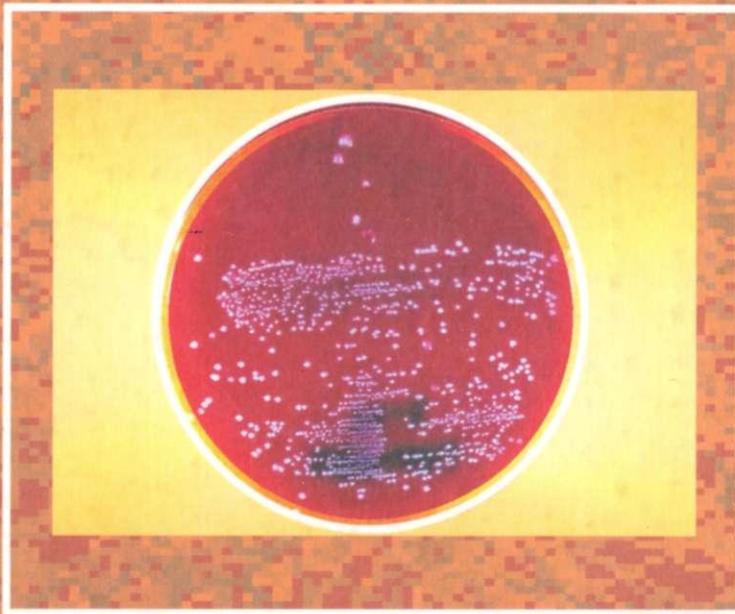


409235

Высшее образование

Е. З. ТЕППЕР
В. К. ШИЛЬНИКОВА
Г. И. ПЕРЕВЕРЗЕВА



ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ


дрофа

10к
409235

Высшее образование

**Е. З. ТЕППЕР
В. К. ШИЛЬНИКОВА
Г. И. ПЕРЕВЕРЗЕВА**

ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Под редакцией В. К. Шильниковой

Допущено
Министерством образования Российской Федерации
в качестве учебного пособия
для студентов высших учебных заведений,
обучающихся по специальности 012400 «Микробиология»
и биологическим специальностям

5-е издание,
переработанное и дополненное



ДРОФА

МОСКВА · 2004

Нацiональная
бiблiотека
Беларусi

УДК 579(075.8)
ББК 28.4я73
Т34

Рецензенты:

кафедра биологии почв факультета почвоведения Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова (зав. кафедрой д-р биол. наук, академик РАЕН Д. Г. Звягинцев);

д-р биол. наук, проф. Л. И. Воробьева (кафедра микробиологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова)

Теппер Е. З.

Т34 Практикум по микробиологии: Учебное пособие для вузов / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева; Под ред. В. К. Шильниковой. — 5-е изд., перераб. и доп. — М.: Дрофа, 2004. — 256 с.: ил.

ISBN 5—7107—7437—5

Пособие — первая книга комплекта по микробиологии для студентов, обучающихся сельскохозяйственным и биологическим специальностям.

В практикуме рассматриваются методы классических областей микробиологии, некоторые новые, получившие признание методы, а также оригинальные разработки авторов и кафедры микробиологии МСХА им. К. А. Тимирязева.

Для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности 012400 «Микробиология» и биологическим специальностям. Может быть полезно специалистам смежных областей, работающим с микроорганизмами, учителям биологии и экологии, а также всем, кого интересуют проблемы биологизации сельского хозяйства.

УДК 579(075.8)
ББК 28.4я73

Учебное издание

Теппер Екатерина Зельмановна, Шильникова Викторина Кузьминична,
Переверзева Генриетта Ивановна

ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Учебное пособие для вузов

Зав. редакцией Н. Е. Рудомазина

Ответственный редактор Н. П. Красинская

Художественное оформление А. Л. Кашеков, Л. Р. Егорова

Технический редактор И. В. Грибкова. Компьютерная верстка А. В. Егоров

Корректор А. Ю. Буланова

Санитарно-эпидемиологическое заключение № 77.99.02.953.Д.006315.08.03 от 28.08.2003.

Подписано к печати 10.12.03. Формат 60×90^{1/16}. Бумага типографская. Гарнитура «Таймс».

Печать офсетная. Усл. печ. л. 16,0. Тираж 3000 экз. Заказ № 8771.

ООО «Дрофа». 127018, Москва, Сушевский вал, 49.

По вопросам приобретения продукции издательства «Дрофа» обращаться по адресу:
127018, Москва, Сушевский вал, 49. Тел.: (095) 795-05-50, 795-05-51. Факс: (095) 795-05-52.

Торговый дом «Школьник». 109172, Москва, ул. Малые Каменщики, д. 6, стр. 1А.

Тел.: (095) 911-70-24, 912-15-16, 912-45-76.

Магазины «Переплетные птицы»: 127018, Москва, ул. Октябрьская, д. 89, стр. 1.

Тел.: (095) 912-45-76;

Московская обл., г. Коломна, Голутвин, ул. Октябрьской революции, 366/2.

Тел.: (095) 741-59-76.

Отпечатано в полном соответствии с качеством предоставленных диапозитивов в Тульской типографии. 300600, г. Тула, пр. Ленина, 109.

ISBN 5—7107—7437—5

© ООО «Дрофа», 2004

Предисловие

Практикум по микробиологии построен в соответствии с действующей программой курса микробиологии, принятой Московской сельскохозяйственной академией им. К. А. Тимирязева для студентов, обучающихся сельскохозяйственным специальностям (агрономия, растениеводство, земледелие, фитопатология, плодоовощеводство, агрохимия, почвоведение, экология, зооинженерия, биотехнология и др.).

На современном уровне развития естественных наук требуются глубокие знания микробиологических процессов, лежащих в основе многих биотехнологических производств и служащих гарантией защиты окружающей среды от антропогенного воздействия.

Помимо приобретения теоретических знаний по микробиологии будущим специалистам сельскохозяйственного и биологического профиля необходимы лабораторно-практические занятия, являющиеся по сути небольшими научно-исследовательскими работами.

Каждая лабораторная работа настоящего пособия содержит краткое обоснование цели исследования, описание техники и методики постановки опыта, анализа полученных результатов, а также перечень необходимых материалов и оборудования для проведения эксперимента.

Предлагаемая форма изложения заставляет студента думать, позволяет самостоятельно воспроизводить и наблюдать в лабораторных условиях микробиологические процессы, идущие в природе.

«Практикум по микробиологии» — результат более чем 30-летнего педагогического опыта авторов, читавших (и читающих) курсы лекций по микробиологии и проводивших лабораторно-практические занятия со студентами всех факультетов МСХА им. К. А. Тимирязева. В «Практикум» вошли методы классических областей микробиологии, некоторые новые получившие признание методы, а также оригинальные разра-

ботки авторов и кафедры микробиологии МСХА. В нем профессионально охвачен весь основной курс учебного материала по сельскохозяйственной микробиологии, а также все важнейшие звенья методики научного исследования.

Предлагаемое практическое руководство может быть полезно студентам не только сельскохозяйственных, но и других вузов, изучающим микробиологию, специалистам смежных областей, работающим с микроорганизмами (генетикам, молекулярным биологам, биохимикам, биотехнологам), учителям биологии и экологии, а также всем, кого интересуют проблемы биологизации сельского хозяйства.

Правила по технике безопасности при работе в микробиологической лаборатории

1. Не входить в лабораторию в пальто, головном уборе, не вносить посторонние вещи.
2. Приступать к занятиям только надев хлопчатобумажный халат.
3. Строго соблюдать правила обращения с химическими реактивами и красителями.
4. С большой осторожностью пользоваться смесью спирта с эфиром, не переносить ее на столы с горелками.
5. Поскольку некоторые микроорганизмы, особенно споры грибов, являются аллергенами, не допускать их распыления — не оставлять открытыми чашки Петри, пробирки, колбы с культурами микроорганизмов.
6. Перед тем как набирать ртом с помощью пипетки суспензии микроорганизмов или реактивы, убедиться в том, что пипетка закрыта с тупого конца ватой.
7. В лаборатории поддерживать порядок и чистоту. По окончании занятий протирать иммерсионный объектив микроскопа мягкой тканью, накрывать микроскоп полиэтиленовым чехлом, приводить в порядок рабочее место, мыть руки.
8. Помнить о том, что студенты несут ответственность за используемые ими микроскопы, другое лабораторное оборудование, чистоту рабочего места.
9. Перед уходом из лаборатории дежурному проверять, выключены ли газ, вода, электроприборы.

1.1. Светлопольная микроскопия

Изучение невидимых невооруженным глазом клеток микроорганизмов, размеры которых не превышают десятков и сотен микрометров (1 мкм = 0,001 мм), возможно только при помощи микроскопов (от греч. *mikros* — малый, *skopeō* — смотрю). Эти приборы позволяют получать в сотни раз (световые микроскопы) и в десятки—сотни тысяч раз (электронные микроскопы) увеличенное изображение исследуемых объектов.

При помощи микроскопа изучают морфологию клеток микроорганизмов, их рост и развитие, проводят первичную идентификацию (от лат. *identificare* — отождествление) исследуемых организмов, ведут наблюдения за характером развития микробных ценозов (сообществ) в почве и других субстратах.

1.1.1. Устройство микроскопа

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

Механическая часть микроскопа. К ней относят штатив, предметный столик и тубус (трубу).

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 (кремальера, зубчатка, макро-винт) служит для предварительной ориентировочной установки изображения рассматриваемого объекта.

Микрометрический винт (микровинт) используют для последующей четкой установки на фокус. При полном повороте микровинта труба передвигается на 0,1 мм (100 мкм).

При вращении винтов по часовой стрелке труба опускается по направлению к препарату, при вращении против часовой стрелки — поднимается от препарата.

Предметный столик служит для размещения на нем препарата с объектом исследования. Предметный столик вращается и перемещается во взаимно перпендикулярных плоскостях с помощью винтов. 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.

Если необходимо исследовать поверхность препарата, не допуская пропусков (что важно при подсчете), или же если во время работы требуется повторное исследование какого-либо определенного участка на препарате, на предметный столик помещают *препаратопроводитель*. На нем имеется система линеек — нониусов, с помощью которых можно присвоить координаты любой точке исследуемого объекта. Для этого при установке препаратопроводителя следует совместить центр вращения столика и оптическую ось системы микроскопа с центрировочной пластинкой препаратопроводителя (отсюда предметный столик с препаратопроводителем называют иногда крестообразным).

Тубус (труба) — оправа, в которую заключены элементы оптической системы микроскопа. К нижней части тубуса прикрепляется револьвер (объективодержатель) с гнездами для объективов. 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.

Во многих современных микроскопах зеркало и конденсор заменены вмонтированным в прибор регулируемым источником света.

Осветительная система находится под предметным столиком. *Зеркало* отражает падающий на него свет в конденсор. Одна сторона зеркала плоская, другая — вогнутая. При работе с конденсором необходимо пользоваться только плоским зеркалом. Вогнутое зеркало применяют при работе без конденсора с объективами малых увеличений. *Конденсор* (от лат. *condenso* — уплотняю, сгущаю), состоящий из 2—3 короткофокусных линз, собирает лучи, идущие от зеркала, 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 пластинок.

Окрашенные препараты лучше рассматривать при почти полностью открытой диафрагме, неокрашенные — при уменьшенном отверстии диафрагмы.

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

Объектив (от лат. *objectum* — предмет) — наиболее важная часть микроскопа. Это многолинзовая короткофокусная система, от качества которой зависит в основном изображение объекта. Наружная линза, обращенная плоской стороной к препарату, называется фронтальной. Именно она обеспечивает увеличение. Остальные линзы в системе объектива выполняют преимущественно функции коррекции оптических недостатков, возникающих при исследовании объектов.

Один из таких недостатков — явление *сферической аберрации*. Оно связано со свойством линз неравномерно преломлять периферические и центральные лучи. Первые обычно преломляются в большей степени, чем вторые, и поэтому пересекаются на более близком расстоянии к линзе. В результате изображение точки приобретает вид расплывчатого пятна.

Хроматическая аберрация возникает при прохождении через линзу пучка лучей с различной длиной волны. Преломля-

ясь по-разному, лучи пересекаются не в одной точке. Сине-фиолетовые лучи с короткой длиной волны преломляются сильнее, чем красные с большей длиной волны. Вследствие этого у бесцветного объекта появляется окраска.

К объективам, устраняющим сферическую и частично хроматическую аберрацию, относятся *ахроматы*. Они содержат до 6 линз и корректируют первичный спектр (желто-зеленую часть спектра), не устраняя вторичного спектра. Изображение, получаемое с помощью ахроматов, не окрашено, но края его имеют красный или синеватый ореол. В современных ахроматах этот недостаток практически неуловим. Лучший материал для линз ахроматов — флинтгласы — старые сорта стекла с высоким содержанием окиси свинца.

Объективы, устраняющие хроматическую аберрацию и для вторичного спектра, называют *апохроматами*. В их составе может быть от 1 до 12 линз. Линзы апохроматов для лучшей коррекции вторичного спектра делают из плавикового шпата, каменной соли, квасцов и других материалов. Апохроматы дают возможность устранить окрашивание объекта и получить одинаково резкое изображение от лучей разного цвета. Максимального эффекта при работе с апохроматами можно достичь только при их сочетании с компенсационными окулярами, возмещающими оптические недостатки объективов. В компенсационных окулярах хроматическая ошибка противоположна хроматической ошибке объектива, и в результате хроматическая аберрация микроскопа оказывается почти полностью компенсированной.

Планахроматы — разновидность апохроматов, имеющих плоское поле зрения. Объективы-планахроматы полностью устраняют искривление поля зрения, обуславливающее неравномерность фокусировки объекта (при кривизне поля зрения фокусируется только часть поля). Планахроматы и планапохроматы используют при микрофотографии.

Объективы бывают сухие и погружные (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

Показатели преломления некоторых соединений

Вещество	Показатель
Воздух	1,00
Стекло	1,52
Вода	1,33
Глицерин	1,47
Касторовое масло	1,48—1,49
Льняное очищенное осветленное масло	1,491—1,486
Кедровое масло	1,515
Смесь касторового масла с гвоздичным (жидкость Мера)	1,515
Гвоздичное масло	1,53
Канадский бальзам	1,536
Анисовое масло	1,557
Монобромнафталин	1,658

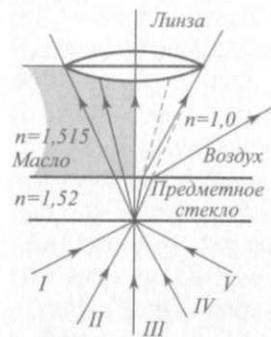


Рис. 1. Ход лучей в сухой и иммерсионной системах: I—V — лучи света

в глаз наблюдателя (рис. 1). При работе с иммерсионным объективом необходимо поместить между покровным стеклом и линзами объектива *кедровое масло*¹, показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла (табл. 1).

Лучи в оптически однородной гомогенной среде не меняют своего направления. Иммерсионные объективы на оправе имеют черную круговую нарезку и обозначения: I — immersion (иммерсия), HI — homogen immersion (однородная иммерсия), OI — oil immersion, MI — масляная иммерсия.

Объективы различают по их увеличению.

Собственное увеличение объектива (V) определяют по формуле

$$V = \frac{l}{f},$$

где l — оптическая длина тубуса или расстояние между фокальной плоскостью объектива и плоскостью изображения, составляющее для разных объективов 128—180 мм; f — фокусное расстояние объектива: чем оно больше, тем меньше увеличение объектива.

Величина увеличения объективов обозначена на их оправе (8×, 40×, 9×). Каждый объектив характеризуется, кроме того, определенной величиной рабочего расстояния в миллиметрах.

У объективов с малым увеличением расстояние от фронтальной линзы объектива до препарата больше, чем у объективов с большим увеличением. Так, объективы с увеличением 8×, 40× и 90× имеют соответственно рабочие расстояния 13,8; 0,6 и 0,12 мм. В зависимости от того, с каким объективом работаешь, для его фокусировки выбирается макрометрический и микрометрический винт. Иммерсионный объектив имеет ра-

¹ Кедровое масло получают из семян виргинского можжевельника *Juniperus virginiana* или зеравшанской арчи *Juniperus seravschana*. В настоящее время в качестве иммерсионной жидкости чаще применяют синтетические продукты, соответствующие по оптическим свойствам кедровому маслу.

бочее расстояние до объектива 0,12 мм, поэтому его нередко называют «близоруким».

У объективов малых увеличений не только большие рабочие расстояния, но и большие поля зрения. В связи с этим рекомендуется исследование препарата начинать с помощью объектива с небольшим увеличением.

Объективы рассчитаны на работу с покровным стеклом толщиной $0,17 \pm 0,1$ мм. Если стекло не соответствует стандарту, необходимо регулировать объектив вращением кольца коррекционной оправы, которой оснащены современные высококачественные объективы. При отсутствии такой оправы сферическую aberrацию, вызываемую покровным стеклом, следует устранить, поднимая или опуская тубус микроскопа.

Одна из важных характеристик объектива — **разрешающая способность**, обуславливающая в конечном итоге разрешающую способность микроскопа в целом. Она определяет наименьшее расстояние между двумя точками на препарате, при котором их изображение будет раздельным. Разрешающая способность объектива зависит от его числовой апертуры

и длины волны света, при которой происходит исследование объекта. Математически такая зависимость выражается формулой

$$d = \frac{\lambda}{2A},$$

где λ — длина волны света, воспринимаемая человеческим глазом (0,4—0,7 мкм, средняя длина волны — 0,55 мкм); A — числовая (нумерическая) апертура объектива.

При определении разрешающей способности объектива (микроскопа) следует различать два случая:

■ освещение *прямое* (лучи падают параллельно оптической оси микроскопа);

■ освещение *косое*. При косом освещении d в 2 раза меньше, чем при прямом:

$$d = \frac{\lambda}{2A}.$$

Предел разрешающей способности объектива или наименьшую величину d можно представить следующим образом.

Пусть значение λ — наименьшее (для более коротких, чем видимые, ультрафиолетовых лучей оно равно 350 нм), а значение A — максимальное (в наиболее совершенных иммерсионных системах — 1,4—1,6). В этом случае разрешающая способность объектива будет наибольшей, хотя по абсолютной величине она — наименьшая.

Для условий работы микроскопов величина λ постоянна, так как объекты исследуются при дневном освещении ($\lambda = 0,55$ мкм). Следовательно, предел разрешающей способности объектива в данном случае зависит исключительно от возможности повышения числовой (численной, или нумерической) апертуры A .

Числовая апертура объектива характеризует его светособирательную способность и определяется по формуле

$$A = n \cdot \sin \frac{1}{2}\alpha,$$

где n — показатель преломления светового луча, проходящего через предметное стекло в среду между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом; α — угол, одна сторона которого совпадает с оптической осью, а другая образована линией, соединяющей точку выхода эффективных лучей из объектива с границей действующего от-

верстия объектива; $\frac{1}{2}\alpha$ — половинный угол входного отверстия объектива.

Важно, чтобы значение величины n было максимальным. Повысить его можно введением в промежуток между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом среды с n , близкой к n стекла. На практике это достигается использованием иммерсионных объективов с введением кедрового масла ($n = 1$). Дальнейшего повышения n можно достичь введением среды с показателем преломления более высоким, чем у стекла.

Не менее важно также, чтобы значение величины $\sin \frac{1}{2}\alpha$ было максимальным: чем больше $\sin \frac{1}{2}\alpha$, тем выше числовая апертура и разрешающая способность объектива. Предел повышения $\sin \frac{1}{2}\alpha$ зависит от степени кривизны фронтальной линзы (это учитывается при изготовлении иммерсионных объективов) и числовой апертуры конденсора.

Высокоапертурные объективы применяют только одновременно с высокоапертурным конденсором. Если апертура конденсора меньше апертуры объектива, то возможности последнего оказываются не полностью использованными.

Следует помнить, что повысить величину $\sin \frac{1}{2}\alpha$ при использовании иммерсионных объективов можно максимальным поднятием конденсора, что определяется светособирающей функцией данного приспособления. Поскольку его линзы короткофокусные, световые лучи фокусируются конденсором на близком расстоянии, т. е. предусматривается фокусировка в плоскости объекта. Если конденсор опущен, то функция, по существу, нарушена.

Окуляр (от лат. *okularis* — глазной) служит непосредственным продолжением «линз» (хрусталиков) глаз человека. Преломляющую систему глаза можно рассматривать как двояковыпуклую линзу со средним фокусным расстоянием 15 см (расстояние наилучшего зрения 25 см).

Окуляр состоит из двух линз — *глазной* (верхней) и *полевой*, или *собирающей* (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 $4\times$ до $15\times$. Собственное увеличение окуляра вычисляют по формуле, применяемой для определения увеличения луп,

$$K = \frac{L}{F},$$

где L — расстояние наилучшего зрения, равное 25 см; F — фокусное расстояние линз окуляра.

Окуляры бывают различных типов. Выбор их зависит от объектива. С ахроматическими объективами малых и средних увеличений и планахроматами малых увеличений применяют окуляры Гюйгенса или ортоскопические окуляры; с апохроматическими, планахроматическими и ахроматическими объективами больших увеличений — компенсационные окуляры.

Окуляры Гюйгенса состоят из двух плосковыпуклых линз, обращенных выпуклой стороной к объективу. Нижняя линза обычно имеет больший диаметр и большее фокусное расстояние, чем верхняя. Фокальная плоскость окуляров Гюйгенса располагается между глазной линзой и линзой поля зрения.

При длительной работе с микроскопом следует пользоваться двойными окулярами — бинокулярной насадкой. Бинокулярные насадки часто имеют собственное увеличение (около $1,5\times$) и снабжены коррекционными линзами. Корпуса насадки могут раздвигаться в пределах 55—75 мм в зависимости от расстояния между глазами наблюдателя. Работа с бинокулярной насадкой улучшает видимость объекта, снижает яркость изображения и тем самым сохраняет зрение.

1.1.2. Основные технические характеристики микроскопа

Качество микроскопа определяется его увеличительной и разрешающей способностями.

Увеличительная способность микроскопа. Коэффициент увеличения микроскопа определяется произведением увеличения окуляра (K) и увеличением объектива (V):

$$D = KV.$$

Теоретически микроскоп может дать увеличение $\times 2000$ раз и более. Однако следует различать полезное и бесполезное увеличения микроскопа. Пределы полезного увеличения в обычно используемых микроскопах достигают $\times 1400$.

При превышении границ полезного увеличения возникает дифракция и другие явления, обусловленные волновой природой света. Они незаметны в пределах полезного увеличения, но приводят к оптическим ошибкам в зоне бесполезных увеличений.

Увеличение, которое дает возможность рассматривать объект под предельным углом зрения, и есть полезное увеличение. Оно обычно превышает числовую апертуру объектива в 500—1000 раз. Например, для объектива с увеличением $40\times$, имеющего числовую апертуру 0,65, полезное увеличение составляет $\times 325$ — 650 . Такое увеличение позволяет различить все структуры, разрешаемые данным объективом. Поэтому, чтобы получить общее увеличение в пределах полезного, для объектива $40\times$ следует брать окуляр $15\times$.

Применение более сильных окуляров не поможет выявлению более тонких деталей объекта.

Если объектив имеет увеличение $90\times$ (числовая апертура — $A = 1,25$), то полезное увеличение для него равно $\times 1250$. Следовательно, и в данном случае, чтобы не выходить за пределы полезного увеличения, не следует применять окуляры с увеличением более $15\times$.

Разрешающая способность микроскопа. Эта характеристика особенно важна при исследовании микрообъектов и их структур. Если увеличительная способность микроскопа зависит от объектива и окуляра, то разрешающая способность определяется главным образом объективом и конденсором. Расчет разрешающей способности микроскопа проводят по формуле

$$d = \frac{\lambda}{2A}.$$

Максимальная разрешающая способность светового микроскопа составляет 0,2 мкм.

Пример расчета разрешающей способности микроскопа.

Если $V = 40\times$, $A = 0,65$, то

$$d = \frac{0,55}{2 \times 0,65} = 0,42 \text{ (мкм)}$$

Если $V = 90\times$, $A = 1,25$, то

$$d = \frac{0,55}{2 \times 1,25} = 0,22 \text{ (мкм)}$$

Разрешающая способность микроскопа тем лучше, чем меньше абсолютная величина d .

Среди существующих моделей современных микроскопов наиболее распространены микроскопы биологические исследовательские (МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3, МБИ-6, МБИ-10) и учебные микроскопы биологические рабочие (МБР-1, МБР-1А).

1.1.3. Работа с микроскопом

■ **Основные правила работы с микроскопом.** Место для микроскопа выбирают подальше от прямого солнечного света. Работа на столе с темной поверхностью меньше утомляет глаза.

Лучше смотреть в окуляр левым глазом, не закрывая правого. В случае работы с бинокулярной насадкой сначала регулируют расстояние между окулярами в соответствии с расстоянием между глазами наблюдателя так, чтобы поля зрения обоих окуляров слились в одно.

Переносить микроскоп необходимо двумя руками: одной держать штатив, другой — основание микроскопа. Следует предохранять микроскоп от толчков, соприкосновения с сильнотоксичными веществами (кислотами, щелочами и т. п.).

Не рекомендуется вынимать окуляр из трубы, чтобы не загрязнять пылью трубу и объективы.

Линзы должны быть всегда чистыми. Нельзя касаться пальцами оптических поверхностей.

Микроскоп следует хранить в чехле.

■ **Работа с иммерсионной системой микроскопа.** При работе с иммерсионным объективом ($V = 90\times$; $A = 1,25$) необходимо установить зеркало плоской стороной вверх и поднять конденсор.

Каплю иммерсионной жидкости (кедрового масла) наносят на препарат, не размазывая ее по стеклу. Погружать в иммерсионную жидкость можно только иммерсионные объективы (не сухие!).

Глядя сбоку на предметное стекло, опускают объектив до поверхности масляной капли. Далее, глядя в окуляр, осторожно опускают объектив при помощи макровинта, следя за появлением изображения.

Когда изображение объекта появится, переходят 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, сдвинуты лампа или зеркало. Причину некачественного изображения надо устранить.

По окончании работы поднимают тубус, снимают препарат и осторожно протирают фронтальную линзу объектива хлопчатобумажной салфеткой, смоченной очищенным бензином.

Иммерсионную жидкость (кедровое масло) рекомендуют хранить в специальных двухкамерных масленках. В наружную камеру наливают ксилол или очищенный бензин для очистки объективов от масла, во внутреннюю — кедровое масло. Камеру с маслом герметично закрывают пробкой, в которую вставляют стеклянную палочку для нанесения капли масла на препарат.

■ **Установка освещения.** Удобнее пользоваться искусственным источником света — он более постоянен, чем дневной, лучше освещает объект, что особенно важно при работе с объективами с сильным увеличением ($90\times$).

Освещение препарата по Кёлеру. Наилучшее освещение объекта достигается при использовании точечного источника света — осветителя (например, осветителей типа ОИ-7, ОИ-9, ОИ-19).

Принцип Кёлера состоит в том, что освещение апертуры коллектора осветителя, конденсора и объектива должно быть одинаковым.

Последовательность установки света по Кёлеру следующая:

1) на расстоянии 25—30 см от микроскопа с помощью соединительной планки (крестовины) устанавливают осветитель с низковольтной лампочкой;

2) препарат помещают на предметный столик, устанавливают объектив $8\times$, поднимают до упора конденсор, открывают полностью его ирисовую диафрагму, почти полностью закрывают полевую диафрагму осветителя, оставляя лишь небольшое отверстие (1,0—1,2 см в диаметре), отодвигают матовое стекло и ставят плоское зеркало;

3) включают осветитель, устанавливают яркость света таким образом, чтобы нить лампы не давала слишком большого накала (это вредно для глаз). На зеркало помещают белый лист бумаги и фокусируют на него изображение нити лампы осветителя;

4) глядя в окуляр, движением зеркала проектируют световой поток в поле зрения микроскопа, фокусируют препарат, опуская конденсор и улавливая изображение полевой диафрагмы осветителя в виде светлого круглого пятна. С помощью зеркала надо добиться того, чтобы световое пятно попало в центр поля зрения. Чем больше отверстие диафрагмы осветителя, тем больше световое пятно. Если оно занимает большую часть поля зрения, его следует уменьшить, сузив отверстие диафрагмы (делать это надо смотря в окуляр);

5) наблюдая в микроскоп, фокусируют препарат в области светового пятна, продолжая слегка опускать конденсор. Если все сделано правильно, то световое пятно, видимое одновременно с препаратом, должно быть равномерно освещено. В противном случае следует слегка повернуть корпус осветителя;

6) продолжая смотреть в окуляр, открывают диафрагму осветителя до тех пор, пока световое пятно не займет все поле зрения. Лучше, если освещенный круг немного выйдет за пределы поля зрения.

Положение зеркала, конденсора и диафрагмы осветителя больше не меняют. Диафрагмой конденсора пользуются только при смене объективов.

Установку света по Кёлеру рекомендуют также и при темнопольной и фазово-контрастной микроскопии.

Измерение объектов. Измерять клетки микроорганизмов (в мкм) можно на фиксированных и живых препаратах с помощью шкалы окулярного микрометра — окулярной линейки. У кокков определяют диаметр клеток, у бактерий другой формы — длину и ширину.

Окулярная линейка — круглая стеклянная пластинка, посредине которой нанесена шкала делений (50 или 100 делений) общей длиной 5 мм. Вставляют окулярную линейку шкалой вверх на диафрагму окуляра, предварительно вывинтив линзу окуляра. Затем ставят препарат и определяют, скольким деле-

ниям линейки соответствует длина и ширина клетки. Измеряют не менее 10—20 клеток.

Чтобы рассчитать истинные размеры клеток, определяют цену деления окулярной линейки с помощью *объектного микрометра*. Последний представляет собой металлическую пластинку в форме предметного стекла с отверстием в центре; в отверстие помещено стекло с линейкой (шкала из 100 делений). Общая длина шкалы объектного микрометра — 1 мм, величина одного деления — 10 мкм (0,01 мм).

Для определения цены деления окулярной линейки объектный микрометр помещают вместо препарата на столик микроскопа и фокусируют изображение линейки при малом увеличении. Затем линейку перемещают в центр поля и меняют объектив на тот, при котором измеряли клетки. Передвигая столик микроскопа и поворачивая окуляр, устанавливают объектный и окулярный микрометры так, чтобы их шкалы были параллельны и одна перекрывала другую. Определение цены деления окулярного микрометра проводят по принципу нониуса, т. е. совмещают одну из черт шкалы окулярного микрометра с чертой объектного микрометра и находят следующее совмещение. Допустим, в двух делениях объектного микрометра (20 мкм) умещается пять делений окулярного микрометра, тогда одно деление окулярного микрометра при данном увеличении равняется 4 мкм (20 : 5). Зная, скольким делениям окулярной линейки соответствует длина и ширина изучаемых клеток, умножают цену деления окулярного микрометра на эти числа.

Полученные значения цены делений окулярной линейки справедливы только для данной системы *окуляр — объектив*.

1.2. Микроскопия в темном поле

В основе метода лежит **эффект Тиндаля** — рассеивающийся пучок света при наблюдении сбоку имеет вид голубоватого конуса на темном фоне. Другими словами, при освещении объекта косыми лучами света эти лучи, не попадая в объектив, остаются невидимыми для глаза, поэтому поле зрения выглядит темным. В то же время оптически неоднородные клетки, находящиеся в поле зрения и попадающие в сферу прохождения лучей, отклоняют их в такой степени, что лучи

попадают в объектив. Поскольку лучи света идут именно от объектов, наблюдатель видит их в темном поле интенсивно светящимися.

Темное поле зрения можно создать в светооптическом микроскопе, заменив обычный конденсор темнопольным и применив источник сильного света. Однако эффект темного поля может быть достигнут только в случае, если апертура конденсора превышает на 0,2—0,4 единицы апертуру объектива. Для исследования в темном поле рекомендуют конденсор с апертурой около 1,2 и объективы с апертурой 0,65—0,85. Важно обращать внимание на толщину предметных (0,8—1,2 мм) и покровных (0,17 мм) стекол, толщину препарата (в воде) и чистоту используемых стекол. Чем толще препарат и чем больше в нем посторонних частиц, преломляющих световые лучи, тем менее контрастно получаемое изображение, так как каждая частица, отражая лучи, освещает поле зрения.

Метод используется при исследовании *живых* клеток микроорганизмов. Он особенно ценен для функционально-морфологического изучения крупных объектов, например дрожжей. Цитоплазма дрожжевых организмов (при условии яркого источника света и хорошего апохроматического иммерсионного объектива) опалесцирует слабо и равномерно. На ее фоне четко различаются черные, оптически пустые вакуоли, капли жира в виде сильно блестящих гранул. Протопласт погибающих клеток опалесцирует молочно-белым цветом.

1.3. Микроскопия с фазово-контрастным устройством

Глаз человека различает световые волны по длине (цвет) и амплитуде (интенсивность, контрастность), но не различает их по фазе.

Почти все живые клетки прозрачны, так как световые лучи, проходя через них, не меняют своей амплитуды, хотя и изменяются по фазе. Превратить «фазовый» (неконтрастный) препарат в «амплитудный» (контрастный) можно, либо окрашивая объект (для живых клеток этот прием малопригоден), либо снижая апертуру конденсора путем прикрывания диафрагмы (прием также нежелателен, так как снижает разрешающую способность микроскопа).

Метод фазово-контрастной микроскопии разработан для наблюдения за прозрачными объектами. Он основан на преобразовании фазовых изменений, претерпеваемых световой волной при прохождении через объект, в видимые амплитудные с помощью определенного оптического устройства.

Если в объектив обычного микроскопа вмонтировать специальный диск — *фазовую пластинку с кольцом* (получается путем напыления диска солями редких металлов толщиной в несколько десятых микрометра), а в конденсор — *кольцевую диафрагму* (непроницаемую для лучей света пластинку с прозрачной щелью в виде кольца) так, чтобы через конденсор и объектив проходило лишь кольцо света, которое затем совмещается с кольцом фазовой пластинки объектива, то фазы проходящего светового луча сдвигаются (обычно на $1/4$ длины волны), фазовые изменения переходят в амплитудные и препарат становится контрастным.

Для проведения исследований необходимо в дополнение к световому микроскопу иметь **фазово-контрастное устройство** (наиболее широко распространена модель **КФ-4**), которое состоит из *фазовых объективов* (на оправе имеется буква «Ф»), *конденсоров с набором кольцевых диафрагм* и *вспомогательного микроскопа* (оптического устройства, помещаемого в тубус вместо окуляра при установке фазового контраста).

Метод применяют для исследования *живых* клеток микроорганизмов, контрастность которых достигается оптическим путем без вмешательства в их физиологические процессы.

1.4. Люминесцентная, или флуоресцентная, микроскопия

Некоторые биологические объекты способны при освещении коротковолновыми лучами (сине-фиолетовыми, ультрафиолетовыми) поглощать их и испускать лучи с более длинной волной. При этом клетки будут светиться желто-зеленым или оранжевым светом. Это *собственная, или первичная, люминесценция*.

Нелюминесцирующие объекты можно обработать специальными флуоресцирующими красителями — *флуорохромами* (акридином желтым, акридином оранжевым, аурамином, примулином, тиофлавином, конго красным) и также наблюдать

люминесценцию. Это будет *наведенная*, или *вторичная*, *люминесценция*.

Препараты, окрашенные флуорохромами, изучают в средах, не люминесцирующих под действием коротковолновых лучей: в воде, глицерине, вазелиновом масле или физиологическом растворе.

Оптическая схема люминесцентного микроскопа отличается от оптической схемы обычного микроскопа источником света (можно использовать *ртутную лампу*, а если возможно возбуждение люминесценции объекта синие-фиолетовыми лучами, — то и *низковольтные лампы*) и наличием на пути лучей двух светофильтров: *синего* светофильтра перед конденсором, пропускающего синие-фиолетовые лучи видимого спектра, и *желтого* светофильтра в окуляре микроскопа, убирающего синие лучи, мешающие выявлению люминесценции.

Люминесцентная микроскопия по сравнению с обычной позволяет:

- сочетать цветное изображение и контрастность объектов;
- изучать морфологию живых и мертвых клеток микроорганизмов в питательных средах и тканях животных и растений;
- исследовать клеточные микроструктуры, избирательно поглощающие различные флуорохромы, являющиеся при этом специфическими цитохимическими индикаторами;
- определять функционально-морфологические изменения клеток;
- использовать флуорохромы при иммунологических реакциях и подсчете бактерий в образцах с невысоким их содержанием.

Наиболее удобен для микробиологических исследований **микроскоп люминесцентный МЛ-2.**

1.5. Электронная микроскопия

По схеме строения электронный микроскоп аналогичен световому, но освещение объекта обеспечивает не луч света, а поток электронов от вольфрамовой нити, нагреваемой электрическим током.

Разрешающая способность современных электронных микроскопов составляет 0,2—0,4 нм, рабочее увеличение в среднем — 100 000 раз.

1.5.1. Трансмиссионный электронный микроскоп

Трансмиссионный (от лат. *transmissio* — передача, переход) микроскоп широко применяют в биологических исследованиях.

Каждый электронный микроскоп состоит из *электронной пушки* (источник электронов); *электромагнитных катушек*, выполняющих роль конденсорной, объективной и проекционной линз; предметного столика; экрана для изображения и окуляра. Для работы микроскопа необходим *вакуумный насос*, так как движение электронов возможно только в вакууме. Электроны в трансмиссионном микроскопе движутся по такому же пути, как и лучи света в световом микроскопе.

Изображение объекта можно сфотографировать, если заменить флуоресцирующий экран (металлическую пластину, покрытую тонким слоем сульфида цинка или смеси сульфида цинка с селенидом кадмия) фотопластинкой.

Препараты для электронно-микроскопических исследований помещают на специальные сетки, на которые нанесена тончайшая пленка (подложка). Общая толщина препарата и подложки не должна превышать 0,25 мкм.

При изучении под электронным микроскопом морфологических особенностей клеток микроорганизмов исследуются *целые* клетки, для изучения ультраструктуры клеток — их *срезы*. Толщина срезов не должна превышать 0,8—0,9 мкм. Контрастность объекта обеспечивается напылением его тяжелыми металлами (хромом, золотом, палладием) или обработкой различными контрастирующими веществами (фосфорно-вольфрамовой кислотой, уранилацетатом и др.).

1.5.2. Сканирующий, или растровый, электронный микроскоп

Этот микроскоп дает объемное, почти трехмерное изображение исследуемого объекта. В сканирующих микроскопах подвижный тонкий электронный луч очень быстро и последовательно обегает поверхность исследуемого объекта по квадратному растру и передает полученную информацию на электронно-лучевую трубку, покрытую люминофором, светящимся под действием электронов. Глубина фокуса сканирующего микроскопа достигает нескольких миллиметров; пределы полезного увеличения — 10—15 тыс. раз, разрешающая спо-

способность меньше, чем у трансмиссионных электронных микроскопов.

Препараты для сканирующего микроскопа подвергают специальной обработке, основная цель которой — обезвоживание объекта без нарушения (сморщивания) поверхности структур. Затем препарат покрывают тонким слоем сплава золота или платины, что делает его поверхность электропроводной и позволяет избежать накопления электрического заряда, который может снизить разрешающую способность микроскопа.

Глава 2 Работа с микроорганизмами

2.1. Культивирование микроорганизмов

2.1.1. Терминология

Выращивание микроорганизмов на питательных средах называют *культивированием* (от лат. *cultus* — выращивание), а развившиеся в результате микроорганизмы — *культурой*. При развитии в жидкой среде культуры образуют *суспензию*, *осадок* или *пленку*, при развитии на плотной среде — *колонию*. Культура может быть *чистой* — содержать потомство клетки только одного вида и *накопительной* — состоять преимущественно из клеток одного вида микроорганизмов.

Внесение клеток микроорганизмов или какого-либо исследуемого материала (образца почвы, пробы воды) в стерильную питательную среду для получения чистой или накопительной культуры называют *посевом*. Перенесение уже выращенных клеток из одной среды в другую (стерильную) называют *пересевом*, или *пассированием* (от лат. *passus* — чередование).

Обычно микроорганизмы выращивают при определенной постоянной температуре в *термостатах* (деревянных или металлических шкафах) или *термостатных комнатах*. В тех

и других постоянная температура поддерживается с помощью терморегуляторов.

Культивирование при определенной температуре называется *инкубацией*, или *инкубированием* (от лат. *incubatio* — выращивание, высиживание птенцов).

Выращивают микроорганизмы в стеклянной посуде: пробирках, колбах или чашках Петри. Для этого стеклянную посуду, не бывшую в употреблении, очищают от щелочи кипячением в растворе, содержащем $K_2Cr_2O_7$ (6%) и концентрированную H_2SO_4 (6%).

В пробирках микроорганизмы культивируют как в жидких, так и на плотных средах. Жидкой средой для аэробных культур заполняют обычно $1/3$ пробирки, для анаэробных — $2/3$. Если плотная среда в пробирках предназначена для последующего выращивания микроорганизмов, при подготовке к стерилизации ее наливают на $1/3$ — $1/4$ объема пробирок.

После стерилизации пробирки с еще не застывшей средой раскладывают на ровной поверхности стола в наклонном (под небольшим углом) положении для получения скошенной поверхности агара. Это так называемые *косяки* — косые или скошенные среды.

Плотная среда, застывшая при вертикальном положении пробирки, называется *столбиком*. Столбики питательной среды, занимающей $1/3$ — $1/2$ объема пробирки, используют для посева культуры *уколом*. Столбики питательной среды, занимающие $2/3$ объема пробирки, после стерилизации применяют для заливки стерильных чашек Петри, предназначенных для микробиологических посевов.

Пробирки со средами и культурами во время работы устанавливают в штативы; пробирки со средами, подготовленными к стерилизации, помещают в проволочные корзины или металлические ведра с отверстиями; пробирки с культурами при инкубации или хранении — в картонные коробки.

При культивировании микроорганизмов в колбах используют только жидкие питательные среды. Для аэробных микроорганизмов среду наливают тонким слоем (например, 30 мл в колбы Эрленмейера на 100 мл), для анаэробных микроорганизмов колбу заполняют на $2/3$ объема.

В чашках Петри микроорганизмы культивируют лишь на плотных средах. Высота этой посуды — около 1,5 см,

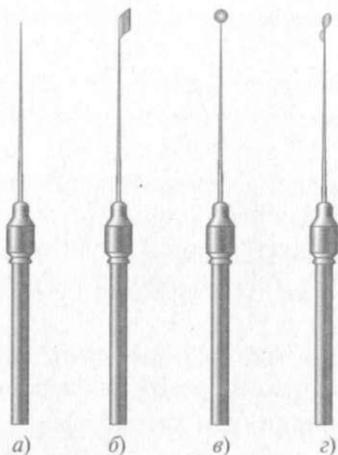


Рис. 2. Инструменты, используемые при работе с микроорганизмами:

а — бактериологическая игла; *б* — шпатель; *в, г* — петли: *в* — петля, сделанная правильно, *г* — петля, сделанная неправильно

диаметр — 8—10 см, причем диаметр верхней чашки (она служит крышкой) несколько больше диаметра нижней.

Для работы с микроорганизмами используют специальные бактериологические *иглы, петли и шпатели* (рис. 2). Их изготавливают из платиновой проволоки, которую закрепляют в специальных металлических держателях или впаивают в стеклянные палочки. Толщина игл и петель не должна превышать 0,5 мм, толщина шпателя может быть 1,5 мм и более.

При посевах и пересевах культур микроорганизмов из колоний, выросших на плотных средах, применяют иглы или шпатели. Последние используют и для взятия клеток микроорганизмов из колоний, врастающих в субстрат. Суспензии микроорганизмов берут петлей.

При приготовлении препаратов микроорганизмов предметные стекла удерживают на весу пинцетом Корнэ или специальными пинцетом-держателями. Сушить препараты целесообразно на верхнем ярусе сушильного металлического столика Коха (рис. 3). Промывать их удобно на приспособлениях-перекладинах или на так называемых препаратодержателях — параллельно расположенных стеклянных палочках, соединенных резиновыми трубками (длина палочек 20—30 см, трубок 15—20 см). Палочки устанавливают над фарфоровыми чашками или ваннами.

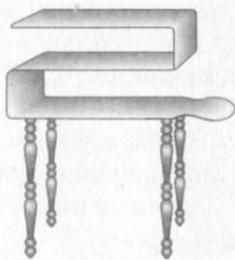


Рис. 3. Столик Коха

2.1.2. Техника посева

Посев (или пересев) всегда проводят вблизи горелки. При посеве клеток микроорганизмов из пробирки в пробирку обе пробирки (одну — с культурой, другую — со стерильной питательной средой) берут в левую руку. Одну пробирку зажимают между указательным и средним пальцами (*первая пробирка*). Нижний конец ее свободно лежит на большом пальце (с его левой стороны). *Вторую пробирку* зажимают между средним и безымянным пальцами. Она должна лежать параллельно первой. Ее нижний конец располагается с правой стороны большого пальца. Большой палец, находясь между пробирками, должен быть в естественном, ненапряженном состоянии и слегка удерживать пробирки в параллельном по отношению друг к другу положении.

При взятии мазка пробирки должны находиться в наклонном положении, гарантирующем стерильность культуры. При вертикальном расположении, пробирок возможно попадание из воздуха посторонних клеток микроорганизмов.

В пламени горелки тщательно обжигают бактериологическую иглу (петлю), держа ее в правой руке в отвесном положении. Мизинцем правой руки вынимают из второй пробирки ватную пробку и зажимают ее между мизинцем и ладонью. Пробку первой пробирки зажимают между безымянным и средним пальцами правой руки. Снова слегка обжигают иглу и вводят ее в пробирку с культурой. Платиновая игла остывает очень быстро. Легким прикосновением ее к колонии микроорганизмов берут небольшое количество микробной массы и переносят во вторую пробирку.

При высеве в плотную скошенную среду иглой с культурой легким движением, не повреждая среды, проводят прямую или волнообразную черту по ее поверхности — **посев штрихом**.

При посеве в столбик питательной среды иглу вводят в толщу ее центральной части — **посев уколом**. При посеве в жидкую среду (или из жидкой среды) лишь слегка наклоняют пробирки, чтобы избежать смачивания пробок и краев пробирок.

Пробки, перед тем как ими закрыть пробирки, обжигают в пламени. Удобнее сначала закрыть первую пробирку, а затем — вторую.

2.1.3. Хранение микроорганизмов

При длительном хранении в лабораторных условиях могут измениться отдельные физиолого-биохимические или морфологические особенности микроорганизмов. Чтобы избежать этого, необходимо хранить культуру чистой и в жизнеспособном состоянии.

Традиционный метод хранения — *пассирование* (субкультивирование), т. е. пересев на свежие питательные среды с временными интервалами в зависимости от вида микроорганизма, среды и условий хранения. Одни виды микроорганизмов требуют частых пересевов, другие можно не пересевать более месяца. В процессе такого хранения нельзя допускать пересыхания среды. Для этого пробирки с культурами рекомендуют обертывать бумагой или пленкой и хранить в условиях, когда процессы жизнедеятельности заторможены, например в холодильнике при 5–8 °С.

Существует ряд других **способов хранения культур**: под слоем стерильного вазелинового масла; в ампулах с жидким азотом; в лиофилизированном состоянии, т. е. высушенными из замороженного состояния. Спорообразующие бактерии могут храниться годами в стерильной сухой почве или соответствующей среде.

2.2. Методы приготовления препаратов микроорганизмов

2.2.1. Техника взятия культуры для приготовления препарата

Пробирку с культурой держат в левой руке почти в горизонтальном положении вблизи горелки. Перед взятием культуры правой рукой вынимают ватную пробку из пробирки, зажимая ее между мизинцем и ладонью, а края пробирки обжигают на пламени горелки. Иглу держат в правой руке большим, указательным и средним пальцами. Обожженной в пламени бактериологической иглой из пробирки берут небольшое количество микробной массы.

Если культуру берут из жидкой среды, не следует сильно наклонять пробирку, чтобы не смочить ее края и пробку. Для взятия культуры лучше пользоваться петлей. После взятия культуры края пробирки и пробку обжигают в пламени и закрывают пробирку.

2.2.2. Исследование живых клеток микроорганизмов методами раздавленной и висячей капли

В обоих случаях окрашивание объекта проводят «прижизненными» красителями — *витальная окраска*. Прижизненными красителями могут служить метиленовый синий, нейтральный красный в концентрациях от 0,001 до 0,0001%.

Оба метода применяют для выявления подвижности клеток микроорганизмов, наблюдения за размножением, образованием и прорастанием спор, установления реакции микроорганизмов на химические соединения и физические факторы воздействия, изучения размеров клеток, характера их расположения, определения запасных веществ в клетке.

Препараты микроскопируют, слегка затемняя поле зрения; конденсор немного опускают, поступление света регулируют вогнутым зеркалом. Вначале пользуются малым увеличением — объектив 8×, после того как обнаруживают край капли, устанавливают объектив 40× или иммерсионный (90×). Более четкие результаты можно получить при микроскопии в темном поле или в фазовом контрасте.

В случае использования **метода раздавленной капли** на чистое предметное стекло наносят каплю водопроводной воды. В нее вносят культуру и смешивают с водой. Накрывают каплю покровным стеклом так, чтобы под ним не образовывались пузырьки воздуха. Стеклопалочкой прижимают покровное стекло к предметному 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 кедрового масла.

Метод удобен для исследования подвижности бактериальных клеток, а также просмотра крупных объектов — микроскопических грибов, дрожжей. Его применяют также при изучении запасных веществ клетки.

Для длительных наблюдений за клетками микроорганизмов применяют **метод висячей капли**. Для него требуется специальное предметное стекло с лункой посередине. На стерильное покровное стекло наносят иглой негустую суспензию микроорганизмов, выращенных в жидкой питательной среде или подготовленных для данной цели. При выращивании на плотной среде микроорганизмы предварительно разводят в физио-

логическом растворе (0,5% NaCl). Покровное стекло переворачивают и помещают на стерильное предметное стекло с лункой так, чтобы капля свободно свисала в лунку. Для герметичности края лунки смазывают вазелином.

2.2.3. Фиксированные препараты микроорганизмов

Вводные пояснения. В микробиологии часто готовят фиксированные препараты. Их рассматривают под микроскопом в окрашенном виде. Под *фиксацией* подразумевается такая обработка живого объекта, которая дает возможность быстро прервать течение жизненных процессов в объекте, сохранив его тонкую структуру. В результате фиксации клетки прочно прикрепляются к стеклу и лучше прокрашиваются. Фиксация необходима в случае работы с патогенными микроорганизмами (в целях безопасности).

Приготовление мазка. На чистое обезжиренное предметное стекло наносят каплю водопроводной воды. Для обезжиривания стекол используют смесь этилового спирта и серного эфира в соотношении 1 : 1. Эти операции проводят вдали от горелок. Прокаленной бактериологической иглой из пробирки с культурой берут небольшое количество микробной массы и вносят в каплю воды. Каплю тщательно размазывают петлей по стеклу на площади около 4 см².

В случае, если суспензия густая, ее сначала разводят водой. Для этого прокаленной петлей берут немного суспензии и переносят в каплю воды на другое предметное стекло. Суспензию нормальной густоты размазывают тонким слоем по стеклу, затем мазок сушат на воздухе при комнатной температуре или при слабом нагревании, держа препарат высоко над пламенем горелки. Сильное нагревание препарата при сушке не рекомендуется для избежания коагуляции белков, искажающей структуру и форму клеток. Высушенный препарат фиксируют.

Фиксация мазка. Ее проводят *над пламенем горелки* при исследовании формы клеток или *при помощи химических соединений* для изучения внутренней структуры клеток. В первом случае препарат три-четыре раза медленно проводят нижней стороной над пламенем горелки. Во втором случае

используют хромовые соединения, формалин, осмиевую кислоту, ацетон.

Один из распространенных приемов фиксации — обработка препарата 96%-ным спиртом или смесью равных объемов этилового спирта и эфира (жидкость Никифорова). Для этого препараты погружают на 10—30 мин в фиксирующую жидкость.

Окрашивание препарата. При окрашивании мазка препарат помещают на препаратодержатель. На мазок наносят несколько капель красителя. В зависимости от вида красителя и цели исследования продолжительность окрашивания варьирует от 1 до 5 мин, в отдельных случаях занимая до 30 мин и более. По окончании окрашивания препарат промывают водой, фильтровальной бумагой удаляют воду, подсушивают на воздухе и микроскопируют.

Существуют простые и дифференцированные методы окраски.

При **простой** окраске используют какой-либо один краситель, например метиленовый синий, фуксин, генциан фиолетовый в щелочных или карболовых растворах. При этом прокрашивается вся клетка.

При **дифференцированной** окраске отдельные структуры клетки окрашиваются разными красителями. Таковы методы окраски по Граму, окраски спор.

Для окрашивания микроорганизмов применяют кислые и основные красители. Первые вступают в реакцию с веществами основной природы, вторые — кислотной природы. Поскольку в белках есть и основные (NH_2^-) и кислотные (COOH^-) радикалы, клеточные структуры хорошо окрашиваются и теми и другими красителями.

Из **основных красителей** наиболее часто в микробиологии применяют: *красные* — нейтральный красный, сафранин, фуксин, гематоксилин; *синие* — виктория, метиленовый синий; *фиолетовые* — генциан фиолетовый, кристаллический фиолетовый, метиленовый фиолетовый; *зеленые* — янус зеленый, метиленовый зеленый, малахитовый зеленый; *коричневые* — везувин, хризоидин; *черные* — индулин.

Кислые красители могут быть следующие: *красные* и *розовые* — кислый фуксин, эритрозин; *черные* — нигрозин; *желтые* — конго, пикриновая кислота, флуоресцин.

Основные красители интенсивнее окрашивают объект в более щелочной среде, кислые — в более кислой. Чтобы различить растворы кислых или основных красителей, в них погружают полоски фильтровальной бумаги. Они несут отрицательный электрический заряд. В случае основного окрашивающего раствора его катионы, обуславливающие окрашивающую способность, фиксируются отрицательным зарядом бумаги, и по ней вследствие капиллярности будет распространяться только вода (в виде бесцветной полосы). Если раствор содержит кислый краситель, его анионы будут подниматься по бумаге и окрасят ее.

Окрашивание живых клеток микроорганизмов (витальная окраска) — очень трудоемкий процесс и поэтому используется в микробиологии редко. Микробные клетки фиксируют не только в целях безопасности (если культуры патогенны) или закрепления их на стекле, но и для того, чтобы они могли более интенсивно поглотить краситель. Предполагают, что при фиксации увеличивается число свободных амино- и карбоксильных групп, в результате повышается сродство клетки к красителю.

Красители можно разделить на позитивные и негативные.

Позитивные красители окрашивают непосредственно клетки микроорганизмов и другие объекты. Из красителей, применяемых в микробиологии, большинство относится к позитивным. Они окрашивают клетки при комнатной температуре в течение 30—60 с.

Негативные красители окрашивают пространство, окружающее клетки микроорганизмов. В результате клетки выглядят силуэтами на окрашенном фоне.

Некоторые микроорганизмы (например, спирохеты) и отдельные структуры (внеклеточная слизь), плохо выявляемые с помощью позитивных красителей, хорошо прокрашиваются негативными красителями. Споры без соответствующей обработки не прокрашиваются, и поэтому при окрашивании клеток бацилл позитивными красителями они имеют вид преломляющих свет включений в вегетативных клетках.

Материалы и оборудование

Культуры микроорганизмов, пробирки, колбы, чашки Петри, бактериологические иглы, петли, шпатели, штативы, предметные ^{крышки} кровные стекла, красители.

3.1. Форма клеток

3.1.1. Бактерии

Под общим понятием «бактерии» описано свыше 1600 видов микроорганизмов-прокариот, не имеющих настоящего сложноорганизованного ядра. Большинство представителей бактерий — одноклеточные организмы, различающиеся размерами и физиологическими свойствами. По форме все бактерии можно разделить на шаровидные (или кокки), палочковидные, извитые и нитчатые. Из почвы выделены также бактерии, имеющие довольно своеобразную форму.

С основными формами бактерий можно познакомиться на примере следующих представителей (рис. 4).

■ **Шаровидные бактерии** — кокки (от греч. *kokkos* — зерно, шарик). Они делятся на следующие группы.

1. **Микрококки** (от лат. *micro* — маленький). В природе встречаются в виде одиночных шаровидных клеток. Примером могут служить клетки *Micrococcus agilis* (от лат. *agilis* — подвижный).

2. **Диплококки** (от греч. *diploos* — двойной) — шаровидные бактерии, соединенные по двое. К ним относится *Azotobacter chroococcum*. Родовое название этих бактерий отражает их способность фиксировать азот атмосферы, видовое — продуцировать коричневый пигмент (от лат. *chroo* — коричневеющий).

3. **Стрептококки** (от греч. *streptos* — цепь) — шаровидные бактерии, образующие в результате деления клеток в одной плоскости разнообразной длины цепочки. К роду стрептококков относятся в основном патогенные бактерии. Но стрептококковую форму имеют многие молочнокислые бактерии рода лактококкус. Поэтому с этой формой бактерий знакомятся при изучении молочнокислого брожения на примере *Lactococcus lactis*. Родовое и видовое названия этих бактерий, образующих короткие цепочки, отражают их причастность к молочнокислому брожению (от лат. *lactis* — молочный).

