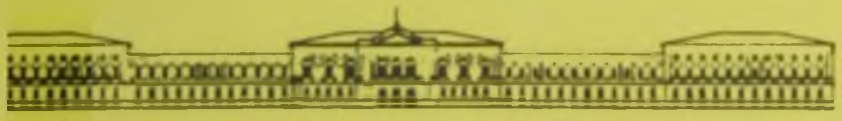
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

Н.Н. Терещенко, Е.Е. Акимова, О.М. Минаева

Практикум по микробиологии для оценки плодородия почвы и качества грунтов

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ



ИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра Сельскохозяйственной биотехнологии

Терещенко Н.Н., Акимова Е.Е., Минаева О.М.

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

Практикум по микробиологии для оценки плодородия почвы и качества грунтов

Томск 2011

УДК 579.64(075.8)

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Биологического института
_____ С.П. Кулижский
«29» апреля 2011 г.

Рассмотрено на заседании
методической комиссии
Протокол № 96 от
«21» апреля 2011 г.
Председатель методической комиссии
Биологического института ТГУ
д-р биол. наук
_____ М.В. Олонова

Рецензент:
д-р биол. наук, профессор *М.В.Штерншис* (кафедра энтомологии и биологической защиты растений Новосибирского государственного аграрного университета)

Терещенко Н.Н., Акимова Е.Е., Минаева О.М.
Практикум по микробиологии для оценки плодородия почвы и качества грунтов: Учебно-методическое пособие для студ. биол. специальностей. Томск: ТГУ, 2011. – 96 с.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов, аспирантов высших учебных заведений, обучающихся по специальностям «Почвоведение», «Агрономия», «Микробиология», «Экология почв», «Защита растений», «Биотехнология средств защиты растений», «Сельскохозяйственная биотехнология» и преподавателей биологических специальностей. Данное пособие может быть также использовано научными сотрудниками и специалистами, занятыми в сфере микробиологии почв, производства биологических средств защиты растений и экологии.

Томский государственный университет, 2011

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ — 5

1. ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ — 6

2. УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПА И ПРАВИЛА РАБОТЫ — 7

2.1 Устройство микроскопа — 7

2.2 Работа с иммерсионной системой микроскопа — 11

2.3 Основные правила работы с микроскопом — 12

2.4. Прямой учет количества микроорганизмов в счетной камере — 12

3. ОСНОВНЫЕ АГРОНОМИЧЕСКИ- И ЭКОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫЕ ГРУППЫ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ — 16

4. МЕТОДИКА ПОСЕВА НА ТВЕРДЫЕ ЭЛЕКТИВНЫЕ СРЕДЫ — 18

4.1. Отбор и подготовка образцов почвы (грунта) для анализа — 18

4.2. Приготовление исходного разведения образца почвы и серии рабочих разведений — 18

4.3. Приготовление и разливка питательных сред в чашки Петри — 20

4.4. Методика посева и расчета количества клеток микроорганизмов — 22

4.4.1. Техника посева на твердые питательные среды — 22

4.4.2. Пересчет количества колоний микроорганизмов на питательной среде в количество клеток в 1 г исследуемого субстрата — 24

5. ИССЛЕДОВАНИЕ, ОПИСАНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ 26

5.1 Исследование морфологии микроорганизмов — 26

5.1.1 Бактерии — 26

5.1.2 Актиномицеты — 29

5.1.3 Нокардии — 30

5.1.4 Микобактерии — 31

5.1.5 Грибы — 31

5.2 Приготовление препаратов живых клеток микроорганизмов для световой микроскопии — 33

5.3 Препараты фиксированных и окрашенных клеток микроорганизмов — 34

5.4 Окраска по Граму — 35

5.5 Исследование культуральных свойств микроорганизмов — 37

5.5.1 Рост микроорганизмов на плотных питательных средах — 37

5.5.2 Рост микроорганизмов в жидких питательных средах — 39

6. МЕТОДЫ УЧЕТА КОЛИЧЕСТВА И СОСТАВА РИЗОСФЕРНОЙ МИКРОФЛОРЫ 41

6.1. Количественный учет ризосферных микроорганизмов — 42

6.1.1. Отбор и подготовка образцов для анализа — 42

6.1.2. Метод прямого подсчета количества микроорганизмов в ризосфере (метод Виноградского–Шульгиной) — 43

6.1.3. Анализ ризосферной микрофлоры методом посева на агаризованные среды ——43
6.1.4. Метод посева на жидкие среды (метод предельных разведений)——43
6.2. Определение качественного состава ризосферных микроорганизмов ——44
6.3. Определение численности неспорообразующих бактерий рода *Pseudomonas*45
6.4 Определение численности спорообразующих бактерий ——46
6.5 Учет численности микроскопических грибов методом глубинного посева—47
7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЗОТОБАКТЕРА МЕТОДОМ ВИНОГРАДСКОГО ——49
7.1 Методика определения актуальной активности азотобактера ——49
7.2. Методика определения потенциальной активности азотобактера (метод почвенных пластинок) ——51
8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ, УЛУЧШАЮЩИХ ФОСФОРНОЕ ПИТАНИЕ РАСТЕНИЙ ——54
8.1. Метод выделения и учета численности микроорганизмов, растворяющих ортофосфаты кальция (Ca), алюминия (Al) и железа (Fe)——54
8.2. Метод учета численности и выделения микроорганизмов, мобилизующих фосфор органических соединений ——57
9. РАСЧЕТ КОЭФФИЦИЕНТА МИНЕРАЛИЗАЦИИ ——59
10. ИЗУЧЕНИЕ РОСТОСТИМУЛИРУЮЩИХ И ФИТОТОКСИЧНЫХ СВОЙСТВ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ——60
10.1. Метод разведений для определения численности микробов-антагонистов в почве ——60
10.2. Методы определения фунгистазиса почвы (метод Маршуновой)——60
10.3. Методы выделения микроорганизмов – стимуляторов роста растений——61
10.4. Методы количественного учета фитотоксичных форм почвенных микроорганизмов и изучение их свойств ——66
10.4.1 Учет на твердых питательных средах ——66
10.4.2. Экспресс-метод скрининга почвенной микрофлоры на фитотоксичность——66
11. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ——69
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК——78
ПРИЛОЖЕНИЕ I——79
ПРИЛОЖЕНИЕ II——83
ПРИЛОЖЕНИЕ III——87
ПОЛЕЗНАЯ ИНФОРМАЦИЯ——89

ВВЕДЕНИЕ

Жизнедеятельность микроорганизмов является одним из наиболее важных факторов, определяющих плодородие почвы. Кроме того, живая фаза составляет основу почвы как ключевого элемента биосферы, регулирующего поток основных биогенных элементов как в малом (биологическом), так и в большом (геологическом) круговоротах. Именно жизнедеятельность почвенного микробоценоза во многом определяет постоянство газового состава атмосферы планеты.

По этой причине любые агротехнические мероприятия, направленные на повышение урожая сельскохозяйственных культур и воспроизводство почвенного плодородия, должны иметь почвенно-микробиологическое обоснование. Помимо поддержания основных экологических (биосферных) функций почвы, микроорганизмы во многом ответственны также и за воспроизводство актуального плодородия, обеспечивающего получение стабильно высоких урожаев высококачественной сельскохозяйственной продукции. Микроорганизмы не только принимают непосредственное участие в превращении минеральных и органических веществ, продуцируют разнообразные биологические соединения, регулируя физико-химические свойства почвы, но и оказывают стимулирующее или ингибирующее влияние на растения и разнообразную почвенную фауну.

Среди применяемых в настоящее время показателей агрономических свойств почвы или качества представленных на рынке разнообразных грунтов, основное внимание уделяется их агрохимической составляющей. Однако, как показывает практика, оптимальное соотношение основных биогенных элементов в почве или грунте вовсе не гарантирует высоких урожаев. Для более полной оценки качества грунта или почвы необходим анализ микробиологических показателей, позволяющих охарактеризовать почву или грунт как биокосную систему и определить уровень ее биологической активности.

В настоящем методическом пособии обобщены ряд методов, разработанных ведущими отечественными научно-исследовательскими институтами сельскохозяйственного профиля, применяющиеся для качественного и количественного анализа почвенной микрофлоры и исследования ее свойств. Среди значительного разнообразия используемых в настоящее время методов авторами были отобраны наиболее простые, не требующие специального оборудования и дорогостоящих реактивов, но, вместе с тем, позволяющие в полной мере описать биологические свойства почвы как системы.

1. ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1. В микробиологической лаборатории запрещается:

- находиться в пальто, плаще и прочей верхней одежде или головном уборе, а также вносить посторонние вещи (в том числе: складывать сумки на стол, подоконник и т.д.);
- находиться без чистого хлопчатобумажного халата с длинным рукавом и плотно застегнутыми манжетами;
- покидать без надобности свое рабочее место, совершать резкие движения, громко разговаривать (в том числе по телефону), отвлекать преподавателя и студентов от работы;
- находиться в микробиологическом боксе одновременно при работающих ультрафиолетовых лампах (заходить можно только через 20 мин после их выключения);
- приступать к работе с длинными распущенными волосами, не убранными под косынку или колпак, а также излишне длинными ногтями;
- что-либо пробовать на вкус, принимать пищу;
- без разрешения преподавателя или лаборанта брать какие-либо сосуды или емкости (колбы, пробирки и проч.) и открывать их;
- открывать чашки Петри, чтобы лучше рассмотреть выросшие колонии микроорганизмов;
- переносить или передвигать с места на место зажженную спиртовку;
- запрещается слив сред в канализацию, а также хранение чашек и пробирок с культурами микроорганизмов в открытом виде. Использованная культуральная жидкость перед сливом в канализацию должна стерилизоваться автоклавированием.

2. В микробиологической лаборатории выполняются все правила техники безопасности, применяемые при работе с химическими реагентами, горючими материалами, стеклопосудой и электрическими приборами.

3. Горячие агаризованные питательные среды можно перемешивать и разливать только спустя 5–7 мин после извлечения из автоклава во избежание их вскипания и ожога рук.

4. После окончания работы рабочее место должно быть убрано: посуда вымыта, столы протерты, стулья задвинуты. Руки необходимо вымыть теплой водой с мылом.

2. УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПА И ПРАВИЛА РАБОТЫ

Изучение невидимых невооруженным глазом клеток микроорганизмов, размеры которых не превышают десятков и сотен микрометров, возможно только при помощи микроскопов (от греч. *micros* – малый, *skopeð* – смотрю). Эти приборы позволяют получать в сотни (световые микроскопы) и в десятки-сотни тысяч раз (электронные микроскопы) увеличенное изображение исследуемых объектов. Изображение в световом микроскопе формируется вследствие того, что объект и различные элементы его структуры избирательно поглощают свет с различной длиной волны (*абсорбционный контраст*) или вследствие изменения фазы световой волны при прохождении света через объект (*фазовый контраст*).

Световая микроскопия включает обычную просвечивающую микроскопию (светло- и темнопольную), фазово-контрастную и люминесцентную. В последнее время разработаны и другие виды микроскопии – инверсионная и конфокальная лазерная сканирующая – и соответствующие микроскопы.

Существуют различные модели учебных и исследовательских световых микроскопов. На занятиях подробно будут рассмотрены микроскопы, используемые на кафедре сельскохозяйственной биотехнологии: микроскоп серии XS-90 и МИКМЕД-5. С помощью микроскопов подобного типа изучают морфологию клеток микроорганизмов (форму клеток, размер, подвижность, степень морфологической гетерогенности), их рост и развитие, проводят первичную таксономическую идентификацию (от лат. *identificare* – отождествление) исследуемых микроорганизмов, ведут наблюдения за характером развития микробных ценозов (сообществ) в почве и других субстратах.

2.1 Устройство микроскопа

Микроскоп состоит из двух частей: механической (подсобной) и оптической (главной).

Механическая часть микроскопа

Механическая часть микроскопа состоит из штатива, предметного столика и тубуса (трубы).

Штатив имеет основание в виде подковы и колонку (тубусодержатель) в форме дуги. К нему примыкают коробка механизмов, система зубчатых колес для регуляции положения тубуса. Система приводится в движение вращением макрометрического и микрометрического винтов.

Макрометрический винт (9, рис. 1) служит для предварительной ориентировочной установки изображения рассматриваемого объекта.

Микрометрический винт (микровинт) используется для последующей четкой установки на фокус (10, рис. 1). При полном повороте микровинта труба передвигается на 0,1 мм.

При вращении винтов по часовой стрелке труба опускается по направлению к препарату, при вращении против часовой стрелки – поднимается

Предметный столик (7, рис. 1) служит для размещения на нем препарата с объектом исследования. Предметный столик вращается и перемещается во взаимно перпендикулярных плоскостях с помощью винтов (8 и 11 рис. 1). В центре столика находится круглое отверстие для освещения препарата снизу лучами света, направляемыми зеркалом микроскопа. В столик вмонтированы два зажима (клеммы) – пружинящие металлические пластинки, предназначенные для закрепления препарата. Для четкого закрепления предметного стекла на предметном столике размещен *препаратоводитель* (13, рис. 1).

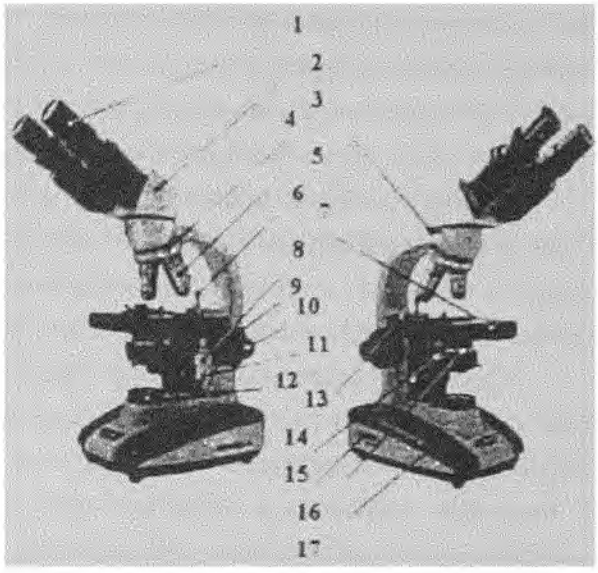


Рис. 1 Микроскоп медицинский МИКМЕД-5
(по: Руководство по эксплуатации «Микроскоп медицинский МИКМЕД-5»)

1 – окуляры, 2 – бинокулярная насадка, 3 – винт крепления насадки, 4 – револьверное устройство; 5 – объективы, 6 – винтовой упор, 7 – предметный столик; 8 – рукоятка перемещения объекта в поперечном направлении, 9 – рукоятка механизма грубой фокусировки; 10 – рукоятка механизма микрометрической фокусировки, 11 – рукоятка перемещения объекта в продольном направлении; 12 – коллектор в оправе, 13 – препаратоводитель; 14 – винт крепления конденсора; 15 – диск регулирования яркости горения лампы, 16 – конденсор; 17 – основание

Тубус (труба) – оправа, в которую заключены элементы оптической системы микроскопа. К нижней части тубуса прикрепляется револьвер (*объективодержатель*) с гнездами для объективов (4, рис. 1). Современные модели микроскопов имеют наклонный тубус с дугообразным тубусодержателем, что обеспечивает горизонтальное положение предметного столика.

Оптическая часть микроскопа

Состоит из основного оптического узла (объектив и окуляр) и вспомогательной осветительной системы (зеркало и конденсор).

Все части оптической системы строго центрированы относительно друг друга. Получение контрастного равномерно освещенного изображения объектов в микроскопе осуществляется с помощью осветительного устройства. В современных микроскопах зеркало отсутствует и вместо него в прибор вмонтирован регулируемый источник света. В используемых моделях, осветитель встроен в основание микроскопа и состоит из коллектора в оправе (12, рис. 1), который ввинчен в отверстие основания (17, рис. 1) и галогенной лампы 12 В, 20 Вт, патрон которой закреплен в основании микроскопа. В модели микроскопа МИКМЕД-5 регулирование яркости изображения объекта возможно с помощью изменения яркости горения лампы вращением диска (15, рис. 1).

Нормальная работа осветительной системы обеспечивается только при использовании предметных стекол толщиной 1–1,2 мм

Конденсор (лат. *condenso* – уплотню, сгущаю), состоит из 2–3 короткофокусных линз, собирает лучи, идущие от источника света, и направляет их на объект. Конденсор необходим, прежде всего, при работе с иммерсионной системой. Линзы конденсора вмонтированы в металлическую оправу, соединенную с зубчатым механизмом, позволяющим перемещать конденсор вверх и вниз специальным винтом. Для регулировки интенсивности освещения в конденсоре есть ирисовая (лепестковая) диафрагма, состоящая из стальных серповидных пластин.

Окрашенные препараты и препараты с живыми грибами лучше рассматривать при почти полностью открытой диафрагме, неокрашенные и содержащие живые клетки бактерий – при закрытом отверстии диафрагмы

Под конденсором располагается кольцевидный держатель для светофильтров (обычно к микроскопу прилагаются синее, зеленое и белое матовые стекла). При работе с искусственным источником света светофильтры создают впечатление дневного освещения, что делает процесс микроскопирования менее утомительным для глаз.

Объектив (лат. *objectum* – предмет) – наиболее важная часть микроскопа (5, рис. 1). Он дает действительное увеличение и обратное изображение изучаемого объекта. Это многолинзовая короткофокусная система, от качества которой зависит в основном изображение объекта. Самая главная – наружная (фронтальная) линза, от фокусного расстояния которой зависит увеличение объектива: чем больше кривизна фронтальной линзы, тем короче фокусное расстояние и тем больше увеличение объектива. Остальные линзы в системе объектива выполняют преимущественно функции коррекции оптических недостатков, возникающих при исследовании объектов. От

увеличения объектива зависят еще две его характеристики – рабочее расстояние, т.е. расстояние от фронтальной линзы до плоскости препарата при сфокусированном объекте, и площадь поля зрения. **Величина увеличения объективов означена на их оправе (8×, 40×, 90×).**

Объективы бывают сухие и погруженные (иммерсионные). При работе с сухими объективами между фронтальной линзой объектива и объектом исследования находится воздух. Оптический расчет иммерсионных объективов предусматривает их работу при погружении фронтальной линзы объектива в жидкую однородную среду. При работе с сухим объективом, вследствие разницы между показателями преломления стекла (1,52) и воздуха (1,0), часть световых лучей отклоняется и не попадает в глаз наблюдателя

Лучи в оптически однородной гомогенной среде не меняют своего направления. **Иммерсионные объективы на оправе имеет черную (или белую) круговую нарезку и обозначения**: I – *immersion* (иммерсия); HI – *homogen immersion* (однородная иммерсия); OI – *oil immersion* или МИ – *масляная иммерсия*. Сухой окрашенный препарат помещают на столик микроскопа и, пользуясь объективом 8×, устанавливают свет. Затем в центр препарата на мазок наносят каплю иммерсионного масла, не размазывая ее по стеклу.

Каждый объектив характеризуется, кроме того, определенной величиной рабочего расстояния в миллиметрах.

! **Чем больше увеличение объектива, тем меньше его рабочее расстояние и поле зрения**

Так, объективы с увеличением 8×, 40×, 90× имеют собственно рабочие расстояния 13,8, 0,6 и 0,12 мм. Иммерсионный объектив имеет рабочее расстояние до объектива 0,12 мм, поэтому его нередко называют «близоруким». **Для наблюдения живых микроорганизмов и поиска нужного поля зрения используют увеличения в 8× (10×) и 40× раз, а для более детального изучения формы и строения микроорганизмов используют иммерсионный объектив 90× (100×).**

! **Так как у объективов малых увеличений не только бо́льшие рабочие расстояния, но и бо́льшие поля зрения, исследование препарата необходимо начинать с помощью объектива с самым малым увеличением, постепенно переходя на объективы с бо́льшим увеличением**

Окуляр (лат. *oculāris* – глазной) служит непосредственным продолжением «линз» (хрусталиков) глаз человека (1, рис. 1). Преломляющую систему глаза можно рассматривать как двояковыпуклую линзу со средним фокусным расстоянием 15 см.

Окуляр состоит из двух линз – глазной (верхней) и полевой, или собирательной (нижней), заключенных в металлическую оправу. Назначение полевой линзы – собирать лучи, идущие от объектива, таким образом, чтобы они проходили через маленькое отверстие глазной линзы. Назначение окуляра – прямое мнимое увеличение действительного обратного и увеличенного изображения, которое дает объектив. **Увеличение окуляра выгравировано на его оправе.** Рабочее увеличение окуляров колеблется в пределах от 4× до 15×.

2.2 Работа с иммерсионной системой микроскопа

При работе с иммерсионным объективом (90×/100×) необходимо установить зеркало плоской стороной вверх и поднять конденсор. Работать с иммерсионным объективом следует в помещении с температурой воздуха от +15 до +25 °С.

Сухой окрашенный препарат помещают на столик микроскопа и, пользуясь объективом 8×, устанавливают свет. Затем, в центр препарата, на мазок, наносят каплю иммерсионного масла, не размазывая ее по стеклу.

При работе с иммерсионным объективом необходимо поместить между покровным стеклом и линзами объектива иммерсионное масло (специальное или кедровое или терпеиовое масла), показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла (вместо кедрового масла можно также использовать глицерин высокой степени очистки).

! Погружать в иммерсионную жидкость можно только иммерсионные объективы (не сухие!)

С помощью макрометрического винта опускают тубус микроскопа до погружения объектива в масло. Эту операцию нужно проводить очень осторожно, следя сбоку за тем, чтобы фронтальная линза не коснулась предметного стекла и не получила повреждения. После погружения объектива в масло, необходимо осторожно, пользуясь микровинтом, чуть приподнимая тубус и, наблюдая в окуляр, найти плоскость препарата. Когда изображение объекта появится, перейти к использованию микровинта.

! Если изображение нерезкое, тусклое или плывет – что-то сделано неправильно! Загрязнена фронтальная линза объектива, мешают пузырьки воздуха в масле, случайно закрыта диафрагма, сдвинута лампа или зеркало

По окончании работы поднимают тубус, снимают препарат и осторожно протирают фронтальную линзу объектива сначала сухой хлопчатобумажной салфеткой, а затем салфеткой, но слегка смоченной очищенным бензином или бензолом.

Оставлять масло на поверхности линзы ни в коем случае нельзя, так как оно способствует фиксированию пыли и может со временем привести к повреждению оптики микроскопа

2.3 Основные правила работы с микроскопом

- **Переносить микроскоп необходимо двумя руками**: одной держать штатив, другой – основание микроскопа.
- Место для микроскопа выбирают подальше от прямого солнечного света.
- Следует предохранять микроскоп от толчков, соприкосновения с сильнодействующими веществами (кислотами, щелочами и др.)
- Нельзя вынимать окуляр из трубы, чтобы не загрязнять пылью трубу и объективы.
- При работе с бинокулярной насадкой сначала регулируют расстояние между окулярами в соответствии с расстоянием между глазами наблюдателя так, чтобы поля зрения обоих окуляров слились в одно.
- **Нельзя касаться пальцами оптических поверхностей**: линзы, объективы, окуляры.
- Микроскоп следует содержать в чистоте и хранить в чехле.

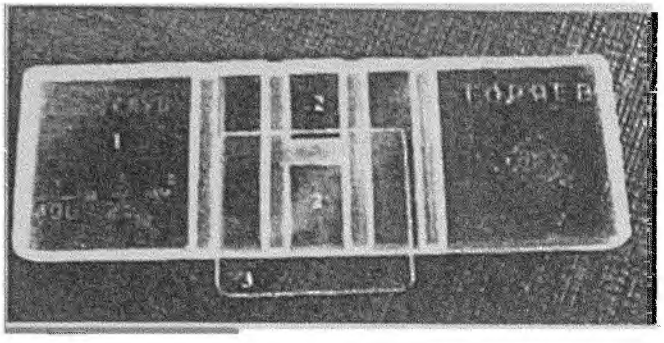
2.4. Прямой учет количества микроорганизмов в счетной камере

Для подсчета клеток микроорганизмов под микроскопом можно использовать счетные камеры, препараты фиксированных и окрашенных клеток, приготовленные на предметных стеклах или мембранных фильтрах. Данные методы позволяют определить общее количество клеток в единице объема (как живых, так и мертвых!).

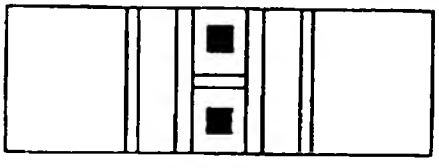
Основное ограничение данных методов – необходимость довольно высоких концентраций клеток в единице исследуемого субстрата, а также достаточная степень прозрачности рабочего разведения

Метод подсчета в счетных камерах рекомендуется использовать для подсчета крупных объектов – дрожжей, одноклеточных водорослей, конидий и спор грибов, крупных бактерий. Наиболее распространен метод подсчета клеток с использованием

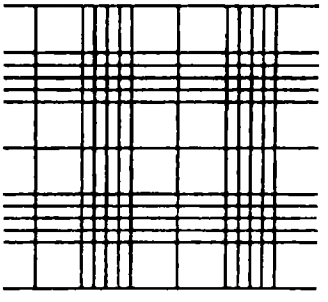
камеры Горяева–Тома (рис. 2). Камера внешне представляет собой толстое предметное стекло, разделенное бороздками. Центральная часть стекла (1, рис. 2) содержит выемку глубиной 0,1 мм (2, рис. 2), на дно которой нанесена сетка. Глубина камеры (0,1 мм) и площадь больших и малых квадратов (соответственно 1/25 и 1/400 мм^2) указаны на предметном стекле.



а



б



в

1 – корпус камеры; 2 – центральна часть камеры с высмкой глубиной 0,1мм;
3 – покровное стекло

а – вид сверху; *б* – вид сбоку; *в* – при малом увеличении микроскопа

Рис. 2 Счетная камера Горяева–Тома для прямого подсчета численности микроорганизмов (фото Терещенко Н.Н.; схемы по: Практикум по микробиологии, 2004)

При работе с камерой необходимо соблюдать определенные ***правила ее заполнения.*** Углубление с сеткой покрывают специальным шлифовальным покровным стеклом. Слегка прижимая, двигают покровное стекло в противоположные стороны до появления картины интерференции (колец Ньютона), свидетельствующей о том, что стекло притерто к сторонам камеры. **Только при таком условии объем камеры соответствует расчетному!**

Камеру заполняют исследуемой суспензией микроорганизмов, которую аккуратно вносят капилляром или пипеткой. Заполненную камеру помещают на столик микроскопа. Для подсчета клеток используют объектив 8× (10×), реже 40×.

