

Г.М.Зенова, А.Л.Степанов, А.А.Лихачева, Н.А.Манучарова

ПРАКТИКУМ ПО БИОЛОГИИ ПОЧВ

ИЗДАТЕЛЬСТВО МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ФАКУЛЬТЕТ ПОЧВОВЕДЕНИЯ

КАФЕДРА БИОЛОГИИ ПОЧВ

Г.М.Зенова, А.Л.Степанов, А.А.Лихачева, Н.А.Манучарова

ПРАКТИКУМ ПО БИОЛОГИИ ПОЧВ

Допущено Учебно-методическим
объединением по классическому
университетскому образованию
(отделение почвоведения) в качестве
учебного пособия по специальности
01.30.00 "Почвоведение"

ИЗДАТЕЛЬСТВО МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

2002

УДК 631.46 ББК 40.3 П69

Д.Г.Звягинцев

Ответственный редактор : доктор биологических наук, академик РАН, профессор

Рецензенты :

доктор биологических наук Д.И.Никитин,
доктор биологических наук, профессор В.К.Шильникова

*Учебное пособие издано при финансовой поддержке
Программы ведущих научных школ Российской Федерации
Грант РФФИ №001597886*

Практикум по биологии почв: Учеб. пособие / Зенова Г.М., П69 Степанов А.Л., Лихачева А.А.,
Манучарова Н. А. - М.: Издательство
МГУ, 2002.- 120 с. ISBN 5-211-04657-9

В учебном пособии излагаются методы работы с основными представителями почвенной биоты - растениями, водорослями, беспозвоночными животными, грибами, дрожжами, бактериями, актиномицетами. Даны методы исследования экологических функций почвенных микроорганизмов, участвующих в процессах превращения веществ в природе. Рассматриваются методы исследования взаимосвязей микроорганизмов в биотических сообществах и методы исследования биологической активности почвы.

Для студентов высших учебных заведений, аспирантов и научных работников, специализирующихся в области почвенной биологии, агрохимии, почвоведения, экологии.

УДК 631.46 ББК 40.3

ISBN 5-211-04657-9

© Г.М.Зенова, А.Л.Степанов,

А.А.Лихачева, Н.А.Манучарова, 2002

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЧВЕННОЙ БИОТЫ	5
Обнаружение и количественный учет микроорганизмов в почве	5
Принципы работы с оптическим микроскопом	11
Методы получения чистых культур и культивирования почвенных микроорганизмов	15
ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ	17
Почвенные водоросли	17
Почвенные беспозвоночные животные	22
Почвенные грибы	29
Почвенные дрожжи	33
Бактерии	36
Актиномицеты	42
РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ	47
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ	52
Выявление микроорганизмов, участвующих в превращении соединений углерода	52
Обнаружение и учет микроорганизмов, участвующих в превращении соединений азота	58
Обнаружение микроорганизмов, участвующих в превращениях фосфора, серы, железа и марганца	67
РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ	72
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ В БИОТИЧЕСКОМ СООБЩЕСТВЕ	74
Экологические методы исследования почвенной биоты	74
Антагонизм микроорганизмов	81
Исследование взаимоотношений микроорганизмов и растений	83
Исследование взаимоотношений микроорганизмов и почвенных беспозвоночных животных	91
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВ	98
РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ	109
ПРИЛОЖЕНИЕ	111
ЛИТЕРАТУРА	119

ВВЕДЕНИЕ

Почвы содержат огромное количество и разнообразие микроорганизмов. Существование почвы без микробов невозможно. Микробы обуславливают протекание в почве ряда наиболее важных процессов. Они являются необходимым звеном в круговороте всех биогенных элементов, участвуют в почвообразовании и поддержании почвенного плодородия.

Биология почв – комплексная наука, родившаяся на стыке разных разделов биологии и почвоведения. Она изучает процессы и явления, которые составляют область исследований генетического почвоведения (происхождение и развитие почв, образование гумуса, формирование почвенного профиля и др.), физики и химии почв (роль микроорганизмов в образовании водопрочных агрегатов почв, в разрушении структуры, в превращении элементов и их аккумуляции), географии почв (разработка принципов и методов биологической диагностики и классификации почв), агрохимии и земледелия (почвенное плодородие и питание растений).

В общей системе биологических знаний биология почв является самостоятельной наукой, имеющей свои объекты исследования, специфические проблемы и необходимые для их решения методологические подходы.

Настоящее учебное пособие составлено по основному курсу "Биология почв" для студентов 2 курса факультета почвоведения Московского государственного факультета им. М.В.Ломоносова. В учебном пособии подробно излагаются методы выявления и учета представителей почвенной биоты – беспозвоночных животных, водорослей, грибов, дрожжей, бактерий и актиномицетов. Описаны методы наблюдения за почвенными организмами и методы, выявляющие их участие в процессах превращения биогенных элементов в почве. Особое место отводится экологическим методам исследования почвенной биоты и методам изучения взаимоотношений в биотическом сообществе. В пособие обсуждаются методы исследования

биологической активности почв. Составлены списки рекомендуемых практических занятий по темам курса "Биология почв"

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЧВЕННОЙ БИОТЫ

Обнаружение и количественный учет микроорганизмов в почве

Метод посева из разведений почвенных суспензий на плотные питательные среды является не единственным и не самым совершенным для количественного учета микроорганизмов в почве. Число бактерий, например, учитываемое с помощью прямого метода люминесцентного микроскопирования почвенной суспензии, в 1000 раз превышает количество бактерий, учитываемое методом посева. Однако метод посева остается одним из распространенных в практике исследования почвенных микроорганизмов вследствие того, что позволяет учитывать не только численность, но и таксономический состав комплекса почвенных микроорганизмов. Из изолированных колоний, вырастающих на чашках с питательной средой, можно выделять чистые культуры микроорганизмов для дальнейшего исследования и идентификации

Отбор и подготовка почвенного образца для микробиологического анализа. Образцы почв для проведения микробиологических исследований отбирают в стерильные пакеты. Для получения статистически достоверных результатов с пробной площади отбирают от трех до десяти образцов методом случайных проб. Микробиологический анализ проводят непосредственно после отбора образцов или хранят образцы в морозильной камере при температуре -5°C .

Подготовка почвенного образца к микробиологическому анализу заключается в удалении крупных корней, разрушении почвенных агрегатов, десорбировании микроорганизмов с поверхности почвенных частиц, дезагрегировании микроколоний микроорганизмов. Для десорбции микроорганизмов и дезагрегирования микроколоний используется обработка почвенного образца ультразвуком на установке УЗДН-1 при следующем

режиме: время обработки образца 4 мин., сила тока 0,44 А, частота 15 кГц. Для учета мицелиальных организмов в почве используют растирание почвенного образца, увлажненного до пастообразного состояния в течение 3-5 мин в фарфоровой ступке резиновым пестиком или пальцем в резиновом напалечнике. Возможно использование электрической пропеллерной мешалки (микроизмельчителя тканей) при следующем режиме: 2-3 тыс. об/мин, 5-10 мин.

Приготовление питательных сред и посуды для посева.

Микроорганизмы, населяющие почву, различны по потребностям в источниках питания, поэтому универсальных сред, одинаково пригодных для роста всех микроорганизмов не существует. Главными элементами, по отношению к которым проявляется разнообразие обмена веществ у микроорганизмов и которые определяют специфичность питательной среды, являются источники углерода и азота.

По составу все питательные среды делятся на естественные и синтетические. *Естественные* питательные среды – это молоко, кусочки вареного белка куриного яйца, сыворотка крови, овощи, фрукты и их отвары, отвары и гидролизаты мяса, рыбы, дрожжей. Для выделения бактерий из почвы используют мясопептонные среды, приготовляемые с добавлением пептона и поваренной соли к отварам и экстрактам мяса. Для выделения из почвы грибов, дрожжей и некоторых бактерий используют виноградное и солодовое сусло, которое готовят из ячменного солода. Сусло содержит в качестве основного источника углерода мальтозу, а также азотистые вещества и витамины. Естественной средой для выделения из почвы микроорганизмов являются почвенные среды. Основой для их приготовления служат торф, почва. Практикуется приготовление пластинок из почвы с добавлением некоторых веществ, приготовление питательных сред на основе почвенных экстрактов. *Синтетические* питательные среды содержат определенный набор химических веществ в определенных концентрациях. Существуют рецепты определенных синтетических сред. Для выделения из почвы и культивирования автотрофных

микроорганизмов используют среды, состоящие из неорганических солей, для выделения гетеротрофных микроорганизмов – среды, где в качестве источника углерода используются сахара, органические кислоты и соли, крахмал.

Особое место в изучении почвенных микроорганизмов занимают элективные среды, введенные в практику микробиологических исследований С.Н.Виноградским. Они обеспечивают развитие узкой группы микроорганизмов, выполняющих определенную функцию, например, фиксирующих азот из атмосферы, разлагающих целлюлозу и так далее. Элективные среды далеко не всегда обеспечивают нормальное развитие видов микроорганизмов, которые преимущественно на них растут. Специализация среды, связанная с необходимостью ограничить развитие посторонних микробов, может привести к тому, что элективные среды перестают быть полноценными для специфического организма. В связи с этим, иногда добавляют к элективным средам дополнительные вещества – витамины, дрожжевой автолизат, мясной бульон.

По физическому состоянию среды разделяются на жидкие и плотные. Для получения плотных сред используют агар-агар, поэтому их называют еще агаризованными. В микробиологической практике применяют пластинки кремнекислого геля, предложенные С.Н.Виноградским. Силикагель представляет собой минеральную основу при приготовлении сред для автотрофных микроорганизмов.

Питательные среды стерилизуют паром. Стерилизацию паром проводят в автоклаве, где давление создается насыщенным паром и температура превышает 100° . Обычно питательные среды стерилизуют автоклавированием в течение 20 мин при 121° . Среда, содержащая некоторые сахара, соки, молоко стерилизуют при 112° 30 мин. Для сред, портящихся при температуре выше 100° применяют стерилизацию текучим паром. Это дробная стерилизация (тиндализация) в кипятильнике Коха. Среда обрабатывается троекратно по 30-40 мин с интервалом в 1 сутки. В течение этого времени споры микроорганизмов прорастают и при последующем кипячении могут быть убиты.

Пастеризация – неполная стерилизация – достигается выдерживанием материала при 70° в течение 15 мин или при 80° в течение 10 мин и применяется для стерилизации легко портящихся пищевых продуктов (молоко, соки, сиропы), используемых в качестве питательных сред для микроорганизмов, а также для освобождения почвенных суспензий от вегетативных клеток микроорганизмов.

Микробиологическую посуду (колбы, пробирки, чашки Петри) стерилизуют сухим жаром (горячим воздухом) в сушильных шкафах, используя следующий режим: 160° – 180° , 2-3 ч.

Прокаливанием в пламени стерилизуют металлические и стеклянные предметы - иглы, петли, предметные и покровные стекла, горлышки колб, бутылок, пробирок.

Рабочее место микробиолога стерилизуют обычно с помощью дезинфицирующих средств – лизола, других фенольных соединений, гипохлорида, формальдегида, окиси этилена, хлороформа. Для стерилизации лабораторных боксов используют ультрафиолетовое облучение в диапазоне 254 нм. В качестве источника ультрафиолетового излучения обычно используются специальные кварцевые бактерицидные лампы. Излучателем в этих лампах служит электрическая дуга, возникающая в парах ртути низкого давления.

В случае проведения модельных опытов со стерильной почвой используют автоклавирование увлажненных почвенных образцов. Автоклавирование проводят три раза в течение трех дней. Между автоклавированиями образцы почв выдерживают в термостате. Проверяют стерильность почвы, инокулируя комочком почвы питательный бульон. Облучение гамма-лучами используют для стерилизации воздушно-сухих образцов почвы. Гамма-лучи, испускаемые изотопами ^{60}Co или ^{137}Cs являются примером электромагнитного ионизирующего излучения. В почвенных исследованиях способ стерилизации облучением признан наиболее надежным и мягким, не вызывающим образования токсических веществ, почти не влияющим на почвенный гумус и физико-химические свойства почвы.

Облучение проводят в двойных запаянных полиэтиленовых пакетах (10x10 см) с 10-20 г почвы на универсальной кобальтовой установке К-200000 или радиохимической установке Рх -j-30 с мощностью облучения 0,5 Мрад/ч. Доза облучения 2,5 Мрад (мегарад). В связи со специальными требованиями по технике безопасности, а также высокой стоимостью источников гамма-облучения исследования проводят на крупных производственных или научно-исследовательских объектах.

Для выделения из почвы бактерий используют мясопептонный агар (МПА)(мясной бульон – 1 л; агар – 20 г), среду Чапека для бактерий (г/л): KCl – 0,5; MgSO₄ · 7H₂O – 0,5; K₂HPO₄ – 1; FeSO₄ · 7H₂O – 0,01; NaNO₃ – 2,0; CaCO₃ – 3,0; сахароза – 20; агар –20. Для выделения из почвы актиномицетов используют казеин-глицериновый агар (г/л): гидролизат казеина с дрожжевым экстрактом – 0,3; глицерин -10 мл; KNO₃ – 2; K₂HPO₄ – 2; MgSO₄ · 7H₂O – 0,05; FeSO₄ · H₂O – 0,01; CaCO₃ – 0,02; NaCl – 2; агар – 20. Для выделения грибов из почвы используют сусло агар (исходное сусло разводят примерно в 2 раза, агар – 2 %) или среду Чапека для грибов (состав среды тот же, что и состав среды Чапека для бактерий, исключается CaCO₃; сахароза –30 г/л).

Разливку питательной среды лучше производить, когда среда имеет температуру около 50⁰, так как при этом на крышках чашек не образуется капель воды в результате конденсации пара. Для того, чтобы колонии на агаре не расплывались чашки со средой подсушивают в сушильном шкафу при 60-70⁰ до появления муарового рисунка на поверхности агара или на воздухе, выдерживая их сутки после разлива среды.

Приготовление почвенных суспензий. Перед посевом влажную или сухую почвы хорошо перемешивают, высыпают на часовое стекло, предварительно протертое спиртом, освобождают от посторонних включений и крупных корней. Используют навеску в 1 г после соответствующей обработки почвы растиранием или другим способом переносят ее в колбу со 100 мл стерильной водопроводной воды. Готовят разведения почвенной суспензии, для

чего 1 мл почвенной суспензии из колбы (разведение 1: 100) последовательно переносят в ряд пробирок с 10 мл стерильной водопроводной воды

Посев почвенной суспензии на плотные среды проводят из разведений 1:10; 1:100; 1:1000 и т.д. в зависимости от таксономической принадлежности учитываемых микроорганизмов, типа почвы, ее влажности и других факторов. Разведение подбирают таким образом, чтобы на чашке развивалось 5—200 колоний бактерий и актиномицетов и 30-50 колоний грибов. При слишком густом или разреженном посеве подсчет количества микроорганизмов будет неточным. Из каждого образца почв берут не менее 3-5 повторных навесок и каждую навеску высевают на 3-5 чашек с каждой средами.

Техника посева На поверхность застывшей подсушенной среды наносят пипеткой 1 каплю почвенной суспензии определенного разведения и с помощью стеклянного шпателя распределяют ее по всему агару. Засеянные чашки подписывают, переворачивают вверх дном и помещают в термостат. Сроки учета микроорганизмов зависят от состава питательной среды и таксономического состава учитываемых организмов. На МПА учитывают на 2-3 сутки роста споровые и неспоровые формы бактерий. На среде Чапека и казеин-глицериновом агаре на 5-7 сутки роста учитывают колонии бактерий и актиномицетов, на сусло-агаре – на 5-7 сутки роста – колонии грибов и дрожжей.

Подсчет количества колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизмов в 1 г почвы. Каждая колония на чашке с питательной средой вырастает из одной колониеобразующей единицы (КОЕ), которая может представлять собой бактериальную, дрожжевую клетку, спору или кусочек мицелия актиномицета или гриба. Поэтому, учитывая колонии микроорганизмов, выросшие на питательной среде, мы можем определить количество КОЕ в 1 г почвы. Подсчет количества колоний на чашке проводят со дна чашки в проходящем свете. На месте подсчитанной колонии чернилами по стеклу или фломастером ставят точку. В случае использования

непрозрачных сред или учета колоний актиномицетов подсчет производят с поверхности агара.

Подсчитав количество колоний на всех параллельных чашках, вычисляют среднее их число на чашке, затем делают пересчет содержания колониобразующих единиц в 1 г (КОЕ/г) почвы по формуле: $A = B \cdot V \cdot C$, где A – КОЕ/г почвы; B – среднее количество колоний на чашке; V – разведение почвенной суспензии, из которого произведен посев; C – количество капель в 1 мл суспензии (количество капель в пипетке на 1 мл, с помощью которой проводили посев). Результаты анализов обрабатываются статистически с учетом ошибки среднего арифметического, среднего квадратического отклонения, коэффициента вариации (Дмитриев, 1995) или на компьютере с использованием программы STATISTICA (Манучаров и др., 2001).

Принципы работы с оптическим микроскопом.

В микробиологической практике для изучения морфологии и строения клеток микроорганизмов применяются светооптические микроскопы, обеспечивающие увеличение объектов в сотни раз, и электронные микроскопы, увеличивающие объекты в десятки тысяч раз.

Для оптических микроскопов существуют фазово-контрастные устройства, темнопольные конденсоры. Используется люминесцентный микроскоп, отличия в эксплуатации и конструкции которого от обычного оптического микроскопа относятся к генерированию и передаче света с длинами волн, пригодными для возбуждения флуоресцирующих красителей (флуорохромов) или естественной флуоресценции в объекте, а также к детектированию света для тех длин волн, которые возникли в объекте в результате флуоресценции.

Современный оптический микроскоп имеет оптическую и механическую части (рис. 1). Механическая часть включает штатив с предметным столиком и тубус. Предметный столик может перемещаться в горизонтальной плоскости с помощью двух винтов, находящихся справа и слева. На поверхности столика

имеется устройство, закрепляющее препарат. Тубус микроскопа перемещается вверх и вниз с помощью двух винтов — макрометрического и микрометрического, предназначенных для грубой и тонкой фокусировки исследуемого объекта. Полный оборот микровинта передвигает тубус на 0,1 мм. В верхнюю часть тубуса вставляется окуляр. В нижней части тубуса имеется револьверное устройство, в отверстия которого ввинчиваются объективы.

Оптическая часть микроскопа включает объектив, окуляр, конденсатор, зеркало.

Объектив — наиболее важная часть микроскопа. Он состоит из системы линз, дающих увеличенное и перевернутое изображение изучаемого объекта. Самая главная линза — наружная (фронтальная), от фокусного расстояния которой зависит увеличение объектива. Чем больше кривизна фронтальной линзы, тем короче фокусное расстояние и тем больше увеличение объектива. Увеличение объектива обозначается на его оправе. Имеются объективы, увеличивающие в 8, 20, 40 (сухие) и 90, 100 (иммерсионные) раз.

Выше фронтальной расположены коррекционные линзы, устраняющие сферическую и хроматическую абберации, обеспечивающие получение более четкого изображения. По способности устранять абберации объективы делятся на ахроматы, апохроматы и планохроматы. Хроматическая погрешность изображения при использовании апохроматов по сравнению с ахроматами уменьшается в 10 раз. Объективы-планохроматы полностью устраняют кривизну поля зрения; их используют при микрофотографировании. Окуляр микроскопа представляет собой оптическую систему из двух линз: глазной (верхней) и собирающей (нижней). Между ними в окуляре имеется диафрагма, которая задерживает боковые лучи и пропускает лучи, близкие к оптической оси и дающие более контрастное изображение. Окуляр увеличивает то изображение, которое дает объектив. Имеются окуляры, увеличивающие в 5, 7, 10, 12, 15, 20 раз. Увеличение окуляра указано на оправе (например, 15х).

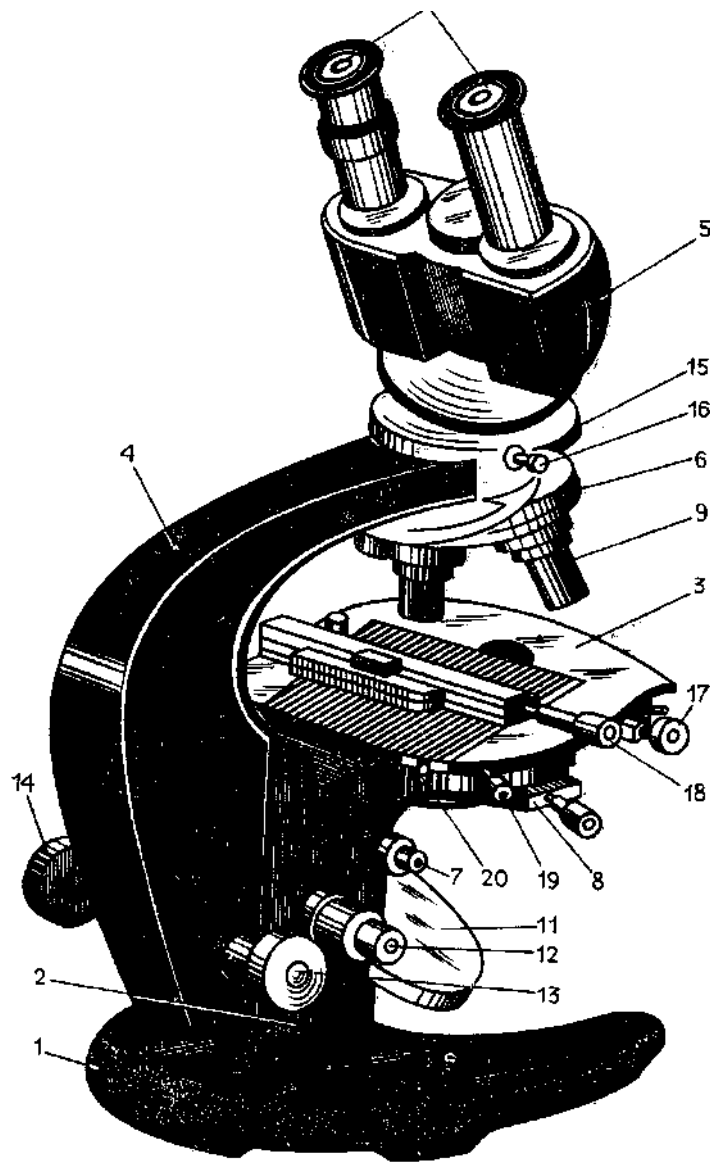


Рис.1. Биологический микроскоп .

1 — основание микроскопа; 2 — штатив; 3 — столик; 4 — держатель тубуса; 5 — бинокулярная насадка; 6 — держатель объективов; 7 — винт; 8 — диафрагма косого освещения; 9 — объектив; 10 — окуляры; 11 — зеркало; 12 — винт микронаводки; 13, 14 — винт макронаводки; 15, 16 — головка тубуса с винтом крепления; 17, 18 — винты крестообразного устройства; 19 — винт для вращательного движения столика; 20 — винт для крепления столика

Зеркало отражает падающий на него свет и направляет его в конденсор для освещения препарата. Плоскую сторону зеркала используют при любом источнике света и любом освещении, вогнутую сторону зеркала — при работе без конденсора с малым увеличением. Конденсор состоит из нескольких линз.

Он собирает параллельные лучи, отраженные зеркалом, в одной точке - фокусе, который должен находиться в плоскости препарата. В нижней части конденсора находится ирисовая диафрагма, с помощью которой можно менять угол лучей и количество пропускаемого конденсором света. Для фокусировки конденсора имеется специальный винт.

При работе с микроскопом необходимо придерживаться определенных правил и прежде всего правильно устанавливать освещение.

Освещение по Келлеру осуществляется с помощью точечного источника света (осветителя). Порядок установки освещения следующий. Закрывают ирисовую диафрагму конденсора и полевую диафрагму осветителя. Устанавливают лампу осветителя в такое положение, чтобы изображение нити лампы было четким на диафрагме конденсора, которую оно должно полностью перекрыть. На зеркало нужно положить кружок бумаги и сфокусировать на него нить лампы осветителя, чтобы добиться четкости изображения. Наблюдение за изображением нити лампы на диафрагме конденсора осуществляют с помощью плоского зеркала микроскопа, в котором отражается диафрагма. Открывают ирисовую диафрагму конденсора и почти до предела закрывают диафрагму осветителя. Фокусируют объектив малого увеличения на плоскость объекта и находят изображение полевой диафрагмы осветителя в виде яркого светящегося круглого пятна. Затем, смотря в микроскоп, устанавливают конденсор в таком положении, при котором изображение светового пятна будет наиболее четким. После этого, не трогая больше конденсор, расширяют диафрагму осветителя до тех пор, пока ее края не совпадут с краями поля зрения. Диафрагму конденсора открывают, меняя степень ее раскрытия при переходе от одного увеличения к другому.

При наблюдении микробов в оптическом микроскопе обычно пользуются препаратами "раздавленная капля" и "висячая капля". Препарат "раздавленная капля" готовится следующим образом: на чистое предметное стекло наносят пипеткой каплю водопроводной воды или физиологического раствора (0,5%-ный NaCl). Рядом с каплей петлей наносят исследуемый материал (клетки

микробов). Петлю прожигают в пламени горелки для уничтожения оставшихся на ней микробов. Каплю со штрихом исследуемого материала покрывают покровным стеклом. Следует при этом обращать внимание на то, чтобы в препарате не было излишней жидкости, которую отсасывают из-под стекла фильтровальной бумагой. Такие препараты рассматриваются под микроскопом с сухими системами объективов и с иммерсией.

Препарат "висячая капля" готовится нанесением иглой на стерильное покровное стекло очень маленькой капли жидкости с взвешенными в ней клетками микроорганизмов. Стекло тотчас же переворачивают каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с лункой так, чтобы капелька висела над лункой, не касаясь ее краев и дна. Края лунки предварительно смазывают смесью равных частей вазелина и жидкого парафина или вазелином, и покровное стекло крепко прижимают к предметному стеклу. Препарат просматривают с сухими системами объективов и с иммерсией. Наблюдения можно производить длительно — в течение недели и более. При приготовлении препаратов для длительных наблюдений пользуются не водой, а жидкой питательной средой. Препараты можно помещать на электрический нагревательный столик и следить за развитием микроорганизмов.

Методы получения чистых культур и культивирования почвенных микроорганизмов

Чистой культурой микроорганизма называют культуру, представляющую собой потомство одной клетки. В случае нитчатых или мицелиальных организмов чистая культура может быть подучена из многоклеточной нити.

При посеве почвенной суспензии на поверхность плотных сред на чашках Петри получают изолированные друг от друга колонии микроорганизмов. Для получения чистой культуры материал, взятый петлей из отдельной колонии, переносят в свежую питательную среду и равномерно распределяют шпателем по поверхности. После этого тем же шпателем, не обжигая его, засевают последовательно еще 2—3 чашки. Обычно на первой чашке после

определенного срока инкубации наблюдается густой, а иногда и сплошной рост микроорганизмов, а на последующих образуются хорошо изолированные друг от друга колонии. Путем отсева из этих колоний получают чистые культуры. Чистоту выделенной культуры проверяют следующим методом: рассеивают культуру истончающимся штрихом на поверхность плотной среды, следят за характером и однородностью роста колоний, контролируют микроскопически.

Культивирование микроорганизмов требует определенных условий температуры, аэрации, pH среды. Постоянная температура поддерживается в термостатах. Термостатами могут быть специальные шкафы, существуют и специальные термостатные комнаты. Мезофильные организмы выращивают при температурах 25— 35°, термофильные — 50—60°, психрофилы — 0—20°. Водоросли и фотосинтезирующие бактерии инкубируют в термостатах с искусственным освещением — люминостатах.

Аэробные микроорганизмы культивируют на поверхности питательных сред в чашках Петри, в колбах и матрасах или в глубине жидких сред, снабжая последние необходимым для микробов количеством кислорода путем встряхивания или перемешивания культур на качалках или пропускания струи стерильного воздуха через толщу среды.

Для получения больших количеств биомассы или культуральной жидкости микроорганизмов используют специальные аппараты — ферментеры, оборудованные для перемешивания среды, подачи и распределения воздуха, а также имеющие контрольно-измерительные приборы, регистрирующие температуру, давление, концентрацию субстрата и продуктов обмена, скорость тока воздуха, ОВП, pH среды.

При культивировании анаэробов из среды и окружающего пространства удаляют кислород. Для этого перед использованием среду кипятят. После высева среду заливают слоем масла или вазелина. Плотную питательную среду заливают слоем полужидкого агара (0,1%). К средам добавляют редуцирующие вещества — тиогликолят натрия, редуцирующие сахара, восстановленное железо. Для инкубирования в анаэробных условиях чашек Петри, засеянных

анаэробными микроорганизмами, используют специальные сосуды - вакуумные эксикаторы, из которых откачивают воздух, пока давление не упадет до 500 мм рт.ст., и заполняют эксикатор инертным газом, например азотом, водородом или их смесью с примесью 5-10% CO₂; анаэростаты, из которых откачивают воздух и заполняют водородом; сосуды с генераторами H₂+CO₂.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ

Почвенные водоросли.

Жизнь почвенных водорослей постоянно связана с почвой. Среди почвенных водорослей различают наземные формы, разрастающихся при благоприятных условиях на поверхности почвы в виде корочек или пленок; водно-наземные, живущие в водной среде постоянно влажных почв; собственно почвенные, обитающие в толще почвенного слоя.

Последняя группировка водорослей - собственно почвенные - из всех вневодных водорослевых ценозов, имеет наибольшее значение, составляет эдафофильные ценозы, непосредственно связанные с почвой, играет особую роль в биосфере.

В основе методов изучения почвенных водорослей лежат принципы фитоценологических исследований и почвенно-микробиологических анализов.

Исследование почвенных водорослей начинается с наблюдений в природе. На выбранном для отбора почвенных образцов участке прежде всего осматривают поверхность почвы, отмечая наличие или отсутствие водорослевых разрастаний, заметных невооруженным глазом. Учет количества водорослей в поверхностных разрастаниях ведут на площадь. Например, колонии *Nostoc commune* собирают с 1 м² или с 1 дм² и определяют их массу.

Прямое микроскопирование почвенного образца. Непосредственный просмотр небольшой порции почвы под микроскопом в препарате в капле воды (препарат "раздавленная капля") дает представление о доминирующих формах водорослей в почве. Таким путем обнаруживаются водоросли, образующие

макроскопически заметные талломы (*Nostoc commune*, *N. flagelliforme*) или массовые разрастания на поверхности почвы. Однако для большинства видов эти препараты не дают представления обо всем многообразии содержащихся в почве форм.

Культуральные методы исследования состава почвенных водорослей. Наиболее простым методом для выявления состава почвенных водорослей является метод "стекло обростания". Исследуемую почву помещают в стерильную чашку Петри, увлажняют до 60 % от полевой влагоемкости и раскладывают на ее поверхность покровные стекла (4-8 стекол на чашку). Между стеклом и почвой должны оставаться небольшие свободные пространства, где на 4-5 день инкубации на свету начинается обильное развитие водорослей. Покровное стекло снимают с поверхности почвы, очищают от крупных частиц почвы и помещают на предметное стекло в каплю воды. При микроскопировании в оптическом микроскопе наблюдают развитие диатомовых водорослей и тех видов зеленых, синезеленых и желтозеленых водорослей, которые доминируют в исследуемой почве.

Для приготовления **водных** и **агаровых культур** водорослей используют минеральные среды: среда Беннета в модификации Голлербаха (г/л): NaNO_3 – 0,21; KH_2PO_4 – 0,25; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,15; CaCl_2 – 0,05; NaCl – 0,05; FeCl_3 – следы и другие минеральные среды. Для выделения культур водорослей из почвы можно использовать почвенную вытяжку без добавления минеральных солей. В агаровые среды добавляют агар (2%).

В случае использования водных культур колбы (на 100-250 мл) засевают комочками почвы и начинают просмотр культур в микроскопе после 2-3 недель инкубации на свету. В случае использования агаровых культур почву наносят на поверхность агаровой среды в виде почвенного мелкозема. На агаре хорошо разрастаются диатомовые, зеленые и синезеленые водоросли, в том числе спорообразующие формы (рис. 2, 3, 4).