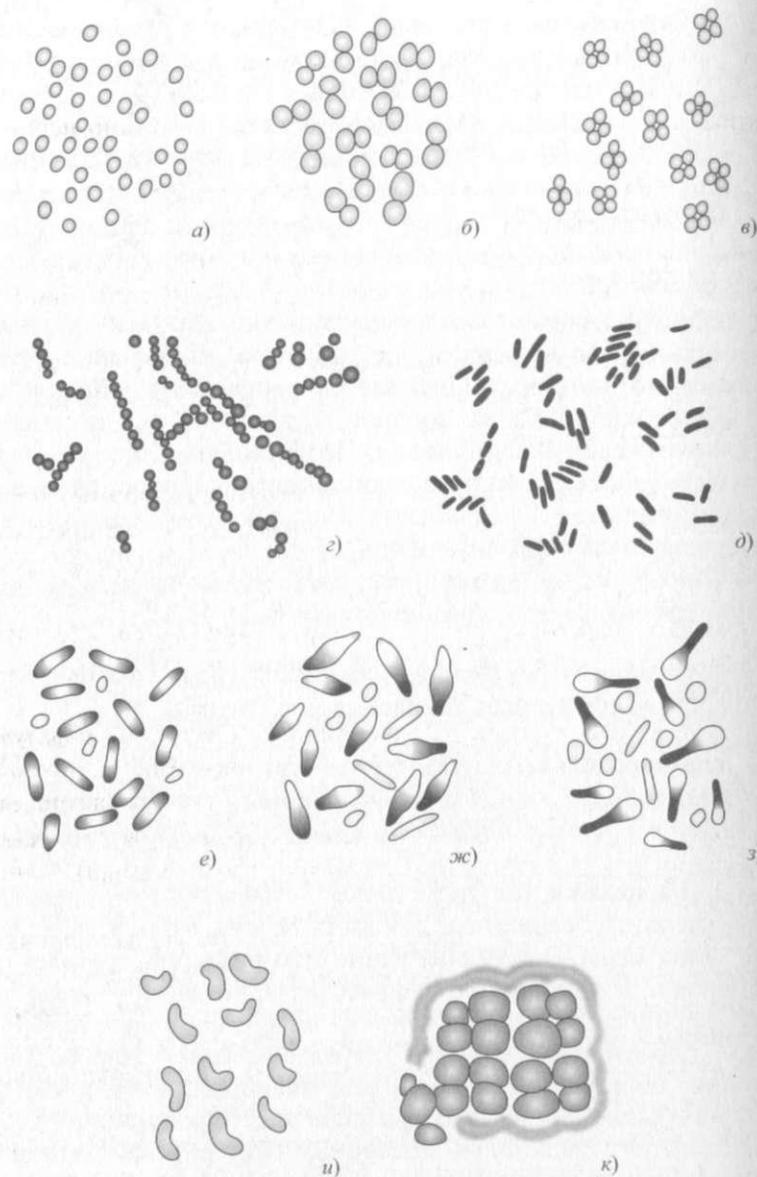


Рис. 4. Форма бактерий: шаровидная: а — микрококки, б — диплококки, в — тетракокки, сарцины, г — стрептококки; палочковидная: д — не образующие спор, е, ж, з — спорообразующие: е — бациллярный, ж — клостридиальный, з — плектридиальный типы спорообразования; извитая: и — вибрионы, к — сарцина (ув. $\times 12\ 000$)

4. **Сарцины** (от лат. *sarceo* — соединяю) — шаровидные бактерии, группирующиеся по 8 клеток. Располагаются в виде куба, с каждой стороны которого по 4 клетки. Такая форма возникает в результате деления клетки в трех взаимно перпендикулярных плоскостях. Некоторые виды сарцин формируют большие сарциноподобные кубообразные пакеты, в которых с каждой стороны находится уже не по 4 клетки (субъединицы сарцины), а по 4 сарцины. Удобна для просмотра *Sarcina flava* (сарцина желтая) — наиболее распространенный представитель микрофлоры воздуха.

Все шаровидные формы бактерий, за исключением *Lactococcus lactis*, просматривают на фиксированных и окрашенных фуксином препаратах.

Палочковидные бактерии. К ним относят формы, образующие споры (роды *Bacillus*, *Clostridium* и др.) и не образующие их (роды *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Lactobacillus* и др.).

Цитоплазма клеток *Pseudomonas stutzeri* прокрашивается равномерно, поскольку это неспорообразующая палочка, и под микроскопом клетки выглядят как тонкие, четко очерченные, равномерно окрашенные палочки.

С представителями палочковидных бактерий, **образующих споры**, можно познакомиться на примере *Bacillus mycoides* или *Bacillus mesentericus*. В названии первого вида отражена его способность развиваться на питательных средах в виде ложногрибовидного налета (от лат. *mycoides* — грибовидный), напоминающего мицелий грибов.

Поскольку *Bacillus mycoides* — спорообразующая палочка, цитоплазма клетки, приступившей к спорообразованию, прокрашивается красителем, а спорогенная зона — нет. Поэтому под микроскопом бацилла выглядит неравномерно окрашенной. Спорогенная зона, как более плотная и непрокрашенная, иначе преломляет свет, чем цитоплазма клетки. Клетки *Bacillus mycoides* относятся к стрептобациллам, так как обычно располагаются цепочками. Для просмотра лучше брать двух-трехсуточную культуру (в более позднем возрасте клетки переходят в стадию спорообразования). *Bacillus mesentericus* (картофельная палочка) также относится к стрептобациллам.

Палочковидные бактерии просматривают на фиксированных и окрашенных фуксином препаратах.

■ **Нитчатые формы.** Представляют собой цепочки цилиндрических клеток, часто окруженные общим *влагалищем*, или *чехлом*. Нитчатые бактерии распространены в илах, почве и водоемах, особенно с высоким содержанием железа. В водоемах эти бактерии часто образуют охристые осадки.

Для знакомства с нитчатыми бактериями рекомендуется брать пробу воды с охристыми отложениями из естественных водоемов. Препарат готовят в раздавленной капле и просматривают с иммерсионной системой. Наиболее часто на нем встречаются железобактерии рода *Leptothrix*, окисляющие закисные формы железа в окисные. Гидрат окиси железа откладывается во влагалищах, отчего они имеют желтовато-бурую (охристую) окраску. Размножается *Leptothrix* делением концевой (молодой) клетки, обращенной внутрь влагалища. При этом старые клетки оттесняются (выталкиваются) молодыми; нить и влагалище в результате размножения и роста клеток удлиняются. Нередко старые клетки отчлениваются от общей нити.

На препарате часто обнаруживаются остатки ожелезненных чехлов (в виде тонких трубок) и другие ожелезненные структуры.

Для выявления вегетативных клеток железобактерий пробу берут непосредственно из охристых осадков, препарат фиксируют 96%-ным спиртом, обрабатывают 1%-ным раствором HCl (для обесцвечивания влагалищ) и окрашивают в течение суток эритрозинном. Влагалища клеток на таком препарате бесцветны, а вегетативные клетки и гонидии красные. *Гонидии* — образования овальной или округлой формы, в некоторых случаях имеющие жгутики. Гонидии формируются у тех нитчатых бактерий, которым свойственна дифференциация нити.

■ **Извитые формы.** Среди бактерий данной группы выделяют следующие формы.

1. **Вибрионы** (от лат. *vibrāre* — извиваться, дрожать) — слегка изогнутые клетки: изгиб их меньше половины окружности.

2. **Спириллы** (от лат. *spiro* — штопор). В отличие от вибрионов их клетки более длинные, толстые и извитые: извитость или равна, или больше половины окружности. Спириллы могут иметь один завиток в виде русской буквы С, два завитка в виде латинской буквы S или несколько — в виде спирали.

3. **Спирохеты** — длинные и тонкие клетки с большим количеством мелких, но крутых завитков; длина клеток превышает их толщину в 5—200 раз.

Вибрионы и спириллы удобно просматривать на фиксированном и окрашенном фуксином препарате, приготовленном из навозной жижи, предварительно инкубированной в течение нескольких суток в термостате. На таком препарате много клеток разных видов микроорганизмов, среди них часто встречаются извитые формы.

Для ознакомления со спирохетами следует приготовить фиксированный крашенный препарат зубного налета. Особенно удачны препараты соскоба из кариесного (гнилого) зуба. Зубные спирохеты чрезвычайно тонкие, почти волосовидные, короткие (всего 2—3 завитка).

■ **Миксобактерии, или скользящие бактерии.** Это группа бактерий, стоящих на более высокой ступени эволюционного развития, чем описанные выше. У отдельных представителей миксобактерий (*Sorangium*, *Polyangium*) даже в световой микроскоп четко видно дифференцированное ядро. Вегетативные клетки имеют палочковидную форму с заостренными или округлыми концами. По мере старения они укорачиваются и переходят в миксоспоры, соединяющиеся впоследствии слизью и образующие первичные и вторичные цисты. Из последних в дальнейшем формируются плодовые тела.

Для наблюдений за формой миксобактерий берут колонии, развившиеся вокруг комочков почвы на гелевых пластинах, на которых единственным источником углерода служит целлюлоза (см. 7.2.1).

3.1.2. Актиномицеты

Актиномицеты (от греч. *aktis* — луч, *mykēs* — гриб) — лучистые грибы (рис. 5, а). Эта группа микроорганизмов занимает промежуточное положение между бактериями и грибами, поэтому ее представителей называют грибобактериями. Они одноклеточные, как бактерии, но образуют мицелий, как грибы; диаметр нитей у них очень мал, как у бактерий (не более 0,5—0,8 мкм), но гифы мицелия длинные и ветвистые, как у грибов. У актиномицетов длина ветвящихся нитей достигает нескольких миллиметров, мицелий грибов в длину — нескольких сантиметров. С грибами актиномицетов объединяет также способность размножаться спорами.

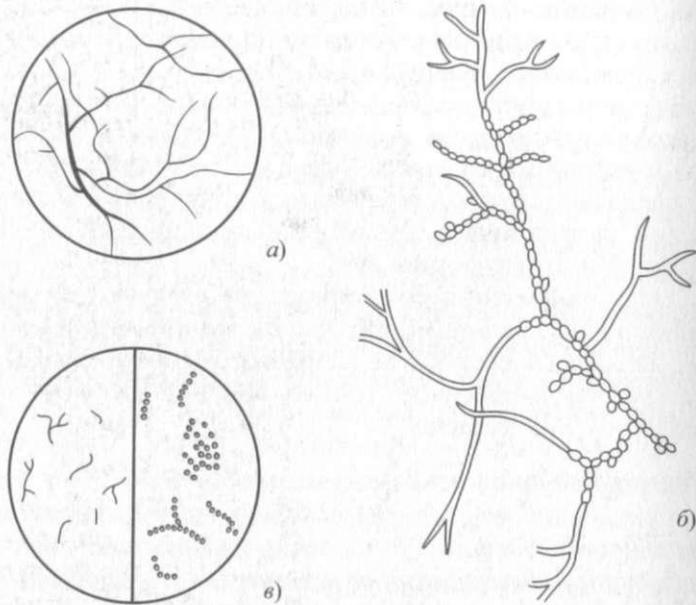


Рис. 5. Актиномицеты (а); нокардии (б); микобактерии (в)

На питательных средах актиномицеты образуют пушистые, бархатистые, мучнистые, преимущественно плотные кожистые колонии, срстающиеся с субстратом, иногда имеющие характерный землистый запах. Мицелий актиномицетов на питательных средах дифференцирован: одна часть его погружена в субстрат (*субстратный мицелий*), другая находится над субстратом (*воздушный мицелий*).

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

Чтобы выявить характерные морфологические признаки колоний актиномицета, сначала следует рассмотреть их при малом увеличении непосредственно на питательной среде на чашках Петри или по краю колонии в пробирке. При этом можно видеть, что гифы мицелия частично внедряются в субстрат, частично стелются по поверхности и приподнимаются над ней. На

концах нитей воздушного мицелия хорошо просматриваются спороносцы со спорами. Спороносцы по строению бывают прямыми, волнистыми, спиральными и мутовчатыми.

Затем готовят фиксированный, окрашенный фуксином, препарат. Для этого на предметное стекло наносят кусочек колонии актиномицета вместе со средой, чтобы захватить не только воздушный, но и субстратный мицелий. Вторым предметным стеклом плотно прижимают этот кусочек к стеклу, раздавливают и размазывают по стеклу. Далее препарат сушат, фиксируют, красят. На фиксированном окрашенном препарате дифференциации мицелия не видно, как правило, не видны и споры, однако четко просматриваются мицелиальные одноклеточные нити.

Много общего с актиномицетами имеют нокардии, или проактиномицеты.

3.1.3. Нокардии

Это наименее дифференцированные формы актиномицетов. Воздушный мицелий у них отсутствует или развит слабо. На питательных средах развиваются колонии тестообразной (мягкой) консистенции с характерным мицелиальным ободком. Окраска их так же разнообразна, как и у нокардиеформных актиномицетов. В молодом возрасте проактиномицеты образуют мицелий, который вскоре начинает *септироваться* (в нитях образуются перегородки) и расчленяться на палочковидные фрагменты, в дальнейшем переходящие в укороченные палочки, но чаще — в кокки.

Для знакомства с проактиномицетами можно воспользоваться чистой культурой *Nocardia rubra*, образующей красные (от лат. *ruber* — красный) колонии (рис. 5, б).

3.1.4. Микобактерии

Это палочковидные, иногда ветвящиеся, образующие подобие мицелия бактерии (рис. 5, в). Настоящего мицелия микобактерии 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.

3.1.5. Грибы

Объектами микробиологии служат многие виды микроскопических грибов. С некоторыми их представителями знакомятся на практических занятиях.

Грибов относят к эукариотам. Тело гриба состоит из мицелия, или *грибницы*, — сплетения тонких ветвящихся нитей — *гиф*.

■ **Зигомицеты.** Низшие грибы, имеют хорошо развитый ветвистый одноклеточный мицелий. Размножаются как половым путем, так и бесполом, т. е. при помощи спор.

Представитель класса — мукор (*Mucor mucedo*) развивается в виде войлочного белого или серого налета на продуктах растительного происхождения и навозе травоядных животных.

Мицелий **муکورовых грибов** пронизывает субстрат и частично стелется по его поверхности. Вверх от грибницы отходят особые воздушные гифы — *спорангиеносцы*, вздувающиеся на концах. Вздутия представляют собой *спорангии*, в дальнейшем они отделяются от спорангиеносцев перегородкой. В спорангиях бесполом путем образуются многочисленные *спорангиоспоры* — *эндоспоры* (от греч. *endon* — внутри).

Перегородка, отделяющая спорангий от спорангиеносца, расположена куполообразно, поэтому верхняя часть спорангиеносца оказывается внутри спорангия. Этот участок спорангиеносца называется *колонкой* и у разных видов муکورовых грибов имеет различную форму (грушевидную, шаровидную, цилиндрическую).

Для просмотра муکورовых грибов следует осторожно взять препаровальной иглой небольшое количество мицелия и другой препаровальной иглой снять его на сухое предметное стекло. Препарат сначала рассматривают без покровного стекла при малом увеличении микроскопа. Видны спорангиеносцы и круглые темные шарики на их концах — спорангии. Обычно они покрыты тонкими шипами из кристаллов оксалата кальция. Затем на поверхность препарата наносят каплю воды, накрывают его покровным стеклом. Оболочка спорангия при этом разрушается, и споры выпадают. Препарат рассматривают последовательно при малом и большом увеличениях (без иммерсии).

Представители рода *Mucor* (рис. 6, а) могут быть выделены из почвы при посеве пылевидных ее частиц на поверхность

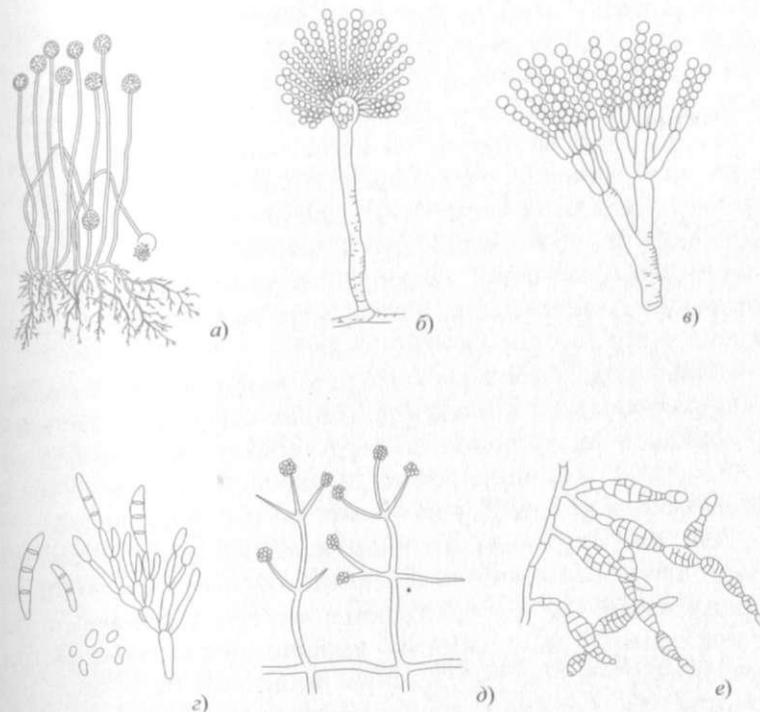


Рис. 6. Грибы микроскопические:

а — *Mucor*, б — *Aspergillus*; в — *Penicillium*; г — *Fusarium*, конидиеносец с конидиями: 1 — макроконидии, 2 — микроконидии; д — *Trichoderma* (конидиеносцы с головками конидий); е — *Alternaria*, конидиеносцы с цепочками конидий

сусло-агара в чашках Петри или из свежего конского навоза, помещенного на 3—4 дня под стеклянный колпак на тарелку с влажной фильтровальной бумагой или сырым песком.

■ **Аскомицеты, или сумчатые грибы.** Высшие грибы с многоклеточным или членистым мицелием, образующие споры в сумках — *асках*. Они включают представителей **эуаскомицетов** (истинных аскомицетов), у которых сумки со спорами формируются в результате полового процесса на поверхности или внутри плодовых тел, образуемых сплетением гиф мицелия (возможно бесполое размножение экзогенно возникающими спорами — *конидиями*), и **гемиаскомицетов**, у которых плодовые тела отсутствуют. К гемиаскомицетам относят большинство дрожжей, рассматриваемых отдельно.

Эуаскомицеты включают два важнейших рода почвенных грибов — *Penicillium* и *Aspergillus*, которых нередко называют также **плесневыми грибами**. К группе плесневых относят и некоторых представителей зигомикетов и несовершенных грибов.

Пенициллы и аспергиллы имеют хорошо развитый многоклеточный мицелий. Размножаются преимущественно конидиальным спороношением. Наблюдаются в виде налета голубого, зеленого, сизого, реже других цветов на продуктах растительного происхождения (варенье, томатной пасте, лимонах и апельсинах), отсыревших изделиях из кожи, обоях. Распространены в верхних горизонтах почвы.

Грибы рода *Penicillium* (рис. 6, в) называют **кистевиками**, так как они образуют конидии на концах мутовчаторазветвленных конидиеносцев, напоминающих кисть руки. Иногда отдельный пучок конидиеносцев, выходящих из одной точки и отчленяющих конидии, напоминает рисовальные кисти.

Для рассмотрения строения конидиеносцев *Penicillium glaucum* препаровальной иглой вырезают кусочек мицелия (приблизительно 0,5 мм²) на границе между его зеленым и белым участками. (Гриб к занятию выращивают в чашке Петри; старые грибы с полностью зеленым мицелием не годятся для просмотра.) Осторожно с помощью двух препаровальных игл кусочек мицелия снимают со среды и помещают в каплю воды на предметное стекло. Сверху на мицелий кладут покровное стекло. Поскольку мицелиальная пленка гриба довольно толстая, может получиться так, что под покровным стеклом вода не будет целиком окружать исследуемый мицелий. В этом случае надо из капельницы добавлять воду под покровное стекло до тех пор, пока кусочек мицелия не будет со всех сторон окружен водой. Затем слегка надавливают на покровное стекло в центре стеклянной палочкой (или препаровальной иглой). Избыток воды можно удалить фильтровальной бумагой.

Препарат сначала просматривают при малом увеличении, уделяя основное внимание его краям, так как на них обычно хорошо видны кисти конидиеносцев. Когда подходящий участок найден, переходят с объектива 8× на объектив 40× и детально рассматривают кисточки. Во время просмотра при малом увеличении конденсор опускают, при переводе на объектив 40× снова регулируют освещенность поднятием конденсора.

Aspergillus, или **лечная плесень** (рис. 6, б), имеет обычно одноклеточные конидиеносцы шаровидно, булавовидно или

грушевидно вздутые. На них располагаются параллельно друг другу короткие кеглеобразные стеригмы, каждая из которых отшнуровывает радиально цепочки конидий. Некоторые виды аспергиллов имеют два ряда стеригм. Вся головка конидиеносца с радиально расходящимися цепочками конидий напоминает наконечник лейки со струйками воды.

Для ознакомления со строением конидиеносцев аспергилла на примере *Aspergillus niger* препаровальной иглой берут небольшое количество мицелия на границе между черным и коричнево-бурым участками колонии и вносят в каплю воды на предметное стекло. Далее поступают так же, как и при просмотре пеницилла. В начальной стадии спорообразования *Aspergillus* похож на *Mucor* (бесцветные головки), затем с возрастом головки покрываются стеригмами, на которых развиваются споры. В результате получают так называемые **кудрявые головки**. От мукора аспергилл всегда можно отличить наличием таких головок. У мукора головки гладкие — «лысые», так как споры его эндогенного происхождения (внутренние), а у аспергилла и пеницилла — экзогенные споры (внешние).

Дейтеромицеты, или несовершенные грибы. Имеют многоклеточный мицелий, но у них нет полового процесса и совершенной стадии спороношения. Размножаются бесполом путем при помощи конидий или вегетативно участками гифов. В природе широко распространены представители родов *Fusarium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, которых формально относят к дейтеромицетам. Встречаются они на растительных остатках, плодах, семенах и в почве.

Среди грибов рода *Fusarium* (рис. 6, г) есть сапротрофы, живущие в почве и на растительных остатках, и паразиты, вызывающие заболевания многих видов растений (увядание, гнили корней, стеблей, плодов, полегание сеянцев древесных и кустарниковых пород, болезни семян, различные пигментации органов растений).

Колонии отдельных видов фузариума на питательных средах (на сусло-агаре) разнообразны по структуре: они могут быть рыхлыми, ватообразными, пушистыми, паутинистыми или плотными пленчатыми. Колонии бывают белые или различных тонов розового или желтого цветов. Нередко питательная среда также окрашивается в разные цвета и оттенки от розового до коричневого.

Фузариумы характеризуются большим разнообразием ферментов, благодаря которым могут использовать в качестве источников питания различные вещества, некоторые виды даже способны усваивать клетчатку.

Приготовив в капле воды препарат обычным способом и рассматривая его под микроскопом, можно увидеть более или менее разветвленные конидиеносцы и очень характерные для фузариума конидии, так называемые *макроконидии*. Они заострены на концах, продолговатые, согнутые, нередко серповидные, с несколькими перегородками (напоминают бананы). У многих видов фузариума образуются, кроме того, овальные мелкие бесцветные, чаще одноклеточные, *микрoконидии*.

Грибы рода *Trichoderma* нередко можно обнаружить на коре, древесине, засохших листьях и стеблях, а также на семенах различных трав, кустарников и деревьев; их легко выделить из почвы на подкисленном сусло-агаре. Через 2—3 дня инкубации при 23—25 °С на поверхности среды появляется сначала белый, затем с оттенками зеленовато-желтого цвета рыхлоклочковатый или войлочный налет, образованный мицелием и скоплением конидиеносцев. С возрастом он становится темно-зеленым. При большом увеличении микроскопа видны прямостоячие, многократно супротивно разветвленные конидиеносцы, приподнимающиеся над мицелием. На вершине конидиеносцев расположены шаровидные головки, каждая из которых состоит из 10—20 одноклеточных бесцветных конидий. Представители этого рода энергично разрушают белковые соединения и разнообразные углеводы. Обладая антибиотическими свойствами в отношении других грибов, в том числе паразитических, триходерма выполняет оздоравливающую функцию в почве.

Разные виды рода *Alternaria* можно выделить с листьев пораженных этим грибом растений картофеля или томата, с семян капусты и других растений, из почвы. Они характеризуются своеобразным (обратнобулавовидным) строением многоклеточных грушевидных конидий, соединенных цепочками. У каждой — 3—9 поперечных и одна или несколько продольных перегородок. Конидиеносцы, являясь боковыми ответвлениями мицелия, имеют вид простых или слаборазветвленных одноклеточных, иногда многоклеточных веточек. Колонии на сусло-агаре сначала светлые, пушистые, затем зеленовато-серые или оливково-черные, бархатистые или ворсистые, неред-

ко с ясно выраженной концентрической зональностью; иногда колонии с самого начала сажисто-черные, уплотненные, во многих случаях темный пигмент диффундирует в среду.

Дрожжи. По современным представлениям, дрожжи — это сборная группа одноклеточных микроскопических организмов, относящихся к разным классам грибов, преимущественно — к классу аскомицетов.

Диаметр клеток дрожжей колеблется от 8 до 15 мкм. Форма их разнообразна: эллипсоидная, грушевидная, округлая, цилиндрическая. Размножаются вегетативным и половым путем. Вегетативные способы размножения — почкование и деление; половой способ размножения связан с образованием спор. К *почкующимся* дрожжам (рис. 7, а) относятся представители «культурных» дрожжей рода *Saccharomyces* (сахаромицеты), к *делящимся* — виды рода *Schizosaccharomyces* (шизосахаромицеты). При половом процессе слияние вегетативных клеток ведет к образованию сумок со спорами или сначала могут сформироваться споры, которые в последующем копулируют друг с другом. В каждой сумке образуется от 2 до 8, иногда 12 спор. Среди дрожжей есть аспорогенные, ложные дрожжи, не способные к половому процессу и спорообразованию. Они относятся к классу несовершенных грибов.

С делящимися дрожжами (рис. 7, б) можно познакомиться на примере *Schizosaccharomyces pombe* (*schizo* — рваться, делиться, *saccharomyces* — сахарный гриб, *pombe* — название африканского напитка, из которого этот организм выделен). Дрожжам размножение делением несвойственно, поэтому данный род дрожжей является отклонением от нормы. Шизосахаромицеты размножаются и половым путем, связанным со спорообразованием, что характерно для сумчатых грибов. *Schizosaccharomyces pombe* рассматривают на фиксированных, окрашенных фуксином препаратах. Это цилиндрической формы крупные клетки с округлыми концами. Размножение делением свойственно также дрожжам рода *Endomyces*. Из почкующихся дрожжей наиболее «одомашнены» дрожжи пекарские — *Saccharomyces cerevisiae*. Форма их разнообразна. Размножаются они почкованием (вегетативный

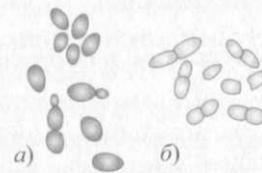


Рис. 7. Дрожжи:
а — почкующиеся;
б — делящиеся

способ размножения) 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 для такого размножения благоприятны (достаточное количество сахара, соответствующая температура, аэрация), процесс идет очень быстро. У некоторых представителей рода клетки после почкования не успевают разъединиться и возникает *псевдомицелий* (ложный мицелий).

Для лабораторных занятий могут быть использованы пекарские дрожжи. Небольшой кусочек дрожжевой массы за несколько часов до занятий помещают в теплую подсахаренную воду и ставят в теплое место. Образуется беловатая мутная жидкость. Каплю этой жидкости наносят на предметное стекло, накрывают покровным стеклом, сверху наносят каплю кедрового масла и просматривают препарат с иммерсионной системой. Клетки хорошо видны и при меньших увеличениях.

В пекарских дрожжах обычно присутствуют две *расы*: одна представлена округло-эллипсоидными клетками, быстро разъединяющимися при почковании; другая — удлиненно-цилиндрическими, образующими при почковании ветвистые кустики (псевдомицелий). На многих клетках видны почки. В мелкозернистом содержимом живых дрожжей хорошо заметны крупные прозрачные вакуоли, занимающие иногда центральное положение.

С представителями аспорогенных дрожжей, размножающихся только почкованием и не образующих спор, можно познакомиться на примере *Candida kefiri*. Их клетки мелкие, диаметром около 5 мкм.

Размножение у дрожжеподобных организмов может происходить также в результате распада гиф на отдельные клетки — *оидии*, или *артроспоры*, как у *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*).

Материалы и оборудование

Коллекцию культур следует пересевать каждые 2—3 месяца на свежие питательные среды: бактерии и актиномицеты — на мясо-пептонный агар, дрожжевые и плесневые грибы — на сусло-агар. За 2—3 дня до занятий культуры пересевают в пробирки (бактерии и актиномицеты) или чашки Петри (грибы) из расчета по две пробирки каждой культуры и одну-две чашки Петри на группу студентов из 10—15 человек.

Для занятий необходимы микроскопы и все принадлежности к ним; предметные и покровные стекла; бактериологические петли (иглы); препаровальные иглы; свежий 5%-ный раствор фуксина.

3.2. Цитохимические методы исследования микроорганизмов

Микробная клетка — сложная живая система, характеризующаяся высокой степенью упорядоченности составляющих ее структур. Каждая такая структура имеет определенную жизненную функцию, а взаимодействие отдельных структур между собой обеспечивает существование клетки, ее целостность.

Для изучения внутреннего строения клеток применяют специальные способы окраски — *цитохимические* методы исследования. Многие из этих методов преследуют диагностические цели. По форме клетки микроорганизмов не слишком разнообразны, и в ряде случаев, чтобы установить их принадлежность к тому или иному роду и виду, необходимо провести специальное окрашивание клетки или вещества, накапливающегося в ней.

3.2.1. Окраска клеток микроорганизмов по Граму

■ **Вводные пояснения.** Этот метод дифференциации микробных клеток основан на различии в химическом составе клеточных оболочек. Сущность его в том, что в клетках одних видов микроорганизмов образуется нерастворимое в спирте соединение иода с основным красителем, а у других видов это соединение появляется временно и после обработки спиртом растворяется. Микроорганизмов первой группы называют *грамположительными*, второй — *грамотрицательными*.

■ **Техника окраски по Граму.** На хорошо обезжиренное предметное стекло наносят три тонких мазка разных культур микроорганизмов (два из них — контрольные, с заведомо известным отношением к окраске по Граму). Мазки высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки и окрашивают в течение 1 мин феноловым раствором генциана фиолетового (или кристаллического фиолетового), держа стекло в слегка наклонном положении. Затем краситель сливают и, не промывая препарат водой, наносят на него на 1 мин

раствор Люголя (до полного почернения мазка). Стекло и в этом случае лучше держать в наклонном положении. Препарат, не промывая водой, обрабатывают, непрерывно покачивая, 96%-ным спиртом в течение 15—20 с. Очень важно четко придерживать времени обесцвечивания, так как при превышении указанного срока обесцвечиваются и грамположительные клетки.

Промыв водой, препарат окрашивают фуксином Пфейфера в течение 1 мин. После этой обработки грамположительные микроорганизмы приобретают темно-фиолетовый цвет, а грамотрицательные окрашиваются лишь в цвет дополнительной окраски (фуксина).

Результаты окраски по Граму зависят от возраста культуры: в старых культурах мертвые клетки всегда окрашиваются грамотрицательно. Поэтому лучше использовать молодые односточные культуры. Некоторые бактерии (протей) окрашиваются *грамвариабельно*, т. е. часть клеток — как грамположительные, а часть — как грамотрицательные.

Хорошими объектами для окраски клеток микроорганизмов по Граму служат дрожжи, *Bacillus mesentericus* или *Bacillus subtilis* (грамположительные) и кишечная палочка *Escherichia coli* (граммотрицательная).

■ **Метод Грама в модификации Синева.** На фиксированный мазок накладывают полоску фильтровальной бумаги шириной 3 см, предварительно пропитанную 1%-ным спиртовым раствором кристаллического фиолетового и высушенную. На бумагу наносят 2—3 капли воды и оставляют ее на препарате 2 мин. Далее окраску проводят по вышеописанной методике. Модификацию Синева широко применяют на практике.

■ **Метод Грама в модификации Калины.** На предметное стекло наносят небольшую каплю дистиллированной воды, помещают в нее минимальное количество клеток микроорганизмов и петлей добавляют 0,5%-ный спиртовой раствор кристаллического фиолетового. Суспензию равномерно распределяют на площади 1 см², подсушивают и фиксируют однократным проведением над пламенем горелки. После этого препарат в течение 1 мин обрабатывают реактивом, содержащим 10 мл 5%-ного раствора фуксина Пфейфера, 10 мл 10%-ного раствора иода, 10 мл ацетона и 70 мл 0,5%-ного

раствора иодита калия. Затем препарат опускают на мгновение в 96%-ный этиловый спирт и быстро высушивают фильтровальной бумагой.

Красители и реактивы для окраски по Граму. 1. *Феноловый раствор генциана фиолетового:* генциан фиолетовый — 1 г, спирт 96%-ный — 10 мл, фенол кристаллический — 2 г, вода дистиллированная — 100 мл.

В некоторых случаях применяют *спиртовой раствор генциана фиолетового:* генциан фиолетовый (или кристаллический фиолетовый) — 1 г, спирт 96%-ный (ректификат) — 100 мл, глицерин — 5 мл. Бутыль со смесью ставят в термостат на 24 ч (можно и дольше), затем фильтруют.

2. *Раствор Люголя* (иодит калия — 2 г, иод кристаллический — 1 г, вода дистиллированная — 300 мл). Вначале готовят концентрированный раствор иодита калия в 5 мл воды, в нем растворяют иод, потом добавляют воду до 300 мл.

3. *Спирт* 96%-ный.

4. *Фуксин Пфейфера* (водный раствор карболового фуксина Циля): 1 мл карболового фуксина Циля (см. 3.2.2) и 9 мл дистиллированной воды.

3.2.2. Выявление кислотоустойчивости бактерий методом Циля—Нильсена

Кислотоустойчивость — свойство, наиболее характерное для микобактерий и некоторых актиномицетов. Оно связано с особенностями химического состава клеточных стенок, главным образом — с наличием в них миколовых кислот. Кислотоустойчивость проявляется в том, что клетки с трудом воспринимают красители, а при окрашивании — прочно их удерживают.

До фиксации мазка бактерий на пламени препарат готовят обычным способом (см. 2.2.1). Далее на фиксированный в пламени и остывший препарат помещают полоску фильтровальной бумаги, обильно смачивают ее карболовым фуксином Циля и нагревают препарат над пламенем 5 мин. Нельзя допускать высыхания препарата: в случае необходимости следует добавить 1—2 капли воды. Нельзя также доводить краситель до кипения: как только появятся пары, препарат отводят в сторону. По окончании окрашивания и охлаждения препарата бумагу удаляют, а мазок промывают слабой струей водопроводной воды до исчезновения окраски в стоке. Затем препарат промокают фильтровальной бумагой и погружают на 3—5 с в

5%-ный раствор H_2SO_4 или 3%-ный раствор HCl . Еще раз промывают препарат водой, промокают и окрашивают в течение 3—5 мин метиленовым синим Леффлера. Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в красный цвет, неустойчивые — в синий.

Красители и реактивы для окраски кислотоустойчивых бактерий.

1. *Карболовый фуксин Циля*. фуксин основной — 1 г, карболовая кислота кристаллическая (фенол) — 5 г, спирт 96%-ный — 10 мл, глицерин — несколько капель, вода дистиллированная — 100 мл. Основной фуксин растворяют в этаноле и затем добавляют растворенный в воде фенол. Раствор тщательно перемешивают и оставляют на несколько дней. Перед использованием его фильтруют.

2. *Метиленовый синий Леффлера*. 30 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего смешивают со 100 мл 0,01%-ного раствора КОН. Насыщенный спиртовой раствор метиленового синего готовят следующим образом: 1,6 г метиленового синего растворяют в 100 мл 95%-ного этилового спирта.

3. *Серная кислота* — 5%-ный раствор или *соляная кислота* — 3%-ный раствор.

3.2.3. Окраска спор у бактерий

Вводные пояснения. Споры бактерий по сравнению с вегетативными клетками обладают высокой устойчивостью к неблагоприятным условиям внешней среды. Они представляют собой округлые, овальные или эллипсоидные образования. Если диаметр споры не превышает диаметра клетки, в которой спора образуется, клетку называют *бацилярной*, если превышает, то в зависимости от расположения споры в центре или на конце клетки эту клетку называют соответственно *кlostридиальной* или *плектридиальной*. В бацилярной клетке спора может размещаться в центре клетки — *центральное* положение, на конце — *терминальное* и ближе к одному из концов — *субтерминальное* положение.

При наблюдении за живыми спорообразующими бактериями их споры можно различить по более сильному преломлению световых лучей. Споры кислотоустойчивы, поэтому с трудом окрашиваются красителями. Объясняется это большой плотностью оболочки, низкой концентрацией в ней свободной воды и высоким содержанием липидов в спорах. В пре-

паратах, окрашенных простыми способами или по Граму, споры остаются бесцветными (*негативная окраска*).

В связи с особенностями физико-химического состава и плотной малопроницаемой оболочкой на первом этапе окраски спор применяют химические вещества, изменяющие структуру их оболочки. Однако при последующем прокрашивании споры одновременно прокрашиваются и цитоплазма клетки, поэтому под микроскопом последняя выглядит однородно окрашенной. Для того чтобы на препарате оставались прокрашенными только споры, следует такой «перекрашенный» препарат частично обесцветить, забирая краситель у цитоплазмы и оставляя его в споре. Этого достигнуть нетрудно, так как краситель, адсорбированный спорой, удерживается прочнее, чем поглощенный цитоплазмой клетки.

Таким образом, все способы окраски спор основаны на **едином принципе**: сначала споры протравливают различными веществами: хромовой, соляной, серной, уксусной кислотами, аммиаком, едким натром или перекисью водорода, затем окрашивают клетку со спорой при нагревании и, наконец, обесцвечивают цитоплазму и дополнительно окрашивают ее контрастным красителем.

Метод Циля—Нильсена в модификации Мюллера. Мюллер, модифицировав известный метод Циля—Нильсена, применяемый обычно для выявления кислотоустойчивости бактерий (дифференциальной окраски микобактерий и некоторых близких к ним микроорганизмов), связанной с особенностями химического состава их оболочки, предложил использовать его для окраски спор бактерий.

До фиксации мазка бактерий на пламени препарат готовят обычным способом (см. 2.2.1). Далее на фиксированный в пламени и остывший препарат наносят 5%-ный раствор хромовой кислоты. Через 5—10 мин ее смывают водой. Препарат накрывают полоской фильтровальной бумаги и обильно смачивают бумагу карболовым фуксином Циля. Подогревают препарат над пламенем до появления паров (не до кипения), затем отводят его в сторону и добавляют новую порцию красителя. Эту процедуру проводят в течение 7 мин. Важно, чтобы краситель испарялся, но бумага не подсыхала. После охлаждения ее снимают, препарат промывают водой и тщательно промокают фильтровальной бумагой. В результате такой обработки клетки со спорами равномерно прокрашиваются.

Далее обесцвечивают цитоплазму клеток (но не споры), обрабатывая 1%-ным раствором соляной или серной кислот в течение 15—30 с. При приготовлении препарата спор *Bacillus mycoides* или *Bacillus mesentericus* рекомендуется обесцвечивать цитоплазму 16—18 с (размеренно считая вслух от 21 до 37—40). При превышении этого времени могут обесцветиться и споры. Затем препарат промывают водой и окрашивают метиленовым синим 2 мин.

Если все операции проделаны правильно, окраска получается контрастной и ярко-красные споры четко выделяются на голубом фоне цитоплазмы.

■ **Метод Пешкова.** На фиксированный в пламени препарат наливают метиленовый синий Леффлера, доводят его до кипения и кипятят 15—20 с, держа стекло над пламенем. Мазок промывают водой и докрашивают в течение 30 с 0,5%-ным водным раствором нейтрального красного. Еще раз промывают, подсушивают и далее исследуют препарат с масляной иммерсией объектива. Споры окрашиваются в голубой или синий цвет, цитоплазма — в розовый.

Для исследования спор удобными объектами могут служить *Bacillus mesentericus* или *Bacillus mycoides* в возрасте 4 сут.

Реактивы для окрашивания спор бактерий. 1. Карболовый фуксин Циля (см. 3.2.2).

2. Метиленовый синий Леффлера (см. 3.2.2).

3. Насыщенный водный раствор метиленового синего 2 г красителя и 100 мл дистиллированной воды.

4. Хромовая кислота, 5%-ный раствор.

5. Соляная (или серная) кислота, 1%-ный раствор.

3.2.4. Окраска капсул

Некоторые виды бактерий образуют слизистые капсулы. При обычных методах окраски они остаются бесцветными. Для выявления их применяют специальные негативные методы окраски, например **метод Бурри**. Метод заключается в следующем.

Каплю туши помещают на хорошо обезжиренное смесью спирта с эфиром предметное стекло и смешивают с каплей жидкости, содержащей бактерии. При помощи покровного стекла распределяют мазок тонким слоем по поверхности предметного стекла. После того как препарат высохнет на воздухе, его рас-

сматривают с иммерсионной системой. На дымчато-темном фоне ясно видны неокрашенные капсулы и клетки бактерий.

Для исследования капсул наиболее удобны клетки азотобактера.

Приготовление туши. Одну часть туши смешивают с девятью частями дистиллированной воды и стерилизуют при 1 атм 30 мин в пробирках, закрытых ватными пробками. Вместо стерилизации можно добавлять к туши несколько капель формалина. Подготовленную таким образом тушь выдерживают две недели, пока все взмученные частицы не осядут на дно. Для приготовления препарата осторожно берут только верхнюю часть отстоявшейся жидкости.

3.2.5. Окраска жгутиков

■ **Вводные пояснения.** Жгутики микроорганизмов — тончайшие образования (0,02—0,04 мкм), легко отрывающиеся от клетки при обработке. Это затрудняет их исследование. В основе методов окрашивания жгутиков лежит обработка их протравителями, в результате которой они увеличиваются в объеме.

■ **Подготовка материала.** Для подготовки культуры рекомендуется ежедневно несколько дней подряд делать пересевы на свежую питательную среду (в жидкую среду или в конденсационную воду свежей скошенной агаризованной среды). В день просмотра материал берут петлей и переносят в пробирку с 5—6 мл стерильной водопроводной воды, нагретой до 37 °С. Не рекомендуется размешивать бактериальную массу в воде петлей, она сама должна разойтись в ней в течение 30—60 мин.

Прежде чем приступать к работе, необходимо проверить подвижность клеток в висячей капле. В случае отсутствия подвижности пробирку оставляют в термостате на 1½—2 сут.

Для приготовления препаратов необходимы *абсолютно чистые* предметные стекла. Их кипятят в растворе бихромата калия в крепкой серной кислоте, затем дважды промывают в растворе едкого натра. После этого стекла промывают водой и хранят в банке с 96%-ным спиртом. Затем ту сторону стекла, на которую будет нанесен мазок, сильно нагревают и охлаждают.

■ **Метод Леффлера.** Суспензию 12—16-часовой культуры бактерий наносят на предметное стекло и сушат при комнатной температуре. Допустимо зафиксировать мазок, быстро проведя его через пламя. Далее препарат обрабатывают протравителем 3—5 мин, нагревая его до появления паров или в течение 15—20 мин при комнатной температуре, затем промывают сильной струей дистиллированной воды 30 с и высушивают на воздухе.

Окрашивают препарат 3—4 мин карболовым фуксином Циля или раствором, содержащим 1 часть насыщенного спиртового раствора фуксина и 10 частей воды при легком нагревании до появления пара. Затем препарат промывают водой, высушивают и исследуют под микроскопом с иммерсией. Жгутики и клетки бактерий окрашиваются в розовый цвет.

Приготовление протравителя. 12 г таннина растворяют при нагревании в 48 мл воды, добавляют 30 мл насыщенного водного раствора железного купороса (FeSO_4) и 6 мл насыщенного раствора фуксина в 96%-ном спирте. Смесь готовят за несколько дней до употребления, хранят в склянке с притертой пробкой в темном месте. Перед началом работы ее фильтруют.

■ **Метод Лейфсона.** Стеклографом на одной половине стекла по границе вычерчивают прямоугольник. На площадь прямоугольника петлей наносят суспензию бактерий. Наклонная стекло, дают возможность стечь избытку жидкости на противоположную сторону стекла. Препарат сушат при комнатной температуре на воздухе.

На мазок наносят точно 1 мл парарозанилинового красителя, следя за тем, чтобы он не растекался за нанесенные на стекло линии. Поскольку в красителе содержится танниновая кислота, предварительной фиксации не требуется. Окрашивание длится 7—15 мин (время определяют в каждом конкретном случае экспериментально). Для уточнения правильности срока окраски препарат помещают на черный фон и освещают сбоку. Как только по всему мазку выпадет осадок, избыточный краситель удаляют слабой струей дистиллированной воды, не отмывая выпавший в осадок краситель. Если клетки бактерий не окрасились в красный цвет, их докрасивают метиленовым синим.

Приготовление парарозанилина. Для этого необходимы три раствора: *первый* — 1,5%-ный NaCl в дистиллированной воде; *второй* — 3%-ный танниновой кислоты в дистиллированной

воде (раствор должен быть светло-желтым); *третий* — 0,9%-ный парарозанилинацетата, или 0,3%-ный парарозанилингидрохлорида в 96%-ном этиловом спирте. Для получения однородной смеси требуется несколько часов даже при взбалтывании. Вместо соли розанилина можно применить основной фуксин в виде 1,2%-ного раствора в 96%-ном этиловом спирте.

Для приготовления красителя смешивают равные объемы всех трех растворов, полученную смесь хранят в плотно закупоренной склянке. Краситель сохраняет свои свойства при 4°C несколько недель, а при $t = -10$ — -20°C — месяцы и даже годы.

■ **Метод серебрения жгутиков по Морозову.** Готовят три реактива. Состав *первого*: 1 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл формалина, 100 мл дистиллированной воды; состав *второго*: 5 г таннина, 1 мл жидкой карболовой кислоты (фенола), 100 мл дистиллированной воды; состав *третьего*: 5 г кристаллического нитрата серебра (AgNO_3), 100 мл дистиллированной воды.

К 80 мл раствора серебра по каплям приливают водный раствор аммиака (нашатырного спирта) до растворения образовавшегося осадка и появления легкой опалесценции. Если аммиака будет добавлено слишком много, то из оставшихся 20 мл раствора серебра следует добавить еще несколько капель до возникновения опалесценции.

Для окраски препарата полученный раствор серебра разводят дистиллированной водой в соотношении 1 : 100.

Техника окраски следующая: на 1 мин на препарат наливают первый реактив, сливают его, промывают препарат водой; наливают второй реактив, препарат подогревают на слабом пламени 1 мин до появления паров, тщательно промывают водой; 1—2 мин при нагревании обрабатывают препарат третьим реактивом до появления темно-коричневой окраски мазка, тщательно промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсией.

3.2.6. Окраска генома бактерий

О наличии генома при цитохимических исследованиях судят по качественной реакции на дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), которая входит в его состав.

■ **Метод Романовского—Гимза.** Этим методом в клетках прокариот одновременно выявляют **геном** клетки и **волютин**. Сначала препарат фиксируют 5 мин метиловым спиртом или фиксатором Карнуа. В последнем случае для удаления следов уксусной кислоты препарат промывают спиртом и тщательно высушивают на воздухе. Окрашивают препарат красителем Романовского—Гимза в течение суток, затем ополаскивают слабощелочной (рН 7,2) водой, высушивают и микроскопируют. Геном окрашивается в красно-фиолетовый цвет, цитоплазма — в слабо-розовый.

Красители. *Краситель Карнуа* содержит абсолютный спирт, хлороформ, ледяную уксусную кислоту в соотношении 6 : 3 : 1.

Краситель Романовского—Гимза. Промышленность выпускает препарат, представляющий собой смесь азура (органического красителя, полученного из метиленового синего), эозина и метиленового синего. Непосредственно перед употреблением к 10 мл дистиллированной воды, имеющей нейтральную или слабощелочную реакцию (рН 7,2), прибавляют 10 капель красителя.

■ **Реакция Фельгена.** Ее применяют для окраски ДНК. При слабом кислотном гидролизе нуклеопротеидов происходит отщепление пуриновых и пиримидиновых оснований, ведущее к высвобождению дезоксирибозы, входящей в ДНК. При гидролизе дезоксирибоза переходит в β -гидроксилевулиновый альдегид, который взаимодействует с сернистой частью бесцветной фуксинсернистой кислоты, выделяя фуксин красного цвета. В результате геном окрашивается.

Препараты бактерий обрабатывают фиксатором Карнуа 5 мин, промывают абсолютным спиртом, гидролизуют 7 мин в растворе 1 н. HCl, подогретом до 60 °С, погружают на 1—2 мин в холодный раствор 1 н. HCl и переносят в фуксинсернистую кислоту (реактив Шиффа) на 3—4 ч. Препараты последовательно промывают в трех кюветах с сернистой водой по 20 мин в каждой, затем ополаскивают дистиллированной водой, высушивают и микроскопируют. Геном окрашивается в фиолетовый цвет.

3.2.7. Окраска включений клеток микроорганизмов

Включения — это вещества, возникающие в результате метаболизма клетки.

■ **Окраска волютина (метахроматических гранул) методом Омелянского.** *Волютин* — полифосфат, запасное фосфор- и азотсодержащее вещество, производное нуклеиновой кислоты. Характерные свойства волютина — сродство к основным красителям и *метахромазия*, т. е. способность приобретать иной цвет, чем цвет окрашивающего вещества.

Метод окраски основан на плохой растворимости волютина в растворах кислот. На обезжиренное стекло наносят тонкий мазок бактерий, сушат его на воздухе, фиксируют над пламенем и окрашивают карболовым фуксином Циля. Через 0,5—1 мин промывают препарат водой, обесцвечивают 20—30 с 1%-ным раствором H₂SO₄, промывают, дополнительно 20—30 с окрашивают метиленовым синим (1 : 40), промывают, промокают, наносят масло и смотрят с иммерсионной системой. Гранулы волютина окрашены в красный цвет на фоне синей цитоплазмы.

Можно окрашивать фиксированные препараты 10—30 с метиленовым синим Леффлера или 1%-ным раствором толуидинового синего, затем промывать препарат водой, промокать фильтровальной бумагой и смотреть под микроскопом. В первом случае (при окраске метиленовым синим) гранулы имеют цвет от синего до фиолетового, во втором — они красные на фоне голубой цитоплазмы.

■ **Окраска гликогена.** *Гликоген* — углевод, животный крахмал. Встречается у эукариот и прокариот. Впервые был обнаружен французским физиологом *К. Бернаром* в печени крыс при их обильном питании углеводами. Часто гликоген накапливается в клетках дрожжей, бацилл. Для обогащения дрожжевых клеток гликогеном их выращивают на солодовой среде.

На чистое предметное стекло наносят небольшую каплю суспензии микроорганизмов и к ней добавляют такую же каплю раствора I₂ в KI (7 г I₂ и 20 г KI на 100—300 мл дистиллированной воды). Сверху помещают покровное стекло, избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Препарат просматривают с масляной иммерсией.

На препарате *Saccharomyces cerevisiae* много почкующихся клеток. В образующихся (растущих) почках гликогена практически нет, поскольку углеводы расходуются в процессе ак-

тивного метаболизма и гликоген не запасается. В материнских клетках окраска гликогена интенсивна — в зависимости от степени его накопления она варьирует от ярко-желтых оттенков до коричнево-желтых.

Включения гликогена хорошо исследовать в 1—2-суточных культурах *Saccharomyces cerevisiae* и *Bacillus mycoides*.

Окраска гранулезы. *Гранулеза* — углевод, крахмалоподобное вещество. Встречается только у прокариот и только в клетках маслянокислых бактерий *Clostridium butyricum* перед спорообразованием. Обычно гранулезы накапливаются в значительном количестве.

В небольшую каплю суспензии маслянокислых бактерий добавляют такую же каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом, удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой и просматривают с масляной иммерсией.

В качестве объекта следует использовать *накопительную культуру маслянокислых бактерий*. Ее получают следующим образом: за 3—4 сут до занятий пробирки на $1/3$ заполняют мелко нарезанным неочищенным картофелем, добавляют мел на кончике ножа и доливают доверху водопроводной водой. Пробирки помещают в водяную баню и нагревают при 70 °С 10 мин, затем охлаждают и ставят в термостат при 30 °С.

Для приготовления препарата маслянокислых бактерий берут пипеткой каплю суспензии из придонного слоя жидкости. Гранулеза окрашивается в сине-фиолетовый цвет и локализуется на одном из концов клеток *Clostridium butyricum*, приобретающих форму веретена в процессе перестройки вегетативных клеток в клетки, несущие споры. Второй конец клетки (с формирующейся спорой) остается неокрашенным.

Окраска жира. Жир содержится в клетках практически всех видов микроорганизмов, особенно много его накапливается при старении культуры.

На предметное стекло наносят небольшую каплю 40%-ного раствора формалина. Петлей в нее вносят культуру микроорганизма. Формалин убивает клетки и разрыхляет их оболочки. Через 5 мин в эту же каплю добавляют небольшую каплю метиленового синего, а спустя 10 мин — каплю судана III (растворимого в жире красителя, индикатора жироподобных веществ). Образовавшуюся общую каплю накрывают

покровным стеклом, удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой и микроскопируют препарат с иммерсией.

Цитоплазма клеток окрашивается в синий цвет, включения жира — в розово-оранжевый.

Объекты для исследования — старые культуры дрожжей, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*.

Многие гранулы, окрашивающиеся суданом III или суданом черным В (0,3%-ным раствором в 70%-ном этиловом спирте), состоят из поли-β-оксимасляной кислоты. Для выявления поли-β-оксимасляной кислоты готовят препарат клеток 24-часовой культуры. Мазок подсушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки, окрашивают суданом черным 5—15 мин (краситель может при этом высохнуть, но это не имеет значения). Затем краситель смывают, препарат подсушивают фильтровальной бумагой и обрабатывают ксилолом, несколько раз погружая в него стекло. Время обесцвечивания не должно превышать 1 мин. Дополнительное окрашивание препарата проводят 0,5%-ным водным раствором сафранина в течение 5—10 с. Включения поли-β-оксимасляной кислоты выглядят как черно-синие гранулы в розовой цитоплазме клеток.

Приготовление судана III. 0,1 г судана III растворяют в 200 мл 96%-ного спирта или концентрированной молочной кислоты.

Материалы и оборудование.

Красители и реактивы для окраски по Граму, выявления кислотоустойчивости бактерий, спор, капсул, жгутиков, генома, волютина, гликогена, гранулезы, жира; предметные стекла, бактериологические петли, спирт с эфиром (1 : 1), микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

4.1. Значение отдельных элементов питания (на примере *Aspergillus niger*)

Каждый студент получает индивидуальное задание — приготовить питательную среду для гриба *Aspergillus niger* соответствующего варианта (всего 11 вариантов).

Если это 1-й вариант (контрольная среда), то в состав среды входят все элементы питания, необходимые для грибов (кроме микроэлементов). Если это 2—8-й варианты, то в каждом из них исключен какой-либо один элемент питания. Если это 9—11-й варианты, то в каждом из них присутствует какой-либо один микроэлемент.

Цель опыта — выяснить, как гриб будет развиваться в отсутствие или при дополнительном внесении какого-либо элемента питания.

Варианты питательных сред:

1. Полная питательная среда без микроэлементов, %: сахара — 10,0; NH_4NO_3 — 0,3; KH_2PO_4 — 0,2; MgSO_4 — 0,05; FeSO_4 — 0,01.
2. Та же среда без углерода: исключена сахара. Для компенсации осмотической активности среды можно внести соответствующее по осмотическому эквиваленту количество хлорида натрия (NaCl), который не оказывает влияния на развитие гриба.
3. Та же среда без азота: исключен NH_4NO_3 .
4. Та же среда без фосфора: KH_2PO_4 заменен другой солью, содержащей эквивалентное количество калия, например KCl . При замене одной соли на другую катион замещается калием, анион — хлором; Cl не оказывает влияния на развитие гриба.
5. Та же среда без калия: KH_2PO_4 заменен эквивалентным количеством NaH_2PO_4 .
6. Та же среда без серы: MgSO_4 и FeSO_4 заменены эквивалентными количествами MgCl_2 и FeCl_3 , закисную соль железа можно заменить окисной.
7. Та же среда без магния: MgSO_4 заменен эквивалентным количеством Na_2SO_4 .
8. Та же среда без железа: FeSO_4 заменен эквивалентным количеством Na_2SO_4 .
- 9—11. Та же среда с добавлением микроэлементов: в 9-м варианте в состав среды вводят ZnSO_4 , в 10-м — MnSO_4 , в 11-м — H_3BO_3 . Концентрация соли, содержащей микроэлементы, во всех трех случаях — 0,01%.

Получив задание, следует рассчитать эквивалентный процент замещающего вещества (это относится ко всем вариантам, за исключением первых трех). Если в каждом из этих вариантов исключить какую-либо соль, то одновременно удаляются два элемента питания вместо одного. Так, в 4-м варианте (среда без фосфора) при удалении KH_2PO_4

одновременно исключаются фосфор и калий. Поэтому калий необходимо внести в среду в эквивалентном количестве в виде KCl .

Пример расчета. Вариант 4-й (среда без фосфора): KH_2PO_4 (0,2% в среде) заменяют KCl .

Молекулярная масса KH_2PO_4 — 136 (39 + 2 + 31 + 64), а KCl — 74 (39 + 35).

Сначала определяют содержание (в %) калия в среде (x):

136 г KH_2PO_4 составляют 0,2%

39 г К » x

$$x = \frac{39 \cdot 0,2}{136} = 0,06 (\%).$$

Затем устанавливают количество KCl (в %) (y), эквивалентное изъятому количеству KH_2PO_4 :

39 г К соответствуют 0,06% К

74 г KCl » y KCl

$$y = \frac{0,06 \cdot 74}{39} = 0,1 (\%).$$

Aspergillus niger — аэробный организм, поэтому для создания лучших условий аэрации используют колбы Эрленмейера объемом 75—100 мл с 30 мл среды.