Подсчет клеток рекомендуется начинать через 2-3 мин после заполнения камеры, чтобы клетки осели, и при микроскопировании находились в одной плоскости! С иммерсионным объективом работать нельзя, так как его рабочее расстояние меньше толщины стекла камеры

Клетки микроорганизмов следует подсчитывать в 10-ти больших или 20-ти малых квадратах сетки, следуя по диагонали. Учитывают все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата (Приложение II, рис. 31). **При подсчете число клеток в большом квадрате не должно превышать 20, а в малом – 10.**

Подсчет клеток повторяют 3–5 раз, каждый раз, заново монтируя камеру и заполняя ее суспензией микроорганизмов. **Для получения достоверного результата общее число клеток микроорганизмов, учтенных во всех квадратах, должно быть не менее 600!** Это обеспечивает большую точность. Количество клеток в 1 мл исследуемой суспензии вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \times 10^3}{h \times S} \times 10^n \text{, где} \qquad [2.1]$$

M – количество клеток в 1 мл суспензии;
a – среднее количество клеток в квадрате сетки;
h – глубина камеры, мм (0,1);
S – площадь квадрата сетки, мм^2;
10^3 – коэффициент перевода [см^3] в [мм^3];
10^n – кратность разведения исследуемой суспензии.

Пример 1

После заполнения камеры Горяева–Тома суспензией бактерий, разведенной в 1000 раз и подсчета клеток в 10-ти малых квадратах, были получены следующие результаты:

№ квадрата	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Число клеток	17	14	18	15	14	20	15	18	14	15

Для учета среднего количества клеток в 1 мл достаточно подсчитать среднее значение количества клеток и подставить полученное значение в формулу [2.1]:

$$M = \frac{16 \times 10^3}{0{,}1 \times 0{,}0025} \times 10^3 = 64\,000\,000\,000 \text{ кл./мл } (\approx 6{,}4 \times 10^{10} \text{ кл./мл}) \qquad [2.1]$$

Для получения статистических параметров численности клеток (более точных и грамотных) необходимо воспользоваться алгоритмом, приведенным в главе 11.

Вопросы для самоконтроля

1. Укажите основной принцип работы микроскопа.
2. Перечислите основные части микроскопа.
3. Какая оптимальная толщина предметного стекла для просмотра препаратов с помощью микроскопа и почему?
4. Как следует рассматривать препараты с грибами и бактериями?
5. Что такое объектив и от чего зависит его качество?
6. Дайте понятие рабочего расстояния и поля зрения.
7. Какие бывают объективы?
8. Особенности работы с иммерсионным объективом и его значение.
9. Правила работы с микроскопом.
10. Что можно наблюдать с помощью микроскопа?
11. Строение камеры Горяева–Тома.
12. Правила работы с камерой Горяева–Тома.

3. ОСНОВНЫЕ АГРОНОМИЧЕСКИ- И ЭКОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫЕ ГРУППЫ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Почву населяет огромное количество разнообразных микроорганизмов, которые являются чувствительными индикаторами, реагирующими даже на незначительное изменение среды обитания. Поэтому, данные о составе почвенного микробного сообщества, наряду с агрохимическими и физическими показателями почвы, могут быть использованы для оценки почвенного плодородия.

Активность почвенной микрофлоры обусловливает протекание в почве разнообразных процессов, связанных с трансформацией отмерших растительных и животных остатков (деструкцией лигноцеллюлозных и липопротеиновых комплексов), аммонификацией и нитрификацией, синтезом и разрушением перегноя, мобилизацией закрепленных в почве форм фосфора, накоплением физиологически активных веществ, фиксацией молекулярного азота атмосферы и т.п.

Для оценки экологического состояния почвы и уровня ее плодородия важно не только определить численность разнообразных групп микроорганизмов, но также проанализировать их соотношение и увязать полученные данные с особенностями структуры и физико-химическими характеристиками почвы.

Среди многочисленного разнообразия почвенных микроорганизмов можно выделить некоторые наиболее показательные группы, пригодные для индикации экологического и агрономического состояния почвы. При этом в качестве подобных индикаторов можно использовать:

1. численность ***неспорообразующих почвенных бактерий*** – симбионтов растений, активно размножающихся в ризосфере и использующих легкодоступные питательные вещества корневых выделений. Подавляющее большинство этих бактерий является представителями рода *Pseudomonas*, способных продуцировать ростостимулирующие и фунгистатические вещества, влияющие на обмен веществ растений и их устойчивость к фитопатогенам;
2. соотношение численности бактерий, предпочитающих минеральные источники азота к числу бактерий, хорошо растущих на источниках органического азота (аммонификаторы). Данный показатель называют ***коэффициентом минерализации*** и используют для оценки интенсивности протекания в почве процессов трансформации органического вещества отмерших растительных и животных остатков или внесенных органических удобрений;
3. ***состав почвенных бацилл***, являющийся показателем активности протекающих в почве минерализационных процессов. В почвах с более энергичными моби-

лизационными процессами доминируют бациллы, способные использовать не только органический, но и минеральный азот (*Bacillus mesentericus, Bac. megaterium, Bac. glutinosus, Bac. subtilis*). В почвах, в которых минерализационные процессы протекают слабо, как правило, преобладают бациллы, нуждающиеся в органическом азоте и не использующие его минеральные формы (*Bac. mycoides, Bac. cereus*);

4. ***численность низших почвенных грибов*** (микромицетов), участвующих в превращении органических веществ в почве, в том числе и труднодоступных. Массовое размножение грибов в плодородной почве обычно сдерживается конкуренцией с разнообразной бактериальной микрофлорой. Вспышки численности грибов указывают на наличие неблагоприятных факторов для роста растений. К этим факторам относятся: повышение кислотности почвенного раствора, наличие веществ-токсикантов, развитие эффекта «почвоутомления» вследствие неправильной системы возделывания почвы и проч.;
5. ***численность микроорганизмов***, способных растворять ***минеральные фосфаты*** кальция, алюминия и железа, а также мобилизовать ***фосфор органических соединений*** и за счет этого улучшать фосфорное питание растений;
6. ***численность и актуальная активность азотобактера,*** способствующего улучшению азотного питания растений и продуцирующего разнообразные вещества ростостимулирующей и фунгистатической природы. Подавление активности азотобактера, как и вспышка численности грибов в почве или грунте, является индикатором неблагоприятных почвенных условий, таких как: наличие токсикантов, недостаток легкодоступных органических соединений, передозировка минеральных удобрений.

4. МЕТОДИКА ПОСЕВА НА ТВЕРДЫЕ ЭЛЕКТИВНЫЕ СРЕДЫ

4.1. Отбор и подготовка образцов почвы (грунта) для анализа

Количество почвенных микроорганизмов учитывают в средней почвенной пробе. Образцы почвы отбирают почвенным буром в 10-ти точках исследуемого участка. В каждой точке делают не менее 5–7 уколов. Все используемые инструменты тщательно промываются водой, а непосредственно перед работой обрабатываются спиртом. Для отбора почвенных проб удобно использовать новые полиэтиленовые пакеты достаточной плотности.

Отобранные образцы объединяют, тщательно перемешивают и просеивают через сито с ячейкой 2 мм. **Хранить образцы почвы до посева следует не более 24 ч при температуре +4...5 °С в герметичной упаковке, позволяющей сохранить исходную влажность образца.**

! **Нельзя замораживать образцы почвы**

В некоторых случаях образцы почвы рекомендуется анализировать сразу после отбора: это касается анализа микрофлоры ризосферы и определения численности патогенной и условно-патогенной микрофлоры.

Непосредственно перед посевом образец почвы высыпают на плотный стерильный лист бумаги или обработанный спиртом поддон, перемешивают и разравнивают слоем примерно 1 см. Не менее чем из 5 точек (конвертом) берут среднюю пробу почвы весом 1 или 10 г (в зависимости от требуемого исходного разведения).

4.2. Приготовление исходного разведения образца почвы и серии рабочих разведений

Для получения исходного разведения образца 10 (или 1) г почвы помещают во флакон с 90 (или 100) мл стерильной воды. В первом случае в качестве исходного будет получено ***десятикратное разведение*** почвенного образца или $1 : 10^{1}$, т.е. ***первое*** разведение. Во втором случае будет получено разведение почвы $1 : 100$ или $1 : 10^{2}$, т.е. ***второе*** разведение. **Номер показателя степени числа 10 соответствует номеру исходного разведения почвенного образца.** Как правило, на практике чаще всего готовят сразу второе разведение, однако в случае заведомо известной низкой численности микроорганизмов в почве, грунте (или каком-либо другом природном субстрате) готовят первое разведение.

При проведении микробиологического посева на твердые элективные среды необходимо учитывать, что большинство почвенных микроорганизмов находятся в почве в адсорбированном состоянии. Для того чтобы получить как можно более точные данные о численности микроорганизмов в почве, необходимо предварительно провести десорбцию клеток микроорганизмов с поверхности почвенных частиц, иначе при анализе будет учитываться не столько количество клеток микроорганизмов, сколько количество попавших на питательную среду почвенных частиц.

Для повышения содержания в воде численности свободных клеток непосредственно перед помещением навески почвы во флакон со стерильной водой проводят растирание навески с небольшим количеством воды из этого же флакона в обработанной спиртом фарфоровой ступке фарфоровым пестиком до состояния гомогенной кашицы в течение 2–3 мин. После растирания в ступку добавляют небольшой объем воды из флакона, тщательно смывают частицы почвы со стенок ступки и с поверхности пестика и переносят все содержимое обратно во флакон. Затем, в течение 10 мин, осуществляют встряхивание флаконов на шейкере. Для предотвращения повторной сорбции клеток на поверхности почвенных частиц, шейкер необходимо отрегулировать так, чтобы он совершал встряхивающие, а не круговые движения.

Так как численность микроорганизмов в почве, как правило, колеблется в диапазоне от тысяч до сотен тысяч клеток в 1 г, существует потребность в дополнительном разбавлении исходного разведения и приготовлении серии рабочих разведений, из которых и будет осуществляться посев (рис. 3).

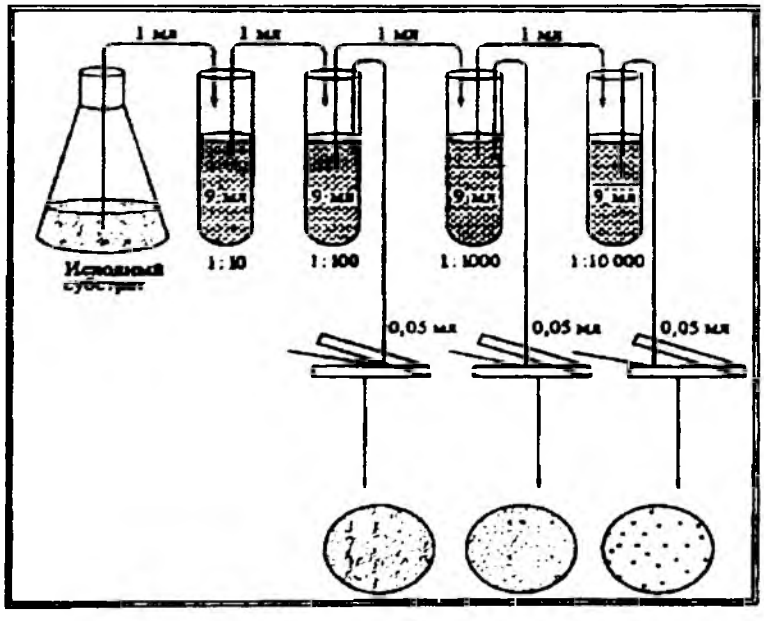


Рис. 3 Схема приготовления серии рабочих разведений и рассева суспензии микроорганизмов шпателем (по: Практикум по микробиологии, 2004)

Разведения готовят в стерильной водопроводной воде или физиологическом растворе (0,85%-й раствор NaCl). Для приготовления разведений стерильную водопроводную воду разливают по 9 мл в стерильные сухие пробирки. Затем 1 мл исследуемой суспензии из колбы стерильной пипеткой переносят в пробирку с 9 мл стерильной воды. Если исходное разведение было 100 кратным (т.е. *вторым*), то в первой пробирке будет получено *третье* (1 : 1000) разведение. Далее 1 мл жидкости из первой пробирки переносят во вторую пробирку с 9 мл стерильной воды и получают разведение, равное 1 : 10000 (1 : 10^{-4}), т.е. *четвертое*. Таким образом, можно получить всю серию необходимых разведений почвенного образца. Содержимое пробирок перед перенесением предварительно перемешивают с помощью пипетки.

Каждое новое разведение необходимо готовить новой пипеткой (или наконечником)!

Так как предсказать точное количество микроорганизмов в анализируемом образце довольно сложно, производить посев следует сразу из нескольких смежных разведений, например, из 3 и 4-го или 4 и 5-го разведений.

! **Степень разведения зависит от плотности исследуемой популяции микроорганизмов: чем больше плотность популяции, тем больше степень разведения**

4.3. Приготовление и разливка питательных сред в чашки Петри

При микробиологическом анализе для определения численности микроорганизмов, как правило, используют так называемые ***элективные среды***. Элективной называют питательную среду, состав которой подобран таким образом, чтобы обеспечить преимущественный (или выборочный) рост какой-то конкретной систематической или физиологической группы микроорганизмов. Существуют среды с широким и узким диапазоном элективности: т.е. строго элективные или высокоспециализированные среды. Примером узкоэлективной среды является безазотистая среда Эшби, предназначенная для роста азотфиксирующих микроорганизмов, способных усваивать азот непосредственно из атмосферы и потому способных расти на средах, не содержащих в своем составе источников азота.

В качестве примера широко используемой элективной среды можно привести мясопептонный агар (МПА), предназначенный для выделения и культивирования аммонифицирующих микроорганизмов, способных усваивать органические источники азота. Поскольку большинство почвенных гетеротрофных микроорганизмов могут использовать в качестве источника азота органические соединения, данную среду

часто рекомендуют для определения общей численности микроорганизмов в почве или так называемого *общего микробного числа (ОМЧ)*.

Однако, при этом нужно помнить, что данные, полученные при подсчете численности микроорганизмов на МПА (и на любой другой питательной среде для гетеротрофов), будут существенно занижены, так как не позволяют учесть большое количество микроорганизмов, растущих только на минеральных источниках питания (хемолитотрофов), деструкторов целлюлозы, медленнорастущих форм бактерий, а также строго анаэробных микроорганизмов (облигатных анаэробов). Из-за огромного разнообразия физиологических и систематических групп микроорганизмов практически невозможно подобрать такую универсальную среду, которая позволила бы определить истинное количество микроорганизмов в почве.

Составы питательных сред, предназначенных для определения численности каких-либо конкретных систематических или физиологических групп микроорганизмов, приводятся в специальной методической литературе или соответствующем ГОСТе. Так как в рецептуре питательной среды содержание необходимых реактивов, как правило, приведено на 1 л дистиллированной воды, необходимо произвести пересчет реактивов на требуемый объем питательной среды. При определении необходимого для посева объема среды исходят из того, что на одну чашку Петри расходуется примерно 15–20 мл среды.

Пример 2

Пересчитайте количество реактивов для посева с 1 л на 300 мл питательной среды КАА (крахмало-аммиачный агар):

Состав среды КАА	г/л	г/300мл
$(NH_4)_2SO_4$	2,0	0,6
K_2HPO_4	1,0	0,3
$MgSO_4$	1,0	0,3
$NaCl$	1,0	0,3
Крахмал	10,0	3,0
$CaCO_3$	3,0	0,9
Агар-агар	15	4,5

Пересчет количества необходимых солей удобно осуществлять, используя математическую пропорцию:

в 1л среды содержится – 2,0 г $(NH_4)_2SO_4$

в 300 мл (т.е. в 0,3л) – x г $(NH_4)_2SO_4$

Следовательно, $x = \frac{0,3 \times 2,0 \text{ г}}{1\text{л}} = 0,6$ г $(NH_4)_2SO_4$

При поверхностном посеве простерилизованную при соответствующем режиме автоклавирования питательную среду разливают в стерильные чашки Петри и остав-

ляют застывать на ровной горизонтальной поверхности. Затем чашки подсушивают в сушильном шкафу или термостате для испарения конденсата.

Для предотвращения образования конденсата разливку сред можно осуществлять под 2–3 слоя стерильных фильтров, предварительно помещенных между донышком чашки Петри и крышкой. Диаметр фильтра должен быть в 1.5–2 раза больше диаметра чашки Петри. Верхний слой фильтра вместе с крышкой снимается и отставляется в сторону на время разливки. При этом среду разливают обычным способом, слегка приподнимая прикрывающие донышко чашки фильтры. Чашки с разлитой средой оставляют на 30–40 мин для застывания среды и впитывания паров влаги фильтрами. Затем крышки вместе с фильтрами возвращают обратно на донышки чашек Петри. Придерживая крышку одной рукой, другой удаляют фильтры, крышка при этом опускается на донышко, чашка закрывается. Следует помнить, что при данном способе разливки сред посев необходимо осуществить в этот же день. Если по каким-то причинам этого сделать не удалось, то перед посевом необходимо тщательно просмотреть чашки на просвет для обнаружения возможных посторонних колоний (контаминант) и выбраковки загрязненных чашек.

4.4. Методика посева и расчета количества клеток микроорганизмов

4.4.1. Техника посева на твердые питательные среды

Из пробирок с приготовленными рабочими разведениями стерильной пипеткой последовательно забирают 0,02–0,05 мл почвенной суспензии и раскапывают на поверхность предварительно разлитой в чашки Петри агаризованной питательной среды. Стерильным стеклянным шпателем Дригальского без нажима плавными круговыми движениями каплю воды равномерно распределяют по поверхности среды, постепенно втирая ее в агаровую пластинку (Приложение 1, рис. 30). Растирание продолжают до тех пор, пока шпатель не перестанет свободно скользить по поверхности среды и появится легкое трение, что свидетельствует о втирании всего объема жидкости в среду.

Посев из каждого разведения проводят минимум на 2-3 параллельные чашки

При посеве одновременно из нескольких разведений можно использовать одну и ту же пипетку (или наконечник при работе автоматической пипеткой), начиная с разведения с наибольшим номером и заканчивая пробирками с наименьшим номером разведения. Растирать капли жидкости также можно одним и тем же шпателем, если начинать с чашек, засеянных из разведений с большим номером и заканчивая чашка-

ми, засеянными из разведений с наименьшим номером. **Следует помнить, что в таком случае увеличивается вероятность заражения посторонней микрофлорой!**

После посева чашки Петри помещают в термостат при температуре, оптимальной для исследуемой физиологической (или систематической) группы микроорганизмов, (от +20 до +33 °С) в перевернутом виде во избежание попадания на поверхность сред капель конденсата с внутренней поверхности крышек чашек Петри. По истечении необходимого для каждой физиологической группы микроорганизмов времени инкубации (от 2 до 30–40 сут.) проводят учет количества выросших на поверхности среды колоний и пересчет на количество клеток микроорганизмов в 1г абсолютно сухого вещества (а.с.в.) образца. При этом, исходят из правила, что: **каждая колония формируется из одной размножившейся на питательной среде клетки**. Подсчет, как правило, проводят, не открывая чашек Петри. Для удобства каждую просчитанную колонию отмечают точкой на наружной стороне дна чашки.

Необходимо помнить, что появление на одной или нескольких параллельных чашках Петри большого количества идентичных колоний, не встречающихся на других чашках, засеянных из того же образца, вероятнее всего, является следствием загрязнения посторонней микрофлорой и свидетельствует о необходимости повторного анализа данного образца (рис. 4)

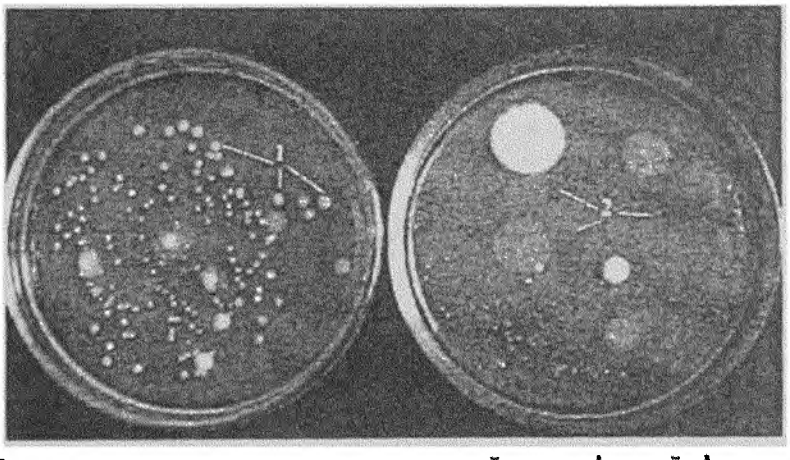


Рис. 4 Пример загрязнения посева посторонней микрофлорой, формирующей однотипные колонии (2) (фото Терещенко Н.Н)

Лучшим разведением следует считать то, при высеве из которого на поверхности среды в чашке Петри вырастает от 30–50 до 100–200 колоний. Результаты параллельных высевов из одного и того же разведения суммируют и определяют среднее число колоний.

4.4.2. Пересчет количества колоний микроорганизмов на питательной среде в количество клеток в 1 г исследуемого субстрата

Пересчет количества колоний в чашках Петри в 1 г почвы (грунта) осуществляют по следующей формуле:

$$N = \frac{N_0 \times 10^n}{V} \times K_w, \text{ где} \qquad [4.1]$$

N – количество клеток в 1 г а.с.в.;
N_0 – количество колоний, сформировавшихся на питательной среде в чашке Петри;
n – степень разведения из которого производился посев;
V – объем капли воды;
K_w – коэффициент влажности образца, рассчитываемый по формуле:

для почвы: $$K_w = \frac{100 + W}{100} \qquad [4.2]$$

для торфосодержащего грунта: $$K_w = \frac{100}{100 - W} \qquad [4.3]$$

где W – влажность почвы и грунта (%)

Пример 3

В результате посева на МПА (мясопептонный агар) из 4-го и 5-го разведений (1:10000 и 1:100000) при объеме капли 0,02 мл на поверхности питательной среды выросло:

– в чашках, засеянных из 4-го разведения – 105 колоний;
– в чашках, засеянных из 5-го разведения – 37 колоний.

Влажность анализируемого образца почвы – 14,2%, что соответствует K_w = 1,14.

Так как оптимальное количество колоний на чашке Петри находится в диапазоне от 50 до 200 колоний, для пересчета используем данные, полученные при посеве из 4-го разведения.

Подставляя значения в формулу [4.1] получаем:

$$N = \frac{105 \times 10^4}{0{,}02} \times 1{,}14 \approx 5985 \times 10^4 \text{ или } 6{,}0 \times 10^7 \text{ КОЕ / г а.с.в. почвы}$$

КОЕ – колонии образующие единицы.

Точность любого метода определения численности микроорганизмов ограничена ошибкой метода, которая возникает в результате случайного распределения клеток в суспензии и является результатом ограниченного числа подсчитываемых клеток, а также связана с техническими ошибками. Ошибки метода неизбежны, тогда как технические ошибки зависят главным образом от качества работ исследователя. Чашечный метод требуют особой чистоты и аккуратности при выполнении всех операций

Вопросы для самоконтроля

1. Методика отбора проб для учета количества почвенных микроорганизмов.

2. Способы хранения образцов для посева.

3. Метод приготовления разведений.

4. Процедура десорбции клеток микроорганизмов и ее значение.

5. Значение встряхивания флаконов с почвенным образцом.

6. Значение стерильных пипеток при приготовлении разведений.

7. В каком случае для приготовления исходного разведения во флакон с 90 мл воды добавляют 10 г исследуемой почвы (или грунта)?

8. При посеве одновременно из трех последовательных рабочих разведений, в каком порядке следует раскапывать почвенную суспензию на чашки Петри, если в работе используют 3, 4 и 5 разведения? В каком порядке затем следует растирать засеянные чашки, если используется только один шпатель?

9. Для обработки результатов микробиологического анализа следует использовать чашки, в которых выросло:

а. 10–15 колоний;

б. 120–150 колоний;

в. 310–350 колоний.

10. Для предотвращения возможных негативных последствий от образования конденсата в чашках Петри...

а. разливку питательных сред осуществляют под бумажные стерильные фильтры;

б. перед разливкой агаризованую питательную среду тщательно перемешивают;

в. после засева чашки Петри помещают в термостат в перевернутом положении.

11. Рассчитайте количество клеток в 1 г а.с.в. почвы, если при посеве из 4-го разведения на двух параллельных чашках Петри выросло 123 и 143 колонии. Объем капли – 0,05 мл, а влажность анализируемой пробы – 27%.

5. ИССЛЕДОВАНИЕ, ОПИСАНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

При описании и идентификации бактерий изучают их культуральные свойства, морфологию, организацию клетки, физиолого-биохимические особенности, химический состав клеток, содержание гуанина и цитозина (ГЦ) в ДНК и другие фено- и генотипические признаки. При идентификации грибов изучают характерные черты их строения и способы образования половых структур. Определение систематической принадлежности микроорганизмов, как правило, начинают с изучения морфологии клеток и, формируемых микроорганизмами на плотных питательных средах, колоний. Для дальнейшей диагностики исследуют особенности роста микроорганизмов на средах различного состава.

5.1 Исследование морфологии микроорганизмов

5.1.1 Бактерии

Под общим понятием «бактерии» в настоящее время описано свыше 1600 видов микроорганизмов-прокариот, не имеющих настоящего сложноорганизованного ядра (Приложение II, рис. 32). Большинство представителей бактерий – одноклеточные организмы, различающиеся размерами и физиологическими свойствами. Морфологическая характеристика и организация клеток бактерий включает такие признаки, как форма клеток (шаровидные, палочковидные, извитые) и размер в микрометрах (рис. 5, 7). У палочковидных бактерий дополнительно отмечают форму концов клеток: вогнутые, закругленные или усеченные. Клетки бактерий могут быть одиночными, соединенными попарно, в цепочки или в виде пакетов. Отдельно отмечают способность бактерий к спорообразованию, а также расположение в клетках спор (бациллярное, клостридиальное и плектридиальное), наличие капсул и клеточных включений, способность к движению, наличие жгутиков и тип жгутикования (один жгутик – монотрих, пучок жгутиков на одном конце – лофотрих, пучки жгутиков на обоих концах клеток – амфитрих, по всей поверхности – перитрих) (рис. 6). Первостепенное значение для систематики бактерий придается окраске по Граму, которая зависит от строения клеточных стенок бактерий (Приложение II, рис. 34–35).

