

УДК 579.68(285.23)

Определение бактериальной продукции в водах озера Байкал различными методами

В.В. Максимов*, **Е.В. Щетинина,**
И.В. Глебова, О.В. Крайкивская, Э.А. Максимова
НИИ биологии при Иркутском государственном университете
Россия 664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3, а/я 24¹

Received 9.09.2009, received in revised form 16.09.2009, accepted 23.09.2009

Проведены синхронные сравнительные исследования определения бактериальной продукции в водах озера Байкал по ¹⁴C-гетеротрофной ассимиляции карбонатов и лейциновым методом. Обосновывается перспективность использования наиболее объективного метода для определения продукционного потенциала бактериопланктона Байкала. Показано, что уровень бактериальной продукции может быть измерен как лейциновым методом, так и по темновой фиксации углекислоты. Для условий Байкала перспективно использовать радиоуглеродный ¹⁴C-метод, который отражает баланс продукционно-деструкционных процессов в толще вод экосистемы озера.

Ключевые слова: Байкал, микробиоценозы, гетеротрофная ассимиляция углекислоты, продукция, лейциновый метод.

Изучение закономерностей функционирования микробных сообществ в водных экосистемах является необходимым этапом в оценке образования и деструкции органических веществ. Актуальность проведения исследований вытекает из необходимости составления балансовых уравнений, связывающих процессы продуцирования и бактериальной деструкции. Поэтому необходимо было подобрать наиболее информативные методы определения бактериальной продукции в водах озера Байкал. В настоящее время современными методами для определения бактериальной продукции считают методы с использованием органических веществ, меченных радиоактивными изотопами: напри-

мер, ¹⁴CO₂, лейцин – ¹⁴C, тимидин – ³H и т.д. D.L. Kirchman с соавторами предложили использовать радиоактивный лейцин для оценки скорости синтеза белка в микробных клетках и определения бактериальной продукции (Kirchman et al., 1986). До сих пор информация о продукционных возможностях микробных сообществ, определенных синхронно различными современными методами, отсутствует. В связи с этим необходимы новые сведения о границах бактериальной продукции, полученной различными прецизионными методами, такими как: ¹⁴C- метод гетеротрофной ассимиляции карбонатов, тимидиновый, лейциновый методы. Сравнение результатов, полученных различными методами, очень

* Corresponding author E-mail address: peterkb@mail.ru

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

важно, поскольку совпадение результатов определения бактериальной продукции независимыми методами повышает степень доверия к каждому из них (Теплинская, 1990; Максимов и др., 2007).

Цель исследований – сравнительная оценка методов (^{14}C -лейцинового и темновой ассимиляции CO_2) определения бактериальной продукции в водах озера Байкал.

Объекты и методы исследования

В течение 2005 г. в период максимальной активности экосистемы Байкала проводились исследования по определению бактериальной продукции. Пробы воды на микробиологический анализ отбирали батометром Молчанова в ранневесенний период в Южном Байкале и в летне-осенний период в Среднем и Северном Байкале.

Продукцию бактериальной биомассы в водах Байкала определяли радиоуглеродным методом на основании изучения гетеротрофной ассимиляции углекислоты в прописи (Романенко, Кузнецов, 1974). Для подсчета продукции применяли коэффициент гетеротрофной ассимиляции углекислоты, равный 0.06, экспериментально рассчитанный для условий Байкала (Максимова, 1977). Бактериальную продукцию с использованием радиоактивного лейцина определяли по (Kirchman et al., 1986). Специально для олиготрофных условий Байкала были проведены эксперименты по адаптации лейцинового метода (Straskrabova et al., 2005; Глебова, 2007). Радиоактивность фильтров определяли на сцинтилляционном счетчике Rackbeta (LKB, Швеция).

Результаты и обсуждение

Целью экспериментов по адаптации лейцинового метода к условиям Байкала было определение оптимальной концентрации ^{14}C -

лейцина в инкубируемой пробе и времени инкубации проб. В ходе исследований установлено, что оптимальная концентрация ^{14}C -лейцина в инкубируемой пробе составляет 100-200 нМ, в этом диапазоне концентраций лейцин активно включается в протеины бактериальных клеток (рис. 1). При более низких концентрациях (от 5 до 100 нМ) инкорпорация лейцина была в 1,5-2 раза ниже, в интервале 100-200 нМ оставалась на постоянном уровне, а при концентрации выше 200 нМ снова снижалась.