Далее рассчитывают количество каждого вещества в граммах в 30 мл среды, зная их процентное содержание.

Пример расчета. Необходим раствор, концентрация NH_4NO_3 в котором 0,3%:

100 мл раствора содержат 0,3 г NH_4NO_3

30 мл » » x NH_4NO_3

$$x = \frac{30 \cdot 0,3}{100} = 0,09 (\text{г}).$$

Таким же образом рассчитывают навески всех остальных компонентов среды.

Так как навески в большинстве своем очень малы, что затрудняет взвешивание, удобнее использовать готовые растворы: 20%-ный раствор сахарозы, 1%-ный раствор микроэлементов, 10%-ный — для всех остальных солей. Для этого надо определить, сколько миллилитров каждого раствора следует взять, чтобы внести соответствующую навеску.

ров. Эти среды применяют главным образом для выделения микроорганизмов из мест их природного обитания и получения их накопительных культур.

Накопительные среды были предложены голландским ученым *М. Бейеринком*. В них интересующий исследователя компонент среды дается в избытке, чтобы выяснить, какой микроорганизм или группа микроорганизмов его используют, поскольку именно он или они будут доминировать в этой среде.

Оптимальные среды предложил *А. А. Имшенецкий* для целлюлозоразрушающих микроорганизмов, *В. С. Буткевич* — для продуцента лимонной кислоты *Aspergillus niger*. Основной принцип оптимальных сред заключается в создании наиболее благоприятных условий для избранных микроорганизмов внесением в среду различных стимулирующих рост добавок (витаминов, ростовых веществ, микроэлементов).

По составу среды подразделяются на две группы: естественные (натуральные) и синтетические.

Естественными обычно называют среды, которые состоят из продуктов животного или растительного происхождения, имеющих сложный неопределенный химический состав. Это — различные части растений, животные ткани, солод, дрожжи, навоз, почва, вода морей, озер и минеральных источников. Их используют чаще в виде экстрактов или настоев. На естественных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, так как в них есть все компоненты, необходимые для роста. Однако среды с неопределенным составом мало пригодны для изучения физиологии обмена веществ микроорганизмов, поскольку не позволяют учесть потребление ряда компонентов среды, а также выяснить, какие вещества образуют микроорганизмы. Указанные недостатки связаны с тем, что состав естественных сред очень сложен и непостоянен, так как существенно колеблется в зависимости от вида сырья и способа приготовления. Это заметно влияет на рост микроорганизмов. Естественные среды используют главным образом для поддержания культур микроорганизмов, накопления их биомассы и диагностических целей.

Синтетические — это такие среды, в состав которых входят в точно указанных концентрациях только известные химически чистые соединения. Синтетические среды бывают простыми и достаточно сложными по составу. Их широко исполь-

зуют для исследований, связанных с изучением обмена веществ микроорганизмов.

Существуют и так называемые **полусинтетические** среды, относящиеся к средам с неопределенным составом. В них наряду с соединениями известной химической природы входят вещества неопределенного состава. Например, в мясной бульон наряду со сложными и неопределенными по химическому составу веществами (мясной бульон) могут входить пептон, глюкоза или сахароза, поваренная соль, фосфат калия; картофельные среды содержат глюкозу и пептон. Полусинтетические среды широко используют в микробиологической практике для получения витаминов, антибиотиков, аминокислот и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Питательные среды могут быть различной консистенции: жидкие, плотные, полужидкие.

Плотные питательные среды используют для учета количества бактерий, выделения чистой культуры и других целей. Такие среды готовят из жидких, добавляя 1,5—2,5% агара или 10—15% желатины. При приготовлении полужидких сред вносят 0,1—0,2% агара.

Агар — это растительный коллоид, получаемый из некоторых морских водорослей. В его состав входят главным образом полисахариды, а также ничтожное количество азотистых веществ. Выпускают агар в виде пластин, стебельков, порошка. Большинство микроорганизмов не используют его в качестве субстрата, и поэтому агар удобен как инертный уплотнитель среды. Температура плавления агара — 100 °С, затвердевания — 40 °С.

Желатина — кислый азотсодержащий продукт, добываемый при выварке костей, хрящей, сухожилий, чешуи рыб. Температура плавления желатины (22—25 °С) ниже температуры инкубации большинства микроорганизмов (30—37 °С). Эта особенность и способность многих микроорганизмов разжижать желатину, выделяя протеолитические ферменты, ограничивают ее применение в качестве уплотняющего средства.

Плотными питательными средами служат также **гелевые пластины**, введенные в микробиологическую практику *С. Н. Виноградским* (см. 7.2.1).

Для выращивания микроорганизмов, усваивающих органические формы азота, часто употребляют **мясо-пептонные среды**: мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар и мясо-пептонную желатину.

4.2.2. Приготовление питательных сред

■ **Мясо-пептонный бульон (МПБ).** Для приготовления мяско-пептонных сред используют *мясной бульон*, который получают следующим образом: 500 г мелко изрубленного свежего мяса без костей, жира и сухожилий заливают в эмалированной кастрюле 1 л водопроводной воды, нагретой до 50 °С, и оставляют настаиваться 12 ч при комнатной температуре или 1 ч при 50—55 °С. Мясо отжимают, экстракт процеживают через марлю со слоем ваты, кипятят 30 мин для свертывания коллоидных белков и фильтруют дважды (первый раз через марлю с ватой, второй — через бумажный фильтр). Фильтрат доливают водой до 1 л, разливают в колбы, закрывают ватными пробками и стерилизуют при 120 °С 20 мин (пробки колб закрывают сверху колпачками из бумаги). Ватные пробки должны быть плотными, так как они служат фильтром, препятствующим проникновению бактерий из воздуха после стерилизации.

Мясной бульон может быть использован в любое время для приготовления соответствующих сред. Если их готовят сразу, то предварительная стерилизация мясного бульона не требуется.

Нередко в лабораторных условиях мясной настой кипятят вместе с мясом, затем мясо отжимают. При этом бульон получается хорошего качества. При потребности в мясном бульоне особо высокой питательности во время настаивания мяса с водой добавляют немного пепсина и подкисляют бульон соляной кислотой. Пепсин способствует дополнительной гидролизации белковых соединений мяса, и в результате количество доступных бактериям питательных веществ возрастает. Мясо можно заменить мясным экстрактом (5 г на 1 л среды).

Для приготовления МПБ к 1 л мясного бульона добавляют 5—10 г *пептона* (первый продукт гидролиза белка) для повышения калорийности среды и 5 г *поваренной соли* для создания осмотической активности. Среду нагревают до растворения пептона, постоянно помешивая.

Затем устанавливают нейтральную или слабощелочную реакцию среды, приливая 20%-ный раствор Na_2CO_3 до посинения влажной красной лакмусовой бумажки. Для проверки рН среды удобно использовать индикатор *бромтимол-*

блау: 1—2 капли его смешивают в фарфоровой чашке с каплей бульона. В нейтральной среде бромтимолблау — бутылочно-зеленый, в кислой — желтый, в щелочной — синий.

После установления рН среду снова кипятят 5—10 мин, и белки, свернувшиеся при изменении реакции среды, отфильтровывают через бумажный фильтр без осветления бульона или осветлив его белком. Для этого свежий яичный белок взбивают с двойным по объему количеством воды и смешивают с охлажденным до 50 °С бульоном. Смесь кипятят, помешивая, на слабом огне 10 мин, затем фильтруют. Прозрачный мяско-пептонный бульон разливают в пробирки, закрывают ватными пробками и стерилизуют при 120 °С 20 мин.

■ **Мясо-пептонный агар (МПА).** К 1 л МПБ добавляют 15—20 г агара. Среду нагревают до растворения агара (температура его плавления — 100 °С, затвердевания — 40 °С), устанавливают слабощелочную реакцию среды 20%-ным раствором Na_2CO_3 и через воронку разливают в пробирки (приблизительно по 10 мл агара столбиком для последующего разлива по чашкам Петри и по 5 мл для получения скошенного агара — косяков).

При разливе агара необходимо следить за тем, чтобы края пробирок оставались сухими, иначе пробки прилипнут к стеклу. Пробирки со средой стерилизуют в автоклаве при 120 °С 20 мин.

■ **Мясо-пептонная желатина (МПЖ).** В 1 л МПБ помещают 100—150 г желатины. Температура плавления желатины зависит от ее содержания в среде: в случае 10%-ной концентрации в среде она плавится при 24 °С; в случае 15%-ной — при 25 °С. В летнее время среды готовят, добавляя 15% желатины.

После растворения желатины при осторожном нагревании устанавливают слабощелочную реакцию среды (как для МПБ и МПА), кипятят 5 мин, затем охлаждают до 40—50 °С. Взбитый с небольшим количеством воды яичный белок вливают в охлажденную желатиновую среду, хорошо взбалтывают и снова нагревают. Среда после выпадения белков в осадок становится прозрачной. Ее фильтруют в горячем виде через бумажный фильтр, разливают в пробирки и стерилизуют в кипятильнике Коха текучим паром, прогревая среду 3 раза по 30 мин каждые 24 ч.

■ **Картофельный агар.** Нарезают ломтиками 200 г очищенного и промытого водой картофеля, заливают 1 л водопроводной воды, варят 30 мин. Отвар фильтруют через вату и добавляют воду до первоначального объема. К полученной жидкости прибавляют 2% агара, кипятят до его расплавления и устанавливают нейтральную реакцию среды ($\text{pH} = 7$). Среду стерилизуют 20 мин при 1 атм¹.

■ **Пивное сусло и сусло-агар.** Зерна ячменя замачивают в холодной воде и прорастивают при 35 °С. После того как ростки станут вдвое длиннее зерен, последние высушивают до воздушно-сухого состояния (можно при слабом подогревании), получая *солод*. Для приготовления **сусла** солод крупно размалывают и смешивают с водой (250 г солода на 1 л воды). Для лучшего выделения фермента амилазы смесь подогревают при 57 °С до исчезновения реакции на крахмал (синего окрашивания с иодом). Пробы на осахаривание крахмала проводят в фарфоровой чашке в капле жидкости.

Сусло процеживают через вату, затем фильтруют через бумажный фильтр. Такое сусло содержит 10—20% сахара. Точное его содержание определяют по плотности раствора при помощи сахариметра. Сусло разбавляют водой до концентрации сахара 6—8% и стерилизуют 30 мин при 115 °С и давлении 0,5 атм. Готовое сусло можно получить на пивоваренном заводе.

Для приготовления **сусло-агара** к пивному суслу добавляют 2,5—3% агара, кипятят до расплавления, фильтруют через вату и стерилизуют при тех же условиях, как и пивное сусло.

■ **Обезжиренное молоко.** Для приготовления питательных сред используют снятое молоко, так называемый **обрат**, так как жир в молоке неблагоприятно влияет на рост некоторых микроорганизмов. Обрат получают сепарированием молока, нагретого до 34 °С. Можно удалять жир и при отстаивании молока.

При стерилизации следует помнить о том, что молоко нельзя длительное время выдерживать в автоклаве, так как лактоза (молочный сахар), содержащаяся в молоке, может карамелизоваться.

Обезжиренное молоко разливают в стерильные пробирки и выдерживают при 115 °С (давление 0,5 атм) 10 мин. Перед

¹ По системе СИ давление принято выражать в *паскалях* (Па): 1 атм = $1,01325 \times 10^5$ Па = 0,1 МПа.

стерилизацией кислотность обрата не должна превышать 22° Тернера, иначе молоко свернется. После стерилизации его выдерживают 3 сут в термостате при 30 °С, чтобы спровоцировать развитие спорообразующих и других стойких к нагреванию форм. Через 3 сут пробирки с молоком просматривают и те, в которых развились микроорганизмы, выбраковывают.

При стерилизации в автоклаве иногда возможно побурение молока вследствие карамелизации молочного сахара и пептонизации казеина. При длительной стерилизации на дно пробирки выпадает осадок казеина, который может частично пептонизироваться. Перегретое побуревшее молоко в качестве среды использовать нельзя.

■ **Дрожжевые среды.** *Дрожжевая вода.* 50—100 г сухих дрожжей разводят в 1 л воды, кипятят 10 мин, фильтруют через бумажный фильтр и стерилизуют текучим паром по 30 мин в течение 3 дней ежедневно.

Дрожжевой автолизат. 200 г прессованных дрожжей разводят в 1 л воды; добавляют 2 г Na_2HPO_4 , каплями 1 н. раствор NaOH (до pH 6,1) и 5 мл хлороформа, выдерживают при 37 °С 2 сут, доводят раствором NaOH до pH 7,4, кипятят 30 мин, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в посуду и стерилизуют при 115 °С 30 мин.

Дрожжевой экстракт. 1 кг прессованных дрожжей разводят в 1 л воды, смесь кипятят 1 ч, трижды отфильтровывают через бумажный фильтр и стерилизуют при 115 °С 30 мин.

■ **Бобовый отвар.** 50 г фасоли (лучше белой) заливают 1 л водопроводной воды и варят до готовности так, чтобы бобы не разварились. Полученный отвар фильтруют через вату, добавляют к нему 10 г сахара и доводят до первоначального объема. Устанавливают слабощелочную реакцию среды, разливают в колбы и стерилизуют в автоклаве 30 мин при давлении пара 1,5 атм.

4.3. Методы стерилизации

Стерилизация, или обеспложивание (от лат. *sterilis* — бесплодный), — это полное уничтожение клеток микроорганизмов в питательных средах, посуде и пр.

Известно несколько методов стерилизации. Чаще всего применяют стерилизацию нагреванием.

4.3.1. Фламбирование, или прокаливание

Прокаливать можно непосредственно перед употреблением платиновые петли, иглы, шпатели, мелкие металлические предметы (ножницы, ланцеты, пинцеты), а также стеклянные палочки, предметные, покровные стекла и т. д.

4.3.2. Стерилизация сухим жаром

Ее применяют для обработки посуды и сухих материалов, например крахмала, мела. При этом стерилизуемый объект выдерживают при 170 °С в течение 2 ч (считая с того момента, как установлена необходимая температура) в печи Пастера (рис. 8, а) или в электросушильных шкафах. Поднимать температуру выше 170 °С не рекомендуется: ватные пробки и бумага начинают разрушаться (буреют, становятся ломкими).

Перед стерилизацией стеклянную посуду закрывают ватными пробками и обертывают бумагой. Чашки, пробирки, пипетки, вату, марлю заворачивают в бумагу или помещают в особые футляры и пеналы, в которых стерильная посуда может храниться после стерилизации.

По окончании стерилизации шкаф открывают только после того, как температура снизится до комнатной, иначе стекло может лопнуть.

4.3.3. Стерилизация текучим паром

Текучим паром (100 °С) обрабатывают предметы, портящиеся от сухого жара, и некоторые питательные среды, не выдерживающие более высокой температуры (среды с углеводами,

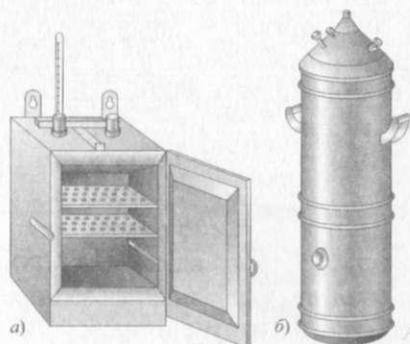


Рис. 8. Оборудование для стерилизации: а — печь Пастера; б — кипятыльник Коха

МПЖ, молоко). Проводят стерилизацию в кипятыльнике Коха (рис. 8, б) по 30 мин в течение 3 сут ежедневно. Такая стерилизация называется *дробной*.

Кипятыльник Коха — высокий металлический цилиндр с двойным дном, свободно закрывающийся конусообразной крышкой с отверстием для термометра. Снаружи цилиндр покрыт асбестом или линолеумом. На дно кипятыльника наливают воду, устанавливают подставку с отверстиями для прохождения пара, на которую помещают стерилизуемые предметы. Продолжительность стерилизации отсчитывают с момента интенсивного выхода пара из-под крышки и повышения температуры до 100 °С.

При однократном прогреве при температуре 100 °С в течение 30 мин погибают вегетативные клетки, споры же многих микроорганизмов остаются жизнеспособными. После такого прогрева среду помещают на 24 ч в термостат при 28—30 °С. Споры, сохранившиеся при первом нагревании, успевают за это время прорасти в вегетативные формы, которые погибают при последующем нагревании. Затем эту операцию повторяют еще 2 раза.

4.3.4. Стерилизация насыщенным паром под давлением

Это наиболее быстрый и надежный способ стерилизации, при котором гибнут самые устойчивые споры. С его помощью стерилизуют большинство питательных сред, посуду.

Обработку насыщенным паром проводят в герметически закрывающемся толстостенном котле — **автоклаве** (рис. 9). На

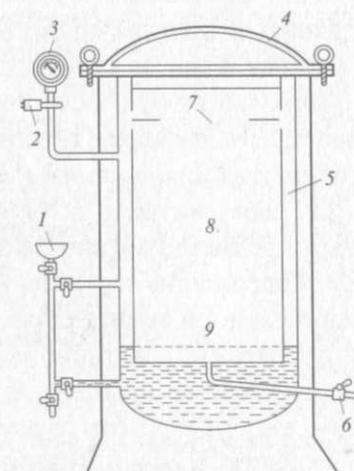


Рис. 9. Схема автоклава: 1 — воронка, через которую автоклав заправляют водой; 2 — предохранительный клапан; 3 — манометр; 4 — крышка автоклава; 5 — водопаровая камера; 6 — кран для выпуска воздуха; 7 — отверстие, через которое пар поступает в стерилизационную камеру; 8 — стерилизационная камера; 9 — подставка для размещения стерилизуемых материалов

массивной крышке или сбоку котла находятся кран для выхода пара, манометр и предохранительный клапан. Манометр показывает, на сколько давление пара внутри котла выше нормального. Для предотвращения взрыва при превышении предельного давления срабатывает предохранительный клапан, давая выход пару.

Показателю манометра в физических атмосферах соответствует определенная температура.

Давление, атм	Температура, °С
0,5	115
1,0	120
1,5	127
2,0	133

Надежной стерилизации достигают нагреванием при 120 °С и давлении 1 атм в течение 20 мин.

Стерилизацию ведут следующим образом. Наливают воду в автоклав, помещают в него стерилизуемые предметы, завинчивают крышку автоклава и начинают подогрев. Кран оставляют открытым до тех пор, пока весь воздух, находящийся в автоклаве, не будет вытеснен парами воды. Когда пар начнет выходить из крана непрерывной струей, кран закрывают, доводят давление пара в автоклаве до 1 атм и поддерживают на этом уровне 20—30 мин. Затем нагрев прекращают, ждут, пока стрелка манометра опустится до 0, осторожно (понемногу) открывают кран и спускают пар. Только потом отвинчивают крышку автоклава. Если кран открыть раньше, чем упадет давление, то жидкость в стерилизуемых сосудах закипит и вытолкнет из них пробки.

Для контроля за работой автоклавов среди стерилизуемых предметов можно закладывать специальные тесты-ампулы, содержащие химические вещества, которые плавятся при определенной температуре. Так, температура плавления бензола 110 °С, антипирина — 113 °С.

Автоклав используют и для дробной стерилизации текущим паром. В этом случае крышку не завинчивают, чтобы обеспечить свободный выход пару.

4.3.5. Пастеризация

Пастеризация представляет собой неполную, или частичную, стерилизацию, что означает нагревание при 65—80 °С в течение соответственно 30—10 мин с последующим быстрым охлаждением до 10—11 °С. Прием был предложен *Л. Пастером* для уничтожения неспорообразующих бактерий в продуктах, чьи свойства ухудшаются при кипячении (молоко, пиво, вино и др.).

4.3.6. Холодная стерилизация — фильтрование через мелкопористые фильтры

Применяют для обработки сред, компоненты которых легко разлагаются при нагревании. Через мелкие поры фильтра могут пройти только ультрамикрорганизмы (вирусы, бактериофаги).

Наиболее часто используют фильтры из *каолина* (полые цилиндры, закрытые с одной стороны). Чтобы жидкость прошла через такой фильтр, необходимо создать разницу давлений по обе стороны цилиндра. Этого достигают нагнетанием или откачиванием воздуха при помощи масляных насосов. Фильтр соединяют с приемником для жидкой среды, которым служит колба Бунзена. Оттянутый конец колбы закрывают ватной пробкой. Смонтированный фильтр с приемником стерилизуют.

Среду для стерилизации наливают в сосуд, в который помещают фильтр, а колбу Бунзена с ватной пробкой соединяют с насосом (масляным или водоструйным) и выкачивают воздух. Поскольку внутри фильтра давление стало ниже, чем над его поверхностью, жидкость под давлением проходит через фильтр в приемник. Бактерии остаются с внешней стороны фильтра.

Неудобства этого метода заключаются в медленной фильтрации и необходимости частой очистки фильтров.

Материалы и оборудование

МПБ, агар, лакмус красный, бромтимолблау, фарфоровые пластинки с лунками или чашки, стеклянные палочки, 20%-ный раствор Na_2CO_3 , пробирки в штативах (для разлива агара), воронки, вата, чашки Петри, пипетки Мора на 1 мл, бумага для обертывания чашек и пипеток, колбы емкостью 250 мл, суровые нитки.

5.1. Методы учета численности микроорганизмов

5.1.1. Учет численности микроорганизмов (КОЕ) в почве методом питательных пластин в сочетании с методом последовательных разведений

Почва — наиболее благоприятная среда для развития микроорганизмов. В связи с большой гетерогенностью ее состава для учета численности в ней микроорганизмов с исследуемого участка берут *среднюю* почвенную пробу (см. 10.1.1).

Сначала готовят суспензии (методом разведения), содержащие разные концентрации почвы в 1 мл воды. Для этого на стерильное часовое стекло стерильным фарфоровым шпателем или алюминиевой чайной ложкой берут из банки или мешка навеску почвы в 1 г. Часовое стекло, шпатель, ложку фламбируют в пламени горелки или, смочив в спирте, обжигают. При взвешивании почвы часовое стекло накрывают другим стерильным часовым стеклом.

Навеску почвы, соблюдая условия асептики, переносят в колбу на 250 мл с 99 мл стерильной воды. Смесь взбалтывают 5 мин, не смачивая пробку. Стерильной пипеткой берут 1 мл суспензии, содержащей 10^{-2} г почвы, и переносят в пробирку с 9 мл стерильной водопроводной воды. Пипетку неоднократно промывают водой в пробирке, чтобы максимально смыть клетки с ее стенок. Другой стерильной пипеткой берут из колбы еще 1 мл суспензии и помещают во вторую колбу, также содержащую 99 мл стерильной водопроводной воды. Эту пипетку промывают таким же образом, как и в первом случае. Пробирку и вторую колбу взбалтывают 1 мин. Концентрация почвы в пробирке будет 10^{-3} г, во второй колбе — 10^{-4} г. Точно так же новыми стерильными пипетками переносят по 1 мл суспензии из второй колбы во вторую пробирку с 9 мл и в третью колбу с 99 мл стерильной водопроводной воды и готовят новые суспензии, содержащие в 1 мл соответственно 10^{-5} и 10^{-6} г почвы.

Для определения численности микроорганизмов в каждом разведении методом питательных пластин можно провести глубинный или поверхностный посев. Последний более сложен и занимает больше времени. Поэтому для подсчета численности бактерий в почве методом питательных пластин можно ограничиться **глубинным посевом**, а поверхностный использовать при учете численности различных физиологических групп микроорганизмов на плотных средах (см. главу 10).

Для определения количества живых клеток, содержащихся в 1 мл суспензии каждого разведения, берут по 1 мл этих суспензий и переносят в стерильные чашки Петри, используя всякий раз новую стерильную пипетку (лучше пипетку Мора). На крышках чашек стеклоглафом отмечают исследуемый вариант и разведение. Затем в чашки Петри вливают расплавленный МПА, заранее приготовленный и разлитый в пробирки на 20 мл ($2/3$ объема) из расчета одна пробирка на чашку. Температура агара должна быть примерно $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ее определяют, прикладывая пробирку с расплавленным агаром к щеке: если щеке не горячо — среду можно вылить в чашку Петри. Осторожными круговыми движениями чашки, не смачивая крышку, агар перемешивают с суспензией. Чашки с застывшим агаром переворачивают вверх дном, чтобы избежать попадания на его поверхность конденсационной влаги с крышки, и помещают в термостат при $28\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Клетки микроорганизмов, попав в питательную среду, начинают размножаться и образуют видимые невооруженным глазом колонии. Каждая колония на чашке с питательной средой вырастает из одной **колониобразующей единицы (КОЕ)**, которая может представлять собой бактериальную, дрожжевую клетку, спору, кусочек мицелия актиномицета или гриба. Через 48 ч инкубации чашки вынимают из термостата и предварительно подсчитывают число колоний. В связи с тем что существуют медленно растущие формы бактерий, окончательный подсчет делают на 5-е сут.

Количество КОЕ в 1 г сырой почвы устанавливают, умножая число колоний в чашке на степень разведения — число, показывающее, во сколько раз в каждом конкретном случае разбавили 1 г почвы. Казалось бы, во всех вариантах посева должно получиться примерно одинаковое число КОЕ, однако на практике происходит не так.

5.1.3. Учет численности КОЕ в воздухе

При определении числа микроорганизмов в воздухе его определенный объем пропускают через пробирку с 10 мл стерильной водопроводной воды. Для этого ее закрывают стерильной пробкой с двумя стеклянными трубками. Одну трубку, сообщаемую с воздухом, опускают в воду до дна пробирки, а отверстие другой, соединенной с аспиратором, находится сразу под пробкой. По количеству воды (в литрах), выпущенной из аспиратора, устанавливают объем воздуха, прошедшего через стерильную воду в пробирке.

При прохождении воздуха через воду микроорганизмы остаются в воде, и их численность затем определяют после приготовления соответствующих разведений методом питательных пластин, как было описано выше (5.1.1). Зная объем воздуха, прошедшего через воду, делают пересчет на 1 м³ воздуха.

Для определения количества КОЕ в воздухе можно использовать и более простой, но менее точный **метод Коха** (осаждение клеток микроорганизмов на плотных питательных средах). Суть его сводится к следующему. Стерильные чашки Петри с питательной средой (МПА, МПЖ или кусок вареной картофелины) открывают в исследуемом помещении (или на исследуемой площади) на 5 мин. Частицы пыли с бактериями под действием силы тяжести оседают на поверхность плотной питательной среды. Через 48 ч инкубации при 28—30 °С осевшие бактерии образуют на среде колонии, которые можно подсчитать (см. 5.1.1). Поскольку некоторые микроорганизмы развиваются медленно, окончательно подсчитывают колонии на 5-е сут.

На площади в 100 см² за 5 мин осажается примерно столько клеток, сколько их находится в 10 л воздуха (0,01 м³). Зная площадь чашки Петри, можно подсчитать количество клеток в 1 м³ воздуха. Для этого число колоний, выросших в чашке Петри, относят к общей площади чашки, затем пересчитывают, сколько таких колоний поместилось бы на 100 см² и далее — в 1 м³ воздуха.

Пример расчета. В чашке Петри диаметром 10 см выросло 45 колоний. Площадь чашки (πr^2) составит $3,14 \cdot 5^2 = 78,5$ (см²).

Далее подсчитывают число клеток на 100 см² (равнозначных 10 л, или 0,01 м³ воздуха):

$$\begin{array}{l} 78,5 \text{ см}^2 \text{ воздуха содержат } 45 \text{ клеток} \\ 100,0 \text{ см}^2 \text{ » } \text{ » } x \\ x = \frac{100 \cdot 45}{78,5} = 57 \text{ (клеток)}. \end{array}$$

Таким образом, в 0,01 м³ воздуха находится 57 клеток, а в 1 м³ их будет в 100 раз больше — 5700.

В исследуемых помещениях чашки Петри с агаром лучше размещать по 2—3. После подсчета колоний в каждой чашке выводят их среднее арифметическое значение.

Материалы и оборудование

Часовые стекла, шпатели, ложки, почва, стерильные колбы на 250 мл со 100 мл и стерильные пробки с 9 мл водопроводной воды, стерильные пипетки Мора на 1 мл, колбы с расплавленным МПА, стерильные чашки Петри, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

5.2. Выделение чистой культуры бактерий

При изучении физиолого-биохимических особенностей и цикла развития бактерий, а также для установления их видовой принадлежности необходимо работать с чистой культурой микроорганизмов. **Чистой** называют такую культуру, которая получена из одной клетки и содержит микроорганизмы одного вида.

Выделение чистой культуры включает **три этапа**: получение накопительной культуры, выделение чистой культуры, определение ее чистоты.

Для получения накопительной культуры определенного вида бактерий сначала подбирают элективные (избирательные) условия среды, обеспечивающие преимущественное развитие данных бактерий. Затем из мест обитания, в которых преобладают представители данной группы, делают посев на соответствующую элективную (селективную) среду.

Чистую культуру получают из одной клетки или отдельной колонии накопительной культуры. Во втором случае из накопительной культуры после ее разведения делают высев на

плотную среду по методу Коха. Каждую образовавшуюся колонию считают развившейся из одной клетки.

Для выделения из накопительной культуры чистых культур аэробных бактерий делают высев на чашки Петри: каплю соответствующего разведения осторожно размазывают стерильным стеклянным шпателем по поверхности плотной среды, после чего этим же шпателем протирают поверхность последующих 3—4 чашек. Чашки выдерживают в термостате от 2 до 7 сут, так как скорость роста различных микроорганизмов неодинакова. Выросшие на некотором отдалении от других колонии отсеивают петлей в пробирки на поверхность скошенной плотной среды или в жидкую среду.

Высев из накопительной культуры микроорганизмов, относящихся к факультативным аэробам или факультативным анаэробам, для получения изолированных колоний делают методом глубинного посева в пробирки со столбиком стерильного агара. Для этого стерильной иглой берут чистую культуру из колоний, одновременно вынимают пробку, обжигают края пробирки, держа ее вверх дном, и над горелкой делают иглой прокол до дна.

Выделение чистой культуры анаэробных бактерий по методу Коха возможно только при ограничении доступа кислорода, в частности при инкубации в анаэроостате.

Чистоту культуры определяют микроскопированием препарата.

Материалы и оборудование

Свежие почвенные пробы в стеклянных банках, пробы навоза и навозной жижи, пробы воды; часовые стекла, ложки алюминиевые чайные или шпатели, пинцеты, весы, разновесы, стеклянные или металлические бюксы, колбы на 250 мл с 99 мл стерильной водопроводной воды, пробирки с 9 мл стерильной водопроводной воды, стерильные пипетки Мора на 1 мл, пробирки со столбиком МПА ($\frac{2}{3}$ объема), стерильные чашки Петри, стеклографы, водяная баня, бумажные этикетки; чашки Петри с посевом, лупы, микроскопы, иглы, пробирки со скошенным МПА и все необходимое для микроскопирования.

6.1. Морфологические и культуральные признаки микроорганизмов

6.1.1. Морфологические признаки

При определении вида бактерий и актиномицетов учитывают морфологические, культуральные и физиолого-биохимические признаки, а у актиномицетов дополнительно химический состав клеточной стенки.

Морфологическими признаками бактерий служат: *форма клеток* (шаровидные, палочковидные и извитые); у палочковидных отмечают форму концов клеток (вогнутые, закругленные или усеченные); клетки могут быть одиночные, соединенные попарно, в цепочки или в виде пакетов; *размеры клеток* в микрометрах (мкм) (поперечное сечение, длина палочки, диаметр шаровидных форм); *способность к спорообразованию* и *расположение в клетках спор* (бациллярное, кластридиальное и плектридиальное); *наличие капсул и клеточных включений*; *способность к движению* и *тип жгутикования* (один жгутик — монотрих, пучок жгутиков на одном конце — лофотрих, пучки жгутиков на обоих концах клеток — амфитрих, по всей поверхности клетки — перитрих); *окраска по Граму* и *кислотоустойчивость*.

К **морфологическим признакам актиномицетов** относят образование ветвящегося мицелия. У отдельных представителей он может быть очень коротким или хорошо развитым, диаметр его варьирует в пределах 0,5—2 мкм (обычно менее 1 мкм). Мицелий можно наблюдать не всегда, так как у отдельных родов и видов он легко фрагментируется. Иногда фрагментация ведет к образованию кокковидных, удлиненных или дифтероидных клеток. Для некоторых актиномицетов характерно формирование спораносцев и спор на воздушном или субстратном мицелии. Спораносцы могут быть прямые, длинные, разветвленные, короткие в виде крючков или спиралей, в мутовках.

Актиномицеты — грамположительные микроорганизмы, хотя с возрастом культуры окраска по Граму может меняться. Среди актиномицетов есть кислото- и спиртоустойчивые, иногда слабокислотоустойчивые виды. Почти все представители группы актиномицетов — аэробы, за исключением некоторых родов, виды которых могут быть анаэробами или факультативными анаэробами.

6.1.2. Культуральные признаки

Характер роста культуры на МПБ и других жидких средах или колоний на МПА и других плотных средах (сусло-агар, агаризованная синтетическая среда) — важные систематические признаки микроорганизмов.

При развитии культуры на жидких средах отмечают характер развития пленки (тонкая, сухая, складчатая, слизистая) и ее цвет; наличие мути (слабая, умеренная, сильная); присутствие, характер осадка (обильный, плотный, хлопьевидный) и его цвет.

Культуральные признаки на плотных средах следующие: *форма* колоний (рис. 10); *профиль* колоний (рис. 11); *край* колоний (гладкий, волнистый, зубчатый, лопастной, реснитчатый, ворсистый, ветвистый); *размеры* (10 мм и более в диаметре — крупная, от 1 до 10 — средняя, не превышает 1 мм — точечная); *поверхность* (гладкая, морщинистая, шероховатая, складчатая, бугристая); *оптические свойства поверхности* (прозрачная, просвечивающая, непрозрачная, блестящая, матовая, флуоресцирующая); *цвет* (грязно-белый, белый, желтый, оранжевый, сиреневый, синий, красный, черный и т. д.); *структура* колоний (однородная, мелко- или крупнозернистая, радиально или концентрически исчерченная, мучнистая, пленчатая, врастающая в агар, легко снимающаяся иглой с агара); *консистенция* (маслянистая, тестообразная, слизистая, сухая, плотная, сметанообразная).

При посеве уколом, когда иглу с культурой вводят в столбик агара, отмечают интенсивность роста в верхней, средней или нижней частях укола.

При изучении колоний актиномицетов обращают особое внимание на *пигмент*, выделяемый в среду, *окраску воздушного и субстратного мицелия*. Значение имеет

структура и консистенция колоний (плотная, кожистая, порошковидная, рыхлая), *поверхность* колоний (мучнистая, пушистая, бархатистая) и *запах* колоний (землистый, эфирный, фруктовый).

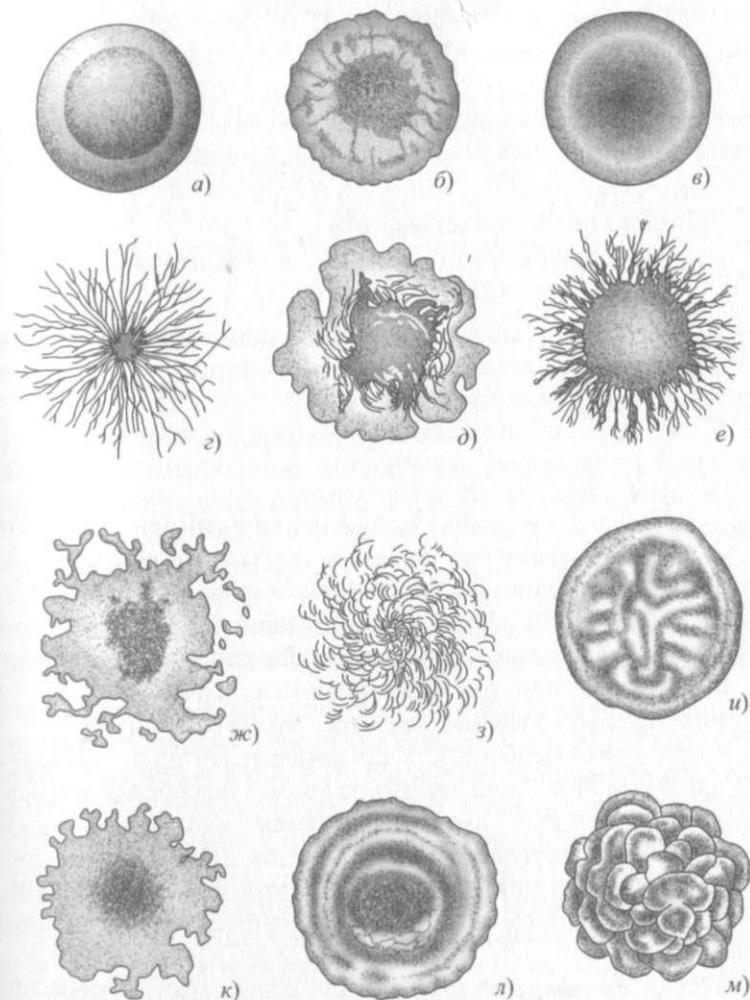


Рис. 10. Форма колоний микроорганизмов:

а — круглая; б — круглая с фестончатым краем; в — круглая с валиком по краю; з, д — ризоидные; е — круглая с ризоидным краем; ж — амебовидная; з — нитевидная; и — складчатая; к — неправильная; л — концентрическая; м — сложная

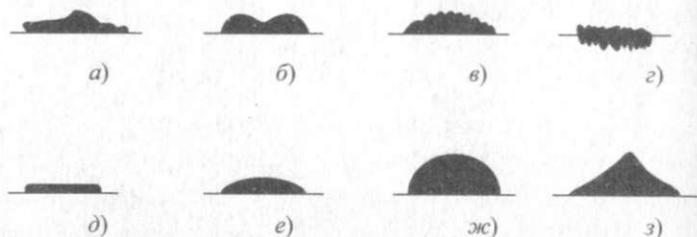


Рис. 11. Профиль колоний микроорганизмов:
 а — изогнутый; б — кратероидный; в — бугристый; г — врастающий в агар;
 д — плоский; е — выпуклый; ж — каплевидный; з — конусовидный

6.1.3. Определение качественного состава микроорганизмов по культуральным и морфологическим признакам

Из каждой группы колоний, выросших на плотных средах, готовят препарат и определяют по форме клеток, к какому роду микроорганизмов они относятся.

Из общего числа микроорганизмов, развивающихся на МПА, можно выделить следующие роды: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Mycobacterium*, *Actinomyces*.

Род *Pseudomonas*. На МПА микроорганизмы этого рода формируют колонии: круглые, неправильной формы, плоские и выпуклые, слизистые и пастообразные, просвечивающие, бесцветные или пигментированные (грязно-белые, синие, сине-зеленые, красные, желтые, бурые и черные).

Характерная особенность представителей рода — образование сине-зеленого или желто-зеленого флуоресцирующего пигмента. Некоторые колонии удается наблюдать только в ультрафиолетовых лучах. У других видов пигменты диффундируют в среду, окрашивая ее в соответствующий цвет. Образование определенного пигмента зависит от состава и реакции среды.

Клетки *Pseudomonas* прямые или слегка изогнутые, часто с заостренными концами. Они располагаются одиночно, парами или короткими цепочками. Размеры клеток $1,5-4 \times 0,5-1$ мкм. Двигаются эти организмы при помощи жгутиков (монотрихи или лопотрихи), не образуют чехлов; для них неизвестны стадии покоя. Бактерии *Pseudomonas* — аэробы, но

в анаэробных условиях способны использовать для дыхания кислород нитратов. Клетки грамтрицательные.

Род *Flavobacterium*. На МПА дают выпуклые или слабо выпуклые округлые колонии диаметром 2—3 мм с цельным краем, чаще гладкие и блестящие, прозрачные, желтого цвета за счет каротиноидных пигментов, не диффундирующих в среду, встречаются желтовато-оранжевые колонии, иногда и красные.

Клетки палочковидной формы ($0,5 \times 1,0-3,0$ мкм) с закругленными концами, неподвижны. Располагаются флавобактерии одиночно, парами и в виде коротких цепочек, иногда — в виде нити. Характерен защелкивающийся тип деления, или *снэпинг-тип* обособления делящихся клеток. Эндоспор не образуют. Грамотрицательные.

Род *Micrococcus*. На МПА, как правило, образуют колонии мелких и средних размеров (диаметр 2—4 мкм). Колонии могут быть: матовые, блестящие, маслянистые; гладкие, выпуклые, плоские; зернистые, мелкоскладчатые; пастообразной или слизистой консистенции, иногда встречаются сухие плотные; цвет колоний возможен белый, серый, реже колонии бесцветные, встречаются буроватые, обычно — желтые, розовые или красные. Пигменты в среду не диффундируют. Клетки мелкие (диаметр $0,2-1,5$ мкм), одиночные, могут встречаться пары, тетрады или скопления неправильной формы. Клетки неподвижные, не образуют эндоспор. Грамположительные.

Род *Sarcina*. Колонии средних размеров; круглые, компактные, выпуклые, плоские; гладкие, бугристые или складчатые, зернистой структуры; матовые или жирно-блестящие; желтые, лимонно-желтые, иногда розовые, красные, белые. Клетки сферические (диаметр $1,8-3$ мкм), соединены в пакеты. Пакет объемный — куб, состоит из 8 клеток, поскольку образуется при делении клетки в трех взаимно перпендикулярных плоскостях. Под микроскопом пакет выглядит состоящим из четырех клеток (одна сторона куба). Есть сарцины, у которых пакеты уложены упорядоченно по четыре, и под микроскопом они смотрятся как большие тьюки, состоящие из четырех пакетов (см. рис. 4, к).

Род *Mycobacterium*. Относится к группе микобактерий. На МПА микобактерии растут медленно или очень медленно.

Они образуют мелкие, круглые компактные колонии, иногда приподнятые; мягкие, пастообразной или слизистой консистенции (растекающиеся по субстрату), бывают сухие крошащиеся, бугристые складчатые; матовые, блестящие, бесцветные или окрашенные (розовые, оранжевые, желтые, зеленые, синие, бурые, черные). Пигмент в среду не выделяют. Молодые клетки — ветвистые или угловатые с неправильными контурами (3,0—7,0×0,7 мкм); с возрастом у большинства видов клетки распадаются на кокки и палочки. Обособление делящихся клеток происходит по снэпинг-типу. Большинство видов грамположительные.

Род *Bacillus*. Палочковидные бактерии, способные образовывать более или менее термоустойчивые споры. Во время формирования споры палочковидная форма клеток сохраняется. По характеру роста колоний на МПА (или МПА + сусло-агар) можно иногда определить видовую принадлежность бацилл. Клетки грамположительные. Аэробы.

B. megaterium — земляная палочка (от лат. *terra* — земля, почва). Колонии гладкие, белые, выпуклые, жирно-блестящие, редко — складчатые (рис. 12, а); края колоний резко очерчены или волнисто-бахромчатые. Споры овальные или цилиндрические, не шире материнской клетки, в поперечнике достигают 2 мкм. Длина клеток — 5—7 мкм и более (рис. 12, б).

B. subtilis (от лат. *sub* — внутри или под, *tilia* — липа, трава, луб; впервые выделена из сена) — сенная палочка. Колонии сухие мелкоморщинистые, бархатистые; бесцветные или розовые; срастающиеся с агаром; край колоний волнистый или слегка волнистый. Палочки короткие тонкие — 3—5×0,9 мкм. Споры овальные (0,9×0,6 мкм), расположены не строго цент-

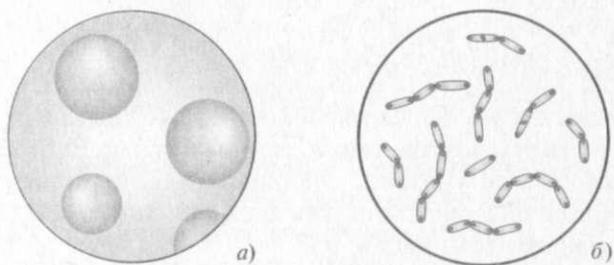


Рис. 12. *Bacillus megaterium*.
а — колонии на МПА; б — клетки двухсуточной культуры на МПА

рально, на некоторых средах — ближе к центру. Клетки подвижные (перитрихи).

B. mesentericus — картофельная палочка. Название связано не с картофелем, а с картофельной болезнью хлеба, которую она вызывает. Появляется картофельная палочка на качественном пшеничном хлебе (зерновом, барвихинском) при хранении его в течение нескольких дней в теплом месте при повышенной влажности, вызывая разрушение белковых веществ и крахмала. При ее интенсивном развитии внешние признаки мякиша изменяются: при разломе он становится тягучим и липким, появляется затхло-гнилостный, иногда с примесью сладковатого, запах. Колонии на МПА тонкие, сухие, морщинистые, серовато-белые. Палочки тонкие, длинные и короткие; подвижные (3—10×0,5—0,6 мкм); иногда они соединены в длинные нити. Споры овальные и продолговатые (0,9—0,5 мкм). При формировании спор клетки не меняют палочковидной формы. Прорастание спор экваториальное.

B. mycoides — грибовидная палочка. Образует колонии, напоминающие рост гриба: ризоидные или мицелиевидные, стелющиеся по поверхности агара. Пучки нитей отходят от края колоний, создавая иллюзию ветвления; нити изгибаются направо или налево, образуя право- или левовращающиеся формы колоний. Клетки в поперечнике — 0,8—1,2 мкм, по длине в зависимости от среды — 5—7 мкм, часто 10 мкм и более (рис. 13). Цитоплазма вакуолизирована, с гранулами запасных питательных веществ. Формы подвижные (перитрихи). Вид имеет много вариантов. Клетки грамположительные.

B. cereus (от лат. *cera* — восковой) — колонии восковидные, толстые, компактные, матовые со складчатым центром

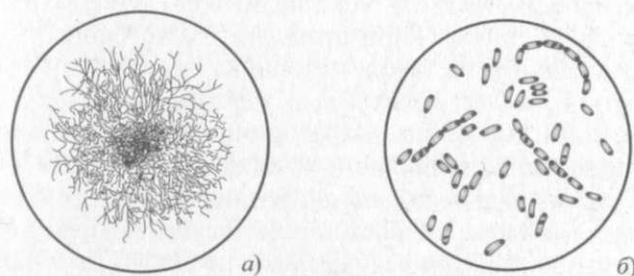


Рис. 13. *Bacillus mycoides*.
а — колонии на МПА; б — клетки трехсуточной культуры на МПА

и ризоидными волнистыми краями; иногда мелкобугристые, с бахромчатыми краями, от которых отходят тонкие сплетения нитей. Клетки толстые, диаметром 1—1,5 мкм, длиной 3—5 мкм, иногда и более; одиночные или соединены в цепочки, нити. Споры овальные (1,2—1,5×0,9 мкм), расположены субтерминально, прорастают полярно.

B. idosus (от лат. *idos* — образ, вид) — колонии сухие, матовые, плоские, мелкоморщинистые, легко и целиком снимающиеся иглой с поверхности агара. Клетки — тонкие прямые палочки (2—3×0,6 мкм), подвижные. Споры овальные, чаще образуются в центральной части клеток.

Род *Actinomyces* — лучистые грибы. Зрелые колонии (7—14 сут) обычно шероховатые, рыхлые по текстуре, могут быть бугристые, складчатые, бородавчатые с мучнистым налетом; разных оттенков; срastaются с субстратом и состоят из неспитированных ветвящихся нитей длиной 10—50 мкм.

6.2. Физиолого-биохимические признаки микроорганизмов

6.2.1. Общие сведения

При изучении физиолого-биохимических признаков микроорганизмов исследуют: отношение их к источникам углерода и азота; продукты жизнедеятельности, накапливающиеся в среде (кислоты, спирты, газы); отношение к кислороду, щелочам и другим факторам внешней среды.

Среди биохимических свойств культуры особенно важно **определение ее ферментативной активности.**

Активность *протеаз* устанавливают: во-первых, по разжижению желатины (при этом учитывают скорость, характер разжижения при уколе столбика желатины) (рис. 14), во-вторых, по свертыванию и пептонизации молока, т. е. отмечают кислотность по покраснению синей лакмусовой бумаги, образование устойчивого сгустка и коагуляцию с последующей пептонизацией, пептонизацию без предварительного свертывания, а также скорость происходящих изменений.

Активность *амилазы* определяют по величине зоны гидролиза крахмала, для чего делают пробы с раствором Люголя на 3—4-е сут после посева культуры на крахмало-аммиачном агаре.

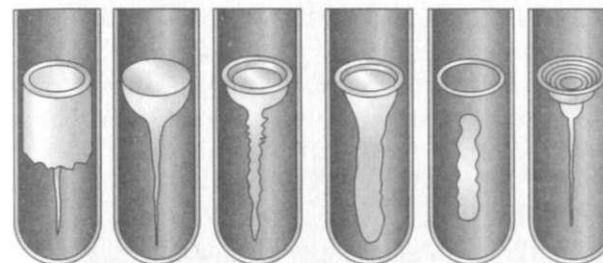


Рис. 14. Варианты разжижения желатины

Активность *целлюлазы* устанавливают по степени распада клетчатки на среде Гетчинсона; активность β -*фруктофуранозидазы* (*инвертазы*) — по гидролизу сахарозы с помощью реактива Фелинга (щелочной раствор оксида меди), который окисляет альдегидные соединения; при этом оксид меди переходит в закись — появляется красный осадок; активность *уреазы* — по накоплению аммиака, используя реактив Несслера; активность *нитратредуктазы* — по восстановлению нитрата (на среде Гильтая) до нитрита (нитрит проверяют в кислой среде цинк-иод-крахмалом).

Один из важнейших признаков актиномицетов — синтез ими антибиотиков. Определенное значение имеет и отношение этих микроорганизмов к источникам углерода.

6.2.2. Отношение к источникам углерода и азота

Чтобы установить доступные источники углерода, готовят *основную синтетическую среду*, содержащую следующие вещества (г/л дистиллированной воды): $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 3,0; KH_2PO_4 — 2,0; NaCl — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,3; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,01. Кроме того, в среду входит *смесь микроэлементов по Федорову* — 1 мл, которая содержит (г/л дистиллированной воды): H_3BO_3 — 5; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ — 5; KI — 0,5; NaBr — 0,52; $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ — 0,3.

К готовой минеральной среде добавляют 1% источника углерода. Обычно испытываемые пентозы (арабиноза, ксилоза), гексозы (глюкоза, левулеза, галактоза) стерилизуют при 100 °С в кипятильнике Коха; дисахариды (сахароза, мальтоза, лактоза), полисахариды (декстрин, крахмал, клетчатка), соли органических кислот (муравьиной, уксусной, масляной, янтарной, щавелевоуксусной, яблочной, винной, лимонной, пирон-

виноградной, глюконовой, салициловой, бензойной, протокатеховой), спирты (этиловый, глицерин, эритрит, маннит, дульцит), жиры и углеводы стерилизуют в автоклаве 30 мин при 1 атм.

При испытании источников азота в основной минеральной среде фосфат аммония заменяют двухзамещенным фосфатом калия (K_2HPO_4) и к среде добавляют 1% глюкозы или другого доступного углевода. В качестве источника азота обычно используют альбумин, пептон, а также аспарагин, глицин и другие аминокислоты, мочевины, аммиачные соли, соли азотистой и азотной кислот в количестве 0,1—0,2% объема питательной жидкости. Для выявления способности микроорганизмов усваивать молекулярный азот из питательной среды исключают все связанные формы азота.

6.2.3. Изучение продуктов жизнедеятельности

При использовании микроорганизмами источников углерода, в частности углеводов, продуктами их жизнедеятельности нередко бывают газы, кислоты и спирты.

Для обнаружения *газов* применяют посев уколом в агаровую среду в пробирки. При появлении газов столбик агара разрывается. Используют также жидкую среду с поплавками. *Поплавок* представляет собой небольшую узкую пробирку (3—4×0,5 см). Его опускают вверх дном в обычную пробирку с жидкой средой, которая при стерилизации заполняет поплавок. При развитии микроорганизмов, образующих газы, последние вытесняют жидкость из поплавка.

Образование *кислот* при посеве на средах, содержащих углеводы, устанавливают при помощи индикатора бромтимолблау, а их количество — титрованием 0,1 н. раствором щелочи. При наличии мела кислоты связываются в кальциевые соли, которые можно обнаружить добавлением к 5 мл среды 1 мл концентрированного раствора оксалата аммония. В присутствии кислот (например, уксусной) выпадает белый осадок, нерастворимый в воде.

Образование *спирта* определяют при отгонке части субстрата с последующей пробой на спирт (реакция на появление иодоформа).

Продуктами жизнедеятельности микроорганизмов на доступных источниках азота часто бывают: *аммиак* (проба с реактивом Несслера), *сероводород* и *меркаптан* (проба с

фильтровальной бумагой, смоченной ацетатом свинца), *индол* (проба с азотистой кислотой), *нитрит* (проба с цинк-йод-крахмалом в кислой среде). Редуктазную способность культур выявляют обесцвечиванием метиленового синего.

6.2.4. Отношение к кислотам и щелочам

Для выявления отношения микроорганизмов к кислотности питательной среды добавляют буферные смеси, поддерживающие соответствующую реакцию среды (рН 3,6—4 — цитратно-фосфатный буфер; 4,5—9,2 — фосфатный буфер; выше 9 — буферные смеси Na_2CO_3 и HCl в различных соотношениях, а также $NaOH$ и K_2HPO_4). После 8—10 сут инкубации при 28—30 °С по росту клеточной массы устанавливают предельные значения кислотности среды, при которых еще возможно развитие бактерий. Рост клеточной массы можно оценить по оптической плотности на ФЭКе.

6.2.5. Отношение к кислороду

Об отношении микроорганизмов к кислороду судят по росту культуры при посеве уколом в пробирку с агаровой или желатиновой средой. Аэробы развиваются в верхней части укола (рост в виде гвоздя); факультативные анаэробы — равномерно по всему уколу; анаэробы — в нижней его части.

6.2.6. Устойчивость к факторам внешней среды

Для определения устойчивости микроорганизмов к высоким концентрациям солей культуру выращивают на основной питательной среде с добавлением доступного источника углерода и азота, а также $NaCl$ или Na_2SO_4 в разных концентрациях. После инкубации при температуре 28—30 °С по степени накопления клеточной массы устанавливают оптимальные, максимальные и минимальные концентрации солей.

Для выявления устойчивости к температуре культуры на питательной среде (лучше жидкой) помещают в политермостат при разных температурах. Затем по степени накопления клеточной массы, как и в первом случае, выявляют оптимальные, минимальные и максимальные температуры.

Аналогично, создавая соответствующие условия, обнаруживают влияние других факторов внешней среды на развитие микроорганизмов.

6.2.7. Чувствительность к антибиотикам и лизоциму

Отношение микроорганизмов к антибиотикам можно выявить на агаровых пластинах методами агаровых блоков, штриха или методом диффузии антибиотика в агар с применением бумажных дисков.

Метод агаровых блоков заключается в следующем: в чашки Петри на агаровую питательную пластину, густо засеянную тест-организмом, помещают агаровые блоки с антибиотиками. Предварительно для получения блоков с этими веществами на поверхность питательной среды, предназначенной для выращивания продуцента антибиотика, высевают сплошным *газоном* соответствующую культуру. После того как микроорганизмы разовьются и образуют антибиотические вещества, диффундирующие в толщу агара (бактерии — на 4–5-е сут, грибы — на 6–8-е, актиномицеты — на 8–10-е сут), стерильным пробочным сверлом вырезают агаровые блоки. По окончании инкубации в термостате, время которой зависит от скорости роста тест-культуры, вокруг агаровых блоков с антибиотиками возникают зоны, в которых отсутствует рост тест-организма. По диаметру зоны судят о чувствительности тест-организма к тем или иным антибиотикам.

При использовании **метода штриха** на питательном агаре в чашках Петри по диаметру высевают культуру продуцента антибиотика. К выросшему организму вплотную подсевают перпендикулярно штрихами тест-культуры. Нечувствительные к антибиотику тест-культуры развиваются от самого края штриха продуцента; чем чувствительнее тест-организм к антибиотику, тем дальше от штриха происходит его рост.

Для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам часто используют **метод диффузии антибиотика в агар с применением бумажных дисков** (см. 15.4). Он заключается в следующем: одну петлю чистой культуры микроорганизма вносят в пробирку со стерильной водой. Стерильной пипеткой наносят на поверхность МПА в чашке Петри 0,02 мл (1 капля) полученной суспензии культуры и равномерно распределяют ее шпателем по поверхности агара. На поверхность засеянного агара стерильным пинцетом у пламени раскладывают диски, пропитанные различными антибиотиками. Чашки (вверх дном) помещают в термостат при 37 °С на 16–18 ч.

Измерять диаметр зон задержки роста микроорганизмов вокруг дисков с антибиотиками следует с учетом диаметров са-

мих дисков. Зоны диаметром до 10 мм указывают на малую чувствительность, зоны диаметром 10 и более мм — на среднюю и большую чувствительность микроорганизма к исследуемым антибиотикам.

Отношение микроорганизмов к лизоциму. *Лизоцимы* — белки-ферменты с антибиотическим действием, широко распространенные в мире животных. Особенно много их в слюне (например, у собак) и слезах (у человека). В концентрации 1 мкг/мл они гидролизуют хитин и его производные, разрушают клеточные стенки бактерий, в частности действуют на муреин, и поэтому особенно эффективно влияют на грамположительные бактерии (*Bacillus megaterium*, *Sarcina flava* и др.).

