendispersion und Gesamtkeimzahl und Nachweis des Dispergierungseffektes durch Sedimentationsversuche. *Zbl. Bakteriologie. Parasit. Infektionskrankh. und Hyg.* **2**, 122, 4, 386—400 (1968).
17. Sukaczew W. H., Dylis H. W.: *Programma i miethodika biogioecenologičeskich issliedowanij.* Izd. Nauka. Moskwa 1966, 199—201.

18. Tchan Y. T., De Ville R.: Application de l'immunofluorescence à l'étude des azotobacter du sol. Ann. Inst. Pasteur. 118 (5), 665—673 (1970).

РЕЗЮМЕ

Разработан быстрый метод подсчета общего числа бактерий в почве, который не требует их морфологического отделения от частиц почвы. Время, которое необходимо для подсчета числа бактерий в почве одного образца, равно 12 мин. плюс время для подсчета бактерий и дрожжей в препарате. Объем суспензии определяется количеством клеток дрожжей, окрашиваемых тем же красителем, что и бактерии.

Количество бактерий в 1 см³ почвы подсчитывается по следующей формуле:

$$x = \frac{a \cdot c \cdot Y}{b}$$

где: a — число бактерий в препарате, b — число дрожжей в препарате, c — число дрожжей в исходной суспензии, Y — первое разбавление почвы.

Коэффициент вариантности разработанного метода равен 16%.

SUMMARY

A method of the quick calculation of the total number of bacteria in soil was worked out. Due to this method, it is not necessary to morphologically differentiate the bacteria from soil particles. The time needed for the determination of bacterial number in one test amounts to 12 minutes plus the time needed for counting the bacteria and yeasts in the preparation. The volume of suspension is determined by the number of yeast cells staining with the same dye as the bacteria.

The number of bacteria in 1 cm³ of soil is to be calculated according to the following formula:

$$x = \frac{a \cdot c \cdot Y}{b}$$

where: x — the number of bacteria in 1 cm³ of soil, a — the number of bacteria in the preparation, b — the number of yeasts in the preparation, c — the number of yeasts in initial suspension, Y — first dilution of soil.

The coefficient of variation of this method amounts to 16.00%.