Оптимальное время инкубации проб – интервал от 2 до 4 часов, так как именно в этом интервале кривая, отображающая включение лейцина в белковую фракцию бактериальных клеток, выходит на плато (рис. 2). При повышении времени инкубации проб происходит достоверное снижение усвоенного лейцина, вследствие чего бактериальная продукция недооценивается. Таким образом, в результате экспериментов были установлены оптимальные условия для применения лейцинового метода определения бактериальной продукции в водах Байкала.

В период летнего максимума развития планктонного сообщества Байкала нами определялась бактериальная продукция микробного планктона по гетеротрофной ассимиляции C/CO_2 (Романенко, Кузнецов, 1974) и ^{14}C -лейциновым методом (Straskrabova et al., 1999; Глебова, 2007).

Величины бактериальной продукции, вычисленные по темновой ассимиляции углекислоты, на всех обследованных станциях в слое 0-10 м колебались в пределах 1,12-4,10 мкг $\text{C}/(\text{л} \cdot \text{сут})$. Продукция бактерий, определенная по включению ^{14}C -лейцина, варьировала от 2,40 до 5,58 мкг $\text{C}/(\text{л} \cdot \text{сут})$. Максимальные значения продукции зафиксированы на горизонте 6 м тем и другим методами и были в 2 раза больше минимальных значе-