Материалы и оборудование

Чистые культуры бактерий на МПА, пробирки со столбиками мясопептонной желатины (МПЖ), пробирки с жидкой средой (МПБ) с разными концентрациями NaCl, стерильные пипетки Мора на 1 мл, бактериологические иглы, чашки Петри с пластинами МПА, шпатели Дригальского, агаровые блоки с актиномицетом — продуцентом антибиотика, пробирки со стерильной водой, бумажные диски, пропитанные разными антибиотиками.

Глава 7

Превращение микроорганизмами безазотистых органических веществ

7.1. Брожение

7.1.1. Общие сведения

Микроорганизмы в основном получают энергию при высвобождении ее из безазотистых органических веществ. Только небольшая их часть может использовать солнечную энергию или энергию окисления минеральных соединений. В зависи-

мости от того, каким путем идет разложение органических веществ, различают **брожение**, при котором высвобождение энергии происходит без доступа свободного кислорода, и **дыхание**, или **окисление**, когда выделение энергии происходит в аэробных условиях. Во втором случае энергия высвобождается полностью, и в качестве конечных продуктов окисления выделяются CO_2 и H_2O .

Брожение сопровождается частичным высвобождением энергии, заключенной в органическом веществе. Поэтому среди конечных продуктов этого процесса всегда находятся неположительно окисленные вещества, содержащие запасы химической энергии, — спирт, молочная кислота и др. В зависимости от основного продукта, образующегося в ходе этих процессов, брожения получили соответствующие названия: спиртовое, молочнокислотное, маслянокислотное и др.

Брожения, осуществляемые микроорганизмами, имеют большое значение в природе и широко используются в практической деятельности человека. Они лежат в основе пивоварения, виноделия, квашения овощей, силосования, переработки молока в кисломолочные продукты и сыр, мочения волокнистых растений (лен) и т. д.

При изучении процессов, вызываемых микроорганизмами, удобно пользоваться методом элективных культур.

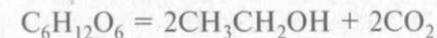
7.1.2. Спиртовое брожение

Вводные пояснения. **Спиртовое брожение** — это процесс превращения углеводов, вызываемый дрожжами, некоторыми видами бактерий (*Zyotomonas mobilis*, *Sarcina ventriculi* и др.) и отдельными представителями мукоровых грибов. Однако практическое значение имеет лишь спиртовое брожение, осуществляемое дрожжами.

Дрожжи встречаются на поверхности растений, плодов, ягод, зерна, в воздухе, почве. Это одноклеточные, неподвижные организмы диаметром 8—15 мкм (для сравнения: диаметр бактериальной клетки 0,5—0,7 мкм). Клетки дрожжей округлой, овальной или несколько удлинённой формы, содержат хорошо заметное под микроскопом ядро. В них встречаются различные включения: капли жира и волютина, сильно преломляющие свет; гликоген.

Дрожжи обычно размножаются бесполом путем: почкованием (*Saccharomyces* и др.), реже — делением (*Schizosaccharomyces*), но способны и к спорообразованию. Споры могут формироваться как без предварительного слияния двух клеток, так и после полового процесса, т. е. в результате слияния содержимого двух клеток. В первом случае сумки со спорами возникают непосредственно из вегетативных клеток, во втором — из образовавшейся зиготы развивается сумка, в которой формируется от 4 до 12 спор (число спор обычно кратно 4). Однако образование спор у дрожжей наблюдается редко. Их появлению способствует резкий переход культуры с богатого питательного субстрата на бедный и хорошая аэрация.

Дрожжи сбраживают углеводы (моно- и дисахариды) с образованием этилового спирта по схеме:



Источником азота служат пептоны, аминокислоты и аммонийные соли. Дрожжи дезаминируют аминокислоты, потребляя освобождающийся при этом азот. Образующиеся в процессе реакции высокомолекулярные спирты составляют главную часть сивушных масел. Дрожжи лучше развиваются при pH 4—6, устойчивы к высоким концентрациям сахара (до 70%) и спирта (до 14%).

Спиртовое брожение лежит в основе виноделия, пивоварения. В хлебопекарной промышленности дрожжи выполняют роль биологических разрыхлителей теста: при брожении и дыхании образуется диоксид углерода CO_2 , благодаря чему увеличиваются объем теста при выпечке и пористость хлеба. Большинство видов культурных дрожжей, используемых в бродильных производствах, принадлежит к роду *Saccharomyces*.

В пивоварении главное внимание обращают на полноту сбраживания мальтозы. В виноделии ценными оказываются побочные продукты, создающие «букет» вина.

Постановка опыта. Для изучения спиртового брожения используют синтетическую среду следующего состава (в объемных процентах): сахароза — 15,0; пептон — 0,5; KH_2PO_4 — 0,3; MgSO_4 — 0,1.

Опыт ставят в нестерильных условиях, однако благодаря созданию элективных условий — учету избирательных потребностей возбудителей спиртового брожения в среде будут разви-

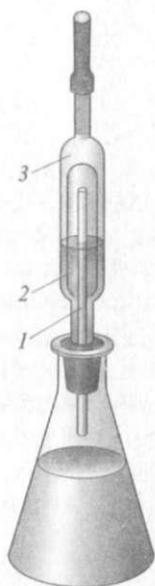


Рис. 15. Колба с затвором Мейссля для изучения спиртового брожения

ваться преимущественно дрожжи. При этом жизнедеятельность других групп микроорганизмов будет подавлена.

100 мл среды наливают в колбу Эрленмейера или плоскодонную колбу на 250—300 мл и вносят туда около 0,5 г пресованных или щепотку сухих дрожжей. Колбу закрывают каучуковой пробкой, в которую вставлен затвор Мейссля с резиновым клапаном Бунзена (рис. 15). В состав затвора Мейссля входят три стеклянные детали: *внутренняя стеклянная трубка (1)*, один конец которой входит в колбу, а другой — во *внутренний стеклянный резервуар (2)*, имеющий внизу отверстия, соединяющие его с *внешним (основным) резервуаром (3)*, который имеет выход вверх и вниз. Выход вверх закрыт толсто-стенной резиновой трубкой с небольшим продольным разрезом (клапан Бунзена). Верхний конец резиновой трубки закрыт стеклянной бусиной. Затвор легко пропускает выделяющийся при брожении диоксид углерода (CO_2), но испаряющаяся при инкубации в термостате влага, проходя через слой концентрированной серной кислоты (H_2SO_4), налитой в затвор, поглощается ею. Клапан также пропускает выделяющийся из колбы CO_2 , но не дает возможности наружному воздуху проникать в колбу.

Колбу взвешивают на технических весах с точностью до 0,01 г и ставят в термостат при 25 °С.

К условиям, способствующим преимущественному развитию дрожжей по сравнению с другими микроорганизмами, относятся: высокая концентрация сахара, слегка кислая реакция среды (за счет KH_2PO_4), анаэробные условия, накопление значительного количества спирта. Сумма этих факторов делает среду селективной для дрожжей.

■ **Определение CO_2 .** Диоксид углерода, образующийся при брожении, определяют по разности массы колбы при постановке опыта и после его окончания. Завершение про-

цесса брожения устанавливают по прекращению газообразования. Брожение обычно продолжается 2—3 дня. Несмотря на то что колбу взвешивают только на технических весах, учет CO_2 получается достаточно точным, так как в процессе брожения его выделяется много. Почти 50% сброженного сахара превращается в диоксид углерода:



	Глюкоза	Этиловый спирт	Диоксид углерода
Молекулярные массы	180	92 (2×46)	88 (2×44)

В опыте среда содержит 15 г сахара (см. Постановка опыта). При этом может выделиться 7—7,5 г CO_2 . Расчет количества образовавшегося спирта и сброженного сахара проводят, исходя из массы выделившегося диоксида углерода в соответствии с уравнением спиртового брожения.

Пример расчета. В процессе брожения образовалось 6 г CO_2 . Находим массы выделившегося спирта (x) и сброженного сахара (y):

$$88 \text{ г } \text{CO}_2 \text{ соответствуют } 92 \text{ г } \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$$

$$6 \text{ г } \text{CO}_2 \quad \gg \quad x \text{ г } \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$$

$$x = \frac{6 \cdot 92}{88} = 6,3 \text{ (г);}$$

$$88 \text{ г } \text{CO}_2 \text{ соответствуют } 180 \text{ г } \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$$

$$6 \text{ г } \text{CO}_2 \quad \gg \quad y \text{ г } \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$$

$$y = \frac{6 \cdot 180}{88} = 12,3 \text{ (г).}$$

■ **Определение интенсивности брожения.** Под *интенсивностью брожения* понимают отношение массы сброженного за определенный промежуток времени сахара к исходному его количеству в процентах.

Пример расчета. Если бы за время инкубации подверглись брожению все 15 г сахара, то интенсивность брожения составила бы 100%. В результате же опыта было сброжено 12,3 г сахара:

$$15 \text{ г сахара соответствуют } 100\% \text{ интенсивности брожения}$$

$$12,3 \text{ г сахара} \quad \gg \quad x \text{ интенсивности брожения}$$

$$x = \frac{12,3 \cdot 100}{15} = 82 \text{ (\%)}$$

■ **Микроскопирование дрожжей.** Познакомиться с морфологией дрожжей можно при исследовании препарата, приго-

Для микроскопических наблюдений за молочнокислыми бактериями готовят препарат из прокисшего молока. Бактериологическую петлю вводят в сгусток и, повернув вокруг оси, извлекают, прикасаясь ею к пленке, которую образует молочная плесень. Сгусток размазывают по предметному стеклу очень тонким слоем без воды. Сушат на воздухе. Фиксируют смесью спирта с эфиром (приблизительно 1 : 1), несколько раз нанося смесь на мазок и сливая ее. При такой фиксации не только погибают и прикрепляются к стеклу бактерии, но и с помощью эфира извлекается и удаляется жир, капли которого на препарате мешают окраске и микроскопированию.

Фиксированный препарат окрашивают метиленовым синим 2—3 мин, промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсией. Метиленовый синий — лучший краситель для молочнокислых бактерий молока, так как он слабо окрашивает основной фон (казеин) и хорошо — клетки микроорганизмов. На препарате преобладают мелкие округлые клетки *Lactococcus lactis*, соединенные в короткие цепочки. Эта бактерия — возбудитель естественного скисания молока в средних широтах. Оптимальная температура для ее развития — 30 °С. Она способствует накоплению в молоке до 1% молочной кислоты.

Нередко на препарате видны разных размеров тонкие палочки обычно правильной формы рода *Lactobacillus*, иногда содержащие зерна волютина. Чаше встречается *Lactobacillus bulgaricus* (рис. 16) — возбудитель естественного скисания молока в южных широтах. Оптимальная температура ее развития — 40 °С, она кислотоустойчива, накапливает до 3,5% молочной кислоты. На плотных средах эта бактерия образует мелкие ха-

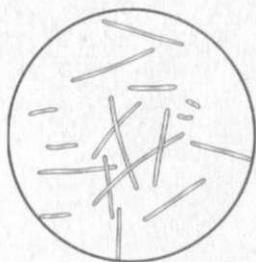


Рис. 16. *Lactobacillus bulgaricus*

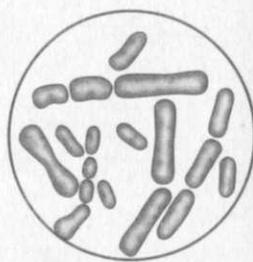


Рис. 17. Молочная плесень *Geotrichum candidum*

актерные колонии в виде комочков ваты, как правило, выпуклые, непрозрачные, непигментированные.

Если на поверхности прокисшего молока появилась пленка, то в мазке обнаруживается также и молочная плесень (рис. 17). Прямоугольные или овальные клетки ее отличаются от молочнокислых бактерий большими размерами.

Можно приготовить также фиксированные препараты из кисломолочных продуктов (йогурта, кефира, ацидофилина, ряженки, бифидока и др.) и зарисовать доминирующие формы.

Препараты из силоса или квашеной капусты готовят следующим образом: сначала втирают в предметное стекло кусочки силосовой массы (или капусты), подсушивают и фиксируют над пламенем горелки. Остывший препарат окрашивают эритрозинном (он в отличие от фуксина не окрашивает растительные элементы). И в силосе, и в квашеной капусте преобладают тонкие, хорошо прокрашивающиеся палочки *L. plantarum*.

Определение количества и качественные реакции на молочную кислоту. Количество молочной кислоты устанавливают по разности между объемами 0,1 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование молока в конце опыта, и при его постановке.

Для титрования берут 5—10 мл (лучше 10 мл) свежего или прокисшего молока, помещают его в колбу Эрленмейера на 100 мл, добавляют 20 мл дистиллированной воды, 1—2 капли фенолфталеина и титруют 0,1 н. раствором NaOH при постоянном взбалтывании до появления устойчивой слабо-розовой окраски. Если на поверхности прокисшего молока образовалась пленка, то, прежде чем взять сгусток, ее сдвигают пипеткой или стеклянной палочкой в сторону, затем разбивают сгусток, постукивая колбой о ладонь.

Кислотность молока выражают в градусах Тернера (°Т) или процентах молочной кислоты. Так, 1 °Т соответствует 1 мл 0,1 н. раствора щелочи, пошедшей на титрование 100 мл молока. Следовательно, если на титрование 10 мл молока пошло x мл щелочи, то для выражения кислотности молока в градусах Тернера нужно значение x умножить на 10.

Чтобы выразить кислотность в процентах молочной кислоты, количество 0,1 н. раствора NaOH (в мл), потраченное на титрование 100 мл молока, умножают на 0,009, так как 1 мл 0,1 н. NaOH нейтрализует эквивалентное количество молоч-

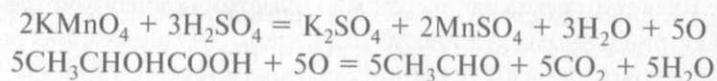
ной кислоты. Молекулярная масса молочной кислоты составляет 90. Для приготовления 1 л 1 н. раствора требуется 90 г кислоты. В 1 л 0,1 н. раствора содержится 9 г, а в 1 мл — 0,009 г молочной кислоты.

После определения титруемой кислотности оставшееся скисшее молоко отфильтровывают через бумажный складчатый фильтр. Фильтрат используют для **качественных реакций на молочную кислоту**.

Для проведения реакции «серебряного зеркала» молочную кислоту превращают в уксусный альдегид. Реакция происходит в кислой среде при температуре кипения в присутствии KMnO_4 . Результатом взаимодействия уксусного альдегида с аммиачным раствором серебра является образование металлического серебра (серебристое окрашивание).

Последовательность проведения этой качественной реакции на молочную кислоту следующая. В коническую колбу на 100 мл набирают пипеткой 5 мл фильтрата, добавляют 2 мл концентрированной серной кислоты и нагревают на асбестовой сетке до начала кипения, периодически взбалтывая. Затем, продолжая кипячение и помешивание, пипеткой по каплям приливают 5 мл 5%-ного раствора KMnO_4 , который при этом обесцвечивается. В результате молочная кислота превращается в уксусный альдегид.

Происходящие химические реакции можно выразить следующими уравнениями:



Для распознавания уксусного альдегида горлышко колбы без промедления накрывают фильтровальной бумагой, смоченной аммиачным раствором AgNO_3 .

Аммиачный раствор нитрата серебра готовят следующим образом: к 1—2 мл 10%-ного раствора AgNO_3 в пробирке добавляют по каплям аммиак: сначала появляется осадок Ag_2O , который затем растворяется в избытке аммиака.

Аккуратно, чтобы не разорвать, фильтровальную бумагу прижимают к краям горла колбы, продолжая нагревание. Уксусный альдегид улетучивается и, реагируя с аммиачным раствором AgNO_3 , вызывает почернение бумаги, имеющее серебристый оттенок, — это выделяется металлическое серебро.

Другой качественной реакцией на молочную кислоту служит реакция с тиофеном. Для ее проведения в пробирку

к 1—2 мл фильтрата прибавляют 5 мл концентрированной серной кислоты и 0,5 мл насыщенного раствора CuSO_4 . Смесь взбалтывают, нагревают 5 мин на водяной бане при 100°C и после охлаждения добавляют к ней несколько капель 0,2%-ного спиртового раствора тиофена. В присутствии молочной кислоты наблюдается вишнево-красное окрашивание. Реакция очень чувствительна и специфична.

Материалы и оборудование

Свежее молоко, колбы на 100 мл, цилиндры на 100 мл, пипетки на 5 и 10 мл; 0,1 н. раствор NaOH , фенолфталеин, треножки с сеткой, микроскопы и все необходимое для приготовления препаратов, воронки, фильтры, 10%-ный раствор AgNO_3 , 13%-ный раствор NH_4OH , H_2SO_4 (плотность 1,84); 0,2%-ный спиртовой раствор тиофена, 5%-ный раствор KMnO_4 , метиленовый синий.

7.1.4. Маслянокислое брожение

Вводные пояснения. Возбудители маслянокислого брожения — строгие анаэробы, подвижные палочки с кластридиальным или плектридиальным типом спорообразования.

По преобладанию тех или иных конечных продуктов маслянокислое брожение подразделяют на **истинно маслянокислое брожение** (брожение глюкозы, крахмала), **ацетонобутиловое брожение**, брожение **пектиновых веществ**.

Маслянокислые бактерии широко распространены в почве (как правило, содержатся в 90% почвенных образцов), навозе, загрязненных водоемах, в разлагающихся растительных остатках, молоке, на поверхности растений и т. д.

Процесс маслянокислого брожения протекает по схеме:



Кроме масляной, в процессе брожения в заметных количествах образуется уксусная кислота, а при подкислении среды (до pH 5,5) — значительные количества бутилового спирта и ацетона.

Энергетическим материалом для маслянокислых бактерий служит крахмал, водорастворимые углеводы (декстрины, ди-, моносахариды), органические кислоты (молочная, пировиноградная) и спирты (маннит, глицерин). В качестве источ-

ника азота бактерии используют самые различные азотистые соединения: пептон, аминокислоты, аммиачные соли, а некоторые — даже атмосферный азот.

Характерная особенность маслянокислых бактерий — способность накапливать в клетках гранулы перед образованием спор.

Постановка опыта. Для изучения маслянокислого брожения можно воспользоваться средой МПБ с добавлением 3—5% глюкозы. Чтобы в этой среде развивались преимущественно маслянокислые бактерии, следует создать в ней строго анаэробные условия и после заражения почвой нагреть до кипения. При нагревании споры маслянокислых бактерий остаются жизнеспособными, а неспорообразующие бактерии погибают.

В колбу Вюрца объемом 250—500 мл наливают 30—50 мл питательной среды, вносят примерно 0,5 г почвы и $\frac{1}{4}$ чайной ложки мела для нейтрализации образующейся в процессе брожения масляной кислоты. На асбестовой сетке колбу нагревают до кипения, не закрывая пробкой. Сняв с огня, колбу охлаждают под струей водопроводной воды, закрывают сверху каучуковой пробкой, а на боковой тубус надевают каучуковую трубку с винтовым зажимом.

Присоединив колбу через каучуковую трубку к насосу (водоструйному или, лучше, масляному насосу Камовского), открывают винтовой зажим и выкачивают из колбы воздух до появления в среде пузырьков. Затем каучуковую трубку зажимают винтовым зажимом и колбу ставят в термостат при 30—35 °С.

Маслянокислое брожение крахмала также исследуют на среде с картофелем. Сырой неочищенный картофель нарезают мелкими кубиками, заполняют ими $\frac{1}{3}$ высокой пробирки, добавляют немного мела, заливают водопроводной водой на $\frac{2}{3}$ и помещают на водяную баню при 80 °С на 10 мин для пастеризации. В среду не вносят ни почвы, ни маслянокислых бактерий, так как на кожуре картофеля всегда есть их споры.

Элективные условия создают:

- наличием крахмала — источника углерода, используемого только микроорганизмами, содержащими фермент амилазу;

- пастеризацией;

- анаэробизмом (высокий столбик жидкости в пробирке и выделение в процессе брожения CO_2 и H_2 , вытесняющих воздух).

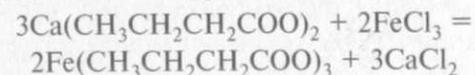
Через 2—3 дня картофель всплывает вследствие бурно идущего газообразования. По окончании брожения культуральную жидкость используют для исследования морфологии маслянокислых бактерий и качественного определения продуктов брожения.

Микроскопирование маслянокислых бактерий. Питательную среду из колбы Вюрца или пробирки с картофелем берут пипеткой, закрыв указательным пальцем верхний конец и погружив ее кончик в средний слой сброженной жидкости. Слегка приподняв палец, набирают в пипетку жидкость, снова зажимают пальцем верхний конец пипетки и, вынув ее из колбы, наносят каплю на предметное стекло. К накопительной культуре добавляют каплю раствора Люголя и накрывают покровным стеклом, на которое наносят каплю кедрового масла.

При микроскопировании препарата обнаруживаются клетки *Clostridium* (от лат. *close* — закрыть, *clostrum* — замок, *tridium* — надолго, долгоживущие, поскольку имеют спору в жизненном цикле) *butyricum* (от греч. *butyrum* — масло), *C. butylicum*, *C. pasteurianum* (см. рис. 4, ж) и других бактерий, имеющих подобную форму. В клетках можно заметить овальные тельца, сильно преломляющие свет. Это споры. В тех местах клетки, где содержится гранула, возникает сине-фиолетовое окрашивание. Зарисовывают только окрашенные клетки, явно относящиеся к группе маслянокислых бактерий. Особенно хороший материал для наблюдений получается при постановке опыта на картофеле.

Качественные реакции на масляную кислоту. Получение маслянокислого железа (реакция с FeCl_3). Нейтральные растворы маслянокислых солей при нагревании с FeCl_3 приобретают коричневое окрашивание вследствие образования маслянокислого железа.

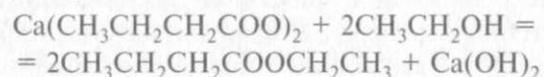
В пробирку наливают 3—5 мл сброженной жидкости, добавляют 1—2 мл 5%-ного хлорида железа и нагревают на пламени. Реакция идет по уравнению:



Раствор маслянокислого железа в отраженном свете имеет буровато-коричневый цвет, а в проходящем свете — кроваво-красный.

Получение масляноэтилового эфира (ананасовой эссенции). К 3—5 мл культуральной жидкости в пробирке прибавляют 0,5 мл 96%-ного этилового спирта и 1—2 мл концентрированной серной кислоты. При взбалтывании и нагревании появляется характерный запах эфира (запах ананаса).

Реакция протекает по уравнению:



Материалы и оборудование

МПБ, глюкоза, картофель, мел, колбы Вюрца, винтовые зажимы, каучуковые пробки и трубки, водоструйный насос или масляный насос Камовского, пробирки, пипетки, водяная баня, раствор Люголя (I + KI), 5%-ный раствор FeCl₃, предметные и покровные стекла, микроскопы.

7.1.5. Брожение пектиновых веществ

Вводные пояснения. Пектиновые (от греч. *pēktos* — студнеобразный) вещества нерастворимы в воде, но способны к набуханию. Они в значительном количестве содержатся в любом растительном материале. В технических культурах (лен, конопля, кендырь и др.) лубяные волокна соединены с кострой и паренхимой при помощи пектиновых веществ. Поэтому брожение последних нашло широкое применение при технической обработке волокнистых растений.

Пектин разрушается микроорганизмами, содержащими фермент пектиназу. Процесс брожения пектиновых веществ состоит из двух последовательных стадий. В первой стадии они гидролизуются до сахаров, во второй идет дальнейшее сбраживание отдельных продуктов гидролиза (галактозы и арабинозы) до масляной кислоты, CO₂, H₂ или H₂O.

Возбудители маслянокислого брожения пектиновых веществ — облигатные анаэробы. Они подвижны, образуют споры; сбраживают пектин, глюкозу, арабинозу, крахмал, но не сбраживают целлюлозу; малотребовательны к источникам азота. Наряду с пектином хорошо усваивают минеральные формы азота.

Постановка опыта. Снопик льняной соломы высотой 6—7 см перевязывают в двух местах ниткой и вносят в пробирку лучше большего, чем стандартный, размера, наполненную на 2/3

водопроводной водой. Пробирку зажимают пинцетом и кипятят на горелке 2—3 мин для удаления экстрактивных (легкосбраживаемых) веществ, которые могут служить источником углерода для других маслянокислых бактерий. Вода приобретает желто-зеленый цвет. Ее сливают. Вновь наполняют пробирку водопроводной водой, кипятят несколько минут и сливают. Так поступают 5—6 раз. После последнего кипячения жидкость не сливают. Охлаждают пробирку под краном, и в снопик вводят свежую соломинку, не подвергавшуюся нагреванию.

Пробирку со снопиком ставят в термостат при 30—35 °С. Через 2—3 дня в ней начинается брожение, а через 5—8 сут оно заканчивается. Накопление в культуральной жидкости масляной кислоты наряду с уксусной, образующейся при сбраживании продуктов гидролиза пектина, можно обнаружить при помощи качественных реакций на масляную кислоту (см. 7.1.4).

Микроскопирование. Извлекают снопик из пробирки, из его середины вынимают несколько соломинок и выжимают из них немного жидкости на предметное стекло. Добавляют каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют с иммерсионной системой.

На препарате обычно видны крупные палочковидные бактерии с плектридиальным типом спорообразования (*баранная палочка*) и прерывистым расположением гранулы, окрашенной в синий цвет. Это *Clostridium pectinovorum* (рис. 18). Нередко обнаруживается *C. felsineum* — палочки меньшего размера сигарообразной формы со спорой на конце. Гранулы может заполнять всю вегетативную часть клетки.

Материалы и оборудование

Льняная солома, пробирки, ножницы, водяная баня, раствор Люголя, 5%-ный раствор FeCl₃, пипетки, пинцеты, скальпели, предметные и покровные стекла, микроскопы

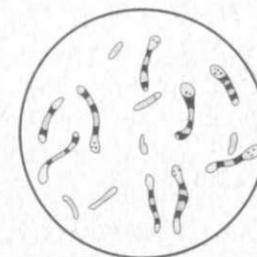


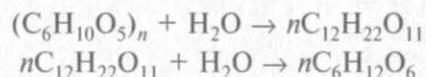
Рис. 18. *Clostridium pectinovorum* в клетках паренхимы льняного стебля

7.1.6. Брожение целлюлозы

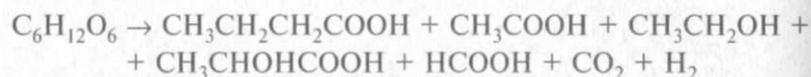
■ **Вводные пояснения.** Целлюлоза разрушается в анаэробных условиях различными спорообразующими бактериями, распространенными в почве, навозе, разлагающихся растительных тканях, рубце жвачных животных.

Упрощенно этот процесс может быть представлен следующим образом:

Первый этап — гидролиз целлюлозы целлюлазой, образование дисахарида целлобиозы, ее гидролиз целлобиазой и образование моносахаридов (глюкозы):



Второй этап — сбраживание глюкозы:



■ **Постановка опыта.** Для получения накопительной культуры мезофильных целлюлозоразрушающих бактерий в круглую плоскодонную колбу вносят около 1–2 г фильтровальной бумаги или вату, нарезанную узкими полосами, и заливают доверху средой следующего состава (%): KNH_4HPO_4 — 0,2; KH_2PO_4 — 0,1; $CaCl_2$ — 0,03; пептон — 0,1; $MgSO_4$ — 0,05; $CaCO_3$ — 0,5.

Среду заражают небольшим количеством почвы, закрывают колбу корковой пробкой с отверстием для выхода газов и ставят в термостат на 30–35 °С.

Элективные условия в данном случае определяются присутствием целлюлозы — источника углерода, который может потребляться только специфическими целлюлозоразлагающими бактериями, имеющими фермент целлюлазу, а также анаэробными условиями. Пептон, введенный в среду в небольшом количестве, практически не нарушает элективности среды, но сильно стимулирует процесс брожения.

Через 7–10 сут начинается брожение целлюлозы, которое длится 2–3 недели. Фильтровальная бумага по мере сбраживания слегка ослизняется, желтеет и постепенно разрушается.

Для получения накопительной культуры термофильных целлюлозоразлагающих бактерий можно пользоваться пита-

тельной средой следующего состава (в г/л водопроводной воды): $NaNH_4HPO_4$ — 1,0; KH_2PO_4 — 0,5; K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4$ — 0,4; $NaCl$ — 0,1; $MnSO_4$ и $FeSO_4$ — следы; пептон — 0,5; $CaCO_3$ — 0,5.

На дно длинной пробирки помещают полоски фильтровальной бумаги слоем 1,5–2 см, заливают пробирку на $\frac{2}{3}$ средой и заражают небольшим количеством конского навоза. Пробирку инкубируют при 60 °С. Через 5–7 сут начинают интенсивно выделяться газы. Бумага приобретает желтую окраску и постепенно превращается в аморфную массу.

■ **Микроскопирование.** При исследовании мезофилов извлекают пинцетом со дна колбы кусочек разлагающейся бумаги и размазывают по предметному стеклу без добавления воды. Мазок сушат обычным способом, фиксируют на пламени горелки и окрашивают фуксином.

В пробирках с термофилами (инкубация при 30–35 °С) развиваются длинные тонкие палочки с круглой спорой на конце — *Clostridium omelianskii* (рис. 19). В накопительной культуре термофильных целлюлозоразлагающих бактерий чаще всего наблюдают длинные крупные палочки с грушевидной спорой на конце — *C. dissolvens*.

Материалы и оборудование

Соответствующие среды, фильтровальная бумага, пептон, колбы круглые плоскодонные на 100–150 мл, корковые пробки с отверстиями, почва, пинцеты, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

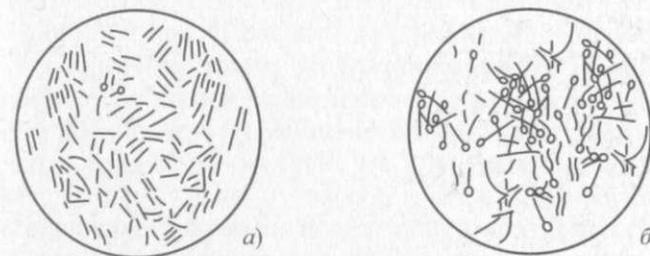


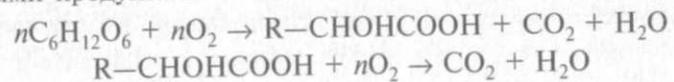
Рис. 19. *Clostridium omelianskii*.

а — молодые клетки; б — клетки со спорами

7.2. Окисление

7.2.1. Окисление целлюлозы

■ **Вводные пояснения.** Этот процесс наиболее широко распространен в природе, так как целлюлоза составляет подавляющую часть растительных остатков. В хорошо аэрируемой почве ее окисляют аэробные микроорганизмы (бактерии, грибы и актиномицеты). Они вырабатывают ферменты целлюлазу и целлюбиазу, вызывающие гидролиз целлюлозы до глюкозы (см. 7.1.6), которую затем окисляют до CO_2 и H_2O ; промежуточными продуктами окисления являются оксикислоты:



■ **Постановка опыта.** Для воспроизведения процесса окисления целлюлозы в лабораторных условиях можно использовать **метод Виноградского на гелевых пластинах**. Для приготовления пластин из кремнекислого геля соляную кислоту плотностью (d) 1,9 в высоком цилиндре разбавляют водой до $d = 1,10$ (на каждые 500 мл концентрированной соляной кислоты следует добавить примерно 500 мл дистиллированной воды). Жидкое стекло ($\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ или K_2SiO_3) наливают в другой высокий цилиндр и разводят дистиллированной водой до $d = 1,06-1,08$ (на 100 мл жидкого стекла следует прилить примерно 500 мл воды). Для установления плотности растворов пользуются ареометрами. Цилиндры и ареометры после разбавления жидкого стекла и кислоты тщательно отмывают.

Полученные после разбавления соляную кислоту и жидкое стекло смешивают в равных объемах; при этом второе вещество осторожно прибавляют к первому при постоянном помешивании. Чтобы устранить возможность появления в толще геля чечевичеобразных полостей, полученный раствор нагревают до кипения, хорошо перемешивают и разливают в чашки Петри слоем не менее 0,7 см. Через 8—10 ч образуется гель. Дав ему хорошо застыть и обсохнуть сверху, чашки с застывшим гелем помещают в эмалированную кастрюлю или большой стеклянный сосуд и ставят под кран для промывания. На водопроводный кран надевают толстую каучуковую трубку, конец которой опускают на дно кастрюли или сосуда. Струя во-

ды должна быть слабой. Промывают в течение 5—7 дней до исчезновения следов хлора 1%-ным AgNO_3 в присутствии HNO_3 . Отмытые от следов хлора чашки с кремневыми пластинами окунают в кипящую воду, а при необходимости стерилизуют в кипятильнике Коха при 100°C 3 раза по 30 мин через каждые 24 ч.

Промытые и прокипяченные гелевые пластины пропитывают 2—3 мл среды следующего состава (г/200 мл дистиллированной воды): $\text{KNO}_3 - 2,5$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1,0$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,5$; $\text{NaCl} - 0,5$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,01$; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,01$.

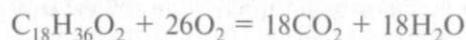
Поверхность геля покрывают стерильным кружком фильтровальной бумаги, по которому раскладывают (по трафарету) 50 комочков почвы (диаметром 1—2 мм) или наносят суспензию почвы соответствующего разведения (см. 8.2.1). Чашки помещают во влажную камеру вверх дном и ставят в термостат при $28-30^\circ\text{C}$. На 8—10-е сут вокруг комочков почвы появляются розовые, зеленые, желтые, буровато-желтые колонии бактерий.

Плотность обрастания комочков почвы целлюлозоразрушающими микроорганизмами выражают в процентах. Число комочков почвы, разложенных на чашке, принимают за 100%. Затем подсчитывают процент комочков почвы, вокруг которых развились колонии целлюлозоразрушающих микроорганизмов.

При отсутствии гелевых пластин микроорганизмы, окисляющие целлюлозу, можно выявить по **методу Омелянского**. Для этого в колбу Эрленмейера на 100—150 мл наливают 30 мл питательной среды, содержащей в водопроводной воде 0,1% NH_4Cl и 0,05% K_2HPO_4 . К раствору добавляют $1/3$ чайной ложки испытуемой почвы, погружают в колбу со средой складчатый фильтр конусом вверх (высота фильтра не должна превышать $3/4$ высоты колбы) и ставят в термостат при $28-30^\circ\text{C}$. На границе между воздухом и средой на целлюлозе будут развиваться аэробные целлюлозоразрушающие бактерии. Бумага постепенно станет слизистой, местами покроется желтыми пятнами колоний миксобактерий.

■ **Микроскопирование.** На препаратах, приготовленных из колоний, выросших на поверхности геля, можно обнаружить представителей разных родов. Наиболее часто встречаются следующие роды.

Продукты гидролиза в дальнейшем аэробные микроорганизмы окисляют до диоксида углерода и воды:



Постановка опыта. Для знакомства с процессом окисления жира и его возбудителями достаточно сначала приготовить элективную минеральную среду, не содержащую источника углерода, — среду Рана (г/л дистиллированной воды): K_2HPO_4 — 5; $CaCl_2$ — 1; $(NH_4)_3PO_4$ — 5; $NaCl$ — следы; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1; $FeCl_3 \cdot 7H_2O$ — следы. Затем 30 мл среды наливают в колбу Эрленмейера на 100 мл и добавляют $\frac{1}{3}$ чайной ложки почвы. В качестве источника углерода вносят кусочек расплавленного свиного сала или говяжьего жира.

Культура жирокисляющих бактерий и грибов развивается также и на касторовом масле. В 30 мл среды достаточно внести 1 мл масла. По мере развития жирокисляющих микроорганизмов в прозрачном касторовом масле появляются белые хлопья нерастворимых в воде жирных кислот. Можно использовать и обычное подсолнечное масло.

Микроскопирование. Готовят препарат, стараясь захватить гидролизованные хлопья жира с поверхности или из глубины культуральной жидкости. Сушат его при комнатной температуре, фиксируют смесью спирта с эфиром (1 : 1), удаляя одновременно остатки жира, затем красят фуксином.

При микроскопировании можно обнаружить неспороносные палочки *Pseudomonas fluorescens* (рис. 21), *P. stutzeri*, иногда на жире развиваются актиномицеты и молочная плесень *Geotrichum candidum* (см. рис. 17).

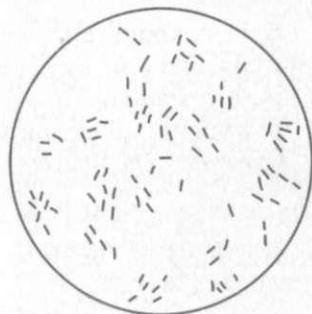


Рис. 21. *Pseudomonas fluorescens*

Материалы и оборудование

Минеральная среда Рана, свежая почва, колбы Эрленмейера на 100 мл, мерные цилиндры на 200 мл, алюминиевые ложки (металлические или фарфоровые шпатели), пипетки Мора на 1 мл. Микроскопы и все необходимое для приготовления окрашенных препаратов и микроскопирования. Смесью спирта с эфиром (1 : 1), бюретки с 0,1 н. спиртовым раствором $NaOH$, фенолфталеин.

7.2.3. Окисление углеводов

Вводные пояснения. Широкая механизация сельского хозяйства приводит к загрязнению сельскохозяйственных земель значительным количеством углеводов. Так, керосин и бензин, используемые в тракторных, автомобильных и других двигателях, мазут и дизельное топливо, применяемые на сельских электростанциях, попадая в почву, приводят к нарушению ее свойств, ухудшают экологическую ситуацию, а аварийные разливы нефти превращают почву в техногенную пустыню. Состав нефти и нефтепродуктов характеризуется высоким процентом парафиновых, нафтеновых и ароматических углеводов. В почве эти продукты окисляют микроорганизмы.

Постановка опыта. Для получения накопительной культуры углеводородокисляющих бактерий в колбу на 250 мл наливают 100 мл жидкой питательной среды (или в колбу на 150 мл — 30 мл среды) следующего состава (%): KNO_3 — 0,4; KH_2PO_4 — 0,06; Na_2HPO_4 — 0,06; $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ — 0,14; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,08; водопроводная вода. pH среды — 7,2—7,3 — устанавливают по бромтимолблау.

В качестве единственного источника углерода добавляют 2 мл керосина или вазелинового масла. Для заражения среды в колбу помещают $\frac{1}{3}$ чайной ложки почвы из пробы, отобранной у бензоколонки или у гаража. Колбы помещают на качалку в термостат при 30 °C на 4—6 сут.

Микроскопирование. Для знакомства с микроорганизмами, окисляющими углеводороды, из накопительной культуры готовят фиксированный и окрашенный препарат.

Углеводороды хорошо окисляют представители родов *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. putida*), *Mycobacterium*, *Arthrobacter* и *Nocardia*.

7.2.4. Окисление углеводов чистой культурой микроорганизмов (по Макклангу)

Для выявления способности чистой культуры микроорганизмов разлагать парафин готовят стерильную агаризованную

среду следующего состава (г/л дистиллированной воды): NaNO_3 — 2,0; K_2HPO_4 — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,008; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,002; агар — 20.

Расплавленную агаризованную среду разливают в стерильные чашки Петри, в которые одновременно вносят стерильной стеклянной пипеткой 3—4 капли стерильного расплавленного парафина, затем круговыми движениями перемешивают содержимое чашек. После охлаждения на поверхности остывшего агара образуются островки парафина в виде тонких пленок. На поверхность агара наносят каплю (0,05 мл) густой суспензии чистой культуры бактерий, испытываемой на способность окислять парафин, и размазывают ее стерильным стеклянным шпателем по всей поверхности агара. Чашки помещают вверх дном во влажную камеру и ставят в термостат при 28—30 °С. После 2—3 недель инкубации микроорганизмы, способные окислять парафин, разрастаются вокруг пленок парафина и покрывают их сплошным толстым слоем.

Если вместо чистой культуры микроорганизмов, способных окислять парафин, на поверхность агаровых пластин нанести каплю почвенной суспензии, то можно выявить формы почвенных микроорганизмов, способные окислять парафин.

Материалы и оборудование (к 7.2.3 и 7.2.4)

Основная жидкая питательная среда для накопительной культуры без источника углерода, склянка с керосином или вазелиновым маслом, почва, колбы на 250 и 100 мл, цилиндр на 100 мл, алюминиевая чайная ложка, вата для пробок, пипетки Мора на 1 мл. Стерильная агаризованная среда Маккланга, стерильный парафин, стерильные чашки Петри, стерильная водопроводная вода — 100 мл, шпатели, чистые культуры микобактерий или нокардий, окисляющих парафин. Микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

Глава 8

Превращение микроорганизмами органических и минеральных соединений азота

8.1. Минерализация азотсодержащих органических соединений

8.1.1. Аммонификация белковых веществ

Вводные пояснения. *Аммонификация* — это превращение органических форм азота в аммиачный азот. Ее вызывают различные микроорганизмы (бактерии, актиномицеты и грибы). Микроорганизмы, осуществляющие аммонификацию белковых веществ, выделяют в окружающую среду протеолитические ферменты (протеазы и пептидазы), под действием которых белки гидролизуются до аминокислот. В свою очередь, аминокислоты, поступая в клетку, дезаминируются с образованием аммиака (NH_3), органических кислот и других продуктов. В белках $\text{C}:\text{N} = 3,5:1$. При разложении белков в анаэробных условиях выделяются также H_2S , меркаптаны, скатол и индол, имеющие неприятный запах, кадаверин и путресцин (диамины). В аэробных условиях конечными продуктами являются NH_3 , CO_2 , H_2O , сульфаты.

Постановка опыта. Для изучения аммонификации белковых веществ питательной средой может служить мясной бульон с добавлением 3% пептона.

По 30 мл среды разливают в 4—5 колб Эрленмейера на 100 мл и добавляют по $\frac{1}{3}$ чайной ложки почвы. Колбы закрывают ватными пробками. Над средой подвешивают две бумажки — красную лакмусовую, или универсальную индикаторную бумагу, смоченную дистиллированной водой, для обнаружения выделяющегося аммиака и фильтровальную, смоченную щелочным раствором ацетата свинца, для выявления сероводорода и меркаптана. Закрепляют их между пробкой и стенками горлышка колбы. Бумажки не должны касаться среды. Сверху колбы прикрывают пергаментной бумагой.

На 3—5-е сут инкубации при 28—30 °С опыт заканчивают и содержимое колбы анализируют. Определяют возбудителей процесса аммонификации белка и продукты их жизнедеятельности.

Микроскопирование. Для обнаружения возбудителей гнилостного распада белковых веществ готовят препарат живых бактерий в раздавленной капле, а также фиксированный и окрашенный препарат.



Рис. 22. *Proteus vulgaris*

Чаще других на препарате встречаются подвижные клетки *Proteus vulgaris* (от греч. *Prōteus* — в древнегреческой мифологии морское божество, способное менять свой облик; от лат. *vulgāris* — обыкновенный, простой) (рис. 22), обладающие на первых стадиях распада белков. Это неспорообразующие, неодинаковой длины палочки. Кроме того, на препарате много спорообразующих клеток *Bacillus mycoides* (см. рис. 13, б) и *Clostridium putrificus* (см. рис. 4, з). У последних споры расположены терминально и диаметр их превышает ширину клетки.

Bac. mycoides вызывает аммонификацию белковых веществ в аэробных условиях, а *C. putrificus* — в анаэробных, но может также развиваться и в аэробных условиях, если в среде находятся аэробные микроорганизмы, поглощающие кислород.

Качественные реакции на продукты гнилостного распада белка. Выделяющийся в атмосферу NH_3 окрашивает подвешенную полоску красной лакмусовой бумаги в синий цвет.

Накопление **аммиака** в культуральной жидкости устанавливают при помощи реактива Несслера. Реакция капельная. На фарфоровые пластинки с лунками или в чашки помещают каплю культуральной жидкости, затем — каплю реактива. При большом количестве аммиака образуется коричневый или буроватый осадок, при небольшом — появляется оранжевая или желтая окраска.

Сероводород обнаруживают с помощью подвешенной полоски фильтровальной бумаги, смоченной ацетатом свинца $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$. Бумага чернеет под действием сероводорода. Если она покрывается серебристым налетом, значит, наряду

с H_2S выделяются еще и меркаптаны (например, метилмеркаптан CH_3SH).

Для выявления **индола** пользуются реакцией Сальковского или реакцией с парадиметиламиндобензальдегидом. В первом случае к 10 мл субстрата добавляют 1 мл 0,2%-ного раствора KNO_2 и несколько капель концентрированной серной кислоты. При взаимодействии этих веществ с индолом получается красно-фиолетовое окрашивание. Эту реакцию дает также индолилуксусная кислота.

Вторая реакция на индол более специфична. К 10 мл субстрата однодневной культуры добавляют 5 мл парадиметиламиндобензальдегида и 5 мл насыщенного раствора сульфата калия. При наличии индола возникает интенсивно-красное окрашивание.

Материалы и оборудование

Питательная среда (МПБ + 3% пептона), цилиндры на 100 мл, колбы Эрленмейера на 100—150 мл, почва, полоски красной лакмусовой и фильтровальной бумаги, раствор ацетата свинца, вата для пробок, белые фарфоровые пластинки с лунками (или фарфоровые чашки), реактив Несслера. Микроскопы и все необходимое для приготовления окрашенных препаратов, пипетки, покровные стекла.

Приготовление реактивов. Ацетат свинца обрабатывают раствором NaOH до тех пор, пока осадок не растворится (0,25 М).

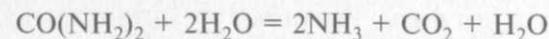
Реактив Несслера готовят следующим образом: 20 г KI растворяют в 50 мл воды и к раствору добавляют до насыщения (около 32 г) небольшими порциями HgI_2 . После этого приливают 460 мл воды и вносят 134 г KOH . Отстоявшуюся жидкость сливают в темную склянку.

Реактив парадиметиламиндобензальдегида содержит 4 г парадиметиламиндобензальдегида, 30 мл 96%-ного этилового спирта, 80 мл концентрированной HCl .

8.1.2. Аммонификация мочевины

Мочевина — конечный продукт превращения соединений азота в организме человека и животных.

Бактерии, вызывающие аммонификацию мочевины, вырабатывают экзофермент уреазу, который гидролизует мочевину до аммиака:



В качестве источника углерода они используют некоторые углеводы и соли органических кислот.

Для наблюдения за процессом аммонификации мочевины можно использовать питательную среду следующего состава (г/л дистиллированной воды): тартрат К или Na (виннокислые, можно соли яблочной кислоты) — 5,0; мочевины — 50,0; K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2.

Среду разливают по 30 мл в колбы Эрленмейера на 100 мл, заражают почвой (или навозом) и ставят в термостат при 25—30 °С. Для обнаружения аммиака, выделяющегося в атмосферу, под ватную пробку подвешивают полоску красной лакмусовой бумаги, смоченную дистиллированной водой.

Через 3—5 сут культуру подвергают анализу. Устанавливают выделение аммиака по посинению красной лакмусовой бумажки, а накопление его — капельной реакцией с реактивом Несслера (см. 8.1.1). К капле культуральной жидкости на фарфоровой пластинке добавляют каплю этого реактива. Образуется буроватый осадок.

Для изучения возбудителей аммонификации мочевины из едва заметной пленки на поверхности среды готовят препарат и окрашивают его фуксином. Чаще всего под микроскопом наблюдают клетки *Urobacillus pasteurii*, реже — *Planosarcina ureae*.

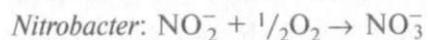
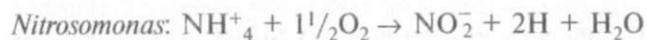
Материалы и оборудование

Среда для воспроизведения процесса аммонификации мочевины, цилиндры на 100 мл, колбы Эрленмейера на 100 мл, почва, алюминиевые ложки, полоски красной лакмусовой бумаги, вата, белые фарфоровые пластинки с лунками, реактив Несслера, пипетки, микроскопы и все необходимое для приготовления препаратов и просмотра их под микроскопом.

8.2. Нитрификация

8.2.1. Выявление нитрифицирующих бактерий на плотных средах

Вводные пояснения. Под *нитрификацией* понимают процессы окисления аммиака до нитрита и нитрата. Эти превращения идут в две фазы. Вызывают их нитрифицирующие бактерии главным образом двух родов:



Энергию, выделяющуюся при окислении аммиака и нитрита, нитрификаторы используют для ассимиляции диоксида углерода. Бактерии, осуществляющие данный процесс, относятся к хемолитоавтотрофам и представляют собой облигатных аэробов.

Первая фаза нитрификации. Для выявления бактерий первой фазы нитрификации и определения относительного количества их в почве используют метод Виноградского на гелевых пластинах (см. 7.2.1).

Промытые и прокипяченные пластины кремнекислого геля (в чашках Петри) пропитывают 3—5 мл среды Виноградского. Минеральная основа среды имеет следующий состав (г/200 мл дистиллированной воды): $(NH_4)_2SO_4$ — 2,0; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4$ — 0,5; NaCl — 0,4; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,4; $MgCO_3$ или $CaCO_3$ — 5,0. Источник азота $(NH_4)_2SO_4$ — 2 г. Лучшие результаты получают при замене $(NH_4)_2SO_4$ на фосфорно-аммонийно-магниевою соль — $NH_4MgPO_4 \cdot MgCO_3$; кроме того, важно растереть $CaCO_3$ перед приготовлением среды пестиком в стерильной ступке.

Питательную среду в чашках упаривают при 40—50 °С до образования белой блестящей эмалевой поверхности, возникающей за счет равномерного распределения слоя $MgCO_3$ или $CaCO_3$. Слой любого из этих веществ служит индикатором процесса нитрификации, так как в тех местах на геле, где развиваются нитрифицирующие бактерии, появляются зоны растворения карбонатов, в которых эти микроорганизмы и обнаруживаются.

По эмалевой поверхности пластин раскладывают определенное число комочков свежей почвы, для чего берут два часовых стекла и стерилизуют их фламбированием. Затем в одно часовое стекло помещают почву, а в другое наливают дистиллированную воду. Палочкой с оттянутым концом, предварительно слегка проведя ее над огнем и смочив водой, захватывают комочки почвы (диаметром 1—2 мм) и по трафарету раскладывают их по поверхности эмалевых пластин.

Чашки помещают во влажную камеру и ставят в термостат при 28—30 °С. Через некоторое время (спустя 7, 14, 21 сут), в зависимости от активности нитрифицирующих бактерий, вокруг отдельных комочков почвы появляются зоны растворения мела, свидетельствующие об обрастании комочков почвы нитрифицирующими бактериями.

Чашки вынимают и подвергают анализу: определяют степень обрастания комочков почвы нитрифицирующими бактериями (в %), изучают морфологию их представителей и продукты жизнедеятельности.

Степень обрастания комочков почвы определяют следующим образом. Общее число комочков почвы, разложенных на чашке, принимают за 100%. Затем подсчитывают число комочков почвы, давших зоны растворения мела, и устанавливают, какой процент они составляют от общего числа комочков почвы. Полученная величина не дает представления об абсолютном количестве нитрифицирующих бактерий в почве. Однако если сопоставить степени обрастания ими комочков разных почв, то этот показатель позволит судить о том, в какой почве содержится больше нитрифицирующих бактерий.

Чтобы **определить продукты жизнедеятельности** бактерий первой фазы нитрификации, чистым ланцетом вырезают по 3 кусочка геля из зон растворения мела и с мест, в которых мел не растворился, помещают их изолированно в лунки белой фарфоровой пластины или в фарфоровые чашки. Сначала делают пробы с кусочками геля контрольных участков, где мел не растворился. *Пробу на аммиак* выполняют с реактивом Несслера: гель приобретает желтовато-оранжевую окраску, что свидетельствует о присутствии аммиака. Затем проводят *пробу на нитрит* с реактивом Грисса или цинк-иод-крахмалом, добавляя каплю 10%-ной серной кислоты: гель остается без изменений, что указывает на отсутствие нитрита.

Аналогичные пробы делают с кусочками геля, взятыми из зон растворения мела (или $MgCO_3$). В этом случае реакция на аммиак с реактивом Несслера отрицательная, т. е. гель не окрашивается. Реактив Грисса окрашивает гель в красный цвет, а цинк-иод-крахмал в кислой среде — в темно-синий, что свидетельствует о появлении азотистой кислоты.

Для знакомства с возбудителями первой фазы нитрификации из зон растворения мела берут иглой немного материала и готовят окрашенный препарат. При его микроскопировании можно обнаружить овальные клетки, похожие на ноль, — *Nitrosomonas* (рис. 23) и *Nitroso-spira*. Первые встречаются в старопашотных почвах, вторые — в целинных. В почвах Европы чаще встречаются *Nitrosomonas europea*.

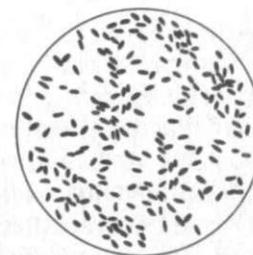


Рис. 23. *Nitrosomonas*

Вторая фаза нитрификации. Бактерии, вызывающие вторую фазу нитрификации, можно наблюдать на чашках с культурой первой фазы при более длительном их выдерживании в термостате. После исчезновения аммиака образовавшийся нитрит может окисляться до нитрата. В этом легко убедиться по исчезновению в среде нитрита и появлению нитрата. Для этого вырезают чистым ланцетом два кусочка геля, помещают их в фарфоровые лунки и об исчезновении нитрита судят по отрицательной реакции с реактивом Грисса или цинк-иод-крахмалом в кислой среде. С другим кусочком геля проводят пробу на нитрат с дифениламином в растворе концентрированной серной кислоты. В присутствии азотной кислоты гель приобретает темно-синий цвет (реакцию на нитрат с дифениламином делают только в отсутствие нитрита).

В препарате, приготовленном из мест растворения мела, взятого с поверхности чашки, в этот период можно обнаружить возбудителей второй фазы нитрификации — мелкие, слегка искривленные и угловатые клетки *Nitrobacter*.

В связи с тем что коэффициент полезного действия хемосинтеза у нитрифицирующих бактерий очень низкий, рост их клеточной массы незначителен и на препаратах, приготовленных обычным способом, они обнаруживаются не всегда или с трудом.

Выявление бактерий обеих фаз нитрификации по Теппер. Для выявления бактерий обеих фаз нитрификации из культуры на гелевых пластинах был разработан специальный прием. В чашку, в которой прошли процессы нитрификации, осторожно вливают 6—8 мл водопроводной воды, бактерии при этом поднимаются на ее поверхность. Если к поверхности во-

ды прикоснуться чистым обезжиренным предметным стеклом, то на нем останутся нитрифицирующие бактерии. После сушки и фиксации препарат красят фуксином и рассматривают под микроскопом с иммерсионной системой.

На препаратах из чашек, в которых прошли первая и вторая фазы нитрификации, можно легко обнаружить представителей обоих родов нитрифицирующих бактерий и их спутников, в частности бактерии рода *Bacteroides*, всегда сопровождающие вторую фазу нитрификации.

Для специального наблюдения за процессом второй фазы нитрификации опыт также можно ставить на гелевых пластинках. Их пропитывают 2—3 мл питательной среды следующего состава (г/200 мл дистиллированной воды): NaNO_2 — 1,0; Na_2CO_3 (безводный) — 1,0; NaCl — 0,5; K_2HPO_4 — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,4.

Среду упаривают при 50 °С до исчезновения свободной воды и по поверхности геля, как и в предыдущем опыте, раскладывают комочки почвы. Затем после 20—30 сут инкубации при 28—30 °С анализируют, как было описано выше.

8.2.2. Выявление нитрифицирующих бактерий на жидких средах

Первую и вторую фазы нитрификации можно наблюдать и в жидких питательных средах. Однако в данном случае процессы менее наглядны.

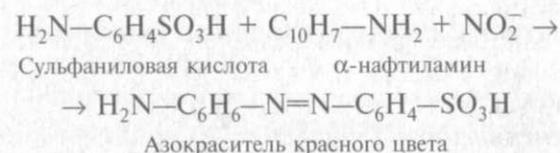
Состав питательной среды для первой фазы (%): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,2; K_2HPO_4 — 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; NaCl — 0,2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,04; CaCO_3 или MgCO_3 — 0,5.

Состав питательной среды для второй фазы (%): NaNO_2 — 0,1; Na_2CO_3 (безводный) — 0,1; NaCl — 0,05; K_2HPO_4 — 0,05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,04.

Для получения накопительной культуры среды после хорошего взбалтывания разливают по 30 мл в колбы Эрленмейера на 100 мл, вносят в них четверть чайной ложки почвы и ставят в термостат при 25—30 °С. Спустя 7 сут (а иногда 14 или 21 сут) в среде для первой фазы нитрификации появляется азотистая, а в среде для второй фазы — азотная кислота. После исчезновения аммиака (для первой фазы) и азотистой кислоты (для второй фазы) опыт заканчивают.

При изучении первой фазы нитрификации устанавливают образование азотистой кислоты (реакция капель-

ная с реактивом Грисса или цинк-иод-крахмалом в кислой среде). В пробирку наливают 1 мл реактива Грисса и 10 мл исследуемого раствора и кипятят. В присутствии азотистой кислоты появляется красное окрашивание. Реактив очень чувствителен к HNO_2 . Ход реакции таков:



Реакцию с цинк-иод-крахмалом проводят следующим образом: в лунку фарфоровой пластинки вносят каплю исследуемого субстрата, 3 капли реактива и каплю 20%-ной серной кислоты. В присутствии азотистой кислоты появляется темно-синее окрашивание.