Формы клеток бактерий не отличаются большим разнообразием. Чаще всего это палочки разной длины, сферические клетки (кокки), а также извитые формы – вибрионы, спирохеты и спириллы. Данные клетки могут образовывать довольно устойчивые сочетания – пары палочек и кокков (диплококки), короткие и длинные цепочки палочек и кокков (стрептококки), тетрады и пакеты из 4 (8) и более кокковидных клеток (сарцины), гроздья (стафилококки), розетки, плоские таблички, сети.

Рис. 5 Формы клеток бактерий и типы спорообразования

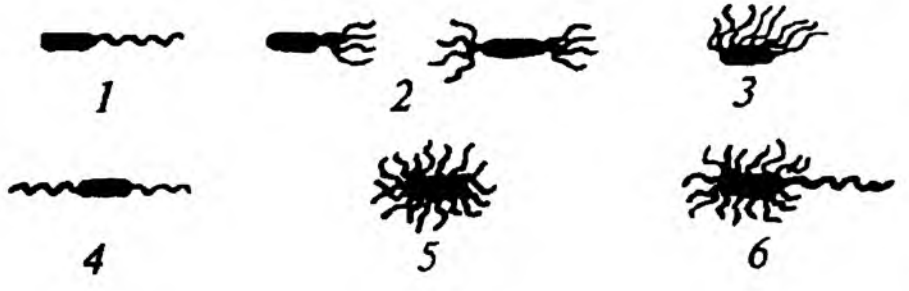


Рис. 6 Типы жгутикования бактерий (по: Нетрусов А.И. и др., 2006)
1 – монотрихальное; 2 – лофотрихальное; 3 – латеральное; 4 – амфитрихальное; 5 – перитрихальное; 6 – смешанное полярно-перитрихальное

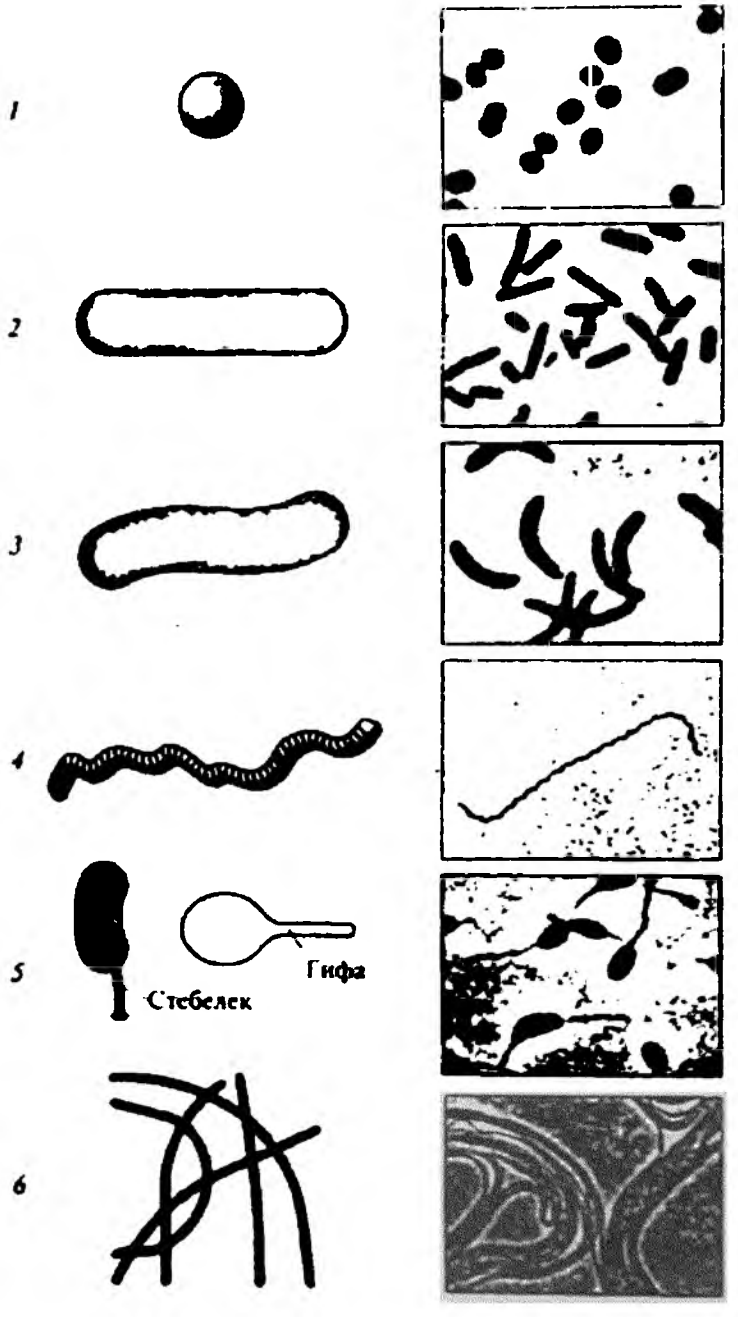


Рис. 7 Представители наиболее распространенных морфотипов бактерий
(по: Нетрусов А.И. и др., 2006)

1 – кокки (*Thiocapsa roseopersicina*); 2 – палочки (*Desulfuromonas acetoxidans*); 3 – спириллы (*Rhodospirillum rubrum*); 4 – спирохеты (*Spirochaeta stenostrepta*); 5 – почкующиеся клетки с выростами (гифы и отростки) (*Rhodomicrobiom vannielii*); 6 –нитевидные клетки (*Chloroflexus aurantiacus*).

5.1.2 Актиномицеты

Название актиномицетов происходит от греч. *actis* – луч и *mykes* – гриб и дословно означает – лучистые грибы (рис. 8). Данная группа микроорганизмов занимает промежуточное положение между бактериями и грибами. Морфологически это одноклеточные, как и бактерии, микроорганизмы, но формирующие мицелий, как грибы. Диаметр нитей мицелия актиномицетов, в отличие от грибов, очень мал (0,5–1,0 мкм), однако гифы длинные и ветвистые.

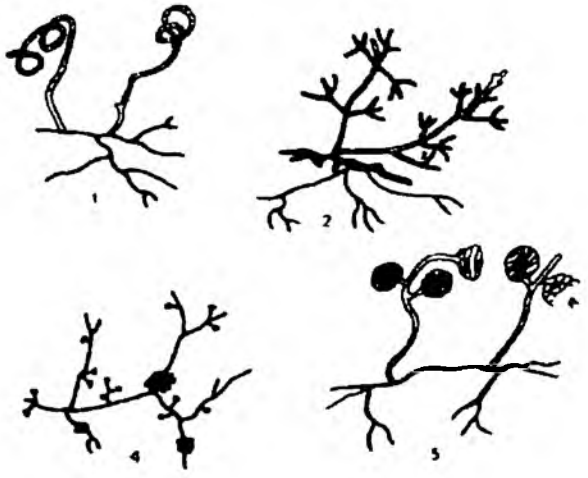


Рис. 8 Представители родов актиномицетов
(по. Сидоренко О.Д. и др., 2005)
1 – *Streptomyces*; 2 – *Streptoverticillium*;
4 – *Micromonospora*; 5 – *Streptosporangium*

Рис. 9 Формы воздушных спороносцев актиномицетов
(по. Нетрусов А.И. и др., 2006)

Размножаются актиномицеты фрагментами мицелия и спорами, которые образуются на воздушном и/или субстратном мицелии. Споры могут быть одиночными, двойными, собранными в цепочки разной формы и длины или в спорангиях. Спороносцы бывают прямыми, волнистыми, спиральными, располагаются на мицелии поочередно, либо мутовками (рис. 9).

В отличие от грибов, актиномицеты на питательных средах образуют компактные, плотные с бархатистой или мучнистой поверхностью колонии (рис. 10–11), иногда имеющие характерный землистый запах. Колонии плотно срастаются с субстратом, слегка в него вдавливаясь по краям. Мицелий актиномицетов на питательных средах диф-

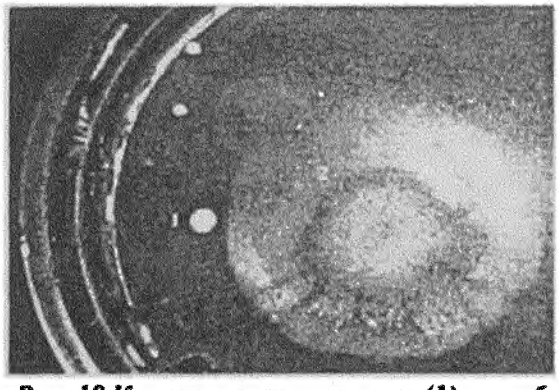


Рис. 10 Колонии актиномицета (1) и гриба (2) (фото Терещенко Н.Н.)

ференцирован: одна часть его погружена в субстрат (*субстратный мицелий*), другая находится над субстратом (*воздушный мицелий*).

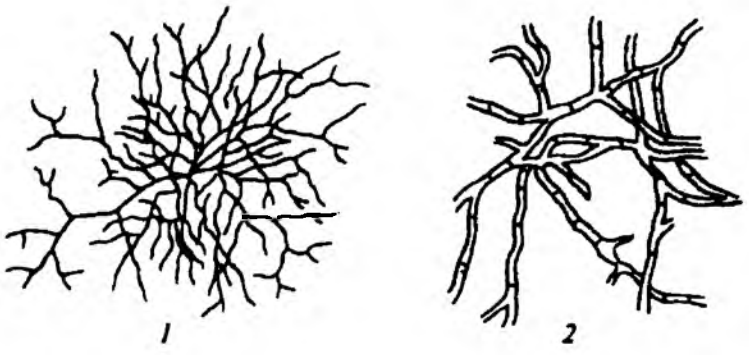


Рис. 11 Мицелиальные организмы при одинаковом увеличении
(по: Нетрусов А.И. и др., 2006)
1 – почвенный актиномицет; 2 – почвенный гриб

Многие представители актиномицетов продуцируют пигменты, поэтому их воздушный мицелий, и особенно колонии, окрашены в голубой, синий, фиолетовый, розовый, бурый, коричневый или черный цвета. Кроме того, пигменты, диффундируя в питательную среду, окрашивают ее в соответствующие цвета.

Чтобы выявить характерные морфологические признаки колоний актиномицетов, сначала следует рассмотреть их при малом увеличении непосредственно на питательной среде на чашках Петри или по краю колонии в пробирке. Затем приготовить фиксированный, окрашенный фуксином, препарат. Для этого на предметное стекло нужно нанести кусочек колонии актиномицета вместе со средой, чтобы захватить не только воздушный, но и субстратный мицелий. Вторым предметным стеклом плотно прижать этот кусочек к стеклу, раздавить и размазать по стеклу. Далее препарат сушат, фиксируют и красят. На фиксированном окрашенном препарате дифференциации мицелия не видно, как правило, не видны и споры, однако четко просматриваются мицелиальные одноклеточные нити.

5.1.3 Нокардии

Нокардии (*Nocardia*) – это наименее дифференцированные формы актиномицетов. Воздушный мицелий отсутствует или развит слабо. На питательных средах развиваются колонии тестообразной (мягкой) консистенции с характерным мицелиальным ободком. Окраска разнообразна. В молодом возрасте образуют мицелий, кото-

рый вскоре начинает септироваться и расчленяться на палочковидные фрагменты, в дальнейшем переходящие в укороченные палочки, но чаще – в кокки (рис. 12, 13*б*).

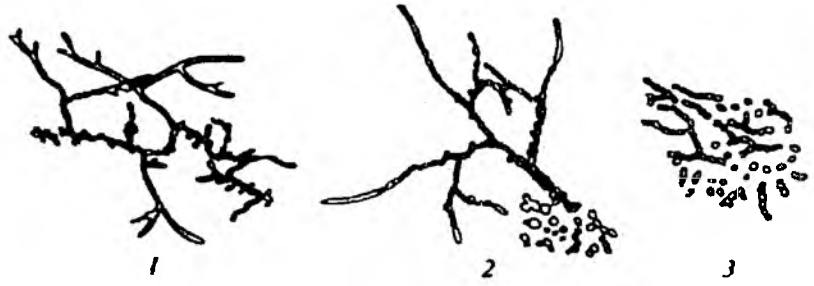


Рис. 12 Клетки нокардии на разных фазах роста культуры
(по: Нетрусов А.И. и др., 2006)
1–2-суточная; 2 – 4–5-суточная; 3 – 7–8 суточная культура

5.1.4 Микобактерии

Это палочковидные, иногда ветвящиеся, образующие подобие мицелия бактерии (рис. 13*в*). Настоящего мицелия не имеют. Колонии тестообразной консистенции, продуцируют пигмент. В молодой культуре формируются палочки искривленной формы с неровным контуром – звездообразные, иногда довольно длинные, с боковыми отростками. В старых культурах ветвистые палочки часто распадаются сначала на более короткие палочки, затем – на кокки.

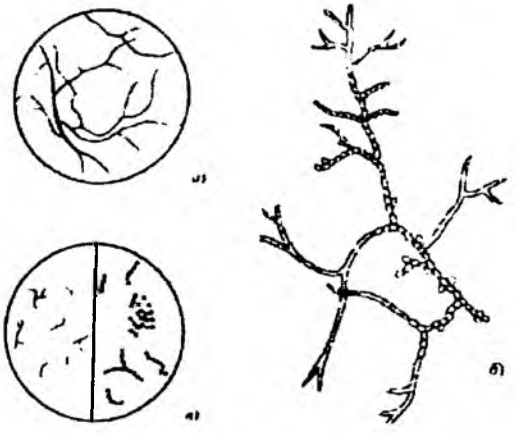


Рис. 13 Актиномицеты (а), нокардии (б); микобактерии (в)
(по: Теппер Е.З., 2004)

5.1.5 Грибы

Грибы – эукариотные одно- и многоклеточные мицелиальные хемоорганотрофные организмы, относятся к царству *Mycota* (Приложение II, рис. 33). Царство грибы представлено двумя отделами: *Oomycota* и *Eumycota*. Отдел *Eumycota* представляет наибольший интерес для микробиологии и включает ряд классов: *Chytridiomycetes*, *Zygomycetes*, *Ascomycetes* (аскомицеты, сумчатые грибы), *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes* (дейтеромицеты, несовершенные грибы).

Грибы – это обширная группа организмов, насчитывающая около 100 тыс. видов. Весьма разнообразны по внешнему виду, местам обитания и физиологическим

функциям. Представителей грибов делят на макро- и микромицеты. Макромицеты образуют крупные плодовые тела, отсутствующие у микромицетов (на протяжении всего жизненного цикла имеются только микроскопические структуры).

Тело гриба – мицелий (грибница) – разветвленные длинные нити (гифы) (рис. 14). У некоторых грибов нити гиф не имеют поперечных перегородок. Для большинства характерны гифы с поперечными перегородками – септами, разделяющими их на участки. На основании данного признака грибы делят на низшие – несептированные и высшие – септированные.

Грибы значительно крупнее бактерий и актиномицетов. Диаметр гиф колеблется от 5 до 50 мкм и более. Клеточная стенка большинства содержит хитин или близкие к нему соединения. Под клеточной стенкой находится зернистая цитоплазма. Она содержит большое количество рибосом, состоящих почти из одной РНК и служащих основным местом синтеза белка. В цитоплазме есть митохондрии, в которых локализованы дыхательные ферменты, кроме того, могут быть включения волютина и жиров. В клетках грибов четко дифференцировано ядро, окруженное мембраной. Несептированный мицелий содержит несколько ядер.

Наличие мицелия – один из отличительных признаков грибов. Отдельные участки мицелия грибов могут превращаться в специальные образования – спорангии, в которых формируются споры. Способы размножения разнообразны (вегетативное, бесполое, половое). Специфичность размножения положена в основу систематики грибов.

Грибы широко распространены в природе. Их обнаруживают во всех естественных субстратах, продуктах питания и т.д. Среди грибов встречаются сапротрофы, паразиты и хищники. В почве грибы участвуют в разложении

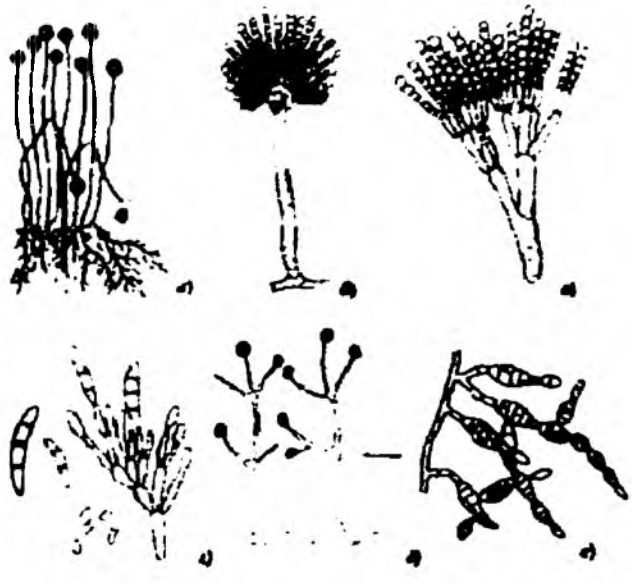


Рис. 14 Микроскопические грибы
(по: Теппер Е.З., 2004)
а – *Mucor*, б – *Aspergillus*; в – *Penicillium*; г – *Fusarium* (конидиеносец с макро- и микроконидиями); д – *Trichoderma* (конидиеносцы с головками конидий); е – *Alternaria* (конидиеносцы с цепочками конидий)

органических веществ, могут вызывать порчу продуктов, деревянных построек, отдельные представители – возбудители болезней растений, животных и человека.

Дрожжи и дрожжеподобные грибы – сборная группа одноклеточных микроскопических организмов, относящихся к разным классам грибов, преимущественно к классу аскомицетов.

Диаметр клеток дрожжей от 8 до 15 мкм. Форма разнообразна: эллипсовидная, грушевидная, округлая, цилиндрическая (рис.15). Размножаются вегетативным (почкование и деление) и половым путем (образование спор). К почкующимся дрожжам относятся представители «культурных» дрожжей рода *Saccharomyces*, к делящимся – виды рода *Schizosaccharomyces*. При половом процессе слияние вегетативных клеток ведет к образованию сумок со спорами. В сумке образуется от 2 до 8 (иногда 12) спор. Среди дрожжей есть аспорогенные (ложные) дрожжи – не способные к половому процессу и спорообразованию (класс несовершенные грибы).

Рис. 15 Дрожжи
(по: Теппер Е.З., 2004)
а – почкующиеся; б – делящиеся

«Одомашненными» дрожжами являются пекарские дрожжи – *Saccharomyces cerevisiae*. Форма разнообразна, размножаются почкованием (вегетативный способ) и аскоспорами. При почковании на материнской клетке возникает маленькая выпуклость – почка – дочерняя клетка, в которую переходит одно ядро. Клетка увеличивается в размерах и отделяется. Если условия благоприятны – процесс идет очень быстро. У некоторых представителей рода клетки после почкования не успевают разъединяться и возникает псевдомицелий.

5.2 Приготовление препаратов живых клеток микроорганизмов для световой микроскопии

Метод применяют для выявления подвижности клеток микроорганизмов, образования и прорастания спор, изучения размеров клеток, характера их расположения. Препараты микроскопируют, а затем, слегка затемняя поле зрения (закрыв ирисовую диафрагму конденсора), рассматривают. Вначале просматривают на малом увеличении, используя объектив 8×, затем, после обнаружения края капли, используют объектив на 40× или иммерсионный (90×).

Для приготовления препарата «раздавленная капля» на чистое предметное стекло наносят каплю дистиллированной воды. В неё вносят исследуемую культуру и

аккуратно смешивают с водой. Накрывают каплю покровным стеклом так, чтобы под ним не образовывались пузырьки воздуха. Стеклянной палочкой прижимают покровное стекло к предметному стеклу и удаляют избыток воды фильтровальной бумагой, поднося ее к краям покровного стекла. При просмотре приготовленного препарата под микроскопом с иммерсионным объективом, на покровное стекло наносят каплю иммерсионного масла. **Капля должна быть очень маленькой, чтобы масло не дотекло до края стекла и не смешалось с водой!**

! Данный метод удобен для исследования подвижности бактериальных клеток, а также просмотра крупных объектов - микроскопических грибов, дрожжей

5.3 Препараты фиксированных и окрашенных клеток микроорганизмов

Получение фиксированных окрашенных препаратов включает приготовление мазка, его высушивание, фиксацию и окраску. Под фиксацией понимают такую обработку живого объекта, которая дает возможность быстро прервать течение жизненных процессов в объекте, сохраняя его тонкую структуру. Кроме того, в результате фиксации, клетки прочно прикрепляются к стеклу, не смываются водой и лучше прокрашиваются.

! Для обезжиривания стекол используют смесь этилового спирта и эфира (1:1). (Вдали от горелок!)
Предметные стекла, используемые для микроскопирования, необходимо хранить в закрытой емкости с этиловым спиртом

Для приготовления мазка на чистое обезжиренное предметное стекло наносят каплю водопроводной воды. Прокаленной и остуженной бактериологической петлей с поверхности бактериальной колонии берут небольшое количество микробной массы и вносят в каплю воды. Каплю и бактериальный материал тщательно размазывают петлей по стеклу на площади около 4 $см^2$, стараясь сделать мазок полупрозрачным. Если мазок получился слишком густым, его необходимо разбавить, добавив прокаленной петлей еще немного воды и растерев мазок на бóльшую площадь предметного стекла.

Высушивание мазка следует производить при комнатной температуре на воздухе, так как при нагревании мокрого мазка возможна деформация бактериальных клеток.

! Хорошо приготовленный тонкий мазок высыхает очень быстро

Для фиксации мазка предметное стекло при помощи пинцета 3–4 раза медленно проводят нижней стороной над пламенем горелки.

Кроме того, фиксировать мазок можно путем обработки его 96%-ным этиловым спиртом или смесью равных объемов спирта и эфира (жидкость Никифорова). Для этого препарат погружают на 1–3 мин в фиксирующую жидкость.

Окрашивают фиксированные препараты, главным образом, анилиновыми красителями. Различают кислые и основные красители. К кислым относят красители, у которых красящими свойствами обладает анион, у основных красителей – катион. Примеры кислых красителей – эозин, эритрозин, нигрозин, кислый фуксин; все они интенсивно связываются с цитоплазматическими компонентами клетки. Основные красители – метиленовый синий, основной фуксин, генциановый фиолетовый, кристаллвиолет, сафранин – интенсивнее связываются с ядерными компонентами клетки.

! В микробиологической практике чаще применяют основные красители, так как высокая концентрация ДНК и р-РНК в клетке делают ее более чувствительной к данному типу красителя

Для простого окрашивания клеток микроорганизмов чаще используют основной фуксин, генциановый фиолетовый и метиленовый синий. Фиксированный препарат помещают на параллельные стеклянные палочки, лежащие над лотком, наносят на него раствор красителя и выдерживают в нем в течение 1–3 мин.

! Необходимо следить за тем, чтобы во время окрашивания краситель на мазке не подсыхал

По окончании окраски, препарат промывают водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Затем препарат высушивают на воздухе или осторожно промокают фильтровальной бумагой, помещают на окрашенный мазок каплю иммерсионного масла и просматривают с объективом 90× (100×).

! В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения светлое и чистое, окрашены только клетки. Возраст культуры, состав среды и условия культивирования существенно влияют на морфологию и цитологию микроорганизмов

5.4 Окраска по Граму

С молекулярной организацией и химическим составом клеточной стенки связывают способность бактерий окрашиваться по Граму (Приложение II, рис. 34–35). Эта окраска является важным диагностическим признаком. По способности окрашиваться красителями триметилфенолового ряда все бактерии делятся на две группы: грамположительные и грамотрицательные. Грамположительные бактерии удержива-

ют комплекс генцианового фиолетового с йодом при обработке препарата спиртом и поэтому окрашиваются в фиолетовый цвет. Грамотрицательные не обладают такой способностью и обесцвечиваются спиртом. Поэтому при последующей обработке фуксином они приобретают розовую окраску.

По Граму рекомендуется окрашивать клетки молодых, суточных культур, так как способность удерживать краситель зависит от физиологического состояния бактерий и некоторые после прекращения активного роста теряют способность окрашиваться по Граму

Техника окраски по Граму. На хорошо обезжиренное предметное стекло наносят три тонких мазка разных культур микроорганизмов: в центре – мазок клеток исследуемой культуры, слева и справа – контрольных. Клетки одной контрольной культуры должны быть грамположительными (например, *Micrococcus luteus* или *Bac. cereus*), другой – грамотрицательными (например, *Escherichia coli*).

Мазки следует готовить тонкими, чтобы клетки равномерно распределялись по поверхности стекла и не образовывали скоплений

Препарат высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки и окрашивают в течение 1–2 мин феноловым (или спиртовым) раствором генцианового фиолетового (или кристаллического фиолетового в течение 1 мин), держа стекло в слегка наклонном положении. Затем краситель сливают и, не промывая препарат водой, на 1–2 мин наносят на него раствор Люголя. Стекло лучше держать в наклонном положении. После полного почернения мазка раствор Люголя сливают. Препарат, не промывая водой и непрерывно покачивая, обрабатывают 96%-ным спиртом в узком стаканчике в течение 15–20 с.

Важно четко придерживаться времени обесцвечивания, так как при превышении указанного срока обесцвечиваются и грамположительные клетки

После этого препарат быстро промывают водой и окрашивают в течение 1–2 мин водно-спиртовым раствором фуксина (1 мл насыщенного раствора основного фуксина + 9 мл дистиллированной воды). Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионным объективом.