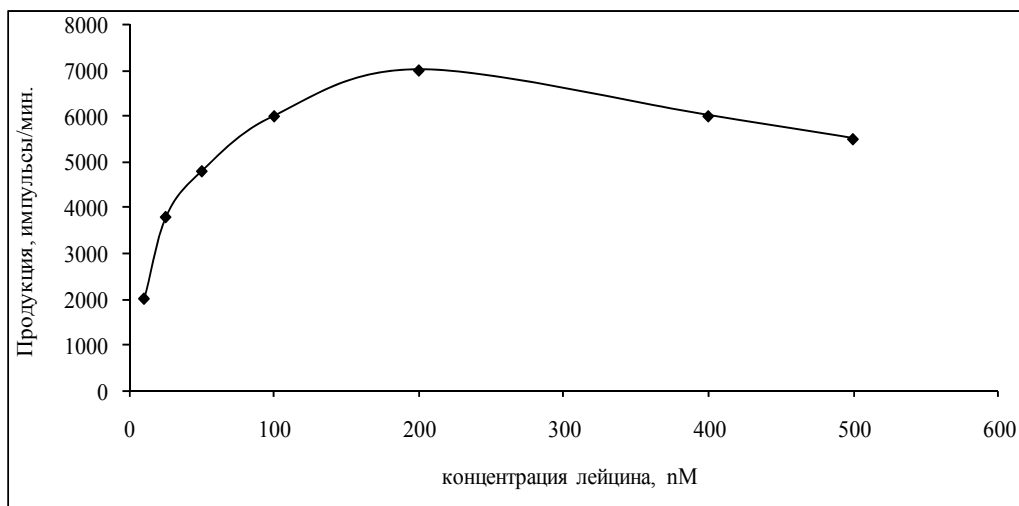


Рис. 1. Зависимость бактериальной продукции от концентрации ^{14}C -лейцина

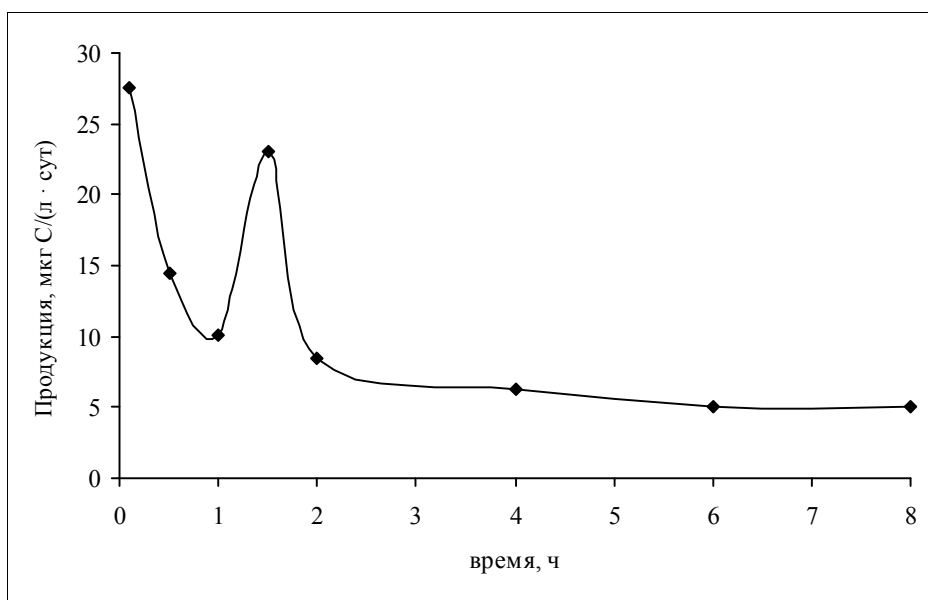


Рис. 2. Зависимость бактериальной продукции от времени инкубации проб

ний. Как видно из рис. 3, четко прослеживается тенденция увеличения или уменьшения продукции бактерий, определенной двумя методами, в различных котловинах озера. Оба метода свидетельствуют о закономерном уменьшении бактериальной продукции с глубиной. Результаты двух исследованных методов определения продукционных возможностей микробиоценозов вод показывают, что бактериальная продукция в Южном Байкале

выше, чем в Среднем и Северном Байкале. Максимальные значения продукции отмечены в районе сброса сточных вод БЦБК как по темновой фиксации углекислоты, так и лейциновым методом (4,10 и 5,58 мкг С/(л · сут) соответственно). Высокие значения бактериальной продукции, определенные по гетеротрофной ассимиляции углекислоты и лейциновым методом, зафиксированы в Среднем Байкале на станции м. Ижимей – п. Турка