При исследовании второй фазы после исчезновения нитрита в лунку фарфоровой пластинки каплю испытуемого раствора, затем добавляют 1 каплю H_2SO_4 и 1 кристалл дифениламина. Если в растворе содержится азотная кислота, то образуется темно-синее окрашивание; то же получается и при наличии азотистой кислоты. Поэтому пробу на нитраты с дифениламином используют при отсутствии нитрита.

Для изучения возбудителей первой и второй фаз нитрификации из соответствующих культур с поверхности среды петлей захватывают немного материала и готовят мазок.

Материалы и оборудование

Гелевые пластины, пропитанные соответствующей питательной средой, свежая почва, часовые стекла, палочки с оттянутым концом и трафарет, необходимые жидкие среды, колбы Эрленмейера, почва, алюминиевые ложки, реактив Несслера и цинк-иод-крахмал, 20%-ный раствор H_2SO_4 (или реактив Грисса). Микроскопы и все необходимое для приготовления препаратов и микроскопирования, фарфоровые пластинки с лунками, дифениламин, растворенный в концентрированной серной кислоте.

Приготовление реактивов. Реактив Грисса состоит из двух растворов: первый — 0,5 г сульфаниловой кислоты в 150 мл разбавленной уксусной кислоты; второй — 0,1 г α -нафтиламина в 20 мл воды с добавлением 150 мл разбавленной уксусной кислоты.

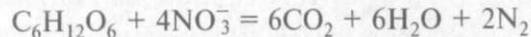
Цинк-иод-крахмал: размешивают 4 г крахмала с небольшим количеством холодной воды, затем при постоянном помешивании

прибавляют к кипящему раствору хлорид цинка (20 г в 100 мл воды). Смесь кипятят до растворения крахмала, добавляют 2 г сухого иодида цинка и доливают водой до 1 л. Раствор хранят в темном месте.

8.3. Денитрификация (нитратное дыхание)

8.3.1. Моделирование процесса денитрификации в лабораторных условиях

Вводные пояснения. Нитратное дыхание происходит с использованием связанного кислорода нитрата. Многие бактерии в актах дыхания восстанавливают нитрат с выделением молекулярного азота (N_2) или закиси азота (N_2O). Этот процесс диссимиляционного восстановления нитрата получил название **денитрификации**. В процессе денитрификации органические субстраты окисляются до CO_2 и H_2O . Суммарно этот процесс можно выразить следующим уравнением:



Микроорганизмы, осуществляющие процесс денитрификации, широко распространены в природе. Большинство их относится к родам *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. stutzeri*), *Paracoccus* (*P. denitrificans*). Процесс идет в основном в анаэробных условиях.

Постановка опыта. Для воспроизведения в лабораторных условиях процесса денитрификации и получения накопительной культуры денитрифицирующих бактерий обычно пользуются средой Гильтая (см. 10.2.2) или средой более простого состава (г/л дистиллированной воды): сегнетова соль (натриевокалиевая соль винной кислоты) или цитрат натрия — 20; KNO_3 — 2,0; K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — следы.

В склянку или колбу Эрленмейера наливают немного питательной среды и добавляют к ней $\frac{1}{3}$ чайной ложки почвы. Среду тщательно перемешивают с почвой для удаления пузырьков воздуха, затем наполняют склянку или колбу питательной средой до края и закрывают каучуковой пробкой, в которую вставлена открытая с двух сторон стеклянная труб-

ка, расширенная в средней части. Пробка вытесняет часть жидкости в стеклянную трубку (рис. 24).

Под пробкой не должны оставаться пузырьки воздуха. В трубку над средой наливают вазелиновое масло небольшим слоем для создания анаэробных условий. Отсутствие углеводов в среде исключает процесс брожения. В полученных условиях в первую очередь будут развиваться лишь микроорганизмы, способные использовать связанный в соединениях кислород нитрата.

При постановке опыта наличие в среде нитрата устанавливают капельной реакцией с дифениламином (см. 8.2.2).

Прибор со средой и почвой помещают в термостат при температуре 28—30 °С. После 5—6 дней инкубации культуру подвергают анализу: отмечают появление пузырьков газа под пробкой и цвет среды.

Результаты опыта. Для микроскопирования возбудителей денитрификации из середины субстрата чистой пипеткой берут каплю и готовят фиксированный и окрашенный препарат, который затем рассматривают под микроскопом с иммерсионной системой.

На препарате преобладают неспорообразующие сферические клетки или короткие палочки *Paracoccus denitrificans*. Нередко наблюдается позеленение среды, особенно при использовании углерода лимонной кислоты, что указывает на развитие *Pseudomonas fluorescens*. На среде с сегнетовой солью чаще развивается *P. stutzeri*.

Для определения продуктов жизнедеятельности денитрифицирующих бактерий из культуральной жидкости делают пробы: на *нитрат* — с дифениламином, на *нитрит* — с цинк-иод-крахмалом в кислой среде или с реактивом Грисса и на *аммиак* — с реактивом Несслера.

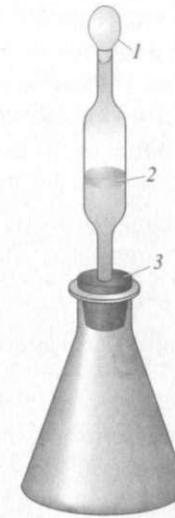


Рис. 24. Прибор для культивирования денитрифицирующих бактерий:

1 — ватная пробка; 2 — слой вазелинового масла; 3 — каучуковая пробка

Обычно после 6 сут инкубации реакции на нитрат и нитрит бывают отрицательными. С реактивом Несслера субстрат показывает положительную реакцию (капля окрашивается в желтовато-оранжевый цвет). Основная масса азота нитрата восстанавливается до молекулярного азота, о чем свидетельствует обильное образование газов (CO_2 и N_2). Наличие аммиака подтверждает то, что эти же бактерии вызывают аммонификацию нитрата, ассимилируя аммиак в качестве источника азота.

Материалы и оборудование

Питательная среда Гильгата или заменяющая ее среда, прибор для постановки опыта, свежая почва, фарфоровая пластинка с лунками, чайная алюминиевая ложка или шпатель (фарфоровый или металлический), пипетки Мора на 1 мл, дифениламин в концентрированной серной кислоте, цинк-иод-крахмал (или реактив Грисса), 20%-ная H_2SO_4 , реактив Несслера, микроскопы и все необходимое для микроскопирования и приготовления окрашенных препаратов.

8.4. Азотфиксация

8.4.1. Общие сведения

Процесс фиксации атмосферного азота бактериями имеет большое значение для общего баланса азота в почве. Он входит в число приоритетных научных проблем, определяя в значительной степени достаточность обеспечения растений доступными формами азота.

Ассимиляцию молекулярного азота, имеющую значение для земледелия, осуществляют прокариоты, которых в зависимости от их взаимоотношений с растением делят на 3 группы.

1. Живущие в симбиозе с растением — *симбиотические азотфиксаторы*.

2. Ризосферные (корневые) и филлосферные (листовые) бактерии, формирующие ассоциации с различными видами небобовых растений, — *ассоциативные азотфиксаторы*.

3. *Свободноживущие почвенные азотфиксаторы* — живут независимо от присутствия растения: вне ризосферы, в почве пара, даже в почве дорог.

Все они *дiazотрофы*, т. е. могут использовать для питания и молекулярный, и минеральный азот. Ежегодно только на поверхности суши бактерии фиксируют до 200 млн т азота и от 30 до 190 млн т — в водных экосистемах.

8.4.2. Симбиотические азотфиксаторы

Вводные пояснения. *Симбиотическая азотфиксация* — это способность бактерий связывать молекулярный азот, находясь в симбиозе с высшими растениями. Более чем 1300 видов бобовых растений и более 200 видов небобовых древесных и кустарниковых пород (ольха, облепиха, мох и другие) имеют клубеньки на корнях. Некоторые (например, тропическое растение сесбания) образуют клубеньки на корнях и стеблях.

Клубеньковые бактерии относятся к родам *Rhizobium* (преимущественно), *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* и другим.

Внедрившись в ткань корня, эти бактерии распространяются обычно в виде инфекционных нитей — колоний размножившихся клеток бактерий.

В зрелой клубеньковой ткани бактериальные клетки превращаются в бактериоиды. В отличие от бактериальной клетки, имеющей форму палочки, *бактероиды* — грушевидные, сферические или ветвистые образования в 3—4 раза более крупных размеров. Зона клубенька с клетками как бактериальной, так и бактериоидной формы получила название *бактероидной*.

Форма и размеры клубеньков разных бобовых растений неодинаковы (рис. 25). У клевера они продолговатые и мелкие, у гороха и вики — округлые и крупные. У фасоли и сои диаметр клубеньков достигает 1 см, а у люпина иногда — величины грецкого ореха. Разрушение клубеньков сопровождается де-

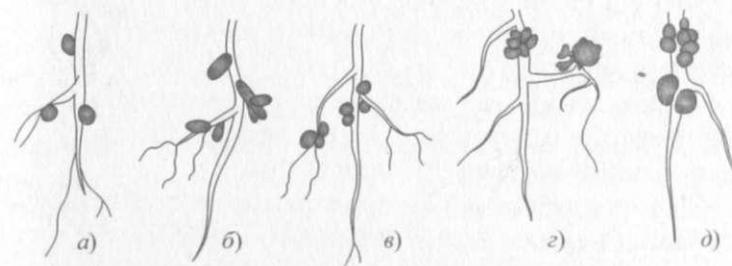


Рис. 25. Форма клубеньков бобовых растений:

а — чины; б — клевера; в — гороха и вики; г — люцерны; д — люпина

градацией элементов растительной клетки и лизисом части бактериоидов, тогда как остальная их часть образует мелкие кокковидные клетки — своеобразные артроспоры, выполняющие функцию размножения и сохранения в природе.

При изучении клубеньковых бактерий в световом микроскопе артроспоры не видны. Их можно обнаружить лишь с помощью электронного микроскопа при большом увеличении.

На питательных средах клетки ризобий — подвижные, не образующие спор грамотрицательные палочки. Среди них встречаются и кокковидные клетки. В старых культурах клетки крупнее, палочковидные, неподвижные, изредка встречаются Т-образные бактериоидные формы.

По скорости роста клубеньковые бактерии делят на медленно растущие, например *Bradyrhizobium japonicum* у люпина, сои, и быстрорастущие — у гороха, клевера и др.

Знакомство с клубеньковыми бактериями. Строение клубеньков бобовых изучают на срезах, которые делают острой ботанической бритвой или готовят на микротоме. Тонкий срез, продольный или поперечный, помещают на предметное стекло и просматривают в раздавленной капле при разных увеличениях. В сухой системе просматривают структуру клубенька, обнаруживают бактериоидную ткань, а затем при достаточной тонкости среза препарат исследуют с иммерсионной системой, где хорошо видна бактериоидная зона клубенька.

Для знакомства с формами разных видов клубеньковых бактерий готовят фиксированные и окрашенные препараты из бактериоидной ткани клеток клубенька. Если клубенек достаточно крупный, его разрезают бритвой на две части и поверхность среза многократно прокалывают стерильной иглой, вызывая возможно большее механическое разрушение клеток. Затем из него отжимают каплю на предметное стекло и готовят фиксированный и окрашенный препарат.

Мелкие клубеньки (2—3) помещают на предметное стекло, добавляют каплю воды и прижимают другим предметным стеклом. Выдавленное содержимое размазывают по стеклу, мазок сушат, фиксируют и красят карболовым эритрозином, фуксином или генцианом фиолетовым.

Хорошая окраска получается при использовании смеси равных частей фуксина и метиленового синего, растворенных в 1%-ном растворе уксусной кислоты. В смеси красок препарат выдерживают 3—5 мин. Ткань клубенька окрашивается в синий цвет, а бактерии — в красный. Форму клубеньковых бактерий, в том числе и бактериоидов, у разных бобовых растений следует зарисовать и подписать названия.

Культуру клубеньковых бактерий готовят так. Кусочек корня с клубеньком тщательно промывают в стерильной воде, стерилизуют поверхность клубенька в растворе спирта, затем вновь промывают стерильной водой, раздавливают клубенек в капле стерильной воды и суспензию высевают на бобовый агар или среду Фреда (см. 12.5.1).

Материалы и оборудование

Фиксированные в формалине корни разных бобовых растений с клубеньками, ботаническая бритва, препаратальные иглы и все необходимое для приготовления препаратов и микроскопирования.

8.4.3. Свободноживущие азотфиксирующие бактерии

Среди свободноживущих азотфиксирующих бактерий наибольший интерес представляют виды родов *Clostridium* и *Azotobacter*.

Вводные пояснения для *Clostridium pasteurianum*. *C. pasteurianum* — облигатный анаэроб. Энергию для всех процессов жизнедеятельности, в том числе и ассимиляции атмосферного азота, бактерии этого вида получают за счет маслянокислого брожения (см. 7.1.4). Сбраживают моно-, дисахара и некоторые полисахариды.

В молодой культуре клетки *C. pasteurianum* имеют форму палочек с перитрихально расположенными жгутиками. Затем клетка образует споры, которая иногда располагается ближе к краю, но чаще — в середине клетки. Споры овальные, окружены капсулой. Клетки имеют клостридиальную форму, накапливают запасное питательное вещество — *гранулезу* (полисахарид, близкий к крахмалу), которая окрашивается при воздействии раствора Люголя в сине-фиолетовый цвет. В период образования спор гранулеза постепенно исчезает.

Анаэробные азотфиксаторы широко распространены в природе. Они встречаются почти повсеместно в почвах и загрязненных водоемах.

Постановка опыта с *C. pasteurianum*. Для получения накопительной культуры используют селективную среду *Виноградского* (г/л дистиллированной воды): глюкоза — 20,0; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; NaCl — 0,5; $CaCO_3$ — 20,0. Для учета *C. pasteurianum* в почве используют среду *Емцева* следующего состава (г/л дистиллированной воды): NaH_2PO_4 — 0,5; K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; NaCl — 0,5; $FeSO_4$ — 0,01; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ — 0,01; смесь микроэлементов по Федорову (см. 6.2.2) — 1 мл; глюкоза — 20; пептон — 5; дрожжевой автолизат — 0,2 мл; $CaCO_3$ — 10; pH 7,0.

Колбу Эрленмейера на 100—150 мл заполняют на $\frac{2}{3}$ жидкой средой, предварительно взболтав ее. Для инокуляции в среду вносят $\frac{1}{3}$ чайной ложки почвы. Селективность среды обеспечивают отсутствие связанного азота и анаэробные условия. Мел добавляют для нейтрализации масляной кислоты. Опыт удобнее ставить в высокие пробирках. Колбы с посевом помещают в термостат при 35—30 °С.

Через несколько дней отмечают помутнение среды и обильное образование газов. На поверхности среды развиваются аэробные микроорганизмы, поглощающие кислород атмосферы. После 4—5 дней инкубаций культуру анализируют.

Микроскопирование культуры *C. pasteurianum*. Содержимое колбы хорошо размешивают и в течение 15—20 с дают осесть крупным частицам, после чего из середины субстрата пипеткой берут немного материала и наносят каплю на предметное стекло. К ней добавляют каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют с иммерсионной системой. В клетках *C. pasteurianum*, содержащих гранулулу, она окрашивается в сине-фиолетовый цвет. Как правило, преобладают веретенообразные формы (см. рис. 4, ж).

Из продуктов жизнедеятельности, кроме газов (CO_2 , H_2), можно обнаружить масляную кислоту (см. 7.1.4).

Чистую культуру *C. pasteurianum* выделяют из колоний, полученных при посеве накопительной культуры после обязательной ее пастеризации на *агаризованную среду Виноградского* или на *картофельно-морковный агар Емцева*: картофельный отвар — 500 мл; морковный отвар — 500 мл; глюкоза — 20 г; K_2HPO_4 — 1 г; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5 г; NaCl, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ —

следы; пептон — 5 г; дрожжевой автолизат — 0,02 мл; $CaCO_3$ — 40 г; агар — 6 г. Отвары готовят следующим образом: по 0,5 кг очищенных картофеля и моркови заливают 2 л дистиллированной воды, кипятят 10 мин, фильтруют, затем добавляют дистиллированную воду до первоначального объема.

Материалы и оборудование

Жидкая среда Виноградского, колбы Эрленмейера емкостью 100—150 мл или высокие пробирки, почва, алюминиевые чайные ложки или шпатели. Микроскопы и все необходимое для микроскопирования препаратов в раздавленной капле, раствор Люголя, пробирки обычные, 10%-ный раствор хлорного железа.

Вводные пояснения для видов рода *Azotobacter*. *Azotobacter chroococcum* фиксирует азот в аэробных условиях. Колонии азотобактера — темно-коричневого, почти черного цвета. В жидких культурах бактерии образуют пленку, а на агаре и на гелевых пластинах — слизистые колонии.

Клетки азотобактера плеоморфные — от палочковидных до кокковидных. Располагаются одиночно, парами, часто окружены слизистой капсулой, которая выявляется после окраски клеток фуксином и смешивания с разбавленной тушью (рис. 26). Внутри клеток ясно выражена зернистость. *A. vinelandii* на плотных средах образует сарциноподобные скопления.

Азотобактер более требователен к условиям окружающей среды, поэтому менее распространен в почве, чем *C. pasteurianum*. В качестве источника углерода усваивает моно-, дисахара, спирты и соли органических кислот, в том числе и бензойную.

Постановка опыта с *A. chroococcum*. Для выявления азотобактера в почве и определения относительного его содержания можно использовать метод Виноградского на гелевых пластинах (см. 7.2.1). Отмытые от следов хлора гелевые пластины пропитывают 3—5 мл питательной среды следующего состава (г/200 мл дистиллированной воды): маннит или тростнико-

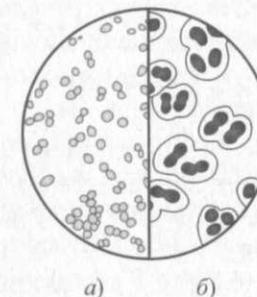


Рис. 26. *Azotobacter chroococcum*:

а — на гелевых пластинах; б — окрашены фуксином и тушью

вый сахар — 20,0; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; NaCl — 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ — 0,01; $CaCO_3$ — 5,0.

После упаривания среды до исчезновения избыточной влаги на поверхности геля раскладывают по трафарету 50 комочков почвы (см. 8.2.1). С этой целью берут два часовых стекла, фламбируют их, затем в одно помещают исследуемую почву, а в другое — дистиллированную воду. Смоченной водой палочкой с оттянутым концом, предварительно проводя ее каждый раз над огнем, захватывают комочки почвы диаметром примерно 2 мм и помещают их на поверхность гелевой пластины. Элективность среды создают отсутствием связанного азота и аэробными условиями.

Чашки с посевом помещают во влажную камеру, и после 5—6 сут инкубации при наличии клеток азотобактера комочки почвы обрастают его колониями.

Для сравнительной оценки заселенности азотобактером разных почв для каждой из них определяют степень обрастания азотобактером комочков почвы по отношению обросших колониями комочков почвы к общему числу комочков на чашке. Это дает возможность установить, какая почва богаче азотобактером.

Если колонии со временем приобретают бурю окраску, их относят к *A. chroococcum*; если они образуют зеленый флуоресцирующий пигмент, то в зависимости от морфологии их относят либо к *A. agile*, либо к *A. vinelandii* (*A. agile*, как правило, обитает в воде). Бесцветные слизистые колонии образуют виды рода *Beijerinckia*, их можно обнаружить в кислых тропических почвах (красноземах).

Микроскопирование и получение накопительной и чистой культуры азотобактера. Для знакомства с возбудителями аэробной азотфиксации из колонии готовят фиксированные и окрашенные препараты и просматривают их с иммерсионной системой. Клетки азотобактера шаровидные, среди них часто встречаются диплококки.

Для получения накопительной культуры азотобактера можно использовать жидкую среду Бейеринка (г/л водопроводной воды): маннит или глюкоза — 20,0; K_2HPO_4 — 0,2; $CaCO_3$ — 5,0; смесь микроэлементов по Федорову — 1 мл (см. 6.2.2); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2.

В колбы Эрленмейера на 100 мл наливают по 30 мл жидкой среды для азотобактера и добавляют $\frac{1}{3}$ чайной ложки почвы. Колбы помещают в термостат при 28—30 °С. После 5—6 дней инкубации опыт снимают; на поверхности среды при наличии азотобактера образуется пленка.

Для выделения чистой культуры азотобактера после проверки накопительной культуры под микроскопом делают посев на агаризованную среду Эшби следующего состава (г/л водопроводной воды): маннит — 20,0; K_2HPO_4 — 0,2; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,2; NaCl — 0,2; K_2SO_4 — 0,1; $CaCO_3$ — 5,0; агар — 20,0. Добавляют смесь микроэлементов по Федорову — 1 мл (см. 6.2.2).

Материалы и оборудование

Гелевые пластины, пропитанные средой Виноградского для азотобактера (при отсутствии гелевых пластин используют жидкие питательные среды Виноградского или Бейеринка), часовые стекла, почва, палочки с оттянутым концом, цилиндры, колбы Эрленмейера на 100 мл. Микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

8.4.4. Ассоциативные бактерии

Вводные пояснения. К настоящему времени известно более 200 видов (24 рода) ассоциативных diaзотрофов: *Azospirillum*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Beijerinckia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Aquaspirillum*, *Xanthobacter* и др. Для них характерна колонизация корней растений без образования выраженных морфологических структур, но с положительным эффектом на продуктивность растения.

Научным центром по разработке бактериальных препаратов на основе ассоциативных бактерий в России является ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (Санкт-Петербург). Наиболее известны препараты *Агрофил*, *Агрофор*, *Ризоэнттерин*, *Биоплант*, *Барьер*. Действующим началом в них являются различные ассоциативные бактерии. Спектр их влияния на растения различен.

Учет общей численности ассоциативных diaзотрофов. Обычно для этого используют глюкозоавтолизатную среду, минеральной основой которой служит среда Федорова — Калининской (г/л дистиллированной воды): K_2HPO_4 — 1,74;

$\text{KН}_2\text{PО}_4$ — 0,91; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,3; NaCl — 0,5; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,01. К ней добавляют (г): глюкозу — 10, дрожжевой автолизат — 0,1, бромтимолблау — 0,2, а также смесь витаминов (мкг): биотин — 10, рибофлавин — 200, витамин B_{12} — 2; тиамин, пиридоксин, пантотенат кальция, никотиновая и парааминобензойная кислоты — по 100.

Среду разливают по 30 мл в конические колбы на 100—150 мл, стерилизуют в течение 20 мин при давлении 0,5 атм и инокулируют в трехкратной повторности разведениями почвенной суспензии от 1 : 100 до 1 : 10 000 000. Культивируют при 25—28 °С 3—4 недели. При подкислении среды до рН 6,0 (желтое окрашивание) добавляют для нейтрализации стерильный раствор NaOH (0,1—0,2 н.). По окончании опыта в вариантах, где отмечен рост бактерий, определяют азот **методом Кьельдаля** (см. 12.5.2). Увеличение исходного содержания азота (0,5—0,7 мг на колбу) на 0,3 мг и более служит показателем азотфиксации. Подсчет наиболее вероятного количества азотфиксирующих ассоциаций в образце проводят по *таблице Мак-Креди* (см. табл. 2 на с.161).

Для определения азотфиксирующей активности ацетиленовым методом (см. 12.4.1) через 5—7 сут от начала опыта 3 мл культуральной среды переносят в стерильные пенициллиновые флаконы, закрывают их резиновыми пробками с зажимами и инкубируют в атмосфере с ацетиленом (10%) в течение суток. Наличие азотфиксации определяют по восстановлению ацетилена до этилена.

Количественный учет азотфиксирующих ассоциаций может быть проведен непосредственно при посеве почвенных разведений в пенициллиновые флаконы. В каждый флакон вносят 3—3,5 мл среды (дрожжевого автолизата в среду в этом случае добавляют 0,06 г на 1 л). Через 3—4 сут среду нейтрализуют стерильным раствором 0,05—1 н. NaOH (если есть подкисление), ватные пробки заменяют резиновыми и в каждый флакон вводят 1 мл ацетилена. Количество образовавшегося этилена определяют на 1-е, 3-и и 7-е сут инкубации. Достоверными считают варианты, где количество этилена выше 5—6 нмоль (наномолей) на флакон. Расчет численности проводят по табл. 2.

На описанной выше среде растут бактерии рода *Xanthobacter*, которые в чистой культуре не используют углеводы. Раз-

виваются также факультативные анаэробы — энтеробактерии. Клостридии и азотобактер на данной среде не растут.

Количественный учет ксантобактера осуществляют в пенициллиновых флаконах, закрытых резиновыми пробками, в атмосфере Ar (аргона), H_2 , CO_2 и O_2 по *Калининской—Редькиной*. Можно определять численность методом предельных разведений на *жидкой среде с метанолом*. Состав среды (на л дистиллированной воды): минеральная основа по Федорову—Калининской (см. выше), витамины (можно использовать только биотин) — 10 мкг/л, метанол — 2,0 г и дрожжевой автолизат — 0,06 г. Ацетилен вводят во флаконы на 2—3-й день после посева. Количество образующегося этилена определяют на 7-е сут инкубации. Численность рассчитывают по таблице Мак-Креди (см. табл. 2 на с. 161). Микроскопируют после высева на минеральные агаризованные среды с метанолом или на картофельный агар.

Азотфиксирующие бактерии рода *Aquaspirillum* — аэробные, грамотрицательные, подвижные бактерии размером $0,7 \times 1,4$ мкм. На обычных питательных средах (МПА) колонии мелкие, бесцветные, круглые, клетки слабоизогнутой бобовидной формы. На жидких пептонных средах с янтарной кислотой и минеральными солями в среде появляются типичные спиралевидные, но более крупные (6—10 мкм) клетки.

Наибольший интерес среди ассоциативных азотфиксирующих бактерий представляют выявляемые в больших количествах на корнях трав, особенно злаков, спириллы с высокой азотфиксирующей активностью, получившие родовое название *Azospirillum*. Они живут в ассоциациях с растениями, распространены и в почве, но преобладают в зоне корня, на корнях и даже в корнях таких растений, как пшеница, рис, тропические травы. Для проявления их азотфиксирующих способностей необходимо пониженное содержание кислорода в среде.

Азоспириллы — утолщенные вибрионы или палочки с заостренными концами, шириной около 1 мкм, подвижные за счет одного или пучка жгутиков в молодом возрасте и теряющие подвижность при переходе в состояние цист в старых культурах. В клетках много гранул поли- β -оксималяной кислоты.

Для получения культуры азоспирилл отмытые кусочки корней длиной 5—8 мм размягчают при помощи профламбированного пинцета и помещают в *элективную полужидкую среду*

без азота следующего состава (г/л дистиллированной воды): *L*-яблочная кислота — 5; K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2; $NaCl$ — 0,1; $CaCl_2$ — 0,02; KOH — 4; агар — 7,75. Сюда же добавляют (мл): раствор микроэлементов — 2; бромтимоловый синий (5%-ный спиртовой раствор); Fe -ЭДТА (1,64%-ный раствор) — 4, раствор витаминов — 1. Раствор микроэлементов включает (г/200 мл дистиллированной воды): $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ — 0,2; $MnSO_4 \cdot H_2O$ — 0,235; H_3BO_3 — 0,28; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ — 0,008; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,024. Раствор витаминов (г/10 мл дистиллированной воды): биотин — 10, пиридоксин — 20.

Доводят pH среды до 6,8, кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С. Не перемешивая среду после инокуляции корнями или почвой, инкубируют флаконы 40 ч при 32 °С. Затем проверяют нитрогеназную активность. Если развившиеся на поверхности среды плотные пленки культуры восстанавливают ацетилен, делают рассев на чашки с этой же средой с 1,5% агара и 20 мг дрожжевого экстракта на 1 л среды. Через неделю мелкие белые плотные колонии пересевают на полужидкую среду BMS, где *A. lipoferum* развиваются в виде типичных розовых, реже красных и желтых, часто складчатых колоний.

Среду BMS готовят следующим образом. 200 г отмытого очищенного картофеля, нарезанного ломтиками, помещают в марлевый мешок, кипятят 30 мин в 1 л воды, фильтруют через вату. Фильтрат сохраняют. Затем 2,5 г *L*-яблочной кислоты растворяют в 50 мл воды и добавляют 2 капли бромтимолового синего и KOH (около 2 г), пока раствор яблочной кислоты не станет зеленым (pH 7,0).

Готовые растворы яблочной кислоты, витаминов (1 мл) и агар (15 г) добавляют к фильтрату, доводят объем дистиллированной водой до 1 л, кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С.

Хорошие результаты дает использование картофельного агара без яблочной кислоты и витаминов.

При изучении кислых лесных почв, не содержащих ни азоспирилл, ни азотобактера, яблочная среда может применяться для выделения и учета энтеробактерий (инкубация при комнатной температуре).

Материалы и оборудование

Глюкозоавтотолитная среда Федорова—Калининской, почва, конические колбы на 100—150 мл, пробирки с 9 мл среды Федорова—Калининской с метанолом для учета ассоциативных диазотрофов методом последовательных разведений, среда BMS, колбы Кьельдаля и все необходимое для определения фиксированного азота методом Кьельдаля, пенициллиновые флаконы для определения азотфиксирующей активности ацетиленовым методом. Микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

Глава 9

Роль бактерий в превращении соединений серы, железа и фосфора

9.1. Трансформация соединений серы бактериями

9.1.1. Окисление сероводорода

Образующийся в почве и загрязненных водоемах сероводород (H_2S) окисляется тионовыми и серобактериями до H_2SO_4 .

Тионовые бактерии — мелкие одиночные клетки, у которых при окислении сероводорода не происходит отложения серы в клетке и на ее поверхности. Энергию окисления восстановленных соединений серы в серную кислоту они используют для поддержания процессов жизнедеятельности, ассимилируя углерод из CO_2 (относятся к облигатным хемолитоавтотрофам).

Для выявления тионовых бактерий можно использовать среду следующего состава (г/л дистиллированной воды): Na_2SO_3 (гипосульфит натрия) — 5,0; $NaHCO_3$ — 1,0; K_2HPO_4 — 0,2; NH_4Cl — 0,1; $MgCl_2$ — 0,1.

Среду разливают в эрленмейеровские колбы емкостью 100—150 мл по 30—50 мл и заражают сточной водой или илом. Колбы помещают в термостат при температуре 30 °С. Через несколько дней в среде появляется свободная сера и обнаруживаются бактерии *Thiobacillus thioeparus*.

Серобактерии подразделяют на две группы: бесцветные и окрашенные — фотосинтезирующие. К бесцветным относят представители рода *Beggiatoa* (свободноплавающие длинные нити) и *Thiothrix* (отличающиеся неподвижным образом жизни). Внутри клеток серобактерий или на их поверхности отлагаются капли серы. По типу углеродного питания они — **миксотрофы**: за счет энергии окисления H_2S ассимилируют CO_2 , но одновременно нуждаются и в органических соединениях.

Для получения культуры бесцветных серобактерий (по Ван-ноградскому) на дно высокого цилиндра или аквариума бросают немного ила, гипса для усиления выделения H_2S , остатки водных растений и доверху заполняют его водой.

Примерно через месяц на поверхности появляется серовато-белая хрупкая пленка, состоящая из крупных нитей серобактерий с включениями капельножидкой серы. Наиболее часто встречаются представители рода *Beggiatoa*.

К цветным серобактериям относят пурпурные и зеленые микроорганизмы, являющиеся **фотолитоавтотрофами**. Источником энергии для автотрофной ассимиляции CO_2 у них служит свет, донором водорода для восстановления CO_2 — H_2S . Фотосинтез у этих бактерий протекает в анаэробных условиях и не сопровождается выделением кислорода.

Для получения накопительной культуры фотосинтезирующих серобактерий используют среду Ван-Ниля следующего состава (%): $NaHCO_3$ — 0,5; NH_4Cl — 0,1; $Na_2S \cdot H_2O$ — 0,1; KH_2PO_4 — 0,1; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,05; $NaCl$ — 0,5; водопроводная вода.

В среду добавляют ацетат, малат или сукцинат натрия в количестве 0,1—0,2%, так как многие фотосинтезирующие бактерии быстрее развиваются в присутствии органических веществ, чем на одной минеральной среде. pH среды устанавливают по бромтимолблау равным 7,0—7,5.

В склянки с притертыми пробками емкостью 100—150 мл вносят 5—10 мл инокулята (исходным материалом может служить ил из разных водоемов), затем их доверху наполняют средой Ван-Ниля, закрывают стеклянными пробками, вытесняя часть жидкости. Таким образом в склянках создаются анаэробные условия.

Склянки со средой и инокулятом помещают в люминостат с температурой 30 °С. После 4—7 сут инкубации в среде

развиваются пурпурные или зеленые серобактерии (в зависимости от посевного материала). В случае развития пурпурных серобактерий среда приобретает сначала розовый, затем — красный цвет; при развитии зеленых серобактерий — желто-зеленый цвет.

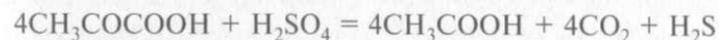
Для знакомства с морфологией фотоавтотрофных бактерий из накопительной культуры готовят препарат в раздавленной капле и просматривают его с иммерсионной системой объектива. В подвижных клетках серобактерий видны включения серы.

Материалы и оборудование

Жидкая среда с гипосульфитом натрия, эрленмейеровские колбы емкостью 100—150 мл, речной ил, сточная вода; среда Ван-Ниля, склянки с притертыми пробками, ил из разных водоемов; микроскопы и все необходимое для микроскопирования, приготовления фиксированных препаратов и препаратов в раздавленной капле.

9.1.2. Восстановление сульфатов (десульфофикация, сульфатредукция, сульфидогенез)

Разложение органических серосодержащих соединений (белков, аминокислот) в анаэробных условиях сопровождается выделением сероводорода. Образуется сероводород также при восстановлении сернокислых и серноватистокислых солей. Большое количество сероводорода образуют сульфатредуцирующие бактерии в процессе сульфатного дыхания. Эти бактерии — облигатные анаэробы, в качестве доноров водорода используют главным образом органические кислоты, спирты и молекулярный водород. Органические субстраты они окисляют не до конца. Чаще всего конечным продуктом окисления является уксусная кислота. Акцепторы водорода у сульфатредуцирующих бактерий — сульфаты:



Окисляемый субстрат

Использовать кислород сульфатов в актах дыхания способны лишь некоторые бактерии:

1) *Desulfovibrio desulfuricans* — вибрионы размером 2—4×1—0,9 мкм, имеющие один полярный жгутик;

2) род *Desulfotomaculum* — палочки с перитрихальным расположением жгутиков, преимущественно распространены

в иле (где происходит анаэробный распад органических веществ) и в загрязненных водоемах (1 мл жидкости содержит 10^6 — 10^7 клеток этого рода).

Для получения накопительной культуры сульфатредуцирующих бактерий можно использовать жидкую среду Ван-Дельдена следующего состава (г/л воды исследуемого водоема): натрий молочнокислый (можно заменить виннокислым, яблочнокислым или янтарнокислым натрием) — 5,0; аспарагин — 1,0; $MgSO_4$ — 1,0; K_2HPO_4 — 0,5. Значение pH доводят до 7,0. К среде добавляют 0,1—0,5 г лимоннокислого железа. При образовании сероводорода среда окрашивается в черный цвет.

В стеклянный сосуд наливают 5—10 мл инокулята (сероводородного ила или воды из загрязненного водоема) и добавляют среду Ван-Дельдена для сульфатредуцирующих бактерий. Затем сосуд закрывают пробкой со стеклянной трубкой (расширенной в середине) таким образом, чтобы пробка вытеснила часть жидкости в трубку. К жидкости в трубке добавляют слой вазелинового масла для создания анаэробных условий. Инкубируют культуру в термостате при 28—30 °С. Через несколько дней появляется сероводород: при добавлении к среде лимоннокислого железа она чернеет.

Материалы и оборудование

Жидкая среда Ван-Дельдена, прибор, состоящий из склянки и резиновой пробки со стеклянной трубкой, проба ила, в котором происходит распад органических веществ, или проба воды из загрязненного водоема, вазелиновое масло, алюминиевые чайные ложки (шпатели фарфоровые или металлические). Микроскопы и все необходимое для микроскопирования; фарфоровые пластины с лунками или фарфоровые чашки, лимоннокислое железо.

9.2. Участие бактерий в превращении железа

Железо поступает в биологический круговорот после мобилизации его из минералов и комплексных органических соединений железа, представленных в почве гуминовыми соединениями.

9.2.1. Восстановление окисного железа в закисное

Если почва насыщена водой, в ней происходят процессы восстановления железа, приводящие к оглеению почвы.

Роль микроорганизмов в восстановлении железа двояка. Этот процесс может быть результатом:

1) накопления восстановленных продуктов (H_2S , H_2 и CH_4), выделяющихся в процессе брожения и вступающих в реакцию с окисным железом;

2) непосредственного воздействия специфичной группы микроорганизмов на окисное железо, имеющего для нее энергетическое значение, подобное тому, которое осуществляется при процессе денитрификации.

9.2.2. Окисление закисного железа в окисное

В среде, насыщенной атмосферным кислородом, закисное железо окисляется в окисное. Этот процесс осуществляется особой группой бактерий, называемых *железобактериями*.

Железобактерии имеют нитчатое строение и ведут прикрепленный образ жизни. В процессе жизнедеятельности, окисляя закисное железо в гидроксид железа ($2FeCO_3 + 1/2O_2 + 3H_2O = 2Fe(OH)_3 + 2CO_2$), образуют охристые осадки, которые могут засорять водопроводные трубы при водоснабжении глубинными водами и дренажные системы, сооружаемые при осушении торфяно-болотных почв.

К железобактериям, образующим охристые осадки, относятся многие бактерии, но наиболее широкое распространение имеет *Leptothrix ochraceae*. Это нитчатый организм, состоящий из цепочки палочковидных клеток, окруженных трубчатым неветвящимся чехлом, пропитанным оксидом железа. Клетки часто выскальзывают из чехлов, поэтому в большинстве случаев чехлы бывают пустыми. Нити свободно плавают. В настоящее время считают, что *L. ochraceae* — миксотроф, так как наряду с закисным железом ему требуется в низкой концентрации глюкоза. Оптимум его развития при pH 7,0—7,5.

Для знакомства с железобактериями, образующими охристые осадки, можно заложить стекла обрастания по методу Холлодного в железистые водоемы на разные сроки (7, 15, 30 и более суток). С этой целью предметные стекла заделывают

в пробку и опускают ее в водоем стеклами вниз. Просмотр таких стекол в раздавленной капле с иммерсионной системой позволяет обнаружить длинные желтоватые нити диаметром 2—3 мкм, принадлежащие *Leptothrix ochraceae*; иногда встречаются перекрученные ожелезненные нити *Gallionella*. При добавлении одной капли 10%-ной соляной кислоты под покровное стекло железо растворяется, а нити обесцвечиваются. После их обесцвечивания, сняв покровное стекло, наносят каплю желтой кровяной соли $K_4[Fe(CN)_6]$: в присутствии окисного железа образуется темно-синий осадок берлинской лазури.

Обработанный соляной кислотой препарат затем промывают водой, сушат, фиксируют и красят генцианом фиолетовым или эритрозином. При просмотре таких препаратов с иммерсионной системой внутри бесцветных нитей обнаруживаются ярко окрашенные клетки или цепочки клеток, вышедших из нитей.

9.2.3. Окисление органических соединений железа

В почве образование отложений железа может происходить за счет разрушения органических комплексов железа.

К бактериям, окисляющим органические соединения железа, относятся представители родов: *Siderocapsa*, *Seliberia*, *Pedomicrobium*.

На стеклах обрастания по методу Холодного, заложенных в водоемы, можно наблюдать клетки *Siderocapsa*, если эти стекла поместить в корневой зоне растений, обитающих в воде, содержащей значительное количество железа.

Материалы и оборудование

Проба из охристых осадков водоемов, жидкая среда Виноградского, высокие цилиндры, 10%-ная HCl, желтая кровяная соль, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

9.3. Превращение бактериями соединений фосфора

Микроорганизмы играют огромную роль в мобилизации доступных для растений форм фосфора в почве.

9.3.1. Превращение органических соединений фосфора

Значительное количество (до 30—35%) фосфора в почве находится в органической форме, малодоступной для растений. Это нуклеиновые кислоты, фитин и его производные — инозит-фосфаты и фосфолипиды.

Микроорганизмы, продуцирующие активные фосфатазы, способны отщеплять от этих органических фосфатов фосфорную кислоту. Последняя, взаимодействуя с катионами, переходит в соли фосфорной кислоты, доступные для растений.

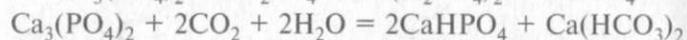
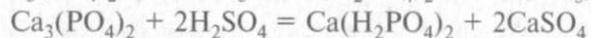
Для наблюдения за процессом мобилизации фосфора из органических фосфатов можно использовать среду Менкиной следующего состава: мясо-пептонный бульон — 1000 мл; нуклеиновая кислота (или лецитин) — 5,0 г; $CaCO_3$ — 20,0 г; агар — 30,0 г.

После стерилизации (30 мин при давлении 0,5 атм) среду встряхивают и разливают в чашки Петри, а на поверхности питательных пластин высевают почвенную суспензию (из разведений 10^{-2} , 10^{-3}). Через несколько дней инкубации при 28—30 °C чашки просматривают. Если в почве присутствовали бактерии, выделяющие фосфатазу, они развиваются на этой среде и отщепляют фосфорную кислоту, создающую вокруг колоний зону растворения мела. На такой среде обнаруживаются крупные спорообразующие палочки, соединенные попарно и в виде коротких цепочек, — *Bacillus megaterium*.

9.3.2. Мобилизация доступных форм фосфора из нерастворимых солей фосфорной кислоты

Значительный процент фосфора в почве находится в виде трикальциевых фосфатов $Ca_3(PO_4)_2$ и других труднорастворимых солей. Специфичных микроорганизмов, растворяющих трикальциевые фосфаты, не установлено. Бактерии в этом процессе участвуют косвенно. Так, нитрифицирующие бактерии, окисляя аммоний, образуют азотную кислоту; серобактерии, окисляя сероводород и серу, образуют серную кислоту, а другие микроорганизмы в процессах дыхания выделяют CO_2 , превращающийся в H_2CO_3 . Все эти кислоты взаимодействуют

с трикальциевым фосфатом и образуют дифосфат и монофосфат кальция, доступные растениям:



Для обнаружения фосфатрастворяющей способности таких бактерий по Федорову на дно чашки Петри насыпают 0,1–0,2 г $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и наливают расплавленный агаризованный почвенный экстракт (глюкоза — 2%). При осторожном перемешивании все компоненты равномерно распределяют по чашке. Если такой агар засеять бактериями, образующими кислоту, то в результате растворения фосфата вокруг развившихся колоний возникнет прозрачный ореол.

Материалы и оборудование

Стерильные чашки Петри, среда Менкиной, стерильные пробирки с водой, стеклянные шпатели Дригальского и образцы почвы, богатые гумусом, или чистая культура *B. megaterium*, стерильные пипетки Мора на 1 мл, стерильные градуированные пипетки на 1 мл, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

Почвенная микробиология

Глава 10

Общий микробиологический анализ почвы

10.1. Подготовка материала для анализа

10.1.1. Взятие средней почвенной пробы и подготовка образца

Среднюю почвенную пробу получают смешиванием отдельных образцов, количество которых зависит от микрорельефа (ровный, волнистый, склон), степени гетерогенности почвы и ее однородности в ботаническом отношении. Рекомендуют с площади 100 м² брать пробу из трех точек; с площади, превышающей 100 м², — из пяти по *принципу конверта* (четыре в точках по углам и одну — ближе к центру прямоугольника); с 1 га и более — из 15 точек. При исследовании пашни пробы берут с глубины всего пахотного слоя, снимая верхний слой толщиной 2 см; при изучении микрофлоры почвенного профиля — по генетическим горизонтам (снизу вверх).

Почвенный образец берут буром, лопатой и ножом. В поле перед взятием образца их тщательно очищают, затем обрабатывают спиртом и обжигают. Можно ограничиться очисткой этих предметов, если затем несколько раз воткнуть их в почву изучаемого горизонта. Укладывают образец в заранее приготовленную стеклянную широкогорлую стерильную банку, закрывающуюся корковой пробкой, обернутой стерильной бумагой, либо в стерильные пергаментные пакеты или пакеты из плотной бумаги, взятой двойным слоем. На пакеты, банки

наклеивают этикетки с указанием места взятия пробы, горизонта и других сведений.

Почвенные образцы анализируют в первые сутки. При необходимости допускается хранение их в холодном помещении (в холодильнике) в течение двух дней. Для придания среднему образцу большей однородности, соблюдая все условия асептики, тщательно перемешивают почву, вынимают корни растений, различные включения.

10.1.2. Приготовление почвенной суспензии и посев

На стерильное часовое стекло стерильным шпателем (или алюминиевой ложкой) помещают 10 г почвы. Чтобы при взвешивании в почву не попали микроорганизмы из воздуха, особенно споры грибов, часовое стекло накрывают другим часовым стеклом. Предварительно стекла взвешивают. Часовые стекла, шпатели и ложки стерилизуют фламбированием.

Навеску почвы переносят в колбу на 250 мл со 100 мл стерильной водопроводной воды, взбалтывают 10 мин (лучше на механической качалке) и дают отстояться грубым частицам почвы.

Одновременно со взятием навески для анализа из средней пробы отбирают 10—20 г почвы для определения влажности, так как полученные при анализе данные пересчитывают на 1 г абсолютно сухой почвы.

Значительно больше микроорганизмов выявляется, если навеску почвы предварительно поместить в стерильную фарфоровую чашку или ступку, увлажнить (0,4—0,8 мл воды или 0,1%-ным раствором пирогенфосфата $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ на 1 г почвы) и 5 мин растереть стерильным резиновым пестиком или пальцем в стерильной резиновой перчатке до пастообразного состояния. Этот прием дает возможность разрушить почвенные агрегаты и десорбировать микроорганизмы с поверхности почвенных частиц и из органоминерального геля.

Перед приготовлением суспензии для каждого образца готовят 2 стерильные колбы на 250 мл; одна содержит 100 мл стерильной водопроводной воды, другая — пустая. Водой из первой колбы растертую почвенную массу смывают в пустую стерильную колбу. Колбу с полученной суспензией встряхивают 5 мин, оставляют на 30 с и готовят разведения, содержащие разные концентрации почвы. 1 мл суспензии в первой колбе

соответствует разведению 10^{-1} . Последующие разведения (10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} и т. д.) лучше тоже делать в колбах на 250 мл с 90 мл стерильной водопроводной воды.

Из каждого предыдущего разведения отдельной стерильной пипеткой берут 10 мл суспензии и переносят в следующую колбу с 90 мл воды. Всякий раз пипетку ополаскивают и отставляют. Последующие колбы встряхивают по 1 мин.

Из полученных разведений делают посев на плотные и жидкие среды. Набор сред зависит от задач бактериологического анализа почвы.

На плотные питательные среды посев проводят преимущественно **поверхностно**. Для этого агаризованные питательные среды разливают в стерильные чашки Петри и после охлаждения подсушивают в термостате при 40°C . На поверхность агаровой пластины стерильной градуированной пипеткой наносят 0,05 мл почвенной суспензии из соответствующего разведения, затем стеклянным шпателем Дригальского растирают каплю досуха; при этом открытую чашку держат в вертикальном положении около пламени горелки. Посев из каждого разведения проводят минимум на 2—3 параллельных чашках (желательно — на 5).

При определении количества бактерий в почве *пахотного слоя* для посева на МПА, крахмалоаммиачном агаре (КАА), среде Чапека используют разведения 10^{-3} и 10^{-4} ; на сусло-агаре, МПА + сусло-агар, бедных средах (нитритный агар), на среде Эшби применяют разведения 10^{-2} и 10^{-3} . Для почв *нижних горизонтов* соответственно используют разведения на один порядок меньше.

Для **глубинного посева** берут 1 мл почвенной суспензии из разведения на порядок меньшего, чем для поверхностного посева.

Суспензию вносят в стерильную чашку Петри, заливают агаром, расплавленным и охлажденным до 45°C , и смешивают с ним. При глубинном посеве показатели получаются более низкие, чем при поверхностном.

При учете микроорганизмов почвы **в жидких средах** последние разливают в пробирки по 9 мл и стерилизуют. Из каждого разведения почвенной суспензии, начиная с самого высокого, отдельной стерильной пипеткой берут по 1 мл и переносят в жидкую среду. Из каждого разведения засевают минимум 2 пробирки или колбы (лучше 3—5).

Когда численность отдельных групп микроорганизмов в почве *небольшая*, их выявляют методом обрастания комочков почвы по Виноградскому. Отмытые от следов хлора (см. 7.2.1) и прокипяченные или простерилизованные гелевые пластинки пропитывают 3—5 мл элективной среды для соответствующей группы микроорганизмов. Обычно среду упаривают в сушильном шкафу при 40—50 °С до образования эмалевой поверхности (см. 8.2.1). По поверхности раскладывают по трафарету 40—50 комочков почвы диаметром 1—2 мм.

Чашки помещают во влажную камеру и ставят в термостат. Если в комочках почвы находятся соответствующие микроорганизмы, то они начинают развиваться и формируют вокруг комочков колонии. Затем вычисляют количество обросших комочков почвы (в % от исходного числа). После определенного срока инкубации при 28—30 °С культуры анализируют.

Материалы и оборудование

Стерильные стеклянные широкогорлые банки, закрытые обернутыми стерильной бумагой корковыми пробками, часовые стекла, фарфоровые чашки, фарфоровые ступки с пестиками, шпатели, ложки, колбы на 250 мл со 100 мл стерильной водопроводной воды — 1 (на человека), колбы на 250 мл с 90 мл стерильной водопроводной воды — 6 (на человека), 0,1%-ный раствор пиродифосфата натрия $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, стерильные пипетки Мора на 10 и 1 мл, стерильные пробирки с 9 мл водопроводной воды, стерильные чашки Петри, питательные среды.

10.2. Состав и приготовление питательных сред для разных групп микроорганизмов

10.2.1. Группы микроорганизмов, выявляемые на плотных средах

Микроорганизмы, использующие органические формы азота, выявляют на МПА.

Для учета спорообразующих бактерий (*по Мишустину*) рекомендуют применять смешанный агар: МПА + сусло в соотношении 1 : 1. МПА готовят обычным способом, сусло-агар — из 7-баллингового сусла (рН 7,0) и 2% агара.

Смешивают МПА и сусло-агар перед посевом и разливают в чашки Петри.

Почвенную суспензию из соответствующего разведения (10^{-1} и 10^{-2}) пастеризуют перед посевом при 70 °С 15 мин. Бациллярных форм выявляется больше, если почву перед приготовлением разведений подсушить при комнатной температуре.

Микроорганизмы (в том числе актиномицеты), способные использовать минеральные формы азота, чаще выявляют на КАА, содержащем (г/л дистиллированной воды): крахмал (растворимый) — 10,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,0; K_2HPO_4 — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1,0; NaCl — 1,0; CaCO_3 — 3,0; агар — 20,0. Крахмал приливают к среде, предварительно растворив его в небольшом количестве воды.

Для выявления этой группы микроорганизмов можно использовать и среду *Чанека* следующего состава (г/л дистиллированной воды): сахароза или глюкоза — 20,0; NaNO_3 — 2,0; K_2HPO_4 — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; KCl — 0,5; CaCO_3 — 3,0; агар — 20,0.

При изучении актиномицетов используют также среды с глюкозой.

Среда 1 (г/л дистиллированной воды): глюкоза — 14,0; CaCO_3 — 0,7; KNO_3 — 0,7; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,35; NaCl — 0,35; K_2HPO_4 — 0,35; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — следы; агар — 20,0.

Среда 2 (г/л дистиллированной воды): глюкоза — 10,0; цитрат натрия — 11,2; KH_2PO_4 — 2,38; K_2HPO_4 — 5,65; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,64; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 1,21; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,012; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,11; CuSO_4 — 0,006; MnCO_3 — 0,0012; агар — 20,0.

Микроорганизмы, участвующие в минерализации гумусовых веществ, автохтонную (от греч. *autochthōn* — местный, коренной) микрофлору обнаруживают на следующих средах.

1. *Водный агар* (по Эрскову): к 1 л водопроводной воды прибавляют 2—2,5% хорошо отмытого агара и 20 мин стерилизуют при 120 °С.

2. *Агаризованная почвенная вытяжка*: к 1 л почвенной вытяжки добавляют 0,5 г K_2HPO_4 и 20—25 г агара. Среду стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Почвенную вытяжку лучше готовить по Фишеру: к 1 кг почвы с высоким содержанием гумуса приливают 1 л 0,1%-ного Na_2CO_3 и нагревают 30 мин в автоклаве при 115 °С. Вытяжку фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Если фильтрат получается мутным, его осветляют кипячением с тальком и снова фильтруют. К 100 мл экстракта добавляют 900 мл воды.

3. На нитритном агаре, приготовленном по методу Виноградского, лучше выявляются представители автохтонной микрофлоры, так как нитрит ингибирует рост бациллярных форм, подавляющих микроорганизмы автохтонной группы. Нитритный агар готовят следующим образом: к среде для второй фазы нитрификации (см. 8.2.2) добавляют 20 г/л хорошо вымоченного в дистиллированной воде агара и стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Азотобактер и олигонитрофильные микроорганизмы (в том числе дрожжи *Lipomyces*) учитывают на среде Эшби (см. 8.4.3).

Микроскопические грибы чаще обнаруживают на сусло-агаре, но можно использовать также кислую среду Чапека.

Для приготовления сусло-агара берут семибаллинговое сусло, разводят его в 3 раза водой и добавляют 2% агара. Среду стерилизуют 30 мин в автоклаве при 0,5 атм или в кипятильнике Коха при 100 °С также 30 мин 3 раза через сутки (дробная стерилизация).

Перед добавлением к почвенной суспензии, внесенной в чашки Петри, расплавленного сусло-агара к нему приливают 2 мл стерильной молочной кислоты (на 1 л субстрата) или 0,5 г стерильной лимонной кислоты.

При приготовлении среды Чапека для грибов в среде, подготовленной для выявления актиномицетов, двузамещенный фосфат калия заменяют эквивалентным количеством однозамещенного фосфата калия (см. выше).

Перед тем как расплавленную среду Чапека внести в чашки Петри, к ней добавляют 4 мл/л стерильной концентрированной молочной кислоты.

10.2.2. Группы микроорганизмов, выявляемые на жидких средах (метод предельных разведений)

Аэробные целлюлозоразрушающие микроорганизмы количественно можно учесть на среде Имшенецкого и Солнцевой, содержащей (%): NaNO_3 — 0,25; K_2HPO_4 — 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,03; NaCl — 0,01; CaCl_2 — 0,01; CaCO_3 — 0,5; добавлять мел необязательно.

По 5 мл этой среды разливают в пробирки, в качестве источника углерода используют полоски фильтровальной бумаги длиной 7—10 см, не содержащие крахмала (реакция с раствором Люголя). Полоски на 4—5 см должны выступать над средой. Стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Нитрифицирующие бактерии учитывают на жидкой среде Виноградского для бактерий первой фазы нитрификации (см. 8.2.2). Среду разливают по 25 мл в колбы Эрленмейера на 100 мл и стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Денитрифицирующие бактерии выявляют на среде Гильтая. Готовят два раствора. Первый: KNO_3 — 2,1 г; аспарагин — 10 г; дистиллированная вода — 250 мл; второй: цитрат натрия — 5,0 г; KH_2PO_4 — 2,0 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 2,0 г; CaCl_2 — 2,0 г; FeCl_3 — следы; дистиллированная вода — 500 мл.

Растворы сливают вместе, устанавливают pH 6,8—7,0, объем доводят дистиллированной водой до 1000 мл. Хорошие результаты получаются и на более простой среде (см. 8.3.1).

Анаэробные азотфиксаторы (*Clostridium pasteurianum*) учитывают на среде Виноградского (см. 8.4.3). Источником углерода в ней служит глюкоза — 20,0 г на 1 л дистиллированной воды. Среду разливают по 9 мл (на 1/2 пробирки). Перед стерилизацией в пробирки опускают опрокинутый вверх дном поплавки для улавливания газов (см. 6.2.3).

10.2.3. Группы микроорганизмов, выявляемые методом обрастания комочков почвы

Для определения качественного состава почвы и относительной оценки населенности почвы аэробными целлюлозоразрушающими микроорганизмами используют гелевые пластины или пластины из «голодного» агара.

На пластину помещают кружок стерильной фильтровальной бумаги, увлажненной стерильной средой Виноградского (см. 7.2.1) или средой Гетчинсона. Затем по фильтровальной бумаге раскладывают (по трафарету) 50 комочков почвы диаметром 1—2 мм.

Среда Гетчинсона имеет следующий состав (г/л дистиллированной воды): NaNO_3 — 2,5; KH_2PO_4 — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,3; NaCl — 0,1; CaCl_2 — 0,1; FeCl_3 — 0,01; рН среды доводят до 7,2 добавлением 20%-ного раствора Na_2CO_3 .

Нитрифицирующие бактерии выявляют на гелевых пластинах, пропитанных 5 мл питательной среды *Виноградского* (см. 8.2.1) для первой или для второй фазы нитрификации. Пластины подсушивают в сушильном шкафу при 40—50 °С до образования блестящей (эмалевой) поверхности. По ней раскладывают комочки почвы диаметром 1—2 мм.

Азотобактер также хорошо выявляется на гелевых пластинах, пропитанных 3—5 мл питательной среды *Виноградского* (см. 8.4.3).