При правильном окрашивании грамположительные бактерии имеют темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные – розово-красный

5.5 Исследование культуральных свойств микроорганизмов

5.5.1 Рост микроорганизмов на плотных питательных средах

На поверхности плотных питательных сред, в зависимости от способа посева, микроорганизмы могут расти в виде колонии, штриха или сплошного газона. ***Колонией*** называют изолированное скопление клеток одного вида, выросшее в большинстве случаев из одной клетки. В зависимости от того, где развивались клетки (на поверхности плотной питательной среды, в толще ее или на дне), различают поверхностные. глубинные и донные колонии. Колонии, образованные на поверхности, различаются большим разнообразием. При их описании учитывают следующие признаки:

Форму – округлая, амебовидная, неправильная (рис. 16).

Размер (диаметр) – измеряют в мм. Если размеры колоний не превышают 1 мм, то их называют точечными.

Поверхность – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная.

Профиль – плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и т.п. (рис. 17).

Блеск и прозрачность – колония блестящая, матовая, тусклая, мучнистая или прозрачная.

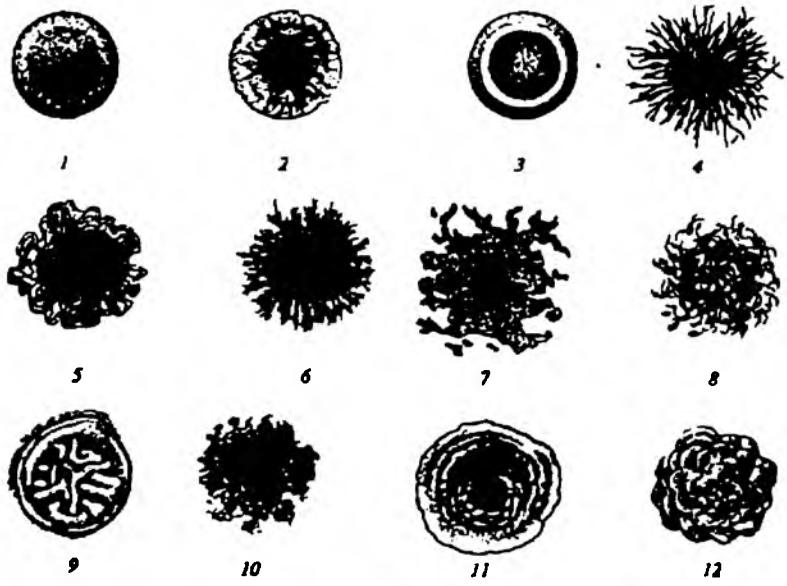


Рис. 16 Форма колоний (по: Практикум по микробиологии, 2004)
1 – круглая; 2 – круглая с фестончатым краем; 3 – круглая с валиком по краю; 4, 5 – ризоидные, 6 – с ризоидным краем; 7 – амебовидная, 8 – нитевидная; 9 – складчатая, 10 – неправильная; 11 – концентрическая; 12 – сложная

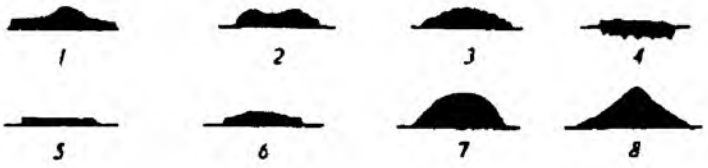


Рис. 17 Профиль колоний (по: Практикум по микробиологии, 2004)
1 – изогнутый; 2 – кратерообразный; 3 – бугристый; 4 – врастающий в субстрат; 5 – плоский; 6 – выпуклый, 7 – каплевидный, 8 – конусовидный.

Цвет – бесцветная колония или пигментированная (белая, желтая, золотистая, оранжевая, сиреневая, красная, черная и т.д.). Грязно-белые колонии относят к бесцветным. Дополнительно отмечают выделение колонией в субстрат какого-либо пигмента.

Край – ровный, волнистый, зубчатый, бахромчатый и т.д. (рис. 18).

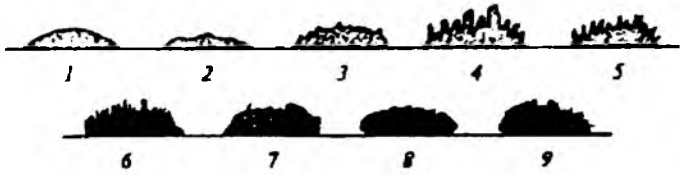


Рис. 18 Край колонии (по: Практикум по микробиологии, 2004)
1 – гладкий; 2 – волнистый, 3 – зубчатый; 4 – лопастной; 5 – неправильный, 6 – реснитчатый; 7 – нитчатый; 8 – ворсинчатый, 9 – ветвистый.

Структуру – однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая (рис. 19). Для этого чашку Петри помещают на столик микроскопа крышкой вниз и рассматривают при малом увеличении.

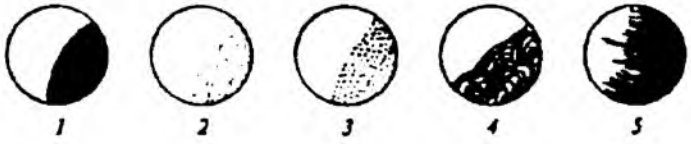


Рис. 19 Структура колонии (по: Практикум по микробиологии, 2004)
1 – однородная, 2 – мелкозернистая; 3 – крупнозернистая; 4 – струйчатая; 5 – волокнистая.

Консистенцию определяют, прикасаясь к поверхности колонии петлей. Колония может легко сниматься с агар-агара, быть плотной, мягкой или врастающей в среду, слизистой (прилипает к петле), тягучей, иметь вид пленки (снимается целиком), быть хрупкой и крошиться при прикосновении. Глубинные колонии довольно однообразны. Чаще всего они похожи на сплющенные чечевички, в проекции имеют форму овалов с заостренными концами. Донные колонии обычно имеют вид тонких прозрачных пленок, стелющихся по дну.

5.5.2 Рост микроорганизмов в жидких питательных средах

Рост микроорганизмов в жидких питательных средах более однообразен, чем на поверхности твердых агаризованных сред и сопровождается помутнением среды, образованием пленки или осадка. Характеризуя рост микроорганизмов в жидкой среде, как правило, отмечают степень помутнения (слабая, умеренная, сильная), особенности строения пленки (тонкая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая), а при образовании осадка указывают скудный он или обильный, плотный, рыхлый, слизистый или хлопьевидный. Очень часто рост микроорганизмов сопровождается появлением запаха пигментацией среды или/и выделением газа.

Для описания роста микроорганизмов на жидких средах их выращивают на мясопептонном бульоне (МПБ) или другой среде, обеспечивающей хороший рост.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие признаки важны для идентификации микроорганизмов?
2. Особенности строения бактериальной клетки.
3. Проведите соответствие между левым и правым столбцами:

один жгутик	а. лофотрих
пучок жгутиков на одном конце клетки	б. перитрих
пучки жгутиков на противоположных концах клетки	в. монотрих
жгутики равномерно по всей поверхности клетки	г. амфитрих

4. Актиномицеты отличаются от грибов ...
   а. более тонким мицелием;
   б. формированием на твердой среде воздушного мицелия;
   в. одноклеточным строением;
   г. врастанием колоний в питательную среду;
   д. формированием конидиеносцев.
5. Особенности строения клеток грибов.
6. Проведите соответствие между левым и правым столбцами:

Форма бактериальной клетки	Тип клетки
округлая	спирохеты
палочковидная	вибрионы
изогнутая	кокки
спиральная	спириллы
в виде запятой	палочки

7. Значение дрожжей для биотехнологии
8. Значение метода приготовления препаратов живых клеток микроорганизмов.
9. Что используют для обезжиривания предметных стекол?

10 Как приготовить препарат «раздавленная капля»?

11 Какие используют в микробиологии красители и для чего?

12 Техника приготовления фиксированных окрашенных препаратов.

13. Что влияет на морфологию и цитологию микроорганизмов?

14 Расставьте в правильном порядке основные операции окрашивания по Граму:

а. препарат, не промывая водой, обрабатывают 96 %-м этиловым спиртом,

б. на обезжиренное стекло наносят тонкий мазок бактериальной культуры,

в. после почернения мазка раствор Люголя смывают,

г. мазок окрашивают в течение 1–2 мин феноловым раствором генцианового фиолетового;

д. мазок фиксируют над пламенем горелки;

е. препарат хорошо промывают водой;

ж. не промывая препарат водой, наносят раствор Люголя;

з. мазок высушивают на воздухе;

и. препарат быстро промывают водой и окрашивают в течение 1–2 мин водным фуксином.

15 Колония – это

16. Чистая культура – это

17. Перечислите основные диагностические параметры морфологии бактериальных колоний.

18 Что такое рост микроорганизмов?

6. МЕТОДЫ УЧЕТА КОЛИЧЕСТВА И СОСТАВА РИЗОСФЕРНОЙ МИКРОФЛОРЫ

В природе все растения находятся в тесном контакте с микрофлорой, населяющей поверхность их корней и размножающейся в прикорневом слое почвы. Во время жизнедеятельности растений, на поверхность корней выделяются различные органические соединения, синтезированные растительным организмом (рис. 20). Корневые выделения растений, содержащие органические вещества, привлекают микроорганизмы, которые, питаясь, размножаются за их счет, оказывая в свою очередь влияние на растение. Подобное явление обусловливает образование биологических сообществ, основанных на взаимодействии растений с широким спектром почвенных микроорганизмов, которые поселяются на поверхности корней или проникают в растительные ткани.

Рис. 20 Комплексное взаимодействие микроорганизмов и растений
(по: Боронин, Кочетков, 2000)

Совокупность корневой системы с почвой представляет собой сложную экологическую нишу, заселенную полезными, вредными и нейтральными для растения микроорганизмами. Активная секреция клетками корня различных веществ обеспечивает питательными субстратами микроорганизмы, образуя с ним прочные ассоциации внутри корневых тканей, на корневой поверхности (*ризоплане*), а также в почве, окружающей корни (*ризосфере*).

Количество микроорганизмов на поверхности корня в ризосфере в сотни раз больше, чем в остальной массе почвы. Одной из характеристик ризосферы различных растений, отражающей ее заселенность микроорганизмами, является количественное

отношение R/S (*rhizosphera / soil*). Величина R/S показывает, во сколько раз количество микроорганизмов определенной таксономической группы в ризосфере данного растения превышает количество этих микроорганизмов в почве. Впервые в 1904 г. Хильтнер обратил внимание на то, что микрофлора в почве, на которой произрастают растения, распределена неравномерно и что численность микроорганизмов в слое почвы, непосредственно прилегающем к корням, значительно выше, чем в почве свободной от корней. Было установлено, что так называемый ризосферный эффект (*Rhizosphere effect*) выражается не только в значительном увеличении количества микроорганизмов в прикорневой почве, но также и в изменении их качественного состава – около корней и на их поверхности концентрируются неспоровые флуоресцирующие бактерии.

6.1. Количественный учет ризосферных микроорганизмов

6.1.1. Отбор и подготовка образцов для анализа

Общее количество микроорганизмов в ризосфере учитывают в средней почвенной пробе, которую составляют путем смешивания 10–15 отдельных образцов, выкопанных вместе с растениями. Каждый образец представляет собой монолит размером не менее 10×10 см. Избыток почвы удаляют. Почву, приставшую к корням растений (т.е. ризосферную почву) стряхивают на стерильное стекло или лист бумаги. Отдельные образцы объединяют, просеивают через стерильное сито 2 мм, удаляют корешки и тщательно перемешивают.

Отбор образцов для анализа ризосферной микрофлоры проводят непосредственно в день анализа. Извлечение растения из почвы приводит к прекращению корневых выделений и усилению аэрации, что неизбежно приводит к изменению общей численности микрофлоры и к деформации структуры микробного сообщества ризосферы

Из полученного среднего образца берут 3 навески по 10 г на лабораторных весах и переносят в 100 мл стерильной воды – получают разведение 1:10. Почвенную суспензию встряхивают 10 мин и делают из нее серию последовательных разведений.

6.1.2. Метод прямого подсчета количества микроорганизмов в ризосфере (метод Виноградского–Шульгиной)

На предметном стекле рисуют квадрат 2×2 см. Почвенную суспензию из второго разведения (1 : 100) в количестве 0,05 мл наносят в центр квадрата и распределяют по всей его площади (4 $см^2$). Препарат высушивают на воздухе, фиксируют в спирте и помещают для окрашивания в стакан с 5%-м карболовым эритрозином (5%-й эритрозин в 5%-м растворе фенола) на 24 ч. Окрашенные мазки отмывают от красителя водой и сушат на воздухе. Из одной исходной суспензии готовят 5 препаратов. Подсчет клеток микроорганизмов проводят с иммерсионным объективом. Подсчитывают 50 полей зрения, передвигая препарат по диагонали. По полученным данным рассчитывают среднее количество клеток в поле зрения по следующей формуле:

$$X = x/n, \qquad [6.1]$$

где: n – число подсчитанных полей зрения;

x – число клеток в 50 полях зрения.

Для определения количества клеток в 1 г почвы перемножают данные подсчета клеток на разведение, площадь поля зрения и объем нанесенной суспензии.

6.1.3. Анализ ризосферной микрофлоры методом посева на агаризованные среды

В стерильные чашки Петри вносят по 1 мл суспензии из 4-го и 5-го разведений и заливают расплавленным и охлажденным до +45...50 °С питательным агаром (МПА). Осторожно перемешивают вращательным движением содержимое чашек. Застывшие чашки помещают в термостат при +25...26 °С. На 3–5 сут. (по-отдельности) подсчитывают количество колоний, выросших на двух параллельных чашках. Затем делают пересчет на 1 г почвы с учетом разведения. Общее количество почвенных микроорганизмов лучше учитывать на бедных средах (среды с агаризованной почвенной вытяжкой, разведенным в 10 раз МПА и т.п.), так как на этих средах микроорганизмы образуют мелкие колонии, что препятствует проявлению антагонизма бактерий.

6.1.4. Метод посева на жидкие среды (метод предельных разведений)

Из 6, 7 и 8-го разведений делают посев 1 мл почвенной суспензии в пробирки с жидкой питательной средой. Для этой цели также лучше использовать бедные среды (например, разведенный в 5 раз МПА с добавлением 1% глюкозы). Из каждого разве-

дения делают высев в 5 параллельных пробирок. После инкубации (3–5 сут.) при +25...26 °С отмечают наличие роста микроорганизмов по помутнению, образованию пленки или осадка. Количество клеток в единице объема определяют, используя таблицу Мейнелл, разработанную на основании методов вариационной статистики (Приложение III, таблица 1).

6.2. Определение качественного состава ризосферных микроорганизмов

Учет видового разнообразия ризосферных микроорганизмов проводят в образцах, взятых в 10-кратной повторности. Из разных участков исследуемого поля отбирают 10 образцов почвы (каждый образец составляют из 20–30 уколов бура). Из каждого образца берут навеску почвы 10 г и помещают в 100 мл стерильной воды. Далее готовят 4-е и 5-е разведение.

Качественный состав ризосферных микроорганизмов учитывают, проводя поверхностный посев на капустную среду, которую готовят следующим образом: 100 г капусты кипятят 30 мин, затем фильтруют и доводят объем до 1 л водопроводной водой. К отвару добавляют агар-агар – 20 г, кукурузный экстракт – 1,25 г и пивное сусло – 25 мл. Среду подщелачивают до pH 7,0–7,2, затем стерилизуют при 0,5 ати в течение 30 мин.

Расплавленную и охлажденную до +40...45 °С питательную среду разливают в стерильные чашки Петри и оставляют застывать на ровной горизонтальной поверхности. На застывший и подсушенный агар стерильной пипеткой наносят 0,05 мл почвенной суспензии из 4-го разведения и тщательно растирают стерильным шпателем Дригальского (Приложение I, рис. 30) по поверхности среды. Из каждого образца делают высев на две параллельные чашки Петри. Засеянные чашки помещают в термостат и инкубируют при +25...26 °С крышками вниз. На 4–5-е сут. производят качественный учет выросших колоний: выделяют все имеющиеся типы колоний, описывают их морфологические признаки и после присвоения им порядкового номера заносят данные о количестве колоний каждого выделенного типа в таблицу.

Для выявления доминантных форм в вариантах опыта используют показатели «частоты встречаемости» и «обилия» (плотности) видов, выражаемые в % и определяемые по следующим формулам:

$$\textit{Частота встречаемости} = \frac{\text{число образцов, где вид обнаружен}}{\text{общее число образцов}} \times 100\% \qquad [6.2.1]$$

$$\textit{Обилие} = \frac{\text{общее число штаммов данного вида}}{\text{общее число штаммов всех видов}} \times 100\% \qquad [6.2.2]$$

Доминирующими в данном микробоценозе считают виды, количество которых составляет не менее 10% от общего числа учтенных микроорганизмов. Учет разнообразия микроорганизмов удобно проводить по приложенной схеме (Приложение III, таблица 2).

На капустной среде учитывают и бактерий, и актиномицетов. Учтенные колонии микроорганизмов отсевают в пробирки на «косой агар» на ту же среду.

Следующим этапом является получение чистых культур изолированных микроорганизмов методом поверхностного рассева на капустную среду из отдельных выделенных ранее колоний.

Предварительно готовят разведения, для чего бактериологической петлей забирают небольшое количество бактериальной массы с «косячка» и вносят в 10 мл стерильной воды в пробирке. Осторожным растиранием петли о внутреннюю поверхность пробирки можно получить более или менее равномерную взвесь бактериальной массы в воде. Далее каплю полученной суспензии наносят на поверхность застывшей агаризованной среды, распределяют ее стеклянным шпателем по всей поверхности среды, а затем этим же шпателем растирают последовательно 2–3 чашки, на которые суспензия бактерий не вносилась. Чашки помещают в термостат при +25 °С крышками вниз. Продолжительность инкубации чашек, как правило, составляет 4–5 сут. Из выросших изолированных колоний отсеивают культуры в пробирки на поверхность скошенной агаризованной капустной среды.

Далее проводят идентификацию выделенных чистых культур общепринятыми методами.

6.3. Определение численности неспорообразующих бактерий рода *Pseudomonas*

Количество бактерий рода *Pseudomonas* чаще всего определяют на среде Кинга В, содержащей пептон и способствующей наилучшему продуцированию бактериями флюоресцирующего пигмента, выделяемого ими в среду. Среда имеет следующий состав, г/л: пептон – 20, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 1,5; глицерин – 10, агар-агар – 15–20. Посев осуществляется из серии разведений в зависимости от предполагаемой численности микроорганизмов в анализируемом образце грунта или почвы. На среде Кинга В, а также на МПА, псевдомонады формируют небольшие (диаметром примерно 1,5–2 мм) плоские полупрозрачные колонии, бесцветные или окрашенные в разные оттенки желто-оранжевого. В проходящих лучах ультрафиолетовой лампы у некоторых представителей рода *Pseudomonas* хорошо различим выделяемый колонией в окружающую среду флюоресцирующий желто-зеленый пигмент. При этом необходимо пользоваться специальными защитными очками.

В большинстве случаев флюоресцирующий пигмент виден и в проходящих лучах обычной настольной лампы. При этом сами колонии псевдомонад часто дают переливчатую окраску от желто-зеленого до синевато-красного цвета

Учет количества бактерий рода *Pseudomonas* можно проводить также на глицериново-пептонном агаре, имеющем следующий состав, г/л: глицерин – 20,0; пептон – 2,5; мясная вода – 50,0; K_2HPO_4 – 1,0; NaCl – 3,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,25; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,01; $CaCO_3$ – 0,04; агар-агар – 15,0.

6.4 Определение численности спорообразующих бактерий

Численность спорообразующих бактерий определяют по количеству в почвенной пробе их спор. Для этого 5–7 мл почвенной суспензии из соответствующего разведения (как правило, 3-го или 4-го) наливают в стерильные пробирки, закрывают ватными пробками, и пастеризуют путем прогревания на водяной бане при +80 °С в течение 10 мин. После этого проводят глубинный или поверхностный посев на чашки Петри на комбинированную агаризованную среду: МПА + сусло-агар в соотношении 1 : 1, которые смешивают перед стерилизацией. Выросшие колонии подсчитывают и затем пересчитывают с учетом разведения на 1 г а.с.в. по выше приведенной схеме.

При отсутствии водяной бани пастеризацию пробирок при +80 °С можно обеспечить, поместив их в стакан с водой, который, в свою очередь, также помещается в еще один стакан с водой большего диаметра, поставленный на электрическую плиту. Уровень нагрева плиты должен обеспечить слабое кипение воды в самом большом стакане и отсутствие кипения в стакане с пробирками. Чтобы убедиться в правильном режиме пастеризации необходимо периодически замерять температуру в стакане с пробирками при помощи термометра – она должна находиться в пределах +75...85 °С

Предварительную идентификацию бацилл диагностических видов *Bac. mesentericus*, *Bac. megaterium*, *Bac. glutinosus*, *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides* и *Bac. cereus* можно осуществить по форме колонии и морфологии клеток, руководствуясь соответствующей справочной литературой.

6.5 Учет численности микроскопических грибов методом глубинного посева

Для определения численности микроскопических грибов в почве или грунте проводят глубинный посев 1 мл почвенной суспензии из 3-го или 4-го разведения в чашки Петри, используя агаризованную питательную сре́ду Чапека, подкисленную (pH 4–4,5) соляной (или молочной или лимонной) кислотой и имеющую следующий состав, г/л: сахароза – 30; $NaNO_3$ – 2,0; KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,5; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – следы, агар-агар – 20. Непосредственно перед посевом в стерильную расплавленную среду добавляют 4 мл/л концентрированной молочной кислоты и заливают в чашки Петри с предварительно внесенным 1 мл почвенной суспензии. Сре́ду и почвенную суспензию тщательно перемешивают осторожным покачиванием чашки. Засеянные чашки инкубируют при температуре +25...26 °С, количество грибов учитывают на 4–5 сут. Оптимальным считается разведение, в котором на чашке Петри выросло 10–30 колоний микроскопических грибов.

Для учета численности грибов также можно использовать сре́ду Мартина с добавлением бенгальского розового, на которой учитывается на 30–60% больше почвенных грибов. Это объясняется ограниченным разрастанием колоний по поверхности среды в присутствии красителя и возможностью прорастания большего количества медленно растущих форм грибов.

Среда Мартина имеет следующий состав, г/л водопроводной воды: глюкоза – 10,0; KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,5; пептон – 5,0; бенгальский розовый – 0,15 мг (добавляется в каждую колбу непосредственно перед стерилизацией среды); агар-агар – 20; pH 4,5–5,5. Кроме того, перед разливкой среды в чашки Петри в расплавленную среду вносят стрептомицин (антибиотик) для подавления роста бактериальной флоры в количестве 0,5 г/л.

Учет количества колоний грибов осуществляют, просматривая чашки Петри в проходящих лучах сильного источника света. Колонии грибов при глубинном росте, как правило, имеют вид тонких паутинообразных скоплений.

Вопросы для самоконтроля

1. Расставьте в правильном порядке основные этапы метода Виноградского-Шульгина (прямого подсчета количества микроорганизмов в ризосфере):
   а. препарат помещают в стакан с 5%-м карболовым эритрозином на 24 ч;
   б. препарат фиксируют в этиловом спирте;
   в. на предметном стекле рисуют квадрат 2×2 см;
   г. препарат высушивают на воздухе;
   д. рассчитывают среднее количество клеток в одном поле зрения по формуле;
   е. окрашенный мазок промывают водой и высушивают на воздухе;
   ж. под микроскопом при помощи иммерсионного объектива посчитывают количество клеток микроорганизмов в 50 полях зрения,
   з. 0,05 мл почвенной суспензии из второго разведения наносят в центр квадрата и распределяют по всей площади.

2. Определение общего количества микроорганизмов в ризосфере методом посева на агаризованные среды проводят на
   а. богатые среды с высоким содержанием органического вещества;
   б. разбавленные в 10 раз агаризованные почвенные вытяжки;
   в. агаризованные почвенные вытяжки с добавлением глюкозы

3. Для выявления доминантных форм микроорганизмов в ризосфере используют показатели
   а. частоты встречаемости,
   б. доминирования вида;
   в. обилия вида;
   г. уровня разнообразия сообщества.

4. Доминирующими в конкретном микробоценозе считают виды, количество которых составляет не менее...
   а. 5 %;
   б. 10%;
   в. 15%
   г. 20%.

5. pH питательной среды, используемой для учета численности микроскопических грибов составляет...
   а. 4,5–5,5;
   б. 5,5–6,5;
   в. 6,5–7,0;
   г. 7,0–7,5.

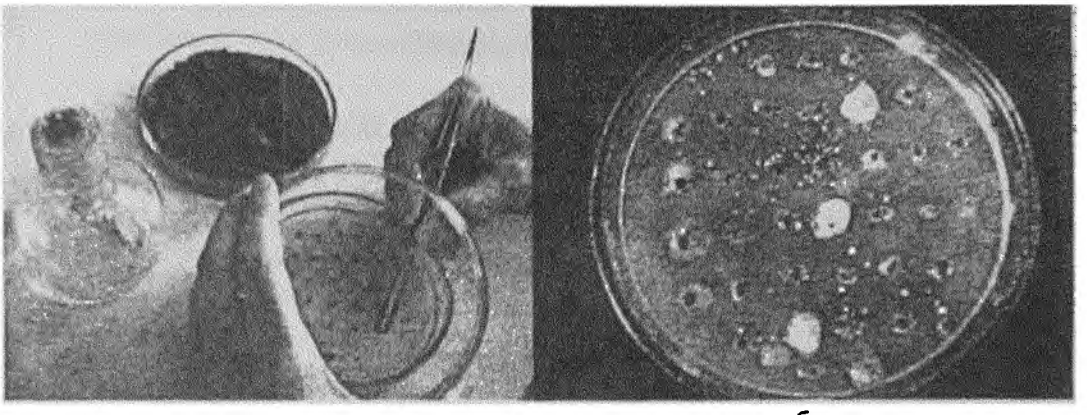
7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЗОТОБАКТЕРА МЕТОДОМ ВИНОГРАДСКОГО

Бактерии рода *Azotobacter* являются представителями весьма ценной в экологическом и агрономическом смысле группы азотфиксирующих микроорганизмов, способных, благодаря наличию фермента нитрогеназы, связывать в своих клетках молекулярный азот атмосферы. Непосредственным продуктом реакции является аммоний, который затем трансформируется в глутаминовую кислоту. В составе синтезированных бактериями аминокислот связанный азот поступает в клетки корней растений и используется растениями. В обмен растение снабжает азотфиксирующих бактерий, как правило, обильно населяющих их ризосферу, легкодоступными источниками энергии в виде сахаров, синтезирующихся в процессе фотосинтеза. Помимо улучшения азотного питания азотфиксирующие бактерии продуцируют широкий спектр биологически активных соединений, обладающих ростостимулирующими и фунгистатическими свойствами.