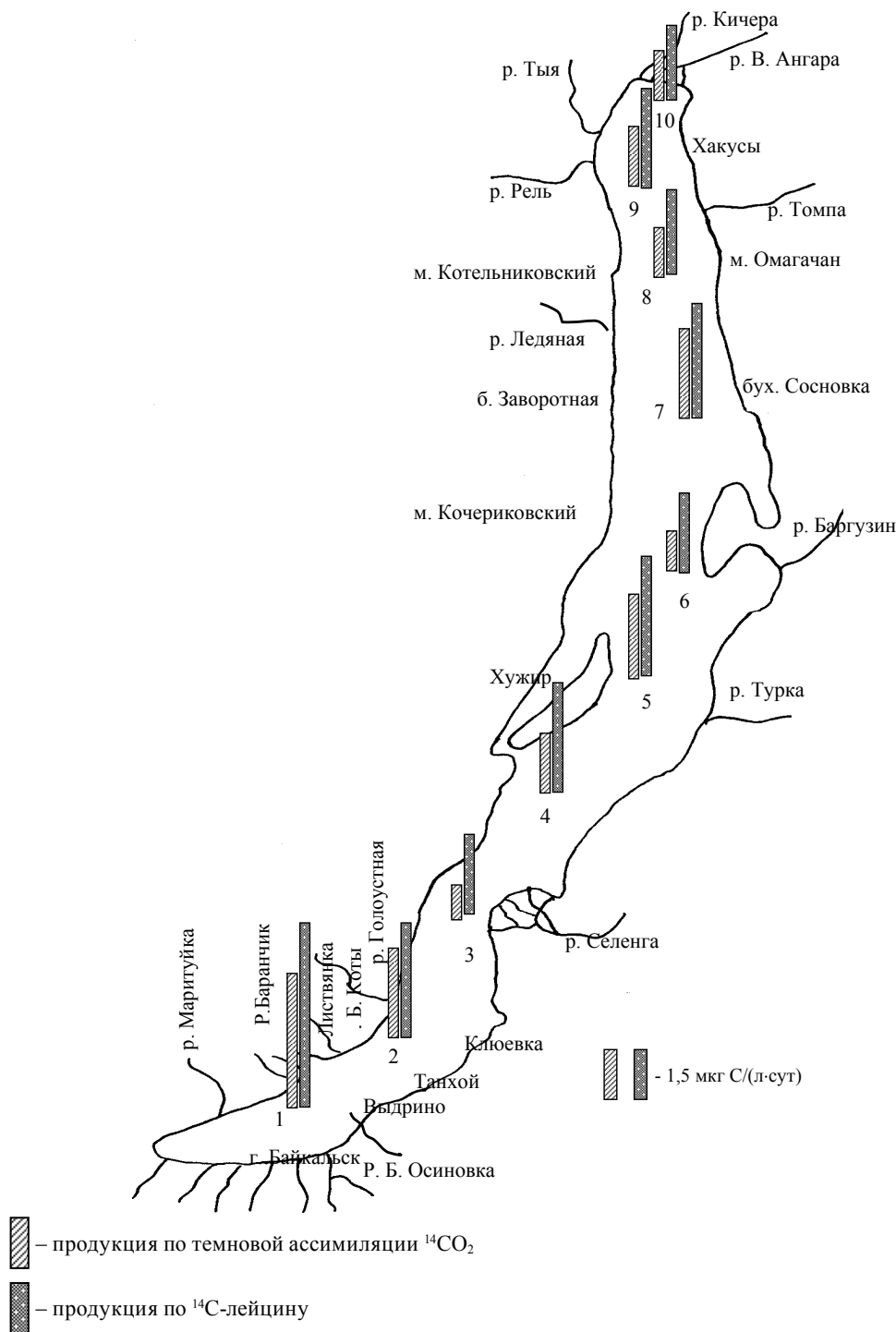


Рис. 3. Бактериальная продукция в слое 0-10 м в пелагиали озера Байкал в летне-осенний период 2005 г. Станции: 1 – 1,5 км от г. Байкальска; 2 – т. № 1 (пос. Б. Коты); 3 – середина разреза м. Б. Колокольный – п. Посольское; 4 – середина разреза б.Ая – м. Сухинский; 5 – середина разреза м. Ижемей – п. Турка; 6 – середина разреза ниже изголовье Св. Носа – м. Кочериковский; 7 – середина разреза б. Сосновка – б. Заворотная; 8 – середина разреза м. Котельниковский – м. Омагачан; 9 – середина разреза с. Байкальское – б. Хакусы; 10 – середина разреза г. Нижнеангарск – м. Немнянка

(2,60 и 3,60 мкг С/(л · сут) соответственно) и в Северном Байкале (б. Сосновка – б. Заворотная, 1,95 и 3,0 мкг С/(л · сут) соответственно). Нужно отметить, что суточная бактериальная продукция, определенная лейциновым методом, на всех обследованных станциях пелагиали Байкала была в среднем в 1,7 раза выше, чем при определении таковой по темновой ассимиляции углекислоты.

Ранее в водах Байкала в ранневесенний период 2003 г. была определена бактериальная продукция одновременно радиоуглеродным методом по ассимиляции углекислоты, лейциновым и тимидиновым методами (Straskrabova et al., 2005). Результаты этих исследований показали, что продукция, определенная по темновой фиксации углекислоты, была в 2 раза выше в поверхностном слое по сравнению с лейциновым и тимидиновым методами. Однако в более глубоких слоях бактериальная продукция, определенная лейциновым методом, была выше в 1,5 раза по сравнению с темновой ассимиляцией углекислоты и тимидиновым методом. Наблюдалось закономерное уменьшение бактериальной продукции, определенной тремя различными методами, с глубиной.

При проведении сравнительных экспериментов по определению продукции бактерий по темновой ассимиляции углекислоты, тимидиновым и лейциновым методами выяснилось, что минимальные значения продукции были получены при определении тимидиновым методом (Straskrabova et al., 2005). Есть сведения, что включение меченного тритием тимидина в метаболизм микробного сообщества происходит у грамотрицательных форм бактерий, доля которых в общем бактериопланктоне может быть самой разной (Теплинская, 1990).