10.3. Определение численности различных групп микроорганизмов

10.3.1. Учет на плотных средах

После инкубации засеянные среды вынимают из термостата и в них подсчитывают число колоний.

Одновременно после сушки бюксов с навесками при 105 °С до постоянной массы определяют содержание абсолютно сухой почвы в 1 г анализируемой сырой почвы (см. 5.1.1).

При подсчете колоний на *богатых* плотных питательных средах (МПА, МПА + сусло-агар, КАА, сусло-агар, среда Чапека, среда Эшби и т. д.) закрытые чашки Петри просматривают в проходящем свете и с внешней стороны колонии отмечают чернилами или тушью. Чтобы не пропустить мелкие колонии, чашки дополнительно просматривают под лупой. Желательно использовать специальный прибор с арифмометром.

Число колоний на *бедных* средах (нитритный агар, «голландный» агар, агаризованный почвенный экстракт и т. д.) оп-

ределяют под микроскопом (окуляр 10× и объектив 3×, в крайнем случае — окуляр 10× и объектив 8×).

В чашках Петри сначала учитывают колонии в 100 полях зрения, затем определяют среднее арифметическое для одного поля зрения. Для определения числа колоний на всей чашке среднее число колоний в одном поле зрения умножают на коэффициент (K), который равен площади чашки Петри (P), деленной на площадь поля зрения (p):

$$K = \frac{P}{p}$$

Диаметр чашки Петри измеряют линейкой, а диаметр поля зрения — под микроскопом, используя для малых увеличений миллиметровую бумагу, а для больших (объективы 40× и 90×) — объективный микрометр.

Подсчитав при поверхностном посеве число колоний на чашке, находят содержание клеток в 1 мл соответствующего разведения, умножая число колоний на 20, так как посеяно было 0,05 мл суспензии. Чтобы определить количество клеток в 1 г сырой почвы, их содержание в 1 мл умножают на степень разведения (10^3 , 10^4 , 10^5 и т. д.).

Для учета микроорганизмов в 1 г абсолютно сухой почвы число клеток в 1 г сырой почвы делят на количество абсолютно сухой почвы, содержащейся в 1 г сырой почвы.

Пример расчета. Установлено, что при поверхностном посеве почвенной суспензии из разведения 10^{-3} число колоний на чашке равно 52; влажность почвы — 25%; при такой влажности 1 г сырой почвы содержит 0,75 г абсолютно сухой почвы. Число клеток в 1 г абсолютно сухой почвы (x) определяют следующим образом:

$$x = \frac{52 \cdot 20 \cdot 1000}{0,75} = 1\,386\,666 \text{ (клеток)}$$

При глубинном посеве число колоний в 1 г абсолютно сухой почвы подсчитывают так же, но не умножают на 20, так как при посеве используют 1 мл суспензии, а не 0,05 мл.

Подсчет желательно проводить и в пересчете на 1 г гумуса или на 1 мг азота. В этих случаях параллельно определяют содержание гумуса или азота в почве.

Учет микроорганизмов на МПА. Проводят его визуально на 4-й день после посева. При наличии колоний *B. mycoides*

количество микроорганизмов определяют на 2-й или 3-й день. После подсчета всех колоний на чашке их группируют по культуральным признакам и определяют роды (а иногда и виды) микроорганизмов.

■ **Учет микроорганизмов на КАА.** Колонии на таком агаре подсчитывают на 7—10-й день. Из общего количества микроорганизмов отдельно учитывают: пигментированные формы — желтые и другие микобактерии, образующие мелкие куполообразные колонии, актиномицеты (*Streptomyces*).

Отмечают окраску колоний, воздушного мицелия (серая, белая, зеленовато-серая, розовая) и среды (выделение пигмента в субстрат). Для описания пигментации можно использовать специальные пособия по определению цвета.

При идентификации актиномицетов описывают консистенцию колоний (плотные, кожистые, рыхлые), поверхность (мучнистая, бархатистая) и запах (землистый, эфирный, фруктовый).

■ **Учет микроорганизмов на бедной среде — нитритном агаре** (см. 10.2.1). Колонии определяют под микроскопом на 6—7-й день культивирования. Если на колониях появляются *Protozoa*, об их наличии судят по образованию цист, которые хорошо просматриваются при малом увеличении объектива. Подсчет проводят после 6 сут инкубации.

По культуральным признакам выделяют следующие роды:

■ *Nocardia* — колонии пастообразные, слизистые, сухие, по периферии образуется мицелиальная зона или мицелиальный ободок (рис. 27, а), состоящий из субстратного и надсубстратного мицелия. В центре колонии чаще преобладают фрагментированные гифы, состоящие из палочковидных и кокковидных клеток. Колонии бесцветные, лимонно-желтые, желтые, розовые, красные;

■ *Mycobacterium* (см. 6.1.3);

■ *Arthrobacter* — колонии мелкие, плоские или слегка приподнятые, бесцветные, иногда с зеленовато-желтым оттенком. По их периферии образуется кружевной или складчатый ободок (рис. 27, б). У отдельных представителей края колоний зубчатые. Молодая культура состоит из мелких искривленных

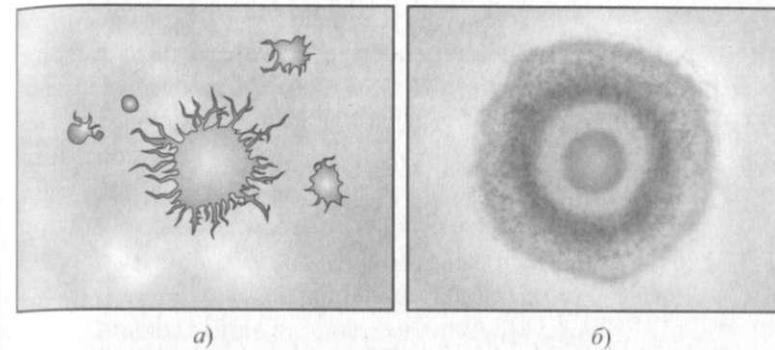


Рис. 27. Характер роста колоний на бедной среде (нитритном агаре): а — *Nocardia*; б — *Arthrobacter*

палочек, затем они довольно быстро распадаются, чаще — на кокковидные клетки;

■ *Микромонаспоры* — их компактный мицелий полностью погружен в субстрат и едва заметен под микроскопом. На поверхности агара кольцеобразно или радиально располагаются бесцветные или темноокрашенные комочки слизи, содержащие споры;

■ *Bactoderma* — колонии мелкие в виде розоватой или белой бархатистой пленки; в центре она — складчатая, а по периферии — стекловидная; край колоний волнистый или лопастный.

■ **Учет на среде Эшби.** Проводят на 5—6-е сут. Отдельно подсчитывают колонии *азотобактера* — плоские, слизистые, мажущейся консистенции, диаметром 5—10 мм, и *олигонитрофильные бактерии* — мелкие, слизистые, бесцветные колонии. Олигонитрофильные дрожжи — *Lipomyces* — образуют слизистые молочно-белые колонии.

■ **Учет грибов на агаровых средах.** Колонии грибов на суло-агаре или среде Чапека подсчитывают через 2 сут инкубации. После 7 сут определяют родовой состав.

В почве часто встречаются грибы родов: *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Macrosporium*, *Chaetomium*, *Cephalosporium*, *Phoma*, *Coremium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Stachybotrys*.

10.3.2. Учет на жидких средах

При определении численности микроорганизмов на жидких средах отмечают крестом пробирки с разведением, в которых развились представители исследуемой группы. Затем для более точного подсчета используют *таблицу Мак-Креди*, составленную на основании обработки многочисленных результатов методом вариационной статистики. В соответствии с требованиями, предъявляемыми к расчетам, необходимо составить **числовую характеристику** из трех цифр (табл. 2).

Первая цифра соответствует числу параллельно засеянных пробирок данного разведения (отмечается последнее разведение, в котором рост микроорганизмов наблюдается во всех параллельных пробирках). Следующие две цифры обозначают число пробирок, в которых обнаружен рост микроорганизмов в последующих двух разведениях. В таблице Мак-Креди находят вероятное число клеток, соответствующее числовой характеристике, и эту цифру умножают на степень разведения, при которой отмечен рост во всех параллельных пробирках.

Пример расчета

Разведение	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Число параллельно засеянных пробирок	4	4	4	4	4
Число пробирок, в которых обнаружен рост	4	4	2	1	0

Числовая характеристика — 421; вероятное число клеток — 9,5 (найденно в таблице). Для учета клеток в 1 г абсолютно сухой почвы полученное число клеток умножают на 1000 (поскольку первая цифра числовой характеристики определяет соответствующее разведение: 10⁻³ или 0,001) и делят на количество абсолютно сухой почвы, содержащейся в 1 г сырой почвы (учитывая ее влажность). При влажности почвы 25% абсолютно сухой почвы в 1 г сырой почвы будет 0,75 г. Найденное число клеток в 1 г абсолютно сухой почвы составит:

$$\frac{9,5 \cdot 1000}{0,75} = 12\ 666 \text{ (клеток).}$$

Экспресс-обработка результатов учета микроорганизмов методом предельных разведений (по Мак-Креди)

Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микроорганизмов при заражении параллельных пробирок				Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микроорганизмов при заражении параллельных пробирок			
	2	3	4	5		2	3	4	5
000	0,0	0,0	0,0	0,0	120	2,0	1,1	0,8	0,6
001	0,5	0,3	0,2	0,2	121	3,0	1,5	1,1	0,8
002	—	—	0,5	0,4	122	—	—	1,3	1,1
003	—	—	0,7	—	123	—	—	1,6	—
010	0,5	0,3	0,2	0,2	130	—	1,6	1,1	0,8
011	0,9	0,6	0,5	0,4	131	—	—	1,4	1,0
012	—	—	0,7	0,6	132	—	—	1,6	—
013	—	—	0,9	—	140	—	—	1,4	1,1
020	0,9	0,6	0,5	0,4	141	—	—	1,7	—
021	—	—	0,7	0,6	200	2,5	0,9	0,6	0,5
022	—	—	0,9	—	201	5,0	1,4	0,9	0,7
030	—	—	0,7	0,6	202	—	2,0	1,2	0,9
031	—	—	0,9	—	203	—	—	1,6	1,2
040	—	—	0,9	—	210	6,0	1,5	0,9	0,7
041	—	—	1,2	—	211	13,0	2,0	1,3	0,9
100	0,6	0,4	0,3	0,2	212	20,0	3,0	1,6	1,2
101	1,2	0,7	0,5	0,4	213	—	—	2,0	—
102	—	1,1	0,8	0,6	220	25,0	2,0	1,3	0,9
103	—	—	1,0	0,8	221	70,0	3,0	1,6	1,2
110	1,3	0,7	0,5	0,4	222	110,0	3,5	2,0	1,4
111	2,0	1,1	0,8	0,6	223	—	4,0	—	—
112	—	—	1,1	0,8	230	—	3,0	1,7	1,2
113	—	—	1,3	—	231	—	3,5	2,0	1,4

Продолжение табл. 2

Чис- ловая харак- терис- тика	Наиболее вероятное число микроорганизмов при за- ражении параллельных пробирок				Чис- ловая харак- терис- тика	Наиболее вероятное число микроорганизмов при за- ражении параллельных пробирок			
	2	3	4	5		2	3	4	5
232	—	4,0	—	—	403	—	—	7,0	2,5
240	—	—	2,0	1,4	410	—	—	3,5	1,7
241	—	—	3,0	—	411	—	—	5,5	2,0
300	—	2,5	1,1	0,8	412	—	—	8,0	2,5
301	—	4,0	1,6	1,1	413	—	—	11,0	—
302	—	6,5	2,0	1,4	414	—	—	14,0	—
303	—	—	2,5	—	420	—	—	6,0	2,0
310	—	4,5	1,6	1,1	421	—	—	9,5	2,5
311	—	7,5	2,0	1,4	422	—	—	13,0	3,0
312	—	11,5	3,0	1,7	423	—	—	17,0	—
313	—	16,0	3,5	2,0	424	—	—	20,0	—
320	—	9,5	2,0	1,4	430	—	—	11,5	2,5
321	—	15,0	3,0	1,7	431	—	—	16,5	3,0
322	—	20,0	3,5	2,0	432	—	—	20,0	4,0
323	—	30,0	—	—	433	—	—	30,0	—
330	—	25,0	3,0	1,7	434	—	—	35,0	—
331	—	45,0	3,5	2,0	440	—	—	25,0	3,5
332	—	110,0	4,0	—	441	—	—	40,0	4,0
333	—	140,0	5,0	—	442	—	—	70,0	—
340	—	—	3,5	2,0	443	—	—	140,0	—
341	—	—	4,5	2,5	444	—	—	160,0	—
350	—	—	—	2,5	450	—	—	—	4,0
400	—	—	2,5	1,3	451	—	—	—	5,0
401	—	—	3,5	1,7	500	—	—	—	2,5
402	—	—	5,0	2,0	501	—	—	—	3,0

Окончание табл. 2

Чис- ловая харак- терис- тика	Наиболее вероятное число микроорганизмов при за- ражении параллельных пробирок				Чис- ловая харак- терис- тика	Наиболее вероятное число микроорганизмов при за- ражении параллельных пробирок			
	2	3	4	5		2	3	4	5
502	—	—	—	4,0	540	—	—	—	13,0
503	—	—	—	6,0	541	—	—	—	17,0
504	—	—	—	7,5	542	—	—	—	25,0
510	—	—	—	3,5	543	—	—	—	30,0
511	—	—	—	4,5	544	—	—	—	35,0
512	—	—	—	6,0	545	—	—	—	45,0
513	—	—	—	8,5	533	—	—	—	17,5
520	—	—	—	5,0	534	—	—	—	20,0
521	—	—	—	7,0	550	—	—	—	25,0
522	—	—	—	9,5	551	—	—	—	35,0
523	—	—	—	12,0	552	—	—	—	60,0
524	—	—	—	15,0	553	—	—	—	90,0
525	—	—	—	17,5	554	—	—	—	100,0
530	—	—	—	8,0	555	—	—	—	180,0
531	—	—	—	11,0	—	—	—	—	—
532	—	—	—	14,0	—	—	—	—	—
535	—	—	—	25,0	—	—	—	—	—

Наличие нитрифицирующих бактерий первой фазы определяют по образованию нитритов — реакцией с цинк-иод-крахмалом в кислой среде. Пробы берут через 7, 14 и 21 сут инкубации.

Денитрифицирующие бактерии и анаэробные азотфиксаторы (*Clostridium pasteurianum*) выявляют на 5—6-е сут культивирования по присутствию газов в поплавках.

Наличие аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов определяют на 8—10-е сут инкубации

в термостате по образованию колоний и разрушению целлюлозы на границе между жидкой средой и воздухом.

10.3.3. Учет методом обрастания комочков почвы

Подсчитывают комочки, образовавшиеся вокруг колоний, а затем определяют, каково их соотношение (%) с общим числом комочков почвы (относительная оценка плотности населения учитываемых групп микроорганизмов в почве).

Рост нитрифицирующих бактерий устанавливают по образованию зон растворения CaCO_3 или MgCO_3 . Кроме того, из этих зон вырезают кусочки геля и делают пробы на NH_3 (реактив Несслера), на нитрит (цинк-иод-крахмал в присутствии H_2SO_4) и на нитрат (дифениламин).

Наличие колоний азотобактера на гелевых пластинах определяют на 3—5-е сут инкубации по образованию сероватых слизистых колоний, которые постепенно приобретают темно-бурый (*A. chroococcum*) или зеленый (*A. agile*) цвет.

Учет аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов на гелевых пластинах выполняют на 8—10-е сут инкубации. Кроме общего подсчета обросших микроорганизмами комочков почвы, отдельно определяют количество комочков, обросших бактериями, актиномицетами и грибами (%).

Можно выделить следующие роды бактерий, использующих целлюлозу: *Cytophaga*, *Cellvibrio*, *Myxococcus*, *Polyangium* и *Sorangium* (см. 7.2.1).

Из грибов, разрушающих целлюлозу, часто можно обнаружить представителей следующих родов:

Dematium — образуют одноклеточные бесцветные конидии округлой или овальной формы. Vegetативные клетки — темные,

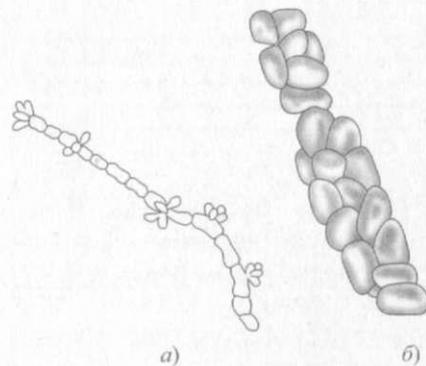


Рис. 28. Грибы, разрушающие клетчатку:
а — *Dematium*; б — эпифитный гриб *Fumago* на клетчатке, хламидоспоры

цилиндрические, собраны в цепочки (рис. 28, а). Колонии на целлюлозе имеют вид черных пятен;

Stachybotrys — колонии черные, бархатистые, под микроскопом обнаруживаются спорангии, покрытые темноокрашенными спорами;

Cladosporium — конидиеносцы длинные, многоклеточные, от них отпочковываются неправильной формы конидии. Колонии окрашены в светлый оливково-зеленый цвет;

Fumago — колонии на клетчатке темные и состоят из скоплений в виде узелков темных овальных и округлых хламидоспор (рис. 28, б);

Chaetomium — образуют перитеции серого или зеленоватого цвета;

аспорогенные грибы — образуют желтый или белый мицелий без спороношения.

Материалы и оборудование (к 10.2—10.3.3)

Питательные среды в колбах (МПА и КАА), жидкие среды в пробирках: среда для аэробных целлюлозоразрушающих бактерий, среда для анаэробных азотфиксаторов; гелевые пластины, пропитанные питательной средой для азотобактера и аэробных целлюлозоразрушающих бактерий; стерильные чашки Петри, колбы со стерильной водопроводной водой по 90 мл, стерильные пипетки Мора на 10 мл, стерильные градуированные пипетки на 1 мл, стерильные шпатели Дригальского, часовые стекла, стеклянные палочки с оттянутыми концами; свежие пробы почв разных типов; чайные ложки, пинцеты, трафареты, лупы, микроскопы, предметные стекла и все необходимое для приготовления окрашенных препаратов, препаратов в раздавленной капле и микроскопирования.

10.3.4. Определение общей численности микроорганизмов в почве методом прямого счета под микроскопом

Метод прямого счета стали применять после того, как обнаружили, что кислые красители хорошо прокрашивают на препарате вегетативные клетки микроорганизмов и слабо — почвенные частицы.

Наиболее точно численность микроорганизмов в почве определяют методом Виноградского. Исследования, проведенные этим методом, показали, что разные почвенные фракции содержат неодинаковое число микроорганизмов. Меньше всего

их во фракции крупных частиц почвы, больше всего — в дисперсной фракции, содержащей максимум органического вещества. Метод имеет ряд достоинств, но достаточно труден и поэтому широко не используется.

Метод Виноградского в модификации Шульгиной чаще применяют в лабораторной практике. Сущность его в следующем. Из средней почвенной пробы (см. 10.1.1) берут 5 г и вносят в колбу Эрленмейера на 250 мл, содержащую 50 мл стерильной водопроводной воды. Навеску почвы предварительно растирают в стерильной агатовой или фарфоровой ступке с небольшим количеством стерильной воды. Для черноземных и темно-каштановых почв навеску растирают с 0,1%-ным раствором пирогенфосфата натрия. Затем 5 мин встряхивают и в течение 2—5 с дают осесть грубым частицам.

Из полученной взвеси стерильной градуированной пипеткой берут 0,01 мл и переносят на хорошо обезжиренное стекло. Одновременно с суспензией на стекло помещают каплю 0,1%-ного раствора агара (хорошо отмытый агар готовят на дистиллированной воде). Агар и суспензию на стекле перемешивают и стерильным покровным стеклом распределяют по трафарету на 4 см². *Трафарет* — заштрихованный тушью на миллиметровой бумаге квадрат площадью 4 см², приклеенный к предметному стеклу с нижней стороны.

Препарат сушат, фиксируют 96%-ным спиртом и красят карболовым эритрозином (от 30 мин до одних суток). При окрашивании стекла погружают в раствор эритрозина. Остаток красителя смывают, опуская стекла в воду тыльной стороной. Затем препарат снова сушат и просматривают под микроскопом с иммерсионной системой.

Для получения более точных результатов подсчитывают 10 полей зрения и определяют среднее число клеток в одном поле зрения. Одновременно устанавливают площадь поля зрения: $p = \pi r^2$ (см. 5.1.3). Диаметр поля зрения измеряют при помощи объектного микрометра. Затем находят, сколько полей зрения (K) размещается на площади мазка (P), равной 400 мм² по формуле:

$$K = \frac{P}{p}$$

Пример расчета. Если диаметр поля зрения равен 0,16 мм, а площадь поля зрения соответствует 0,02 мм², то

$$K = \frac{P}{p} = \frac{400}{0,02} = 20\ 000 \text{ (полей зрения).}$$

Среднее число клеток в поле зрения умножают на K и устанавливают число клеток в 0,01 мл суспензии. Для определения количества клеток в 1 мл суспензии полученное число умножают на 100, для подсчета в 1 г абсолютно сухой почвы — на степень разведения и делят на навеску абсолютно сухой почвы, содержащейся в 1 г сырой почвы.

Использование метода прямого учета почвенных микроорганизмов по Виноградскому в модификации Шульгиной показало, что в почве содержится в сотни и тысячи раз больше клеток микроорганизмов, чем удается учесть методом питательных пластин.

Метод учета численности бактерий в почве при помощи люминесцентной микроскопии по Звягинцеву и Кожевину дает еще более достоверный результат по сравнению с методом Виноградского. Суть его в том, что приготовленные из почвенной суспензии препараты окрашивают специальным красителем — акридином оранжевым (флуорохромом). Окрасившиеся в ярко-зеленый цвет клетки хорошо заметны на темном или красном фоне почвенных частиц и препарата, причем микроскопия в отраженном свете позволяет учитывать и адсорбированные почвенными частицами клетки, которые, как правило, не видны в проходящем свете.

Порядок подготовки препарата:

1) почвенную суспензию с соотношением почвы и воды 1 : 10 (10 г почвы на 90 мл воды) обрабатывают на ультразвуковой установке УЗДН-1 с диспергирующей насадкой в течение 3 мин при силе тока 0,40 А и частоте 15 кГц. Обработка почвы ультразвуком способствует не только разрушению почвенных агрегатов и десорбции микроорганизмов, но и дезагрегации микроколоний в почве. Затем почвенную суспензию переносят в мерный цилиндр на 100 мл. После отстаивания (2 мин) пипеткой отбирают 2 мл суспензии из средней фракции, т. е. возле отметки на цилиндре «50 мл», и переносят в колбу с 18 мл воды;

2) колбу энергично встряхивают, суспензию из нее наносят микропипеткой на тщательно обезжиренное предметное стекло (0,01 мл на препарат) и равномерно распределяют петель по площади 4 см² (квадрат 2×2). На каждом стекле можно приготовить 3 препарата. Удобнее предварительно начертить расположение квадратов в натуральную величину на бумаге и класть на нее предметные стекла для приготовления препаратов;

3) препараты высушивают на воздухе при комнатной температуре. Затем после фиксации легким нагреванием на пламени газовой горелки препараты окрашивают водным раствором акридина оранжевого (разведение 1 : 10 000) 2—4 мин;

4) избыток красителя удаляют в процессе промывки, для чего стекла погружают на 10 мин в стакан или кювету с водопроводной водой. Окрашенные препараты высушивают при комнатной температуре;

5) для микроскопии на препарат наносят каплю воды и покрывают покровным стеклом. Приготовленный препарат не должен содержать пузырьков воздуха, лишнюю воду снимают фильтровальной бумагой. Препарат просматривают на люминесцентном микроскопе МЛ-2 или МЛ-4 (фильтры ФС-1-2, ЖЗС-19, ЖС-18, объектив 90×Л, окуляры 4× или 5×).

Число клеток микроорганизмов, содержащихся в 1 г почвы (M), определяют по формуле

$$M = \frac{4 \cdot a \cdot H}{p} \cdot 10^{10},$$

где 4 — площадь квадрата, см²; a — среднее число клеток в поле зрения; p — площадь поля зрения (мкм²); H — показатель разведения (в данном случае $H = 100$, что приемлемо для поверхностных горизонтов почв основных типов, однако степень разведения может быть изменена в зависимости от численности микроорганизмов в конкретном образце; желательнее подобрать разведение таким образом, чтобы среднее число клеток в поле зрения составляло 5—10); 10^{10} — коэффициент, который получается при измерении площади мазка в мкм и расчете H в мл.

Из каждого почвенного образца готовят два препарата и на обоих препаратах подсчитывают клетки в 5 полях зрения. Поля зрения выбирают не произвольно, а переходят к новому полю зрения, поворачивая микровинт столика на определенную величину.

Учет при помощи люминесцентной микроскопии требует соответствующего оборудования. При его отсутствии следует применять метод Виноградского в модификации Шульгиной.

Материалы и оборудование

Средняя почвенная проба, колбы Эрленмейера на 250 мл с 50 мл стерильной водопроводной воды, пустые стерильные колбы на 250 мл, 0,1%-ный раствор пиррофосфата натрия, фарфоровая (или агатовая) ступка с пестиком, 96%-ный этиловый спирт, хорошо обезжиренные предметные и покровные стекла, стерильные градуированные пипетки на 1 мл, 0,1%-ный агар, карболовый раствор эритрозина, трафареты на 4 см², объект-микромметр, микроскопы (светлопольный и люминесцентный) и все необходимое для микроскопирования.

Глава 11 Изучение почвенных и ризосферных микробоценозов

11.1. Состав и соотношение почвенных микроорганизмов

11.1.1. Метод обрастания стекол по Холодному

Сущность метода состоит в следующем. На ровной поверхности почвы делают ножом разрез, глубина которого зависит от исследуемого горизонта. Отмытые и обезжиренные стекла (одновременно берут несколько стекол) плотно прижимают к вертикальной стенке разреза и засыпают почвой. В пахотном слое стекла помещают на 3—5 см ниже поверхности. Сверху разрез засыпают почвой и место, где заложены стекла, отмечают этикеткой. Стекла выдерживают в почве в зависимости от задачи исследования от недели до нескольких месяцев.

После истечения времени экспозиции убирают почву с тыльной стороны стекол, «откидывают» их от стенки и вынимают. Тыльную сторону вытирают сухой тряпкой, а опытную поверхность стекол высушивают на воздухе и фиксируют трижды, проводя тыльной стороной над пламенем горелки.

После фиксации стекло погружают в воду опытной поверхностью вниз, не доводя его до дна. При этом крупные частицы почвы, отмокая, падают на дно, а фиксированные микроорганизмы и мелкие частицы остаются на стекле. После промывки препарат погружают в раствор карболового эритрозина на срок от 30 мин до 24 ч.

Окрашенные препараты исследуют под микроскопом с иммерсионной системой. При микроскопировании отмечают характер микрофлоры, плотность обрастания стекол и доминирующие формы. Отдельные ассоциации микроорганизмов можно запечатлеть, используя микрофото съемку.

11.2. Микроорганизмы, разлагающие гумусовые вещества

11.2.1. Метод Виноградского

Для выявления *автохтонной* — истинно почвенной группы микроорганизмов, минерализующих гумусовые вещества, по Виноградскому отмытые от следов хлора и прокипяченные гелевые пластины пропитывают минеральной средой без источников углерода и азота (г/200 мл дистиллированной воды): K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; $NaCl$ — 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ — 0,01.

В чашку вносят 3—5 мл минеральной среды, а в качестве единственного источника углерода и азота добавляют гумат кальция.

Чашки Петри с гелевыми пластинами с гуматами и комочками почвы (см. 8.2.1) помещают во влажную камеру крышками вниз и выдерживают при 25—28 °С 40—50 сут и более. Вокруг комочков почвы на гумате появляются специфичные бурые колонии в виде тонких бархатистых налетов розового и белого цвета — *Bactoderma* (*B. alba*, *B. rosea*).

11.2.2. Метод Виноградского в модификации Теппер

В данной модификации в отличие от основного метода к 3—5 мл минеральной среды добавляют 0,3 г $CaCO_3$, а вместо гумата кальция используют более подвижную и доступную для микроорганизмов форму — гумат натрия — 10—50 мг. Вместо комочков почвы добавляют 1 мл почвенной суспензии разведе-

дения 10^{-2} . Содержимое чашки также тщательно перемешивают, подсушивают до эмалевой поверхности, помещают во влажную камеру и выдерживают при 25—28 °С.

Через 50—60 сут инкубации на поверхности гелевых пластин с гуматами появляются мелкие колонии бурого и желто-бурого цвета. Диаметр отдельных колоний колеблется от 0,5 до 1,0—1,5 мм, а после 4 мес. инкубации — от 1,0 до 2,5 мм. Более крупные колонии микроорганизмов образуются, если гуматы используют только как источник углерода. В этом случае в минеральную среду вносят дополнительно азот в виде KNO_3 (14 мг на чашку).

При просмотре колоний под микроскопом с увеличениями $\times 30$ ($10\times$ — окуляр, $3\times$ — объектив) и $\times 80$ ($10\times$ — окуляр, $8\times$ — объектив) у многих из них по периферии обнаруживается мицелиальная зона, состоящая из фрагментированных гифов, характерных для представителей рода *Nocardia*. При посеве бурых и желто-бурых колоний на нитритный агар (см. 10.2.1) часть их образуют микроорганизмы рода *Nocardia*, микобактерии и *Arthrobacter*. Определенная доля бурых колоний на гумате принадлежит представителям *Micromonospora*.

В более поздние сроки инкубации (через 5—6 мес. и позже) появляются бактерии рода *Bactoderma* (*B. alba* и *B. rosea*). Для выявления бактерий этого рода к нитритному агару следует добавить дрожжевой автолизат.

Описанным способом можно изучить микроорганизмы, участвующие в разложении не только гумата натрия, но и фульвокислот. В этом случае к основной минеральной среде, указанной выше, следует добавить 10—50 мг фульвокислот.

Метод Виноградского в модификации Теппер дает возможность изучить **сукцессию микроорганизмов**, участвующих в разложении гумусовых кислот. С этой целью при постановке опыта чашки с гумусовыми кислотами (фульвокислотами или гуминовыми кислотами), инфицированные почвенной суспензией (10^{-2}), помещают во влажную камеру и в термостат при 25—28 °С. В разные сроки инкубации (через 2, 4, 6, 8 и 12 мес.) вынимают две параллельные чашки и изучают в них микрофлору.

Поскольку в гумусовых кислотах соотношение $C : N < 25 : 1$, то при их разложении выделяется аммиак. Однако аммиак не накапливается, а по мере образования окисляется нитрифицирующими бактериями. Поэтому в процессе окис-

ления гумусовых кислот (через 4, 6 и 8 мес. инкубации) наряду с микроорганизмами автохтонной группы (*Nocardia*, *Bacteroides*, *Mycobacterium*) на гелевых пластинах с гумусовыми кислотами обнаруживаются зоны с клетками *Nitrosomonas*.

Материалы и оборудование

Гелевые пластины, пропитанные минеральной средой Виноградского для микроорганизмов, разлагающих гумусовые вещества (в чашках Петри), почва, часовые стекла, стеклянные палочки с оттянутыми концами, гумат натрия, фульвокислоты, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

11.3. Микробные ценозы, участвующие в разложении различных органических и неорганических остатков в почве

11.3.1. Разложение микроорганизмами свежих органических остатков с образованием гумуса

Вводные пояснения. Основным источником гумуса в почве, кроме пожнивных остатков, служит навоз. Однако его не всегда бывает достаточно для обеспечения потребности растений в органических веществах. В связи с этим особый интерес представляет рисовая солома, непригодная для кормовых целей.

Выход гумуса при внесении такой соломы в почву зависит от ряда факторов: типа почвы, добавления минерального азота и степени аэрации почвы. При аэробном разложении соломы выход гумуса значительно выше, чем в анаэробных условиях.

Поскольку растительные остатки (в частности, солома) — сложные органические соединения, состоящие из различных химических компонентов, а питание у микроорганизмов специфично, то представляет интерес смена микробных ценозов, участвующих в разложении растительных остатков с образованием гумусовых веществ.

Наибольшего внимания заслуживает **разложение соломы в аэробных условиях**. В качестве объекта исследования можно использовать овсяную (рисовую) солому. Овсяная солома содержит примерно 65% углерода и 0,65% азота (С : N = 100 : 1).

Постановка опыта. Опыт закладывают в чашках Петри на гелевых пластинах, что обеспечивает хорошую аэрацию и в определенной степени имитирует поверхностное внесение соломы в почву.

Отмытые от следов хлора гелевые пластины (см. 7.2.1) пропитывают 3 мл основной минеральной среды Виноградского без источников углерода и азота. Поскольку соотношение С : N в соломе может быть неодинаковым, к минеральной среде добавляют раствор азота в виде KNO_3 из расчета 26 мг азота на чашку.

В качестве единственного источника углерода на поверхность пластины помещают 1 г абсолютно сухой измельченной (до 3—5 мм) соломы. Солому увлажняют до 60% полной влагоемкости (ПВ) и добавляют к ней 1 мл почвенной суспензии разведения 10^{-2} .

Затем не менее 30—40 чашек помещают во влажную камеру и в термостат при 25—28 °С. Количество чашек рассчитывают, исходя из планируемых сроков анализа результатов опыта.

Анализ. Периодически — через 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 210, 270 и 360 сут инкубации — вынимают по 2 параллельные чашки и подвергают их микробиологическому анализу. Сроки проведения анализов примерно приурочены ко времени разложения отдельных химических компонентов соломы (экстрактивных межклеточных веществ, целлюлозы, лигнизированной целлюлозы и лигнина). В последние сроки анализов (через 150, 210, 270 и 360 сут инкубации) в 2 параллельных чашках определяют содержание гумуса (фульвокислот и гуминовых кислот) в массе соломы и в геле. Извлекают гумусовые вещества 0,1 н. раствором NaOH и по методу Тюрина. В вытяжках определяют углерод гуминовой кислоты и фульвокислоты.

При микробиологических анализах разлагающуюся солому просматривают визуально и при увеличении микроскопа $\times 30$ и $\times 80$, а также описывают родовой состав грибов, получивших развитие в соответствующие сроки разложения соломы. Затем солому снимают с поверхности геля и помещают в колбу с 99 мл стерильной водопроводной воды, взбалтывают 10 мин, готовят разведения (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} и т. д.) и делают поверхностные посевы на различные среды.

Учитывают: сапротрофные бактерии — на МПА; бациллярные формы в состоянии спор после пастеризации суспензии — на МПА + сусло-агар; микроорганизмы, использующие минеральные формы азота, (в том числе актиномицеты) — на КАА; микроскопические грибы — на подкисленном сусло-агаре.

При развитии эпифитного гриба *Fumago* число хламидоспор определяют методом прямого счета. Для этого берут небольшую навеску соломы, готовят препарат в раздавленной капле и просматривают с иммерсионным объективом. Число хламидоспор во взятой навеске пересчитывают на общую массу соломы в чашке.

Микроорганизмы автохтонной группы (*Nocardia*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter* и *Micromonospora*) учитывают на нитритном агаре (см. 8.2.2 и 10.2.1).

Аналогичный опыт можно поставить и с рисовой соломой.

Результаты опыта с овсяной соломой, инфицированной суспензией дерново-подзолистой почвы, обычно свидетельствуют о том, что оптимальная численность грибов, выявляемых на сусло-агаре, отмечается на 15-е сут инкубации в период разложения экстрактивных веществ и активного разложения целлюлозы (через 90 сут компостирования). Оптимальная численность сапротрофных бактерий, выявляемых на МПА, отмечается через 30—60 сут инкубации, а через 120 сут и до конца опыта их численность резко падает. Микроорганизмы, использующие минеральные формы азота, в том числе актиномицеты, выявляемые на КАА, наиболее активно развиваются на 30—90-е сут разложения соломы. Оптимальное развитие целлюлозоразрушающих бактерий на среде Гетчинсона можно наблюдать через 30 и 90 сут инкубации. Через 120 сут разложения и до конца опыта их численность также резко падает. Численность микроорганизмов автохтонной группы, минерализующих лигнин и гумусовые вещества, резко возрастает со 150-х сут и до конца опыта.

Материалы и оборудование

Гелевые пластины, пропитанные минеральной средой Виноградского (в чашках Петри), овсяная солома, почва, стерильные колбы с 99 мл водопроводной воды, стерильные пипетки Мора на 1 мл, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

11.3.2. Изучение микробных ценозов, участвующих в разложении гербицидов — производных сим-триазинов в почве

Вводные пояснения. Гербициды триазины (атразин и симазин) широко применяют при выращивании кукурузы, сорго, проса, плодов и овощей. Остатки их могут довольно долго (до 18 мес.) сохраняться в почве и причинять существенный вред последующим культурам. В связи с этим необходимо иметь представление микроорганизмы, участвующие в деструкции триазинов в почве, тем более что есть данные об их причастности к трансформации гумуса.

Постановка опыта. Для выявления наиболее конкурентоспособных микроорганизмов, ассимилирующих триазины, можно поставить лабораторный опыт на гелевых пластинах (см. 7.2.1).

Отмытые от следов хлора и прокипяченные гелевые пластины пропитывают 3 мл минеральной среды Виноградского с добавлением 5 г CaCO_3 на 200 мл дистиллированной воды. В каждую чашку вносят 1 мл раствора симазина или атразина из расчета 2, 5, 10 мг д. в. (действующего вещества) и 1 мл почвенной суспензии в разведении 10^{-2} . Растворы тщательно перемешивают, подсушивают при 40—45 °С до образования глянцевой (или эмалевой) поверхности. Для инкубации чашки помещают крышками вниз во влажную камеру и выдерживают в термостате при 25—28 °С.

Анализ. Опыт снимается после 6 мес. инкубации. Перед определением остаточного количества симазина или атразина чашки просматривают под микроскопом при увеличениях (окуляр 10×, объектив 3×; окуляр 10×, объектив 8×) и описывают культуральные признаки колоний.

После микроскопирования препаратов из колоний суспензию последних высевают поверхностно на нитритном агаре. При инфицировании среды в чашках с триазинами суспензией дерново-подзолистой почвы развиваются бактерии, участвующие в процессе минерализации гумусовых кислот (*Nocardia*, *Arthrobacter* и представители *Micromonospora*), в некоторых случаях — и бактерии рода *Bactoderma*.

11.3.3. Микробные пейзажи при нитрификации, разложении гумусовых кислот и деструкции симазина и атразина (метод Теппер)

В опытах на гелевых пластинах развивается аэробная микрофлора, которой, как известно, присуща гидрофобность. Поэтому, если в чашку, в которой прошел тот или иной процесс, добавить осторожно с одного края 6—8 мл дистиллированной воды, бактерии с поверхности гелевых пластин поднимутся к поверхности воды (см. 8.2.1). Прикоснувшись к ней чистым обезжиренным предметным стеклом, получают отпечаток (*пенлику*) микроорганизмов, развившихся на гелевых пластинах. Исключение составляет мицелий актиномицетов и микромонопор, вросший в гель. После фиксации и окраски препараты просматривают с использованием иммерсионной системы. На них, как правило, хорошо видны микробные пейзажи.

В опытах по изучению 1-й фазы нитрификации при инфицировании среды дерново-подзолистой почвой через 21—25 сут обнаруживаются бактерии рода *Nitrosomonas*, а при инфицировании среды суспензией торфяно-болотной почвы низинного типа — иногда и *Nitrosococcus* (рис. 29, а).

В опытах по разложению микроорганизмами гумусовых кислот (4—5 мес. инкубации и более) можно обнаружить: представителей автохтонной группы — септированные гифы, палочковидные и кокковидные фрагменты *Nocardia* (рис. 29, б); неспоронные палочки; расположенные в один слой и соединенные в пленку бактерии рода *Bactoderma* (рис. 29, в); иногда в более поздние периоды в виде спутников — бактерии рода *Nitrosomonas*.

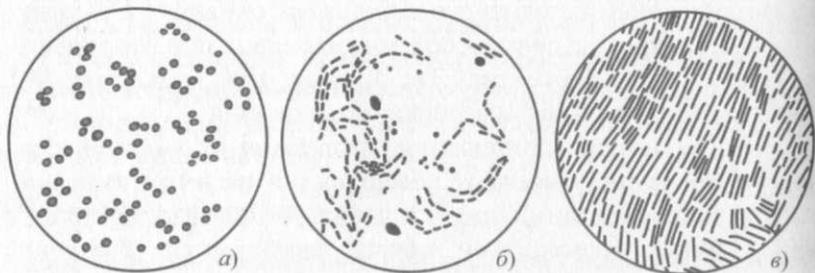


Рис. 29. Микробные пейзажи в репликах из опытов на гелевых пластинах: а — *Nitrosomonas*; б — фрагментированные гифы *Nocardia*; в — бактерии рода *Bactoderma*

В опытах по разложению триазинов (симазина и атразина) кроме фрагментированных гифов *Nocardia* встречаются бактерии рода *Bactoderma*, скопления палочек и кокков представителей рода *Arthrobacter*, иногда (при более высоких дозах гербицида) развивается мицелий с одиночными спорами видов рода *Micromonospora*.

Материалы и оборудование

Гелевые пластины, пропитанные минеральной средой Виноградского (в чашках Петри), симазин или атразин, почва, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

11.4. Микроорганизмы, обитающие в ризосфере и ризоплане растений

11.4.1. Общие сведения

Чем ближе к корневой системе расположена почва, тем больше бактерий в ней содержится. Особенно много микроорганизмов на поверхности корня — в *ризоплане* (от греч. *rhiza* — корень, *plane* — ровно). Здесь обитают преимущественно *эпифиты* (от греч. *epi* — над, на; *phyton* — растение). В слое почвы (2—3 мм), прилегающем к корням, получившем название *ризосферы*, в качестве дополнительного источника питания бактерии используют продукты распада отмерших тканей корня. Питательными веществами для бактерий, обитающих на корнях, служат продукты экзосмоса растений (корневые выделения).

В ризосфере могут развиваться те же формы бактерий, что и в почве, отдаленной от корней, но на корнях обычно преобладают неспоронные палочки рода *Pseudomonas*, причем на корнях злаков, бобовых и других растений поселяются неодинаковые их виды и разновидности. Это объясняется различием в обмене веществ у отдельных видов растений.

В прикорневой зоне растений бактерии в известной мере играют роль санитаров, очищая ее от продуктов метаболизма растений. Минерализуя органические остатки, они в то же время переводят ряд элементов питания в доступную для растений форму. Отдельные виды бактерий, развивающиеся на корнях, продуцируя ростовые вещества и витамины, оказывают положительное влияние на рост растений. Однако многие

бактерии корневой зоны обладают денитрифицирующей способностью и в условиях недостаточной аэрации могут обусловить значительные потери азота из почвы.

11.4.2. Учет бактерий в ризосфере методом Красильникова

Стерильной лопатой подкапывают почву под растением, стерильным пинцетом извлекают корни. Приставшую к корням почву стряхивают в стерильную чашку Петри, перемешивают и из нее берут навеску в 1 г (одновременно берут навеску для определения влажности почвы). Навеску помещают в 100 мл стерильной водопроводной воды и готовят ряд разведений.

При поверхностном посеве из полученных разведений стерильной микропипеткой наносят на поверхность питательных пластин (МПА, КАА и др.) по 0,05 мл и шпателем досуха втирают в агар. При глубинном посеве из разведений стерильной пипеткой берут 1 мл суспензии и вносят в стерильную чашку Петри, а затем добавляют соответствующую агаризованную питательную среду.

Выросшие на агаре колонии подсчитывают визуально и под лупой (см. 5.1.1).

Для определения качественного состава бактерий колонии на чашке группируют по культуральным признакам. Из каждой группы готовят препарат и выявляют форму бактерий. Видовую принадлежность устанавливают, делая пересев из колонии на скошенный агар, и после очистки культуры изучают ее морфологические и физиологические признаки.

11.4.3. Учет ризосферной и корневой микрофлоры методом последовательных отмываний корней (по Теппер)

Из выкопанных монолитов почвы с растениями стерильными пинцетом и ножницами отбирают 1 г молодых корней примерно одного диаметра с приставшими к ним частицами почвы. Одновременно берут навеску для определения влажности почвы.

Корни помещают в 1-ю колбу со 100 мл стерильной водопроводной воды и взбалтывают 2 мин. Стерильным крючком, сделанным из обычной бактериологической иглы, корни извлекают и переносят последовательно во 2-ю, 3-ю и т. д. до

7-й колбы, также содержащие по 100 мл стерильной водопроводной воды. В каждой колбе корни отмывают по 2 мин. Желательно в последнюю 7-ю колбу перед стерилизацией добавить в воду 3—5 г песка.

Из каждой колбы отдельно стерильной пипеткой берут 0,05 мл отмывной воды, наносят на поверхность питательной пластины (МПА) и отдельным шпателем Дригальского, держа полуоткрытую чашку около пламени горелки, втирают в среду досуха. Чашки помещают в термостат при 28—30 °С. Спустя 3—5 сут чашки можно анализировать.

По мере отмывания корней численность бактерий не убывает, а в ряде случаев — даже увеличивается. Это свидетельствует о тесной связи эпифитных микроорганизмов с тканями растений, для которых они служат естественным защитным барьером. В чашках с посевом из первых отмываний много крупных колоний спорозоных форм бактерий — это могут быть и почвенные обитатели. По мере отмывания количество колоний бациллярных форм уменьшается и возрастает число мелкоточечных колоний неспорообразующих форм рода *Pseudomonas*.

Для определения количества микроорганизмов в ризосфере и на корнях суспензию из 1-й колбы (1-го отмывания) дополнительно взбалтывают 5 мин. Затем из нее готовят разведения, из которых делают поверхностные посевы. Содержимое остальных 6 колб сливают вместе и, также приготовив последовательные разведения, проводят из них поверхностные посевы на МПА.

Для подсчета клеток в 1 г абсолютно сухой почвы ризосферы число колоний на чашке умножают на 20 (чтобы определить их число в 1 мл) и на степень разведения, а затем делят на массу абсолютно сухой почвы ризосферы. Количество ризосферной почвы, попавшей с корнями в 1-ю колбу, находят по разности первоначальной навески и навески отмытых корней (для чего из последней порции отмывной воды корни извлекают, помещают на фильтровальную бумагу для удаления воды и взвешивают).

При определении количества микроорганизмов на 1 г корней число колоний, выросших в чашке, умножают на 20, на степень разведения и на 600 (6 смывов по 100 мл в каждом) и делят на величину массы сырых корней.

В зависимости от задач, поставленных исследователем, можно использовать различный набор сред для культивирования микроорганизмов, развивающихся в корневой зоне растений.

Материалы и оборудование (к 11.4.1—11.4.3)

Монолит (10×10 см) почвы или вегетационный сосуд с растениями, пинцеты, ножницы, часовые стекла, колбы на 250 мл, содержащие 100 мл стерильной водопроводной воды, 3—5 г стерильного песка (для последних разведений), крючки из проволоки, стерильные градуированные и моровские пипетки на 1 мл, стерильные шпатели, лупы, микроскопы и все необходимое для приготовления окрашенных препаратов и микроскопирования.

Глава 12 Биологическая активность почвы

12.1. Общая биологическая активность почвы

12.1.1. Определение общей биологической активности почвы по методу Мишустина, Вострова и Петровой (по интенсивности разложения полотна)

Чем выше в почве содержание подвижного азота и других элементов питания, тем активнее идет окисление целлюлозы. Целлюлозоразрушающие микроорганизмы, разлагая клетчатку, синтезируют и частично выделяют в среду аминокислоты. При обработке остатков полуразрушенного льняного полотна 0,5%-ным раствором нингидрина в тех местах, где активно развивалась микрофлора и разлагалась целлюлоза, образуются сиреневые пятна — продукты реакции аминокислот с нингидрином.

Льняным полотном обшивают хорошо отмытые стекла (10×50 см), стерильной лопатой и стерильным ножом делают вертикальный разрез почвы на глубину 35 см. К ровной стенке разреза по профилю прикладывают стекло с полотном, отступая от поверхности почвы на 2—3 см. Затем стекло засыпают почвой, плотно прижимая к стенке. На поверхности почвы

ставят этикетку. В лабораторных условиях используют стекла (5×25 см) и обычный стеклянный вагнеровский вегетационный сосуд с почвой.

Через 20—30 дней стекло откапывают, подсушивают полотно, осторожно стряхивают с него почвенные частицы и обрабатывают 0,5%-ным раствором нингидрина в ацетоне.

Для определения степени разложения полотна в процентах, если анализ выполняют *по горизонтам*, вырезают кусок определенной площади каждого горизонта, промывают водой, высушивают и взвешивают. Кусок такой же площади вырезают из контрольного полотна и тоже взвешивают. Сравнивая массу первого и второго кусков, определяют степень разложения полотна. Если *опыт модельный*, вынимается все полотно, промывается, сушится и взвешивается.

12.1.2. Метод определения общей микробиологической активности почвы по выделению диоксида углерода

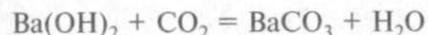
Метод основан на том, что в почве, лишенной корней, источником CO_2 являются микроорганизмы, выделяющие его при дыхании. Количество газа определяют, улавливая его $\text{Ba}(\text{OH})_2$ или в **аппарате Варбурга**.

В первом случае 150—200 г почвы, просеянной через сито с ячейками 2 мм, помещают в стерильную склянку Тищенко на 500—600 мл с двумя отводными трубками. Влажность почвы стерильной водой доводят до 60% ПВ. Воздух предварительно очищают от CO_2 , пропуская через две последовательно соединенные склянки Тищенко, содержащие 30%-ный раствор NaOH и стерильную водопроводную воду, предназначенную для увлажнения почвы (воздух пропускают через почву по нижнему отверстию склянки).

Прошедший сквозь почву воздух выходит через выходную трубу в две последовательно соединенные склянки Дрекслея на 250—300 мл, содержащие по 100 мл 0,1 н. раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$ с фенолфталеином. Выходная трубка склянки Тищенко с почвой соединена резиновой трубкой с тубусом склянки Дрекслея. Через установку во время опыта воздух продувают со скоростью 1—2 л/ч при помощи аспиратора или водоструйного насоса. Продолжительность продувания 10—12 дней.

По окончании опыта или по мере нейтрализации $\text{Ba}(\text{OH})_2$ диоксидом углерода титрованием 0,1 н. щавелевой

кислотой определяют не использованный в реакции $\text{Ba}(\text{OH})_2$. По его расходу устанавливают количество выделившегося CO_2 по уравнению



Для каждого почвенного образца параллельно определяют содержание диоксида углерода в двух пробах.

Количество выделяемого диоксида углерода за определенный промежуток времени пересчитывают на 1 г абсолютно сухой почвы, или на 1 г гумуса.

Материалы и оборудование

Стекла (5×25 см), хорошо отмытые и обшитые льняным полотном, стеклянный вагнеровский вегетационный сосуд с почвой, 0,5%-ный раствор нингидрина в ацетоне, склянки Тищенко на 500—600 мл, 30%-ный раствор NaOH , стерильная водопроводная вода, склянки Дрекслея на 250—300 мл, 0,1 н. $\text{Ba}(\text{OH})_2$, фенолфталеин, водоструйный насос, 0,1 н. щавелевая кислота.

12.2. Аммонифицирующая активность почвы и микроорганизмов

12.2.1. Определение аммонифицирующей активности почвы

100 г свежей почвы, просеянной через стерильное сито с ячейками 2 мм, помещают в стерильные колбы Эрленмейера на 250 мл. К почве добавляют субстрат для аммонификации (1% кровяной муки, содержащей 11,5% азота, или 1% пептона, или 1—2% гороховой муки). Влажность почвы доводят до 50—60% ПВ. Колбы закрывают ватными пробками и ставят в термостат при 28—30 °С.

Через 7 сут компостирования почву опытных вариантов и контрольную подвергают анализу. Для этого из тщательно перемешанной почвы берут навеску в 3—5 г, помещают ее в колбу Эрленмейера на 250 мл, добавляют 100 мл 1 н. раствора KCl или NaCl и фильтруют через бумажный фильтр. Промывку почвы 1 н. раствором KCl продолжают до полного исчезновения аммиака (проба с реактивом Несслера). Почвенную вытяжку в 1 н. растворе KCl доводят до определенного объема, затем из нее берут 50 мл. Аммиак отгоняют, используя отгонный аппарат для определения азота по микрометоду

Кьельдаля. Конденсированная вода с аммиаком из холодильника поступает в колбу с титрованным 0,1 н. раствором H_2SO_4 , содержащим индикатор. Остаток кислоты титруют 0,1 н. щелочью в присутствии метилового красного. 1 мл 0,1 н. серной кислоты, нейтрализованной аммиаком, соответствует 1,7 мг аммиака, или 1,4 мг азота.

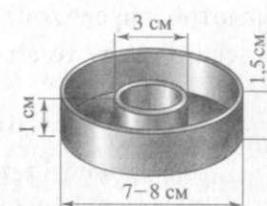


Рис. 30. Чашка Конвея

Хорошие результаты дает определение аммиака в **чашках Конвея** (рис. 30), которые состоят из двух цилиндров, вставленных один в другой, имеющих общее дно. Чашки плотно закрывают пришлифованной к верхнему краю внешнего цилиндра стеклянной крышкой, которую для лучшей герметичности смазывают смесью воска и вазелина.

Во внутреннюю часть чашки вносят 1 мл титрованного раствора 0,1 н. H_2SO_4 и добавляют 1—2 капли метилового красного. Держа чашку наклонно, во внешнюю ее часть наливают 1—2 мл исследуемого раствора. Затем чашку ставят горизонтально и, держа левой рукой наготове крышку, вносят в противоположный конец внешней части 1 мл насыщенного раствора K_2CO_3 (можно заменить 10%-ным раствором KOH). Потом быстро закрывают чашку крышкой и вращательным движением перемешивают содержимое внешней части чашки.

Контролем служит *слепая проба*, где исследуемый раствор заменен дистиллированной водой. Затем чашки (в нескольких повторностях) оставляют на сутки при комнатной температуре или на несколько часов ставят в термостат при 35—37 °С. После этого крышку снимают и титруют 0,02 н. или более слабым раствором щелочи до изменения окраски индикатора.

12.2.2. Определение аммонифицирующей активности микроорганизмов

Для определения аммонифицирующей способности микроорганизмов **по Федорову** необходимо приготовить минеральную питательную среду следующего состава (г/л дистиллированной воды): K_2HPO_4 — 2; KH_2PO_4 — 2; MgSO_4 — 0,3. К этой среде добавляют пептон и глюкозу в таких количествах, чтобы соотношение С : N было 5 : 1; 10 : 1; 15 : 1; 20 : 1 и 30 : 1.

В качестве источника азота можно использовать гороховую и люпиновую муку, гуматы и др.

На 100 мл субстрата берут 1 г пептона, содержащего 0,15 г азота и 0,5 г углерода. Для получения соотношения C : N = 5 : 1 к 100 мл среды добавляют 0,625 г глюкозы; соотношения C : N = 10 : 1 — 1,25 г глюкозы и т. д.

Питательную среду разливают по 100 мл в колбы Эрленмейера на 300 мл и стерилизуют. Затем среду инфицируют исследуемыми микроорганизмами и помещают на 7 сут в термостат при 28—30 °С. Опыт ставят минимум в двух повторностях.

После инкубации накопившийся аммиак определяют **диффузионным методом** в чашке Конвея. Параллельно устанавливают общее количество выросших клеток методом прямого счета под микроскопом или методом питательных пластин на МПА.

Материалы и оборудование

Стерильные колбы Эрленмейера на 250 мл, стерильное сито с ячейками 2 мм, почва, субстрат для аммонификации, 1 н. раствор KCl, бумажный фильтр, отгонный аппарат для определения азота методом Кьельдаля, чашки Конвея, минеральная питательная среда Федорова с пептоном и глюкозой, МПА, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

12.3. Нитрифицирующая и денитрифицирующая активность почвы

12.3.1. Определение нитрифицирующей активности почвы

Из почвенного образца, просеянного через сито с отверстиями 2 мм, отбирают навеску в 100 г и помещают в стерильную колбу Эрленмейера на 250 мл. Почву смачивают до 60% ПВ, добавляют к ней 0,1 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и 0,2 г CaCO_3 , перемешивают, закрывают ватной пробкой, взвешивают и помещают в термостат при 27—28 °С на 30 сут. Контролем служит почва без сульфата аммония.

Влажность почвы должна быть постоянной. Для этого каждые 7 сут колбы взвешивают и стерильной дистиллированной водой доводят влажность до первоначального уровня (см. 8.2.1).

По окончании опыта определяют нитраты в опытных и контрольных почвах (см. 8.2.1).

12.3.2. Определение денитрифицирующей активности почвы

При определении денитрифицирующей активности почвы возникают большие затруднения, так как способность восстанавливать нитраты — не единственная функция денитрифицирующих бактерий в почве. Эти бактерии могут развиваться и в присутствии молекулярного кислорода, окисляя белки, жиры и другие соединения.

Согласно **методу Федорова**, навеску свежей почвы в 50 г помещают в стерильную колбу на 250 мл, увлажняют ее стерильной водой до 60% ПВ и добавляют 0,1—0,2 г нитрата. После 14-дневного компостирования одновременно устанавливают количество нитрата, нитрита и аммиака. Сравнивая эти показатели у разных почв, можно выявить их потенциальную денитрифицирующую активность.

Недостаточная точность метода обусловлена прежде всего длительностью инкубации (14 сут). За такой срок в почве может произойти смена многих процессов, направленность и интенсивность которых зависит от природы образца.