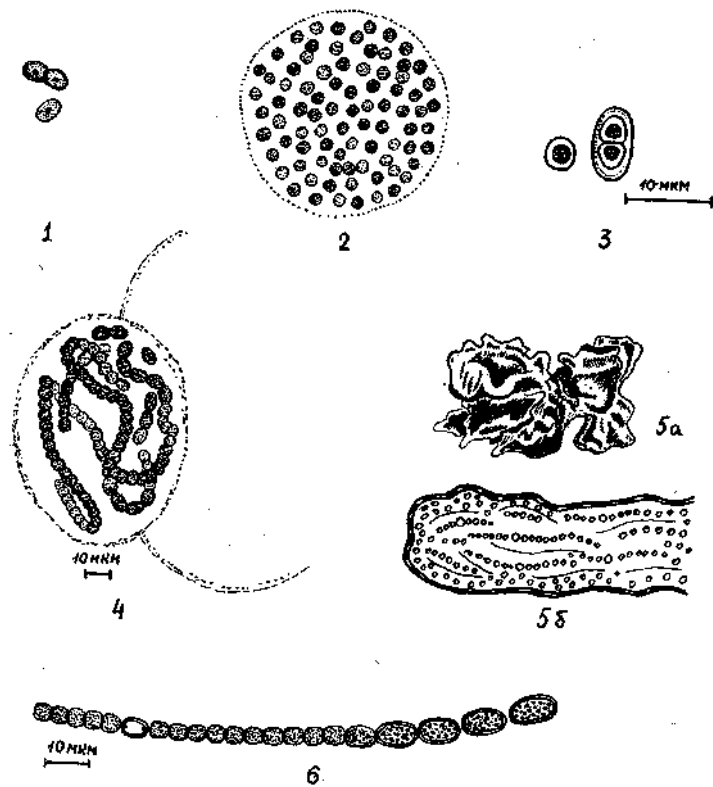


Рис. 2. Синезеленые водоросли (цианобактерии). 1- *Synechococcus* sp.; 2 – *Microcystis* sp.; 3 – *Gloeocapsa minuta*.; 4 – *Nostoc* sp.; 5 – *Nostoc commune*; а – макроскопическое изображение, б- микроскопический разрез; 6 – *Anabaena variabilis*

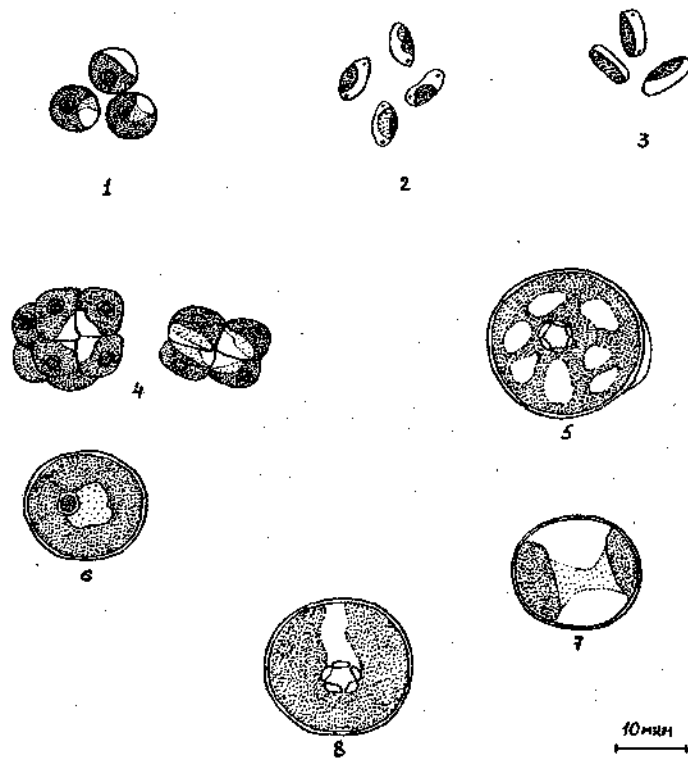


Рис. 3. Зеленые водоросли: 1 – *Chlorella vulgaris*; 2 – *Cocomyxa* sp.; 3 – *Chlorocystis* sp.; 4 – *Chlorosarcinopsis minor*; 5 – *Spongiochloris* sp.; 6 – *Chlorococcum* sp.; 7 – *Myrmecia* sp.; 8 - *Neochloris* sp.

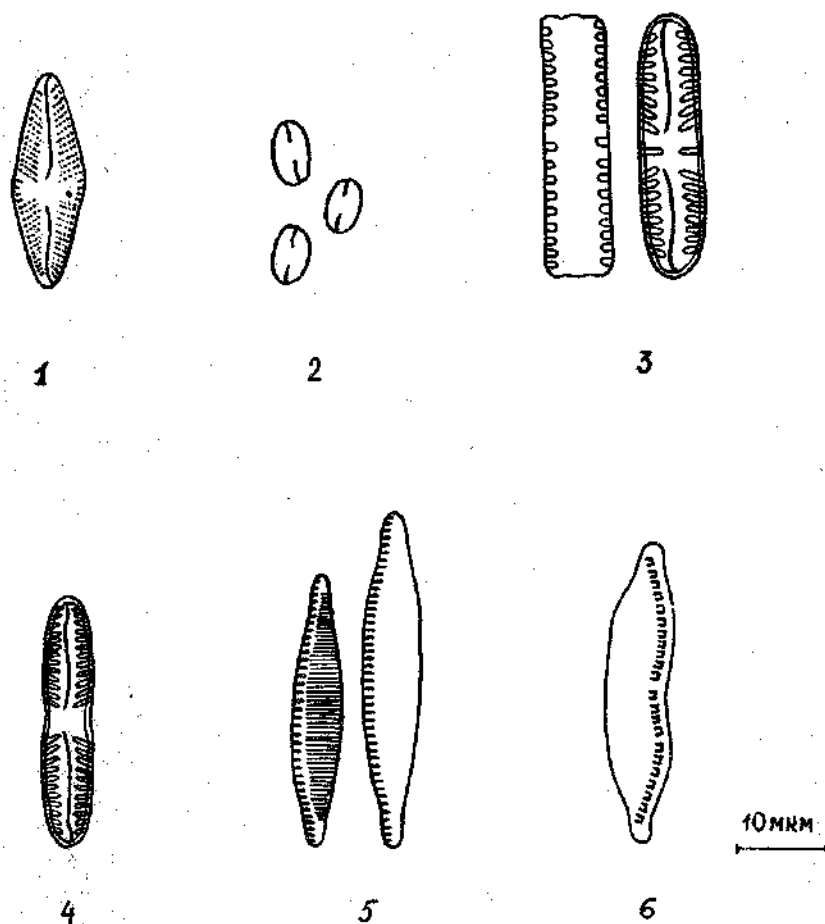


Рис. 4. Диатомовые водоросли: 1 – *Navicula mutica*; 2 – *N. pelliculosa*; 3 – *Pinnularia borealis*; 4 – *P. intermedia*; 5 – *Nitzschia palea*; 6 – *Nitzschia amphioxys*.

Разные виды культур имеют свои достоинства и недостатки. Водные культуры, хорошо выявляя общий состав обитающих в почве водорослей, могут дать неправильное представление о количественных соотношениях между видами и о доминирующих формах. Коррективы в эти представления могут внести культуры на "стеклах обрастания", выявляющие массовые и жизнедеятельные формы. Вокруг частичек мелкозема в агаровых культурах разрастается немного видов, часто один вид, что способствует выделению альгологически чистых культур водорослей. Инкубацию на свету проводят в люминостахах.

Методы количественного учета почвенных водорослей. Для прямого учета микроскопических водорослей среди почвенных частиц чаще всего используют метод Виноградского в модификации Э.А.Штиной (Зенова, Штина,1990), состоящий в следующем. Навеску почвы (1 г) растирают в ступке резиновым наконечником с небольшим количеством воды. Если свежая почва была фиксирована формалином для сохранения в ней водорослей при последующем подсчете клеток, то почву растирают в формалине. Добавляют воду, доводя объем суспензии до 4 мл, и тщательно взбалтывают 2 мин. После 30 сек отстаивания надосадочную жидкость сливают. Процедуру повторяют три раза. Затем надосадочную жидкость центрифугируют (500 g/мин 1 мин). Каплю суспензии наносят на предметное стекло, закрывают покровным (препарат "раздавленная капля") и микроскопируют в оптическом микроскопе. Просчитывают водоросли не во всей капле, а только в части ее, просматривая, например, каждую вторую или пятую полосы, равные по ширине диаметру поля зрения. При учете клеток в оптическом микроскопе разделяют водоросли по систематическим группа, отмечая число синезеленых (цианобактерий); зеленых и желтозеленых (вместе), диатомовых. При наличии многоклеточных форм отмечают число особей и число клеток.

При **люминесцентном методе** учета клеток водорослей для приготовления препаратов (Кожевин, 1989) почвенную суспензию обрабатывают на ультразвуковом дезинтеграторе (2 кГц, 44А, 2 мин), наносят на обезжиренное предметное стекло (0,01 мл на препарат) и равномерно распределяют по площади квадрата 4 см². На каждом стекле делают по 3 препарата. Препараты высушивают на воздухе при комнатной температуре, фиксируют легким нагреванием и микроскопируют в люминесцентном микроскопе. Число водорослей в 1 г почвы рассчитывают по формуле:

$$N = \frac{a \cdot n \cdot S}{p}$$

где *a* – среднее число клеток в поле зрения; *p* – площадь поля зрения (мкм²); *n* – показатель разведения; *S* – площадь мазка.

Нельзя использовать для счета в люминесцентном микроскопе пробы, зафиксированные формалином, так как формалин "гасит" естественную флуоресценцию клеток водорослей.

После определения числа клеток определяют **биомассу** водорослей, исходя из объема клеток и принимая удельный вес клеток за единицу. Измеряют диаметр клеток и длину нитей в случае нитчатых форм. Биомассу можно определять методом взвешивания поверхностных разрастаний или функциональными методами по содержанию хлорофилла, по скорости фотоассимиляции CO_2 , но они менее надежны.

Почвенные беспозвоночные животные

Для учета представителей почвенных беспозвоночных животных в поле или в лесу используется **метод выборки животных из почвы**. Простой способ выборки – метод почвенных раскопок. Размер выбираемой пробной площадки зависит от степени увлажненности почвы, чаще всего $0,25 \text{ м}^2$, в сухих районах до $1 - 2 \text{ м}^2$. Расстояние между раскопками, которых может быть несколько – $5 - 10 \text{ м}$. Раскопки делают на глубину $30 - 50 \text{ см}$, в сухих местах на легких почвах – до 100 см и более.

Почву из раскопки выбирают послойно. От границ отмеренной площадки отгребают опад или подстилку (если площадка в лесу) или сухую землю поверхностного слоя (на пару). Рядом с площадкой помещают клеенку или плотную материю, на которую выкладывают выбранную из раскопкой почву. Каждый вынутый слой почвы, в том числе и слои подстилки, тщательно вручную перебирают, собирая животных отдельно из каждой пробы и слоя. Дождевых червей и моллюсков помещают в мешочки или банки с почвой. Хищников помещают поодиночке. Мелких насекомых, многоножек, мокриц помещают в пробирки с 70^0 -ным спиртом с добавлением нескольких капель глицерина и формалина, крупных насекомых – в морилки или сосуды со спиртом. Собранный и зафиксированный материал подлежит систематической обработке для определения видовой принадлежности. В зоологической

литературе имеются специальные определители, которыми пользуются для идентификации.

Для учета мелких членистоногих пробы можно брать на свежезачищенной стенке траншеи или почвенного разреза методом смешанных образцов. В этом случае исследуется погонный метр траншеи, разделенный на 5 колонок. В каждой из колонок из середины почвенных горизонтов берут мелким буром по 5 точечных образцов, объединяемых затем в одну смешанную пробу объемом 150 см³ (объем бура 30 см³). Численность микроартропод выражают числом экземпляров особей в слое или в 1 г почвы.

Для учета личинок насекомых (хрущей, щелкунов, крупных видов долгоносиков и мух) используют сельскохозяйственную **обработку почвы плугом**. Личинки собирают в борозде и учитывают. Количество животных за плугом пересчитывают на каждый погонный метр.

Для учета проволочников используют **метод приманок** – животных улавливают на приманки из ломтей картофеля, натыкаемых на палочки и закапываемых в почву на глубину около 5 см на расстоянии 50 – 100 см друг от друга. Для учета гусениц на полях пропашных культур и на парах раскладывают кучки выполотых сорняков или скошенной травы, служащие приманками. Под каждой такой кучкой в местах с высокой плотностью залегания этих вредителей скапливается иногда до нескольких десятков особей. Проверку и подсчет гусениц проводят в ранние часы на следующее утро после раскладки.

Для учета дождевых червей в почве кроме метода выборки используют также **метод полива поверхности почвы раздражающими покровами червей жидкостями**, заставляющими червей выходить на поверхность. Используют 0,14-0,5% раствор формалина.

Для учета мезофауны используют также стандартный **метод ловчих линий**. Эта методика широко применяется для сбора насекомых – журуелиц, жуков. Выставляют двумя параллельными рядами линии ловушек Барбера (5-10 ловушек в линии с расстоянием между ловушками до 10 м). В качестве

ловушек используют стеклянные банки на 0,5 л с 4% формалином. для защиты от дождевой воды над ловушками на высоте 4-5 см устанавливают крышки из пластмассы размером 14x14 см. На дно банок помещают немного почвы. Ловушки ставят на 10 суток. Выбор насекомых выражают в единицах динамической плотности – уловистостью на 10 ловушек/ суток. Доминантными считаются виды, численность которых составляет более 5%, субдоминантными - 2-5 % от общего числа собранных особей.

Для учета энхитреид используют **методы, основанные на принципе создания температурного градиента.** Осуществляют эти методы следующим способом. На носик воронки надевают резиновую трубку с зажимом, под которую подставляют сосуд. В воронку наливают доверху воду, а в верхней части воронки укрепляют сито, на котором распределяют пробу почвы так, чтобы почва оказалась погруженной в воду. Над пробой включают 60-ваттную электрическую лампочку. При нагреве пробы энхитреиды мигрируют вниз и, проползая сквозь ячейки сита, тонут в воде, накапливаясь в носике воронки и в резиновой трубке. После 3 ч выгонки открывают зажим и черви со струйкой воды попадают в поставленный сосуд, после чего их легко подсчитать

Для учета мелких почвенных членистоногих в почвенных пробах используют **методы "автоматической выборки"** – эклекторные методы. Они основаны на одной общей для всех обитателей почвы особенности – отрицательном фототаксисе почвенных обитателей и избегании ими подсыхающего почвенного слоя. Пробу почвы (5-1000 см³) помещают на сито, вставленное в воронку несколько большего, чем сито, диаметра. Под горлышко воронки подставляют сосуд с фиксирующей жидкостью – 70⁰-ным спиртом или 2%-ным формалином. При подсыхании пробы почвы, идущем интенсивнее сверху, мелкие членистоногие пытаются уйти глубже. Переваливаясь сквозь ячейки сита, они попадают в сосуд с фиксирующей жидкостью, где их подсчитывают. Поверхность почвенной пробы можно нагревать лампочкой 40 Вт (нужно следить, чтобы температура на поверхности почвы не поднималась выше 35-40⁰). Приборы, используемые в этом методе, называют

фототермоэлектрорами или электрорами Тульгрена. В лаборатории используют электрорные установки, состоящие из серии воронок, сит с почвой и лампочек.

Для учета нематод (см. Приложение) в почве применяют метод с **"воронкой Бермана"**. Воронку вставляют носиком в пробирку, затем всю установку помещают в сосуд с водой так, чтобы воронка была почти доверху наполнена водой. В воронку на сите помещают пробу почвы (1см³ или 1г) так, чтобы почва оказалась погруженной в воду. Нематоды проползают через ячейки сита и скатываются в пробирку. Подсчет животных проводят через сутки на часовом стекле или в специальной камере.

Для выявления и учета почвенных простейших используют метод **проращивания почвенного мелкозема на агаризованных покровных стеклах во влажных камерах** (Бабьева, Зенова, 1989).

Водную вытяжку из почвы (1 кг почвы, 1 л воды) кипятят 1 ч, отстаивают сутки, фильтруют, в полученный фильтрат добавляют 1% агара, очищают яичным белком и наносят тонким слоем на обезжиренные покровные стекла, которые затем раскладывают на влажную фильтровальную бумагу в чашки Петри. Почву размельчают и просеивают через сито 0,25 мм, почвенный мелкозем через трубку, один конец которой закрыт сеткой, равномерно высевают на поверхность агара на стекле. Чашки инкубируют при 20-24⁰ в течение 7-10 дней. На стеклах наблюдают за развитием и активным движением простейших *in situ*, выделяют животных в чистую культуру.

Стекла можно окрашивать. Приготовление окрашенных препаратов проводят, помещая стекла в пары 1%-ной осмиевой кислоты или в жидкость Шаудина, а затем окрашивая их молибденовым гематоксилином. Опыт проводят в 10-кратной повторности. Учитывая площадь стекла, поля зрения микроскопа и вес почвенного мелкозема, вычисляют количество протистов в 1 г почвы. Особенно хорошо этим методом учитываются амёбы.

Для количественного учета активно двигающихся инфузорий, жгутиконосцев и амёб используют метод предельных разведений навески почвы жидкой питательной средой с математической обработкой полученных

данных по таблице Мак-Креди (Гельцер, 1986; Бабьева, Зенова, 1989). Навеску почву в 10 г увлажняют до пастеобразного состояния, растирают в фарфоровой ступке резиновым напалечником 5 мин и готовят ряд последовательных 10-кратных разведений навески почвы жидкой средой (сенной отвар с почвенной вытяжкой 1:1) не менее чем в двукратной повторности. Через 10 суток рассчитывают число пробирок, в которых размножились простейшие. На основании полученных результатов составляют числовую хаоактеристику, состоящую из трех цифр. На первом месте отмечают число пробирок того разведения, где во всех повторностях развилась культура простейших. Следующие две цифры обозначают пробирки с развившейся культурой из двух последовательных разведений. Предположим, что найденная числовая характеристика – 210. По таблицам Мак-Креди находим вероятное число, соответствующее 210. Это число – 6,0. Если при составлении числовой характеристики за начало ее было взято разведение 1:100, то количество простейших в 1 г почвы равно $6,0 \times 100 = 600$.

Для учета раковинных амёб используют **микроскопирование водной суспензии почвы**. Метод состоит в следующем (Гельцер и др., 1985). Суспензия, приготовленная из 100-200 мг субстрата и 20-25 мл воды, остается на несколько часов для размокания почвенных частиц. Затем суспензию взбалтывают в течение 10 мин и сливают в чашку Петри, дно которой расчерчено на квадраты по 1 см². Крупные комочки почвы разрушают с помощью препаровальной иглы, мелкозем распределяют по дну чашки тонким слоем. Взвесь просматривают под микроскопом при малом (объектив 8х) и большом (объектив 40х) увеличении. Число раковинок подсчитывают в 14 квадратах, расположенных крестообразно по диагонали чашки. Общее количество амёб (М) в навеске определяют по формуле:

$$M = \frac{N}{14} \cdot S$$

где N – число раковинок в 14 квадратах, S – площадь дна чашки.

Используя окраску карболовым эритрозинем, можно разделять живые тестаии (окрашиваются в интенсивно малиновый цвет) и пустые раковинки (в розовый цвет).

Существуют и другие методы учета раковинных амев более сложные в исполнении (Гельцер и др., 1985).

Наблюдение за почвенными беспозвоночными животными осуществляют, используя фиксированные препараты, под бинокулярной лупой или в оптическом микроскопе при малом увеличении (рис. 5,6,7)

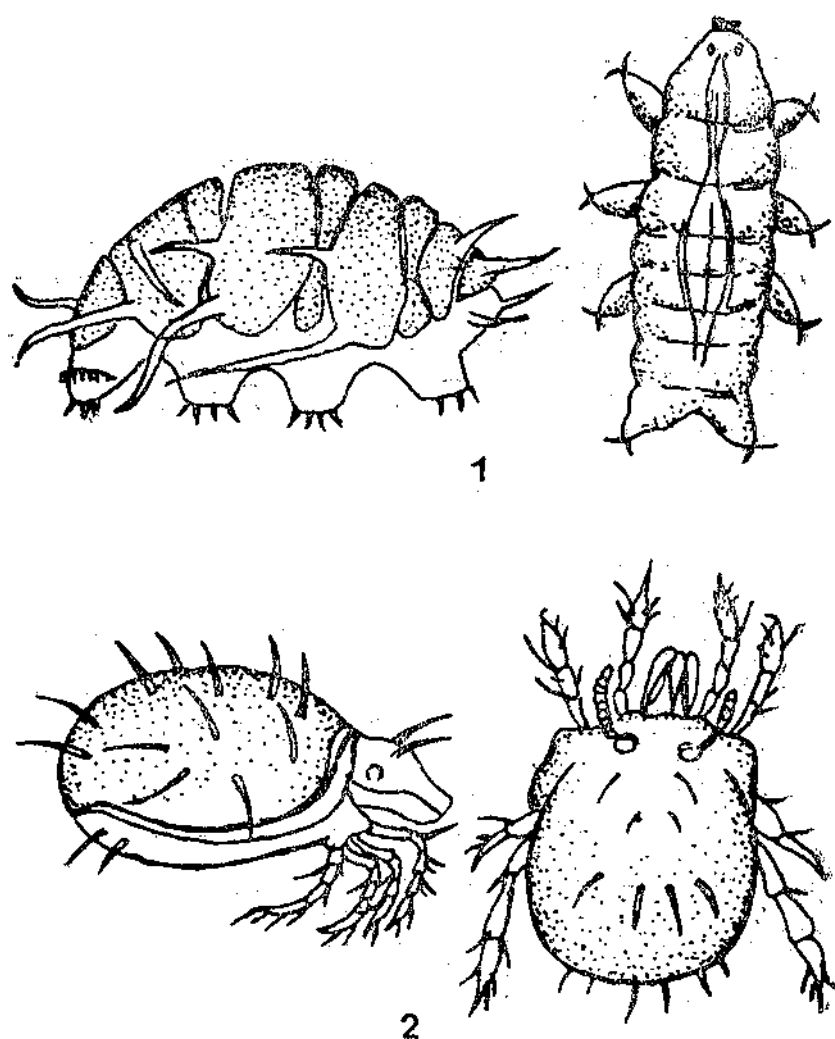


Рис. 5. Тихоходки (1) и панцирные клещи (2).

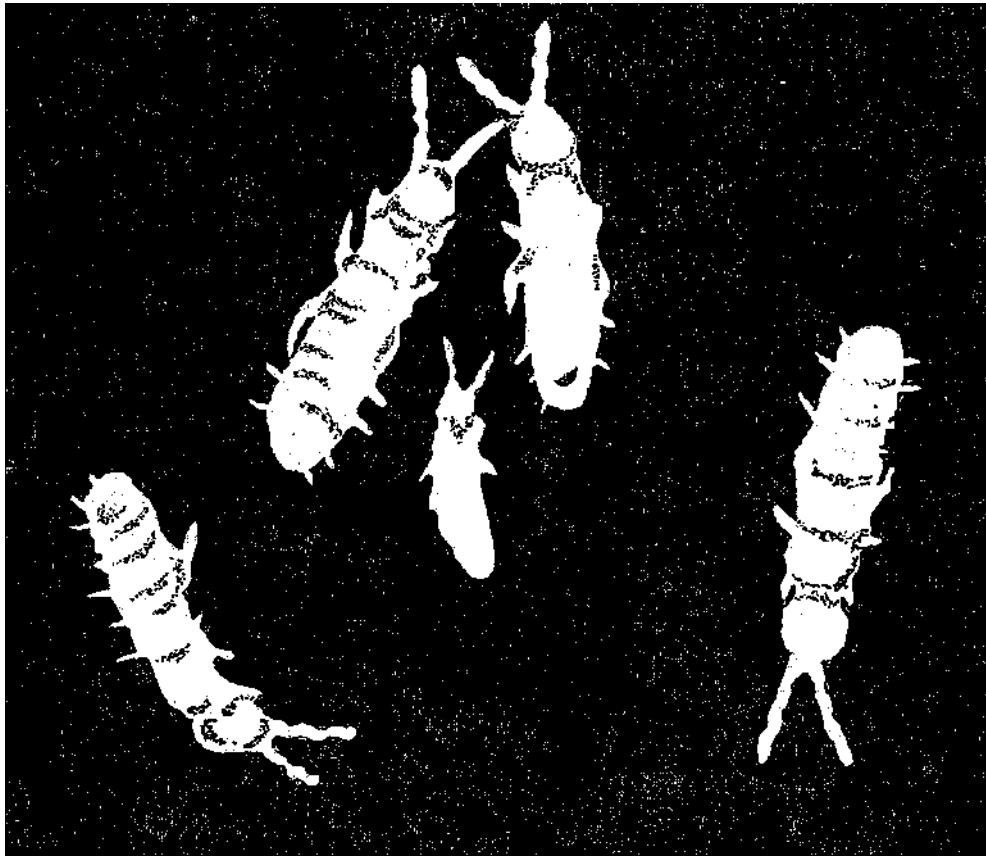


Рис. 6. Ногохвртки – коллемболы.

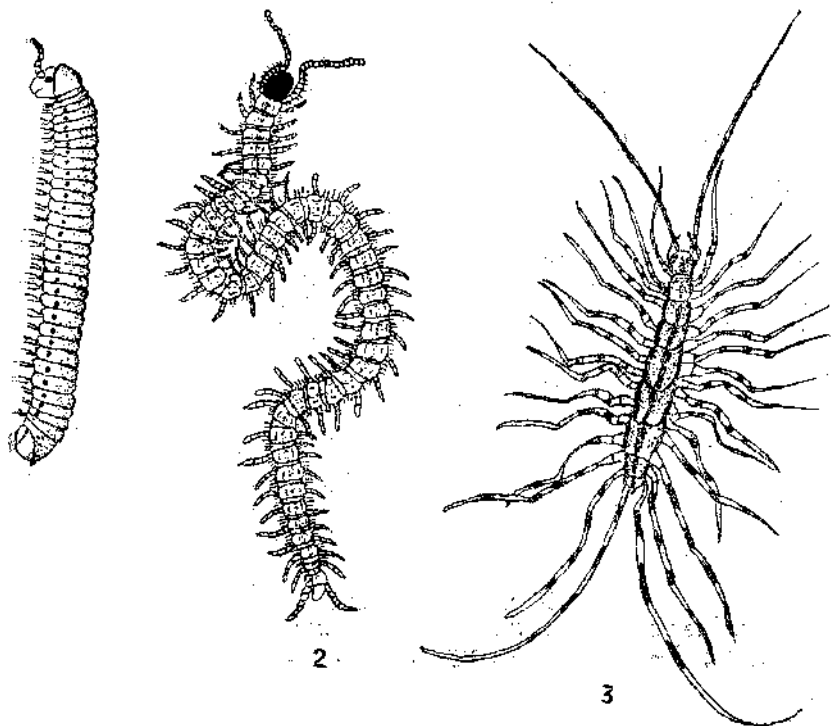


Рис. 7 Многоножки: 1 – кивсяк, 2 – геофил, 3 – мухоловка..

Почвенные грибы

При выявлении и учете почвенных микромицетов из почвы **методом посева из разведений почвенных суспензий на плотные питательные среды** наиболее часто используют подкисленные молочной кислотой (4 мл/л) сусло – агар и синтетические среды с простыми углеводами, например, среду Чапека следующего состава (г/л): сахара - 20,0; NaNO_3 - 2,0; KH_2PO_4 - 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; KCl - 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,01; агар - 20,0. Кислая реакция среды подавляет развитие бактерий.

При выделении грибов, не развивающихся на кислых средах, для подавления бактерий используют бенгальский розовый, кристаллический фиолетовый, малахитовый зеленый. Применяют также комбинации из красителей и антибиотиков. Например, используют бенгальский розовый со стрептомицином (50-70 мг/л). Для селективного выделения грибов из почвы применяют следующие антибиотики: хлоромицетин (5 мг/л), неомицин (50-100 мг/л), полимиксин (50 мг/л), пенициллин (50 мг/л), эндомицин (5-10 мг/л).

Для выделения микромицетов, быстро усваивающих легкодоступные углеводы, используют сусло-агар, среду Чапека, среду Мартина и др. Грибы, не выдерживающие конкуренции за моносахара при высоких концентрациях последних, выделяют на "голодные" среды – водный агар, агар с почвенной вытяжкой, агар с разведенным в 8-10 раз суслом. На этих средах микромицеты развиваются медленно, образуют мелкие колонии.

При выделении микромицетов, разлагающих целлюлозу, лигнин, гумусовые вещества и др., источник углерода добавляют к синтетической минеральной среде или помещают на почву (метод приманок).

При учете почвенных грибов методом посева для десорбирования мицелия и спор с поверхности почвенных частиц не пользуются ультразвуком из-за того, что крупные клетки грибов больше повреждаются ультразвуком, чем клетки бактерий. Используют пропеллерную мешалку (микроизмельчитель тканей РТ-2 (5 мин при 5000 об/мин) или растирание почвы, увлажненной до пастообразного состояния.

Засеянные почвенной суспензией чашки просматривают, начиная с 3-5 сут. Окончательный учет производят на 6-10-ый день на средах с целлюлозой, с лигнином – через 2-3 недели, на голодном и почвенном агаре – через 3-4 недели.

Для дифференцированного учета спор и мицелия применяют **метод мембранных фильтров**. В колбу вносят навеску почвы 1г и доливают водой до 100 мл. Для полной десорбции микроорганизмов в суспензию добавляют поверхностно-активное вещество Твин-60. Суспензию обрабатывают на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1 (22 кГц, 0,44 А, 2 мин), вносят в нее смесь $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и MgCO_3 для коагуляции почвенных частиц, взбалтывают 2 мин, переносят в мерный цилиндр на 100 мл. После 5-минутного отстаивания 5 мл суспензии профильтровывают через мембранный фильтр. Мембранные фильтры (диаметр пор 0,4 мкм) предварительно выдерживают сутки в 0,5%-ном растворе диазинового зеленого для тушения собственной люминесценции, отмывают в воде, высушивают. После фильтрации мембранные фильтры высушивают, окрашивают в 0,001%-ным раствором калкофлора 1—2 мин, снова высушивают и просматривают под люминесцентным микроскопом Люмам И-3 (объектив 90х). Споры и гифы грибов имеют ярко-зеленое свечение.

Количественный учет грибов в почве и расчет их биомассы производят с помощью **люминесцентного микроскопа** (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991).

Методы наблюдения за почвенными грибами в чистых культурах. Культуральные признаки грибов описывают на плотных питательных средах в чашках Петри. Используют сусло-агар и синтетические среды. За культурой наблюдают в течение нескольких дней и даже двух недель с интервалом 3—4 дня. При описании культуральных признаков грибов отмечают скорость роста колоний (быстро растущие или медленно растущие), внешний вид колонии, текстуру колонии (бархатистая, пушистая, шерстистая, шероховатая, войлочная), окраску колонии, окраску субстратного и воздушного мицелия,

диффузию пигмента в агар, окраску окружающей среды. Отмечают складчатость колонии, наличие эксудата, его цвет, запах культуры.

Для характеристики морфологических признаков культуры грибов сначала просматривают на чашках при малом увеличении микроскопа, а затем готовят микроскопический препарат.

Для наблюдения за репродуктивными органами (рис. 8) из колонии вырезают блоки с помощью пробочного сверла, после их изъятия на чашках остаются лунки, через 1—2 дня лунка зарастает мицелием, который можно наблюдать под оптическим микроскопом. Спороношение наблюдают в сканирующем электронном микроскопе (см. Приложение).

Развитие мицелия и спорогенез можно наблюдать на агаризованных стеклах. Стерильной расплавленной средой покрывают предметные стекла и помещают в чашку Петри и на П-образную стеклянную подставку. Посев гриба производят штрихом по длинной стороне стекла. Штрихи покрывают стерильными покровными стеклами так, чтобы под ними не оставалось пузырьков воздуха и часть штриха была свободной. Во избежание пересыхания агара в чашку наливают на дно стерильную воду. Через 6 - 8 дней инкубации при 25° стекла вынимают и, очистив нижнюю сторону от агара, микроскопируют. Мицелий со спороношениями удобно рассматривать, приготовив препарат следующим образом: небольшой кусочек питательной среды помещают на стерильное предметное стекло, инфицируют грибной культурой, покрывают покровным стеклом и инкубируют 2—3 суток; затем снимают покровное стекло, кладут его на предметное, закрывают новым покровным стеклом и микроскопируют.

Для изготовления микроскопического препарата препаративными иглами вырезают небольшой участок колонии, помещают в каплю воды и закрывают покровным стеклом. К воде добавляют этиловый спирт 1:1 или концентрированную уксусную кислоту, поскольку споры грибов не смачиваются водой. Для приготовления микроскопических препаратов грибов используют специальную жидкость следующего состава: карболовая кислота

кристаллическая — 20 г, глицерин — 40 мл, дистиллированная вода — 20 мл.