Наиболее доступным способом оценки азотфиксирующей способности микробного сообщества почвы или грунта является определение актуальной и потенциальной активности бактерий рода *Azotobacter*. ***Актуальная активность азотобактера*** показывает, какое количество клеток азотобактера от их общего числа в почве в данный конкретный момент находится в состоянии активного фиксирования азота. Определение ***потенциальной активности азотобактера*** позволяет оценить максимально возможное количество клеток азотобактера, способных фиксировать азот атмосферы при отсутствии лимитирования бактерий по доступным источникам энергии (углерода).

7.1 Методика определения актуальной активности азотобактера

Определение актуальной активности азотобактера проводят методом Виноградского, высевая мелкие комочки анализируемой почвы или грунта на поверхность агаризированной питательной среды Эшби, не содержащей источников азота. Схема раскладывания комочков приведена на рис. 21 а.



а б

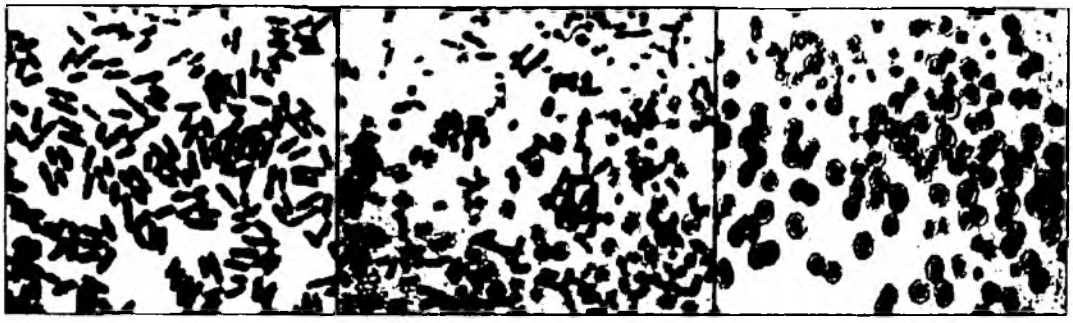
Рис. 21 Метод определения актуальной активности азотобактера (фото Терешенко Н.Н.)
а – схема размещения комочков грунта на поверхности питательной среды в чашке Петри; б – слизистые колонии азотобактера, сформировавшиеся вокруг комочков почвы

Согласно схеме, отдельные мелкие комочки почвы или грунта раскладывают в шахматном порядке на расстоянии примерно 1 см друг от друга на поверхности агаризованной среды Эшби (предварительно прокаленным и остуженным металлическим пинцетом). При раскладывании комочков крышку чашки Петри следует держать слегка приоткрытой напротив зажженной спиртовки. Инкубируют засеянные чашки Петри ***в неперевернутом виде*** при температуре +28...30 °С в течение 2–3 сут. После указанного времени проводят подсчет комочков почвы, давших рост слизистым морщинистым колониям азотобактера. Цвет колоний в зависимости от вида азотобактера может варьировать от светло-кремового или зеленоватого до бурого или даже черного (рис. 21 б).

Для получения достоверных результатов комочки засеянной почвы должны быть мелкими (d ≈ 1 мм), а их количество в чашке Петри должно быть не менее 45–50 шт.
Раскладывание комочков и их рассыпание по поверхности среды Эшби при посеве создаст дополнительные точки роста азотобактера, не поддающиеся точному учету.
В случае сильного прилипания почвы к поверхности пинцета его следует слегка подсушить в пламени горелки

Так как на среде Эшби при определенных условиях могут также расти и олигонитрофильные дрожжи-липомицеты, из выросших колоний необходимо приготовить фиксированные окрашенные фуксином препараты для микроскопирования. Суточная культура азотобактера представляет собой довольно крупные, неправильной формы

толстые палочки. Однако уже на 2–3 сут. они трансформируются в округлые цистоподобные клетки, хорошо прокрашивающиеся фуксином. При этом, вокруг клеток, как правило, четко различается кольцо слабоокрашенной полисахаридной капсулы (рис. 22).



а *б* *в*

Рис. 22 Морфология клеток 24-ти часовой (а), 3-х (б) и 5-ти (в) суточной культуры азотобактера на среде Эшби (по: Виноградский С.Н., 1952)

Степень актуальной активности азотобактера вычисляют как процент комочков, давших рост азотобактера на среде Эшби, к общему числу засеянных комочков.

Для более активного роста азотобактера, в составе среды Эшби можно заменить глюкозу равным количеством маннита

Пример 4

При посеве на поверхность среды Эшби 50-ти комочков почвы спустя 3 сут. инкубации 30 комочков обросли характерными слизистыми колониями, микроскопирование которых подтвердило присутствие клеток азотобактера.
Составив математическую пропорцию, вычисляем:

50 комочков – 100%
30 обросших комочков – x %.

Получаем $x = \frac{30 \times 100}{50} = 60\%$

Следовательно, в анализируемой почве в настоящий момент примерно 60% от всей популяции бактерий рода *Azotobacter* находится в состоянии активного связывания азота из атмосферы.

7.2. Методика определения потенциальной активности азотобактера (метод почвенных пластинок)

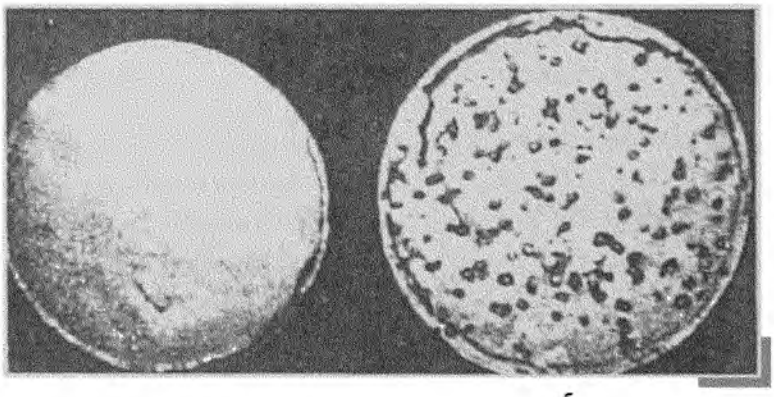
Для определения потенциальной активности азотобактера используют метод почвенных пластинок. Навеску анализируемой почвы или грунта необходимо просеять через сито с диаметром отверстий 1 мм для удаления посторонних включений и

крупных комков почвы. Затем к почве добавляют легкодоступный для бактерий источник углерода (глюкозу, крахмал или манит) в количестве 1% от используемой навески почвы и затем тщательно перемешивают. Почву увлажняют и перемешивают до состояния густой и однородной пасты. Почвенную пасту выкладывают в донышко чашки Петри, тщательно выравнивая (как бы полируя) поверхность почвенной пластинки.

Количество почвы в чашке Петри должно быть таким, чтобы поверхность почвенной пластинки была на 1 мм ниже края донышка чашки и в закрытой крышкой чашке сохранялась прослойка влажного воздуха

Размер навески почвы зависит от диаметра используемых чашек Петри и удельного веса самой почвы. Удобнее использовать объем почвы, составляющий примерно 1/7 или 1/8 от объема чашки Петри. При набивке навески почвы в чашку Петри между поверхностью почвенной пластинки и крышкой чашки должно оставаться примерно 1–2 мм воздушного пространства. Закрытые крышками чашки Петри помещают в термостат при +28...30 °С на 3–4 сут. Для предотвращения пересыхания поверхности почвенных пластинок чашки Петри можно поместить под колпак, одновременно с емкостью, наполненной водой для испарения.

Спустя 3–4 сут. на поверхности почвенной пластинки появляются кремовые или черные блестящие колонии азотобактера (рис. 23).



а *б*

Рис. 23 Почвенные пластинки без колоний азотобактера (а) и с колониями азотобактера на поверхности (б) (по: Виноградский С Н., 1952)

Потенциальную активность азотобактера выражают в количестве колоний, выросших на 1 см^2 поверхности почвенной пластинки.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое актуальная и потенциальная активность азотобактера.
2. Методы определения активности азотобактера.
3. Используя формулу для пересчета результатов микробиологического посева «методом комочков обрастания», определите актуальную активность азотобактера, если из 52 засеянных на среду Эшби комочков почвы 14 сформировали колонии азотобактера.
4. Укажите источники углерода, которые можно использовать вместо глюкозы в составе среды Эшби:
   - сорбит;
   - маннит;
   - глицерин;
   - мочевина;
   - крахмал;
   - аспарагин.

8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ, УЛУЧШАЮЩИХ ФОСФОРНОЕ ПИТАНИЕ РАСТЕНИЙ

Как известно, в большинстве пахотных почв, фосфор является основным лимитирующим элементом для роста и развития растений, причем значительно более дефицитным, чем азот. Если запасы азота на Земле практически безграничны (до 75–78% от состава атмосферы), то запасы фосфора весьма умеренны и быстро истощаются. В отличие от азота и других биологических макроэлементов, фосфор не имеет газовых форм и в значительной степени необратимо вымывается в Мировой океан. Несмотря на то, что валовое содержание фосфора в почве может быть достаточно высоким, основная часть его представлена труднодоступными минеральными и органическими соединениями, которые становятся доступными для растений только после их мобилизации микроорганизмами. По этой причине коэффициент усвоения растениями фосфора минеральных удобрений более чем в два раза ниже, чем азота.

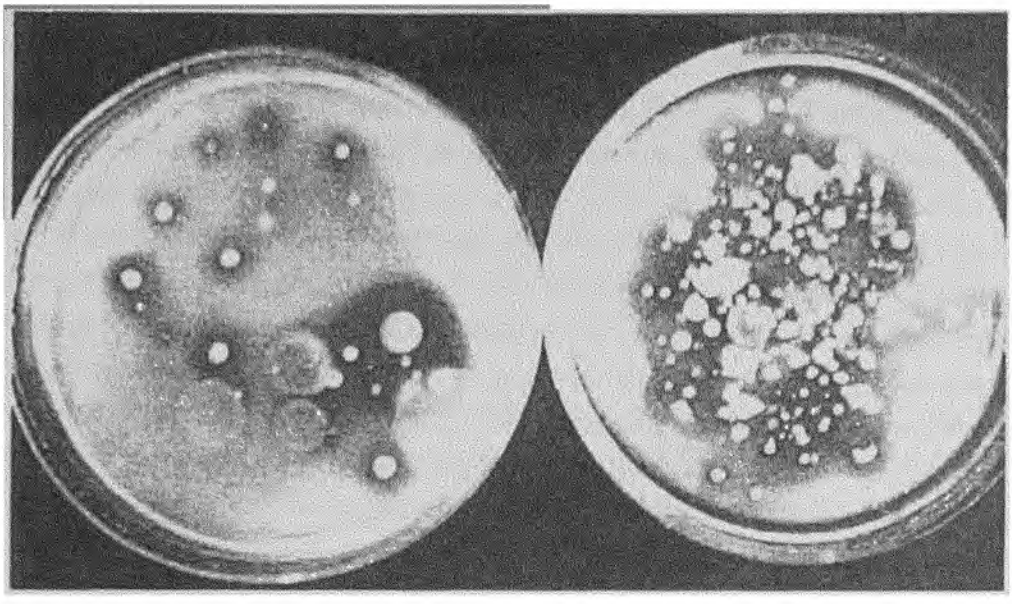
При наличии доступного органического вещества многие почвенные микроорганизмы способны растворять ортофосфаты, а также фитаты кальция, железа и алюминия. Кроме того, отдельные представители почвенной микрофлоры обладают ферментами фитазами, освобождающими ортофосфат из фитина. Микроорганизмы, продуцирующие активные фосфатазы, способны отщеплять от этих органических фосфатов фосфорную кислоту, которая, взаимодействуя с катионами, переходит в соли фосфорной кислоты, доступные для растений.

Оценивая значимость этих процессов нужно иметь в виду, что ионы фосфора очень быстро связываются почвой. По этой причине микробиологическая мобилизация фосфора в почве имеет реальное значение только в пределах ризосферной зоны, где существует градиент движения питательных веществ из почвы в корень.

8.1. Метод выделения и учета численности микроорганизмов, растворяющих ортофосфаты кальция (Ca), алюминия (Al) и железа (Fe)

Фосфатрастворяющие микроорганизмы выделяют при посеве соответствующего разведения почвенной суспензии в чашки Петри с агаризованной средой, содержащей нерастворимые минеральные фосфаты кальция в виде мелкодисперсной взвеси. Колонии фосфатрастворяющих микроорганизмов можно различить по зонам растворения осадка ортофосфата кальция, кольцом опоясывающим колонии. При определении численности фосфатрастворяющих бактерий, как правило, приходится производить посев одновременно из 2-х или даже 3-х последовательных разведений. При высокой численности фосфатрастворяющих бактерий их колонии сливаются, образуя

сплошное прозрачное поле растворения фосфата, значительно затрудняя дифференциацию колоний (рис. 24).



а *б*

Рис. 24 Колонии фосфатрастворяющих бактерий, формирующие зоны растворения фосфата кальция при посеве из 4-го (а) и 3-го (б) разведения почвы
(фото Терещенко Н.Н.)

Для учета численности фосфатрастворяющих бактерий используют элективную питательную среду Муромцева следующего состава, г/л водопроводной воды: глюкоза – 10; аспарагин – 1; K_2SO_4 – 0,2; $MgSO_4$ – 0,2; кукурузный экстракт – 0,2; агар-агар – 20. Стерилизуют среду при 0,5 ати в течение 20 мин.

В качестве источника азота в этой среде используют физиологически нейтральный аспарагин – одно из наиболее универсальных азотсодержащих соединений для синтетических сред. Нитраты или соли аммония, как источники азота, менее пригодны для выявления непосредственной способности микроорганизмов к растворению фосфатов, так как первые являются, как правило, физиологически щелочными солями, а вторые – физиологически кислыми. Вместо общепринятого хлористого калия вносят сульфат калия, для того чтобы избежать избыточного количества хлорид ионов, образующихся при осаждении фосфата. Добавление в глюкозо-аспарагиновую среду небольшого количества кукурузного экстракта значительно стимулирует развитие микроорганизмов.

! **Четкие зоны растворения осадка формируются только в том случае, если плотная агаровая среда достаточно и равномерно мутная, а количество нерастворимого фосфата в ней сравнительно невелико**

Поэтому наибольший эффект дает внесение свежеосажденных солей по методу, предложенному Герретсеном и модифицированному Муромцевым: в стерильную расплавленную агаризованную среду вышеуказанного состава вносят (из расчета на 1л) 3,3 г $CaCl_2 \times 6H_2O$ и тщательно перемешивают. Затем добавляют 3,8 г $Na_3PO_4 \times 12H_2O$ и вновь энергично размешивают колбу со средой. В результате реакции между хлоридом кальция и фосфатом натрия образуется равномерный мелкодисперсный осадок фосфата кальция. Соли вносят в сухом виде, что обеспечивает постепенное их взаимодействие по мере растворения. При этом по расчету на 1 л среды приходится 1,5г свежеосажденного $Ca_3(PO_4)_2$.

Приготовленную таким образом питательную среду разливают по 20 мл в чашки Петри и после застывания среды засевают из серии последовательных разведений почвенной взвеси. Инкубируют чашки при +27...28 °С в течение 2–10 сут. **При учете результатов подсчитывают только те колонии, вокруг которых образуются четкие прозрачные зоны растворения мелкодисперсного осадка фосфата кальция.**

Наряду с вышеописанным методом можно воспользоваться и готовым реактивом фосфата кальция, но зоны растворения будут значительно менее отчетливыми. Рекомендуются следующие количества фосфатов для внесения в агаризованную среду, г/л: $Ca_3(PO_4)_2$ – 4-5; фосфорит – 6–7; апатит – 8–10. Порошок фосфата вносят в горячий расплавленный агар и дают отстояться для осаждения крупных частиц, после чего среду разливают в чашки Петри и засевают вышеуказанным способом.

В кислых почвах минеральные соединения фосфора представлены в основном фосфатами алюминия и железа. Для учета численности микроорганизмов, растворяющих данные виды фосфатов, используют методы, в целом сходные с вышеописанными, но свежеосажденные фосфаты получают из солей алюминия и железа. Для этого смешивают по 10 мл стерильных растворов Na_3PO_4 и $AlCl_3$ (для получения $AlPO_4$) или $FeCl_3$ (для получения $FePO_4$). После тщательного перемешивания осажденный фосфат вместе с надосадочной жидкостью вносят в расплавленный глюкозо-аспарагиновый агар вышеуказанного состава.

Согласно расчету, на 1л среды берут 570 мг $Na_3PO_4 \times 12H_2O$ и 362 мг $AlCl_3 \times 6H_2O$ или 405 мг $FeCl_3 \times 6H_2O$. Готовая среда содержит 264 мг $AlPO_4 \times 3H_2O$ или 280 мг $FePO_4 \times 2H_2O$ в 1 л. Кислотность среды доводят до pH=6,8 с помощью 10%-го раствора NaOH. Приготовленная среда должна иметь хорошо выраженную мутность. После посева и инкубации чашек вокруг колоний микроорганизмов, растворяющих фосфаты алюминия и железа, формируются хорошо выраженные зоны просветления среды.

8.2. Метод учета численности и выделения микроорганизмов, мобилизующих фосфор органических соединений

Органические соединения фосфора в почве представлены инозит-фосфатами, фосфорсодержащими протеинами, нуклеиновыми кислотами и другими соединениями, входящими в состав отмерших растительных и животных остатков. Из них наиболее устойчивыми и потому в наибольшем количестве накапливающимися в почве являются фосфаты инозита – фитаты, на долю которых иногда приходится до 50% всего органического фосфора почвы. В нейтральных и щелочных почвах содержатся в основном фитаты кальция и магния, а в кислых почвах – фитаты алюминия и железа.

Учет в почве количества микроорганизмов способных мобилизовать фитаты, проводят вышеописанным способом, внося в элективную глюкозо-аспарагиновую среду различные фитаты. При этом в качестве фитатов кальция и магния удобно использовать коммерческий фармацевтический препарат «Фитин», который предварительно растворяют и переосаждают. Для этого 0,5 г препарата растворяют в 10 мл 1Н HCl и добавляют 1н NaOH до pH=7,0. При этом выпадает мелкозернистый осадок фитата Ca (II) или Mg(II), который после отстаивания и отделения надосадочной жидкости вносят в 500 мл глюкозо-аспарагиновой среды.

Соли алюминия и железа получают из коммерческого «Фитина». Для этого препарат фитина растворяют в 2%-ной соляной кислоте и осаждают фосфат концентрированным водным раствором $FeCl_3$. Обильный осадок фитата железа отделяют на воронке Бюхнера и промывают соляной кислотой до тех пор, пока смывной фильтрат не перестанет мутнеть при нейтрализации NaOH до pH=7,0.

Аналогичным путем с помощью $AlCl_3$ получают фитат алюминия с той лишь разницей, что перед внесением хлористого алюминия pH раствора фитина в соляной кислоте доводят с помощью NaOH до pH=3,5. Осадок фитата алюминия отмывают на воронке таким же раствором. Полученные фитаты алюминия и железа вносят в горячий глюкозо-аспарагиновый агар в количестве 0,1%, тщательно размешивают до получения равномерного помутнения среды, кислотность (pH) доводят до 7,0.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие соединения используют в качестве источника азота для учета численности фосфатрастворяющих бактерий?
2. Что влияет на методику учета численности фосфатрастворяющих бактерий?
3. Какие колонии учитывают при учете численности фосфатрастворяющих бактерий в образце?

4. Укажите основные источники фосфора в почвах с нейтральными и кислыми значениями pH (проведите соответствие между левым и правым столбцами):

Кислые почвы	а. Фосфориты
	б. Апатиты
	в. Фитаты кальция
	г. Фитаты алюминия
	д. Фитаты железа
Нейтральные почвы	е. Фосфаты кальция
	ж. Фосфаты алюминия
	з. Фосфаты железа
	и. Нуклеопротеины

9. РАСЧЕТ КОЭФФИЦИЕНТА МИНЕРАЛИЗАЦИИ

Коэффициент минерализации показывает интенсивность протекания в почве процессов трансформации (минерализации) органического вещества растительных и животных остатков, а также используемых разнообразных органических удобрений. В численном выражении коэффициент минерализации представляет собой отношение количества микроорганизмов – аммонификаторов (усваивающих органические азотсодержащие соединения, такие как белки и аминокислоты) и микроорганизмов, предпочитающих минеральные источники азота (аммоний). Численность микроорганизмов-аммонификаторов определяют посевом на мясопептонный агар (МПА). Численность микроорганизмов, преимущественно усваивающих минеральные источники азота, учитывают на среде КАА (крахмало-аммиачный агар).

Например, при микробиологическом посеве из образца почвы на МПА было обнаружено $6{,}0\times10^7$ КОЕ/г а.с.в. почвы. Численность микроорганизмов, учтенных на КАА составила $8{,}5\times10^7$ КОЕ /г а.с.в. почвы. Вычислив отношение $8{,}5\times10^7$ / $6{,}0\times10^7$, мы получим значение коэффициента минерализации, равное в данном случае 1,42. Значение коэффициента минерализации, превышающее единицу, свидетельствует о довольно высокой скорости минерализационных процессов в исследуемой почве.

При интерпретации значений коэффициента минерализации необходимо учитывать общее количество валового азота в почве и количество внесенных азотных минеральных удобрений. Значение коэффициента больше 1 в почве с невысокой численностью аммонификаторов и недавним внесением NPK будет отражать не столько высокие показатели минерализации органического азотсодержащего вещества, сколько реакцию микроорганизмов, предпочитающих минеральный азот, на внесение этого азота в составе удобрений

10. ИЗУЧЕНИЕ РОСТОСТИМУЛИРУЮЩИХ И ФИТОТОКСИЧНЫХ СВОЙСТВ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

10.1. Метод разведений для определения численности микробов-антагонистов в почве

Существующие методы учета численности микробов-антагонистов в почве основаны на засеве плотных питательных сред разведениями почвенной суспензии для получения изолированных колоний. Из этих колоний получают чистые культуры, затем методом штриха, лунок, блоков и т.д. устанавливают наличие антифунгальной активности. Модификация этого метода состоит в получении колоний почвенных микроорганизмов прямо на газоне тест-микроорганизма. При этом создается возможность сразу же выявить и подсчитать активные колонии антагонистов по зонам подавления тест-микроба вокруг них.

В качестве тест-микроорганизма, по отношению к которому изучают антибиотический потенциал почвы, можно использовать чистые культуры фитопатогенных грибов, например, *Verticillium dahliae* Kleb.

Анализ проводится на средах, пригодных как для роста почвенных микроорганизмов, так и тест-микроба. Применяют водный почвенный экстракт (почва : вода = 1 : 1), обогащенный 0,5–1% глюкозы или среду Чапека, разбавленную в два раза для предотвращения слишком бурного развития микрофлоры. Состав основной среды Чапека, г/л: сахароза – 30; $NaNO_3$ – 3; KH_2PO_4 – 1; $MgSO_4 \times H_2O$ – 0,5; KCl – 0,5; $FeSO_4$ – 0,01.

10.2. Методы определения фунгистазиса почвы (метод Маршуновой)

Эффект фунгистазиса проявляется в задержке и подавлении прорастания покоящихся форм низших грибов (конидий, микросклероциев и др.), находящихся в почве или внесенных в нее. Данное явление широко распространено во всех почвах и связано с разнообразными факторами биологической и небиологической природы.

Методика определения фунгистазиса почвы заключается в следующем: 40–50 г исследуемой почвы помещают в стерильную чашку Петри и увлажняют до 80% от полной влагоемкости. На выровненную поверхность почвы накладывают стерильный целлофановый круг или бумажный фильтр, а сверху помещают по 5–6 блоков водного агара или целлофановых дисков диаметром 18 мм. В качестве контроля использу-

ют блоки (или диски), помещенные на фильтровальную бумагу во влажную камеру. Используемые в тесте чашки предварительно выдерживают в термостате 24–48 ч при температуре +20...22 °С для диффузии почвенных веществ в блоки или диски.

На поверхность блоков (дисков) наносят суспензию покоящихся форм изучаемого тест-гриба. Сверху диски с грибом можно накрыть вторым слоем дисков. Чашки инкубируют при +25...27 °С. Срок инкубации зависит от конкретного вида испытуемого гриба и определяется периодом 90–100%-го прорастания покоящихся форм гриба в контрольном варианте. Обычно для конидий он составляет 24–48 ч, а для микросклероциев – 36–48 ч.

При микроскопировании поверхности блоков или дисков учитывается общее число конидий (не менее 200) и определяется количество проросших в процентах от показателей в контроле. Проросшими считаются конидии или микросклероции, диаметр колоний которых меньше длины их ростовых трубок.

Если в тесте сравнивают одновременно несколько почв, обладающих высоким уровнем фунгистазиса, то ингибирование прорастания покоящихся форм может быть одинаково сильным во всех вариантах, что затрудняет установление более или менее четких различий между вариантами почвы. В таких случаях рекомендуется разбавлять почву стерильным наполнителем: кварцевым песком или смесью песка с глиной в соотношении 40 : 60. Содержание почвы в серии готовых разбавленных смесей должно составлять 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 и 16%. Помимо основного контроля (влажная камера), может применяться дополнительный контроль – стерильный наполнитель.

Агаровые блоки и целлофановые диски могут быть заменены мембранными фильтрами с размером пор не менее 1 мкм. Фильтры накладывают непосредственно на почвенную пластинку и подвергают описанной процедуре. По окончании эксперимента их высушивают, окрашивают 0,5–1%-м водным раствором генцианового фиолетового, метиленовым синим, эритрозином или другим красителем. Перед микроскопированием фильтры просветляют иммерсионным маслом. Подобные препараты могут храниться довольно долгое время.