В каждом конкретном случае соотношение анализируемых азотсодержащих соединений может быть результатом не только активности денитрификаторов, но и неучтенной активности микроорганизмов других физиологических групп, принимающих участие в трансформации азота.

12.3.3. Определение денитрифицирующей активности и смены процессов в замкнутой системе почва — атмосфера путем применения ацетилена по методу Федоровой

При денитрификации редукция нитрата идет до газообразных продуктов:



В опытах с растущими культурами денитрифицирующих микроорганизмов и в условиях их активности в почвах оказалось, что небольшие концентрации ацетилена (C_2H_2) ингибируют редукцию закиси азота (N_2O) денитрификаторами без заметного угнетения восстановления других продуктов диссимляции NO_3^- .

Денитрификация, как доминирующий процесс, закономерно сменяется азотфиксацией. Это обусловлено изменением соотношения легкодоступного связанного азота и углерода и уровня окислительно-восстановительного потенциала, который в значительной степени определяется присутствием нитрата в среде. Активность нитрогеназы подавляется нитратами, и азотфиксаторы, обладая нитрат- и нитритредуктазой, предпочитают использовать нитраты и нитриты, чем N_2O и N_2 .

В замкнутом объеме в этот период происходит накопление N_2O за счет активности денитрификаторов и выделение CO_2 в результате интегральной жизнедеятельности как денитрификаторов, так и азотфиксаторов.

Фиксация N_2 бактериями при наличии достаточного количества источника углерода начинается практически после полной утилизации нитратов и нитритов. Этот момент может быть зафиксирован по появлению в газовой фазе этилена. Использование в качестве источника углерода глюкозы позволяет дополнительно контролировать нитрогеназную активность по выделению H_2 и некоторой убыли N_2 .

Принцип метода определения денитрифицирующей активности почвы состоит в том, что введение ацетилена¹ в исходную атмосферу дает возможность фиксировать количество выделившейся закиси азота в процессе диссимиляции NO_3^- и NO_2^- (т. е. денитрификации). Накопление N_2O прекращается с исчезновением нитратов и нитритов из субстрата, что совпадает с появлением этилена, свидетельствующего об азотфиксирующей активности бактерий. Анализ газовой фазы на указанные компоненты в динамике позволяет определить максимальное количество N_2O , образовавшееся в опыте, и рассчитать по нему количество восстановленных до закиси азота нитратов и нитритов. Все необходимые газовые составляющие могут быть идентифицированы на одном детекторе.

Определение проводят в стеклянных сосудах, имеющих боковой отросток, перекрывающийся притертым стеклянным затвором, и отверстие сверху, которое после внесения в сосуд почвы, глюкозы (13,3 мг на 1 г почвы) и нитрата (0,5 мг KNO_3

¹ Ацетилен взрывоопасен, поэтому при работе с ним надо соблюдать правила техники безопасности: хранить газ в металлических баллонах или получать из карбида кальция перед опытом.

на 1 г почвы) в виде растворов закрывается пробкой из силиконовой резины. Такая пробка позволяет производить многократный отбор проб газа без потери герметичности. При открытом затворе через боковой отросток с помощью вакуумного насоса, соединенного с манометром, эвакуируют атмосферный воздух и проводят 2—3-кратную промывку содержимого сосуда инертным газом, который вводят с помощью шприца, а затем откачивают через боковой отросток. Для этой цели применяют аргон или гелий, которые соответственно используют в качестве основы экспериментальной газовой смеси.

Затем половину сосудов заполняют газовой смесью с 1,5% C_2H_2 , а другую — с 10% C_2H_2 . Большая концентрация C_2H_2 сильнее тормозит утилизацию N_2O бактериями, что дает возможность надежно фиксировать максимум образовавшегося в процессе денитрификации N_2O и позволяет подстраховать исследователя в том случае, если в вариантах с меньшим содержанием ацетилена его уловить не удастся.

Газовые смеси готовят в газометрах (за 24 ч до опыта). Количество образовавшегося N_2O рассчитывают по калибровочным кривым. Определение всех газовых компонентов (CO_2 , N_2O , N_2 , H_2 , C_2H_2 , C_2H_4 , CH_4) расширяет возможности метода, позволяет наблюдать смену процессов, обусловленную активностью отдельных физиологических групп микроорганизмов (включая метанообразующие), и изучать воздействие на них отдельных факторов.

Ацетиленовый метод Федоровой позволяет вычлнить денитрификацию из всех происходящих в почве метаболических процессов и количественно оценить его методом газовой хроматографии.

12.4. Азотфиксирующая активность микроорганизмов

12.4.1. Определение азотфиксирующей активности ацетиленовым методом

Нитрогеназа азотфиксирующих микроорганизмов способна восстанавливать ацетилен (C_2H_2) до этилена (C_2H_4). Оба предельных углеводорода легко идентифицируют при помощи

газового хроматографа. Поскольку процессы восстановления молекулярного азота и восстановления ацетилена аналогичны, второй широко применяют для моделирования и изучения азотфиксации. Если в газовой среде присутствуют одновременно N_2 и C_2H_2 , то в первую очередь произойдет восстановление ацетилена вследствие большего сродства электронов к атому углерода.

Ацетиленовый метод определения азотфиксирующей активности бактерий разработан Харди с соавт. Чувствительность метода позволяет обнаружить до 10^{-12} М этилена и превосходит чувствительность масс-спектрометрического определения ^{15}N в 10^3 раз, а метода определения азота по Кьельдалю — в 10^6 раз. Поскольку азотфиксацию осуществляют аэробные и анаэробные свободноживущие и симбиотические бактерии, схема экспериментов должна быть различной.

Используют несколько вариантов этого метода:

1) отбор проб почвы (воды, других анализируемых субстратов или чистой культуры микроорганизма) с последующей инкубацией в атмосфере ацетилена;

2) способ почвенных монолитов, при котором часть почвы (с растением или без него) инкубируют с ацетиленом в газонепроницаемом контейнере;

3) полевой диффузионный метод «колпаков», заключающийся в том, что поверхность почвы накрывают газонепроницаемым колпаком, под который вводят ацетилен;

4) выдерживание монолита почвы с растением в продуваемой через почву ацетилен-воздушной смеси.

Во всех случаях ацетилен вводят в воздушное пространство в количестве 10% от объема сосуда, или «колпака», или с заведомым избытком.

Применение ацетиленового метода в полевых условиях сопряжено с некоторыми сложностями: введение в почву ацетилена может сопровождаться его адсорбцией или, напротив, затрудненной диффузией. Образующийся этилен также способен адсорбироваться почвой, а при отсутствии ацетилена, напротив, выделяться ею. В герметичной камере, особенно при длительной экспозиции, возникает **парниковый эффект** — увеличение концентрации CO_2 в составе газовой смеси. Следствием его является активизация фотосинтеза, в

результате чего усиливается отток корневых выделений, способствующий повышению активности микроорганизмов; кроме того, может учитываться не только азотфиксация в почве и ризосфере, но и в филлосфере растений.

В соответствии с методом Харди с соавт. питательную среду с культурой помещают в шприцы фирмы *Chirana* на 10 мл. Атмосферный воздух удаляют вакуумным насосом, соединенным со шприцем и манометром, а содержимое шприца (инокулят) трижды промывают аргоном (Ar). Затем шприцы заполняют газовой смесью Ar + 2% C_2H_2 (для анаэробов). Для аэробных микроорганизмов в нее вводят 2—10% O_2 . После заполнения шприца газовой смесью иглу снимают и отверстие закрывают силиконовой пробкой, через которую впоследствии берут газовые пробы инсулиновым шприцем для анализа на газовом хроматографе.

Продолжительность опыта определяется его целями и активностью культуры: *острый* опыт идет до 3 сут.

В конце опыта реакцию восстановления C_2H_2 прекращают, добавляя к культуральной среде 0,2 мл 40%-ного NaOH. Газовую смесь готовят в газометрах заранее (за 24 ч до опыта), чтобы обеспечить наиболее полную диффузию газовых составляющих.

Ацетилен и этилен определяют на газовом хроматографе с пламенным ионизационным детектором по времени выхода каждого газа, сравнивая его со временем выхода известного стандартного газа. Колонку (1,5 м длиной и 4 мм диаметром) заполняют сорбентом (силикагелем АСК). В качестве газоносителя используют водород, устанавливая его расход равным 36 мл/мин (хроматограф «Becher Delft»). Температура колонки — 50 °С, объем вводимой газовой пробы — 0,5 мл. Количество C_2H_2 и C_2H_4 рассчитывают по калибровочной кривой. В длительных экспериментах для определения азотфиксирующей активности почвы пользуются флаконами из-под пенициллина или стеклянными сосудами на 16 см³ с силиконовой пробкой и боковым отростком, перекрывающимся притертым стеклянным затвором. В последнем случае через боковой отросток легко удалять необходимый инертный газ и наполнять им сосуд.

12.4.2. Определение актуальной (полевой) и потенциальной активности азотфиксации в почве методом Умарова

Для определения **актуальной активности** азотфиксации в почве используют специальный прибор (рис. 31). Он представляет собой металлический цилиндр (*a*, 5) со съемным колпаком из полиэтиленовой пленки (*a*, 1) с резиновой пробкой (*a*, 2). Цилиндр помещают в почву до кольцевой канавки (4). Для предотвращения утечки газов почву вокруг цилиндра в радиусе 10 см увлажняют. Внутри цилиндра ставят бюкс с 25–30 г CaC₂. На металлический обруч (*a*, 3; *b*, 3) натягивают колпак, в кольцевую канавку (водяной затвор) наливают воду, увлажняют водой карбид кальция и быстро накрывают цилиндр колпаком, при этом обруч должен погрузиться в воду канавки. Через пробку в колпаке вводят шприцем 2–5 мл пропана (стандарт) и отмечают время начала инкубации. Количество пропана определяется объемом колпака. Длительность инкубации — от 1–2 до 12–24 ч. По окончании опыта шприцем через резиновую пробку берут 3 газовые пробы по 15 мл и вводят в вакуумированный пенициллиновый флакон. Пробы можно

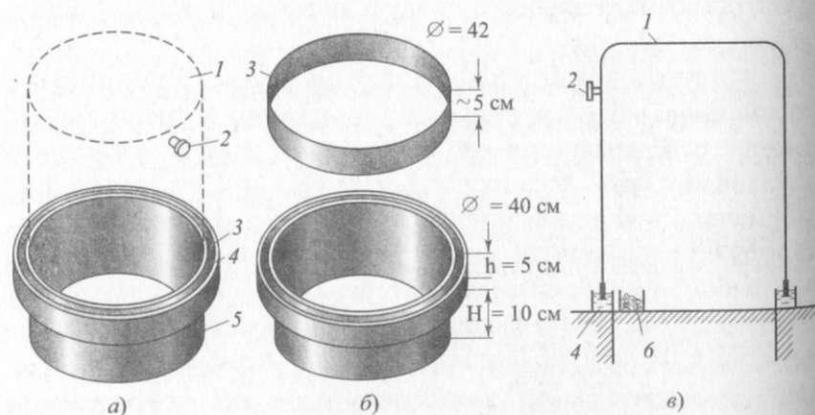
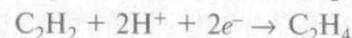


Рис. 31. Прибор для полевого определения активности азотфиксации в почве:

a — в собранном виде; *b* — отдельные детали прибора; *v* — вертикальная проекция: 1 — полиэтиленовый колпак; 2 — резиновая пробка; 3 — металлический обруч для натягивания полиэтиленового мешка; 4 — кольцевая канавка, заполненная водой (водяной затвор); 5 — металлический цилиндр для определения актуальной активности азотфиксации; 6 — бюкс с карбидом кальция

хранить при комнатной температуре в темноте. Поскольку этилен могут выделять не только почвенные грибы, но и корни растений, делают контрольное определение неспецифического этиленогенеза: почву, как и в опыте, инкубируют под колпаком, но без карбида кальция, т. е. без ацетилена.

Активность азотфиксации вычисляют по уравнениям:



Коэффициент перевода этилена в аммиак равен 3. Следовательно, величину, полученную для этилена, необходимо разделить на 3. Теоретически рассчитанный коэффициент в разных конкретных условиях может варьировать от 2,4 до 25. Это связано с тем, что на восстановление ацетилена используются все поступающие электроны. Поэтому надо всякий раз определять истинное соотношение, между скоростью восстановления нитрогеназой ацетилена и азота для разных экологических условий.

Площадь почвы внутри цилиндра (*S*) вычисляют по формуле $S = \pi r^2$, а объем цилиндра — по концентрации пропана в газовой пробе.

Активность азотфиксации в почве выражают в мг фиксированного азота на 1 м², или на 1 га за сут.

При определении **потенциальной активности** 5 г почвы, просеянной через сито с диаметром ячеек в 1 мм, помещают в пенициллиновый флакон, вносят глюкозу (2% от массы абсолютно сухой почвы) и увлажняют до 60% ПВ. Почву тщательно перемешивают, флакон закрывают ватной пробкой и ставят в термостат при 28 °С.

Через 1 сут инкубации флаконы закрывают резиновыми пробками и вводят в них по 0,5 мл ацетилена. Еще через 1 ч инкубации в термостате берут газовую пробу (0,5 мл) для анализа на хроматографе. Контроль — флакон без ацетилена.

По окончании измерений резиновые пробки вновь заменяют на ватные, ставят флаконы в термостат на 1 сут и вновь повторяют всю процедуру. Измерение считается законченным, если в двух пробах количество этилена отличается не более чем на 5%. Потенциальную активность азотфиксации выражают в мг фиксированного азота на 1 кг почвы за 1 ч.

12.4.3. Определение нитрогеназной активности симбиотических азотфиксирующих бактерий

При определении нитрогеназной активности на интактных клубеньках в пенициллиновый флакон помещают отмытые и просушенные фильтровальной бумагой корни бобового растения с клубеньками. Шприцем вводят ацетилен (10% избыточного давления ацетилена) и после экспозиции в течение 1 ч в условиях теплицы или других помещений (в зависимости от целей эксперимента) реакцию останавливают введением 1–5 мл реактива Несслера, который связывает оставшийся ацетилен. Образцы можно хранить в холодильнике при 4 °С длительное время до анализа на хроматографе.

При определении нитрогеназной активности интактной бобово-ризобияльной системы осторожно извлекают растение с клубеньками из почвы или другого субстрата. Очищают клубеньки, стряхивая почву с корней, и помещают растение до корневой шейки в полиэтиленовый пакет. Пакет закрывают резиновой пробкой, предварительно разрезанной вдоль на две половины и имеющей отверстие для стебля растения. Растение размещают так, чтобы надземная часть была расположена над пробкой, а корневая система — в пакете. Щели между отверстием в пробке и стеблем заделывают замазкой.

Воздух из пакета откачивают. Через специальное отверстие в пробке шприцем вводят в пакет 50 см³ газовой смеси (15% ацетилена, 20% кислорода и 65% аргона). Газовую смесь готовят непосредственно перед опытом в газометре, представляющем собой сосуд, заполненный 30%-ным раствором NaCl, объем которого равен объему вводимых газов. Через 10–15 мин шприцем отбирают из газовой смеси образец в 5 мл и переносят его в закрытый шприц-сборник для анализа методом газовой хроматографии.

В полевых условиях при определении азотфиксирующей активности бобово-ризобияльной системы методом «колпаков» цилиндр не следует углублять в почву более чем на 10 см, так как основная масса клубеньков локализована в верхнем слое. Колпаки проверяют на герметичность водой. Для обеспечения концентрации ацетилена, равной 5–10%, на колпак высотой 60–70 см рекомендуется вносить 35–40 г карбида кальция и 20 мл пропана.

12.4.4. Работа на газовом хроматографе

Количество образовавшегося в ходе определения азотфиксирующей активности почвы этилена определяют при помощи пламенно-ионизационного детектора на газовых хроматографах любой марки.

Для разделения газов используют сорбенты АСМ, ТЗК-М и др. Газами-носителями служат инертные газы аргон, гелий или азот. Количество восстановленного этилена определяют по стандартным пикам, для чего готовят стандартный раствор этилена.

Пример расчета. В случае, если разведение стандартного раствора 1 : 1000, 1 мл 100%-ного этилена разводят в герметичной емкости на 1 л. Исходя из закона Авогадро, 1 моль газа этилена занимает объем 22,4 л. Рассчитаем, сколько молей занимает интересующий нас объем (0,001 л):

$$\begin{array}{l} 1 \text{ моль этилена занимает объем } 22,4 \text{ л} \\ x \text{ этилена } \gg \gg 0,001 \text{ л} \end{array}$$

$$x = \frac{1 \cdot 0,001}{22,4} = 44,6 \cdot 10^{-9} \text{ (моль)} = 44,6 \text{ (нмоль)}.$$

Вводя в хроматограф данное количество стандартного этилена (1 мл с известной размерностью (44,6 · 10⁻⁹ моль), получаем величину стандартной пробы в сантиметрах, относительно которой рассчитывают опытные пробы.

Пробы из опытных образцов вводят в хроматограф и получают величины пиков в миллиметрах на разных шкалах чувствительности хроматографа, которые впоследствии приводят к размерности стандартной пробы и к единому объему вводимой пробы.

Для сравнительной оценки активности бобово-ризобияльной системы ацетиленовым методом данные вычисляют с помощью следующей формулы (в нмолях восстановленного этилена за 1 ч в расчете на одно растение):

$$A = \frac{P_2 \cdot K_2 \cdot V_1 \cdot V_3}{P_1 \cdot K_1 \cdot V_2 \cdot t \cdot n} \cdot 44,6, \quad (1)$$

где A — количество этилена (C₂H₂) в нмолях на реакционный флакон (аптечный флакон на 30 мл) в единицу времени; P_2 — пик диаграммы пробы из реакционного флакона в см (при наличии примеси этилена в исходном ацетилене пик фона вычитают); P_1 — усредненный пик ди-

аграммы пробы стандарта в см; K_1 — калибровка (чувствительность) прибора при анализе пробы стандарта; K_2 — калибровка прибора при анализе пробы из флакона; V_1 — объем пробы стандарта в см³; V_2 — объем испытуемой пробы из флакона в см³; V_3 — объем реакционного флакона в см³; t — время экспозиций в ч; n — число корней во флаконе; 44,6 — количество C_2H_4 (нмоль в 1 см³) в пробе стандарта.

Работу следует вести при одинаковой калибровке (чувствительности) прибора при анализе проб из флакона и стандарта, тогда $\frac{K_2}{K_1} = 1$. Лучше, если объемы проб из стандарта и флакона равны, например составляют 0,5 мл. Тогда $\frac{V_1}{V_2} = 1$. В каждый флакон следует вводить ацетилен в количестве, равном 5% объема флакона (так, во флакон на 30 мл вводят 2 см³ ацетилена, на 130 мл — 6 см³ ацетилена). Время экспозиции — 1 ч. Для этих условий формула (1) приобретает вид:

$$A = \frac{P_2 \cdot V_3}{P_1 \cdot t \cdot n} \cdot 44,6. \quad (2)$$

Вследствие того что в каждой анализируемой партии образцов величины V_3 (объем флакона) и P_1 (средняя величина пиков стандарта для всех определений) одни и те же, число корней также равно, формула еще более упрощается:

$$A = P_2 \cdot C,$$

$$\text{где } C = \frac{V_3 \cdot 44,6}{P_1 \cdot t \cdot n}. \quad (3)$$

Таким образом, для определения количества C_2H_4 в нмолях, образовавшегося во флаконе за 1 ч в расчете на 1 растение, пик диаграммы пробы из каждого флакона умножают на коэффициент C , рассчитанный предварительно.

Пример расчета. $K_1 = K_2 = 20 \times 10^{-10}$; $V_1 = V_2 = 0,5 \text{ см}^3$; $V_3 = 43 \text{ см}^3$; $t = 1 \text{ ч}$; $n = 1$; отдельные показатели P_1 составляют 11,4; 11,5; 11,4; средний P_1 — 11,4 см. Отсюда:

$$C = \frac{43 \cdot 44,6}{11,4 \cdot 1 \cdot 1} = 168,2;$$

$$A = P_2 \cdot 168,2.$$

Флакон № 1: $P_2 = 16,2 \text{ см}$; $A_1 = 16,2 \cdot 168,2 = 2725$ (нмоль C_2H_4 /растение/ч).

Флакон № 2: $P_2 = 15,8 \text{ см}$; $A_2 = 15,8 \cdot 168,2 = 2658$ (нмоль C_2H_4 /растение/ч) и т. д.

Если результаты хотят выразить в мкг фиксированного азота за 1 ч на 1 растение (мкг N/растение/ч), проводят пересчет: количество этилена в нмоль C_2H_4 /растение/ч умножают на $0,0093 \left(\frac{28}{3} \cdot 10^{-3} \right)$, где 28 — молекулярная масса азота; 10^{-3} — множитель для пересчета нмоль в мкг, так как 1 нмоль = 10^{-9} моль, а 1 мкг = 10^{-6} г; 3 — коэффициент (см. 12.4.2).

Материалы и оборудование (к 12.3—12.4)

Стерильные колбы Эрленмейера на 250 мл, $(NH_4)_2SO_4$, $CaCO_3$, газовый хроматограф любой марки с пламенным ионизационным детектором, сосуды с пробкой из силиконовой резины, шприцы, газометры для приготовления газовых смесей, прибор для определения актуальной и потенциальной активности азотфиксации по Умарову, пенициллиновые флаконы, ацетилен, бобовое растение с клубеньками, реактив Несслера.

12.5. Выделение и изучение чистых культур клубеньковых бактерий

12.5.1. Выделение чистой культуры клубеньковых бактерий

Из клубеньков *однолетних* бобовых растений бактерии выделяют в период бутонизации — цветения растения-хозяина, из клубеньков *многолетних* растений — на втором году жизни.

От тщательно промытого в водопроводной воде корня отделяют пинцетом или бритвой наиболее крупные розовые клубеньки, помещают их в фарфоровый тигель Гуча с сетчатым дном, который погружают в большие по размеру фарфоровые чашки с 96%-ным этиловым спиртом на несколько минут. После этого клубеньки многократно промывают стерильной водой.

Стерильным пинцетом клубеньки переносят в стерильную чашку Петри и стерильным ножом разрезают на части. Бактериологической петлей берут небольшое количество со-

держимого клубенька, переносят в каплю стерильной воды на поверхность агаровой питательной среды в чашке Петри и размазывают шпателем. Этим же шпателем делают посев последовательно еще на 2—3 пластинах для получения отдельных колоний (*истоциющий посев*).

Засеянные чашки выдерживают в термостате при 25—27 °С. Быстрорастущие клубеньковые бактерии появляются на 3—4-е сут, медленно растущие — на 7—9-е. Появление колоний на 1—2-е сут свидетельствует о загрязнении культуры.

Питательной средой служит *среда Фреда*: маннит (сахароза или глюкоза) — 10,0 г; KH_2PO_4 — 0,5 г; MgSO_4 — 0,2 г; NaCl — 0,1 г; CaCO_3 — 3,0 г; дрожжевая вода (рН 6,8) — 100 мл; агар — 15 г; дистиллированная вода (рН 7,0) — 0,9 л.

Можно использовать *бобовый агар* следующего состава: бобовый отвар — 1000 мл; сахароза — 2 г; KH_2PO_4 — 1,0 г, MgSO_4 — 0,3 г; агар — 15,0 г.

В бобовый агар добавляют NaHCO_3 до рН 7,0 и стерилизуют при 120 °С 30 мин.

Для приготовления *бобового отвара* 50 г бобов (белой фасоли или гороха) заливают 1 л водопроводной воды и варят до набухания и растрескивания кожуры (бобы не должны развариваться). Отвар фильтруют через вату (марлю) и доводят водопроводной водой до 1 л.

На этих средах клубеньковые бактерии образуют бесцветные или молочно-белые, часто слизистые, колонии, за исключением розово-красных колоний клубеньковых бактерий из клубеньков *Lotononis bainesii*.

На скошенном бобовом агаре быстрорастущие клубеньковые бактерии обильно развиваются, образуя довольно прозрачные слизистые, часто стекающие вниз мощные колонии-штрихи.

Медленнорастущие бактерии люпина и сои образуют менее прозрачные с небольшим количеством слизи и более плотные, похожие на капли стеарина, беловатые колонии-штрихи.

Клубеньковые бактерии хорошо растут также на *среде Лазаревой* (на 1 л водопроводной воды): KH_2PO_4 — 0,5 г; MgSO_4 — 0,2 г; NaCl — 0,2 г; MnSO_4 — 0,005 г; NH_4MoO_4 — 0,002 г; маннит или сахароза — 10 г; дрожжевая вода — 100 мл, агар — 1,5%;

среде Норриса (на 1 л водопроводной воды): K_2HPO_4 — 0,5 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,8 г; NaCl — 0,2 г; FeCl_3 — 0,01 г; маннит — 10 г; свежеприготовленный дрожжевой экстракт — 100 мл; рН 7,2.

Для медленно растущих клубеньковых бактерий (сои, люпина) следует использовать *среду Исварана* (г/л водопроводной воды): маннит или сахароза — 10 г; K_2HPO_4 — 0,5 г; MgSO_4 — 0,2 г; NaCl — 0,1 г; глюконат кальция — 1,5 г; FeCl_3 — 0,01 г; дрожжевой экстракт — 2 г; агар — 20 г.

Для проверки чистоты выделенной культуры делают посев на МПА, так как, кроме клубеньковых бактерий люцерны и донника, ни одна культура клубеньковых бактерий на МПА не развивается.

Характерный тест для клубеньковых бактерий — рост на лакмус-молоке.

Лакмусовое молоко, или *лакмус-молоко*, готовят следующим образом. 50 г лакмуса измельчают в ступке и растворяют в 150 мл 40%-ного этанола. Смесь кипятят 1 мин на водяной бане, после отстаивания декантируют (при помощи делительной воронки), добавляют к осадку еще 150 мл 40%-ного раствора этилового спирта и снова кипятят 1 мин. Надосадочную жидкость декантируют, объединяют с предыдущей порцией и оставляют на ночь. Затем доводят объем 40%-ным раствором этилового спирта до 300 мл, устанавливают рН 7,0, добавляя к раствору по капле 1 н. раствор HCl (окраска становится пурпурной).

К свежеснятому (обезжиренному) молоку добавляют готовый лакмусовый раствор до бледно-лиловой или сине-фиолетовой окраски последнего (около 40 мл/л). Устанавливают рН смеси, равный 7,0, добавляя 1 н. раствор NaOH . Стерилизуют 10 мин автоклавированием при 115 °С. Перегревание ведет к карамелизации.

Быстрорастущие клубеньковые бактерии на 10—14-е сут подщелачивают лакмусовое молоко, которое при этом слегка синее или не меняет окраски, и образуют светлое кольцо — сывороточную зону. Только клубеньковые бактерии люцерны, донника и некоторые штаммы клубеньковых бактерий клевера подкисляют лакмусовое молоко (придают ему розовую окраску).

Медленнорастущие клубеньковые бактерии лакмус-молоко подщелачивают, но сывороточной зоны не образуют, т. е. не гидролизуют казеин. Большинство клубеньковых бактерий не способно разжижать желатину, однако некоторые штаммы разжижают ее через 2 мес. культивирования.

Для дифференцирования бактерий рода *Agrobacterium* и бактерий рода *Rhizobium* используют кетолактозный тест. *Agrobacterium* обильно развиваются, продуцируя 3-кетолактозу на среде Гаура и Маречковой, содержащей (на 1 л дистиллированной воды): лактозу — 5,0 г, KNO_3 — 1,0 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1 г, NaH_2PO_4 безводный — 0,18 г, агар — 12,0 г, Fe-ЭДТА 0,25%-ный раствор — 10 мл; MnSO_4 33,5%-ный раствор — 10 мл; pH 6,8. Колонии клубеньковых бактерий на этой среде обычно не растут.

Для проведения кетолактозного теста чистую культуру бактерий помещают на 1—2 сут при 25—30 °С на скошенную агаризованную среду Фреда (см. выше). Затем петлей культуру переносят небольшими комочками (диаметром не более 0,5 см) на агаризованную среду Гаура и Маречковой в чашки Петри. На одну чашку можно поместить 4—6 комочков исследуемых культур. Чашки инкубируют 1—2 сут при 28 °С, затем наливают в них тонким слоем реактив Бенедикта следующего состава: NaCl — 250 г, NH_4NO_3 — 100 г, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ — 250 г, вода дистиллированная — до 1 л. Чашки оставляют при комнатной температуре. Если культура образует 3-кетолактозу (3-кетогалактопиранозилглюкозу), то вокруг нее появляется желтое кольцо CuO , которое хорошо видно на голубом фоне реактива. Через 1 ч кольцо достигает максимального диаметра (2—3 см). Для бактерий рода *Rhizobium* кетолактозный тест всегда отрицателен.

При просмотре под микроскопом чистой культуры живых клеток клубеньковых бактерий на препарате в раздавленной капле отмечают их большую подвижность. Каждая клетка совершает вибрирующие, дрожашие движения, занимая то вертикальное, то горизонтальное по отношению к глазу исследователя положение. Бактерии очень полиморфны, но в основном они мелкие. На фиксированных окрашенных (лучше эритрозином) препаратах четко просматривается зернистость, создающая впечатление опоясанности клеток.

Материалы и оборудование

Стерильные чашки Петри, пинцет, нож, среда Фреда или бобовый агар, шпатели, корни бобового растения с клубеньками в фазе бутонизации — цветения, этиловый спирт, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

12.5.2. Определение специфичности клубеньковых бактерий. Отбор активных (эффективных) культур клубеньковых бактерий

Вводные пояснения. Специфичность клубеньковых бактерий — это их избирательная способность заражать определенный род, вид, семейство бобовых растений или группу родов. Критерием служит появление хотя бы одного клубенька на корнях растений, бактеризованных исследуемой культурой.

При отборе высокоэффективных клубеньковых бактерий основным, наиболее надежным критерием служит их влияние на урожай растений и содержание в них азота. Некоторые клубеньковые бактерии образуют клубеньки, но при этом усвоения молекулярного азота в бобово-ризобиальном симбиозе не происходит или этот процесс идет очень слабо и потребность растений в азоте не удовлетворяется. Такие клубеньки называют неактивными, или неэффективными. Обычно они мелкие, разбросаны по всему корню, содержат мало бактериальной ткани и быстро разрушаются. Бывают случаи, когда клубеньковые бактерии образуют клубеньки, паразитирующие на растении. Для получения высоких урожаев важно подобрать высокоэффективные культуры бактерий, изучить их особенности. Предварительный отбор можно проводить в условиях лабораторного, а затем вегетационного опытов. Окончательно же эффективность проверяют при полевых испытаниях.

Подбор активных культур клубеньковых бактерий по Разумовской. Его проводят в лабораторных или вегетационных опытах. Для этого берут большие (180×40 мм) пробирки со средой следующего состава (г/л дистиллированной воды): K_2HPO_4 — 1,0; MgSO_4 — 1,0; CaCO_3 — 0,5; FeSO_4 , H_3BO_3 , MnSO_4 — следы, агар — 1,0. Среду разливают в пробирки слоем 4 см, закрывают ватными пробками и стерилизуют при 120 °С 20 мин.

Одновременно проводят стерилизацию семян концентрированной серной кислотой по Nutman. Для этого мелкие семена погружают на 1—2 мин, а крупные — на 3—5 мин в серную кислоту, налитую в коническую колбу на 0,7—1,0 л. При этом колбу слегка покачивают. После обработки кислоту сливают и в колбу сразу же быстро вливают большую порцию

стерильной водопроводной воды: если приливать воду медленно или в небольшом количестве, семена могут перегреться. Воду меняют несколько раз. По окончании промывки реакция среды на поверхности семян должна быть нейтральной (определяют лакмусовой бумагой).

Стерильность семян проверяют посевом части их на МПА или бобовый агар. После прорастания семена переносят стерильным пинцетом в пробирки с агаровой средой одновременно с 1 мл взвеси культуры клубеньковых бактерий.

Для затемнения корней пробирки снаружи обертывают плотной бумагой так, чтобы она закрывала слой агара и семена. Растения выращивают при естественном или искусственном освещении. По мере их развития наблюдают за образованием клубеньков, массой растений и содержанием в них азота. Контролем служат пробирки без бактерий.

Общий азот в исследуемых растениях определяют **микрометодом Кьельдаля**. Для этого навеску хорошо измельченного воздушно-сухого растительного материала массой около 0,2 г помещают в колбу Кьельдаля на 50—100 мл, приливают 10 мл фенолсерной кислоты и ставят на сжигание. Через сутки, когда жидкость приобретает желтую окраску, добавляют 1 каплю хлорной кислоты (если жидкость темно-бурая, то — 2). По окончании сжигания жидкость обесцвечивается.

Колбу охлаждают и переносят раствор в мерную колбу на 100 мл, тщательно и многократно маленькими порциями ополаскивая колбу Кьельдаля дистиллированной водой и сливая промывные воды в ту же мерную колбу. Затем объем раствора доводят до метки и используют для дальнейшей отгонки.

Прибор Кьельдаля состоит из отгонной колбы Кьельдаля, обратного холодильника, отстойника и колбы — парообразователя. В парообразователь наливают дистиллированную воду (не менее $\frac{2}{3}$ объема), подкисленную концентрированной серной кислотой (1—2 мл) с несколькими каплями смешанного *индикатора Гроака*.

Данный индикатор готовят следующим образом: к 100 мл 0,2%-ного спиртового раствора метилового красного добавляют 100 мл 0,1%-ного спиртового раствора метиленового синего. Хранят его в темной склянке с притертой пробкой длительное время.

В течение всей работы вода в парообразователе должна быть окрашена в розовый цвет. В парообразователь вносят небольшое количество битого кирпича. Воду в парообразователе прогревают до начала работы. Для этого в отгонную колбу через воронку наливают около 20 мл дистиллированной воды, воронку закрывают; зажигают под парообразователем горелку и доводят воду в нем до закипания. Зажим парообразователя при этом должен быть открытым, а зажим отстойника — закрытым.

Под холодильником, на конец которого надета резиновая трубка с капельницей, ставят рабочий стакан (пустой или с водой). Затем осуществляют «холостой» отгон так, как описано ниже, используя вместо исследуемого раствора дистиллированную воду.

Исследуемый раствор отгоняют следующим образом. Под капельницу холодильника ставят приемную колбу или стакан. В нее наливают 10 мл 2%-ного раствора борной кислоты, подкрашенной индикатором Гроака (на 1 л борной кислоты — 10 мл индикатора). Приемную колбу ставят на подставку так, чтобы капельница холодильника погрузилась в нее почти до дна.

В отгонную колбу пипеткой через воронку вносят 10 мл исследуемого раствора, ополаскивают воронку небольшими порциями дистиллированной воды, добавляют 10 мл 40%-ного раствора NaOH, снова ополаскивают воронку дистиллированной водой, кран воронки закрывают и наливают в воронку дистиллированную воду.

Открывают зажим предварительно нагретого парообразователя, выпускают пар, придвигают горелку при закрытом зажиме отстойника.

При этом начинает выделяться аммиак, который образовался ранее при сжигании органического вещества навески и был затем связан фенолсерной кислотой. Он отгоняется в приемник, где поглощается борной кислотой с образованием бора аммония.

Отгон аммиака прекращают через 5 мин с момента изменения розовой окраски раствора приемной колбы на зеленую. После этого капельницу холодильника вынимают из раствора кислоты и отгоняют пар еще 1—2 мин. Тщательно обмывают капельницу дистиллированной водой и титруют содержимое

колбы 0,01 н. раствором серной кислоты из микробюретки до перехода зеленой окраски титруемого раствора в слабо-розовую.

После каждого определения отставляют горелку, закрывают зажим парообразователя, приемную колбу с отгоном заменяют рабочим стаканом, открывают зажим отстойника для слива раствора из отгонной колбы; когда в отстойнике остается примерно $\frac{1}{3}$ жидкости, зажим отстойника закрывают. Прибор снова готов к определению.

Расчет количества азота (N) (%) проводят по формуле

$$N = \frac{100(a_2 - a_1) \cdot V \cdot 0,00014}{b \cdot H},$$

где a_1 — количество 0,01 н. H_2SO_4 , пошедшей на титрование «холостого» раствора, мл; a_2 — количество 0,01 н. H_2SO_4 , пошедшей на титрование испытуемого раствора, мл; 0,00014 — количество азота, связанное 1 мл 0,01 н. раствора H_2SO_4 , г; 100 — пересчет в %; V — объем исходного раствора, мл; b — аликвота, взятая для отгона, мл; H — навеска, г.

Определение азотфиксации изотопным методом. Более точные данные о размерах азотфиксации бобово-ризобиального симбиоза можно получить, выращивая растения, инокулированные клубеньковыми бактериями, в атмосфере, содержащей меченый азот — ^{15}N , с последующим определением количества фиксированного азота в масс-спектрометре.

Инокулированные растения выращивают длительное время в изолированной камере в газовой среде, содержащей меченый ^{15}N . При этом регулируют газовый режим, контролируют изотопный состав азота в газовой смеси и поддерживают определенную влажность.

По обогащению азота газовой смеси камеры, растений и субстрата изотопом ^{15}N рассчитывают количество азота, используемого тест-растением из воздуха, мг:

$$x = \frac{b(a_1 - 0,386)}{a - 0,386},$$

где x — количество азота, усвоенного из воздуха, мг; a — обогащение азота газовой смеси изотопом ^{15}N , ат% $^{15}N_2$; a_1 — обогащение азота исследуемого образца изотопом ^{15}N , ат% $^{15}N_2$; b — содержание азота

в образце, мг; 0,386 — обогащение изотопом ^{15}N образца в естественном состоянии.

Определение азотфиксирующей активности бобово-ризобиального симбиоза ацетиленовым методом по Парийской и Гореловой. Для этого растения выращивают в пробирках (2×20 — 2×30 см) с отростком, на который надевают тонкий резиновый шланг, герметично закрытый на конце стеклянной палочкой. Пробирки на $\frac{1}{4}$ заполняют средой следующего состава (г/л дистиллированной воды): KCl — 0,74; KH_2PO_4 — 0,3; K_2HPO_4 — 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; $CaSO_4$ — 0,5; $FeCl_2$ — 0,04; агар — 8.

Клубеньковые бактерии вносят в теплую среду в концентрации $1 \cdot 10^7$ клеток/мл. Проросшие семена, предварительно простерилизованные (см. выше), помещают по одному в пробирки на поверхность застывшей, засеянной ризобиями среды. Растения выращивают в оранжерее в течение месяца. Азотфиксирующую активность определяют после 16-часового светового дня, вводя в пробирки по 0,5 мл ацетилена (см. 12.4.2).

12.5.3. Определение общего и активного симбиотических потенциалов и удельной активности симбиоза по методу Посыпанова

Метод определения общего и активного симбиотических потенциалов (ОСП и АСП) основан на относительном постоянстве массы клубеньков в определенной фазе развития растения (в течение примерно 7—10 сут) и зависимости активности бобово-ризобиальной системы от массы клубеньков, содержащих леггемоглобин.

Расчет ОСП — средней массы всех клубеньков за период t и АСП — средней массы розовых клубеньков с леггемоглобином за тот же период в кг/га проводят по формуле

$$t (M_1 + M_2)/2,$$

где t — время между двумя анализами, сут; $(M_1 + M_2)/2$ — средняя масса всех клубеньков (для ОСП) или только розовых (для АСП).

Расчет ОСП и АСП за вегетационный период делают, суммируя показатели ОСП и АСП за отдельные периоды.

Массу клубеньков растений на 1 га можно определить по массе клубеньков на единицу площади (0,05 м²). Для этого готовят металлическую рамку (300×167 мм). Для культур рядового и узкорядного посевов рамку размещают так, чтобы в нее попали соответственно 2 и 4 рядка. Короткие боковые грани рамки располагают на середине междурядий.

Толщина монолита должна соответствовать глубине распространения клубеньков изучаемой культуры. Корни с клубеньками отмывают от почвы и учитывают массу всех клубеньков монолита. Зная площадь монолита и среднюю плотность стояния растений, определяют массу клубеньков на 1 га или на одно растение.

Массу клубеньков на 1 га рассчитывают по формуле

$$M = 10 \cdot m \cdot S, \quad (1)$$

где 10 — коэффициент пересчета г/м² в кг/га; m — масса клубеньков в монолите, г; S — площадь монолита, м².

Если площадь монолита равна 0,05 м², то $M = 2000 \cdot m$.

Если травостой не выравнен, сначала устанавливают коэффициент выравненности. Например, суммарная площадь, не занятая бобовыми культурами (выпады), составляет 30%, коэффициент выравненности — 0,7. С поправкой формула (1) примет вид:

$$M = \frac{10 \cdot m \cdot k}{S},$$

где k — коэффициент выравненности.

Для расчета массы клубеньков на 1 растение среднюю массу клубеньков монолита делят на среднюю плотность стояния растений.

Широкорядным способом с междурядьями 45 см сеют сою, фасоль. При этом в монолит площадью 0,1 м² войдет часть рядка длиной 22,2 см. Поскольку диаметр распространения клубеньков сои не превышает 25 см, ширину монолита, не снижая точности опыта, можно сократить с 45 до 25 см. Площадь такого монолита будет равна 0,1 м² и $M = (100 \cdot m)$ кг/га.

Удельную активность симбиоза (УАС) определяют следующим образом. В течение 1 сут через равные промежутки времени проводят 5—6 определений нитрогеназной активности

клубеньков (см. 12.4.3). Количество фиксированного азота (y) в г/м² за 1 сут рассчитывают по формуле

$$y = \sum \bar{n} \cdot \frac{t}{S},$$

где t — период между двумя анализами, ч; $\bar{n} = \frac{n_1 + n_2}{2}$ — средняя нитрогеназная активность за период t , мг/ч на сосуд (n_1 и n_2 — нитрогеназная активность по двум смежным определениям); $\sum \bar{n}t$ — суточная нитрогеназная активность, мг N₂ в 1 сут на 1 сосуд; S — площадь сосуда, м².

Количество азота, фиксированного из воздуха за определенный отрезок времени, можно рассчитать по формуле

$$N = 10 \cdot \bar{y} \cdot t,$$

где t — период определения, сут; $\bar{y} = \frac{y_1 + y_2}{2}$ — средняя удельная азотфиксирующая активность за время t , г/м² в 1 сут; 10 — коэффициент пересчета г/м² в кг/га.

Суммируя количество азота, фиксированного за отдельные периоды, можно рассчитать азотфиксацию за вегетационный период.

УАС определяют на единицу площади (г/м² в 1 сут) или на единицу массы клубеньков (г/кг сырых активных клубеньков в 1 сут) или за период вегетации.

12.5.4. Определение вирулентности и конкурентоспособности клубеньковых бактерий

Вводные пояснения. Вирулентность клубеньковых — способность этих бактерий проникать в клетки корня растения, там размножаться и вызывать образование клубеньков — определяют по времени появления первого видимого клубенька. Критерием вирулентности может быть также доза инокулята — «инфекционная нагрузка», «запас инфицирующего начала» для осуществления процесса инфицирования в максимально короткие сроки.

Отбор вирулентных культур ризобий мелкосемянных растений методом Фэреуса. Два предметных стекла толщиной 0,7—0,8 мм с проложенной между ними с одного конца стек-

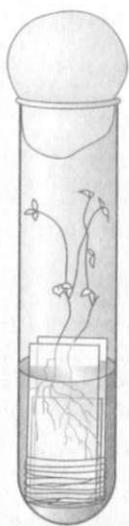


Рис. 32. Образование клубеньков на корнях проростков бобовых в системе стекл Фэреуса

лянной пластинкой располагают так, чтобы край одного стекла выступал над краем другого примерно на 3—5 мм, и прочно перевязывают их нитками (рис. 32). Указанное расположение удобно для дальнейшего заполнения агаром пространства между стеклами и посева семян. Стеклённые пластинки для прокладки готовят из тонких предметных стекол, разрезая их на 3 части.

Систему стекл Фэреуса ставят в чашку Петри и стерилизуют в автоклаве. После стерилизации и заполнения агаризованной средой пространства между стеклами по две таких системы помещают в пробирки (180×40 мм) с жидкой питательной средой (60 мл на пробирку). Состав агаризованной (0,6% агара) и жидкой среды одинаков (г/л дистиллированной воды): CaCl_2 — 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,12; K_2HPO_4 — 0,1; K_2HPO_4 — 0,15; лимонно-кислое железо — 0,005; Mo, Cu, B, Fe, Mn — следы.

Предварительно рН среды доводят до 6,6 серной кислотой, затем стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм 30 мин.

Одновременно стерилизуют семена. Существуют разные способы стерилизации семян. Один из наиболее распространенных способов следующий: сначала семена обрабатывают спиртом (для лучшей их смачиваемости), затем промывают стерильной водой и помещают в большие стерильные колбы с 0,1%-ным раствором сулемы (или 1%-ной бромной водой) и выдерживают мелкие семена в течение 2—3 мин, а крупные — в течение 4—5 мин. По прошествии срока обработки семена неоднократно промывают стерильной водой, соблюдая правила асептики. Стерилизовать семена можно также по Nutman концентрированной серной кислотой (см. 12.5.2).

Отобранные простерилизованные семена помещают в чашку Петри с фильтровальной бумагой и оставляют в тонком слое стерильной воды. Посев проводят через сутки. К этому времени семена прорастают (длина проростков — 3—5 мм). Пространство между предметными стеклами в подготовленной

системе заполняют расплавленной агаризованной минеральной средой с помощью стерильных пипеток. После застывания агара в каждую систему помещают по три проростка. Посев проводят асептически. Далее по две таких системы устанавливают в пробирки с жидкой минеральной средой. Через сутки семена и среду инокулируют 3 каплями густой суспензии двухсуточной культуры клубеньковых бактерий.

Для исследований под микроскопом через 4—5 сут после посева, соблюдая условия асептики, осторожно стерильным пинцетом вынимают одну систему. Бритвой разрезают нитки. Одно предметное стекло удаляют. На агар наносят каплю воды, на нее помещают покровное стекло и корни просматривают под микроскопом.

■ **Определение конкурентоспособности клубеньковых бактерий.** *Конкурентоспособность* — это способность вирулентного штамма клубеньковых бактерий в присутствии других вирулентных штаммов обеспечивать преимущественное инфицирование бобового растения. Ее можно выявить только при наличии двух или нескольких штаммов в зоне корня растения.

Основное условие при определении конкурентоспособности — проверка ее только у штаммов заведомо одинаково вирулентных или даже более вирулентных по сравнению с тем, который оценивают. Иначе можно допустить ошибку, приняв за более конкурентоспособный более вирулентный штамм.

Критерий конкурентоспособности — количество клубеньков, образуемых каждым из вирулентных штаммов при их одновременном воздействии на растение. Правильнее конкурентоспособность определять в лабораторных, строго контролируемых условиях. Для этой цели применяют серологический метод и метод метки штамма-мутанта по его антибиотикоустойчивости.

При **серологическом методе** оценки конкурентоспособности ризобий для иммунизации кроликов в качестве антигенов используют суспензии 2—3-суточных культур быстрорастущих и 5—7-суточных культур медленно растущих штаммов в физиологическом растворе (2 мл на скошенный агар). Для освобождения от неспецифических Н-антигенов суспензии прогревают в течение 30 мин на кипящей водяной бане и выдерживают 1 сут в холодильнике.

Иммунизацию осуществляют в ушную вену кроликов-самцов массой 3,5—4,5 кг возрастающим количеством инфицирующего материала. Всего вводят не менее 20 млрд клеток с интервалом в 3 дня. Курс иммунизации — 6—8 инъекций.

Кровь у опытных животных берут на 7-й день после последней иммунизации из наружной краевой вены уха. Собирают ее в стерильный сосуд, смоченный физиологическим раствором, ставят на 1 ч в термостат при 37 °С.

Кровяной сгусток отделяют от стенок пипеткой Пастера и ставят сосуд на 18—20 ч в холодильник при 4—10 °С. Затем пипеткой Пастера отделяют отстоявшуюся сыворотку (антисыворотку) и переносят ее в стерильные пробирки. Консервировать сыворотку можно тимолом или борной кислотой (2 г на 100 мл), но лучше хранить ее в лиофилизированном состоянии.

Для **реакции преципитации методом Оухтерлони** используют максимально чистый прозрачный агар (лучше *агар Дифко*). В стерильные чашки Петри заливают расплавленный агар слоем 3—4 мм. После застывания при помощи специального штампа в агаре вырезают лунки диаметром 3—4 мм. Удобнее использовать штамп из 7 трубочек: 1 — центральная и 6 — по окружности на расстоянии 8 мм друг от друга. В лунки пипетками Пастера наливают: в центральную — антисыворотку, в периферийные — растворы антигенов. Заполнять лунки следует быстро, аккуратно, не переливая жидкость через края и не касаясь их. Чашки помещают в эксикатор с водой на дне и тимолом в качестве антисептика. Реакцию проводят при 20 °С.

Линии преципитации учитывают визуально на 2—4-й день. Если определяют долю того или иного штамма, участвующего в образовании клубеньков в почве, то, чтобы оценить его конкурентоспособность, в качестве антигена берут культуры клубеньковых бактерий, выделенные из клубеньков и приготовленные так, как описано выше.

Для оценки конкурентоспособности клубеньковых бактерий **методом метки** исследуемые штаммы культивируют на средах с возрастающими (от 10 до 1000 ед/мл) дозами антибиотика, в частности стрептомицина или канамицина. При этом происходит адаптация отдельных штаммов к высокой дозе антибиотика. При инокуляции такими резистентными штаммами можно определить, какое количество клубеньков образовано, и таким образом получить характеристику их конкурентоспособности.

Обычно исследуют не менее 100 клубеньков. После стерилизации поверхности клубеньков (см. 12.5.1) каждый клубенек отдельно раздавливают в капле стерильной воды и проводят посев в чашки со стрептомицином. Если клубенек образован резистентным вариантом, то на среде со стрептомицином отмечают рост клубеньковых бактерий.

Материалы и оборудование (к 12.5.2—12.5.4)

Семена бобовых растений, концентрированная H_2SO_4 , колбы на 1 л со стерильной водопроводной водой по 500—600 мл, пробирки (180×40 мм) со средой Разумовской, прибор Фэреуса для определения вирулентности ризобий, культуры клубеньковых бактерий, стрептомицин или канамицин.

Глава 13

Анализ бактериальных препаратов

К бактериальным удобрениям относятся такие препараты, как **нитрагин** и **азотобактерин**. Первый содержит клетки клубеньковых бактерий, второй — клетки азотобактера.

В 1 г сухого нитрагина должно содержаться не менее 70 млн клеток медленнорастущих культур и не менее 300 млн — быстрорастущих. Основные условия, определяющие качество азотобактерина, — клетки азотфиксатора должны быть жизнеспособными и сохраняться в препарате на исходном уровне.

13.1. Определение жизнеспособности клеток клубеньковых бактерий

13.1.1. Экспресс-метод определения жизнеспособности клеток клубеньковых бактерий в сухом нитрагине по Шильниковой, Сигуте

Основной метод. 1 г сухого нитрагина разводят в 99 мл стерильной водопроводной воды. Быстрорастущие культуры выдерживают на качалке 90 мин, медленнорастущие — 120 мин (220 об/мин, 28 °С). Определяют рабочую концентра-

цию клеток (10—30 млн в 1 мл). Затем суспензию исследуемых клеток помещают в две одинаковые пробирки и окрашивают: в одной пробирке — примулином (разведение 1 : 1000), в другой — акридиновым оранжевым (разведение 1 : 200 000).

Через 15 мин окрашенные суспензии наносят на предметные стекла по 0,01 мл, еще через 3—5 мин суспензию накрывают покровным стеклом 18×18 мм, края препарата парафинируют и подсчитывают клетки (не менее 100 полей зрения в трех повторностях для каждого образца).

Сначала просматривают препарат, окрашенный акридиновым оранжевым, с масляной иммерсией под микроскопом МЛ-2. Площадь покадровой рамки (0,00306 мм²) является площадью поля зрения. Количество полей зрения в площади 18×18 мм равно 105 882. Зная среднее количество бактерий в 1 поле зрения и разведение, подсчитывают общее количество бактерий в мазке.

Препараты, окрашенные акридиновым оранжевым, могут храниться 3—5 месяцев. На этих препаратах учитываются и живые, и мертвые клетки (общее количество). Соотношение живых поврежденных и мертвых клеток считают на препаратах, окрашенных *примулином* — люминесцентным красителем, импрегнирующим оболочки живых клеток только в незначительной степени, легко проникающим в мертвые клетки и накапливающимся в них. Благодаря этой способности красителя живые клетки тускло люминесцируют, мертвые — светятся ярким зеленовато-желтым цветом. Просматривают препараты, окрашенные примулином, в свете люминесценции (при освещении объекта сверху, через объектив).

Можно исключить окраску клеток акридиновым оранжевым. В этом случае после просмотра препарата, окрашенного примулином, в свете люминесценции следует посмотреть то же поле зрения при фазово-контрастном освещении объекта снизу, через конденсор. Надо помнить, что при освещении препарата снизу он быстро выгорает. Продолжительность анализа — не более 4 ч.

Число живых (жизнеспособных) клеток (B) определяют по формуле

$$B = A - M,$$

где A — общее число клеток в препарате, подсчитанное при окраске акридиновым оранжевым в светлопольном микроскопе или при окраске примулином в фазово-контрастном микроскопе; M — число поврежденных и мертвых клеток.

■ **Метод с использованием контрастных флуорохромов.** Используют контрастные флуорохромы — аурамин 00 и конго красный. Начальные этапы подготовки те же, что и в первом опыте. После реактивации клеток и выдерживания на качалке их суспензию вносят в мерные центрифужные пробирки и окрашивают 3 мин конго красным (разведение 1 : 2000) при pH 9,0, затем центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин. Потом заменяют конго красный аурамин (разведение 1 : 20 000) и при pH 4,4 выдерживают 10 мин. 0,01 мл окрашенной суспензии наносят на предметное стекло, через 3—5 мин накрывают покровным стеклом (18×18 мм), края препарата парафинируют.

Препарат просматривают в люминесцентном микроскопе не более 30 мин в сине-фиолетовом свете. Исследуют не менее 100 полей зрения в трех повторностях для каждого образца. Живые клетки светятся зеленым цветом, мертвые — красным. Продолжительность анализа — не более 4 ч.

Важное условие анализа — **подготовка покровных и предметных стекол.** Их кипятят 20 мин в растворе нейтрального мыла («детское») на дистиллированной воде; тщательно промывают проточной и споласкивают дистиллированной водой; подсушивают и заливают хромовой смесью не менее чем на 2 ч. В этой же смеси стекла можно хранить.

После обработки хромовой смесью стекла промывают проточной водой, затем — дистиллированной и кипятят 5 мин в 5%-ном растворе Na₂CO₃; снова споласкивают дистиллированной водой, потом — слабым раствором уксусной кислоты и тщательно промывают дистиллированной водой; сушат на воздухе или в сушильном шкафу. Стекла хранят в смеси *Никифорова* (спирт : эфир = 1 : 1), но лучше их использовать сразу. Указанная подготовка исключает свечение фона самих стекол при обработке препарата люминофором.

13.1.2. Экспресс-метод определения количества жизнеспособных клеток клубеньковых бактерий в ризоторфине на мембранных фильтрах по Шильниковой, Сигуте

При возделывании бобовых культур применяют также препарат **ризоторфин** — сыпучую массу с влажностью 50—55%, расфасованную в полиэтиленовые пакеты по 200, 400, 600 или 800 г. Ризоторфин для сои и люпина хранят при 12—14 °С, для остальных

ных культур — при 3—5 °С. Срок годности — 6 мес. В 1 г ризоторфина содержится 2,5 млрд клеток клубеньковых бактерий.

■ **Постановка опыта.** Поскольку часть клеток клубеньковых бактерий адсорбирована в ризоторфине, сначала их десорбируют с торфяных частиц растиранием ризоторфина в 0,1—0,5%-ном растворе пирогосфата натрия или обработкой твином-20 (поверхностно-активным веществом).

Мембранные фильтры № 1 (диаметр пор 0,3 мкм), № 2 (диаметр пор 0,5 мкм) или «Сынпор» (Прага) (диаметр пор 0,23 мкм) маркируют по лицевой (матовой) стороне простым карандашом и кипятят 20—30 мин в дистиллированной воде в открытом химическом стакане с 3—5-кратной сменой воды и начальной температурой 45—50 °С (для предотвращения скручивания фильтров). При кипячении и смене воды происходит стерилизация фильтров, из пор вытесняется воздух и удаляются растворители.

10 г препарата ризоторфина разводят в 90 мл стерильного раствора пирогосфата натрия, предварительно растерев его до пастообразного состояния, и делают последовательные разведения. Прокипяченный мембранный фильтр вместе с обычным фильтром из фильтровальной бумаги, также прокипяченным, выкладывают на фильтроносную пластинку **фильтра Зейтца** и закрепляют воронкой. Можно вместо фильтра Зейтца использовать специальные приборы Рублевской водопроводной станции. Фильтруют 1 мл раствора ризоторфина определенного разведения, распределяя его равномерно по всей поверхности фильтра, при отрицательном давлении — через воронку Бюхнера посредством водоструйного насоса.

Далее бактерии подращивают на среде Исварана: быстрорастущие клубеньковые — 6—8 ч, медленно растущие — 18—24 ч; общую численность микроорганизмов определяют на МПА. С этой целью фильтры маркированной стороной вверх фламбированным пинцетом переносят в чашки Петри, заполненные агаризованными (0,7—1% агара) средами Исварана и МПА. На фильтре с диаметром фильтрующей поверхности около 30 мм не должно быть более 50 колоний.