Для прижизненной окраски грибов используют как основные (генциановый фиолетовый, метиленовый синий, сафранин, нейтральный красный, метиленовый фиолетовый), так и кислые (эри-трозин) краски в концентрации 1:500, 1:1000, 1:10000.

Диагностика и идентификация грибов проводятся на основании строения и способов формирования репродуктивных органов, имеют значение морфологические и культуральные признаки. Для некоторых представителей требуется проследить весь цикл развития организма. Принадлежность к классу и роду устанавливают по Атласу родов почвенных грибов. Видовая идентификация проводится по специальным определителям для отдельных родов.

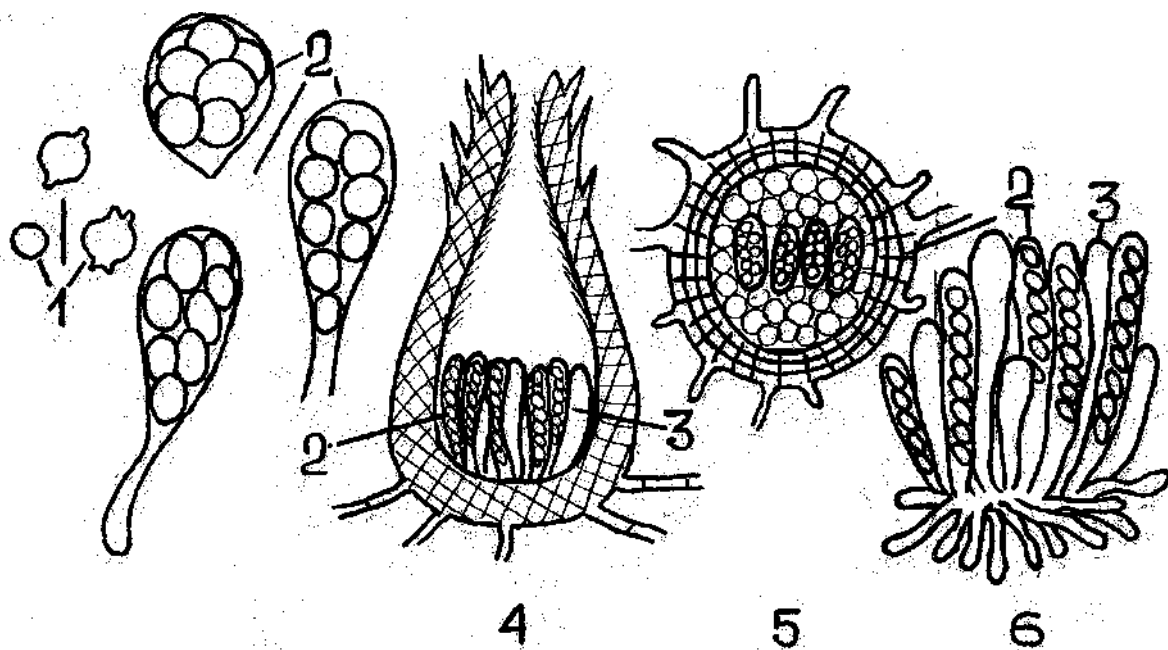


Рис. 8. Органы полового размножения у сумчатых грибов: 1 – аскоспоры, 2 – сумки со спорами, 3- стерильные гифы, 4,5,6 – плодовые тела: 4 – перитеции, 5 – клейстотеции, 6 – апотеции (Зенова, Кураков, 1988).

Почвенные дрожжи

Методы выявления и учета почвенных дрожжей. Наиболее широко используемой средой для выделения дрожжей является солодовое сусло. Из синтетических сред используются агар Сабуро, называемый также глюкозо-пептонной средой (г/л): глюкоза - 40; пептон - 10; агар - 20 и глюкозо-аммонийная среда (г/л): глюкоза - 20; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 5; KH_2PO_4 - 1,95; K_2HPO_4 - 0,15; MgSO_4 - 0,5; NaCl - 0,1; CaCl_2 - 0,1; агар — 20. Для обогащения факторами роста к этим средам добавляют иногда дрожжевой (0,2%) и мясной (0,3%) экстракты и виноградный сок (3%).

Для подавления роста бактерий и актиномицетов среды для выделения дрожжей подкисляют до pH 4,5 путем добавления минеральных или органических кислот. Для синтетических сред используется соляная кислота, для сусловых — молочная, лимонная или винная. Для подкисления заводского солодового сусла (6—8% СВ) обычно требуется 3—4 мл/л концентрированной молочной кислоты. Кислоты добавляют в жидкую или расплавленную агаризованную среду после стерилизации непосредственно перед засевом или перед разливкой в чашки Петри. Если использовать 3% агара, то среда застывает даже при pH 4,8.

Используют антибиотики широкого спектра действия: стрептомицин (80 мг/л или 100 ед/мл), пенициллин (20—100 ед/мл), левомицетин (50 мг/л). Их добавляют в среду порознь и в комплексе, как и при работе с грибами.

Для ограничения роста грибов в среду добавляют специфические вещества: дифенил (0,5—0,01%), бычью желчь (0,25—0,5%), теллурид калия (0,05—0,15%), пропионат натрия (0,15—0,25%) или некоторые красители: бром-крезоловый пурпурный (0,0025%-ный или 2,5 мл/л 1%-ного раствора), бенгальский розовый (0,003%-ный), кристаллический фиолетовый (0,001%-ный).

При выделении мезофильных дрожжей инкубацию производят при 20—26—28°, при выделении психрофильных форм — при 5°. Сроки инкубации

зависят от температуры. При 28° — 4—5 дней, при 5° — не менее 14 суток. В посевах из почвы, инкубируемых при низких температурах, удается учесть в 2—3 раза больше дрожжей, чем при 28°, так как росту дрожжевых колоний при этом не мешают грибы. Учет опытов производят через две недели или месяц.

Дрожжи рода *Lipomyces* выделяют и учитывают в почве методом посева почвенных комочков на безазотистую среду Эшби с сахарозой. Дрожжевые колонии в виде слизистых молочнобелых обрастаний появляются вокруг комочков почвы через 15— 20 суток (рис. 9)

Методы наблюдения за чистыми культурами дрожжей. Для описания культуральных признаков дрожжей используют сусло-агар и глюкозо-пептонный агар с дрожжевым автолизатом (0,5%). При описании колоний дрожжей отмечают размер колонии, ее цвет, консистенцию. Можно описывать не колонии, а рост по штриху. Посев производят прямым штрихом в пробирке со скошенным агаром. Описывают характер роста через 6—8 суток инкубации при 25°, а в случаях медленно растущих форм описание делают через 8 суток и через 6 недель его повторяют. Длительное выращивание производят при комнатной температуре (20°). При описании роста дрожжей в жидких средах в пробирках отмечают помутнение среды, образование кольца или пленки.

Форму и размер клеток описывают в культурах разного возраста на плотных и жидких средах (см. Приложение). Первый просмотр и измерение клеток производят после 2—3-суточного инкубирования при 25—28°. Если дрожжи растут медленно или не дают роста при температуре выше 20°, то первое описание делают через 2—3 недели инкубации. Во всех случаях культуры после первого просмотра оставляют при комнатной температуре (17—18°) и еще раз описывают через 4 недели.

Наблюдение за строением и размножением дрожжей с помощью светооптического микроскопа проводят на живых культурах. Капсулы выявляют в препарате с жидкой тушью, т. е. методом негативного контрастирования. Псевдомицелий наблюдают на агаровых пластинках (предметное стекло, покрытое пленкой агаризованной среды). Споры у дрожжей наблюдают в живых препаратах при больших увеличениях оптического микроскопа и с использованием электронного микроскопа (рис.10)



Рис. 9. Колонии липомицетов вокруг комочков почвы на среде Эшби

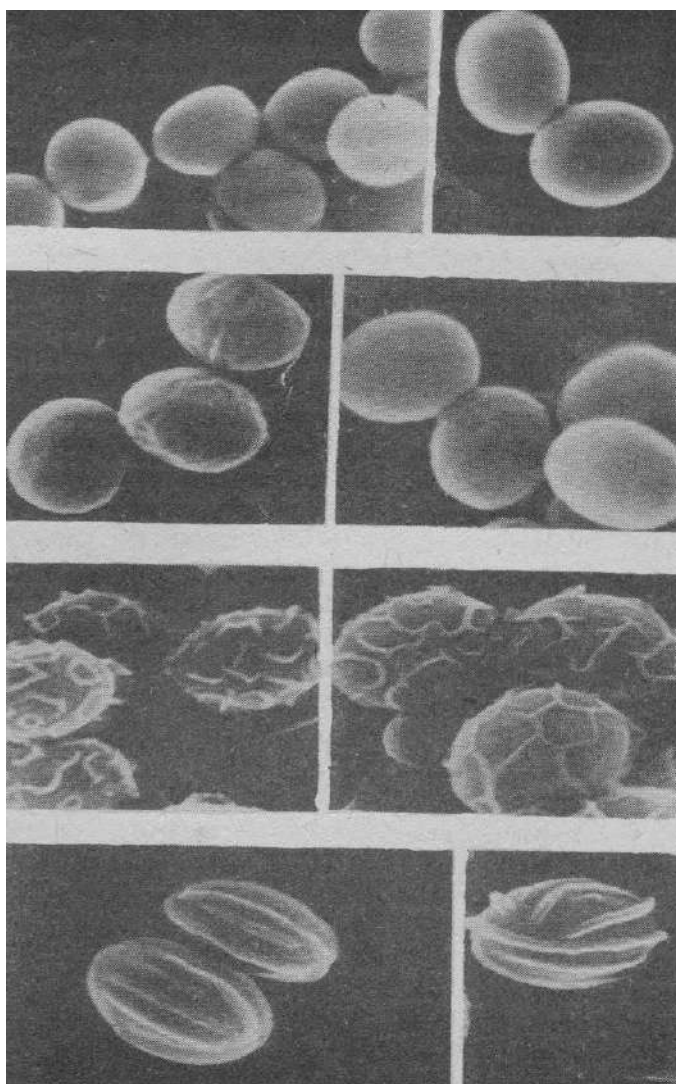


Рис. 10 Споры липомицетов в сканирующем электронном микроскопе (x10000).

Для идентификации дрожжей кроме морфологических признаков используют показатели физиологической активности: способность к брожению, ассимиляцию разных источников углерода, рост на нитрате и др. (Бабьева, Голубев, 1979).

Бактерии

Методы обнаружения и количественного учета бактерий в почве.

Возможность биологических методов учета почвенных бактерий ограничена в том смысле, что нельзя предложить среды, обеспечивающей рост всех почвенных бактерий. В зависимости от целей исследования для учета бактерий употребляются различные питательные среды. К таким средам относятся мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА) (МПБ разводится в 10 раз), МПА пополам с суслом, МПА с желтком, среда Эшби, среда Гетчинсона, среда следующего состава (Добровольская и др., 1989) (г/л): пептон – 2; глюкоза – 1; дрожжевой экстракт – 1; гидролизат казеина – 1; солодовый экстракт – 1; глицерин – 10 мл. В некоторых случаях необходимо использовать среды, обеспечивающие рост возможно большего количества бактерий, например среды, приготовленные из почвенной вытяжки. Почвенная вытяжка готовится следующим образом: 1 кг хорошо окультуренной почвы заливают 1 л водопроводной воды, автоклавируют, после чего дают отстояться. Жидкость сливают и фильтруют через двойной фильтр, который нейтрализуют до pH 7,2. К 100 мл почвенной вытяжки добавляют 900 мл дистиллированной воды и 15 г агара. Кипятят, разливают по пробиркам или колбам и стерилизуют в автоклаве при 121° в течение 30 мин.

Существуют селективные методы для выделения из почвы отдельных групп почвенных бактерий.

Для преимущественного выделения из почвы грамположительных спорообразующих бактерий проводят пастеризацию почвенных суспензий (прогревание при 80° в течение 10—15 мин), при которой погибают вегетативные клетки и сохраняются споры бактерий. При этом необходимо

помнить, что в почве бациллы находятся как в виде спор, так и в виде вегетативных клеток, и количество бацилл, учитываемое с помощью посева на МПА после пастеризации почвенной суспензии, определяет только количество спор.

Для элиминирования бацилл при учете стрептомицетов, нокардий, коринеподобных бактерий и грамотрицательных бактерий (Добровольская и др. 1989) используют добавление в питательные среды красителя метилового красного (0,015%).

Элиминирование грамотрицательных бактерий в целях селективного выделения коринеподобных бактерий из почв и подстилок может осуществляться путем прогревания почвы перед посевом (80°, 1ч). При выделении коринеподобных бактерий из растительных субстратов — подстилок, филлосферы растений — используют среду следующего состава (г/л): пептон - 10, дрожжевой экстракт-5, гидролизат казеина - 5, мясной экстракт - 2, солодовый экстракт - 5, глицерин - 2, MgSO₄ - 1, Твин-80 (поверхностно-активное вещество) - 0,05, дистиллированная вода - 1 л.

Для выделения грамотрицательных бактерий из почвы используются преимущественно свежие образцы почвы (отобранные в день анализа). Это связано с тем, что упомянутые формы бактерий наиболее чувствительны к высушиванию образца почвы. Выделение грамотрицательных форм (в том числе псевдомонад) из почвы производят путем посева почвенной суспензии на МПА с 2—7%-ным глицерином (Скворцова, 1981) или с применением элективной накопительной культуры.

Количественный учет бактерий можно проводить методом посева из почвенной суспензии на плотные среды. Однако нужно помнить, что чашечный метод дает возможность выделить только одну узкую группу почвенных бактерий. Общее количество бактерий возможно учесть только прямым микроскопированием.

Методы прямого микроскопического учета бактерий в почве. Прямой микроскопический метод подсчета бактерий стал возможен только после того, как Х.Кон и С.Н.Виноградский предложили применять для окрашивания почвенной суспензии кислые краски, которые хорошо окрашивают клетки микроорганизмов и слабо — почвенные частицы. Этот метод позволил установить, что в почве содержится в тысячи раз большее количество микроорганизмов, чем то, которое удастся учесть методом посева почвенных суспензий на агаризованные среды.

Метод Виноградского в модификации Шульгиной состоит в следующем. Среднюю пробу почвы массой 5 г помещают в колбочку объемом 250 мл, содержащую 45 мл стерильной водопроводной воды. Почву перед анализом рекомендуется растереть резиновым пестиком в течение 5 мин. Колбочку энергично встряхивают 5 мин. Суспензию можно обработать ультразвуком или на микроизмельчителе тканей. После 1—2 с отстаивания с помощью пипетки с точно вымеренной величиной капли наносят одну каплю суспензии на поверхность чистого обезжиренного предметного стекла. Нужно следить, чтобы суспензия в пипетке не оседала, для чего все манипуляции проводить быстро и пипетку держать в горизонтальном положении до момента закапывания суспензии. Одновременно с каплей суспензии на стекло наносят одну каплю 0,1%-ного агара, очищенного от микробных клеток. На стекле, куда наносят суспензию, предварительно отмечают прямоугольник площадью 8 см². Нанесенную суспензию равномерно распределяют по поверхности всего прямоугольника. Для опытов используют тщательно очищенные и обезжиренные стекла. Препарат подсушивают и фиксируют в течение нескольких минут 96%-ным спиртом или парами осмиевой кислоты и окрашивают карболовым эритрозинном 1ч. Следят, чтобы в течение окрашивания препараты не высыхали. Краску смывают, погружая стекла в стакан с водой. Препараты высушивают, и с помощью иммерсионного объектива (90х) проводят подсчет клеток. Необходимо приготовить не менее пяти повторных стекол. Количество клеток, просчитанных во всех препаратах

суммируют. Расчет количества клеток (N) в 1 г абсолютно сухой почвы проводят по формуле:

$$N = \frac{A \cdot 8 \cdot 10^9 (P \cdot 100)}{B \cdot B \cdot \Gamma},$$

где A — общее количество учтенных на стекле клеток, B — площадь поля зрения (в мкм^2), вычисленная по формуле πr^2 , B — объем нанесенной суспензии (в мл), Γ — количество просчитанных полей зрения, P — влажность почвы (%).

Один из наиболее простых и удачных методов выявления, изучения и количественного учета микроорганизмов, в том числе и бактерий, — **люминесцентная микроскопия в падающем свете** (Звягинцев, 1987). Почвенную суспензию (1:10) после предварительной обработки на ультразвуковой установке переносят в мерный цилиндр на 100 мл. После двухминутного отстаивания пипеткой отбирают 2 мл суспензии из средней фракции (с отметкой на цилиндре 50 мл) и переносят в колбу с 18 мл воды. Перед приготовлением препаратов колбу энергично встряхивают, суспензию наносят микропипеткой на обезжиренные предметные стекла (0,01 мл на препарат) и равномерно распределяют на площади 4 см^2 (квадрат $2 \times 2 \text{ см}$). Фиксируют нагреванием и окрашивают препарат водным раствором акридинового оранжевого (разведение 1:10000, 2— 4 мин). Для удаления избытка флуорохрома стекла погружают на 10 мин в стакан с водопроводной водой. После высушивания при комнатной температуре препараты просматривают в люминесцентном микроскопе. Для микроскопирования на препарат наносят каплю воды и закрывают обезжиренным покровным стеклом. Из каждого почвенного образца готовят два препарата и в каждом препарате просматривают 20 полей зрения, чтобы данные были математически достоверными. Количество микробных клеток в 1 г почвы вычисляют по формуле:

$$N = \frac{4a \cdot n}{S} \cdot 10^{10},$$

где N — количество клеток в 1 г почвы, a — среднее число клеток в поле зрения, S — площадь поля зрения (мкм^2), n — показатель разведения.

Желательно подобрать разведение таким образом, чтобы среднее число клеток в поле зрения составляло 5—10.

Методы наблюдения за бактериями. Культуральные признаки бактерий обычно описывают на твердых питательных средах (например, МПА, кусочки картофеля, моркови) и в жидких средах (например, МПБ).

Колонии бактерий на твердых питательных средах (рис. 11) описывают, отмечая следующие признаки: размер колонии (колония крупная — > 10 мм в диаметре; средняя — 1—10 мм; мелкая, точечная — 1 мм); профиль колонии (колония выпуклая, конусоидная, плоская, кратерообразная); край колонии (ровный, лопастной, волнистый, зубчатый, бахромчатый, фестончатый); поверхность колонии (гладкая, бугристая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами, радиально исчерченная); цвет колонии; блеск и прозрачность; консистенция (тестообразная, густая, слизистая, тягучая, жидкая, клейкая), вид колонии под микроскопом (зернистая, однородная, исчерченная). Колонии рассматриваются под микроскопом при малом увеличении (x8).

Морфологию живых бактериальных клеток изучают в препаратах "раздавленная капля", микроскопируя их при большом увеличении с иммерсионным объективом (x90). Отмечают размеры клеток, измеряя их окуляр-микрометром, подвижность клеток (используют 12-24 – часовую культуру), форму клеток.

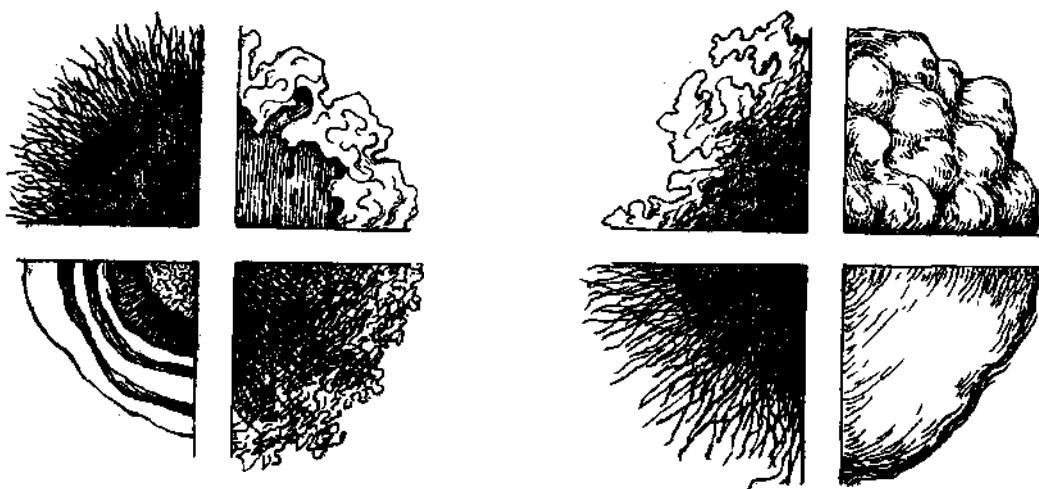


Рис. 11. Типы бактериальных колоний

Для исследования деталей строения клетки — органоидов, спор, жгутиков, различных включений — готовят фиксированные и окрашенные препараты. Препарат бактерий для фиксации и окраски (мазок) готовят на чистых обезжиренных стеклах. На подготовленное стекло наносят каплю суспензии бактериальных клеток и размазывают ее тонким слоем по поверхности стекла с помощью петли или краем покровного стекла. Мазки высушивают при комнатной температуре.

При фиксации необходимо возможно полнее сохранить прижизненную структуру бактериальных клеток. Известно много способов фиксации препарата, наиболее распространенный — фиксация жаром (фломбирование). Стекло с высушенным мазком проводят три-четыре раза через пламя горелки мазком вверх, пока не появляется ощущение жжения при прикладывании стекла к тыльной стороне руки. Для изучения формы клетки этот способ фиксации удовлетворителен. Для исследования тонкого строения бактерий препараты фиксируют химическими веществами — безводным метиловым спиртом (5 мин), 96%-ным этиловым спиртом (5 мин), смесью равных объемов этилового спирта и эфира (20 мин), фиксатором Карнуа (этиловый спирт — 60 мл, хлороформ — 30 м, ледяная уксусная кислота — 10 мл; фиксация — 15 мин).

После фиксации препарат окрашивают. Существуют различные методы покраски. Наиболее употребительные красители: метиленовый синий (спиртовой или водный раствор); фуксин основной (спиртовой или водно-спиртовой раствор), применяются и более сложные методы покраски с использованием нескольких красителей, например, окраска по Граму.

Дифференциацию бактерий по Граму можно производить и без окрашивания. Для разделения бактерий на грамположительные и грамотрицательные (что коррелирует с особенностями химического состава клеточной стенки этих двух групп бактерий) используют быстрый и простой метод, основанный на взаимодействии бактериальной массы с 3% раствором КОН. Клетки бактерий (лучше 1-2 суточные) помещают петлей в каплю 3% КОН на предметное стекло, размешивают круговыми движениями и через 5-6 с

петлю резко поднимают. Суспензия грамотрицательных бактерий становится вязкой и тянется за петлей, образуя тяжи. Грамположительные бактерии равномерно распределяются в капле щелочи. Реакция считается отрицательной, если образования слизистых тяжей не наблюдается в течение 60 с. Образование вязкой суспензии клеток грамотрицательных бактерий в щелочи связано с лизисом клеточных стенок и освобождением ДНК. Метод используют в качестве предварительного для диагностики. Существуют исключения, например грамотрицательные флавобактерии не образуют в щелочи слизистых тяжей.

"Негативная окраска" — окраска капсул жидкой тушью — заключается в том, что клетки бактерий помещают сначала в каплю разбавленного наполовину водой карболового фуксина Циля, а затем через 2—3 мин их смешивают с каплей туши и размазывают по предметному стеклу краем покровного стекла. После подсушивания препарат рассматривают под микроскопом. Бесцветные капсулы резко выступают между темным фоном препарата и окрашенными в красный цвет клетками бактерий.

Морфологию клеток исследуют в электронном микроскопе (см. Приложение).

Актиномицеты

Методы выявления и количественного учета актиномицетов. Для выявления и количественного учета стрептомицетов (наиболее распространенных в почвах представителей актиномицетов, принадлежащих к роду *Streptomyces*) чаще всего используют **метод посева почвенной суспензии на плотные среды** — крахмало-аммиачную, крахмало-казеиновую, казеин-глицериновую, среду с хитином и др. (Звягинцев, Зенова, 2001).

Для наиболее полного выделения актиномицетов из почвы производят механическую обработку образцов с целью десорбции клеток микроорганизмов: растирание почвы, обработку ультразвуком на установке УЗДН-1 (22 кГц, 0,44 А, в течение 2 мин; Звягинцев, 1987).

В качестве селективирующих агентов при выделении стрептомицетов из

почвы используют ингибиторы, подавляющие рост других микроорганизмов (немицелиальных бактерий и грибов) — антибиотики (пенициллин — 1 мг/л, стрептомицин — 25, полимиксин — 5, нистатин — 50, циклогексимид — 50, мипарицин — 50 мг/л; налидиксовую кислоту (1-10 мкг/мл), фенол и другие химические вещества; обогащают почву CaCO_3 , хитином, кератином; используют высушивание и прогревание ($40^\circ\text{—}45^\circ$; 2—16 ч) образцов перед анализом.

Выявление и учет представителей других, так называемых "редких" (редко встречающихся) родов актиномицетов возможны при использовании специфических селективных приемов (Зенова, 2000): прогревание образцов перед посевом ($100\text{--}120^\circ$, 1 ч), использование селективных сред с добавлением различных антибиотиков, длительные сроки инкубации (до 3-6 недель).

Дифференцированно учитывать споры и мицелий в видовой популяции актиномицетов в почве позволяет следующий метод, который предусматривает удаление почвенных частичек, мешающих выявлению спор, и концентрирование мицелия и спор, что обеспечивает учет популяции в диапазоне естественных (низких) уровней обилия: 1 г почвы вносят в колбу, доливают 100 мл воды, добавляют 1—2 капли поверхностно-активного вещества Твин-60 для более полной десорбции микроорганизмов, обрабатывают суспензию на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1 (22 кГц, 0,44 А, 2 мин), добавляют смесь коагулянтов $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и MgCO_3 (навеска 0,7 г, в отношении 2:5) для удаления почвенных частиц и коллоидов. После двухминутного взбалтывания суспензию отстаивают в мерном цилиндре на 100 мл 5 мин, отбирают из надосадочной жидкости пробу в 1 мл и фильтруют ее через мембранный фильтр (диаметр пор 0,23 мкм), который предварительно выдерживают для тушения собственной люминесценции в насыщенном спиртовом растворе судана черного В. После фильтрации фильтры окрашивают по двухэтажной схеме непрямого метода флуоресцирующих антител (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991), высушивают и микроскопируют (Люам И-3, 90х). Споры и мицелий актиномицетов имеют яркое желто-зеленое свечение (Кожевин, 1989)

Методы наблюдения за почвенными актиномицетами. Культуральные признаки актиномицетов описывают на плотных питательных средах, синтетических и белковых. При описании актиномицетных колоний обычно отмечают наличие и цвет воздушного и субстратного мицелия, наличие растворимого пигмента, выделяемого в среду; консистенцию колоний; наличие складчатости колоний (концентрическая или радиальная); консистенцию воздушного мицелия (мучнистая, бархатистая, порошковидная, пушистая).

Морфологические признаки актиномицетов — строение колоний и мицелия, его ветвление, строение и расположение спороносцев (рис.12), наличие спорангиев, склероциев, количество спор в цепочках на субстратном и/или воздушном мицелии (рис.13) — изучают, просматривая колонии актиномицетов, выросшие на плотной питательной среде в чашках Петри, при малом увеличении микроскопа.

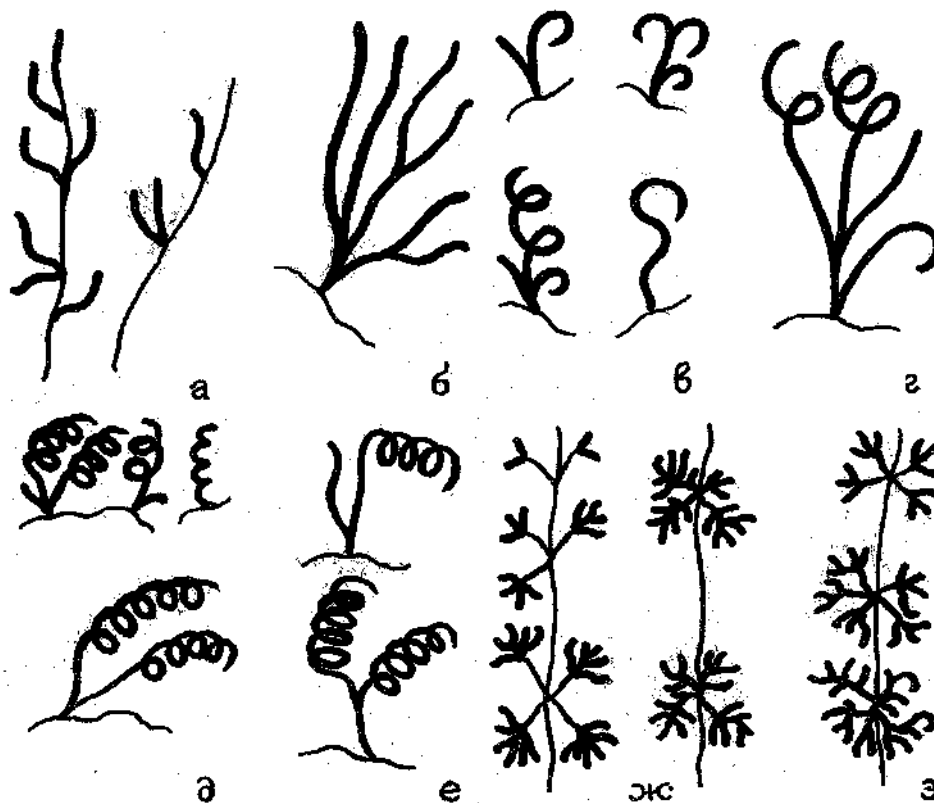


Рис. 12. Форма и расположение спороносцев у актиномицетов: а — прямые, короткие; б — прямые, длинные, разветвленные; в — короткие в виде крючков и коротких неправильных спиралей; г — длинные в виде крючков и неправильных спиралей; д- в виде правильных спиралей; е — с плотными сжатыми спиральями; ж — в мутовках прямые; з — в мутовках, имеют крючки, спирали в 1-1,5 оборота.

Для более детальных исследований получают рост актиномицетов на предметных или покровных стеклах. Используют метод "желобка". В застывшем агаре стерильным скальпелем вырезают 1—2 желобка шириной в 1 см во всю глубину агара. Края желобка с помощью петли засевают культурой актиномицета. На засеянные участки желобков накладывают покровные или предметные стекла.

Чашки инкубируют обычным способом. При этом актиномицет развивается на поверхности стекла, граничащей со средой. Стекла с развивающейся на них культурой снимают с агара и исследуют прижизненно или после фиксации и окраски под микроскопом.

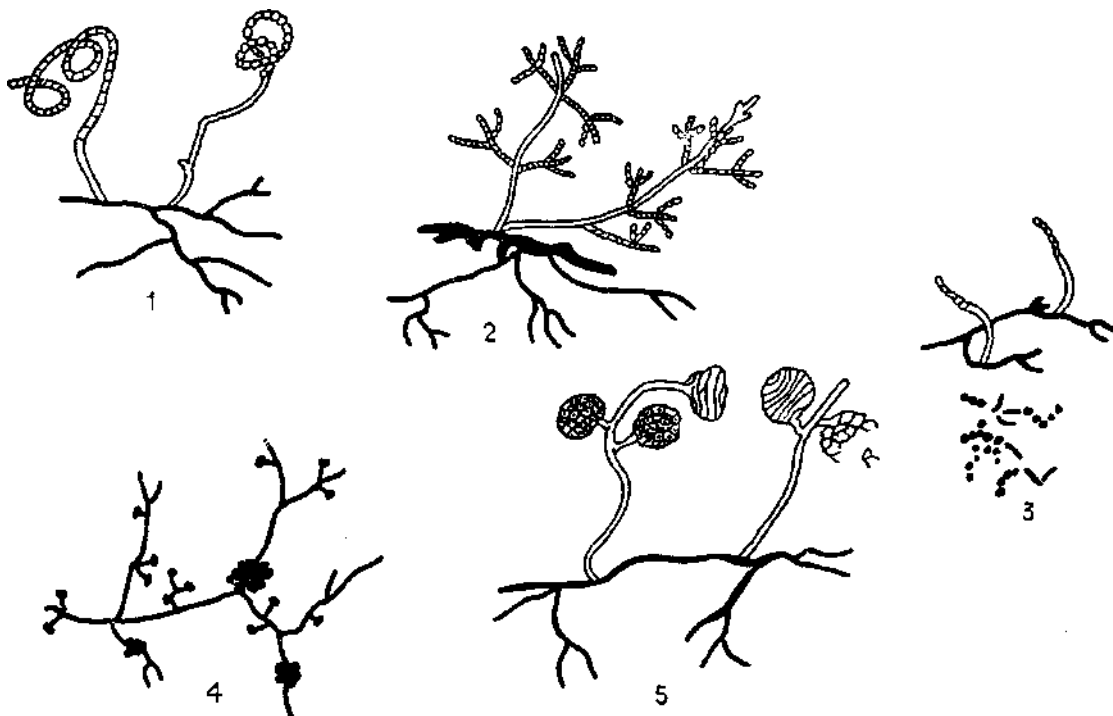


Рис. 13. Актиномицеты:

1 — *Streptomyces*; 2 — *Streptoverticillium*; 3 — *Nocardia*; 4 — *Micromonospora*; 5 — *Streptosporangium*

Строение спороносцев и характер поверхности оболочки спор выявляют в электронном микроскопе (см. Приложение). В случае использования трансмиссионного микроскопа препараты готовят без фиксации и напыления,

слегка прикасаясь сеткой с нанесенной на нее коллодиевой или формваровой пленкой к поверхности спороносящего воздушного мицелия. Используют инструментальное увеличение $\times 3000$ и $\times 10000$. В случае использования сканирующего электронного микроскопа препараты готовят по следующей методике. На латунном стержне получают отпечаток спор, прикасаясь поверхностью стерженька к поверхности спороносящего воздушного мицелия. Отпечаток подсушивают на воздухе, напыляют золотом. Используют инструментальное увеличение $\times 3000$ и 10000 . Существует несколько типов поверхности спор: гладкая, шиповатая, волосистая (рис. 14).