10.3. Методы выделения микроорганизмов – стимуляторов роста растений

Стимулирующее влияние микроорганизмов на растения проявляется уже с момента прорастания семян. На этом основан метод использования семян в качестве биотеста для обнаружения микробов-стимуляторов в составе ризосферной микрофлоры или в других природных средах.

Обогащение семя микробными метаболитами осуществляется путем замачивания семян в культуральных жидкостях исследуемых микроорганизмов, полученных в

результате их культивирования в жидкой питательной среде. Для ризосферных микроорганизмов рекомендуется среда следующего состава: 1 л капустного отвара (100 г капусты кипятят 20 мин в 1 л водопроводной воды) + 25 мл пивного сусла + 1,25 мл кукурузного экстракта. Кислотность среды (pH) должна соответствовать 7,0–7,2. Стерилизуют среду в течение 30 мин при 0,5 ати. В качестве заменителя данной среды можно использовать разбавленные мясопептонный агар или среду Кинга В. Продолжительность культивирования микроорганизмов составляет 6–8 сут., за это время происходит накопление в культуральной среде продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Для замачивания семян используют культуральные жидкости, разбавленные водопроводной водой. При массовом отборе микробов-стимуляторов применяют разведения 1 : 50. Семена, помещенные в металлические или стеклянные бюксы, заливают жидкостями так, чтобы она лишь слегка покрывала семена. В качестве контроля используют замачивание семян в воде и незасеянной стерильной питательной среде, разведенной также в 50 раз.

Замоченные образцы семян выдерживают в термостате при +24...25 °С в течение 20–24 ч. За это время семена набухают, поглощая вместе с жидкостью содержащиеся в ней продукты жизнедеятельности исследуемых микроорганизмов. Набухшие семена помещают в специальные растильни или чашки Петри на смоченную водой фильтровальную бумагу, увлажненную так, чтобы жидкость полностью впиталась в фильтр. Чашки Петри вмещают по 25 крупных (пшеница) или по 50 мелких (лен, рапс, клевер), растильня – до 100 семян любого размера.

Продолжительность проращивания набухших семян во влажной камере (в растильне или закрытых чашках Петри) составляет в среднем 4 сут. Результаты учитываются по весу выросших зеленых проростков и корней, отделенных от семян. Сырые проростки высушивают до постоянного веса при +60°С и взвешивают на аналитических весах с точностью до четвертого или пятого знака после запятой.

Так как обычно даже в пределах одной повторности прорастают не все взятые для проращивания семена, то результаты выражают в г/100 семян. Окончательный результат вычисляют как среднее арифметическое из всех повторностей (не менее 5–6). Средний вес проростков выражают в г абсолютного веса, но чаще – в процентах к усредненным показателям веса зеленой массы и массы корней в контроле.

При более детальном изучении микроорганизмов как стимуляторов роста растений используют несколько разведений культуральной жидкости: 1 : 50; 1 : 100; 1 : 200; 1 : 500 и т.д. для установления оптимальной концентрации, при которой проявляется максимальный стимулирующий эффект. Все последующие эксперименты про-

водят только с оптимальными для каждого испытуемого микроорганизма концентрациями культуральной жидкости.

Для всесторонней оценки влияния продуктов жизнедеятельности микроорганизмов на процессы прорастания семян рекомендуется учитывать ряд принятых в семеноводстве показателей: всхожесть, энергию, дружность и скорость прорастания. Осуществляемая для этого процедура замачивания семян аналогична приведенной выше. При определении энергии, дружности и скорости прорастания, семена после замачивания помещают (по 100 шт. в каждой повторности) на фильтровальную бумагу, смоченную водой или питательной смесью (обычно раствором NPK). Проращивание длится 10 дней. Через каждые сутки в журнале отмечают количество проросших семян отдельно по повторностям.

Всхожесть определяют по числу проросших семян (%) от общего количества использованных семян в каждой повторности.

Энергию прорастания вычисляют по количеству семян, проросших на 3 сут. от начала эксперимента.

Дружность прорастания (Д) выражают средним процентом семян, проросших за 1 день прорастания, и вычисляют по формуле:

$$Д = П / А, \qquad [10.1]$$

где: ***Д*** – дружность прорастания (%);

П – полная всхожесть (%);

А – число дней прорастания.

Скорость прорастания (С) – сумма средних значений количества семян, прорастающих ежедневно. Определяется по следующей формуле:

$$С = а + б/2 + в/3 + г/4 \ldots.,$$

где: С – скорость прорастания;

а – число семян, проросших за 1-е сут.;

б – число семян, проросших за 2-е сут.;

в – число семян, проросших за 3-и сут.;

г – число семян, проросших за 4-е сут.; и т.д.

Результаты, полученные для каждой повторности (отдельно для каждого показателя), суммируют и определяют среднее арифметическое для каждого варианта. Сравнение средних показателей между собой позволяет определить степень стимулирующего действия метаболитов испытуемых микроорганизмов на процесс прорастания семян.

Все вышесказанное можно проиллюстрировать на следующем примере.

Пример 5

Семена огурца, замоченные в культуральной жидкости штамма бактерий (активного продуцента витамина группы "В"), разведенной в 200 раз, и для контроля – в воде, проращивали в термостате при 24 °С. Результаты ежесуточно проводимых измерений приведены в таблице 3.

Таблица 3

Влияние метаболитов штамма – активного продуцента витаминов на прорастание семян огурца

Вариант замачивания семян	Количество проросших семян, шт.					
	1-е сут.	2-е сут.	3-е сут	4-е сут.	5-е сут.	6-е сут.
в воде (контроль)	11	12	27	22	15	8
в культуральной жидкости	26	38	21	13		

Данные таблицы позволяют вычислить все вышеназванные показатели:

Всхожесть: Контроль = 11 + 12 + 27 + 22 +15 + 8 = 95

Вариант = 26 + 38 + 21 + 13 = 98

Энергия

прорастания: Контроль = 11 + 12 + 27 = 50

Вариант = 26 + 38 +21 = 85

Дружность

прорастания: Контроль = 95 : 6 = 15,83

Вариант = 98 : 4 = 24,50

Скорость

прорастания: Контроль = 11 + 12/2 + 27/3 + 22/4 + 15/5 + 8/6 = 35,83

Вариант = 26 + 38/2 + 21/3 + 13/4 = 55,26

После сравнения полученных результатов видно, что замачивание семян в культуральной жидкости микробного штамма, продуцирующего витамины, активизировало их прорастание, что выразилось в повышении энергии, дружности и скорости прорастания.

Однако такие однозначные результаты получаются далеко не всегда, так как семена, в зависимости от их полноценности, неодинаково отзываются на микробные метаболиты. Не каждое всхожее семя способно дать нормальный росток в полевых условиях. Физиологически неполноценные семена могут прорастать, но из них формируются ослабленные, хотя и жизнеспособные проростки.

Одним из биологических показателей, наиболее полно характеризующих полноценность семян и жизнеспособность растения, является ***интенсивность начального роста семян***. Между интенсивностью начального роста и продуктивностью растений существует прямая зависимость.

Для определения интенсивности начального роста семена опытных и контрольных вариантов (по 100 шт. в каждой повторности) помещают в сосуды диаметром около 20 см, заполненные песком, увлажненным до 60% от полной влагоемкости водой или питательной минеральной смесью, на глубину 6–10 см, где и проращивают в течение 14 сут. при температуре, благоприятной для конкретного вида растений. Сосуды сверху закрывают стеклом.

По истечении срока проращивания в каждом сосуде определяют число нормально проросших семян, вес сырых и сухих надземных органов и корней, предварительно тщательно отмытых от песка. Интенсивность начального роста оценивают по весу 100 проростков, выраженному в г или %.

Оценить ростостимулирующую активность метаболитов конкретных штаммов можно также по их влиянию на корнеобразование у черенков фасоли при помощи модифицированного ***метода Турецкой***. Метод основан на том, что в обогащенных стимуляторами частях растений повышается интенсивность дыхания, к ним усиливается приток пластических веществ, в результате чего активизируются ростовые процессы.

В тесте используют срезанные черенки фасоли, которые опускают базальными концами в испытуемый раствор, а затем учитывают количество образовавшихся на них корешков. Семена фасоли замачивают в воде и оставляют в теплом месте. Наклюнувшиеся семена высаживают в кюветы, заполненные увлажненным песком и выращивают на свету 10 дней. К этому времени растения достигают высоты 12–14 см, после чего их срезают на расстоянии 1 см от поверхности песка, подбирая примерно одинаковые по длине и толщине стебли, и ставят по 5–8 шт. в стаканы с исследуемой разведенной (1:50) культуральной жидкостью так, чтобы концы погрузились в нее на 4–5 см.

Контролем служат растения, которые ставят на такой же срок в воду или разведенную (1:50) питательную среду, использованную для выращивания бактерий.

В каждый стакан наливают по 50 мл жидкости и оставляют в ней растения на 6–12 ч. Затем жидкость сливают и заменяют 100 мл водопроводной воды, в которой черенки фасоли оставляют на 7 дней в условиях теплицы на свету до образования на них корешков. Воду периодически меняют, чтобы она все время оставалась прозрачной.

Корешки подсчитывают на каждом черенке отдельно, вычисляют среднее для варианта и сравнивают со средним количеством корешков, образовавшихся в контроле. Корешки можно отделить от черенка, высушить и взвесить.

10.4. Методы количественного учета фитотоксичных форм почвенных микроорганизмов и изучение их свойств

10.4.1 Учет на твердых питательных средах

Данный метод учета основан на посеве определенного разведения почвенной суспензии на твердую питательную среду с последующим выделением микроорганизмов в чистую культуру. Среди морфологически идентичных колоний (по окраске, форме, текстуре и т.п.) для выделения в чистую культуру выбирают одну с точным учетом количества всех тождественных ей. Далее все выделенные в чистую культуру бактериальные изоляты культивируют на жидкой питательной среде соответствующего состава. Полученные из культуральной жидкости фильтраты испытывают в биотестах с высшими растениями (по вышеописанной в п. 10.3 методике). *Фитотоксичными* считаются микроорганизмы, культуральная жидкость которых угнетает рост использованных в биотесте растений на 25% и более.

Расчет количества фитотоксичных форм почвенных микроорганизмов ведется на 1 г почвы и выражается либо в абсолютных значениях численности либо в % от общего числа обнаруженных на данной среде микроорганизмов. После соответствующей идентификации выделенных микроорганизмов до вида (или рода) дополнительно вычисляются: ***частота встречаемости*** (отношение числа образцов почвы, где данный вид был обнаружен, к общему числу проанализированных); ***плотность (обилие) вида*** – численность микроорганизмов данного вида по отношению ко всем другим в % (Приложение I, табл. 2).

10.4.2. Экспресс-метод скрининга почвенной микрофлоры на фитотоксичность

Данный экспресс-метод основан на результатах совместного глубинного выращивания тест-культуры (*Chlorella vulgaris* L.) и соответствующего разведения почвенной суспензии на общепринятых при изучении почвенной микрофлоры плотных питательных средах.

Метод состоит в следующем: 1 мл соответствующего разведения почвенной суспензии вносят в чашку Петри и заливают расплавленной и охлажденной до 40–45 °С питательной средой (МПА, средой Чапека, КАА или какой-либо другой). Непосредственно перед заливкой, в охлажденную питательную среду вносят взвесь клеток хлореллы. Количество культуры водорослей зависит от используемой питательной

среды: при использовании МПА или среды Чапека осуществляют смыв хлореллы 10–15-ю мл стерильной воды с 2–3 «косяков» в 0,5 л питательной среды; при использовании КАА смыв осуществляют с 4–5 «косяков» хлореллы в 0,5 л среды.

Если целью исследований является учет фитотоксичности почвенных микромицетов для подавления бактериальной флоры, то в состав питательной среды вносят биомицин из расчета 20–40 ед./мл среды. И при смыве хлореллы с «косяков», и при внесении биомицина общее количество вносимой в питательную среду стерильной воды не должно превышать 10–15 мл на 0,5 мл используемой питательной среды.

После охлаждения чашки Петри ставят в термостат (26 °С). Через 48 ч их переносят в фитокамеру и при той же температуре инкубируют еще 3–5 сут. Микроорганизмы – продуценты фитотоксичных веществ выделяются на общем зеленом фоне по зонам отсутствия роста хлореллы.

Учет количества фитотоксичных форм ведется в соответствии с описанием, приведенным в вышеописанной методике (см. п. 10.4.1.)

Состав среды для культивирования хлореллы на косяках, г/л: KNO_3 – 5,0; KH_2PO_4 – 0,3; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,3; пептон – 2,5; глюкоза – 10,0; раствор микроэлементов – 1 мл; агар-агар – 20,0.

Раствор микроэлементов, г/л: $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,022; $MnSO_4$ – 1,81; $CuSO_4 \times 5H_2O$ – 0,079; $NaBO_3 \times 4H_2O$ – 2,63; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 9,3; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$ – 1,0; $CaCl_2$ – 1,2; $Co(NO_3)_2$ – 0,02; трилон Б – 10,0. pH среды – 6,5, стерилизация при 1 ати 20–30 мин.

Данная методика не требует выделения индивидуальных колоний почвенных микроорганизмов, их культивирования на жидких питательных средах, а также испытания фитотоксической активности культуральных фильтратов при помощи биотестов с высшими растениями.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие показатели используют для оценки влияния микроорганизмов на рост и развитие растений?
2. Проведите соответствие между левым и правым столбцами.

Всхожесть	сумма средних значений количества семян, прорастающих ежедневно
Энергия прорастания	выражают средним процентом семян, проросших за 1 день прорастания
Дружность прорастания	определяют по числу проросших семян (%) от общего количества использованных семян в каждой повторности
Скорость прорастания	вычисляют по количеству семян, проросших на 3 сут. от начала эксперимента

3 Рассчитайте скорость прорастания семян при условии, что на 1-е сут. проросло 25 семян, на 2-е – 6, на 3-и – 5 и на 4-е сут – 5

4 Используя условия задачи, приведенные в таблице, рассчитайте всхожесть, энергию, дружность и скорость прорастания семян томата, замоченных в культуральной жидкости штамма бактерий *Pseudomonas* sp., разведенной в 100 раз, и для контроля – в воде

Таблица

Влияние метаболитов бактерий *Pseudomonas* sp. на прорастание семян томата

Вариант замачивания семян	Количество проросших семян, шт.					
	1-е сут.	2-е сут	3-е сут	4-е сут.	5-е сут	6-е сут
контроль (вода)	10	12	23	20	13	7
опыт (культуральная жидкость бактерий *Pseudomonas* sp.)	21	36	24	11		

11. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Методы определения концентрации микроорганизмов требуют приемов статистической обработки, несколько отличающихся от традиционных, так как распределение таких данных подчиняется закону Пуассона. Квадратичное отклонение при подсчете микроорганизмов методом предельных разведений или в камере Горяева–Тома можно вычислить по формуле:

$$\sigma = \sqrt{N} \qquad [11.1]$$

где: N – число ***непосредственно*** подсчитанных микроорганизмов или колоний.

Так, например, если на поверхности агара в чашке Петри насчитали 55 колоний, то квадратичное отклонение следует рассчитывать, исходя из этого числа, а не из числа, получаемого при последующем вычислении концентрации микроорганизмов в исходной культуре. **Формула дает удовлетворительные результаты при условии, что N превышает 15.** Кроме того, она не применима в тех случаях, когда не исключено влияние ряда причин, отражающихся на точности результатов опыта.

Такими причинами могут быть: 1) неточность приготовления разведений исходной культуры, 2) наличие в микробной суспензии существенного количества конгломератов, включающих более чем одну жизнеспособную микробную клетку, которые при последующем высеве на плотную питательную среду образуют единичные колонии, 3) колебания в составе питательной среды или особая лабильность исследуемого микроорганизма, что может привести к тому, что в отдельных случаях существенная доля высеянных живых микроорганизмов не образует колоний (например, в случае заражения вирусами).

Под N в формуле подразумевается результат единичного определения, т.е. например, результат подсчета микроорганизмов в одном препарате или подсчет количества колоний в одной чашке Петри. Для оценки доверительного интервала средней арифметической из ряда параллельных определений следует воспользоваться следующей формулой:

$$I_{95} = 2\sqrt{\frac{\overline{N}}{n}} = \frac{2\sqrt{T}}{n} \qquad [11.2]$$

для уровня достоверности 95%;
или формулой

$$I_{99} = 2{,}7\sqrt{\frac{\overline{N}}{n}} = \frac{2{,}7\sqrt{T}}{n} \qquad [11.3]$$

для уровня достоверности 99%,

где: n – число определений;

T – общее число микроорганизмов или колоний, найденных во всех изученных препаратах;

$\overline{N}$ или $N_{ср}$ – среднее число микроорганизмов или колоний ($\overline{N} = \frac{T}{n}$).

При этом предполагается, что все препараты приготовлены из одного и того же разведения одной культуры.

Доверительный интервал средней можно найти не в абсолютном, а относительном выражении, например, в процентах к величине средней, для чего можно воспользоваться следующими формулами:

$$100\frac{I_{95}}{\overline{N}} = \frac{200}{\sqrt{T}}\% \qquad [11.4]$$

для уровня достоверности 95% и

$$100\frac{I_{99}}{\overline{N}} = \frac{270}{\sqrt{T}}\% \qquad [11.5]$$

для уровня достоверности 99%.

а) Определение концентрации микроорганизмов в счетной камере

В счетную камеру помещается разведенная суспензия микроорганизмов, после чего под микроскопом подсчитывается число клеток, наблюдаемых в пределах ряда квадратов сетки, нанесенной на поверхность камеры (см. параграф 2.4). Каждый малый квадрат сетки соответствует определенному объему (v) микроскопируемой суспензии (обычно 1/4000000 мл). Если в просмотренных n малых квадратах найдено всего T микроорганизмов, то среднее число микроорганизмов, соответствующее одному малому квадрату, равно $\overline{N} = \frac{T}{n}$. Отсюда концентрация микроорганизмов в данной суспензии (C) составляет $C = \frac{\overline{N}}{v}$.

Если при подготовке суспензии для микроскопии в камере исходная культура была разведена в K раз, то концентрация в культуре выразится формулой:

$$C = \frac{K}{v}\overline{N} \qquad [11.6]$$

Пример 6

В камере Горяева–Тома при просмотре разведенной в 100 раз культуры *E. coli* найдено в 20 малых квадратах всего 144 клетки. Отсюда среднее количество клеток в одном квадрате $\overline{N} = 144/20 = 7{,}2$. По формуле [11.2] находим доверительный интервал для $\overline{N}$ с уровнем достоверности 95%:

$$I_{95} = \frac{2\sqrt{144}}{20} = 1{,}2$$

или в относительном выражении согласно формуле [11.4]:

$$100\frac{I_{95}}{\overline{N}} = 100\frac{1{,}2}{7{,}2} = \frac{200}{\sqrt{144}} = 16{,}6\%$$

В камере Горяева–Тома одному малому квадрату соответствует объем 1/4000000 мл. Следовательно, по формуле [11.6], концентрация в исходной культуре составляет:

$$C = \frac{100 \times 7{,}2}{1 + 40000000} = 2{,}88 \times 10^9 \text{ клеток/мл}$$

Доверительный интервал найденной концентрации в относительном выражении будет тем же, что был найден для $\overline{N}$, т.е. ±16,6%. В абсолютном выражении он составит $2{,}88\times10^9\pm0{,}48\times10^9$ клеток/мл. Таким образом, с вероятностью 95% можно полагать, что действительная концентрация клеток *E. coli* в исходной культуре находится в интервале от $2{,}40–3{,}36\times10^9$ клеток/мл.

Если необходимо оценить доверительный интервал с вероятностью 99%, то производим аналогичный расчет с помощью формул [11.3] и [11.5]. В приведенном примере результат вычислений составит $2{,}88\times10^9\pm0{,}65\times10^9$ клеток/мл.

Если концентрация микроорганизмов оценивается по результатам микроскопирования в камерах двух или более различных разведений одной и той же культуры, то при расчете концентрации в исходной культуре следует исходить из среднего взвешенного количества микроорганизмов ($\overline{\overline{N}}$) на один малый квадрат счетной камеры, которое вычисляется из частных средних, найденных для каждого из просмотренных разведений культуры (с поправкой на разную степень разведения), по формуле:

$$\overline{\overline{N}} = \frac{\overline{N_1} + \overline{N_2} + \ldots\ldots\ldots + \overline{N_{m-1}} + \overline{N_m}}{K_m\left(\frac{1}{K_1} + \frac{1}{K_2} + \ldots\ldots\ldots + \frac{1}{K_{m-1}} + \frac{1}{K_m}\right)} \qquad [11.7]$$

где: $\overline{N_1}$, $\overline{N_2}$, $\overline{N_{m-1}}$, $\overline{N_m}$ – средние количества микроорганизмов в одном малом квадрате, найденные при просмотре в камере 1-го, 2-го (m-1)-го и m-го разведений культуры, пронумерованных в порядке возрастания кратности разведения суспензии;

K_1, K_2, K_{m-1}, K_m, – величины соответствующих кратностей разведения суспензии.

Таким образом, при конечном расчете концентрации в исходной культуре формула [11.6] в данном случае примет вид:

$$C = \frac{K_m}{v}\overline{N} \qquad [11.8]$$

В относительном выражении доверительный интервал как среднего взвешенного количества микроорганизмов ($\overline{N}$), так и концентрации исходной культуры вычисляется по формуле:

$$100\frac{I_m}{\overline{N}} = \frac{200}{\sqrt{\sum T}}\% \qquad [11.9]$$

для уровня достоверности 95% и

$$100\frac{I_m}{\overline{N}} = \frac{270}{\sqrt{\sum T}}\% \qquad [11.10]$$

для уровня достоверности 99%.

Здесь $\sum T$ обозначает сумму общего числа клеток, подсчитанных во всех просмотренных квадратах каждой из камер.

Пример 7

Определение концентрации микробных клеток производилось в двух камерах Горяева–Тома (v=1:4000000). В первую помещена культура *E. coli*, разведенная в 20 раз (K_1), а во вторую – та же культура, разведенная в 100 раз (K_2). В первой при просмотре 20 малых квадратов найдено 256, а во второй в 20 квадратах найдено 60 клеток.

Отсюда $\overline{N_1} = 12{,}8$, а $\overline{N_2} = 3{,}0$.

$$\overline{N} = \frac{12{,}8 + 3{,}0}{100(1/20 + 1/100)} = 2{,}63.$$

Следовательно, концентрация клеток микроорганизмов в исходной культуре составит по формуле [11.8]:

$$C = \frac{100}{1 + 40000000}2{,}63 \cong 1{,}05 \times 10^9 \text{ клеток/мл}$$

Доверительный интервал как $\overline{N}$, так и концентрации культуры в относительном выражении составит по формуле [11.9]:

$$100\frac{I_m}{\overline{N}} = \frac{200}{\sqrt{256 + 81}} = 10{,}8\% \text{ для уровня вероятности 95\%,}$$

или по формуле [11.10]

$$100\frac{I_m}{\overline{N}} = \frac{270}{\sqrt{256 + 81}} = 14{,}7\% \text{ для уровня вероятности 99\%.}$$

Таким образом, действительное значение концентрации клеток в исходной культуре с вероятностью 95% находится в интервале $1{,}05\times10^9\pm0{,}11\times10^9$, а с вероятностью 99% – $1{,}05\times10^9\pm0{,}15\times10^9$.

Для проверки существенности различий концентраций в двух культурах, если определения проводились с помощью счетных камер, наиболее удобными являются критерии, выражаемые неравенствами:

$$|C_a - C_b| > 2\sqrt{\frac{C_a^2}{T_a} + \frac{C_b^2}{T_b}}$$ для уровня вероятности 95% и [11.11]

$$|C_a - C_b| > 2{,}7\sqrt{\frac{C_a^2}{T_a} + \frac{C_b^2}{T_b}}$$ для уровня вероятности 99% [11.12]

где: $|C_a - C_b|$ – абсолютная величина разности концентраций микроорганизмов в сравниваемых культурах;

T_a и T_b – общие количества микроорганизмов, подсчитанных в камере при определении соответствующей культуры.

Пример 8

При сравнении двух культур с помощью подсчета в камерах установлены концентрации 254×10^6 и 477×10^6 клеток/мл. При определении концентрации в первой культуре общее число микроорганизмов, подсчитанных в камере, составило 124, а при определении во второй культуре – 145. Подставим эти значения в формулу [11.11].

Левая часть неравенства составит $|254\times10^6 - 477\times10^6| = 223\times10^6$, правая часть – $2\sqrt{\frac{(254\times10^6)^2}{124} + \frac{(477\times10^6)^2}{145}} \cong 90\times10^6$

Так как, $223\times10^6 > 90\times10^6$, можно с вероятностью 95% считать, что наблюдаемое различие концентраций статистически значимо.

Воспользовавшись формулой [11.12], можно показать, что в приведенном примере различие концентраций достоверно и с вероятностью 99%.

Также доверительный интервал можно оценить для отношения концентраций двух культур с помощью формул:

$$I_{95C_a C_b} = 2\frac{C_a}{C_b}\sqrt{\frac{1}{T_a} + \frac{1}{T_b}},$$ [11.13]

для уровня вероятности 95%,

$$I_{99C_a C_b} = 2{,}7\frac{C_a}{C_b}\sqrt{\frac{1}{T_a} + \frac{1}{T_b}},$$ [11.14]

для уровня вероятности 99%.

T_a и T_b имеют здесь то же значение, что и в формулах [11.11] и [11.12].

Обращаясь к приведенному примеру, находим, что отношение концентраций сравниваемых культур составляет:

$$\frac{C_2}{C_1} = \frac{254}{477} = 0{,}53$$

По формуле [11.13]:

$$I_{95\%} = 2 \times 0{,}53\sqrt{\frac{1}{124} + \frac{1}{145}} = 0{,}13,$$

а по формуле [11.14]:

$$I_{99\%} = 2{,}7 \times 0{,}53\sqrt{\frac{1}{124} + \frac{1}{145}} = 0{,}18$$

Таким образом, с вероятностью 95% можно полагать, что истинное значение отношения концентраций расположено в интервале 0,53±0,13, а с вероятностью 99% – в интервале 0,53±0.18.