В литературе существуют противоречивые данные о применении лейцинового

и тимидинового методов определения бактериальной продукции. Некоторые авторы рекомендуют тимидиновый метод взамен лейцинового для измерения гетеротрофной бактериальной продукции (Hietanen et al., 2002). Другие авторы показывают, что лейциновый метод на порядок величин более чувствительный, что позволяет проводить измерения при низкой бактериальной продукции (Simon, Azam, 1989). Главное преимущество лейцинового метода над тимидиновым заключается в том, что для измерения продукции бактерий не требуется переводного коэффициента, так как количество лейцина, количество белка в клетке и отношение углерода к белку в бактериальных клетках всегда постоянны в морских сообществах. В то же время, многими авторами обнаружена высокая корреляция между уровнем включения лейцина и тимидина, что свидетельствует о сбалансированном росте (Kirchman et al., 1985; Heinanen, Kuparinen, 1992).

Использование лейцинового метода показало, что бактериальная продукция составляла в среднем 19-33 % от первичной продукции (Tulonen, 1993). С помощью лейцинового и тимидинового методов было определено, что бактерии используют 20-40 % первичной продукции в течение 24 часов в слоях от 2 до 20 м (Straskrabova et al., 2005). Аналогичные данные были получены нами ранее на Байкале по темновой фиксации углекислоты, когда бактерии в верхнем трофогенном слое трансформировали до 44 % от суммарной первичной продукции (Максимова, Максимов, 1989).

Таким образом, критически относясь к полученным результатам относительно погрешностей и известных неопределенностей при их получении, мы все же можем данные, полученные двумя методами, сопоставить. Причем ^{14}C -метод гетеротрофной ассими-

ляции можно в условиях Байкала использовать не только для получения относительных данных об активности бактериального звена экосистемы, но и для измерения абсолютных показателей его продуктивности с точностью $\pm 5\%$. Для условий Байкала перспективно использовать радиоуглеродный ^{14}C -метод, который отражает баланс продукционно-деструкционных процессов в толще вод экосистемы озера. Этот вывод основывается на стабильности и повторяемости многолетних количественных параметров по ^{14}C -активности микробных сообществ в узких пределах вариаций (Максимова, Максимов, 1989; Максимов, 2006).

Сравнение результатов, полученных по темновой ассимиляции углекислоты в 1980-2000 гг., показало, что значения бактериальной продукции были в одних пределах величин, что свидетельствует об устойчивом состоянии экосистемы пелагиали Байкала (Максимова, Максимов, 1989; Максимов, 2006; Максимов и др., 2007).

Результаты исследований показали, что уровень бактериальной продукции может быть измерен лейциновым методом и радиоуглеродным ^{14}C -методом. Лейциновое включение, которое измеряет синтез бактериаль-

ных белков, дает более высокие показатели бактериальной продукции, чем тимидиновый (Tuominen, 1995) и темновая фиксация углекислоты. При сравнении трех методов определения бактериальной продукции в ранневесенний период было показано, что все методы адекватно свидетельствуют о закономерном уменьшении бактериальной продукции с глубиной. В основном же результаты, полученные двумя методами (лейциновым и темновой фиксацией углекислоты), сопоставимы и выражены величинами одного порядка.

В условиях олиготрофности существования микробных сообществ пелагиали озера радиоуглеродный ^{14}C -метод определения продукции бактерий является наиболее доступным технологичным способом получения надежной информации об интегральных результатах жизнедеятельности бактериальных сообществ. В подтверждение наших выводов имеются данные (Романенко, 1985), свидетельствующие о том, что на олиготрофных водоемах можно использовать темновую ассимиляцию углекислоты с применением ^{14}C -карбонатов и производить расчеты дыхания и продукции микробных сообществ (Садчиков, Козлов, 1992).

Работа выполнена при частичной поддержке Аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2010 гг.)» (проект РНП № 2.1.1/2880).

Список литературы

Глебова И.В. (2007) Применение радиоактивного лейцина для определения бактериальной продукции в водах озера Байкал. Микроорганизмы в экосистемах озер, рек, водохранилищ. Материалы 2-го Байкальского микроб. симпозиума с международным участием. Иркутск, 10-15 сентября, с. 52.

Максимов В.В. (2006) Биопродуктивность микробных сообществ пелагиали Байкала. Вестник Бурятского университета: Спецвыпуск. Улан-Удэ: Изд-во Бурятского гос.ун-та, с.105-112.

Максимова Э.А. (1977) Микрофлора Байкала в продукционных и самоочистительных процессах: Автореф. дисс.... канд. биол. наук. Алма-Ата, 19 с.