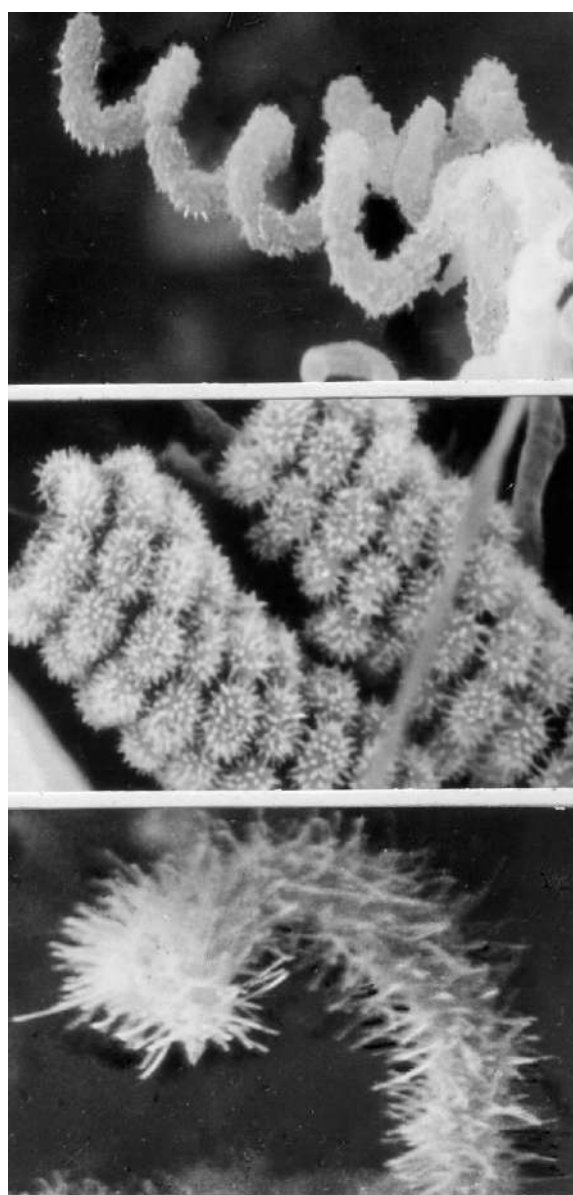


Рис.14. Споры актиномицетов в электронном микроскопе ($\times 10000$).

Для фиксации и окраски мицелия актиномицетов применяют в основном те же методы, что и для бактерий. Для изучения деталей строения мицелия, расположения спороносцев и спор можно применять фиксацию жаром и окрашивание 0,02%-ным водным раствором кристаллического фиолетового или метиленового синего.

Диагностика и идентификация бактерий и актиномицетов проводится на основании культуральных, морфологических, физиологических и хемотаксономических признаков с использованием Определителя бактерий Берджи (1997).

РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

Общее знакомство с основными группами почвенной биоты.

Занятие 1. 1. Просмотреть и описать коллекцию почвенных животных. Отметить характерные особенности строения отдельных органов, отражающие приспособление к условиям обитания в почве.

2. Просмотреть и зарисовать почвенные корочки с разрастаниями водорослей и лишайников.

3. Описать колонии грибов, дрожжей, бактерий и актиномицетов на питательных средах.

4. Просмотреть и зарисовать негативные колонии бактерио- и актинофагов.

Методы микроскопического исследования

почвенных микроорганизмов

Занятие 2. 1. Ознакомиться с устройством микроскопа. Научиться устанавливать свет по Келлеру.

2. Приготовить препарат бактерий методом "раздавленная капля", просмотреть под микроскопом, зарисовать.

3. Приготовить препарат подвижных микроорганизмов методом "висячая капля", просмотреть под микроскопом, зарисовать.

Среды для культивирования микроорганизмов и методы стерилизации

Занятие 3. 1. Приготовить среды для проведения посева из почвенной суспензии и выделения микроорганизмов. Приготовить в колбах две агаризованные среды – среду Чапека для бактерий и среду Чапека для грибов.

2. Разлить водопроводную воду по 100 мл в колбы и по 10 мл в пробирки для приготовления почвенных суспензий.

3. Приготовить ватные пробки для всех пробирок и колб.

Занятие 4. 1. Отработать приемы заворачивания в бумагу микробиологической посуды — чашек Петри, пипеток, шпателей.

2. Загрузить посуду в шкаф для стерилизации и ознакомиться с режимом его работы.

3. Познакомиться с работой автоклава.

Выделение и культивирование микроорганизмов

Занятие 5. 1. Произвести посев из образца почвы по следующему плану: разлить по чашкам Петри среды Чапека для бактерий и Чапека для грибов, посушить чашки со средами. Взять навески почвы по 1 г, произвести обработку почвенных образцов перед анализом методом растирания, приготовить необходимые разведения почвенной суспензии, произвести посев из разведений на приготовленные среды в чашках Петри.

2. Разлить в чашки Петри агаризованную среду Чапека для бактерий и после ее застывания оставить чашки открытыми на 10 мин для инфицирования их микробами из воздуха.

3. Познакомиться с устройством термостатов разных типов, работой качалок, ферментеров, хемостатов.

Занятие 6. 1. Учет результатов посева. Подсчитать количество колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий, актиномицетов и грибов на средах Чапека для бактерий и Чапека для грибов. Провести пересчет количества микроорганизмов на 1 г почвы (КОЕ/г почвы).

2. Описать рост микроорганизмов на всех использованных средах и сравнить колонии микроорганизмов на среде Чапека для бактерий при высеве из воздуха и из почвы.

3. Выделить из одной бактериальной колонии культуру пересевом на среду Чапека в пробирке.

Почвенные водоросли

Занятие 7. 1. Промикроскопировать при большом увеличении (объектив 40x) и зарисовать отдельных представителей почвенных водорослей. Синезеленые (цианобактерии) — представители родов *Gleocapsa*, *Nostoc*, *Phormidium*; обратить внимание на гетероцисты и гормогонии у ностоковых водорослей; зеленые — *Chlorella*, *Chlorhormidium*, *Chlamydomonas*; желто-зеленые — *Pleurochloris*; диатомовые — *Navicula*, *Pinnularia*, *Nitzschia*, *Hantzschia*, *Eunotia*.

2. Приготовить и промикроскопировать препараты из культур водорослей, растущих в минеральном питательном растворе. при инокуляции его почвой.

3. Рассмотреть визуально и в препарате под микроскопом зеленые корочки на поверхности почвенных монолитов, разрастания водорослей на почвенных пластинках в чашках Петри и стекла обрастания.

Почвенные животные

Занятие 8. 1. Пронаблюдать под микроскопом при малом увеличении за движением вегетативных клеток амёб. Зарисовать форму клетки, вакуоли, ядро. Промикроскопировать и зарисовать цисты *Ameoba* sp.

2. Промикроскопировать *Paramecium* sp. Зарисовать органоиды клетки, трихоцисты, проследить за образованием пищеварительной вакуоли.

3. Наблюдать под микроскопом за движением жгутиковых простейших — представителей родов *Bodo* и *Monas*. Остановить движение организма добавлением в препарат уксусной кислоты. Зарисовать органоиды клетки.

4. Приготовить жидкую культуру почвенных простейших засевом из

разведений почвенных суспензий в сенной настой с почвенной вытяжкой (1:1).

На следующем занятии просмотреть под микроскопом обрастание почвенных частичек простейшими и промикроскопировать жидкие культуры простейших. Определить количество простейших в 1 г почвы.

Занятие 9. 1. Просмотреть коллекцию насекомых и личинок насекомых, обитающих в почве (личинка майского хруща, медведка, жуки).

2. Зарисовать внешний вид кивсяка.

3. Зарисовать внешний вид, строение дождевого червя.

4. Промикроскопировать при малом увеличении комочки почвы, разложенные на агаризованной среде Эшби, и пронаблюдать за движением нематод и клещей.

5. Просмотреть под микроскопом при малом увеличении представителей панцирных и гаммазовых клещей.

Занятия по исследованию почвенных животных, рекомендуемые во время летней практики студентов

1. Определить численность почвообитающих животных методом почвенных раскопок.

2. Учесть площадь, приходящуюся на ходы кротов в почвенном разрезе. Подсчитать количество выбросов (кротовин) на определенной площади почвы различных угодий (луг, пастбища, лес).

3. Подсчитать число норок дождевых червей на 1 м² открытой поверхности почвы после дождя.

Почвенные микроскопические грибы

Занятие 10. 1. Промикроскопировать и зарисовать спорангии представителей класса *Zygomycetes*, родов *Mucor* и *Rhizopus*. Приготовить препарат спорангиев, раздавив их покровным стеклом, и рассмотреть споры, используя большое увеличение микроскопа.

2 Зарисовать при большом увеличении конидиеносцы, плодовые тела и

сумки со спорами у представителей родов *Penicillium* и *Aspergillus* (готовые препараты).

4. Промикроскопировать и зарисовать при малом и большом увеличении оптического микроскопа конидиеносцы представителей несовершенных грибов *Alternaria* и *Trichothecium*.

Почвенные дрожжи

Занятие 11. 1. Ознакомиться с формой дрожжевых клеток. Промикроскопировать клетки представителей следующих родов дрожжей: *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Candida*, *Trichosporon*, *Rodotorula*. Отметить наличие ложного мицелия у *Candida sp.*

2. Просмотреть под микроскопом и зарисовать сумки со спорами у дрожжей родов *Lipomyces*, *Debaryomyces*, *Williopsis*.

3. Выявить капсулы у почвенных дрожжей *Lipomyces* или *Cryptococcus* методом негативного контрастирования.

Бактерии

Занятие 12. Познакомиться с многообразием бактериального населения почвы. 1. Промикроскопировать с объективом 90х фиксированные и окрашенные препараты некоторых представителей грациликот (*Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Hyphomicrobium*, *Cytophaga* (или *Sporocytophaga*), *Azospirillum*; фирмакут (*Bacillus*, *Clostridium*, *A.rthrobacter*, *Micrococcus*). Зарисовать.

2. Пронаблюдать движение псевдомонад в препарате "висячая капля".

Занятие 13. 1. Познакомиться с характером ветвления. мицелия и общей структурой микроколоний актиномицетов. Для этого промикроскопировать при малом увеличении 1—2-х суточные культуры *Nocardia* и *Streptomyces* на чашке с питательной средой. Зарисовать.

2. Промикроскопировать и зарисовать расположение споропосцев и спор у представителей *Micromonospora*, *Streptomyces*; спорангиев у представителей рода *Streptosporangium*, используя фиксированные и окрашенные препараты.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Методы исследования экологических функций почвенных микроорганизмов направлены на выявление участия биоты в процессах превращения биогенных элементов в биосфере и определение скорости протекания этих процессов в почве.

Выявление микроорганизмов, участвующих в превращении соединений углерода

Разложение крахмала. Наблюдение за микроорганизмами, гидролизующими крахмал, проводят при посеве из почвенной суспензии на агаризованную среду с растворимым или оклейстеризованным крахмалом. Вокруг колоний микроорганизмов, образующих амилазы и поэтому способных гидролизовать крахмал, образуются прозрачные ореолы. Положив комочки почвы на агар, можно обнаружить микроорганизмы, разлагающие крахмал, в почве. Если чашки залить раствором йода, то среда окрасится в синий цвет. Зоны вокруг колоний окрасятся либо в красно-бурый цвет — гидролиз дошел до стадии декстринов, либо они останутся бесцветными — гидролиз прошел до стадии образования сахара. Наилучшие результаты в опытах по разложению крахмала получают при работе с растворимым крахмалом.

Разложение пектина. Пектинразлагающие микроорганизмы обладают ферментами — пектиназами, действие которых на растительную ткань проявляется в размягчении и распаде на отдельные клетки (мацерация) растительной ткани. Отбор культур микроорганизмов, обладающих пектиназами, проводят по их мацерирующей способности. Культуры микроорганизмов выращивают в картофельном отваре (200 г тертого картофеля в 1 л воды кипятят 15 мин, затем фильтруют через марлю и стерилизуют) в течение 10 дней при 24°. Затем 20—25 мл культуральной жидкости выливают в чашки Петри, опускают в них тонкие срезы картофеля. Мацерацию картофеля определяют после 6-часового выдерживания в термостате при 40° с помощью

тонкой иглы. При наличии мацерации клетки отделяются друг от друга и срез картофеля размягчается. Мацерация свидетельствует о присутствии в культуральной жидкости пектолитических ферментов, в частности протопектиназы. Присутствие пектолитических ферментов в культурах микроорганизмов можно выявить и по наличию зон осветления и разложения пектина в местах инокуляции микроорганизмов на плотных средах, покрытых слоем 2%-ного раствора пектина. В качестве плотной питательной среды может быть использован почвенный агар.

Обнаружение пектинэстеразы проводят с помощью посева на специальную среду следующего состава: картофельный бульон— 1000 мл; пектин—7 г; дрожжевой автолизат—5 мл; тиогликолевая кислота—1 мл; 0,5%-ный бромтимоловый синий—1 мл. Среду стерилизуют при 0,5 атм 30 мин. После стерилизации рН среды доводят до 7,2—7,5 стерильным 10%-ным раствором NaOH. Инкубацию посевов производят при 37°. На 1-, 2-, 3- и 4-е сутки роста определяют изменение значения рН по изменению окраски индикатора.

Наличие полигалактуроназы в культурах микроорганизмов выявляют, высевая культуры на среду следующего состава: картофельный бульон—1000 мл; пектин—13 г; дрожжевой автолизат—5 мл; тиогликолевая кислота—0,5 мл; 0,004%-ный нейтральный красный — 1 мл. Последующие операции аналогичны определению пектинэстеразы.

Аэробное разложение целлюлозы. Аэробные целлюлозоразлагающие микроорганизмы наиболее полно выявляются методом . почвенных пластинок. Почву обогащают соединениями калия и азота (2 мл 1,5%-ного раствора KNO_3 на 50—60 г почвы). Обогащенную навеску размешивают, увлажняют и помещают в чашку Петри, на дно которой предварительно кладут стерильные обеззоленные фильтры или фильтровальную бумагу. На поверхность почвенной пластинки также накладывают кружок фильтровальной бумаги и плотно прижимают его к поверхности пластинки. Чашки с пластинками инкубируют во влажной камере. Срок инкубации варьирует в зависимости от

свойств почвы. Для дерново-подзолистой почвы этот срок можно ограничить несколькими неделями, в черноземе срок инкубации должен быть увеличен. Результаты опыта оценивают по степени разложения бумаги. В дерново-подзолистой почве целлюлозоразлагающие микроорганизмы представлены обычно грибами, в черноземе — миксобактериями. Для выделения миксобактерий из почвы используется следующий метод. Чашка Петри наполняется почвой, которая увлажняется до полной влагоемкости. В почву вносят автоклавированный кроличий помет. Инкубируют при 30°. Через 10 дней на комочках помета под микроскопом видные плодовые тела миксобактерий. Используется также метод накопительных культур. В этом случае применяют среду Гетчинсона (г/л): KH_2SO_4 - 0,1; NaCl - 0,1; CaCl_2 - 0,1; FeCl_3 - 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3; NaNO_3 - 2,5, дистиллированная вода. Среду наливают в колбочки или пробирки, куда в качестве источника углерода помещают фильтровальную бумагу: В колбочки опускают складчатый бумажный фильтр, в пробирки — полоски фильтровальной бумаги (рис.15). После стерилизации колбочки и пробирки засевают комочками почвы.

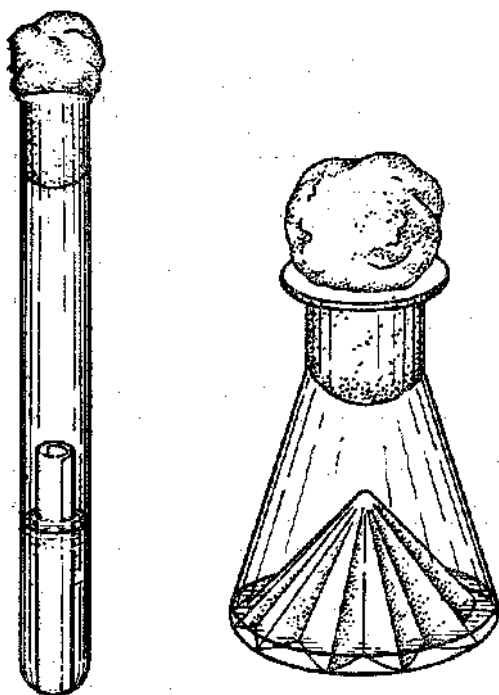


Рис.15. Методы обнаружения аэробных целлюлозоразлагающих микроорганизмов.

Условия накопительной культуры для целлюлозоразлагающих микроорганизмов можно создать, используя метод комочков. На поверхность пластинок кремнекислого геля или голодного агара накладывают кружки фильтровальной бумаги, смоченные раствором Гетчинсона. Затем на поверхность бумаги раскладывают 25 комочков почвы. Чашки инкубируют в термостате при 25—30° во влажной камере и наблюдают за развитием микроорганизмов. Через несколько недель подсчитывают процент комочков, вокруг которых наблюдается разложение клетчатки, и составляют характеристику развивающихся микроорганизмов на основе их микроскопического исследования.

Анаэробное разложение целлюлозы. Для накопительной культуры анаэробных целлюлозоразлагающих микроорганизмов А. А. Имшенецкий предложил следующие питательные среды.

1. Для накопительной культуры (г/л): $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 1,5; KH_2PO_4 - 0,5; MgSO_4 - 0,4; NaCl - 0,1; MnSO_4 и FeSO_4 - 1 капля 1%-ного раствора; пептон - 5,0, CaCO_3 - 2,0, фильтровальная бумага — 15,0, pH 7,0 - 7,4.

2. Для накопительных и чистых культур: мясопептонный бульон—500 мл; CaCO_3 —2 г; фильтровальная бумага—15 г; водопроводная вода — 0,5 л.

Жидкие питательные среды разливают высоким слоем в высокие пробирки. Фильтровальную бумагу нарезают полосками и опускают на дно пробирки. Засевают комочками почвы и инкубируют в термостате при 30—35° для обнаружения мезофильных бактерий и при 60° — для поиска термофильных бактерий.

Количественный учет анаэробных целлюлозоразрушающих бактерий проводят методом предельных разведений. Готовят ряд последовательных 10-кратных разведений почвенной суспензии. Посев производят в несколько параллельных пробирок (не менее 5), которые инкубируют в термостате; просматривают, материалы учета обрабатывают по таблице Мак-Креди. Полученные данные могут, однако, рассматриваться лишь как приблизительные, так как бактерии трудно смываются с волокон клетчатки, на

которых происходит их развитие, и не распределяются равномерно в воде при приготовлении разведений.

Для микроскопирования берут разрушающуюся бумагу, помещают ее на предметное стекло в каплю воды, разрывают волокна бумаги препаровальными иглами, распределяют на стекле, фиксируют, окрашивают и наблюдают микроорганизмы.

Образование метана. Минеральный состав среды (г): NH_4Cl - 0,75; KH_2PO_4 - 1,0; K_2HPO_4 - 2,0; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,02; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,01; NaHCO_3 - 2,0; CaCO_3 - 2,0; выщелоченный агар - 12; вода водопроводная - 100 мл, вода дистиллированная - 900 мл.

Сульфаты в среду не вводят, чтобы препятствовать развитию сульфатредуцирующих бактерий. В среду перед посевом добавляют 1 - 2 мл/л дрожжевого экстракта и 20 мл/л простерилизованной культуральной жидкости, полученной при развитии накопительной культуры метаносарцины. Для снижения окислительно-восстановительного потенциала среду кипятят, продувают углекислотой и вносят 4 мл/л 3%-ного раствора $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ в 0,5%-ном растворе Na_2CO_3 , что соответствует 17 мг/л H_2S , pH 7, rH_2 около 12. Перед посевом в расплавленную среду вносят источники энергии — кальциевые соли муравьиной, уксусной, молочной кислот или спирты (этанол, метанол) в количестве 1%.

Существует метод выделения метанобразующих бактерий, в котором в качестве источника энергии используется молекулярный водород. Для засева берут разведения почвенной суспензии в стерильной воде, содержащей 10—20 мл/л H_2 ; 1 мл посевного материала вносят в стерильную пробирку, затем заливают приготовленную среду так, чтобы не оставалось пузырьков воздуха. Время инкубации при 28—30° составляет от 10 дней до нескольких месяцев. О развитии метанобразующих бактерий судят по выделению пузырьков газа. Однако газообразование не может служить единственным критерием развития метанобразующих бактерий. Для подтверждения присутствия бактерий, образующих метан, необходим еще и газовый анализ. Количественный учет метанобразующих бактерий может быть проведен с помощью метода

предельных разведений.

Окисление метана. Для получения накопительных культур метаноокисляющих бактерий инокулируют жидкие и агаризованные среды почвенными суспензиями и помещают их в метано-воздушную среду при соответствующей температуре (30, 37, 45, 55, 60°C). Если необходимо выявить весь видовой состав метаноокисляющих бактерий, содержащихся в исследуемом образце, то на первом этапе накопительную культуру следует получать на твердой среде. Последующие этапы выделения накопительной культуры необходимо проводить на жидкой среде следующего состава (г/л): KNO_3 - 1; KH_2PO_4 - 0,4; K_2HPO_4 - 0,4; NaCl - 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3; CaCl_2 - 0,02; FeCl_3 - 0,001. Для приготовления сред используют водопроводную кипяченую фильтрованную воду (50%) и дистиллированную воду (50%). Фосфорные соли растворяют в дистиллированной воде. Для приготовления твердых сред пользуются очищенным агаром Дифко или силикагелем. Посуду очищают от органических примесей. В качестве источника углерода в среде используют метан. Опыты проводят в колбе, снабженной двумя стеклянными трубками с кранами и резиновой пробкой. В одну из трубок под давлением вводят метан, второй кран в это время открыт для выхода воздуха. Закрывают оба крана, колбу ставят на 3 - 4 дня при 30 - 37°. На поверхности жидкости появляется красноватая пленка метаноокисляющих бактерий.

Для выращивания метаноокисляющих бактерий на твердых средах используют специальные сосуды, которые герметизируют при помощи металлической крышки, оборудованной двумя штурцерами, через которые вводится и выводится газовая смесь. В сосуды помещают чашки с агаризованной средой указанного выше состава, инокулированные почвенной суспензией, и заполняют газовой смесью метан - воздух (1:1 — 1:4). Смену газовой фазы в сосуде осуществляют каждые двое суток. Сосуды помещают в термостат. Спустя 5—10 суток на агаре появляются визуально различимые колонии метаноокисляющих бактерий.

Колонии метаноокисляющих бактерий получают также при использовании

мембранных фильтров. Для этого на агаризованную среду накладывают фильтры, через которые была предварительно отфильтрована исследуемая проба.

Синтез и разложение гумусовых веществ. Для выявления грибов, принимающих участие в синтезе гумусовых веществ в почве за счет образования темноокрашенных продуктов — меланинов, используют метод мембранных фильтров. На мембранных фильтрах измеряют общую длину темноокрашенных грибных гиф и рассчитывают биомассу мицелия этих грибов.

Для выявления микроорганизмов, участвующих в разложении гумусовых веществ почвы, можно использовать метод Теппер. Из средней пробы отбирают навеску почвы в 25 г, которую смачивают до полного насыщения слабым раствором α -гумата (или другой фракцией гумусовых веществ), содержащего примерно 0,5 мг углерода в 1 мл гумата. Почву помещают в виде комочков на пластинки кремнекислого геля, пропитанные минеральной средой Виноградского без источника углерода и азота. Чашки инкубируют во влажной камере при температуре 25—28° 50—60 суток и более. Специфические микроорганизмы, разлагающие гуматы, образуют бурые или бархатистые налеты на поверхности комочков и в геле.

Обнаружение и учет микроорганизмов, участвующих в превращении соединений азота

Об интенсивности процесса азотфиксации в почве судят на основании определения активности нитрогеназы - азотфиксирующего ферментного комплекса микроорганизмов, способного восстанавливать не только молекулярный азот, но также и ряд других соединений с тройной связью, в частности ацетилен. Ацетиленовый метод определения активности азотфиксации основан на способности нитрогеназы восстанавливать ацетилен до этилена в количестве, пропорциональном количеству азота, которое может быть восстановлено в тех же условиях. Оценка активности азотфиксации

проводится по измерению количества образовавшегося этилена.

Способность к связыванию молекулярного азота присуща прокариотным организмам. Существуют методы обнаружения и изолирования почвенных азотфиксирующих бактерий.

Для обнаружения **азотобактера** методом почвенных комочков навеску почвы (60—100 г) увлажняют водопроводной водой до пастообразного состояния и микробиологической петлей или иглой раскладывают комочки правильными рядами (50 комочков на каждую чашку Петри) на среду Эшби следующего состава (г/л): K_2HPO_4 - 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2; $NaCl$ - 0,2; KH_2PO_4 - 0,1; $CaCO_3$ - 5,0; маннит (или сахароза) - 20,0; агар - 20,0; вода дистиллированная. На каждый образец почвы используют две чашки Петри, которые помещают в термостат во влажной камере. Через 4—6 суток подсчитывают количество комочков почвы, обросших слизистыми колониями азотобактера (обязателен микроскопический контроль), и вычисляют процент обрастания.

Для обнаружения в почве азотобактера используют также метод почвенных пластинок. Навеску почвы (40—50 г), обогащенную необходимыми для развития азотобактера веществами (0,5% сахарозы, 0,1% K_2HPO_4 , 1% мела), помещают в фарфоровую чашечку, увлажняют до пастообразного состояния, тщательно перемешивают и помещают в чашку Петри. Почву равномерным слоем распределяют по дну чашки, предварительно уложив на дно древесный уголь или битое стекло (для лучшей аэрации и дренажа). В чашку вставляют стеклянную трубочку, проходящую через почвенную пластинку и обеспечивающую газообмен. Пластинки инкубируют во влажной камере в течение 4 - 6 дней. Появление слизистых колоний на поверхности почвенной пластинки свидетельствует о наличии в исследуемой почве азотобактера.

Для выявления на корнях злаков бактерий рода *Azospirillum* и получения культуры азоспирилл отмытые кусочки корней длиной 5—8 мм размягчают с помощью профламбированного пинцета и помещают в элективную

полужидкую среду без азота следующего состава (г/л): яблочнокислый натрий или кальций - 0,5; KH_2PO_4 - 0,4; K_2HPO_4 - 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; NaCl - 0,1; CaCl_2 - 0,02; FeCl_3 - 0,01; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,002; дрожжевой экстракт - 5 мл; агар - 1,75; бромтимоловый синий - 5 мл (0,5%-ный спиртовой раствор); pH 6,8.

Инкубацию проводят в течение недели при 32°. Под поверхностью среды азоспириллы образуют белые колонии 2 - 4 мм в диаметре.

Колонии пересевают в полужидкую среду такого же состава с 15 мл дрожжевого экстракта на 1 л. Штаммы поддерживаются на среде того же состава в пробирках с полужидкой (0,3% агара) средой. Нитрогеназную активность проверяют ацетиленовым методом.

Для обнаружения в почве анаэробных азотфиксирующих бактерий рода *Clostridium* пользуются методом накопительной культуры в жидкой среде Виноградского следующего состава (г/л): глюкоза - 20; K_2HPO_4 - 0,1; MnSO_4 , NaCl , FeSO_4 - следы; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; CaCO_3 - 20,0. Среду наливают в пробирки высоким слоем, засевают комочками исследуемой почвы и пастеризуют 10 мин при 80° в целях освобождения от сопутствующих аэробных бесспорных бактерий. Через 2—3 суток после посева среда мутнеет, из нее начинают выделяться пузырьки газа, что свидетельствует о развитии анаэробных споровых бактерий, вызывающих в соответствующих элективных условиях маслянокислое брожение. Глюкоза при этом превращается в масляную кислоту и углекислый газ, а в пробирках образуется много пены, появляется запах масляной и уксусной кислот. Последняя также является одним из продуктов маслянокислого брожения. Обычно этот метод используют для обнаружения клеток *Clostridium pasteurianum*, которые легко увидеть при микроскопировании осадка. Так называемая гранулезная реакция способствует выявлению клеток в осадке. Перед спорообразованием в клетках *Clostridium pasteurianum* накапливается много гранулезы, для которой характерно окрашивание раствором Люголя. Каплю жидкости, содержащую клетки клостридиев, накрывают покровным стеклом и к одному краю стекла подносят пипетку с раствором Люголя, а к другому — фильтровальную

бумагу, которая засасывает раствор под покрывное стекло. При микроскопировании препарата видны клетки кластридиев с потемневшим содержимым. Спора в клетке остается при этом неокрашенной и хорошо различима на темном фоне.

Обнаружить **клубеньковые бактерии** в почве довольно трудно вследствие отсутствия селективных сред. Выявляют их в почве при помощи растений. Опыт ставят следующим образом. В небольшие колбочки Эрленмейера разливают невысоким (4 см высоты) слоем питательную среду следующего состава (г/л): K_2HPO_4 - 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 1,0; $CaCO_3$ - 0,5; $FeSO_4$, H_3PO_3 , $MnSO_4$ - следы; агар-агар - 0,1. Колбы стерилизуют при 121° 20 мин. После застывания агара на поверхность среды раскладывают предварительно простерилизованные семена клевера. Стерилизацию семян проводят 1%-ным раствором сулемы в спирте или 1%-ной бромной водой 5 мин. Перед этим семена обрабатывают мылом или другим поверхностно-активным веществом для обеспечения полной смачиваемости поверхности. Промытые семена проверяют на стерильность посевом на МПА и бобовый агар.

Вместе с семенами в колбочки добавляют 1 мл почвенной суспензии (разведение 1 : 10). Контролем служит колба, куда добавляется 1 мл суспензии почвы, взятой из-под клевера. Сосуды обертывают снаружи плотной бумагой, так чтобы она закрывала агар и семена, предохраняя бактерии от действия света. Растения выращивают в вегетационном домике или в лаборатории при естественном или искусственном освещении. По мере развития растений проводят наблюдения за образованием клубеньков в исследуемой почве, принимая за 100% количество растений, образующих клубеньки в контрольной колбе.

Для выделения культур клубеньковых бактерий корни с клубеньками тщательно отмывают от почвенных частиц, клубенек отрезают, промывают в стерильной воде, трижды сменяя ее, помещают в раствор сулемы (1 : 1000) в чашке Петри и выдерживают 2—3 мин. Затем переносят клубенек в чашку Петри со стерильной водопроводной водой, промывают в течение 5 мин, вы-

держивают в спирте 1 мин и промывают в трех последовательных чашках со стерильной водой, выдерживая по 10 мин в каждой. После промывания клубенек переносят в стерильную чашку и раздавливают скальпелем в капле воды. Одну петлю взвеси переносят на поверхность бобового агара в чашках Петри и размазывают шпателем. Этим же шпателем делают посев еще на двух последовательных чашках. Спустя 1—2 суток инкубации в термостате при 28—30° на чашках вырастают слизистые беловатые непрозрачные колонии, иногда похожие на капли стеарина. Бобовый агар готовят из бобового отвара: 50 г бобов (белой фасоли или гороха) заливают 1 л воды и варят до набухания и растрескивания кожуры (но не до разваривания), фильтруют через вату, доводят водопроводной водой до 1 л, добавляют 1% сахара, 0,05 мл 0,1%-ного раствора K_2HPO_4 и раствором соды устанавливают рН 7. Для получения плотной среды добавляют 1,5—2% агара. Стерилизуют при 121° 20 мин.