б) Определение концентрации живых микроорганизмов путем высева на плотные питательные среды

Один из основных методов определения концентрации живых микроорганизмов в тех или иных суспензиях состоит в приготовлении разведений и высевов на плотные питательные среды, где после инкубации образуются колонии, каждая из которых, как правило, соответствует одному жизнеспособному микроорганизму (см. параграф 4.4.1). Техника статистической обработки при этом ничем не отличается от описанной выше для определений концентраций с помощью счетных камер. Следует пользоваться теми же формулами с той лишь разницей, что под рядом условных обозначений будут подразумеваться показатели, характерные для метода определения концентрации высевом на плотные питательные среды. Условные обозначения формул [11.1–11.14] будут иметь в этом случае следующее значение:

N – число колоний, найденных в единичном высеве на плотную питательную среду;

$\overline{N}$ – среднее число колоний из найденных в серии единичных высевов одинакового разведения одной и той же культуры;

T – общее число колоний, найденных во всех высевах данного разведения культуры;

$\overline{\overline{N}}$ – среднее взвешенное число колоний из простых средних, которые найдены при высевах разных разведений одной и той же культуры;

K – кратность разведения высеваемой микробной суспензии;

ν – объем единичной посевной дозы в мл;

C – число живых микроорганизмов в 1 мл исходной культуры.

Пример 9

Сравниваются две серии биопрепарата. После высева препарата I в разведении $1:10^3$ на поверхности плотной среды в трех чашках Петри найдены следующие количества колоний: 116, 144 и 121. После высева препарата II – в разведении $1:10^4$ на 5 чашек найдено 22, 31, 26, 29 и 34 колоний. Объем посевной суспензии (на каждую чашку) – 0,5 мл. Вычислим общее число колоний, найденных во всех трех чашках с высевом препарата I:

$T = 116 + 144 + 121 = 381$.

Соответствующая величина для препарата II составит:

$T = 22 + 31 + 26 + 29 + 34 = 142$.

Среднее число колоний на чашках препарата I составит:

$$\overline{N}_I = \frac{381}{3} = 127,$$

а препарата II:

$$\overline{N}_{II} = \frac{142}{5} = 28,4.$$

Согласно формуле [11.3] доверительные интервалы средних арифметических числа колоний для вероятности 99% составят соответственно:

$$I_{99,I} = 2,7 \times \frac{\sqrt{381}}{3} = 17,6 \quad \text{и}$$

$$I_{99,II} = 2,7 \times \frac{\sqrt{142}}{5} = 6,5,$$

а в относительном выражении доверительные интервалы как средних $\overline{N}_I$ и $\overline{N}_{II}$, так и концентраций исходных культур C_I и C_{II} составят с вероятностью 99% (по формуле [11.5]):

$$100 \times \frac{I_{99,I}}{\overline{N}_I} = \frac{270}{\sqrt{381}} = 13,8\% \quad \text{и}$$

$$100 \times \frac{I_{99,II}}{\overline{N}_{II}} = \frac{270}{\sqrt{142}} = 22,7\%.$$

Концентрации в исходных культурах могут быть вычислены по формуле [11.6] и составят:

$$C_I = \frac{10^3}{0,5} \times 127 = 254 \times 10^3 \text{ клеток/мл};$$

$$C_{II} = \frac{10^4}{0,5} \times 28,4 = 568 \times 10^3 \text{ клеток/мл}.$$

Выясним, достоверно ли обнаруженное различие концентраций препаратов I и II. Воспользуемся формулой [11.12]. Левая часть неравенства составит:

$$|C_I - C_{II}| = |254 \times 10^3 - 568 \times 10^3| = 314 \times 10^3,$$

а правая:

$$2,7 \times \sqrt{\frac{(254 \times 10^3)^2}{381} + \frac{(568 \times 10^3)^2}{142}} = 134 \times 10^3$$

Так как, $314 \times 10^3 > 134 \times 10^3$, то, различие между концентрациями можно признать достоверным с вероятностью заведомо большей 99%. Наконец, вычислив отношение концентраций: $C_I : C_{II} = 254 \ 568 = 0{,}45$. Доверительный интервал отношения с вероятностью 99% составит по формуле [11.14]:

$$I_{99\,C_I/C_{II}} = 2{,}7 \times 0{,}45 \bullet \times \sqrt{\frac{1}{381} + \frac{1}{142}} = 0{,}12$$

Таким образом, истинная величина отношения концентраций с вероятностью 99% заключена в интервале $0{,}45 \pm 0{,}12$.

Пример 10

Рассмотрим случай определения концентраций живых микроорганизмов по результатам высева на плотную среду двух различных разведений одной и той же культуры.

При посеве на плотную питательную среду суспензии клеток *Clostridia sporogenes* в трех чашках Петри в разведении 1:10000 получено 101, 86 и 94 колонии. Объем высеваемой суспензии – 1 мл. Аналогичный высев из разведения 1:30000 привел к образованию 43, 36 и 29 колоний. Соответствующие средние количества колоний на чашку для каждого из разведений составят $\overline{N}_1 = 94$ и $\overline{N}_2 = 36$. Среднюю взвешенную вычисляем по формуле [11.7]:

$$\overline{N} = \frac{94 + 36}{30000 \times \left(\frac{1}{10000} + \frac{1}{30000} \right)} = 32{,}5.$$

Таким образом, согласно формуле [11.8] исходная концентрация клеток бактерий составит

$$C = \frac{30000}{1} \times 32{,}5 = 9{,}75 \times 10^5 \text{ клеток/мл}$$

Доверительный интервал найденного значения концентрации вычислим с вероятностью 95% по формуле [11.09]:

$$100 \times \frac{I_{95}}{\overline{N}} = \frac{200}{\sqrt{(101 + 86 + 94) + (43 + 36 + 29)}} = 10{,}3\,\%.$$

Таким образом, в абсолютном выражении истинная концентрация *Cl. sporogenes* с вероятностью 95% заключена в интервале от $8{,}75–10{,}75 \times 10^5$ клеток/мл.

Вопросы для самоконтроля

1. Дайте понятие «средняя арифметическая»
2. Доверительный интервал – это ...
3. Статистическая значимость – это ...
4. Почему при расчете статистических параметров при учете численности микроорганизмов не используются стандартные методы?
5. Какой статистической величиной пользуются при расчете концентрации клеток с использованием различных разведений одной и той же культуры?
6. Какие причины могут оказать влияние на точность учета концентрации клеток методом предельных разведений с высевом на плотные питательные среды?

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Изд-во мед.лит-ры, 1962. 179 с.
2. Боровин А.М., Кочетков В.В. Биологические препараты на основе псевдомонад // АГРО XXI. 2000. С. 140–145.
3. Виноградский С.Н. Микробиология почвы. М.: Изд-во АН СССР, 1952. 792 с.
4. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология: учебник для вузов. 6-е изд., испр. М.: Дрофа, 2006. 444 с.
5. Красильников Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения. М.: Изд-во Акад. наук СССР, 1958. 463 с.
6. Маршунова Г.Н. К методике определения фунгистазиса серозёмной почвы. Бюл. ВНИИ СХМ. 1981. №3. С. 12–16.
7. Методические рекомендации по оценке токсического действия пестицидов на микрофлору почвы. Л.: Изд-во ВАСХНИЛ, 1981. 42 с.
8. Микроскоп медицинский МИКМЕД-5. Руководство по эксплуатации Ю-33.23.268 РЭ. 2008. 24 с.
9. Микроскоп серии XS-90. Паспорт и руководство пользователя. 2009. 4 с.
10. Некоторые новые методы количественного учета почвенных микроорганизмов и изучения их свойств. Л.: Изд-во ВАСХНИЛ, 1987. 53 с.
11. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология: учебник для вузов. М.: Изд. Центр «Академия, 2006. 352 с.
12. Основные микробиологические и биохимические методы исследования почвы. Л.: Изд-во ВАСХНИЛ, 1987. 47 с.
13. Правдин П.В. Лабораторные приборы и оборудование из стекла и фарфора: Справ. изд. М: Химия, 1988. 336 с.
14. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Изд. Центр «Академия, 2005. 608 с.
15. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Уч. пособие / Под ред. Н.С. Егорова. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.
16. Сидоренко О.Д., Борисенко Е.Г., Ванькова А.А., Войно Л.И. Микробиология: Учебник для агротехнологов. М.: ИНФРА–М, 2005. 287 с.
17. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для вузов. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Дрофа, 2004. 256 с.
18. Открытое Акционерное Общество "ХИМЛАБОРПРИБОР" // Режим доступа – http://www.klinlab.ru/, свободный.
19. Современное лабораторное оборудование. Компания МИЛЛАБ // Режим доступа – http://www.millab.ru/, свободный.
20. Live Journal – приложение к «Живому журналу» // Режим доступа – http://www.ljplus.ru/, свободный.

Лабораторная посуда включает в себя изделия общего назначения из стекла ТС (термостойкое) и ХС (химически стойкое), мерные изделия, приборы и аппараты из стекла, соединительные элементы, камеры Горяева, стекла предметные и покровные, часы песочные, спиртовки.

Лабораторная посуда – изделия общего назначения. В соответствии с требованиями ГОСТ 25336-82 «Посуда и оборудование лабораторные стеклянные» на колбы конические, плоскодонные, круглодонные, Вюрца, грушевидные, остродонные, колбы Кьельдаля, стаканы высокие, низкие наносится обязательная маркировка (рис. 31):

- номер ГОСТ;
- обозначение единицы измерения,
- цифра соответствующая условному номинальному объему;
- матовая поверхность для нанесения лабораторных записей;
- марка, логотип завода-изготовителя;
- обозначение размера конуса,
- обозначение марки стекла.

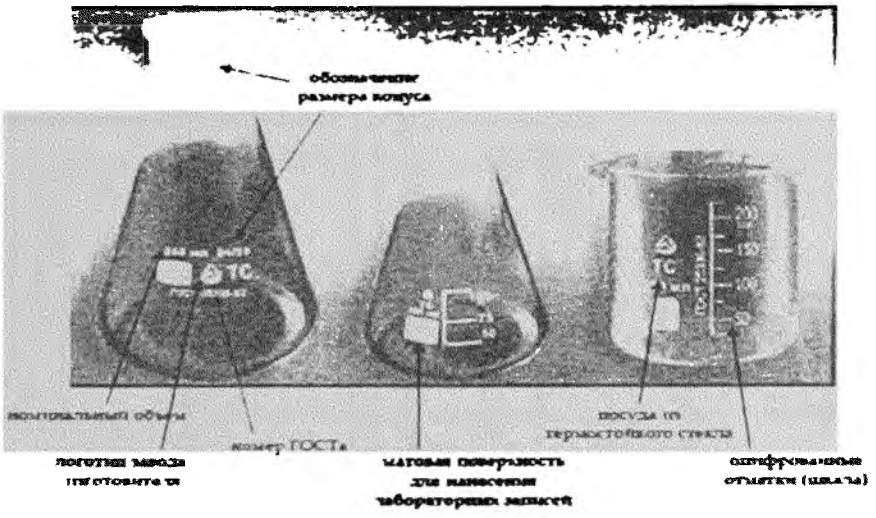


Рис. 25 Условные обозначения, применяемые для маркировки лабораторной посуды

Лабораторная посуда – мерные изделия. В соответствии с требованиями ГОСТ 29227-91, ГОСТ 29228-91 « «Пипетки градуированные», ГОСТ 29169-91 «Пипетки с одной меткой», ГОСТ 29251-91 «Бюретки», ГОСТ 1770-74 «Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки» на мерные изделия 2-го класса точности наносится обязательная маркировка

- логотип завода изготовителя,
- цифра, соответствующая номинальному объёму либо оцифрованные отметки, указывающие объём (шкала);

- обозначение единицы измерения,

- класс точности изделия;

- обозначение температуры, при котором проводилась градуировка;

- символы Н или О – вымерка изделия на налив или отлив;

- номер ГОСТ;

- знак утверждения типа на изделия, которые внесены в реестр СИТ;

- оттиск клейма поверки (при выпуске с производства мерная посуда подлежит обязательной поверке);

- обозначение размера конуса.

Пипетки применяются для точного отмеривания определенных объемов жидкости. Пипетки градуированные могут изготавливаться 1-го и 2-го класса точности (рис. 32).

Условные обозначения пипеток:

Исполнения 3, 1-го класса точности вместимостью 50 мл – пипетка 3–1–50 ГОСТ 20292–74

Исполнения 7, 1-го класса точности вместимостью 5 мл – пипетка 7–1–5 ГОСТ 20292–74

Исполнения 8, 2-го класса точности вместимостью 0,1 мл – пипетка 8–2–0,1 ГОСТ 20292–74;

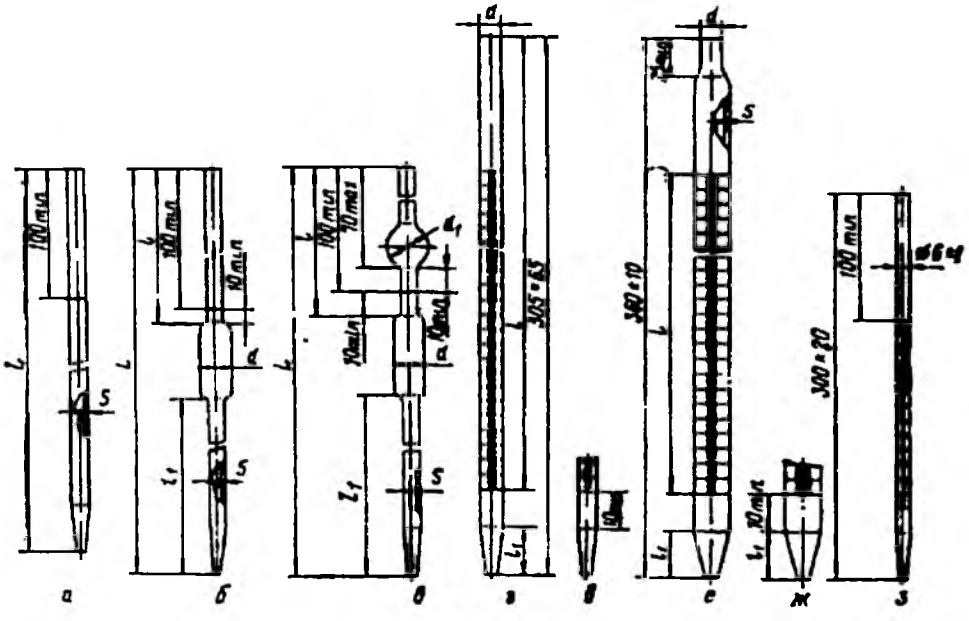
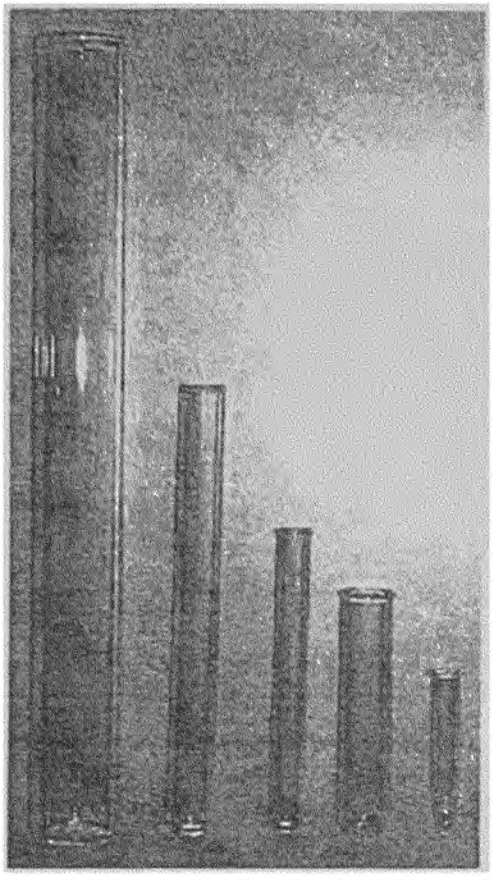


Рис. 26 Типы стеклянных лабораторных пипеток (По: Правдин П.В., 1988)
а – без делений прямые (исполнение 1); б – без делений прямые с расширением в виде баллончика или шара (исполнение 2); в – без делений с расширением и запасным резервуаром (исполнение 3); г – с делениями прямые на полный слив (исполнение 4); д – с делениями прямые на частичный слив (исполнение 5); е – с делениями с расширением на полный слив (исполнение 6); ж – с делениями с расширением на частичный слив (исполнение 7); з – капиллярные (исполнение 8).



Пробирки предназначены для проведения лабораторных работ. Они бывают различной формы, высоты и диаметра (рис. 33). В соответствии в ГОСТ 25336-82 пробирки выпускают следующих типов: П1 – цилиндрические с развернутым краем, П2 – цилинрические, П2Т – цилиндрические толстостенные; П3 – остродонные; П4 – с взаимозаменяемым конусом; П4О – с взаимозаменяемым конусом и отводом.

Условные обозначения пробирок:

Тип П1 диаметром 16 мм, высотой 150 мм из химически стойкого стекла группы ХС – пробирка П1–16–150 ХС ГОСТ 25336–82

Тип П2 диаметром 10 мм, высотой 90 мм из химически стойкого стекла группы ХС – пробирка П2–10–90 ХС ГОСТ 25336–82

Тип П3 номинальной вместимостью 5 мл из химически стойкого стекла группы ХС – пробирка П2–10–900 ХС ГОСТ 25336–82

Тип П4 номинальной вместимостью 5 мл с взаимозаменяемым конусом 14/23 из химически стойкого стекла группы ХС – пробирка П4–5–14/23 ХС ГОСТ 25336–82

Рис. 27 Типы пробирок (Источник: http://www.klinlab.ru/KATALOG/himiko_posyda/him_ posyda_1_ja.htm)

Чашки Петри – лабораториая посуда, в которой микроорганизмы культивируют на плотных питательных средах (рис. 34). Имеет форму невысокого плоского цилиндра и состоит из двух крышек: верхняя крышка чуть больше диаметра нижней. Чашки Петри обычно изготавливаются из прозрачного стекла или пластмассы (прозрачный полистирол) и могут иметь различные размеры и форму. Наиболее часто используются чашки диаметром 8–10 см и высотой около 1,5 см. Чашки Петри изготовленные из стекла – миогоразовые, но перед использованием необходимо их стерилизовать, завернув в бумагу. Чашки Петри изготовленные из полистирола – одиоразовые и поставляются стерильными, в герметичиой упаковке.

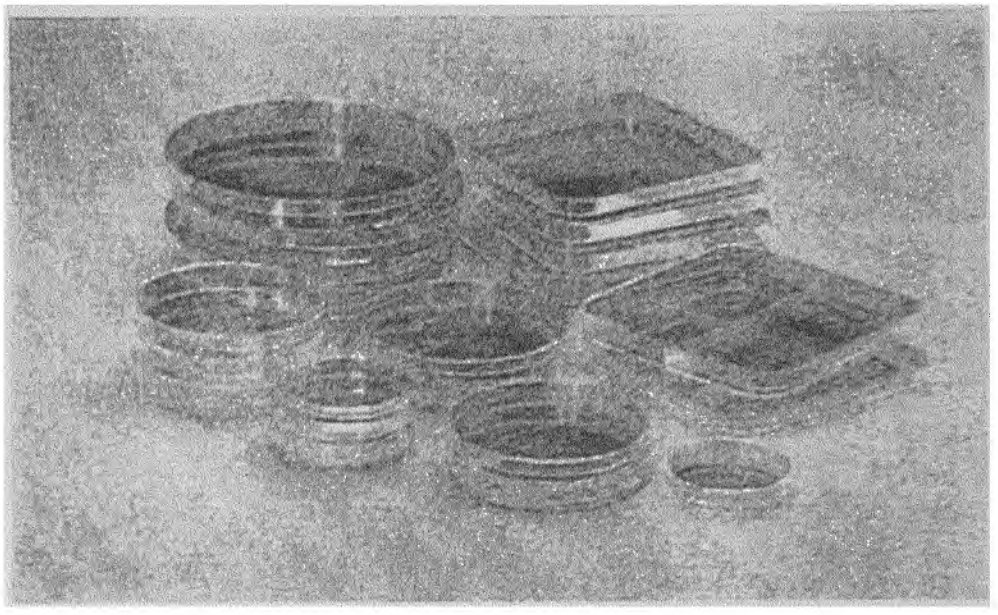


Рис. 28 Различные формы чашек Петри
(Источник: http://www.millab.ru/list.php?id_podrazdela=62)

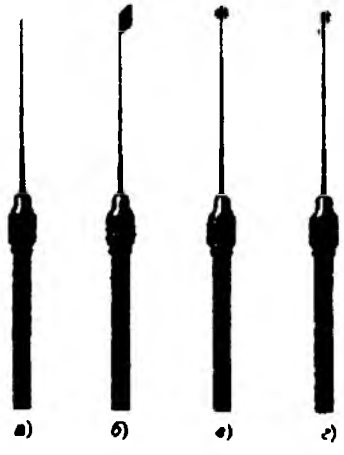


Рис. 29 Инструменты, используемые при работе с микроорганизмами
(по Теппер Е.З и др, 2004)
а - бактериологическая игла; *б* – шпатель, *в* – петля, сделанная правильно, *г* – петля, сделанная неправильно

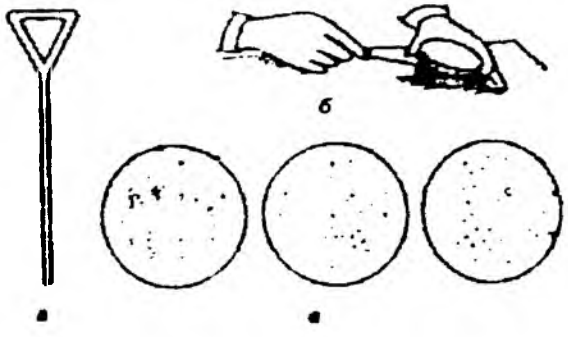


Рис. 30 Рассев культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды шпателем
(по Практикум по микробиологии, 2005)
а – шпатель Дригальского, *б* – техника рассева, *в* – рост микроорганизмов после рассева на различных разведениях

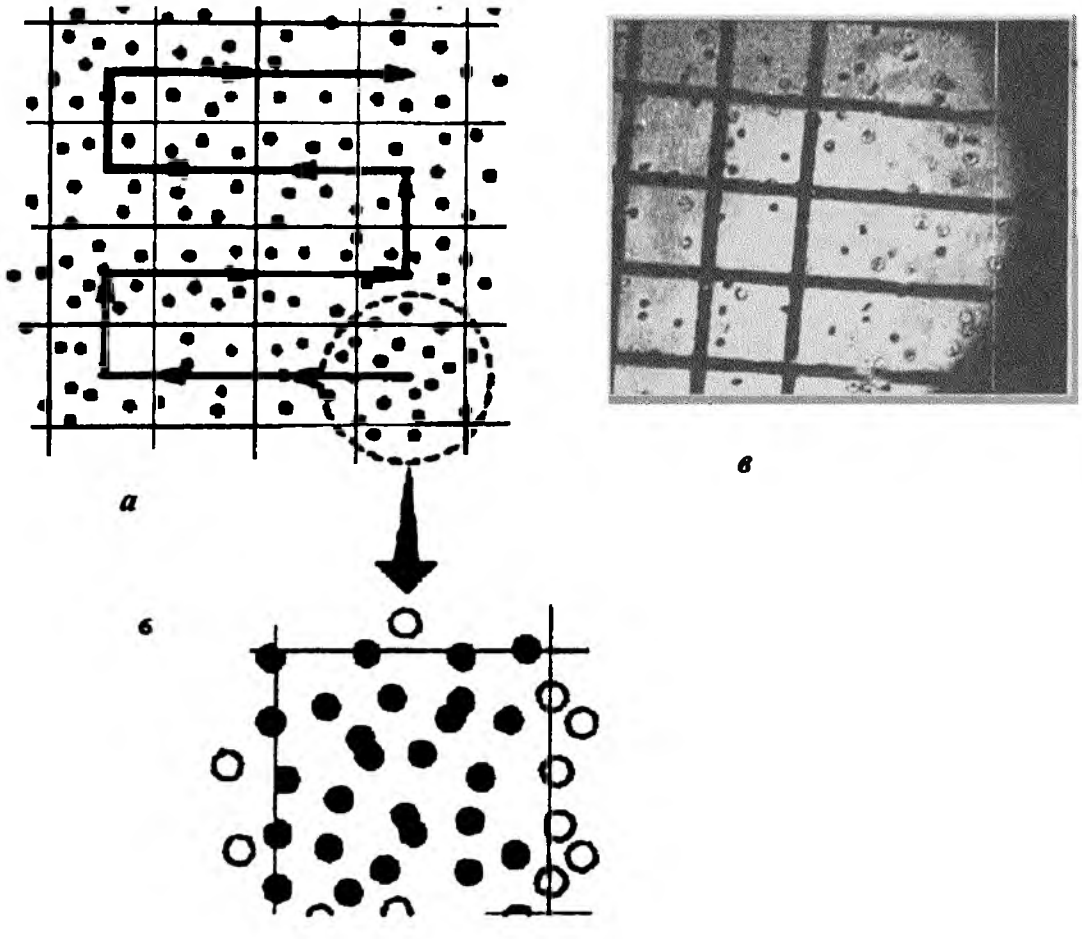


Рис. 31 Методика подсчета клеток в камере Горяева–Тома

а, б – техника подсчета живых клеток микроорганизмов с помощью камеры

в – подсчет клеток с помощью камеры (Фото по: http://www.ljplus.ru/img4/c/v/chorn_tylpan/IMG_-081111.jpg)