Максимова Э.А., Максимов В.Н. (1989) Микробиология вод Байкала. Иркутск: изд-во Иркут. ун-та, 156 с.

Максимов В.В., Щетинина Е.В., Глебова И.В. (2007) Сравнительная оценка различных методов определения бактериальной продукции в водах озера Байкал. Микроорганизмы в экосистемах озер, рек, водохранилищ: материалы 2-го Байкальского микроб. симпозиума с международным участием. Иркутск, 10-15 сентября, с. 148.

Романенко В.И., Кузнецов С.И. (1974) Экология микроорганизмов пресных водоемов (лабораторное руководство). Л.: Наука, 189 с.

Романенко В.И. (1985) Микробиологические процессы продукции и деструкции органического вещества во внутренних водоемах. М.: Наука, 295 с.

Садчиков А.П., Козлов О.В. (1992) Суточная динамика продукции фито- и бактериопланктона. Гидробиол. журнал, 28 (2): 12-16.

Теплинская Н.Г. (1990) Процессы бактериальной продукции и деструкции органического вещества в северных морях. Апатиты, 105 с.

Heinänen A., Kuparinen J. (1992) Response of bacterial thymidine and leucine incorporation to nutrient (NH_4 , PO_4) and carbon (sucrose) enrichment. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol., vol. 37: 241-251.

Hietanen S., Lehtimäki J.M., Tuominen L., Sivonen K., Kuparinen J. (2002) *Nodularia* spp. (Cyanobacteria) incorporate leucine but not thymidine: importance for bacterial-production measurements. Aquat. Microb. Ecol., 28: 99-104.

Kirchman D., Kneess E., Hodson R. (1985) Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic system. Appl. Environ. Microbiol. 49: 599-607.

Kirchman D., Newell S.Y., Hodson R. (1986) Incorporation versus biosynthesis of leucine: implications for measuring rates of protein synthesis and biomass production by bacteria in marine systems. Mar. Ecol. Prog. Ser. 32: 47-59.

Kirchman D.L. (1993) Leucine incorporation as a measure of biomass production by heterotrophic bacteria. In: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J.J. (Eds.) Aquatic microbial ecology. Boca Raton, Florida: Lewis Publ., p. 509-512.

Simon M., Azam F. (1989) Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. Mar. Ecol. Prog. Ser., 51: 201-213.

Straskrabova V., Callieri C., Carrillo P., Cruz-Pizarro L., Fott J., Hartman P., Macek M., Medina-Sanchez J.P., Nedoma J., Simek K. (1999) Investigation on pelagic food webs in mountain lakes – aims and methods. J. Limnol. 58: 77-87.

Straskrabova V., Izmet'yeva L.R., Maksimova E.A., Fietz S., Nedoma J., Borovec J., Kobanova G.I., Shchetinina E.V., Pislegina E.V. (2005). Primary production and microbial activity in euphotic zone of Lake Baikal (Southern basin) during late winter. Global and Planetary Change 46: 57-73.

Tuomola T. (1993) Bacterial production in a mesohumic lake estimated from (^{14}C) leucine incorporation rate. Microb. Ecol., 26: 201-217.

Tuominen L. (1995) Comparison of leucine uptake methods and a thymidine incorporation method for measuring bacterial activity in sediment. Journal of Microbiological Methods 24: 125-134.

The Determining of Bacterial Production in Baikal Waters by Different Methods

**Vyacheslav V. Maximov,
Elena V. Schetinina, Inessa V. Glebova,
Olesia V. Kraikivskya, Elvira A. Maximova**
*Research Center for Biology of Irkutsk State University
3 Lenina st., Irkutsk, 664003 Russia*

For the first time the synchronous comparative researches by definition of bacterial production in waters of lake Baikal on ^{14}C -heterotrophic assimilations of carbonates and by the methods and of leucine incorporation are lead. Perspectives of use of the most objective method for definition of production potentialities of microbial plankton of Baikal are proved. It is shown that the level of bacterial production can be measured as by the leucine method, and on dark assimilations of carbonic acid. For conditions of Baikal it is perspective to use the radiocarbon ^{14}C - method which most adequately reflects the balance of production-destruction processes in a strata of waters of an ecosystem of the lake.

Keywords: Baikal, microbiocenoses, heterotrophic assimilation of carbonic acid, production, leucine method.