Для выделения актиномицетов рода *Frankia* из азотфиксирующих клубеньков на корнях небобовых растений (лоха серебристого или облепихи крушиновидной) используют следующую методику: клубеньки растений, выращенных в питомнике (5 лет) или оранжерее (1—2 года) в почвенной культуре, тщательно отмывают водой с лаурилсульфатом (0,02%) и отделяют от друз клубенька терминальные доли. Стерилизацию проводят 3%-ным раствором OsO_4 в течение 5 мин. После 5-кратного отмывания окиси осмия водой дольки помещают на 15 мин в буфер ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ - 2,16 г/л; KH_2PO_4 - 0,2 г/л; $NaCl$ - 0,8 г/л; поливинилпирролидон МВ-40000 - 1,0 г; рН 7,2). Затем каждую дольку клубенька переносят в новую порцию буфера и разделяют на части скальпелем и иглой, соблюдая стерильность. Полученные кусочки (1—2 мм) раскладывают по одному в пробирки (20 x 150 мм) с 14 мл модифицированной среды Квиспела (МСК) следующего состава (г/л): K_2HPO_4 - 0,3; NaH_2PO_4 - 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2; KCl - 0,2; дрожжевой экстракт Дифко - 0,5; пептон Дифко - 0,5; лецитин - $0,5 \cdot 10^{-2}$ или Твин-80 - 1 мл/л; $FeC_6H_5O_7 \cdot nH_2O$ - 0,01; раствор микроэлементов - 1 мл/л (H_3BO_3 - 0,15 г; $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,08 г; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,06 г; $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,01 г; $(NH_4)_6Mo_7O_{25} \cdot 4H_2O$ - 0,02 г;

CoSO₄ - 0,001 г; дистиллированная вода).

Через 8—10 недель инкубирования кусочков клубеньков в среде при 28° отбирают пробирки, где рост посторонних бактерий и грибов отсутствует. В таких пробирках дольки клубеньков опущены мицелием актиномицетов, различимым визуально. Кусочки клубеньков с мицелием рассеивают на чашки диаметром 50 мм вглубь полутвердой (0,8%-ного агара Дифко) МСК. Чашки заклеивают липкой лентой для ограничения поступления кислорода и инкубируют при 28° в течение 2—4 недель. Затем проводят микроскопический контроль колоний, появившихся в толще агара и вокруг кусочков клубенька. Колонии небольших размеров диаметром 1—2 мм, имеющие тонкий септированный нераспадающийся мицелий с терминальными и интеркалярными спорангиями и везикулами, отсеивают на чашки с полутвердой МСК и в пробирки с жидкой МСК для дальнейшего культивирования.

Для выявления **аммонифицирующих** бактерий в почве пользуются методом посева из почвенных суспензий на МПА. Накопительную культуру аммонификаторов можно получить, засевая комочками почвы пептонную воду или мясопептонный бульон в пробирках или колбочках. Пробирки закрывают ватными пробками и под них подвешивают влажную красную лакмусовую бумажку для обнаружения аммиака. Об образовании сероводорода судят по реакции с уксуснокислым свинцом, раствором которого пропитывают полоски фильтровальной бумаги и помещают их под пробки. Сверху пробки надевают резиновый колпачок для затруднения выхода газообразных продуктов. После 2—3 дней инкубации при 25—30° лакмусовая бумажка синееет от выделяющегося аммиака, а бумажка с уксуснокислым свинцом темнеет. Просматривая под микроскопом препараты, приготовленные из накопительной культуры, можно наблюдать крупные клетки споровых бацилл.

Для обнаружения **нитрификаторов** в почве пользуются обычно накопительными культурами на элективной среде.

Для выделения и учета **аммонийокисляющих** бактерий используют среду Сориано и Уокера (г/л дистиллированной воды): (NH₄)₂SO₄ - 0,5; KH₂PO₄

- 0,2; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,04; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,04; железо лимоннокислое - 0,0005; 1 мл 0,05%-ного раствора фенолового красного; pH 7,5—7,8 (устанавливают 5-ным раствором NaHCO_3). В среду добавляют следующие микроэлементы (мг/л дистиллированной воды): трилон Б - 500; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 200; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 10; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 3; H_3BO_4 - 30; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 20; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 1; $\text{NaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 2; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 3.

Наличие индикатора, изменяющего окраску при подкислении на желтую, позволяет судить о развитии культур. Образование нитритов проверяется качественно с реактивом Грисса (красное окрашивание).

Нитритоксиляющие бактерии выделяют на среде Уотсона и Уотербери (г): NaNO_2 - 0,07; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,006; K_2HPO_4 - 0,02; водопроводная вода - 700 мл; дистиллированная вода - 300 мл; pH 7,5.

Об использовании нитрита судят по реакции с реактивом Грисса. Среды заражают почвой (1% по объему). Накопительные культуры инкубируются в темноте при 25—30° в течение 3—4 недель.

Для обнаружения **нитрифицирующих** бактерий могут быть использованы и плотные питательные среды — пластинки кремнекислого геля. Готовят их следующим образом. К соляной кислоте плотностью 1,1 приливают при помешивании равный объем жидкого калийного или натриевого стекла плотностью 1,05—1,06 и слегка подогревают. Начинаящий коагулировать золь быстро разливают по чашкам Петри и дают ему застыть. Затем чашки помещают в сосуд, до дна которого проходит каучуковая трубка, соединенная с водопроводом. Кремневые пластинки промывают водопроводной водой до тех пор, пока гель не перестает давать реакцию на С1 (проба с AgNO_3). Тогда чашки вынимают, промывают 2—3 раза дистиллированной водой и пропитывают средой Виноградского, состоящей из 2-х растворов: 1) K_2HPO_4 - 0,5 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3 г; NaCl - 0,3 г; FeSO_4 - 0,02 г; MgCO_3 - 0,02 г; дистиллированная вода - 0,2 л; 2) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 10 г; дистиллированная вода - 0,2 л. Берут 2 мл первого и 1 мл второго растворов, чашки подсушивают. Стерилизуют чашки при 112° 15 мин. После этого на поверхность чашек в

минимальном количестве воды вносят хорошо растертую взвесь простерилизованного в течение 1 ч при 121° 0,5 г мела и равномерно распределяют по поверхности пластинки. Чашки подсушивают примерно 1 ч при 35°. Поверхность пластинки должна иметь вид белой эмали.

На поверхность гелевой пластинки помещают при помощи трафарета комочки почвы (50—100 шт.). Для этого почву увлажняют, равномерно растирают и наносят комочки на пластинку иглой или петлей. О развитии нитрифицирующих бактерий судят по зонам растворения мела вокруг комочков и появлению нитритов и нитратов около них.

Жидкую среду Виноградского, состоящую из двух выше перечисленных растворов, можно инокулировать комочками почвы. После инкубирования опытных колб при 28° в течение 7-10 дней в культуральной жидкости определяют нитраты качественной реакцией с дифениламином в концентрированной H₂SO₄ (синее окрашивание)

Количественный учет аммонифицирующих и нитрифицирующих бактерий в почве проводят обычно с помощью метода предельных разведений. Почвенную суспензию для посева готовят точно так же, как и при использовании чашечного метода. Посев производят в пробирки, содержащие определенное количество жидкой питательной среды. Для определения аммонификаторов посев обычно делают из 10-кратных разведений (до 8 и более). Для определения нитрификаторов ограничиваются двумя первыми разведениями. Из каждого разведения почвенной суспензии засевают от двух до пяти параллельных пробирок с соответствующей питательной средой. Пипетки во время постановки подобных опытов следует оберегать от заражения микроорганизмами из воздуха. Для каждого разведения рекомендуется брать новую стерильную пипетку. Расчет количества микроорганизмов проводят с помощью таблиц Мак-Креди.

Для обнаружения **денитрифицирующих** организмов в почве используют метод накопительной культуры. Опыт проводят на среде Гильтая. Готовят два раствора: 1) KNO₃ - 2,0 г, аспарагин - 1,0 г, дистиллированная вода - 250 мл; 2)

натрий лимоннокислый - 2,5г; KH_2PO_4 - 2 г; CaCl_2 - 0,2 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2 г; FeCl_3 - следы; дистиллированная вода — 500 мл. Оба раствора сливают и доводят объем среды до 1000 мл. Устанавливают pH 7 по индикатору бромтимоловому синему, который добавляют в среду. Цвет среды должен быть зеленый. Среду наливают высоким слоем в пробирки, стерилизуют, затем засевают комочками почвы. Инкубация продолжается 5—7 дней в термостате при 25—30°. Об идущем процессе восстановления нитратов свидетельствует образование азотсодержащих газов, пены на поверхности среды, посинение среды. Среда в пробирках мутнеет от развивающихся в ней бактерий. Численность денитрифицирующих бактерий в почве определяют методом предельных разведений.

Однако традиционный способ оценки численности не точен. Способность к денитрификации не является детерминирующим признаком какой-либо одной группы микроорганизмов — ею обладает большинство почвенных прокариот.

Для исследования выделения газообразных соединений из почвы используют два новых перспективных метода — радиоизотопный (с использованием радиоактивного изотопа ^{15}N достаточно сложен) и ацетиленовый, основанный на ингибировании ацетиленом редуктазы закиси азота, при котором восстановления нитратов до молекулярного азота не происходит, а процесс редукции обрывается на стадии образования N_2O , улавливаемой газовым хроматографом. Оба метода применяют для определения скорости денитрификации в почве.

Одни и те же культуры бактерий способны осуществлять как процесс фиксации атмосферного азота, так и процесс денитрификации в зависимости от экологических условий, в которых микроорганизмы существуют. Экспериментально это явление продемонстрировано с культурой *Azospirillum brasilense*, выделенной из корней. Культура выращивалась в хемостате при температуре 30° в среде, лишенной связанного азота, следующего состава (г/л): KH_2PO_4 - 2,0; NaCl - 0,1; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,01; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,002; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,02; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,02; яблочная кислота - 1. Для

предотвращения осаждения солей $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ они автоклавировались отдельно. Яблочная кислота перед добавлением в среду нейтрализовалась NaOH до pH 6,8. В этих условиях ацетиленовым методом регистрировался процесс фиксации молекулярного азота. В случае если к основной среде добавляли KNO_3 , процесс азотфиксации прекращался, культура *A. brasilense* начинала восстанавливать нитрат. Количество выделяемого N_2O регистрировали на газовом хроматографе.

Обнаружение микроорганизмов, участвующих в превращениях фосфора, серы, железа и марганца

Для выделения из почвы микроорганизмов, обладающих способностью растворять фосфаты железа и алюминия используют следующий метод. Фосфаты железа и алюминия осаждают следующим образом. Простерилизованные через фильтр Зейца растворы Na_3PO_4 и $FeCl_3$ (для получения $FePO_4$) или $AlCl_3$ (для получения $AlPO_4$) сливают и после осаждения асептически вносят в расплавленную глюкозо-аспарагиновую среду (г/л): глюкоза - 10,0; аспарагин - 0,5; K_2HPO_4 - 0,5; агар - 20,0. Используют следующие навески (мг): $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 390; $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ - 570; $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ - 360. Среду разливают в чашки Петри и засевают почвенной суспензией (разведения 10^4 — 10^6). Инкубируют при $28^\circ C$ 3—10 суток. Вокруг колоний бактерий, актиномицетов, грибов, растворяющих фосфаты железа и алюминия, образуются зоны просветления.

Для выделения из почвы микроорганизмов, растворяющих соли фитиновой кислоты (фитаты — наиболее распространенные органофосфаты почвы), используют метод Муромцева. Фитаты железа получают следующим образом: 50 г фитина растворяют в 500 мл 2%-ной HCl и осаждают фитат железа добавлением концентрированного водного раствора $FeCl_3$ (выпадает белый осадок фитата железа). Осадок отфильтровывают, промывают 2%-ной HCl до тех пор, пока фильтрат не перестает мутнеть при добавлении NaOH до pH 6. Фитат железа вносят (0,1% по сухому весу) в глюкозо-аспарагиновую

среду. Перед внесением удаляют избыток соляной кислоты, добавляют агар и стерилизуют при 115° 30 мин. Вокруг колоний бактерий, актиномицетов, грибов, растворяющих фитаты железа, образуются зоны просветления.

Накопительную культуру **фотосинтезирующих серобактерий** можно получить, используя следующую среду (г): KH_2PO_4 - 1; NH_4Cl - 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,4; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,05; раствор микроэлементов - 1 мл; дистиллированная вода - 950 мл. Раствор микроэлементов (г/л дистиллированной воды): ЭДТА - 5,2; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 1,5; ZnCl_2 - 0,07; $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,1; H_3BO_3 - 0,062; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,19; $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,017; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,024; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,036. В стерильную среду асептически добавляют раствор микроэлементов, 1 мл витамина B_{12} (2 мг B_{12} на 100 мл дистиллированной воды) и 40 мл K_2HCO_3 (5%-ный). Растворы витаминов и NaHCO_3 стерилизуют предварительно фильтрованием.

В среду добавляют 5%-ный раствор $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ в дистиллированной воде (16 мл — для пурпурных и 12 мл для зеленых серобактерий). Раствор стерилизуют автоклавированием; pH среды для зеленых серобактерий 6,8, для пурпурных — 8,3 (доводится H_2SO_4 или N_2CO_3 (2 моль/л соответственно)).

Среду разливают высоким слоем в пробирки и заражают почвой или илом. Инкубацию производят при искусственном или естественном освещении.

Для выделения и культивирования тионовых бактерий пользуются следующими средами (г/л):

1) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; FeSO_4 - 0,01; CaCl_2 - 0,25; KH_2PO_4 - 3,0; порошкообразная сера - 10 г (серу стерилизуют отдельно и добавляют в среду перед посевом);

2) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 5,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,4; K_2HPO_4 - 4,0; KH_2PO_4 - 1,5; CaCl_2 - 0,25; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; FeSO_4 - 0,01; pH 7.

Инкубацию проводят в термостате в течение 1—2 недель. О развитии тионовых бактерий судят по растворению серы, образованию пленки или помутнению среды, падению pH раствора и присутствию в нем сульфатов. Сульфаты обнаруживаются при помощи 5%-ного раствора BaCl_2 в 2н. HCl

(выпадение белого осадка).

Для получения накопительной культуры **сульфатредуцирующих бактерий** применяют среду Постгейта, имеющую следующий состав.

Раствор 1 (г): K_2HPO_4 - 1; NH_4Cl - 1; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ - 0.1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 2; лактат Na (70%-ный) - 3,5; дрожжевой экстракт - 1; pH 7,4; дистиллированная вода - 980 мл.

Раствор 2 (г): $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5; дистиллированная вода - 10 мл.

Раствор 3 (г): аскорбиновая кислота - 0,1; Na-тиогликолят - 0,1; дистиллированная вода - 10 мл.; pH 7,4.

Растворы стерилизуют отдельно, затем их сливают и разливают по стерильным пробиркам.

Иногда в среду перед засевом почвой добавляют простерилизованный в пламени горелки гвоздь.

После засева сред почвой (лучше брать болотную почву) пробирки со средами закрывают резиновыми или притертыми пробками, не оставляя воздуха (среду наливают под самую пробку). Сверху пробку заливают парафином. Культуры инкубируют в термостате в течение 3 недель при 30°. Развитие сульфатредуцирующих бактерий регистрируют по почернению осадка в пробирках, происходящему вследствие образования сернистого железа.

Для выделения и учета сульфатвосстанавливающих бактерий применяется метод Штурм (рис. 16).

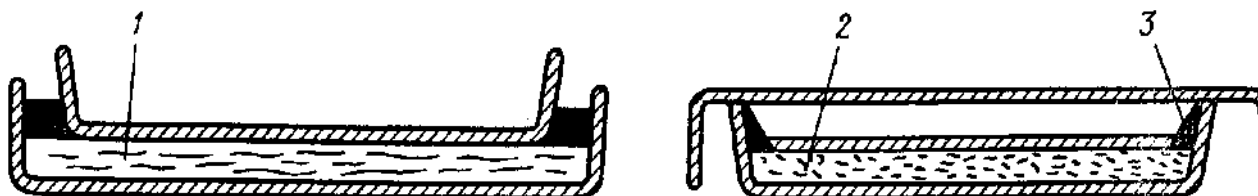


Рис. 16. . Методы выделения сульфатвосстанавливающих бактерии по Л. Д. Штурм (слева) и В. И. Дуде:

/ — агар; 2 — почвенная пластинка; 3 — парафин

Агаризованную среду Таусона наливают в крышку чашки Петри, а затем, после поверхностного посева почвенной суспензии, к поверхности среды плотно прижимают дно чашки; зазор между стенками дна и крышки заливают стерильным парафином. Герметизировать чашки можно круглыми стеклянными пластинками. Существует модификация метода, предложенная В.И. Дудой. Агаризованные среды заменяют пластинками стерильной почвы или смесью тонкодисперсных минералов: каолинита, бентонита, гипса и силикагеля. На почвенные пластинки наносят каплю почвенной суспензии и распределяют ее ровно по поверхности пластинки с помощью стеклянного шпателя. На пластинку помещают кружок стекла (или дно чашки Петри), который плотно прижимают к почве (либо к минеральной пластинке) так, чтобы удалить пузырьки воздуха. Процедура выполняется легче, если пластинка в центре слегка выпуклая. На последнем этапе парафином заливают часть почвы, находящуюся между краем стеклянной пластинки и стенкой чашки (рис.16). Черные колонии сульфатредуцирующих бактерий становятся заметными на 3—4-е сутки инкубации. Рост колоний можно наблюдать в течение длительного времени, не нарушая целостности камер. Учет количества колоний производят через 3—4 недели. Более интенсивное развитие бактерий наблюдается при добавлении 0,5 мл дрожжевого экстракта и 0,1 мл лактата кальция на 100 г воздушно-сухой почвы.

Для выявления **нитчатых железобактерий *Leptothrix*** применяют метод накопительных культур. Почву или ил вносят в сенной отвар, торфяную вытяжку или пептонную воду, куда добавляют источник железа (например, гвозди) или марганца.

Для выделения и культивирования *Leptothrix* используют среды с низкой концентрацией органических веществ (0,1—2 г/л), например среду с набором минеральных солей по ван Вейну следующего состава (мг): KH_2PO_4 - 27; K_2HPO_4 - 40; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 40; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 75; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 50; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 5; глюкоза — 100; дрожжевой экстракт - 70; гидролизат казеина - 100

(или KNO_3); MnSO_4 - 50; MgCO_3 - 1000 (1 г); аммиачно-железная соль лимонной кислоты - 100. Соли марганца и железа, а также набор микроэлементов и витаминов вносят в среду перед посевом. На поверхности среды после инкубации образуются мелкие черно-коричневые колонии.

Для выделения **одноклеточных железобактерий** *Arhtrobacter siderocapsulatus* (*Siderocapsa eusphaera*) используется среда Принсгейма в модификации Тилера следующего состава (%): дрожжевой экстракт - 0,005; MnSO_4 - 0,002. На дно пробирки добавляется щавелевокислое железо или FeS . Вода дистиллированная. Инкубация 2—3 дня. Иногда в среды добавляют пептон (0,00002%) и глюкозу (0,0002%). Агаризованную среду с железом используют, нанося на застывший агар густую суспензию щавелевокислого закисного железа, а сверху — очень тонкий слой среды указанного состава без марганца. Посев почвенной суспензии или воды из болотистого ручья производят на поверхность агара, где образуются мелкие темно-коричневые колонии. При микроскопировании видны кокки и палочки с капсулами.

Количественный учет железобактерий в пробах почвы, ила, воды проводят методом прямого счета на мембранных фильтрах «Синпор» с диаметром пор 0,4 мкм. Для выявления окислов железа на клетках микроорганизмов фильтры окрашивают эритрозином или желтой кровяной солью с соляной кислотой.

Для выделения из почвы **бактерий, окисляющих марганец**, пользуются методом посева из почвенных разведений на поверхность питательных сред. Почвенную суспензию перед посевом обрабатывают на качалке при 180 об/мин в течение 30 мин. Используются следующие питательные среды:

1. Среда Лиске (%): выщелоченный агар - 1,5; уксуснокислый марганец - 0,01.
2. Полужидкая среда: выщелоченный агар - 0,1%, щавелевокислый или уксуснокислый марганец - 1 капля густой суспензии на пробирку с 5 мл среды.
3. Жидкая среда (%): крахмал - 2; углекислый марганец - 0,1; вода дистиллированная.

Совместные колонии гриба и окисляющего марганец организма на плотных средах имеют весьма характерную концентрическую структуру. Наличие марганца в отложениях *Metallogenium* устанавливают при помощи реакции с солянокислым бензидином. Для выявления в почве *Metallogenium* используют также метод капиллярной микроскопии. Педоскопы заполняют агаризованным органоминеральным гелем, приготовленным из смеси фульвокислот.

Для получения органоминеральных фульватных гелей пользуются кислотной вытяжкой, которую получают настаиванием 50 г почвы в течение суток в 1 л 0,1 н. раствора HCl. После фильтрации производят осаждение фульвокислот путем нейтрализации вытяжки раствором NaOH до pH около 5,0. Осадок отфильтровывают, отмывают водой. Отмытый гель помещают в колбу с небольшим количеством воды и стерилизуют при 115° 30 мин.

В некоторых случаях используют стекла обрастания по Холодному, покрытые агаризованным органоминеральным гелем. Срок экспозиции стекол 2 месяца. Наблюдения ведут под микроскопом.

Колонии *Metallogenium* растут на гифах грибов. Грибы с *Metallogenium* имеют вид черных «паучков» в толще агара.

РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

Обнаружение микроорганизмов, принимающих участие в превращении веществ в почве

Занятие 1. 1. Засеять агаризованную среду с крахмалом почвенной суспензией для выявления амилолитических микроорганизмов. На следующем занятии выявить на чашках колонии микроорганизмов, гидролизующих крахмал с помощью реакции с йодом.

2. Поставить опыты по выявлению пектинразлагающих грибов с использованием метода мацерации растительной ткани (ломтики картофеля). На следующем занятии отметить наличие или отсутствие мацерации картофеля.

3. Поставить опыт по выявлению в почве целлюлозоразлагающих микроорганизмов методом почвенных пластинок и методом накопительной культуры на среде Гетчинсона. Через месяц описать разложение фильтровальной бумаги, промикроскопировать волокна бумаги в зонах разложения, зарисовать.

4. Пронаблюдать за газообразованием в накопительных культурах метанобразующих бактерий.

Занятие 2. 1. Поставить опыт по обнаружению в почве азотобактера методом почвенных комочков. На следующем занятии описать колонии азотобактера, развившиеся вокруг комочков почвы на среде Эшби. Промикроскопировать и зарисовать.

2. Поставить опыт по обнаружению в почве бактерий рода *Clostridium*. На следующем занятии описать рост бактерий на среде Виноградского в накопительной культуре. Отметить появление запаха, газа, мути, пены в пробирке. Промикроскопировать, проделав гранулезную реакцию, зарисовать.

3. Произвести посев комочками почвы в ряд пробирок с пептонной водой для выявления аммонификаторов. На следующем занятии пронаблюдать за образованием сероводорода и аммиака в пробирках.

4. Произвести посев из разведения почвенной суспензии в ряд пробирок со средой Гильтая для обнаружения денитрификаторов. На следующем занятии отметить наличие мути, пленки, осадка, изменение цвета среды, появление пузырьков газа в пробирках.

5. Поставить опыт по обнаружению в почве нитрификаторов методом с использованием жидкой среды Виноградского. Среду засеять комочками почвы, на следующем занятии выявить присутствие в среде нитратов качественной реакцией с дифенилом в концентрированной серной кислоте.

Занятие 3. 1. Засеять почвенной суспензией чашки со средой, содержащей фосфат железа, для выявления бактерий, разлагающих соединения фосфора. Через несколько занятий отметить наличие зон просветления в

чашках Петри, свидетельствующих о наличии в почве бактерий, участвующих в превращениях фосфора.

2. Поставить опыт по выявлению в почве тионовых бактерий. На следующем занятии проследить за изменениями среды, появлением мути, падением значения рН раствора, появлением сульфатов в среде.

3. Зарегистрировать развитие сульфатредуцирующих бактерий в пробирках с жидкой средой Постгейта по почернению осадка.

Занятие 4. 1. Пронаблюдать под микроскопом клетки железобактерий из накопительной культуры и колонии *Metallogenium* на гифах грибов.

2. Зарисовать клубеньки на корнях бобовых растений.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ В БИОТИЧЕСКОМ СООБЩЕСТВЕ

Экологические методы исследования почвенной биоты

Метод стекол обрастания (по Росси—Холодному). Метод позволяет наблюдать «микробные пейзажи». В небольшом почвенном разрезе одну из стенок зачищают и, сделав ножом вертикальную щель, закладывают в нее стерильные предметные стекла, плотно прижимая их к почве. Закапывают разрез, отмечая кольшком местонахождение препаратов. Если почва содержит достаточно влаги, то закопанное стекло вскоре покрывается почвенным раствором, к его поверхности прилипают коллоидные частички органического и минерального происхождения. В этой среде поселяются и активно развиваются различные микроорганизмы, образующие на стеклах характерные для данной почвы микропейзажи. По истечении срока экспозиции (не менее одного месяца) стекло осторожно отделяют от почвы (не скользящим движением), подсушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки, отмывают осторожно препарат водой от крупных частиц почвы (для этого можно оставить стекло в стакане с водой в наклонном положении на несколько часов), окрашивают 1%-ным карболовым эритрозинном в течение 1 ч во

влажной камере, промывают дистиллированной водой, высушивают и микроскопируют. Метод широко применяется в микробиологической практике. С помощью этого метода впервые оказалось возможным наблюдение за распределением различных микроорганизмов в их природной среде обитания, наблюдение за формой и размерами группировок микроорганизмов, их взаимоотношениями.

Модификации метода заключаются в том, что стекла перед помещением в почву покрывают какой-нибудь питательной средой или специфическим субстратом (например, фильтровальной бумагой, льняной тканью и т. д.)

Метод капиллярных педоскопов. В естественных условиях в почве, илах развитие микроорганизмов может происходить в почвенных капиллярах, к стенкам которых прикрепляются почвенные микроорганизмы. На этом основан метод, предложенный Б. В. Перфильевым и Д. Р. Габе. Используют специальный прибор — педоскоп, состоящий из набора плоских капилляров с плоскопараллельными стенками. Стерильные педоскопы вставляют в почву с помощью специального пробойника так, чтобы каналы ячеек приняли вертикальное положение, т. е. соответствовали преобладающему направлению движения почвенного раствора. Экспозиция педоскопов в почве длится обычно в течение месяца, после чего педоскопы вынимают из почвы, очищают снаружи от почвенных частичек, рассматривают под микроскопом с иммерсионным объективом. Микробные клетки в педоскопах могут быть зафиксированы и окрашены. Фиксируют их в парах осмиевой кислоты или в парах 40%-ного раствора формалина. Окрашивают 1%-ным раствором карболового эритрозина, промывают водой.

Модификация метода, предложенная Т. В. Аристовской, состоит в том, что внутренние стенки капилляров покрывают средой, содержащей ту или иную фракцию гуминовых кислот. 50 г почвы заливают 1 л 0,1 н. раствора NaOH и через 18—20 ч отфильтровывают. Реакция среды должна быть слабокислой, pH фильтра осторожно доводят 0,2 н. HCl до 5. Затем в фильтрат по капле прибавляют 20%-ный раствор FeCl₃ до полного выпадения гумусовых

веществ в форме геля, который отфильтровывают и отмывают от следов хлора (проба с 1%-ным раствором AgNO_3). Около 5 мл геля растирают в ступке, взбалтывают в 1 л воды, вносят агар (0,1%) и стерилизуют. Педоскоп боковой стороной помещают в расплавленную среду, протирают снаружи стерильной ватой, подсушивают.

Метод люминесцентномикроскопического наблюдения микроорганизмов в почвенных монолитах по Звягинцеву. Цилиндрическую формочку (диаметр и высота по 1 см) из нержавеющей стали, пластмассы или стекла, имеющую острые края, вдавливают в почву исследуемого горизонта и осторожно вынимают ее так, чтобы над краями формочки возвышался слой почвы. Острой бритвой срезают почву, чтобы верхняя грань монолита была на уровне краев формочки. На поверхность почвы капают водный раствор акридинового оранжевого (1:1000) и накрывают ее очень тонким покровным стеклом (0,10—0,12 мм). Через 10—20 мин исследуют в люминесцентном микроскопе с иммерсионным объективом (90x) в отраженном свете. Основные трудности метода заключаются в подборе подходящей концентрации красителя; для каждой почвы она подбирается опытным путем.

Электронномикроскопические исследования почвенных микроорганизмов. Имеется два типа электронных микроскопов: просвечивающие или трансмиссионные (ТЭМ), в которых исследуемый объект просвечивается пучком электронов, создающим затем на экране или фотопластинке соответствующее изображение, и растровые или сканирующие (СЭМ), в которых изображение создается вторичными электронами, испускаемыми исследуемой поверхностью при облучении ее пучком первичных электронов. Электронные микроскопы просвечивающего типа отличаются более высокой разрешающей способностью, однако они пригодны только для изучения очень тонких образцов (с толщиной, не превышающей $5 \cdot 10^{-2}$ мкм). Поэтому в микробиологии и почвоведении все более широкое применение находит растровая электронная микроскопия, позволяющая исследовать массивные непрозрачные объекты произвольной геометрии. В сканирующем электронном

микроскопе высокая разрешающая способность сочетается с большой глубиной резкости, широким полем зрения и большим диапазоном увеличения.

Подготовка препаратов для электронной микроскопии — сложный и трудоемкий процесс. Подложка препаратов для микроскопов просвечивающего типа должна быть очень тонкой (10—15 мкм) и проницаемой для электронов. Такие пленки изготавливают из коллодия, формвара, угля и кварца и помещают на металлические сетки. Диаметр предметных сеток равен 2—3 мм. На пленки наносят суспензию микроорганизмов и после испарения воды препарат просматривают. Часто препарат подвергают дополнительной обработке — оттенению металлом (золотом, платиной, палладием, хромом или ураном). Напыление металлом производят под вакуумом на специальном приборе — напылителе. Такая дополнительная обработка повышает контрастность изображения. При микроскопировании почвенной суспензии ее очищают от растворимых веществ путем диализа (Гузев и др., 1978)

Методы исследования адсорбции почвенных микроорганизмов.

Применение метода люминесцентной микроскопии дало возможность увидеть адсорбированные клетки непосредственно на почвенных частицах (Звягинцев, 1987). Поскольку большинство микробиологических объектов не обладает собственной люминесценцией или обладает ею в слабой степени, микроорганизмы окрашивают обычно специальными красителями — флуорохромами (например, акридиновым оранжевым), которые обуславливают свечение клеток. При проведении работы важно точно подобрать оптимальную концентрацию красителя. Только в этом случае клетки будут достаточно хорошо видны. Например, можно подобрать такую концентрацию, когда почвенные частицы светятся красным, а адсорбированные на них клетки — зеленым. Опыты проводятся с применением отраженного света.

Иногда свечение почвенных частиц затрудняет рассмотрение прикрепленных к ним клеток микроорганизмов, особенно при рассмотрении почвенных монолитов, где почвенные частицы составляют сплошной светящийся фон. Ослабление свечения фона достигается применением

тушителей (например, пирофосфата натрия 0,5—1%).

Большие возможности для изучения адсорбции микроорганизмов в почве дает сканирующая электронная микроскопия. При использовании сканирующего электронного микроскопа удается видеть отдельные адсорбированные клетки микроорганизмов и их микроколонии.

Учитывая данные люминесцентного и электронномикроскопического анализа, свидетельствующие о том, что микроорганизмы находятся в адсорбированном состоянии, проводят специальную обработку почвенных образцов перед посевом на чашки с питательной средой, чтобы добиться десорбции микроорганизмов с поверхности почвенных частиц.

Методы изучения микробных сукцессии в почве. Какую бы группу микроорганизмов не изучал микробиолог, важно понять, какое место занимает эта группа в системе микроорганизмов в почве. Важнейший принцип, которым руководствуются при решении этой проблемы, — изучение объектов исследования в динамике.

В почве непрерывно протекает закономерная смена (сукцессия) микроорганизмов, которая длится на протяжении недель, месяцев.