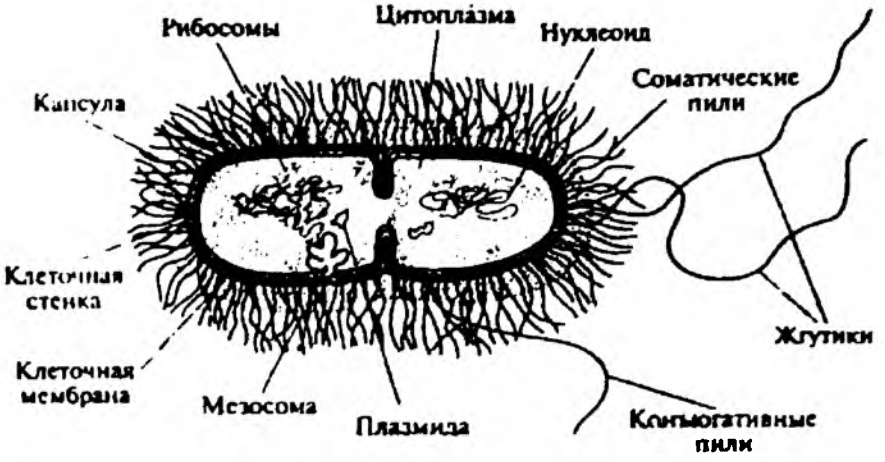


Рис. 32 Строение бактериальной клетки (прокариотической)
(По: Нетрусов А.И и др., 2006)

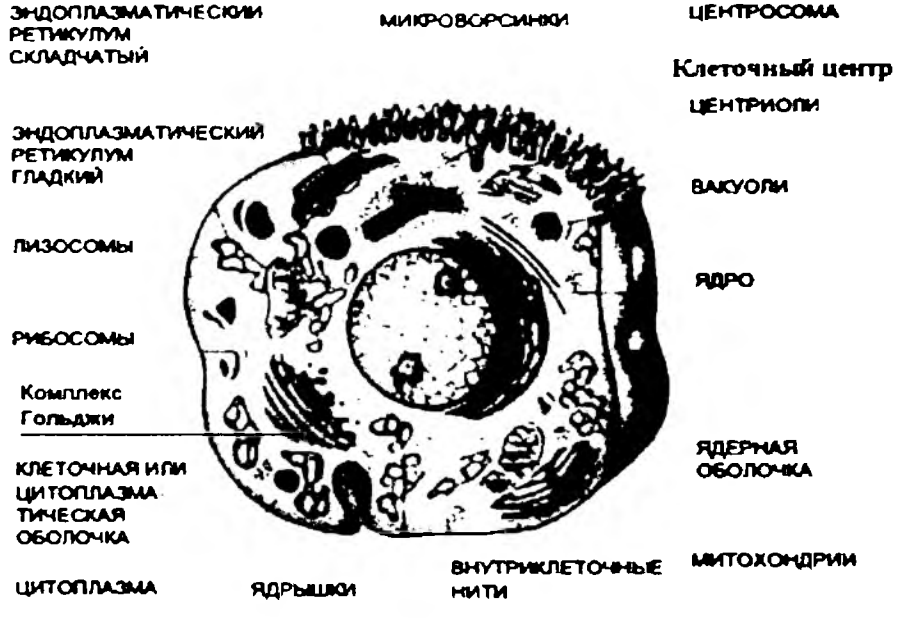


Рис. 33 Строение эукариотической клетки
(Источник http //diplom.mistic-egypt.by ru/content/chapter2/paragraph3/subpar1.html)

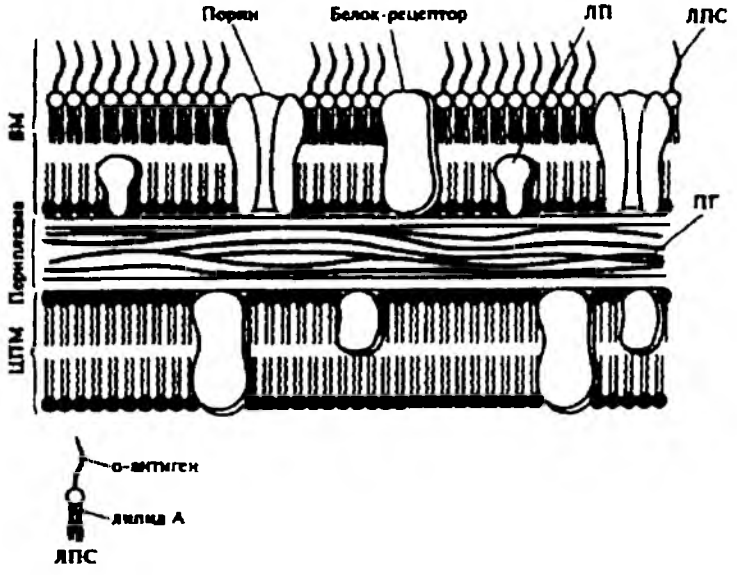


Рис. 34 Структура грамотрицательной клеточной стенки (по: Нетрусов А.И. и др, 2006)
Тонкий слой пептидогликана сверху покрыт внешней мембраной (ВМ), прикрепленной к нему липопротеидами (ЛП). Между двумя мембранами – периплазматическое пространство со слоем пептидогликана (ПГ) внутри него. Внешняя мембрана на внутренней поверхности содержит фосфолипиды, на внешней – липополисахариды (ЛПС). ЛПС состоят из липидной части, обращенной внутрь внешней мембраны, формируя ее гидрофобную область, и полисахаридной части, обращенной во внешнюю среду

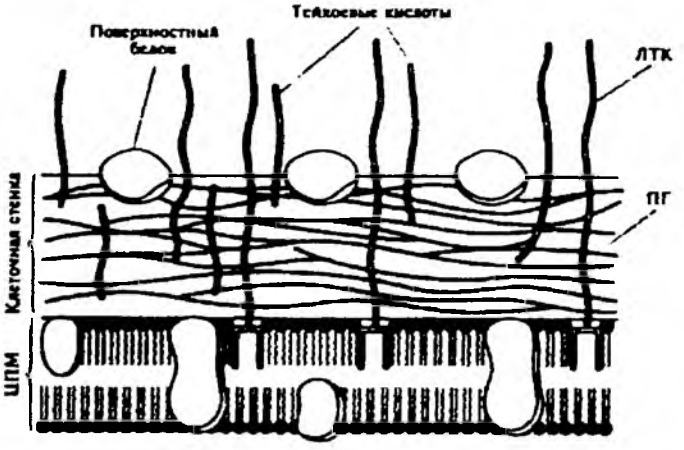


Рис. 35 Структура грамположительной клеточной стенки (по: Нетрусов А.И. и др, 2006)
Клеточная стенка содержит до 40 слоев пептидогликана. Молекулы тейхоевых кислот ковалентно связаны с пептидогликаном (ПГ). Липотейхоевые кислоты (ЛТК) содержат липидные «хвостики», закрепленные в гидрофобной области ЦПМ. Клеточные стенки могут иметь белковые слои на поверхности. Белковые структуры располагаются или островками (как показано на схеме), или тесно упаковываются, образуя S-слой

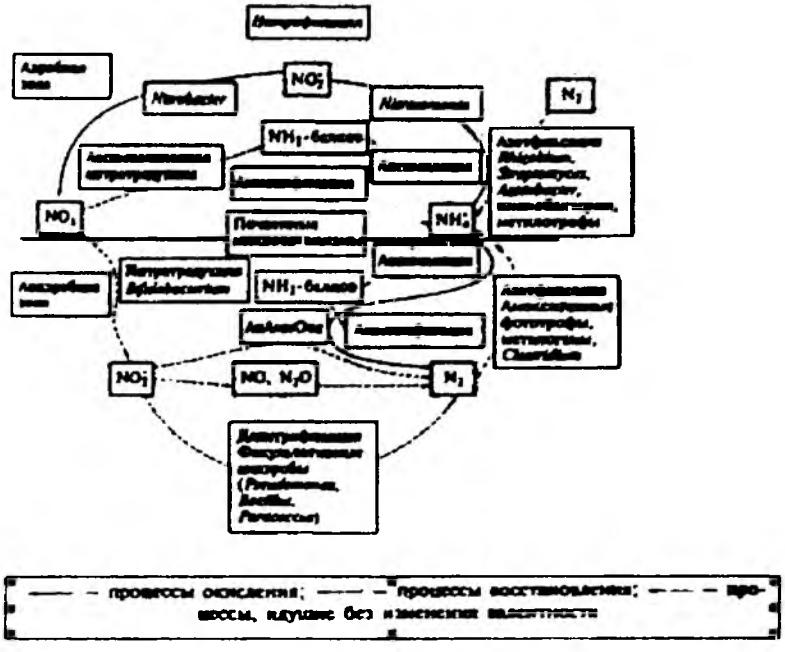


Рис. 36 Цикл азота (По: Нетрусов А.И. и др., 2006)

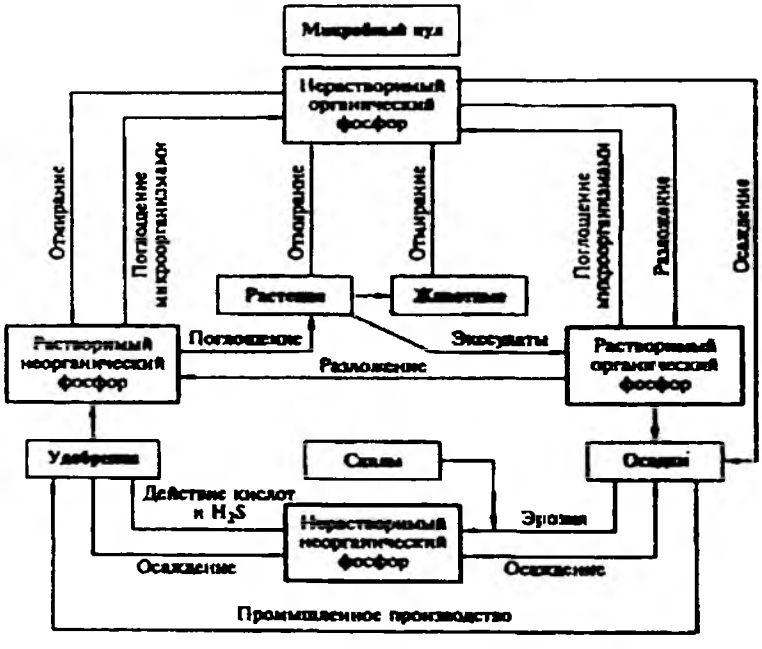


Рис. 37 Глобальный цикл фосфора на Земле (По. Нетрусов А.И. и др., 2006)

ПРИЛОЖЕНИЕ III

Таблица 1

Учет жизнеспособных клеток в единице объема при засеве 5 параллельных пробирок для каждого из 3-х последовательных разведений (Таблица Мейнелл)

Число мутных пробирок в группах, зараженных суспензиями трех последовательных разведений			НВЧ* (приходящееся на каждый инокулюм первого разведения	Число мутных пробирок в группах, зараженных суспензиями трех последовательных разведений			НВЧ* (приходящееся на каждый инокулюм первого разведения
6	7	8		6	7	8	
0	1	0	0,18	5	1	1	4,6
1	0	0	0,20	5	2	0	4,9
1	1	0	0,40	5	2	1	7,0
2	0	0	0,45	5	2	2	9,5
2	0	1	0,66	5	3	0	7,9
2	1	0	0,68	5	3	1	11,0
2	2	0	0,93	5	3	2	14,0
3	0	0	0,78	5	4	0	13,0
3	0	1	1,1	5	4	1	17,0
3	1	0	1,1	5	4	2	22,0
3	2	0	1,4	5	4	3	28,0
4	0	0	1,3	5	5	0	24,0
4	0	1	1,7	5	5	1	35,0
4	1	0	1,7	5	5	2	54,0
4	1	1	2,1	5	5	3	92,0
4	2	0	2,2	5	5	4	160,0
4	2	1	2,6				
4	3	0	2,7				
5	0	0	2,8				
5	0	1	3,1				
5	1	0	3,3				

Примечание. НВЧ – наиболее вероятное число клеток, определяемое при подсчете жизнеспособных клеток методом разведений. Для расчета учитывают количество помутневших пробирок каждого разведения и по таблице находят наиболее вероятное число (НВЧ). Найденную величину умножают на разведение, принятое за начальное.

Таблица 2

Встречаемость разных видов микроорганизмов в ризосфере (на примере ризосферы пшеницы)

№ культуры	Внешний вид колонии	Повторности										Сумма Σ	Формула расчета
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	Зеленая плоская…	2	0	1	2	0	1	1	2	1	2	12	
2	Водянистая выпуклая…	1	3	0	0	0	2	2	0	0	3	12	Обилие = $\frac{12 \times 100}{129}$ = 9,3% вида №1
3	Белая выпуклая…	1	1	1	0	1	0	0	3	1	0	8	
4	Плоская прозрачная…	0	2	2	0	3	1	1	1	2	0	12	
5	Слизистая с желтым центром…	2	1	0	0	2	0	3	2	0	0	10	
6	Плоская белая…	0	1	1	2	1	0	5	1	3	2	16	Частота встречаемости = $\frac{8 \cdot 100}{10}$ = 80%
7	Лимонная плоская…	0	0	0	0	4	0	0	0	0	1	5	
8	Розовая слизистая…	0	0	1	2	1	1	1	0	0	0	6	
9	Слизистая с белым центром…	0	2	1	0	0	3	3	2	2	4	18	
10	Желтая плоская…	0	3	0	0	0	0	2	1	1	0	7	
11	Оранжевая выпуклая	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	12	
12	Красная выпуклая…	0	0	0	0	0	0	0	0	11	1	12	

Σ = 129

Абсолютно сухое вещество (en equilibrium water steam) – высушенное при температуре 105–110 °С.

Автоклав (гр. *autos* – сам + лат *clavis* – ключ) – плотно закрывающийся сосуд предназначенный для стерилизации перевязочного материала, инструментов, лабораторной посуды, питательных сред, белья, а также обеззараживания микробных культур и инфекционного материала путем нагревания с избыточным давлением. Также может использоваться при проведении многих физико-химических процессов, что увеличивает скорость процессов. При достижении температуры 120 °С избыточное давление составляет одну атмосферу (1 ати), 132 °С – 2 ати.

Автоклавирование – стерилизация медицинского инструмента, перевязочного материала, сред и посуды насыщенным паром под давлением с помощью герметичного аппарата – автоклава.

Агар-агар – вещество, которое используется для уплотнения питательной среды. Агар-агар получают из некоторых морских водорослей и выпускают в виде стебельков, пластин или порошка. Большинство микроорганизмов не используют его в качестве субстрата для роста. Это сложный полисахарид, в состав которого входят агароза и агаропектин, небольшое количество солей. Сохраняет свои свойства только при pH близком к нейтральному! В воде образует гель, который плавится при 100 °С и затвердевает при температуре около 45 °С. В среды агар-агар добавляют в количестве 1,5–3% от общего объема.

Адсорбция (лат. *ad* – на, при; *sorbeo* – поглощаю) – процесс сгущения газообразного или растворенного вещества на поверхности раздела фаз. Адсорбция – частный случай сорбции. Поглощаемое вещество, ещё находящееся в объёме фазы, называют *адсорбтив*, поглощённое – *адсорбат*. В более узком смысле под адсорбцией часто понимают поверхностное поглощение примеси из газа или жидкости твёрдым веществом – *адсорбентом*. Процесс, обратный адсорбции, то есть перенос вещества с поверхности раздела фаз в объём фазы, называется **десорбция**.

Антагонизм (гр. *antagonizomai* – борюсь против кого-нибудь) – форма взаимоотношений между организмами, при котором один вид подавляет развитие другого или убивает его.

Антагонист (противник, соперник) – организм, подавляющий или убивающий другой организм.

Антибиотик(и) (гр. *anti* – против+ гр. *bios* – жизнь) – вещество биологического происхождения, способное убивать микроорганизмы или угнетать их рост. Вырабатываются плесневыми грибами (пенициллин), актиномицетами (стрептомицин), бактериями (грамицидин) и высшими растениями (фитонциды). Каждый антибиотик характеризуется специфическим избирательным действием только на определенные виды микробов. Антибиотиками называют также антибактериальные вещества, извлекаемые из растительных и животных клеток, а в некоторых случаях и получаемые синтетически. В промышленности антибиотики получают микробиологическим и химическим синтезом.

Бокс – изолированная, застекленная часть помещения (или комната) предназначенная для пересева культур микроорганизмов и проведения других процедур требующих стерильных условий. Стерилизация бокса достигается применением бактерицидной лампы.

Глицерин – (1,2,3-тригидроксипропан; 1,2,3-пропантриол) (гр. *glykeros* – сладкий). Химическое соединение с формулой $HOCH_2CH(OH)\text{-}CH_2OH$ или $C_3H_5(OH)_3$. Простейший представитель трёхатомных спиртов. Представляет собой вязкую прозрачную гигроскопичную жидкость, не ограниченно растворим в воде, сладкий на вкус. Легко образуется при гидролизе природных (растительных или животных) жиров и масел (триглицеридов), впервые был получен Карлом Шееле в 1779 г. при омылении жиров.

Грам – **Ганс Кристиан Йоахим Грам** (дат. *Hans Christian Joachim Gram* ; 13.09.1853–14.11.1938) – датский бактериолог. В 1884 г. разработал метод разделения двух основных классов бактерий с помощью Метода окраски Грама, которая продолжает оставаться стандартной процедурой в микробиологии. Метод сыграл главную роль в классификации бактерий. Грам был скромным человеком и в своей первой публикации отметил. «...несмотря на то, что знаю что сейчас этот метод имеет недостатки и несовершенен, но я также надеюсь что в руках других исследователей он превратится во что-то полезное».

Десорбция – перенос вещества с поверхности раздела фаз в объём фазы. Процесс, обратный адсорбции.

Доверительный интервал в математической статистике – это интервал, построенный с помощью случайной выборки из распределения с неизвестным параметром, такой, что он накрывает данный параметр с заданной вероятностью.

Закон Пуассона – вероятность возникновения случайного события n раз за время t. Распределение Пуассона моделирует случайную величину, представляющую собой число событий, произошедших за фиксированное время, при условии, что данные события происходят с некоторой фиксированной средней интенсивностью и независимо друг от друга.

Изолят – потомство одной клетки, выделенной из какого-либо субстрата, поддерживающееся на среде определенного состава.

Индикатор (лат. *indicator* – указатель) – прибор, устройство, вещество – объект, отображающий изменения какого-либо параметра контролируемого процесса или состояние объекта в форме, наиболее удобной для непосредственного восприятия человеком. В химии – вещество, дающее характерные (обычно цветные) химические реакции и употребляющиеся при анализе (например: лакмус, метилоранж, фенолфталеин и другие).

Инкубация/ инкубирование (лат. *incubatio* – выращивание) – культивирование при определенной температуре.

Концентрация (лат. *con* – с + *centrum* – центр, сосредоточение) – количество клеток в 1 мл (клеток/мл). В микробиологии наряду с этим термином используется термин ***титр***.

Контаминант (лат. *contaminatio* – смешение, примесь, загрязняющее вещество) – любой посторонний объект, случайно попавший в культуру или культуральную среду. В случае если это микроорганизм, то он может конкурировать с культивируемыми клетками и, следовательно, подавлять их рост или полностью замещать их.

Косяк – скошенная питательная среда в пробирке, получается, когда пробирки со стерильной, еще не застывшей плотной питательной средой раскладывают на ровной поверхности стола в наклонном положении (под небольшим углом). После этого засевается музейной культурой. Необходим для хранения культуры микроорганизмов.

Культивирование (лат. *cultus* – выращивание) – выращивание микроорганизмов на питательных средах.

Культура – развившиеся в результате культивирования микроорганизмы. При развитии в жидкой среде образуют суспензию, осадок или пленку, на плотной среде – колонии. Культура может быть *чистой* – содержать потомство клетки только одного вида и *накопительной* – состоять преимущественно из клеток одного вида микроорганизмов.

Лимитирование – ограничение

Метаболиты (гр. *metabole* – перемена) – вещества, образующиеся в организме в процессе обмена веществ. Метаболиты бывают первичными, вторичными, промежуточными (подвергающимися дальнейшим биотрансформациям) и конечными, не подвергающимися дальнейшей биотрансформации и экскретируемые из организма.

Общее микробное число (Colony Forming Units – CFU) – общее число мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, способных образовывать колонии на питательном агаре при температуре 37 °С в течение 24 ч, видимые с увеличением в два раза. Наряду с инкубацией при температуре 37 °С используют инкубацию посевов при температуре 20–22 °С в течение 72 ч для учета сапрофитных водных микроорганизмов.

Патоген (гр. *pathos* – страдание, болезнь + гр. *genos* – рождение, род, происхождение) – любой микроорганизм (включая вирусы, бактерии и проч.), способный вызывать патологическое состояние (болезнь) другого живого существа. В более общем случае под патогеном понимают любой фактор внешней среды, способный вызвать повреждение каких-либо систем организма или развитие каких-либо заболеваний. Патогенными микроорганизмами называются паразитирующие микроорганизмы по отношению к их хозяину. Негативное воздействие патогенов на организм может осуществляться различными механизмами, вызывающими интоксикацию, разрушение тканей, нарушение регуляторных механизмов или другими путями и обычно связано с их размножением в организме и воздействием продуктов жизнедеятельности на хозяина.

Пептон (англ. *peptone*) – препарат, полученный из молока и мяса животных под действием протеолитических ферментов (если используется трипсин, то такой пептон называется *триптон*). На начальных стадиях процесса переваривания белков под действием ферментов, например, пепсина образуются крупные белковые фрагменты, которые и называются пептонами. Кроме коротких пептидов, обычно пептоны содержит жиры, металлы, соли, витамины и много других органических и минеральных веществ. Пептоны широко используются для создания питательной среды для выращивания бактерий и грибов.

Посев – внесение клеток микроорганизмов или какого-либо исследуемого материала (образца почвы, пробы воды) в стерильную питательную среду для получения чистой или накопительной культуры.

Пересев / пассирование (лат. *passus* – чередование) – перенесение выращенных клеток из одной среды в другую (стерильную).

Принцип Коха – каждая колония является потомством одной клетки. Это позволяет на основании числа колоний, выросших после посева на плотную питательную среду, судить об исходном содержании в ней клеток микроорганизмов. Результаты количественного определения микроорганизмов, проведенного по методу Коха, часто выражают в колониеобразующих единицах (КОЕ).

pH – водородный показатель – мера активности (в очень разбавленных растворах она эквивалентна концентрации) ионов водорода в растворе, и количественно выражающая его кислотность, вычисляется как отрицательный (взятый с обратным знаком) десятичный логарифм активности водородных ионов, выраженной в молях на литр: $pH = -\lg [H^+]$. Это понятие было введено в 1909 году датским химиком Сёренсеном. Показатель называется pH, по первым буквам латинских слов *potentia hydrogeni* – сила водорода, или *pondus hydrogenii* – вес водорода. Растворы бывают кислыми, нейтральными и щелочными. Так как в кислых растворах $[H^+] > 10^{-7}$, следовательно, pH кислых растворов < 7, а pH щелочных растворов pH > 7, pH нейтральных растворов равен 7

Ризоплана (от греч. *rhiza* – корень и лат. *planiae* – растение) – зона (до 100 мкм), окружающая корни и корневые волоски, заселенная микроорганизмами и входящая в состав ризосферы.

Ризосфера – (от греч. *rhiza* – корень и *sphaira* – шар) – прилегающий непосредственно к корням растений слой почвы (2–3 мм), отличающийся значительной биологической активностью и повышенным содержанием микроорганизмов. Состав микробиоты ризосферы зависит от типа почвы, вида и возраста растений.

Секреция (от лат. *secretio* – отделение) – в широком смысле – любые железистые выделения растений и животных. В более узком – процесс образования и выделения специальными железами животных, играющих важную роль в процессах обмена веществ. В отличие от собственно выделения, при секреции у вещества может быть определённая функция (оно может не быть отходами жизнедеятельности). **Секрет** – жидкое или газообразное физиологически активное вещество, выделяемое специализированными органами и тканями в полости организма, протоки органов и во внешнюю среду. Органы, выделяющие секрет, называются железами.

Суспензия (лат. suspensio – подвешивание) – смесь веществ, где твёрдое вещество распределено в виде мельчайших частичек в жидком веществе во взвешенном (неосевшем) состоянии. ***Клеточная суспензия*** – клетки, культивируемые в перетекающей или взбалтываемой жидкой среде

Статистическая значимость – в статистике величину называют статистически значимой, если мала вероятность чисто случайного возникновения её или ещё более крайних величин. Здесь под крайностью понимается степень отклонения от *нулевой гипотезы*.

Стерилизация – (обеспложивание) – методы, применяемые для уничтожения всех форм жизни как на поверхности, так и внутри стерилизуемых объектов (вегетативных и споровых форм патогенных и непатогенных микроорганизмов). Является одним из важнейших и

необходимых приемов в микробиологической практике Термин «стерильность» имеет абсолютное значение: можно говорить только либо о стерильности, либо о нестерильности, но не может быть состояния «частичной или неполной стерильности», «почти стерильного». Стерилизация бывает холодная и термическая.

Фермент / энзи́мы (от лат. *fermentum* – дрожжи, закваска) – обычно белковые молекулы или молекулы РНК (рибозимы) или их комплексы, ускоряющие (катализирующие) химические реакции в живых системах. Обязательно присутствуют во всех клетках живого организма. Реагенты в реакции, катализируемой ферментами, называются **субстратами**, а получающиеся вещества – **продуктами**. Ферменты специфичны к субстратам (АТФаза катализирует расщепление только АТФ, а киназа фосфорилазы фосфорилирует только фосфорилазу).

Физиологический раствор – водный раствор определенного физико-химического свойства, осмотическое давление которого равно осмотическому давлению крови. Существует несколько типов физиологических растворов, состав которых зависит от целей, для которых они применяются. В микробиологической практике используется 0,85%-ный раствор NaCl для приготовления разведений, чтобы избежать стресса культуры при смене осмотического давления.

Фунгистатическая активность – способность бактерий подавлять рост и развитие грибов, обусловленное выделением антибиотиков, сидерофор, цианидов и других соединений.

Шейкер – перемешивающее устройство, предназначен для перемешивания жидкостей, разделения смесей на фракции (просеивание через сита), экстракции и выращивания культур клеток. Шейкеры используются в микробиологии, вирусологии, химии, биохимии, биологии и т.д.

Штамм – генетическая однородная культура микроорганизма, наследственная однородность которой поддерживается отбором по специфическим признакам. Штамм не является таксономической категорией: наинизшим таксоном у всех организмов является вид, один и тот же штамм не может быть выделен второй раз из того же источника в другое время.

Элективные условия – избирательные условия, которые обеспечивают преимущественное развитие желаемых (необходимых исследователю) микроорганизмов или группы микроорганизмов из смешанной популяции.