Изучая сукцессии в системе почва—микроорганизмы, регистрируют динамику количественного и качественного состава бактерий, грибов и актиномицетов.

Для характеристики сукцессии применяют в совокупности метод посева и прямой метод и вычисляют коэффициент K (Звягинцев, 1987).

Прямой метод дает сведения как о бактериях, учитываемых на мясопептонной агаризованной среде (МПА), так и о микроорганизмах, не вырастающих на МПА из-за иных пищевых потребностей и особенностей кинетики роста; о бактериях, испытывающих стресс; мертвых клетках и т. д. Анализ соотношения данных микроскопии и посева на МПА (коэффициент K) позволяет предположить, что для сукцессии микроорганизмов в почве, инициируемой внесением одного легкодоступного субстрата (например, глюкозы), посев на МПА дает сведения о большей части микроорганизмов,

способных к быстрому росту, так называемых r -стратегов. Коэффициент K рассчитывают по формуле:

$$K = M/P,$$

где M — численность бактерий, учитываемых прямым методом, P — бактерии, учтенные на определенной питательной среде, например МПА.

Для зрелых сообществ коэффициент K будет возрастать, а для молодых — уменьшаться. Коэффициент K будет возрастать, если будет расти разнообразие микроорганизмов, которые могут быть учтены на других питательных средах, возрастать число медленно растущих форм, число клеток, находящихся в состоянии стресса, включая голодание, число нежизнеспособных клеток. Все эти компоненты учитываются прямым методом, но не методом посева, их увеличение характерно для зрелых систем. Поэтому высокое K характеризует поздние стадии микробной сукцессии, где преобладают микроорганизмы с K -стратегией. Низкое значение K указывает на увеличение доли быстрорастущих бактерий (r -стратегов), что характерно для начальных этапов сукцессии. Результаты по изменению коэффициента K подтверждают положение о возможности его применения для индикации стадий микробной сукцессии.

Одним из приемов изучения сукцессии почвенных микроорганизмов является внесение видовых (штаммовых) популяций. При этом комплекс почвенных микроорганизмов зондируется разнохарактерными популяциями (K - и r -стратегами). K -стратеги имеют больше шансов выжить на поздних стадиях сукцессии, r -стратеги — на ранних. Поведение внесенной популяции будет различаться в зависимости от того, на какой стадии сукцессии находятся собственно почвенные микроорганизмы.

Для изучения популяций в почве применяют два метода. Первый метод предполагает использование генетически маркированных популяций, которые можно было бы узнать среди многочисленных и разнообразных почвенных микроорганизмов. Наиболее распространено получение стрептомицинустойчивых штаммов. Получение таких штаммов обычно требует всего несколько

недель и достигается путем последовательных пересевов на ряд сред с повышающимися концентрациями стрептомицина. Необходимо получить штаммы, устойчивые к концентрации стрептомицина 500 мкг/ мл среды, так как на такой среде не растут собственно почвенные бактерии.

Опыт по изучению динамики популяции бактерий, внесенной в нестерильную почву, проводится следующим образом. Навеску почвы 40—60 г помещают в чашку Петри, предварительно просеивая через сито с диаметром отверстий 1 мм. Инициация сукцессии обеспечивается увлажнением воздушно-сухой почвы или внесением дополнительных субстратов — микрокристаллической целлюлозы или глюкозы (1% от веса воздушно-сухой почвы). В почву вносят суспензию клеток стрептомицинустойчивого штамма бактерий на уровне 10^8 клеток/г почвы. Популяцию вносят через 0, 2, 7, 16, 25 суток после инициации сукцессии и учитывают на протяжении 35—50 суток. Почву инкубируют при постоянной влажности (60% от полевой влагоемкости) при температуре 20° в эксикаторе. Бактерии, внесенные в почву, учитывают с помощью поверхностного посева на МПА со стрептомицином. Посеву предшествует обработка почвенных суспензий на установке УЗДН-1 (22 кГц, 0,44 А, 2 мин).

Второй метод — иммунолюминесценция — более сложен в исполнении и предполагает иммунизацию испытуемой культурой кроликов, получение иммунной сыворотки, которой обрабатывают почвенный мазок, содержащий тест-культуру. Препарат обрабатывается антикроличьим гаммаглобулином, меченным изотиоцианатом флуоресцеина. По специфическому краевому иммунному свечению среди множества почвенных микроорганизмов в почвенной суспензии отличают клетки заданного микроорганизма (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1980).

Антагонизм микроорганизмов.

Для выявления микробов-антагонистов и изучения их антибиотической активности существуют методы, основанные на способности антибиотиков диффундировать в агаризованную среду.

Метод агаровых блоков заключается в следующем. Поверхность питательного агара, пригодного для развития испытуемого организма и образования антибиотического вещества, засевают сплошным "газоном" антагониста. После того как организм хорошо разовьется и образует антибиотическое вещество, которое диффундирует в толщу агара (для бактерий — 4—5 суток, для грибов — 6—8, для актиномицетов — 8—10 суток), стерильным пробочным сверлом вырезают агаровые блоки и переносят их на поверхность другой агаровой пластинки в чашке Петри, предварительно засеянной тест-организмом. После инкубации в термостате (время инкубации зависит от скорости роста тест-культуры) вокруг агаровых блоков образуются зоны отсутствия роста тест-организма в том случае, если антибиотическое вещество, выделяемое исследуемым организмом, угнетает рост тест-микроба (рис.17). По диаметру зон судят об антибиотической активности изучаемого организма.

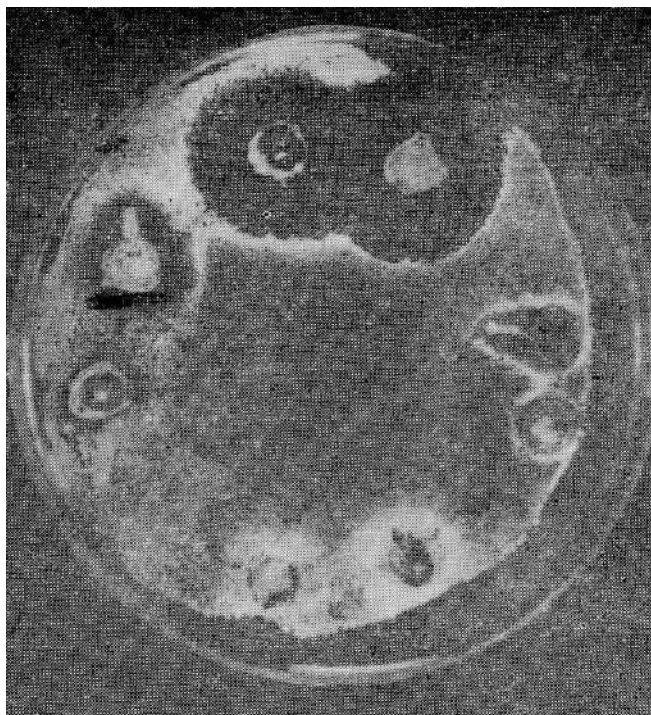


Рис. 17. Зоны угнетения роста тест-организма вокруг блоков с антагонистами

Спектр антимикробного действия антагониста удобно определять с помощью следующих методов. На питательный агар в чашки Петри высевают в виде штриха испытуемый организм. К выросшему микроорганизму подсевают перпендикулярно или в виде окружности тест-организмы. По другой модификации вырезают большой блок среды с культурой испытуемого антагониста и ставят в центр агаровой пластинки на чашке Петри. Тест-микробы подсевают штрихами по радиусам к блоку испытуемой культуры (рис.18). Чашки инкубируют в термостате в течение 3—7 суток при 28—30°. Максимальное действие антибиотика проявляется на том организме, развитие которого начинается на большем расстоянии от блока.

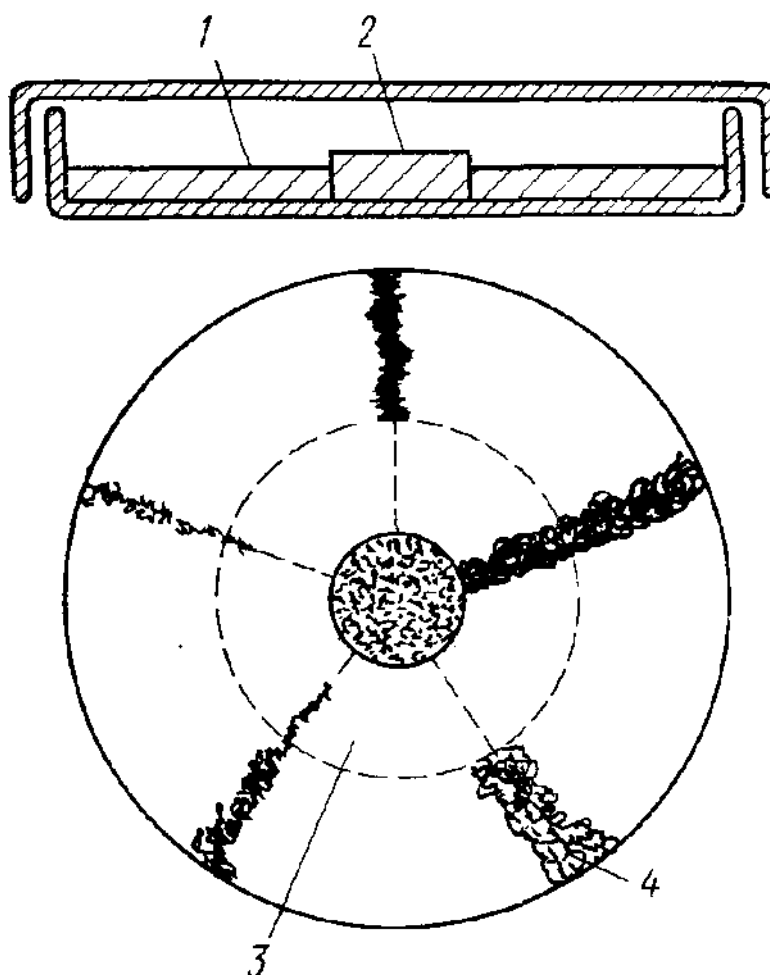


Рис. 18. Схема опыта по определению антимикробного спектра актиномицета-антагониста:

1 — среда для развития тест-организмов; 2 — агаровый блок с антагонистом; 3 — зона диффузии антибиотика; 4 — штрих тест-организма.

Исследование взаимоотношений микроорганизмов и растений.

Микроорганизмы, живущие на поверхности листьев растений (эпифитные микроорганизмы), можно наблюдать по их росту на отпечатке листа на поверхности питательной среды в чашке Петри (рис.19).

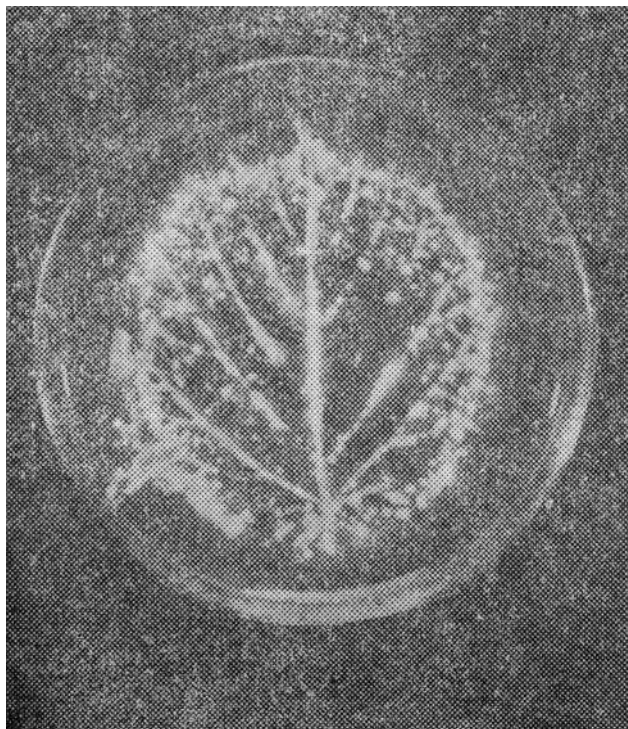


Рис. 19. Рост дрожжей на отпечатке листа.

Методы исследования микроорганизмов в ризосфере. Микроорганизмы в ризосфере исследуют методом последовательных отмываний корней по Теппер. Из почвенных монолитов с растениями стерильным пинцетом и ножницами отбирают 1 г молодых корней (примерно одного диаметра) с приставшими к ним частицами почвы. Корни помещают в колбу со 100 мл стерильной водопроводной воды и взбалтывают в течение 2 мин. Стерильным крючком или пинцетом корни извлекают из колбы и переносят последовательно во вторую, третью, четвертую, пятую, шестую и седьмую колбы, также содержащие по 100 мл стерильной водопроводной воды. В каждой колбе корни отмывают по 2 мин. Желательно, чтобы в последней (седьмой) колбе в воду перед стерилизацией было добавлено 5—7 г песка. Из

каждой колбы отдельно стерильной пипеткой берут по капле отмывной воды и высевают на поверхность питательной среды в чашке Петри. Чашки инкубируют в термостате при 28—30°. В качестве питательной среды используют МПА, среду Эшби, сусло-агар, крахмало-аммиачный агар и т. д. Учет посевов производится на 3—7-е сутки роста микроорганизмов. По мере отмывания корней численность микроорганизмов не убывает, а в ряде случаев даже увеличивается. При этом в чашках с посевом из первых отмываний обнаруживается много крупных колоний, состоящих из споровых форм микроорганизмов. По мере отмывания корней количество колоний бациллярных форм уменьшается и возрастает число мелких точечных колоний, представляющих неспорозные формы бактерий рода *Pseudomonas* и др., а также коринеподобных бактерий.

Для сравнительного определения количества микроорганизмов в ризосфере и ризоплане по методу Теппер суспензию из первого отмывания дополнительно взбалтывают 5 мин, затем из нее готовят разведения, из которых делают посевы. Содержимое остальных шести колб сливают вместе и также приготавливают последовательные разведения, из которых делают посевы. Количество ризосферной почвы, попавшей с корнями в первую колбу, находят по разности первоначальной навески и навески отмытых корней. Для этого из последней порции отмывной воды корни извлекают, помещают на фильтровальную бумагу для удаления воды и взвешивают.

Образцы ризосферы и ризопланы можно разделить и следующим образом. Корни растения отмывают от прилипшей к корню почвы в течение 3 мин на качалке при 180 об/мин в 100 мл стерильной водопроводной воды (образцы ризосферы). Отмытые корни (образцы ризопланы) переносят в другую колбу со 100 мл стерильной воды. Образцы ризосферы и ризопланы отдельно обрабатывают ультразвуком на установке УЗДН-1 (22 кГц, 0,44 А, 2 мин). Производят посев из разведений на плотные питательные среды (Кожевин, 1989).

Методы изучения образования клубеньков на корнях бобовых и небобовых растений. Клубеньки на корнях бобовых растений можно наблюдать, помещая корень в специальный фиксирующий раствор (рис. 20).

Процесс инокуляции растений культурами бактерий и актиномицетов для образования клубеньков на корнях бобовых (клевера, гороха, сои) и небобовых (ольхи, облепихи) растений проводят по методу Фереуса. Два предметных стекла толщиной 0,7— 0,8 мм с проложенной между ними с одного конца стеклянной пластинкой располагают так, чтобы край одного стекла выступал над краем другого примерно на 3— 5 мм, и прочно связывают нитками. Стеклянные пластинки для прокладки готовят из покровных стекол. Систему стекол стерилизуют в автоклаве в чашках Петри. Заполняют пространство между предметными стеклами стерильной расплавленной агаризованной минеральной средой следующего состава (г/л): CaCl_2 - 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,12; KH_2PO_4 - 0,1; Na_2HPO_4 - 0,15; лимоннокислое железо - 0,005; следы Мп, Си, В, Мо; агар - 6; рН 6,6 (доводят серной кислотой).

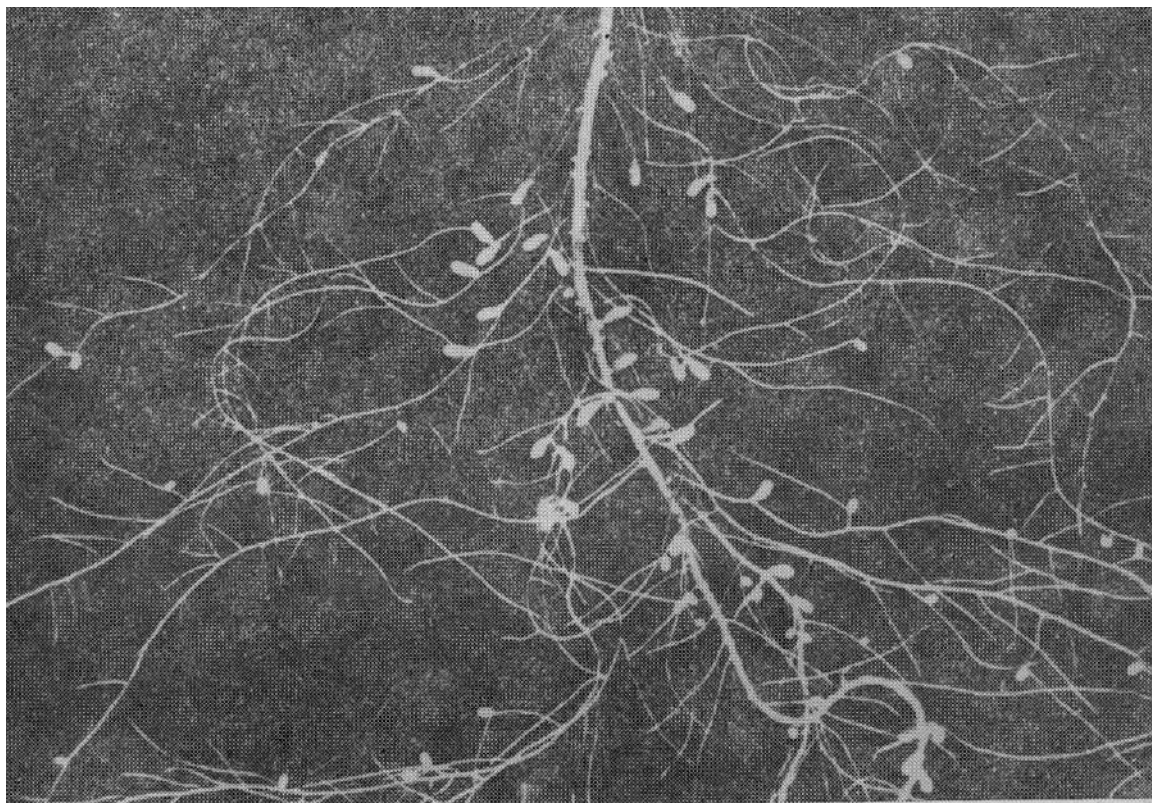


Рис. 20. Клубеньки на корнях гороха

В полужидкий агар между стеклами помещают 3—4 проростка растений и системы опускают в стаканчики с ватными пробками, в которые налита жидкая минеральная среда того же состава (рис 21). Через сутки проростки инокулируют суспензией 2—3-суточных культур клубеньковых бактерий или актиномицетов рода *Frankia*. Для микроскопирования препарата бритвой срезают нитки, удаляют одно стекло, на агар наносят каплю воды, на нее помещают покровное стекло. Наблюдают за образованием клубеньков на корнях инокулированных растений.

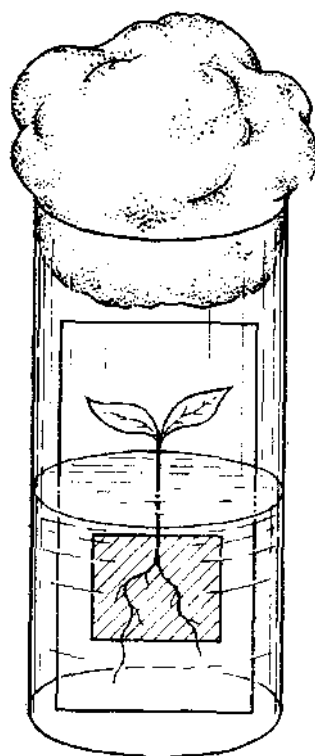


Рис.21. Схема установки для искусственного получения клубеньков на корнях растений

Определение токсического влияния почвенных микроорганизмов на растения. Почвенные микроорганизмы способны образовывать вещества различной химической природы, подавляющие рост растений, — фитотоксины. Накопление в почве токсинов обуславливает токсические свойства почв, определяемые следующим методом. Испытуемую почву с

помощью пинцета освобождают от крупных корневых остатков и тщательно перемешивают металлическим шпателем. Навеску 60 г помещают в чашку Петри (опыт проводят нестерильно). Почву увлажняют водой до состояния густой пасты и тщательно размазывают по чашке Петри. На поверхность почвенной пластинки раскладывают от 10 до 50 семян испытуемого растения (в зависимости от их размера), предварительно замоченных в водопроводной воде в течение суток. Обычно используют семена культур, возделываемых на изучаемых почвах. Контрольные семена раскладывают на увлажненной вате, покрытой фильтровальной бумагой. Семена проращивают в течение 5—7 дней при постоянной температуре во влажной камере.

Степень токсичности почвы определяют по разнице в количестве проросших семян и длине проростков и корней в опыте и контроле. Токсичными считают почвы, вызывающие угнетение прорастания семян на 20—30% и более. Определение токсичности почвы рекомендуется проводить на свежих образцах почвы, так как после хранения образцов токсичность их значительно меняется.

Метод определения микробного токсикоза. Метод Гузева отличается тем, что позволяет вычленить микробную токсичность из общего токсикоза почвы. С помощью этого метода способность к токсинообразованию у микроорганизмов определяется непосредственно в почве по отношению к высшим растениям и микроскопическим беспозвоночным животным.

На поверхность почвенной пластинки в чашке Петри наносят тонкий слой крахмала полоской в 1 см по диаметру чашки. Почву инкубируют во влажной камере в течение месяца при 25°. Затем на крахмальную полоску раскладывают 15—20 семян кресс-салата и редиса. Контролем служат семена растений, помещенные на поверхность почвы без крахмала. Через 3—5 суток измеряют длину корешков и проростков у опытных и контрольных растений и по разнице в их длине судят о микробном токсикозе.

Микробную токсичность по отношению к микроскопическим беспозвоночным животным оценивают по степени поедаемости ими первичных

деструкторов крахмала (грибов, актиномицетов, бактерий).

Использование азотобактера как тест-организма для определения токсических свойств почвы. Агаризованную среду Эшби разливают в стерильные чашки Петри и после застывания среды покрывают ее стерильными пластинками целлофана, который тщательно расправляют на поверхности агара металлическим шпателем. Целлофан предварительно нарезают кружками по размеру чашки Петри и во влажном состоянии стерилизуют в автоклаве. На поверхность целлофана в центр чашки Петри помещают испытуемую почву на площади диаметром 2 см. Почву предварительно увлажняют до пастообразного состояния. На дне чашки карандашом по стеклу отмечают границы почвенной лепешки. Чашки инкубируют в термостате при 28° в течение суток. Через сутки целлофан вместе с почвой снимают с агара, а среду засевают суточной культурой *Azotobacter chroococcum*. В случае наличия токсических веществ в почве азотобактер не вырастает на пластинке агара в том месте, где находилась почва, здесь на газоне образуется стерильная зона. В качестве тест-микроорганизмов могут быть использованы и другие культуры, в таком случае выбирают соответствующие питательные среды для их развития. Учет опыта производится после проявления роста тест-микроба, по измерению диаметра стерильной зоны.

Определение токсических свойств чистых культур микроорганизмов. Для определения токсичности выделенных из почвы культур микроорганизмов их предварительно выращивают в жидких питательных средах в покое или на качалке. Определение токсичности культуральной жидкости производят у бактерий на 2—3-й день, у актиномицетов на 5—10-й день, у грибов на 7—10-й день роста. В качестве тестов для определения токсинов используют семена различных растений. Токсичность микроорганизмов определяют методом замочки семян.

Отфильтрованную культуральную жидкость разливают в стаканчики на 100 мл, отбирают по 20—50 семян растений, замачивают их в каждом сосуде на 24 ч. Для контроля семена замачивают на тот же срок в водопроводной воде и в стерильной питательной среде. Те и другие семена раскладывают на

увлажненной вате с фильтровальной бумагой в чашках Петри. Все чашки увлажняют равным количеством водопроводной воды. Токсичными считают культуры микроорганизмов, вызывающие либо снижение всхожести семян, либо угнетение развития проростков и корней более чем на 30% по сравнению с контролем.

Применение электронного микроскопа для наблюдения за взаимодействием микроорганизмов и растений. Эпифитные микроорганизмы, развивающиеся на поверхности стеблей, листьев и семян растений (микроорганизмы филлосферы), и микроорганизмы, развивающиеся на корнях растений (микроорганизмы ризопланы), можно наблюдать с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ). На препаратах, приготовленных из семян, листьев и корней растений, можно проследить за развитием микроколоний бактерий, дрожжей, грибов, выявить особенности прикрепления микробов к поверхности растительных тканей (рис. 22).

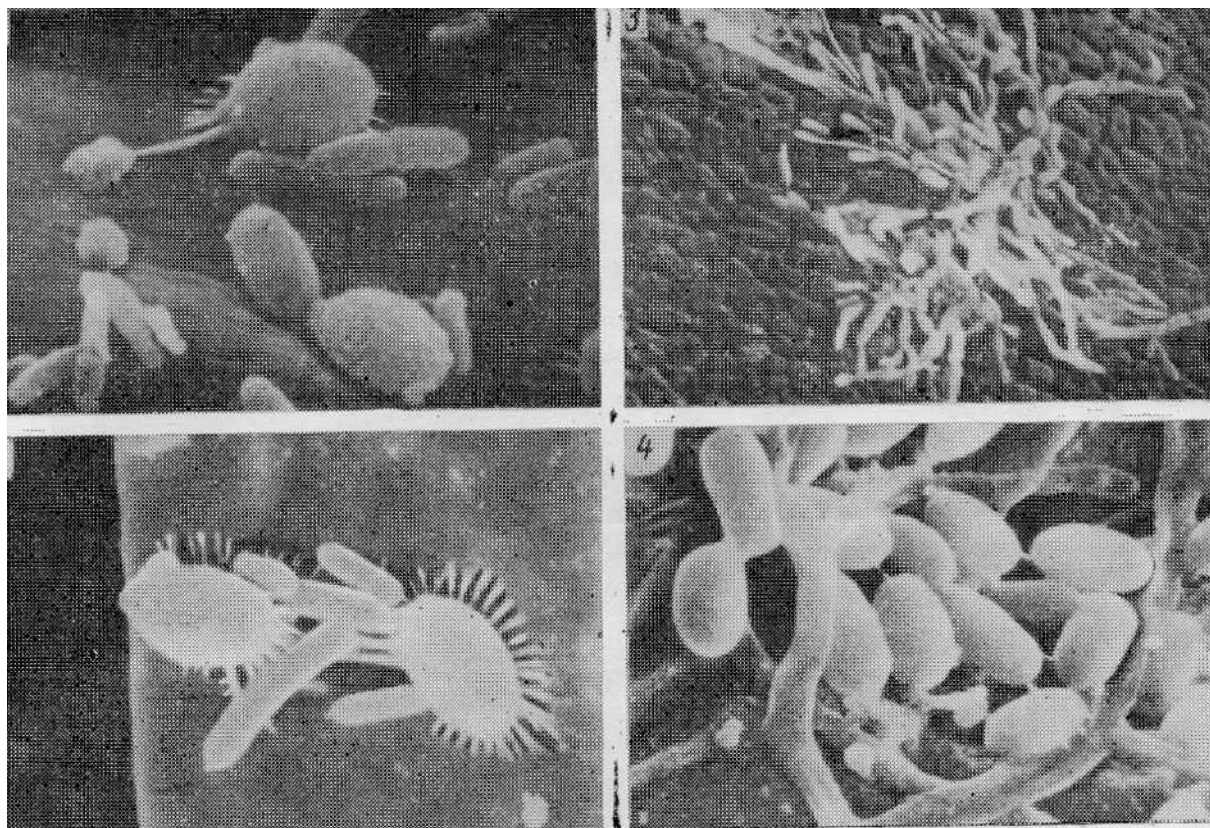


Рис 22 Микроорганизмы на поверхности растительных тканей (фото В.С.Гузева):

1, 2 — на корне пшеницы; 3 — на зерне пшеницы; 4 — на хвое ели

Электронный микроскоп используется для наблюдения за симбиотическими взаимоотношениями низших растений — водорослей и гетеротрофных микроорганизмов — грибов и актиномицетов. Взаимодействие грибов и водорослей приводит к образованию лишайника (рис.23). В лаборатории при совместном выращивании актиномицета и зеленой водоросли хлореллы образуется актинолишайник, таллом которого напоминает таллом природных лишайников, состоящих из грибов и водорослей. В природе развитие альгоактиномицетных ассоциаций наблюдается на выходах карбонатных пород (рис.23).

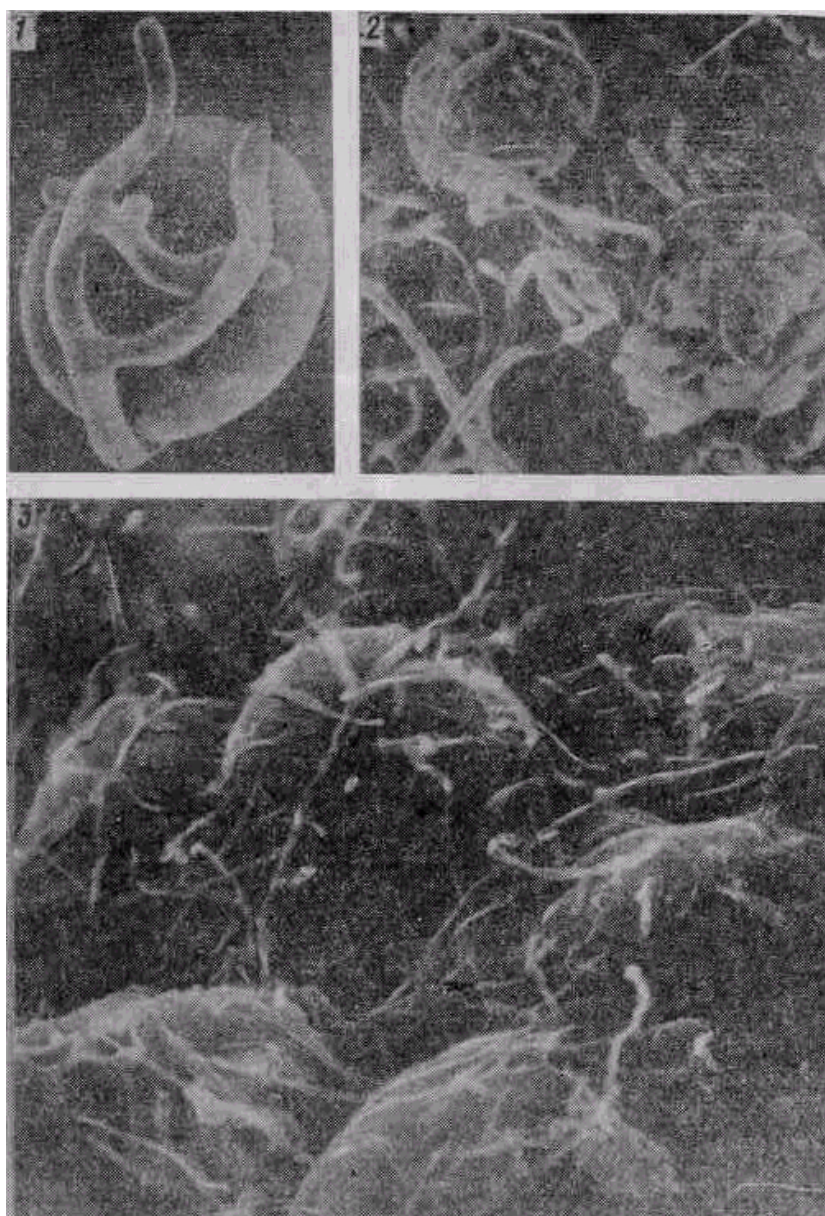


Рис. 23. Гифы грибов (1, 2), оплетающие клетки водорослей при образовании лишайника; гифы актиномицетов (3), оплетающие клетки водорослей в альгобактериальных ценозах

Исследование взаимоотношений микроорганизмов и почвенных беспозвоночных животных

Наблюдения за взаимоотношениями в культурах простейших с бактериями. Почвенные простейшие питаются избирательно различными бактериями. Для демонстрации этого явления выделяют чистые культуры наиболее распространенных и характерных почвенных простейших: из жгутиконосцев, например *Bodo*, амёб — *Vohldkampfia limax*, *Hartmanella rhyzodes*, инфузорий — *Colpoda*. Для получения чистых культур простейших их культивируют на массе клеток *Azotobacter chroococcum*, вырастающих на среде Федорова с микроэлементами следующего состава (г/л): сахароза - 20,0; K_2HPO_4 - 0,3; $CaHPO_4$ - 0,2; K_2SO_4 - 0,2; $MgSO_4$ - 0,3; NaCl - 0,5; $FeCl_3$ - 0,01—0,1; $CaCO_3$ - 5; смесь микроэлементов - 1 мл. Смесь микроэлементов (г/л дистиллированной воды): H_3BO_3 - 5,0; $(NH_4)_2MoO_4$ - 5,0; KI - 0,5; NaBr - 0,5; $ZnSO_4$ - 0,2; $Al_2(SO_4)_3$ - 0,3. Бактерии выделяют и культивируют на элективных средах: олигонитрофилы — на среде Эшби, нитрифицирующие бактерии - на среде Виноградского, денитрифицирующие - на видоизмененной среде Гильтая; аэробные целлюлозоразлагающие бактерии - на среде Гетчинсона; аммонифицирующие бактерии — на МПА с суслон или МПА. Перед опытом в каждом варианте определяют плотность популяции данного вида простейших и бактерий. Для определения интенсивности развития протистов на различных бактериях в каждую пробирку с развивающимися бактериями вносят по 2 мл культуры простейших. Для сравнения полученных результатов интенсивность развития протистов выражают в процентах, принимая за 100% рост на олигонитрофильных микроорганизмах.

Азотобактер — хороший пищевой источник для протистов. Взаимоотношения между азотобактером и почвенными простейшими сложны и включают не только истребление одного организма другим, но и элементы симбиоза. Эксперименты по влиянию простейших на фиксацию азота и интенсивность развития азотобактера проводят в смешанных культурах

бактерий и простейших. Выращивают простейшие путем повторных пересевов их в культуру азотобактера на элективной среде Федорова, что позволяет освободиться от посторонних бактерий.

Опыт проводят в течение 7—10 дней при 26°. Плотность популяции азотобактера определяют методом разведений, подсчет простейших в жидких средах проводят микроскопически.

Методы исследования взаимоотношений почвенных беспозвоночных с макро- и микромицетами. Почвенные беспозвоночные животные питаются грибами, причем отношения их могут быть различными. Мицелий гриба может служить единственным источником питания для животного длительное время, либо мицелий может служить в качестве части пищи животного, либо мицелий губительно влияет на животное.

Для выяснения взаимоотношений между коллемболами, энхитреидами, дождевыми червями, с одной стороны, и грибами — с другой, в чашки Петри с сусло-агаром и культурой гриба "подсаживают" животных. Затем прослеживают поведение животных на культуре грибов. Отмечают степень поедаемости мицелия, подвижность животных, возможность завершения цикла и рост (линьки), смертность животных.

Например, при соприкосновении с грибами моховиком желто-бурым, лисичкой настоящей, чесночником, некоторыми несовершенными микромицетами (*Alternaria tenuis*, *Penicillium verrucosum* var *cyclopium*) коллемболы и энхитреиды пытаются скрыться в агаре, проедая в нем ходы и "колодцы", концентрируются в дальнем от гриба месте чашки. Если же коллембол подсаживают на мицелий мухомора красного, березовика, свинушек толстой и тонкой, белого гриба или козляка, то беспозвоночные существуют 10—15 дней и питаются мицелием, сохраняя подвижность. На мицелии лаковицы розовой, строфании Горнемана, строчка обыкновенного, дождевика шиповатого коллемболы могут жить и размножаться длительное время.

Дождевые черви и энхитреиды, как правило, не употребляют в пищу высших грибов. Коллемболы и личинки двукрылых активно питаются

мицелием многих грибов.

Для исследования возможности распространения мицелия и спор грибов с экскрементами животных последних стерилизуют стрептомицином с поверхности и пересаживают в чашки Петри со стерильным сусло-агаром. Затем прослеживают рост грибов на питательной среде. Споры *Penicillium verrucosum* var *cyclopium* и *Fusarium oxysporus*, попадая в кишечник вместе с гифами в процессе питания, активно переносятся животными через экскременты. Споры *Alternaria tenuis* перевариваются в кишечнике *коллембол* и личинок двукрылых сем. *Sciaridae*. Опыты по пересадке животных с отмытой, но не простерилизованной поверхностью тела показали, что мицелий грибов активно распространяется животными.

Наблюдения за питанием простейших дрожжами. Первый метод. На чашки Петри с голодным агаром наносят штрихи дрожжей длиной 2 см. Предварительно готовят густую суспензию дрожжей и петель по трафарету, подкладываемому под чашку, наносят штрихи с двойной повторностью. В конец каждого штриха инокулируют цисты и вегетативные клетки амёб. Наблюдение проводят на 3—4-е сутки. Отмечают наличие в препаратах амёб с клетками дрожжей (рис.24) степень выедания штриха дрожжевых клеток амёбами, инцистирование амёб. Полное выедание штриха дрожжей *Cryptococcus albidus* отмечается, например, клетками амёб *Hartmanella rhyzodes*, *Vahlkampfia limax*. На некоторых видах дрожжей амёбы инцистируются до того как выедают штрих полностью.

Второй метод. В большие пробирки наливают по 1мл физиологического раствора и стерилизуют. В пробирки вносят смешанные культуры различных дрожжей и амёб. Стерильной пипеткой каплю смеси помещают в камеру Горяева и просчитывают отдельно амёбы и дрожжи. Затем пробирки помещают в термостат на 24° и делают просчеты через каждые 12 ч. Учитывают изменение числа вегетативных клеток и цист амёб и дрожжей в совместной культуре, изменение морфологии дрожжевых клеток.

Взаимоотношения водорослей и почвенных беспозвоночных животных. При выращивании водорослей на мембранных фильтрах, помещенных на почву, отмечается поселение простейших, в частности амёб, клещей, энхитреид. Уменьшение количества водорослей на фильтрах или полное их исчезновение в результате выедания заметно макроскопически.

Опыт по выявлению выедания почвенных водорослей энхитреидами проводят следующим образом. В чашки Петри помещают по 5 г почвы, увлажненной до пастообразного состояния. Через два дня чашки с почвой стерилизуют при 1,5 атм 45 мин. На приготовленные таким образом почвенные пластинки помещают мембранные фильтры (с диаметром пор менее 1 мкм), на которые наносят по 1 мл суспензии водорослей (представителей родов *Chlorella* или *Chlamydomonas*) с ранее установленным титром. В опытные чашки с фильтрами помещают по три особи энхитреид, в контрольные — водоросли или энхитреиды отдельно.



Рис.24 . Почвенные амёбы, питающиеся дрожжами

Чашки инкубируют при освещении 1300 лк. Через 2—3 недели учитывают количество водорослей на фильтрах. Массу водорослей снимают с поверхности фильтра, разбивают с помощью гомогенизатора и подсчитывают в камере Горяева. Чтобы иметь представление не только о численности съеденных водорослей, но и об их биомассе, определенный объем суспензии водорослей с установленным титром фильтруют через заранее взвешенные бумажные фильтры. Фильтры высушивают при 105° и определяют абсолютно сухой вес водорослей. Затем подсчитывают вес одной клетки водорослей и проводят пересчет численности съеденных клеток на биомассу. Количество энхитреид в почве учитывают путем тщательного просматривания под бинокулярной лупой.

Методы исследования взаимоотношений почвенных беспозвоночных с микроорганизмами. Для определения характера связей почвенных микроорганизмов и беспозвоночных, выявления симбиотических и антагонистических отношений между ними изучают микроорганизмы в кишечниках, пище, экскрементах животных. Правильные сравнительные результаты получают только при равномерной заполненности кишечников животных пищей, т. е. в период активного насыщения. Пустые кишечники исследуют в случае изучения облигатного симбиоза — специфической микрофлоры пищеварительного тракта или внутриклеточных симбионтов.

Объектами микробиологического анализа при изучении зоомикробных взаимоотношений являются : пищевой субстрат беспозвоночных (листовой или хвойный опад, компост, почва и др); содержимое кишечника животных; поверхность кишечного эпителия; специализированные органы и ткани (мицетомы, клетки эпителия и др.); экскременты; поверхность тела и конечностей животных.

Для изучения микроорганизмов, находящихся на поверхности тела животного, делают смыв с нее и высевают на плотные питательные среды.

Для анализа микроорганизмов содержимого кишечника используют "сытых" особей, т.е. животных, нормально питающихся до начала посева.

Одновременно анализируют две группы по 5 особей. Животных обездвигивают в кипятке в течение 1-2 с и вскрывают в стерильных условиях.

При аккуратном вскрытии стерильными инструментами поверхностная стерилизация животного не обязательна, так как возможно избежать соприкосновения кишечника с внешней стороной тела. Животного перед вскрытием можно обработать гипохлоритом натрия или спиртом. Мелких животных (энхитреид, коллембол) отмывают при вращении сосуда с кипяченой водой, затем в стерильной воде со стрептомицином (1:10). Последний смыв высевают для контроля стерильности на МПА, КАА, сусло-агар.

Поверхность панцирных клещей стерилизуют свежеприготовленной хлорноватистой кислотой. Орибатида для изучения микроорганизмов кишечника заливают в парафиновый блок, срезы готовят стерильным скальпелем.

Животных вскрывают стерильным скальпелем, отделяют и извлекают кишечника. При малых размерах животных не выделяют их кишечника. В этом случае из тел беспозвоночных с отмытой и простерилизованной поверхностью тела готовят гомогенат, который затем высевают на среду.

Кишечник разделяют на отделы – передний, средний и задний, каждый из которых стерильно вскрывается при помощи иглы под контролем в бинокулярной лупе. Из кишечника достают содержимое и помещают на влажную стерильную фильтровальную бумагу. Содержимое кишечника 5 –ти особей взвешивают (параллельно определяют влажность содержимого, высушивая его при 105°), добавляют 2 капли стерильной воды и растирают в ступке пестиком с резиновым наконечником. Объем гомогената доводят до 3 мл стерильной водой. Посев производят либо без разведения, либо из разведений 1:10, 1:100 микродозатором по 50 мкм на чашку в 5-10 повторностях.

Для анализа микроорганизмов, адсорбированных на кишечном эпителии, используют "голодных" особей. Животных отсаживают с опадом на несколько суток на влажную фильтровальную бумагу для освобождения кишечника от содержимого. Кишечник стерильно изолируют и разделяют на отделы, не

вскрывая. Каждый отдел прополаскивают последовательно в трех порциях стерильной воды. Материал от 5 особей собирают в бюксы, взвешивают и растирают в агатовой ступке с 2 каплями воды пестиком с резиновым наконечником. Параллельно определяют влажность образцов. В ступку добавляют 2 мл стерильной воды и гомогенат доводят до 3 мл. Для посева берут 25-100 мкл гомогената. Иногда используют 10-кратные разведения гомогената.

Выделение микроорганизмов из экскрементов методически близко выделению из содержимого кишечника. По 5 активно питающихся особей отсаживают на стерильную фильтровальную бумагу на 1 сут, по прошествии которых экскременты собирают и взвешивают (параллельно определяют влажность экскрементов). Готовят гомогенат, производят посев из разведений 1:10, 1:100. Важно разделить "свежие" и "стареющие" экскременты, состав и организация микробных сообществ которых существенно различаются.

Микробиологическое разложение растительных остатков протекает в экскрементах значительно быстрее, чем в почве, активизируясь после прохождения через кишечник животных. Исследование экскрементов дождевых червей, например, выявляет в 3 раза больше бактерий, растущих на МПА, в 4 раза — бактерий, растущих на КАА, в 6 раз больше актиномицетов, в 2—15 раз больше грибов по сравнению с почвой. Для изучения влияния экскрементов на развитие микробиологических процессов в почве используют и другую методику (Количественные методы в почвенной зоологии., 1987). Стерильно полученными экскрементами заражают стерильную почву и исследуют в ней изменение численности и состава микроорганизмов. Стерильные экскременты получают двумя способами:

- 1) стерилизуют поверхность тела животных (абсолютным спиртом, водой со стрептомицином в отношении 1:10, хлорноватистой кислотой), предварительно несколько раз помещая животных в воду для отмывания прилипших комочков почвы, собранные экскременты помещают в стерильную почву;

2) животных со стерильной поверхностью тела сажают в стерильную почву и прослеживают за развитием в ней микроорганизмов. Проводят микробиологические анализы экскрементов, изолированных из почвы или находящихся в почве. Контролем служит почва без животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВ

Биологическую активность почв определяют, пользуясь самыми различными микробиологическими (прямой подсчет микроорганизмов разных групп – бактерий, актиномицетов, грибов – и определение количества микробных зачатков на разных питательных средах), биохимическими (определение ферментативной активности почв, АТФ, ДНК), физиологическими (физиологический метод определения биомассы микроорганизмов, определение дыхания почв) и химическими (определение нитратов, нитритов, аммония) методами.

Все методы можно разделить на две группы:

1) методы определения актуальной (полевой) биологической активности в почвах (полевые методы определения дыхания, азотфиксации, денитрификации, некоторые изотопные методы);

2) методы определения потенциальной биологической активности почв, т.е. той активности, которая обнаруживается в лаборатории при оптимальных условиях для протекания данного процесса (определение ферментативной активности почв, лабораторные методы определения нитрификации, азотфиксации, денитрификации, интенсивности дыхания). Ко второй группе методов относятся и определение численности микроорганизмов прямыми методами или посевом, определение ДНК, мурамовой кислоты, хлорофилла, физиологический метод определения микробной биомассы, так как они позволяют определить только потенциальные возможности микроорганизмов в почве, но не дают представления об активной части микроорганизмов в определенный момент (Звягинцев, 1987).

Метод определения дыхания почвы. Определение скорости эмиссии CO_2 из почвы в атмосферу (дыхания почвы) проводят камерно-эмиссионным методом (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991).

Изолятор представляет собой цилиндр из нержавеющей стали высотой 10—20 и диаметром 5—15 см. Его врезают в почву на глубину 3—5 см и выдерживают в течение 15—30 мин, отбирая в динамике пробы воздуха из изолированного объема надпочвенной атмосферы. Для отбора проб в стальных изоляторах имеются отверстия, закрытые резиновыми пробками. Отбор производят шприцами типа «Рекорд» объемом 10—20 см³. Пробы до анализа хранят в пенициллиновых или инсулиновых флакончиках с водно-солевыми (NaCl) растворами. После транспортировки в лабораторию производят определения концентрации CO_2 в пробах методом газовой хроматографии. Условия определения: детектор по теплопроводности (катарометр), колонки с носителем Рагарак-Q (0,3x350 см), газ-носитель гелий (25 мл/мин), температура колонки 40°. Отбор газовых проб производят в динамике немедленно после установки изолятора (c_0) и дважды через равные промежутки времени τ (c_1 и c_2). Величину τ выбирают таким образом, чтобы она соответствовала началу замедления накопления газа в камере. Динамика накопления газа в камере зависит не только от интенсивности его выделения, но и от газопроницаемости почвы, а также от высоты изолятора. Расчет газопроницаемости (D') почвы ведут по формуле

$$D' = -H/\tau \ln \{(C_1 - C_0)/(C_2 - C_1)\}$$

Скорость эмиссии газа определяют по формуле

$$F = D'(C_1 - C_0) / \{1 - \exp(-D'\tau/H)\}.$$

Пример. Получены следующие величины C (мкг CO_2 —C/см³):

$C_0=0,1$; $C_1=0,29$; $C_2=0,41$ мкг CO_2 —C/см³. Расчет по формулам приводит к следующим результатам: $D'=0,12$ см/мин; $F=0,203$ мкг CO_2 — C/см⁺²/мин.

Метод инициированного микробного сообщества: С помощью сканирующего электронного микроскопа в сочетании с классическими методами микробиологии изучается структура и особенности инициированного субстратом сообщества почвенных микроскопических обитателей. Отмечают доминирование и соотношение отдельных групп бактерий, актиномицетов, грибов, водорослей, простейших и микроскопических беспозвоночных животных (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991).

Метод заключается в следующем. Нестерильную почву в воздушно-сухом состоянии растирают в ступке, предварительно удалив крупные корешки, просеивают через сито 1 мм, увлажняют дистиллированной водой до 60% полевой влагоемкости и тщательно перемешивают. Пастообразную массу почвы вносят в маленькие чашки Петри диаметром 4 см до краев и слегка уплотняют шпателем так, чтобы образовалась ровная поверхность. На поверхность почвенной пластинки в чашке Петри наносят тонкий слой крахмала полоской в 1 см по диаметру чашки. Для этого на тонкий слой крахмала осторожно накладывают два чистых листа бумаги так, чтобы расстояние между ними было 1 см; чашку с почвой переворачивают и по диаметру чашки прикладывают на 1 с к образовавшейся полоске. Лишнее количество крахмала сдувают сжатым воздухом так, чтобы на почве осталась тонкая полоска не более двух-трех слоев крахмальных зерен. Чашки с почвой помещают в другие чашки большего размера, на дно которых налита дистиллированная вода для поддержания постоянной влажности. В таком состоянии чашки инкубируют при 25° в термостате в течение 2—3 недель.

За развитием микроорганизмов на полоске крахмала наблюдают визуально с помощью лупы, светооптического и сканирующего электронного микроскопов. В сканирующем микроскопе наблюдают развитие бактерий, актиномицетов, грибов, водорослей и беспозвоночных животных (рис.25).

При использовании описанного подхода в макромасштабах воспроизводится аэробная микрозона, обогащенная органическим веществом

(крахмалом). С помощью этого метода удалось установить, что обычно в заданных узких условиях процесс ведут несколько доминирующих видов. Антропогенные воздействия (удобрения, пестициды, загрязнения в виде тяжелых металлов); независимо от природы действующего фактора, изменяют микрофлору, активно ведущую процесс в соответствии с общими законами. Подход дает возможность определять ряд микробиологических характеристик почв, в том числе и допустимые нагрузки того или иного фактора на почву. При увеличивающихся нагрузках каждый фактор вызывает в микробном сообществе изменения, соответствующие следующим состояниям системы: состоянию гомеостаза, стресса, развития резистентных форм, репрессии.

Ацетиленовый метод определения потенциальной активности азотфиксации. 5 г освобожденной от корешков и просеянной через сито с диаметром ячеек в 1 мм почвы помещают в пенициллиновый флакон, вносят 1-2% глюкозы (от веса абсолютно сухой почвы) и увлажняют стерильной водой до влажности 60% полевой влагоемкости. Почву перемешивают стеклянной палочкой до получения однородной по влажности массы, закрывают флакон ватной пробкой и помещают в термостат на 28°. Из каждого почвенного образца отбирают не менее трех навесок для определения потенциальной активности азотфиксации. Через сутки инкубации в термостате закрывают флаконы резиновыми пробками и вводят в каждый флакон по 0,5 мл ацетилена, после чего вновь помещают их в термостат на 1 ч. Через час из каждого флакона отбирают газовую пробу в 0,5 мл и вводят ее в газовый хроматограф. В параллельной навеске проводят контрольное определение на восстановление ацетилена до этилена во флаконе с 5-тью мл воды при отсутствии почвы. Колонка газового хроматографа обеспечивает разделение газов метана, пропана, этилена, ацетилена. Объем пробы газовой смеси 0,5 мл. Пробу вводят медицинским шприцем. Расчет величины активности азотфиксации проводят, исходя из того, что соотношение между количеством образованного этилена и соответствующим количеством азота составляет 3:1, т. е. результат, полученный для этилена делят на 3, чтобы получить величину активности

фиксации азота. После окончания измерений резиновые пробки вновь заменяют на ватные, флаконы ставят на сутки в термостат, после чего определение повторяют до тех пор, пока в двух соседних по времени пробах количество этилена не будет отличаться более чем на 5%. Потенциальную активность азотфиксации выражают в миллиграммах фиксированного азота на килограмм почвы за час (мг/кг/ч).

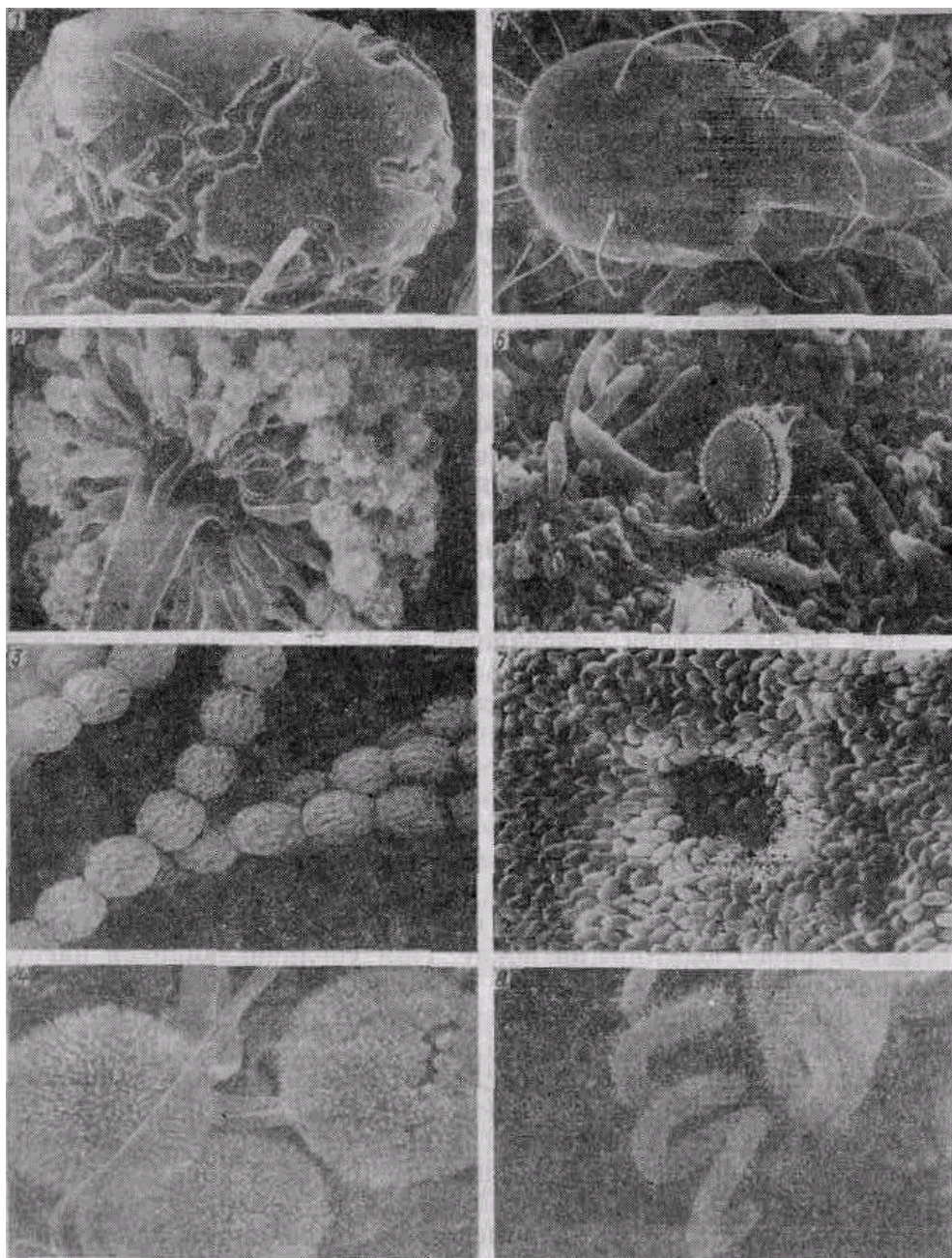


Рис. 25. Организмы иницированного крахмалом микробного сообщества почвы (фото В. С. Гузева).

1 - разложение крахмального зерна грибами; 2-4 - грибы; 5 — клещ; 6 — раковина диатомовой водоросли; 7 — бактерии; 8 — актиномицет

Определение потенциальной активности денитрификации в почве.

Навеску воздушно-сухой почвы (5 г) помещают в пенициллиновый флакон объемом 15 мл, увлажняют до 60% от полевой влагоемкости и инкубируют при 28° 2—3 суток. После этого вносят глюкозу (2,5 мг/г), нитрат калия (0,2 мг/г), добавляют 5 мл стерильной дистиллированной воды, флаконы закрывают резиновыми пробками, которые фиксируют зажимами. Воздух вытесняют аргоном и вводят 1 мл ацетилена. После этого флаконы тщательно встряхивают, переворачивают вверх дном и инкубируют при 28° 1—24 ч. Анализ газов проводят на газовом хроматографе М-3700 с детектором по теплопроводности. Длина колонки — 3,5 м, диаметр — 3 мм, наполнитель Рагарак-Q, ток питания катарометра — 148 мА, температура испарителя термостата — 30°. Расход газа носителя (гелия) — 30 мл/мин. Активность денитрификации выражают в миллиграммах азота на 1 кг почвы за час (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991).

Методы определения в почве активности ферментов. Наиболее простыми из них по выполнению являются методы определения активности дегидрогеназ и инвертазы (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991).

Для определения активности **дегидрогеназ** в почве в качестве акцептора водорода применяют бесцветные соли тетразолия (2, 3, 5-трифенил-тетразолий хлористый, ТТХ), которые восстанавливаются в красные соединения формазанов (трифенил-формазан, ТФФ). Навеску почвы 1 г помещают в 50-миллилитровую вакуумную колбу с притертыми стеклянными пробками, добавляют 10 мг углекислого кальция и тщательно смешивают. Для определения дегидрогеназ лучше использовать свежие образцы почвы, так как при высушивании образцов почвы активность дегидрогеназы падает до 50—80% (для дерново-подзолистой почвы). Затем добавляют 1 мл 1%-ного раствора ТТХ. Определение проводят в анаэробных условиях, для этого воздух из колбы эвакуируют при разрежении 10—12 мм рт. ст. в течение 2—3 мин. Колбы осторожно встряхивают и ставят в термостат при 38° на 24 ч. Контролем служит стерилизованная почва и субстраты без почвы. После окончания

инкубации в колбы добавляют по 25 мл этилового спирта и встряхивают в течение 5 мин. Содержимое колбы фильтруют и полученный раствор ТФФ анализируют на фотоэлектроколориметре, используя кюветы шириной 5 мм и синий светофильтр с длиной волны 500—600 нм. Количество формазана в мг рассчитывают по стандартной кривой. Для составления калибровочной кривой готовят стандартный раствор формазана в этиловом спирте (0,1 мг в 1 мл), затем в мерные колбы на 25 мл берут соответствующее количество стандартного раствора, содержащее от 0,1 до 1,0 мг формазана, этанолом доводят до метки и фотоколориметрируют согласно вышеописанному способу. Активность дегидрогеназ выражают в миллиграммах ТФФ на 10 г почвы за сутки. Ошибка определения — до 8%.

Фотоколориметрический метод определения активности **инвертазы** заключается в следующем. В колбу емкостью 50 мл помещают 5 г почвы, добавляют 10 мл 5%-ного раствора сахарозы, 10 мл ацетатного буфера (рН 4,7) и 5—6 капель толуола. Колбы закрывают пробками, встряхивают и помещают в термостат при температуре 30° на 24 ч, периодически встряхивая их. Контроль — стерилизованная почва (3 ч при 180°) и чистый субстрат.

После инкубации содержимое колб фильтруют в 100-миллилитровые мерные колбы. Из фильтра берут 6 мл в большие пробирки, добавляют 3 мг сегнетовой соли и 3 мл раствора сернокислой меди, хорошо перемешивают и кипятят на водяной бане в течение 10 мин. Затем пробирки с раствором охлаждают в холодной воде, содержимое переносят в пробирки и центрифугируют в течение 5—7 мин при 3000 об/мин. Прозрачный центрифугат колориметрируют на фотоэлектроколориметре (светофильтр — 630 нм), кюветы шириной 1 см. Количество глюкозы рассчитывают по предварительно составленным калибровочным кривым. Исходный стандартный раствор — 6 мг глюкозы в 1 мл. Активность инвертазы выражают в миллиграммах глюкозы на 1 г почвы за сутки. Ошибка определения — до 5%.

Весьма плодотворной является оценка обогащенности генетических

горизонтов микроорганизмами и ферментами по всему почвенному профилю в различных типах почв, предложенная Д. Г. Звягинцевым, согласно которой активность почвенных ферментов рассчитывается на столбик с площадью сечения в 1 см^2 с учетом глубины исследуемого слоя почвы.

Методы определения биомассы микроорганизмов в почве. Наиболее эффективными и современными являются **регидратационный** и **кинетические** методы (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991).

Принцип **регидратационного метода** определения микробной биомассы в почве состоит в следующем. Мягкое высушивание почвы ($65\text{—}70^\circ$, 24 ч) избирательно действует на живые микробные клетки, происходит нарушение целостности цитоплазматических мембран, которое может быть в зависимости от природы конкретного микроорганизма полным (необратимым) или обратимым. На мертвое органическое вещество почвы высушивание при относительно низкой температуре практически не действует. В ходе регидратации высушенной почвы (встряхивании почвенного образца с водой или слабым раствором нейтральной соли) внутриклеточные компоненты высвобождаются в раствор и могут быть определены любым достаточно чувствительным аналитическим методом. В практике микробиологических исследований содержание клеточных компонентов определяют по сумме органических соединений, по N-содержащим соединениям, калию и фосфору. Кроме того, можно оценивать соединения индивидуальной природы, находящиеся до момента высушивания внутри клеток почвенных микроорганизмов — нуклеиновые кислоты, полисахариды, белки. Вариант регидратационного метода с регистрацией количества микробной массы по сумме органических веществ состоит в следующем: 5 г почвы помещают в коническую колбочку на 50 мл и оставляют в термостатируемом сушильном шкафу при температуре $65\text{—}70^\circ$ на сутки. Затем готовят вытяжку из почвы $0,5 \text{ M K}_2\text{SO}_4$ (соотношение почва : раствор равняется 1:5 для почв с высоким содержанием ОВ и 1:2 для бедных почв), встряхивая суспензию на качалке или вручную в течение 30 мин. Суспензию центрифугируют и в надосадочной

жидкости определяют содержание органических веществ методом бихроматного окисления. Для этого 1,6 мл прозрачной вытяжки смешивают с 2,4 мл сернохромовой смеси (готовят, растворяя 6 г $K_2Cr_2O_7$ в 400 мл воды, затем приливают 2 л концентрированной H_2SO_4), пробирки помещают в термостат при 140° на 20 мин, охлаждают и спектрофотометрируют при 590 нм. В качестве стандартов используют растворы глюкозы в концентрационном диапазоне 100—500 мг С/л. Параллельно ставят контрольное определение с почвой без высушивания. Количество микробной биомассы рассчитывают по формуле

$$x = \frac{c - c_0}{0,3},$$

где x — углерод микробной биомассы (мкг/г почвы); c и c_0 — количество водорастворимых соединений в почве после высушивания и в свежем образце соответственно; 0,3 — пересчетный коэффициент, равный доле солюбилизирующихся после регидратации клеточных компонентов.

В работе используются только свежие почвенные образцы, в воздушно-сухих почвенных образцах биомасса микроорганизмов резко снижается.

Принцип кинетических методов определения биомассы микроорганизмов в почве состоит в следующем. Скорость любого микробиологического процесса (нитрификации, потребление органических веществ или их окисления до CO_2 , нитратредукции, азотфиксации, окисления Fe и прочих) зависит в основном от трех факторов: количества (биомассы) соответствующих микроорганизмов, концентрации субстрата данного процесса и условий его протекания. Если в почву внести субстрат микробиологического процесса в насыщающей концентрации, а условия жизнедеятельности микробного населения (влажность, температура, газообмен с воздухом) поддерживать на постоянном оптимальном уровне, то скорость процесса V будет пропорциональна количеству микроорганизмов X . Тогда

$$X = \frac{V}{Q},$$

где коэффициент пропорциональности Q есть одновременно и пересчетный коэффициент от скорости к биомассе. По своему биологическому смыслу Q является удельной скоростью превращения субстрата. В микробиологической кинетике существуют фундаментальные соотношения между Q , удельной скоростью роста μ и экономическим коэффициентом или выходом биомассы по субстрату Y :

$$Q = \frac{\mu}{Y}.$$

Для того чтобы найти численные значения Q , μ , и Y для конкретной почвы, ставят однократно эксперимент, в котором после внесения субстрата микроорганизмам "дают возможность" подрасти. При этом в динамике измеряют скорость потребления субстрата (она растет экспоненциально при неограниченных ресурсах питательных веществ), а также стехиометрические соотношения между субстратами и продуктами микробного роста. По динамике V находят μ , а по стехиометрии процесса Y . Поясним путь расчета Y на конкретных примерах:

1) при определении биомассы водорослей и других фотосинтезирующих почвенных микроорганизмов измеряют V по скорости фотоассимиляции CO_2 (используют $^{14}\text{CO}_2$, либо измеряют разницу в скорости выделения CO_2 темноте и на свету), Y в этом случае равен 1, так как размеры фотоассимиляции углерода равны приросту альгомассы;

2) при определении биомассы водородных бактерий измеряют скорость потребления водорода, а для оценки коэффициента одновременно регистрируют сопутствующее потребление CO_2 (по разнице между скоростями выделения CO_2 почвой в присутствии H_2 и без него). Величина Y равна частному от деления $\Delta\text{CO}_2/\Delta\text{H}_2$;

3) при определении биомассы микроорганизмов, аэробно использующих глюкозу, прослеживают динамику потребления внесенной в почву глюкозы и

выделения CO_2 . Прирост биомассы находят по уравнению материального баланса $\Delta X = \Delta S - \Delta \text{CO}_2$, где ΔX , ΔS и ΔCO_2 — соответственно прирост углерода микробной биомассы, потребление углерода глюкозы и выделение углерода CO_2 . Величину μ находят по динамике интенсивности выделения CO_2 как более точно регистрируемой переменной.

Определение биомассы микроорганизмов, аэробно использующих глюкозу, проводят следующим образом. 2 г свежей почвы помещают в пенициллиновый флакон, вносят 5 мг глюкозы в объеме 0,1 мл, флакон закрывают резиновой пробкой и инкубируют при 25° в течение 30—60 мин. В начале и в конце инкубации отбирают пробы воздуха объемом $0,5 \text{ см}^3$ с помощью шприца и определяют в них концентрацию CO_2 на газовом хроматографе. Скорость выделения CO_2 (V_{CO_2}) рассчитывают по динамике прироста концентрации CO_2 с учетом объема газовой фазы флакона. Объем газовой фазы рассчитывают по разнице между общим внутренним объемом флакона и объемом твердой и жидкой фаз почвы. Для расчета Q однократно прослеживают динамику потребления глюкозы и прироста V_{CO_2} . Для этого ставят серию флаконов и инкубируют их с глюкозой, как было описано выше, периодически из термостата изымают по два флакона, готовят вытяжки $0,5 \text{ M K}_2\text{SO}_4$ и определяют остаточное содержание глюкозы бихроматным методом (см. определение микробной биомассы регидратационным методом). Одновременно в двух флаконах каждые 2—3 ч в течение дня измеряют динамику Y_{CO_2} . Величину Y находят по уравнению материального баланса $Y = \Delta X / \Delta S = 1 - \Delta \text{CO}_2 / \Delta S$, μ — по наклону линеаризованной кривой в координатах " $\ln V_{\text{CO}_2}$ — время".

При серийных анализах достаточно измерить лишь начальную скорость выделения CO_2 , воспользовавшись ранее определенным значением коэффициента Q .

РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

Экологические методы исследования почвенной биоты

Занятие 1. 1. Промикроскопировать и зарисовать "микробные пейзажи" на стеклах обрастания. Отметить присутствие на стеклах грибов, актиномицетов, клеток и колоний бактерий.

2. Просмотреть под микроскопом и зарисовать микроорганизмы в капиллярных педоскопах.

3. Поставить опыт по наблюдению за внесенной в нестерильную почву стрептомицинустойчивой культурой бактерии.

На последующих занятиях проследить за поведением внесенной популяции в почве, используя метод поверхностного посева из разведения почвенной суспензии на агаризованную среду со стрептомицином. Оформить результаты графически.

4. Ознакомиться с работой люминесцентного и сканирующего электронного микроскопов.

Взаимоотношения в биотическом сообществе

Занятие 2. 1. Поставить опыт по выявлению антагонистов среди актиномицетов по отношению к тест-объекту *Staphylococcus aureus* (или другой бактерии) методом агаровых блоков.

2. Поставить опыт по определению спектра антимикробного действия одного штамма актиномицета штриховым методом (в опыт взять пять-шесть тест-культур микроорганизмов).

3. Поставить опыт по выявлению токсических свойств почвы.

4. Выявить токсические свойства культуральной жидкости гриба *Penicillium verrucosum var. cyclopium* методом замочки семян.

На следующем занятии учесть результаты поставленных опытов.

Занятие 3. 1. Проследить под микроскопом за клетками амёб, развивающимися на колониях азотобактера, дрожжей. Приготовить препараты

"раздавленная капля", зарисовать.

2. Пронаблюдать за выеданием водорослей почвенными животными на мембранных фильтрах, помещенных на поверхность почвы в чашках Петри.

3. Произвести посев из почвы, кишечника и экскрементов дождевого червя на среды МПА, КАА, сусло-агар для выявления микроорганизмов. На следующем занятии учесть результаты посевов и сравнить их.

Методы исследования биологической активности почв

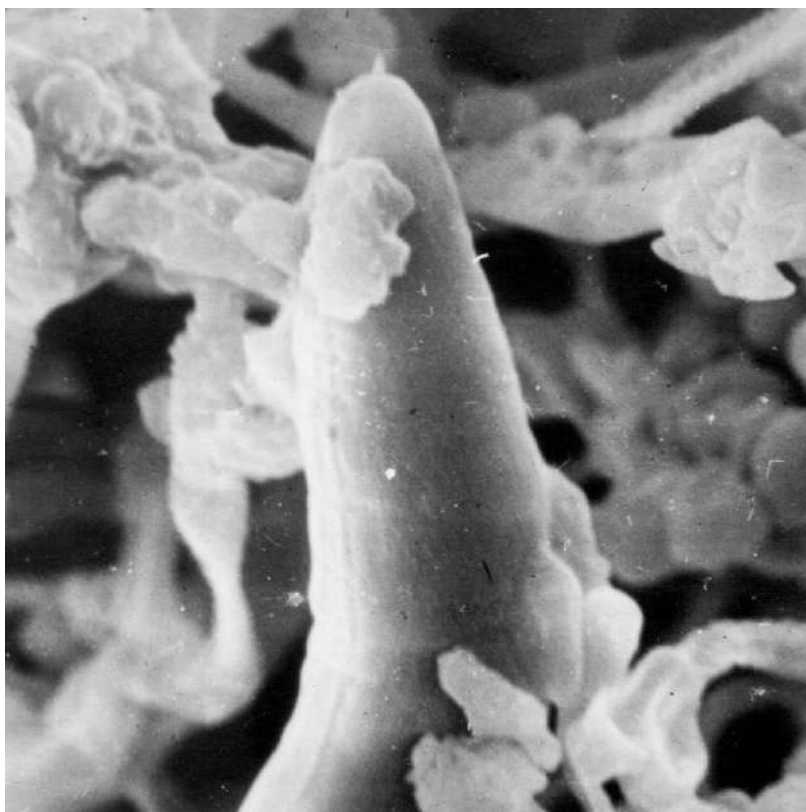
Занятие 4. 1. Подсчитать количество бактерий в почве методом посева на МПА и прямым методом с помощью люминесцентного микроскопа. Рассчитать коэффициент K .

2. Проанализировать сообщество организмов, разлагающих крахмал, на почвенных пластинках с крахмалом с помощью просмотра чашек под бинокулярной лупой и методом посева.

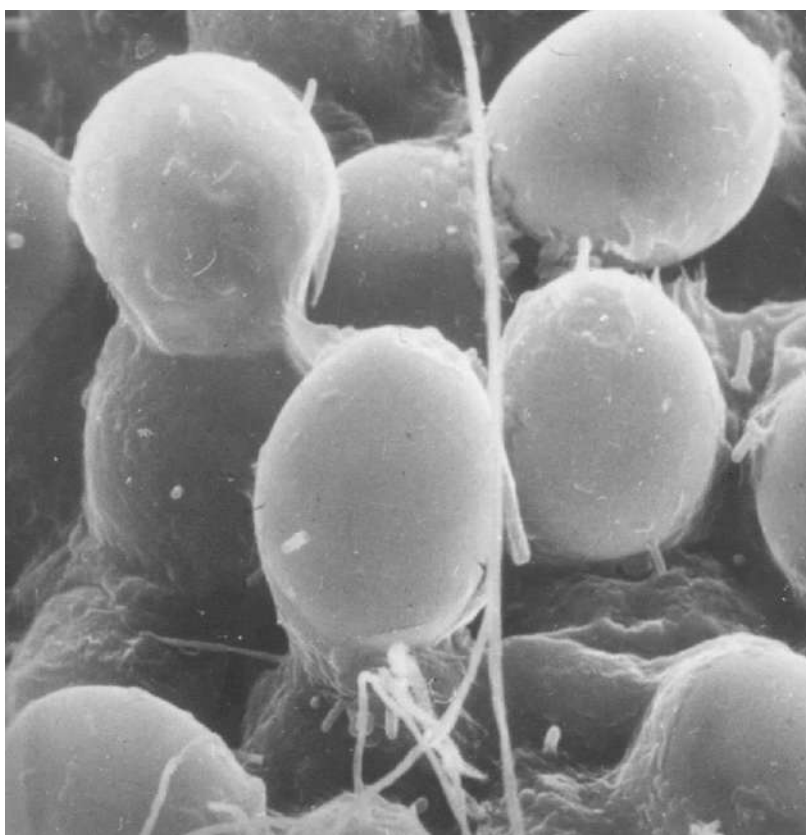
3. Провести определение активности инвертазы в почве фотокolorиметрическим методом.

4. Определить биомассу микроорганизмов в почве регидратационным методом.

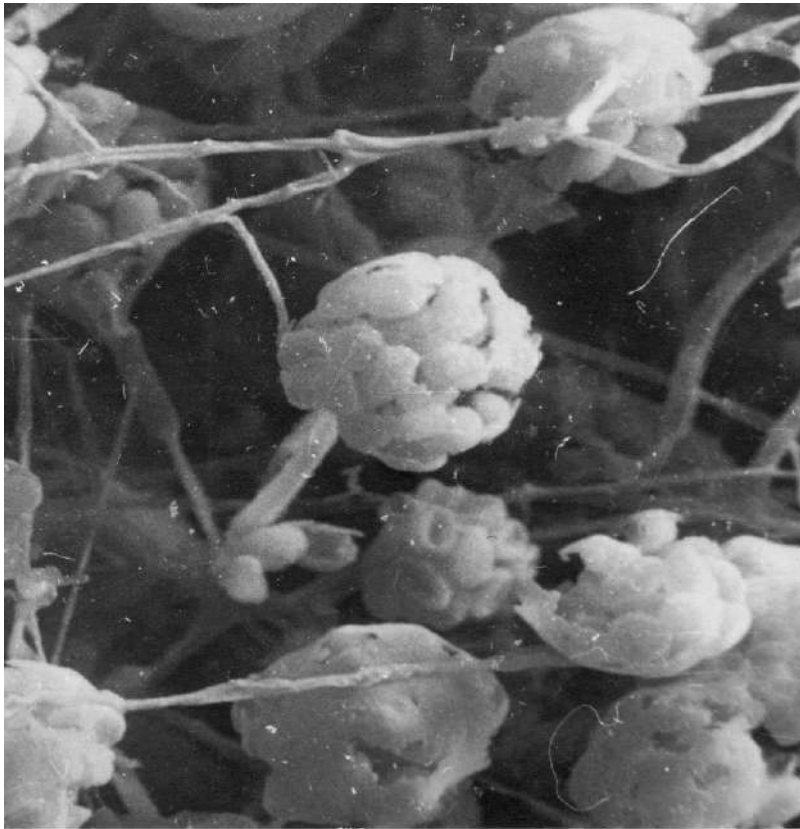
ПРИЛОЖЕНИЕ



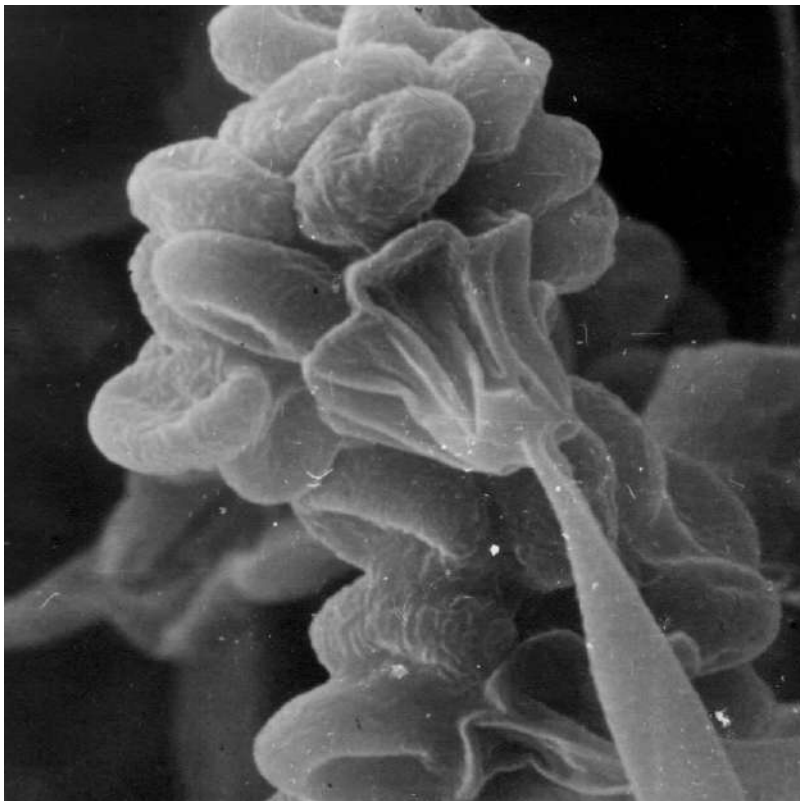
Нематода (x3000)



Клетки дрожжей (x5000)



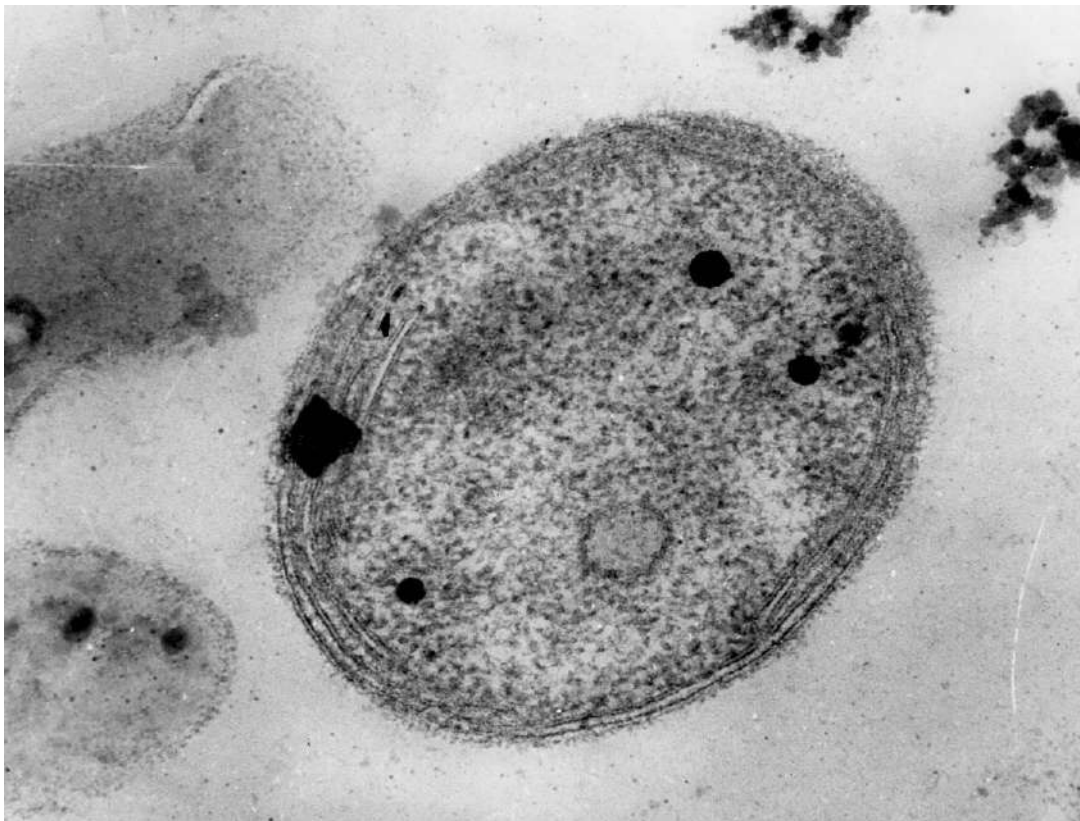
Спороношение у грибов (x3000)



Спороношение у грибов (x5000)



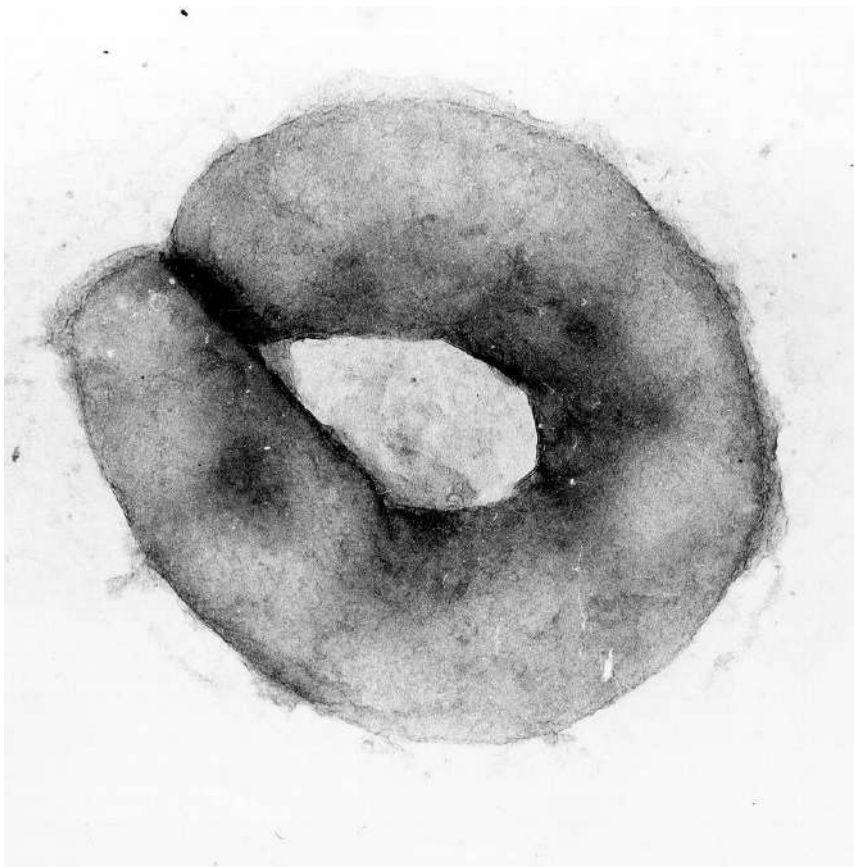
Ультратонкий срез клетки грамположительной бактерии (x60000)



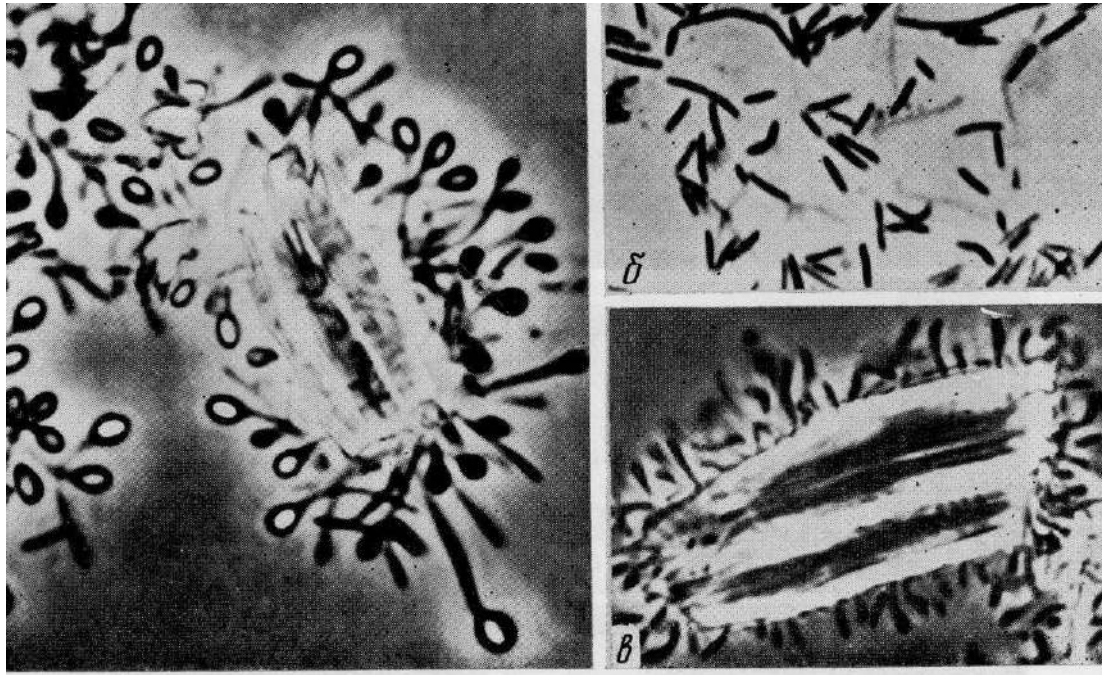
Ультратонкий срез клетки грамотрицательной бактерии (x6000)



Клетка грамотрицательной бактерии рода *Pseudomonas* (x30000).



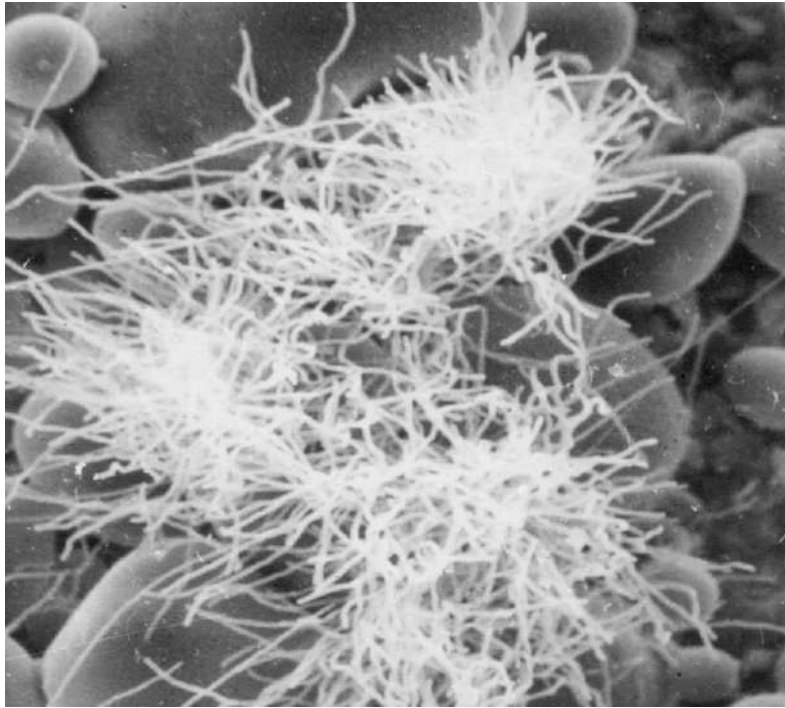
Клетка грамотрицательной нитрифицирующей бактерии
рода *Nitrosocyclus* (x30000)



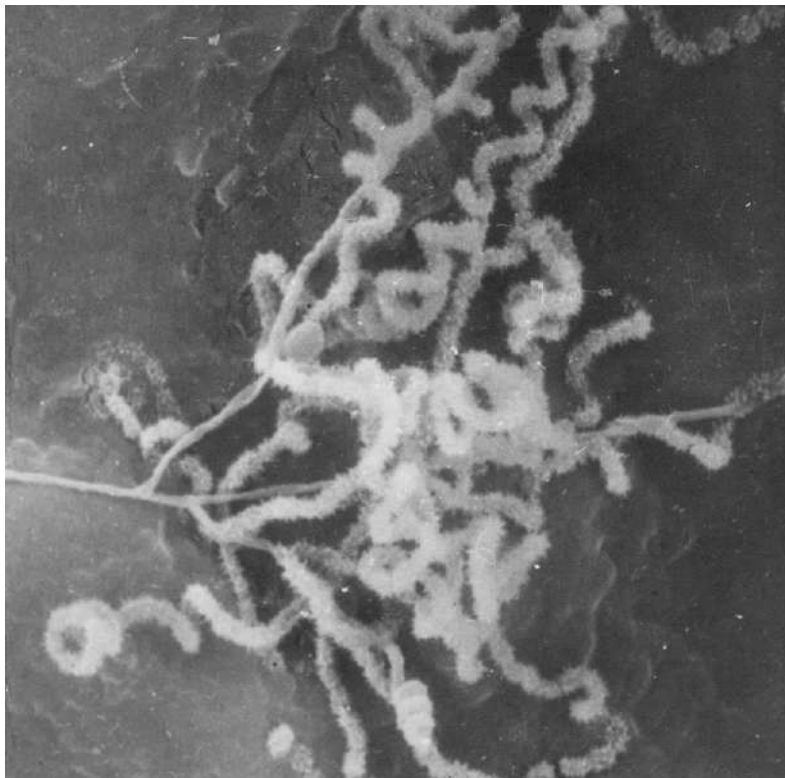
Грамположительные бактерии рода *Clostridium* (x2000).



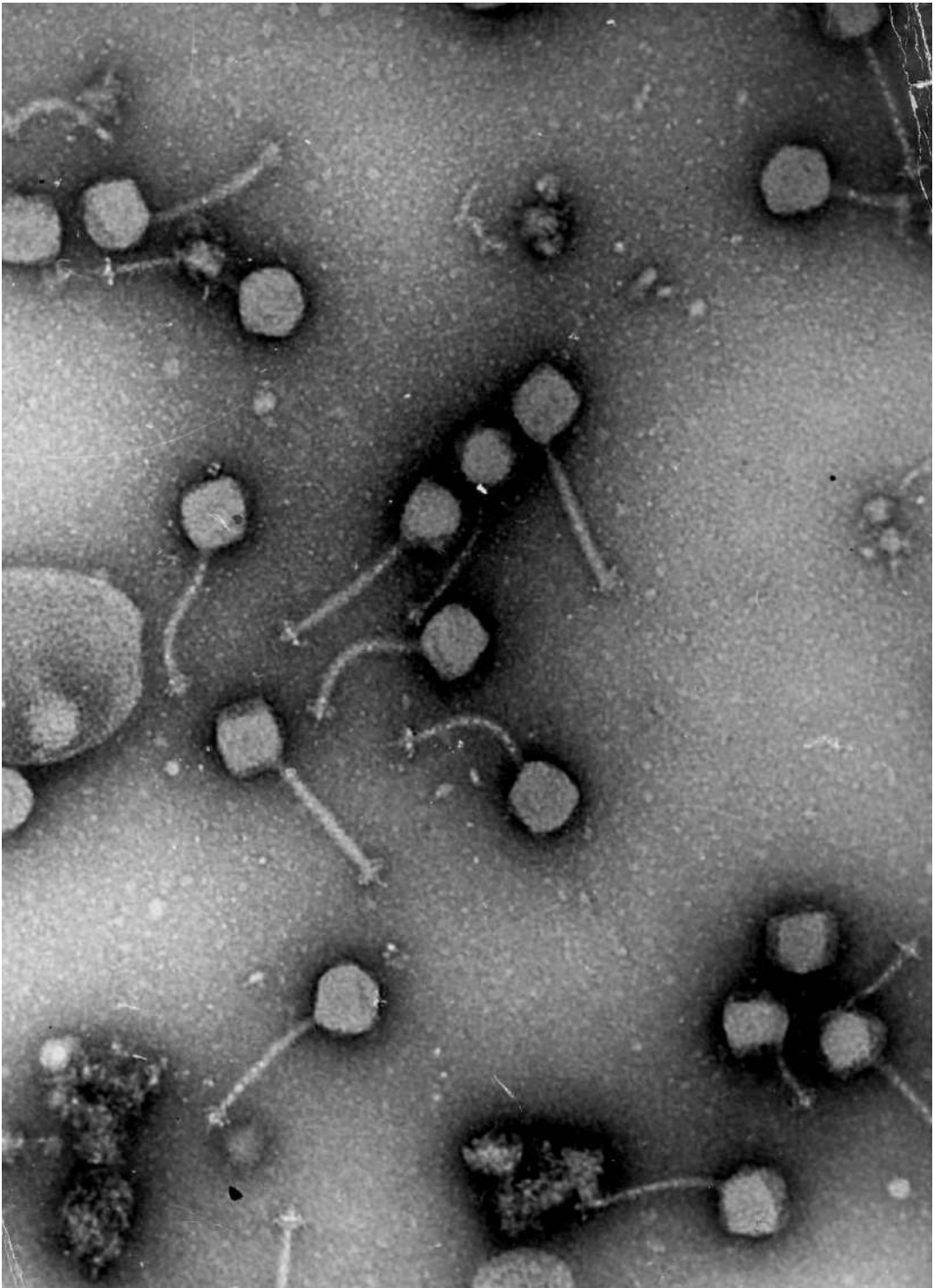
Клетки грамположительной бактерии рода *Arthrobacter* (x10000)



Актиномицеты, прямые спораносцы (x1000)



Актиномицеты, спиральные спораносцы (x3000)



Φαγ (x180000)

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выявления и идентификации дрожжей. М. Изд-во "Пищевая промышленность" 1979. 119 с.
2. Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. М. Изд-во МГУ. 1989. 333с
3. Гельцер Ю.Г., Корганова Г.А., Алексеев Д.А.. Почвенные раковинные амебы и методы их изучения. М. Изд-во МГУ. 1985.76 с.
4. Гельцер Ю.Г. Биологическая диагностика почв. М. Изд-во МГУ. 1986. 78 с.
5. Гузев В.С., Шоба С.А., Селецкий Г.И. Применение растровой электронной микроскопии в почвоведении, мелиорации и сельском хозяйстве. М.-Новочеркасск.1978. 61 с.
6. Дмитриев Е.А. Математическая статистика в почвоведении. М. Изд-во МГУ. 1995. 318 с.
7. Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н., Лысак Л.В. Методы выделения и идентификации почвенных бактерий. М. Изд-во МГУ. 1989. 71 с.
8. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. М.Изд-во МГУ. 1987. 255 с.
9. Зенова Г.М. Почвенные актиномицеты редких родов. М.Изд-во МГУ.2000. 91с.
10. Зенова Г.М., Кураков А.В. Методы определения структуры комплексов почвенных актиномицетов и грибов. М. Изд-во МГУ. 1988. 53 с.
11. Зенова Г.М., Штина Э.А. Почвенные водоросли. М. Изд-во МГУ. 1990. 78 с.
12. Количественные методы в почвенной зоологии. (Под редакцией М.С.Гилярова, Б.Р.Стригановой). М. Наука. 1987. 254 с.
13. Кожевин П.А. Микробные популяции в природе. М. Изд-во МГУ. 1989. 170с.
14. Манучаров А.С., Самсонова В.П., Мешалкина Ю.А., Дмитриев Е.А. Математическая статистика в почвоведении. М.Изд-во МГУ. 2001. 99 с.
15. Методы почвенной микробиологии и биохимии. (Под редакцией Д.Г.Звягинцева). М. Изд-во МГУ. 1991. 302 с.
16. Определитель бактерий Берджи. М. Изд-во "Мир". 1997. Т. 1,2.
17. Скворцова И.Н. Методы идентификации и выделения почвенных бактерий рода *Bacillus*. М. Изд-во МГУ. 1981. 77 с.

Учебное издание

Зенова Галина Михайловна
Степанов Алексей Львович
Лихачева Анна Анатольевна
Манучарова Наталия Александровна

ПРАКТИКУМ ПО БИОЛОГИИ ПОЧВ

Изд. лиц. № 040414 от 10.04.1997. Подписано в печать ... 12.2001. Формат 60×90/16. Бумага офс. № 1. Офсетная печать. Усл. печ. л. ... Уч.-изд. л. Тираж 150 экз.

Издается за счет средств Гранта РФФИ № 001597886

Ордена "Знак Почета" Издательство Московского университета.
103009, Москва, ул. Б.Никитская, 5/7.

Отпечатано с оригинал-макета в ООО "МАКС Пресс"

119899, Москва, Воробьевы горы, факультет почвоведения.