Состав среды Исварана (г/л дистиллированной воды): маннит — 10; K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4$ — 0,2; NaCl — 0,1; глюконат кальция — 1,5; $FeCl_3$ — 0,01; дрожжевой экстракт — 2; pH 6,8 (устанавливают раствором NaOH). Стерилизуют среду при

0,5 атм 30 мин, для подавления сапротрофной микрофлоры добавляют 0,01% кристаллического фиолетового.

Колонии на фильтрах окрашивают в течение 5 мин раствором акридинового оранжевого (1 : 1000) на фосфатном буфере (pH 8), промывают стерильной водопроводной водой 1—2 мин. Для хранения фильтры фиксируют в парах формалина, для чего 10%-ный раствор формалина наливают на дно чашки Петри, на крышку которой прикрепляют влажный мембранный фильтр с выросшими колониями. Чашку Петри помещают в термостат или на нагревательный столик при 40 °С на 15—20 мин.

Перекрашенные фильтры отмывают через влажную фильтровальную бумагу: на фильтровальную бумагу, обильно смоченную водой, помещают мембранные фильтры тыльной стороной на несколько минут. Меняя фильтровальную бумагу, доводят окраску фильтров до нужной степени яркости. Высушенные фильтры можно осветлять, нанося на них несколько капель иммерсионного масла.

■ **Анализ.** Колонии подсчитывают под люминесцентным микроскопом в сине-фиолетовом свете (объектив 10×, окуляр — любой). Можно считать их визуальнo с помощью прибора для подсчета колоний, особенно если метод модифицируют для подсчета чистых культур клубеньковых бактерий, например, когда необходимо определить дозу инокулюма на препарате. В этом случае через 15—18 ч подращивания быстрорастущих культур и 36 ч подращивания медленно растущих их окрашивают 0,25%-ным раствором хризоидина, эозина или 2%-ным раствором эритрозина в 5%-ном растворе карболовой кислоты (феноле) в течение 7 мин.

13.2. Определение числа клеток азотобактера в азотобактерине

Для определения числа клеток азотобактера в азотобактерине 10 г почвенного препарата азотобактерина помещают в 100 мл воды, выдерживают в течение 1 ч, периодически встряхивая. Затем содержимое энергично встряхивают 10 мин и 10 мл полученной бактериальной взвеси переносят в колбу с 90 мл стерильной водопроводной воды. Встряхивают 5 мин и получают

разведение 10^{-2} . Затем готовят последующие разведения: 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8} . Из последних двух разведений трижды набирают по 1 мл суспензии, помещают в 3 параллельные чашки Петри, заливают слоем в 7—10 мм расплавленного и охлажденного до 45°C агара Эшби и тщательно перемешивают его с суспензией.

Как только агар застынет, чашки переворачивают вверх дном и в таком положении выдерживают в термостате при $26\text{--}28^{\circ}\text{C}$.

Подсчитывают клетки азотобактера на 3—4-е сут. Общее их число (x) определяют по формуле

$$x = K \cdot P,$$

где K — среднее количество колоний; P — степень разведения.

В 1 г азотобактерина при выпуске должно быть не менее 100 млн клеток азотобактера.

Численность посторонней микрофлоры в азотобактерине устанавливают микропипетированием исходной суспензии и посевом ее (1 мл) в 3 параллельные чашки на МПА. Колонии посторонних микроорганизмов определяют через 3 сут.

Материалы и оборудование (к 13.1—13.2)

Сухой нитрагин, ризоторфин, примулин, акридиновый оранжевый, пробирки, чистые культуры ризобий, аурамин 00, конго красный, мембранные фильтры № 1 или № 2, фильтр Зейтца, водоструйный насос, среда Исварана, 2%-ный раствор эритрозина в 5%-ном растворе карболовой кислоты, азотобактерин, колбы или пробирки со стерильной водопроводной водой для получения разведений до 10^{-8} , среда Эшби, стерильные чашки Петри, люминесцентный микроскоп МЛ-2, светлопольные микроскопы и все необходимое для микропипетирования.

14.1. Эпифитные микроорганизмы зерна

14.1.1. Общие сведения

На поверхности зерна обитает разнообразная микрофлора. Часть микроорганизмов попадает туда из ризосферы, часть заносится с пылью и насекомыми. Однако на зерне, как и на всей поверхности растений, развиваются лишь некоторые микроорганизмы, так называемые эпифиты. Эпифитные микроорганизмы, размножающиеся на поверхности стеблей, листьев и семян растений, получили название *микроорганизмов филлосферы*. Эпифиты питаются продуктами экзосмоса растений; устойчивы к высоким концентрациям фитонцидов, выдерживают периодические колебания влажности.

Численность этих микроорганизмов невелика, и видовой состав их довольно постоянен: более 90% составляют гнилостные бактерии, в основном — неспорозные (род *Pseudomonas*). Особенно часто на зерне встречается *Erwinia herbicola*, образующая на плотных средах золотисто-желтые колонии. Встречаются также *Pseudomonas fluorescens*, микрококки, молочнокислые бактерии, дрожжи. Бацилл и микроскопических грибов немного.

В определенных условиях эпифитные микроорганизмы могут быть полезны для растений, так как препятствуют проникновению паразитов в ткани растения. На хранении зерна присутствие эпифитных микроорганизмов может сказываться отрицательно.

На развитие микроорганизмов на зерне, а следовательно, на сохранность последнего решающее влияние оказывают влажность, температура, степень аэрации, целостность зерна и состояние его покровных тканей.

В зрелом зерне вода находится в связанном состоянии и недоступна микроорганизмам, которые в этом случае пребывают в состоянии анабиоза (покоя). На зерне с повышенной влажностью микроорганизмы размножаются и тем быстрее, чем выше температура. Развитие микробиологических процессов на хранящемся зерне с повышенной влажностью

приводит к заметному, а иногда и очень значительному повышению его температуры. Это явление получило название *термогенез*.

Самонагревание зерна ведет к смене микрофлоры. Своиственные зерну эпифитные микроорганизмы исчезают. Начинают обильно размножаться непигментированные неспороносные палочки, вытесняющие *Erwinia herbicola*. Позднее появляются термостойкие (термотолерантные) микрококки, на плотных средах чаще всего образующие мелкие белые плоские колонии, а также плесневые грибы, актиномицеты. Самонагревание свыше 40—50 °С способствует развитию спорообразующих и термофильных бактерий. По мере самонагревания изменяется видовой состав и плесневых грибов: виды *Penicillium*, преобладающие вначале, заменяются представителями рода *Aspergillus*.

Таким образом, по видовому составу микрофлоры можно судить не только о том, подвергалось ли зерно самонагреванию, но и насколько далеко зашел этот процесс. Преобладание *Erwinia herbicola* в микробном ценозе зерна служит показателем его хорошего качества. Большое количество спорообразующих бактерий и грибов указывает на потерю семенами всхожести.

Благоприятные условия для развития на поверхности зерна микроорганизмов кроме порчи самого зерна способствуют накоплению выделяемых микроорганизмами токсинов. При скармливании такого зерна скоту и домашней птице возникают отравления. Таким образом, правильное хранение зерна сводится к тому, чтобы не допускать развития на нем микроорганизмов.

14.1.2. Количественный учет КОЕ на зерне

Навеску массой 5 г помещают в колбу с 50 мл стерильной водопроводной воды и 2—3 г песка. Колбу взбалтывают круговыми вращательными движениями 10 мин. Из полученной вытяжки готовят разведения (10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4}). Отдельными стерильными пипетками Мора берут по 10 мл суспензии и переносят в колбы, содержащие 90 мл стерильной водопроводной воды. Затем из каждой колбы берут по 1 мл суспензии соответствующего разведения и вносят их в стерильные чашки Петри в двух повторностях. В каждую чашку Петри выливают

по одной пробирке расплавленного, но предварительно охлажденного до 50 °С МПА. Чашки инкубируют при 30 °С. Наряду с МПА используют элективные среды (см. 4.2.1).

Через 3—5 сут инкубации подсчитывают общее число КОЕ на МПА в чашках и рассчитывают количество КОЕ на 1 г зерна.

14.1.3. Определение качественного состава микроорганизмов зерна

Колонии группируют по культуральным признакам. Из каждой группы колоний готовят препараты, выявляют принадлежность микроорганизмов к роду или виду и определяют численность бактерий каждой группы в процентах от общего числа микроорганизмов.

На основании микробиологического анализа делают заключение о качестве зерна.

На свежем доброкачественном зерне преобладает *Erwinia herbicola* (до 80%), образующая блестящие оранжевые колонии. Встречается *Pseudomonas fluorescens*, формирующая желтовато-зеленоватые флуоресцирующие колонии; непигментированные неспорообразующие палочки; дрожжи — блестящие, выпуклые, часто окрашенные в розовые тона колонии. При учете на сусло-агаре с мелом выявляются молочно-кислые бактерии, образующие чечевицеобразные мелкие колонии с зонами растворения мела.

На несвежем зерне, хранившемся при повышенной влажности, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens* не выявляются. Обнаруживаются микрококки, образующие мелкие белые блестящие плоские колонии; спорообразующие палочки; актиномицеты, а также неспорообразующие палочки. При учете на сусло-агаре выявляется значительное количество грибов, главным образом относящихся к роду *Penicillium*, а также *Aspergillus*.

Материалы и оборудование

Зерно в колбах — свежее и хранившееся в условиях повышенной влажности, весы и разновесы, часовые стекла, колбы со стерильной водой (по 90 мл), колбы со стерильной водой (по 50 мл) и песком, стерильные пипетки Мора на 10 и 1 мл, стерильные чашки Петри, МПА в пробирках и колбах, водяная баня, треножник, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

14.2. Микробиологический анализ силоса

14.2.1. Общие сведения

Силосование — консервирование кормовой массы без доступа воздуха, наиболее распространенный способ заготовки сочных кормов. Молочнокислые бактерии, обитающие на растениях, играют большую роль при силосовании кормов. В основе силосования лежит молочнокислое брожение. Молочнокислые бактерии сбраживают сахара силосующихся растений в молочную и частично — в уксусную кислоты, подавляющие развитие гнилостных, маслянокислых и других бактерий, ухудшающих качество корма.

Молочнокислые бактерии снижают рН корма до 4,2—4,0. Если рН силоса по тем или иным причинам становится выше 4,7, то создаются условия, благоприятные для жизнедеятельности микроорганизмов, ухудшающих хранение корма. В нем накапливаются масляная кислота, амины, аммиак и другие продукты.

Для обеспечения нормального развития молочнокислых бактерий в процессе силосования необходимы достаточное содержание сахара в силосующихся растениях и анаэробные условия. Плесневые грибы переносят сильное подкисление, но являются строгими аэробами, поэтому в хорошо спрессованном, укрытом, заквашенном корме размножаться не могут.

Во время брожения с распадом сахаров увеличивается количество органических кислот. Однако снижение рН зависит не только от образования молочной и уксусной кислот, но и от буферности растительного материала, которая, в свою очередь, обуславливается присутствием белка, солей. Чем выше буферность растительной массы, тем больше нужно кислот, чтобы снизить рН корма, так как буферный материал нейтрализует часть молочной кислоты (ионы водорода). Поэтому, несмотря на накопление кислот, рН среды почти не снижается до тех пор, пока не будет израсходован весь материал, обеспечивающий буферность. Связанные буферным материалом кислоты образуют в силосе запас так называемых связанных кислот. Более буферное исходное сырье для получения силоса хорошего качества должно иметь больше сахаров, чем менее буферное. Таким образом, силосуемость расте-

ний определяется также их специфическими буферными свойствами.

Буферность растертой растительной массы определяют при титровании по количеству 0,1 н. раствора молочной кислоты, необходимому для смещения ее рН до 4,0. Поскольку на образование молочной кислоты затрачивается примерно 60% сахаров корма, то, рассчитав 100%, определяют так называемый *сахарный минимум данного растительного сырья*, т. е. наименьшее количество сахара, необходимое для образования такого количества молочной и уксусной кислот, которое может сместить рН до 4,0.

Растения хорошо силосуются, если в них много сахара, а сахарный минимум небольшой. Если фактическое содержание сахара в растениях примерно равно сахарному минимуму, то они силосуются плохо и малейшее отклонение в процессе силосования приводит к порче корма. Если фактическое содержание сахара меньше сахарного минимума, то растения вовсе не силосуются.

Хороший силос характеризуется следующими показателями: цвет — оливково-зеленый (лишь немного варьирует), запах — приятный (моченых яблок, печеного хлеба), рН — 4—4,2, общая кислотность — 2—2,5% (в переводе на молочную кислоту), влажность — 70%. Микрофлора хорошего силоса представлена молочнокислыми палочками и лактококками, часто в небольших количествах встречаются дрожжи. Последние образуют эфиры, придающие силосу приятный запах, и обогащают корм белком и витаминами. Однако в больших количествах дрожжи ухудшают качество силоса — снижают его кислотность, так как являются конкурентами молочнокислых бактерий в потреблении сахара.

В первый период после закладки силоса бурно развивается микрофлора смешанной фазы брожения, обычно обитающая на поверхности здоровых растений: гнилостные бактерии (в основном неспорообразующие палочки), бактерии группы кишечной палочки и др. При подкислении корма их сменяют молочнокислые лактококки, а затем более кислотоустойчивые молочнокислые палочки. Через две недели (при снижении рН до 4,0 и ниже) микробиологические процессы в силосе в основном заканчиваются.

14.2.2. Исследование качественного состава микрофлоры силоса

Для анализа из торцевой части траншеи, ямы или наземных буртов берут среднюю пробу силоса. Сняв стерильным ножом верхний слой, вырезают кубики по средней линии бурта с интервалом в 1 м. Их складывают в стерильную стеклянную банку на 1—2 л с притертой пробкой так, чтобы силос был уложен плотно и доверху. Пробы перемешивают в стерильном кристаллизаторе, измельчают стерильными ножницами и берут навески для анализов. Исследование проводят не позднее 1 сут после взятия пробы.

Для знакомства с микрофлорой силоса из него готовят препарат. Для этого берут пинцетом немного силоса и плотно прижимают его к предметному стеклу без добавления воды так, чтобы на стекле остался отпечаток. Препарат сушат на воздухе, фиксируют на пламени и окрашивают метиленовым синим (2—3 мин). Смыть краситель водопроводной водой и высушив вдали от пламени, препарат микроскопируют с иммерсионной системой.

На препарате видны тонкие неспорообразующие палочки, варьирующие в размере (молочнокислые бактерии), и молочнокислые лактококки. Среди них обычно преобладают *Lactobacillus plantarum* — гомоферментативные мезофильные короткие палочки, часто располагающиеся параллельными рядами. Встречаются клетки почкующихся дрожжей. Споробразующие бактерии обнаруживаются редко. В некачественном силосе на препарате видны споробразующие палочки (маслянокислые бактерии, аэробные гнилостные бактерии), а также плесневые грибы.

14.2.3. Количественный учет микроорганизмов в силосе

Навеску силоса (5 г) помещают в колбу с 50 мл стерильной водопроводной воды и 2—3 г песка. Колбу взбалтывают круговыми вращательными движениями 10 мин. Из полученной вытяжки готовят разведения (10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6}), а затем проводят посев из соответствующих разведений на элективные среды: 1 мл суспензии — при глубинном посеве, 0,05 мл суспензии — при поверхностном. Инкубация при 28 °С.

Определение количества молочнокислых бактерий проводят глубинным посевом на *сусло-агаре с мелом* или на *капу-*

стном агаре с мелом (среды 1, 1а, см. далее), а также на *капустном агаре со спиртом и мелом* (среда 2). Вокруг колоний молочнокислых бактерий вследствие накопления молочной кислоты образуются зоны растворения мела (рис. 33).

Колонии молочнокислых бактерий на *сусло-агаре с мелом* и *капустном агаре с мелом* подсчитывают на 5—6-е сут, а на *капустном агаре со спиртом и мелом* — на 7—10-е. Среда 2 служит для выявления молочнокислых бактерий в составе эпифитной микрофлоры исходной растительной массы, так как входящий в ее состав спирт тормозит рост посторонней микрофлоры.

Количество посторонней микрофлоры (аэробных гнилостных микроорганизмов) определяют глубинным посевом на *пептонном агаре* (среда 3). Подсчет колоний ведут на 5—7-е сут.

Количество микроскопических грибов и дрожжей определяют на *сусло-агаре со стрептомицином* (среда 4) поверхностным посевом. Подсчет колоний ведут на 3—4-е сут, при необходимости повторно — на 7—8-е.

Титр маслянокислых бактерий устанавливают на *жидкой среде Емцева* (среда 5а) и *картофельной среде* (среда 5). Для определения количества спор маслянокислых бактерий делают посев из суспензии после ее пастеризации в течение 10 мин при 75 °С. Учет ведут по интенсивности выделения газа (кусочки картофеля всплывают), титр маслянокислых бактерий и их спор устанавливают методом предельных разведений по Мак-Креди.

Аэробные протеолитические бактерии учитывают на *МПБ* (среда 6) по накоплению газа в поплавках. Посевы выдерживают при 28 °С 2 недели.

При анализе силосов из трав, выращенных на фоне высоких доз азотных удобрений, денитрифицирующие бактерии учитывают на *среде Гильтая* (среда 7). Посевы выдерживают 10—12 дней при 28 °С. Количество денитрификаторов определяют по интенсивности выделения газа и изменению цвета индикатора.

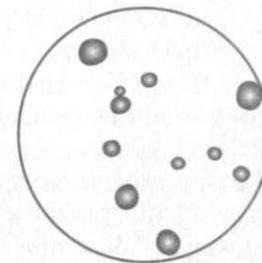


Рис. 33. Зоны растворения мела вокруг колоний молочнокислых бактерий силоса

При анализе силоса учитывают также споры аэробных гнилостных бацилл. На плотной среде (среда 8) делают поверхностный посев. Чашки инкубируют при 28 °С; подсчет колоний выполняют на 4-е сут.

Бактерии группы кишечной палочки учитывают на среде Кесслера (среда 9) или среде Булира (среда 10) по выделению газа и накоплению его в поплавках. Пробирки выдерживают 48 ч при 40—42 °С.

Доминирующие на плотных средах колонии микроскопируют. Для обнаружения маслянокислых бактерий из пробирок с картофелем готовят препарат в раздавленной капле с добавлением раствора Люголя.

Состав элективных сред. Среда 1. *Сусло-агар с мелом.* Сусло, разбавленное до 3% по Баллингу, — 1 л, агар — 20—25 г, стерильный мел — 30 г. Стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Среда 1а. *Капустный агар с мелом.* Капустный бульон — 900 мл, дрожжевой экстракт — 100 мл, пептон — 10 г, глюкоза — 20 г, ацетат натрия — 3,35 г, $MnSO_4$ — 0,025 г, агар — 15—20 г. Стерильный мел добавляют в колбы из расчета 5 г на 200 мл среды. Стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Среда 2. *Капустный агар со спиртом и мелом.* В расплавленную и охлажденную до 50 °С среду прибавляют 20 мл этилового спирта (96%-ного) на 200 мл среды, тщательно взбалтывают и заливают в чашки Петри с посевным материалом.

Среда 3. *Пептонный агар.* Пептон — 5 г, K_2HPO_4 — 1 г, KH_2PO_4 — 0,5 г, $MgSO_4$ — 0,5 г, NaCl — следы, водопроводная вода — 1 л, агар, хорошо промытый, — 15—20 г. Стерилизуют при 1 атм 20 мин.

Среда 4. *Сусло-агар со стрептомицином.* Сусло, разбавленное до 3%, по Баллингу, — 1 л, агар — 26 г. Стерилизуют при 0,5 атм 30 мин. Перед разливкой среды в чашки Петри в сусло-агар добавляют 80—100 ед. стрептомицина на 1 мл среды.

Среда 4а. *Подкисленный сусло-агар.* Сусло, разбавленное до 3%, по Баллингу, — 1 л, агар — 20—25 г. Стерилизуют при 0,5 атм 30 мин. Перед разливом среды в чашки Петри в расплавленный сусло-агар добавляют прокипяченную в течение 10 мин на водяной бане молочную кислоту (2 мл на 1 л среды).

Среда 5. *Картофельная среда с мелом.* В пробирки вносят стерильный мел (на кончике скальпеля), 8—10 картофельных кубиков величиной 2—3 мм заливают водопроводной водой до $\frac{3}{4}$ объема пробирок. Стерилизуют при 1 атм 30 мин.

Среда 5а. Картофельный крахмал — 20 г, пептон — 5 г, дрожжевой автолизат — 0,2 мг, KH_2PO_4 — 0,5 г, K_2HPO_4 — 0,5 г, $MgSO_4$ — 0,5 г, NaCl — 0,5 г, $FeSO_4$ — 0,01 г, $MnSO_4$ — 0,01 г, $CaCO_3$ — 10 г, смесь микроэлементов по Федорову — 1 мл, дистиллированная вода — 1 л, тиогликолевая кислота — 0,05%, нейтральрот — 0,004%, pH 7,4—7,5. Стерилизуют среду при 0,5 атм 30 мин. Температура инкубации посевов — 30—35 °С.

Среда 6. *МПБ:* пептон — 10 г, NaCl — 4 г, мясной бульон — 1 л. Наливают в пробирки с поплавками до $\frac{3}{4}$ объема. Стерилизуют при 1 атм 20 мин.

Среда 7. *Среда Гильтая (видоизмененная).* Лимоннокислый натрий — 2 г, KNO_3 — 1 г, KH_2PO_4 — 1 г, K_2HPO_4 — 1 г, $MgSO_4$ — 1 г, $CaCl_2$ — 0,2 г, $FeCl_3$ — следы, дистиллированная вода — 1 л, 1%-ный раствор бромтимолблау до pH 6,8—7,0. Стерилизуют при 1 атм 20 мин.

Среда 8. *МПА и сусло-агар (1 : 1).* Стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Среда 9. *Среда Кесслера.* К 1 л водопроводной воды прибавляют 50 мл свежей бычьей желчи в 10 г пептона. Смесь кипятят 15 мин на водяной бане, взбалтывают. Когда пептон растворится, фильтруют через вату, затем прибавляют 10 г лактозы. После растворения лактозы устанавливают слабощелочную реакцию (pH 7,6) и добавляют 4 мл 1%-ного водного раствора гениана фиолетового. Полученную среду разливают в пробирки с поплавками и стерилизуют при 1 атм 15 мин.

Среда 10. *Среда Булира.* К 1 л МПБ добавляют 12,5 г маннита и 6 мл 1%-ного раствора нейтральрота. Среду разливают в пробирки с поплавками и стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Среда имеет вишневый цвет. При развитии кишечной палочки она становится оранжевой и в поплавке скапливается газ.

14.2.4. Определение кислотности силоса

Для определения *общей кислотности* берут навеску силоса (20 г) и помещают в коническую колбу с обратным холодильником на 500 мл. Содержимое колбы заливают 200 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают и нагревают 1 ч.

После охлаждения содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр. Затем 10 мл фильтрата (с двойным количеством дистиллированной воды) титруют 0,1 н. раствором NaOH в присутствии фенолфталеина до появления устойчивой слабо-розовой окраски.

Общее содержание кислоты в силосе в пересчете на молочную кислоту выражают в %: 1 мл 0,1 н. раствора NaOH соответствует 0,009 г молочной кислоты (см. 7.1.3).

Умножив численное значение объема 0,1 н. раствора NaOH, израсходованного на титрование экстракта из 100 г силоса, на 0,009, находят количество кислоты в силосе.

Пример расчета. На титрование 10 мл вытяжки израсходовано 1,7 мл 0,1 н. раствора NaOH. Следовательно, на титрование 200 мл вытяжки пойдет 34 мл этого же раствора. Из 20 г силоса получено 200 мл вытяжки, для нейтрализации 100 г силоса необходимо x мл 0,1 н. раствора NaOH. Соответственно

$$x = \frac{100 \cdot 34}{20} = 170 \text{ (мл 0,1 н. NaOH).}$$

Содержание молочной кислоты:

$$170 \cdot 0,009 = 1,53 \text{ (\%).}$$

Достаточно точные результаты получают, если определение кислотности ведут следующим образом. Навеску силоса в 5 г растирают в ступке и помещают в широкую пробирку диаметром 2—2,5 см. Содержимое заливают 50 мл дистиллированной воды, закрывают резиновой пробкой и тщательно перемешивают. Навеску силоса 30 мин настаивают при 10—12 °С, затем определяют кислотность вытяжки титрованием.

Титруют 10 мл вытяжки с двойным количеством дистиллированной воды 0,1 н. раствором NaOH в присутствии фенолфталеина до появления устойчивой слабо-розовой окраски.

Пример расчета. На титрование 10 мл вытяжки израсходовано 1,7 мл 0,1 н. раствора NaOH. Следовательно, на титрование 50 мл вытяжки пойдет 8,5 мл этого раствора. Из 5 г силоса получено 50 мл вытяжки, для нейтрализации 100 г силоса необходимо x мл 0,1 н. раствора NaOH. Соответственно

$$x = \frac{100 \cdot 8,5}{5} = 170 \text{ (мл 0,1 н. NaOH).}$$

Содержание молочной кислоты:

$$170 \cdot 0,009 = 1,53 \text{ (\%).}$$

При установлении реакции среды силоса готовят его вытяжку, определяют в ней рН, так же как при определении общей кислотности. Затем находят рН при помощи индикаторов или электрометрически.

Определение рН индикаторным методом

Цвет смеси индикаторов (бромтимолблау и метиловый красный)	рН
Красный	4,2 и ниже
Красно-оранжевый	4,2—4,6
Оранжевый	4,6—5,2
Желтый	5,2—6,1
Желто-зеленый	6,1—6,4
Зеленый	6,4—7,2
Зелено-синий	7,2—7,6

При использовании индикаторов поступают следующим образом. В фарфоровую чашку помещают 2 мл вытяжки силоса и добавляют 2 капли индикатора (смесь равных объемов, бромтимолблау и метилового красного). Сравнивая цвет содержимого чашки с данными, приведенными в табл. 3, определяют рН.

Материалы и оборудование

Весы и разновесы, конические колбы на 500 мл с обратным холодильником, широкие пробирки, треножник с асбестовыми сетками, колбы на 100 и 250 мл, воронки, бумажные фильтры, пипетки на 10 и 2 мл, фарфоровые чашки, пинцеты; индикаторы: смесь равных объемов бромтимолблау и метилового красного, фенолфталеин, метиленовый синий, раствор Люголя (1 : 2). Питательные среды, стерильные чашки Петри, стерильные пипетки на 1 мл, стерильная водопроводная вода в пробирках по 9 мл и в колбах по 50 мл. Чашки и пробирки с посевами. Микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

15.1. Бактериологический анализ молока

15.1.1. Общие сведения

Молоко — хорошая среда для микроорганизмов. В нем содержатся белки (казеин в виде казеината кальция), небольшое количество пептона, свободные аминокислоты, жир, молочный сахар (лактоза), минеральные соли, витамины (А, D, E, С, РР и группы В) и другие соединения. Поэтому при благоприятных температурных условиях микроорганизмы бурно размножаются в молоке и ухудшают его качество.

Обсеменение молока микроорганизмами происходит при доении и хранении. Бактерии попадают в молоко из вымени животного, с его кожи, посуды, оборудования, из корма, с рук и одежды доильщика, а при стойловом содержании животных — из желудочно-кишечного тракта (кишечная палочка, молочнокислые, маслянокислые и гнилостные бактерии). В выводные протоки вымени микроорганизмы проникают через каналы сосков. Большая часть их погибает благодаря бактерицидным свойствам ткани вымени. Жизнеспособными остаются наиболее стойкие группы — микрококки, стрептококки. При неблагоприятных условиях содержания животных в вымя могут попадать и болезнетворные микроорганизмы.

При соблюдении санитарных правил в молоке преобладают микрококки, молочнокислые бактерии (кишечного происхождения), сарцины.

Загрязненное молоко содержит значительное количество бактерий группы кишечной палочки, маслянокислых и гнилостных бактерий.

Во время хранения изменяются количество содержащихся в молоке бактерий и соотношение отдельных видов. Характер изменений зависит от температуры, продолжительности хранения и первоначального состава микрофлоры молока.

При микробиологическом анализе молока определяют общую численность бактерий, учитываемых на агаре с гидролизированным молоком или на МПА, титр кишечной палочки (коли-титр) и делают пробу на редуктазу.

15.1.2. Проба на редуктазу

В молоке содержатся различные ферменты, в том числе *редуктаза* — анаэробная дегидрогеназа, катализирующая передачу водорода от окисляемого субстрата любому ненасыщенному соединению кроме кислорода воздуха. Редуктаза накапливается в молоке главным образом при размножении в нем микроорганизмов. Поэтому количество ее в молоке — показатель его бактериальной обсемененности. Обнаруживается редуктаза по обесцвечиванию красителей — метиленового синего или резазурина.

При **редуктазной пробе с метиленовым синим** добавляют реактив в молоко, отчего оно окрашивается в синий цвет. Редуктаза восстанавливает метиленовый синий, переводя его в бесцветную лейкоформу. Поэтому в присутствии редуктазы молоко, окрашенное метиленовым синим, обесцвечивается.

Свеженадоенное молоко восстанавливает метиленовый синий медленно, с увеличением числа бактерий в молоке скорость восстановления возрастает. По скорости восстановления в молоке метиленового синего можно примерно определить численность бактерий и степень загрязнения молока. Однако строгой зависимости между числом бактерий в молоке и временем обесцвечивания в нем метиленового синего нет, так как каждый вид бактерий выделяет определенное, неодинаковое количество редуктазы.

Взятие пробы проводят после тщательного перемешивания молока. Стерильным черпаком отбирают 50 мл в стерильную посуду, закрывают стерильной ватной пробкой и немедленно приступают к анализу. Для этого в чистую пробирку наливают 1 мл раствора метиленового синего и 20 мл исследуемого молока, предварительно нагретого до 38—40 °С. После перемешивания пробирку ставят в редуктазник или термостат при 38—40 °С (указанная температура оптимальна для редуктазы) и наблюдают за обесцвечиванием через 20 мин, 2 ч и 5,5 ч. Проба на редуктазу считается законченной, когда наступает полное обесцвечивание молока. Исходя из времени

Определение качества молока по времени его обесцвечивания

Таблица 4

Показатель	Класс			
	1-й	2-й	3-й	4-й
Время обесцвечивания, ч	5,5	5,5—2	2—0,5	20 мин
Примерное количество бактерий, млн	0,5	0,5—4	4—20	20
Качество молока	Хорошее	Среднее	Плохое	Очень плохое

обесцвечивания выделяют четыре класса качества молока (табл. 4).

Редуктазная проба с резазурином длится не более 1 ч. В стерильные пробирки наливают 10 мл анализируемого молока, 1 мл 0,0005%-ного водного раствора резазурина, тщательно перемешивают и помещают на водяную баню при 38—40 °С. Изменение окраски учитывают через 20 мин и через 1 ч (табл. 5).

Пробирки с молоком, обесцвеченным через 20 мин, убирают, остальные находятся в водяной бане до конца опыта.

Во многих странах официально принята **10-минутная проба** с резазурином. Молоко считают пригодным, если за это время исчезает сине-фиолетовое или сине-стальное окрашивание.

Классификация молока по редуктазной пробе с применением резазурина

Таблица 5

Качество молока	Количество бактерий в 1 мл молока, млн	Продолжительность изменения цвета, ч	Окраска молока
Хорошее	Менее 0,5	1	Сине-стальная
Удовлетворительное	От 0,6 до 4	1	Сине-фиолетовая или сиреневая
Плохое	От 4 до 20	1	Розовая или белая
Очень плохое	Более 20	20 мин	Белая

15.1.3. Определение общего количества бактерий в молоке

Вначале готовят разведения (10^{-1} — 10^{-9}), для чего из отобранной пробы молока стерильной пипеткой берут 1 мл и переносят в пробирку с 9 мл стерильной водопроводной воды (технику приготовления разведений см. в 5.1.1). Затем при глубинном посеве из разведений молока, обесцвечивающегося с резазурином менее чем через 20 мин, т. е. разведений 10^{-4} ; 10^{-5} и 10^{-6} , берут отдельной стерильной пипеткой по 1 мл суспензии и вносят в стерильные чашки Петри в двух- и трехкратной повторности.

При обесцвечивании молока с резазурином более чем через 20 мин посев делают из разведений 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . В чашки с суспензией вносят расплавленный и охлажденный до 45—50 °С МПА. Суспензию с агаром перемешивают и чашки Петри с посевом помещают в термостат при 28—30 °С. После 2-дневной инкубации подсчитывают колонии бактерий в чашках. Количество дрожжей и плесневых грибов подсчитывают на 4-й день. Число колоний умножают на степень разведения и определяют среднее арифметическое их число после учета колоний в трех чашках. Это соответствует числу клеток в 1 мл молока.

15.1.4. Определение титра кишечной палочки *Escherichia coli* (коли-титра, титра коли)

При оценке качества молока определение титра коли имеет важное значение, так как кишечная палочка — обитатель кишечника человека и животных и ее присутствие в молоке указывает на фекальное загрязнение молока.

Коли-титр — это наименьший объем (в мл) или масса (в г) исследуемого материала, в котором обнаруживается хотя бы одна клетка кишечной палочки.

Для выявления кишечной палочки и определения ее титра в молоке используют газообразующую способность группы бактерий *E. coli-aerogenes* на жидкой среде Булира следующего состава: МПБ — 1 л, маннит — 10 г, NaCl — 5 г.

Насыщенным раствором соды устанавливают нейтральную реакцию среды, затем подкрашивают ее насыщенным водным раствором нейтральрота до вишнево-красного цвета,

фильтруют, разливают в пробирки с поплавками и стерилизуют в автоклаве при 1 атм.

В пробирки со средой Булира вносят по 1 мл суспензии из соответствующего разведения. Посев проводят из всех разведений в двух- и трехкратной повторности. Пробирки с посевом выдерживают 48 ч при 42 °С.

В связи с тем что в пробах молока могут быть другие бактерии, сбрасывающие лактозу с образованием газа, точно установить наличие кишечной палочки можно, сделав посев из забродившей жидкости на специфическую среду Эндо. Если бродильная проба положительная и культура на среде Эндо дает ярко-красные колонии, то в исследуемом субстрате присутствует кишечная палочка. Для полной идентификации нужны дополнительные данные: об отсутствии разложения желатины, об отсутствии газа и кислоты при выращивании на сахарозе и об образовании скатола и индола в МПБ.

Коли-титр молока можно определить на среде Кесслера, в состав которой входят желчь, краситель генциановый фиолетовый — вещества, подавляющие рост молочнокислых и других грамположительных бактерий.

Молоко или молочные продукты вначале разводят в соотношении 1 : 10, 1 : 100 и т. д. Затем берут 6 пробирок со средой Кесслера (среда 9, см. 14.2.3): в три из них вносят по 1 мл, в остальные — по 0,1 мл каждого разведения. Засеянные пробирки ставят на 2 сут в термостат при температуре 43 °С. Отсутствие газообразования во всех 6 пробирках указывает на чистоту продукта, и при этом принято считать, что его коли-титр выше 3 мл; при газообразовании в одной пробирке, засеянной 1 мл исследуемого продукта, коли-титр равен 3 мл; при образовании газа более чем в одной пробирке с 0,1 мл разведения молока коли-титр считается равным 0,3 мл. Такое молоко непригодно к употреблению. При образовании газа в 6 или 5 пробирках с 0,1 мл разведения молока (очень загрязненное молоко) — коли-титр менее 0,3 мл.

Идентификацию кишечной палочки в этом случае также проводят на среде Эндо, для чего высевают на нее суспензию из газообразующих пробирок и ставят их на 1 сут в термостат при температуре 37 °С.

Определение качества молока по коли-титру

Показатель	Класс			
	1-й	2-й	3-й	4-й
Коли-титр	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-5}
Качество молока	Хорошее	Среднее	Плохое	Очень плохое

На основании определения титра кишечной палочки качество молока подразделяют на классы (табл. 6).

15.1.5. Определение в молоке количества спор лактатсбраживающих анаэробных бактерий

При оценке качества молока (согласно требованиям ГОСТа 25102—82) необходимо определить в нем количество спор лактатсбраживающих анаэробных бактерий. Иногда при нормальной кислотности молоко может быть обильно обсеменено спорами маслянокислых бактерий, которые выдерживают пастеризацию. Развитие лактатсбраживающих маслянокислых бактерий особенно опасно в сыре, так как они вызывают его вспучивание на поздних этапах созревания вследствие выделения большого количества газов CO_2 и H_2 . Образование масляной кислоты придает сыру прогорклый вкус и делает его абсолютно непригодным для реализации или резко снижает его качество.

Метод определения количества спор лактатсбраживающих анаэробных бактерий в молоке основан на способности анаэробных бактерий развиваться и давать видимые признаки роста — разрывы среды — в посевах прогретого молока в пробирках с плотной питательной средой после выдерживания его в течение 3 сут при температуре 37 °С.

Проводят посев 1 мл исследуемого образца молока и его разведений в пробирки с 10 мл питательной среды, прокипяченной перед анализом в течение 30 мин и охлажденной до 40 °С. Каждый образец исследуемого молока из выбранных разведений засевают в две пробирки с мясо-пептонной или лактатной средой, внося посевной материал на дно пробирки и не взбалтывая ее содержимое. Сверху посева заливают слоем в 1,5—2 см расплавленного и предварительно охлажденного до 45 °С агара. Пробирки помещают в термостат при 37 °С на 7 ч.

**Определение вероятного числа спор
лактатсбраживающих анаэробных бактерий в молоке**

Количество пробирок с положительными результатами при разных объемах посевого материала			Наиболее вероятное число спор в 1 мл	Количество пробирок с положительными результатами при разных объемах посевого материала			Наиболее вероятное число спор в 1 мл
1 мл	0,1 мл	0,01 мл		1 мл	0,1 мл	0,01 мл	
0	0	0	0,0	1	1	2	—
0	0	1	0,5	1	2	0	2,0
0	0	2	—	1	2	1	3,0
0	1	0	0,5	1	2	2	—
0	1	1	0,9	2	0	0	2,5
0	1	2	—	2	0	1	5,0
0	2	0	0,9	2	0	2	—
0	2	1	—	2	1	0	6,0
0	2	2	—	2	1	1	1,3
1	0	0	0,6	2	1	2	20,0
1	0	1	1,2	2	2	0	25,0
1	0	2	—	2	2	1	70,0
1	1	0	1,3	2	2	2	110,0 и более
1	1	1	0,2				

При приготовлении *мясо-пептонной среды* к 900 мл МПБ добавляют 5 г лактата кальция, 15 г ацетата натрия, 0,8 г хлорида цистеина, 40 мл дрожжевого автолизата или 4 г сухого дрожжевого автолизата и 20 г агара. Смесь нагревают до 95 °С, выдерживают при постоянном помешивании до расплавления агара и добавляют 10 мл 0,01%-ного водного раствора тетрабората натрия, 10 мл 1%-ного раствора кислого карбоната натрия и 1 мл 0,4%-ного водного раствора индикатора нейтрального красного. При помощи 20%-ного водного раствора молочной кислоты устанавливают рН 5,7. Приготовленную среду разливают в пробирки по 10 мл, закрывают ватными пробками и стерилизуют 20 мин при температуре 115 °С. Затем ватные пробки заменяют стерильными резиновыми.

Допустимо использовать в анализе *упрощенную среду* следующего состава: МПБ — 1 л; лактат кальция — 6,5 г; агар — 20 г; 0,4%-ный водный раствор индикатора нейтрального красного — 1 мл; рН 5,7. Стерилизуют среду при 0,5 атм 20 мин.

Наличие спор анаэробных лактатсбраживающих бактерий определяют по разрывам агарового столбика вследствие выделения газа и по изменению красного цвета питательной среды на соломенно-желтый.

Наиболее вероятное число спор вычисляют по количеству пробирок, в которых они дали рост (табл. 7).

Результаты опытов, в которых количество пробирок с видимыми признаками роста маслянокислых бактерий при посевах 1, 0,1, 0,01 мл молока, составляет 002, 012, 021, 022, 102, 112, 122, 202, не могут быть использованы для расчета, так как в 95% случаев они вызваны несовершенной техникой приготовления разведений или присутствием антибактериальных веществ. При таких результатах исследование молока надо повторить.

Материалы и оборудование

Разные по качеству пробы молока, высокие пробирки, цилиндры, раствор метиленового синего (5 мл насыщенного раствора метиленового синего на 195 мл дистиллированной воды), редуктазник с водой, нагретой до 38—40 °С, пробирки со стерильной водопроводной водой по 9 мл в каждой, стерильные пипетки Мора на 1 мл, пробирки со средой Булира с поплавками, расплавленный МПА, агаризованная среда для анаэробных микроорганизмов, водяная баня, термометр, среда Булира в пробирках с поплавками, среда с лактатом.

15.2. Методы выделения чистых культур молочнокислых бактерий

15.2.1. Выделение чистой культуры ацидофильной палочки

Ацидофильная палочка — гомоферментативная молочнокислая бактерия, обитающая в кишечнике человека и животных. Оптимальная температура для ее развития — 37—40 °С, предель-

ная кислотность — 220 °Т (2,0%). Палочка устойчива к фенолу, образует антибиотические вещества. Кисломолочный продукт, приготовленный с использованием в качестве закваски ацидофильной палочки, применяют для лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний, особенно у молодняка крупного рогатого скота.

Для выделения ацидофильной палочки используют кал теленка. Из него готовят препарат, сушат его на воздухе, фиксируют на пламени и красят метиленовым синим 2—3 мин. Подсчитывают число клеток ацидофильной палочки в десяти полях зрения и находят среднее арифметическое.

В мазке обычно преобладают гнилостные кокковые формы, палочки, встречаются единичные клетки *Lactobacillus acidophilus* — тонкие палочки, варьирующие по размеру, иногда содержащие гранулы волютина (красятся метиленовым синим в красный цвет — явление *метахромазии*). Делают посев кала в стерильное молоко и инкубируют при 37—40 °С — температуре, оптимальной для развития *L. acidophilus*.

Из образовавшегося сгустка делают посев в стерильное молоко и снова инкубируют при 37—40 °С. Таких посевов можно сделать 3—4. Постепенно ацидофильная палочка, образуя молочную кислоту и имея оптимальные для развития условия, подавляет рост гнилостных бактерий, содержащихся в кале. Такую накопительную культуру ацидофильной палочки высевают на плотную питательную среду и из отдельной развившейся колонии выделяют чистую культуру.

Плотной питательной средой может служить агар с *гидролизованым обратом*, который готовят следующим образом. В бутылку с 1 л прокипяченного и охлажденного до 45 °С обрат добавляют разведенный в небольшом количестве теплой воды 1 г сухого порошка панкреатина и 5 мл хлороформа. Бутылку встряхивают, плотно закрывают корковой пробкой и выдерживают в термостате 3 сут при 40 °С. Ежедневно содержимое бутылки встряхивают, после чего открывают пробку для удаления паров хлороформа. Готовый раствор фильтруют и разбавляют в 4—5 раз водопроводной водой, доводят до рН 7—7,2 и стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

L. acidophilus образует мелкие колонии в глубине среды. Их просматривают под микроскопом с объективом 8×. Колонии имеют вид рыхлых тонковолокнистых скоплений неправильной формы, напоминающих кусочки ваты или мха. Иногда их называют паучками.

Из характерных колоний, расположенных изолированно от других, готовят фиксированный препарат и петлей делают посев в стерильный обрат.

Ацидофильная палочка образует в стерильном обрате однородный плотный сгусток. Газообразования в культурах не отмечается. Пересевы повторяют, выдерживая пробирки в термостате при 37—40 °С. Отбирают те из них, которые сбрасывают молоко не позже чем через 12—14 ч. В лаборатории чистые культуры необходимо пересевать каждые 7—10 дней и хранить при 10 °С.

С целью проверки свойств чистых культур *L. acidophilus* выделенные культуры используют в качестве закваски для приготовления ацидофильного молока. Для этого свежее молоко разливают по 100 мл в стерильные стаканы, пастеризуют на водяной бане при 75 °С в течение 10 мин. Затем молоко охлаждают до 40 °С и вносят закваску в количестве 5% (на 100 мл молока — 0,5—1 пробирка чистой культуры). Стаканы закрывают этикеткой с надписью, завязывают и ставят в термостат при 37 °С.

После сквашивания молока проводят его органолептическую оценку и определяют кислотность титрованием. Ацидофильная палочка образует в молоке однородный плотный тянувшийся сгусток казеиновой кислоты. Вкус — чистый, кисло-молочный с характерным металлическим привкусом.

15.2.2. Выделение чистой культуры молочнокислого лактококка

Lactococcus lactis — гомоферментативная молочнокислая бактерия, возбудитель естественного скисания молока в средних широтах нашей страны. Оптимальная температура его развития — 30—35 °С, предельная кислотность — 120 °Т. Для выделения молочнокислого лактококка в чистую культуру используют сметану, простоквашу.

Готовят препарат, размазывая сметану тонким слоем (без воды) на подогретом на пламени горелки предметном стекле. Мазок сушат на воздухе, фиксируют смесью спирта с эфиром, окрашивают метиленовым синим 2—3 мин. При микроскопировании препаратов с иммерсионной системой наблюдают соединенные попарно или в виде коротких цепочек клетки *L. lactis*. Если сметана несвежая, то встречаются клетки дрожжей, молочная плесень — *Geotrichum candidum*, спорообразую-

щие палочки. Сгусток сметаны петлей переносят в пробирку, содержащую 10 мл стерильной водопроводной воды. После перемешивания из этого разведения другой петлей берут суспензию и вносят ее в пробирку с расплавленным, но предварительно охлажденным до 50 °С МПА с 2% сахарозы или агаром с гидролизованным обратом.

Расплавленный агар с суспензией выливают в стерильную чашку Петри. Чашки с посевом инкубируют при 30 °С 2—3 сут.

При посеве суспензии из сметаны на агаровые среды выявляется преимущественно *Lactococcus lactis*, который образует поверхностные и глубинные колонии. Поверхностные колонии — мелкие, точкообразные, диаметром 1 мм, выпуклые, голубоватые, прозрачные, глубинные, имеют форму чечевицы. Колонии *L. lactis* просматривают под микроскопом (объектив 8×). Характерные колонии отмечают на чашке Петри стеклотрафом. Из них готовят препарат для микроскопирования, а затем петлей делают пересев в стерильный обрат в пробирках, которые ставят в термостат при 30 °С.

При органолептической оценке отмечают цвет, запах, вкус, консистенцию простокваши. *L. lactis* образует в молоке однородный плотный сгусток казеиновой кислоты. Сгусток ломкий, вкус «чистый» кисломолочный, кислый. Затем определяют кислотность путем титрования.

Материалы и оборудование

Стерильный обрат, МПА с 2% сахарозы, стерильные чашки Петри, водяная баня, треножник, стеклянные стаканы для заквашивания молока, ложки, колбы на 100 мл, пипетки на 5—10 мл, дистиллированная вода, фенолфталеин, 0,1 н. NaOH, бюретка для титрования, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

15.3. Микробиологический анализ других продуктов

15.3.1. Микробиологический анализ сыра

В основе сыроделия лежат сложные биохимические процессы, основная роль в которых принадлежит молочнокислому и пропионовокислому брожению. Большое влияние на качество готового продукта оказывает качество молока и прежде всего

степень обсемененности его нежелательными микроорганизмами.

Свертывание молока (коагуляцию казеина) проводят, заквашивая его молочнокислыми бактериями и вводя сычужный фермент. Такие сыры называются **сычужными**. Сыры, в созревании которых участвуют только молочнокислые бактерии, называют **кисломолочными**.

По степени разложения казеина сычужные сыры делят на **твердые** и **мягкие**. Твердые сыры, в свою очередь, делят на **крупные** (швейцарский, советский) и **мелкие** (голландский, костромской и др.).

Крупные сыры имеют более длительный период созревания (6—9 мес.), чем мелкие (1—2 мес.), в процессе их приготовления участвуют преимущественно молочнокислые палочки *Lactobacillus casei*, *L. helveticus*, в меньшей степени — молочнокислые лактококки *Lactococcus lactis* и ароматообразующие лактококки.

В закваску для крупных сыров наряду с молочнокислыми бактериями включают и пропионовокислые палочки. Стадия пропионовокислого брожения следует за стадией молочнокислого брожения и сопровождается накоплением летучих кислот — пропионовой, уксусной и диоксида углерода, образующихся при сбраживании лактатов. Выделение диоксида углерода обуславливает появление рисунка сыра — так называемых **глазков**. В мелких сырах глазки образуются в первые дни ферментации в процессе жизнедеятельности ароматообразующих лактококков.

Свойства сыра — вкус, аромат, консистенция, рисунок — формируются как результат сложных биохимических процессов, главная роль в которых принадлежит микроорганизмам, внесенным в сырную массу с закваской.

Наличие микроорганизмов в сыре может служить и причиной различных его пороков. Раннее вспучивание сыров вследствие образования большого количества газов (CO₂ и H₂) вызывают бактерии группы кишечной палочки в период, когда в сыре еще недоиспользована лактоза. Позднее вспучивание вызывают маслянокислые бактерии рода *Clostridium*, сбраживающие молочную кислоту в масляную с выделением CO₂ и H₂. Изъязвление корки сыра могут вызывать плесневые грибы.

При полном анализе сыра проводят количественное определение микроорганизмов методом посева на агаре с гидро-

лизованным молоком измельченной и растертой при подогреве до 45 °С пробы сыра.

При изучении микрофлоры сыра можно также использовать **метод отпечатков**, дающий возможность охарактеризовать естественное расположение микроорганизмов в сыре.

Этот метод заключается в следующем. Сначала у взятого для исследования свежего сыра фламбированным ножом срезают то место, где будет взята проба. Затем срезают тонкий кусочек сыра, кладут его между двумя сухими чистыми предметными стеклами и сдавливают ими. Затем стекла осторожно разъединяют и сыр удаляют. Полученный на стекле отпечаток сушат вдали от пламени, фиксируют смесью спирта с эфиром (1 : 1) и окрашивают метиленовым синим. При микроскопировании крупных сыров выявляются палочковидные формы молочнокислых и пропионовокислых бактерий, при микроскопировании мелких сыров — молочнокислые лактококки.

Материалы и оборудование

Свежий сыр (например, голландский), предметные стекла, метиленовый синий, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

15.3.2. Микробиологический анализ сливочного масла

Различают два основных типа сливочного масла: сладкосливочное и кислосливочное.

Сладкосливочное масло готовят из пастеризованных сливок, которые не заквашиваются. По технологии приготовления масла этого типа присутствие микрофлоры нежелательно: чем меньше микроорганизмов, тем лучше масло. Снижения численности микрофлоры достигают пастеризацией сливок с последующей упаковкой и хранением масла при низких температурах (–20 °С), а также надлежащим уходом за оборудованием. Загрязнение масла возможно из-за недоброкачественной воды, используемой для его промывания. В 1 мл свежего сладкосливочного масла содержится 50 000—100 000 клеток бактерий.

Технология **кислосливочного масла** основана на использовании молочнокислых бактерий для сквашивания сливок. После пастеризации в сливки вносят закваску, состав микрофлоры которой важен для повышения *прочности* (устойчивости при хранении) и аромата масла. В состав закваски входят *Lactococcus lactis*, *L. cremoris* и ароматобразующие бактерии:

L. diacetylactis, *L. citrovorus* и *L. paracitrovorus*. В 1 мл кислосливочного масла содержится от 1 до 10 млн бактерий.

Масло для учета численности микроорганизмов берут стерильным шупом из 2—3 мест по 10—15 г и помещают в стерильные банки с притертыми пробками. При исследовании на плесневые грибы делают соскобы с поверхности масла, особенно с тех мест, где простым глазом или в лупу виден мицелий гриба.

Перед исследованием пробу масла расплавляют в банке на водяной бане, нагретой до 40—50 °С. Из расплавленного масла после тщательного перемешивания стерильной пипеткой берут 1 мл и вносят в пробирку с 9 мл стерильной воды, подогретой до 40 °С. Из полученного таким образом разведения 10^{-1} готовят все последующие (10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5}). Из соответствующих разведений делают посев на элективные среды: для учета общего количества бактерий — на агар с гидролизованным молоком или МПА, для учета протеолитических бактерий — на молочный агар, молочнокислых бактерий — на агар с гидролизованным обратом и мелом, дрожжей — на сусло-агар со стрептомицином, для определения бродильного титра — на среду Кесслера.

Для микроскопического исследования берут кислосливочное свежее и несвежее масло. Его плавят в стеклянном стакане на водяной бане при температуре 40 °С, перемешивают, наливают в центрифужную пробирку и центрифугируют 10 мин. Верхний слой сливают, из осадка готовят препарат. Мазок прогревают на пламени горелки и обезжиривают, прикладывая к неостывшему мазку фильтровальную бумагу. Окрашивают метиленовым синим в течение 2—3 мин.

В свежем кислосливочном масле присутствуют молочнокислые лактококки, в несвежем масле — наряду с молочнокислыми бактериями встречаются дрожжи, плесневые грибы и гнилостные бактерии.

Материалы и оборудование

Образцы сливочного масла свежего и несвежего, водяная баня, банки с притертыми пробками, стерильные пипетки, стеклянные стаканы, составляющие элективных сред (МПА, агар с гидролизованным обратом и мелом, сусло-агар со стрептомицином, среда Кесслера), центрифуги, лупы, метиленовый синий, фильтровальная бумага, горелки, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

15.3.3. Микробиологический анализ мяса

Мясо здорового скота можно считать практически свободным от микроорганизмов. Мясо павших больных и переутомленных животных содержит аэробные и анаэробные микроорганизмы.

Бактерии, попавшие на поверхность мяса, постепенно проникают вглубь него. Скорость проникновения зависит от температуры окружающей среды и вида микроорганизмов. В мясо, охлажденное до 2—4 °С, бактерии проникают через 30 дней в среднем на глубину 1 см. Проникновению микроорганизмов препятствует образующаяся в результате подсыхания мяса корочка. При хорошей корочке туша может храниться при 0 °С около 8 недель.

После убоя скота происходят изменения в мышечной ткани, наступает период созревания мяса, характеризующийся сложными физико-химическими процессами. При распаде гликогена в мышечной ткани накапливается молочная кислота, а в результате распада АТФ — фосфорная кислота. Для завершения созревания мяса требуется обычно несколько дней.

Если мясо хранить при температурах, благоприятных для развития микроорганизмов, в нем начнутся микробиологические процессы. Преобладающей микрофлорой в гниющем мясе становятся гнилостные палочки. Примерно через 3—4 сут в глубине мяса начинают размножаться и анаэробы (*Clostridium perfringens*, *C. sporogenes* и др.). Даже в мясе клинически здоровых животных иногда обнаруживают болезнетворные микроорганизмы, которые вызывают мясные отравления (пищевые токсикоинфекции). Часть их содержится в кишечнике животных и в момент убоя.

В случае убоя животных, больных сибирской язвой, туберкулезом, бруцеллезом, рожей свиней и другими инфекционными заболеваниями, возбудители обязательно содержатся в мясе. Условия убоя, использование и выбраковка мяса больных животных регулируются особыми ветеринарными правилами.

По степени свежести мясо подразделяют на доброкачественное, мясо сомнительной свежести и мясо, непригодное в пищу.

Доброкачественное мясо имеет сухую корочку бледно-розового или бледно-красного цвета. На разрезе оно плотное, эластичное, ямка после надавливания быстро исчезает.

Несвежее мясо покрыто плотной темно-красной или ослизненной корочкой. Консистенция его мягкая, несколько дряблая, образующаяся при надавливании пальцем ямка не заполняется. Запах неприятный, гнилостный. Такое мясо используют только по указанию ветеринарно-санитарного надзора.

Если поверхность испорченного мяса ослизненная, липкая, на разрезе оно зеленого цвета, консистенция мяса дряблая, мажущаяся, жир слизистый, с прогорклым запахом, то его бракуют, это **непригодное в пищу** мясо.

Для анализа берут 2 сорта мяса: свежее и несвежее. На предметных стеклах делают по два *мазка-отпечатка*: один — с поверхностного, другой — из глубинного слоя каждого сорта. Для приготовления **препарата-отпечатка** из поверхностного слоя мяса стерильными ножницами вырезают кусочек (0,5—1 г) и прикладывают его срезанной стороной к поверхности обезжиренного, фламбированного предметного стекла. Чтобы приготовить препараты-отпечатки из глубоких слоев, поверхность мяса прижигают нагретым шпателем, стерильным ножом делают надрез и берут из глубины небольшой кусочек (0,5—1 г), который прикладывают к стеклу. Препараты подсушивают на воздухе, фиксируют смесью спирта с эфиром, окрашивают фуксином и микроскопируют, подсчитывая количество микроорганизмов в каждом поле зрения и отмечая их форму.

Препарат-отпечаток свежего мяса окрашивается обычно плохо. Если он получен из поверхностного слоя мяса, то в поле зрения встречаются единичные палочки и кокки. В препаратах из глубоких слоев микроорганизмы или отсутствуют, или встречаются не во всех полях зрения.

Препарат-отпечаток мяса сомнительной свежести окрашивается удовлетворительно. При просмотре в каждом поле зрения обнаруживается по несколько десятков микроорганизмов. Особенно много их в препарате из поверхностного слоя мяса.

Препарат-отпечаток мяса, непригодного в пищу, окрашивается хорошо. При просмотре препаратов как из по-

верхностных, так и из глубинных слоев мяса в поле зрения можно насчитать в среднем более 30 микроорганизмов.

При разложении мяса кокки в отпечатках почти отсутствуют и все поле зрения усеяно палочками. Среди гнилостных микроорганизмов преобладают микрококки, кишечная палочка, флуоресцирующие бактерии, споровые формы.

Из аэробных бактерий наиболее активно ведут гнилостный процесс *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, из факультативно-анаэробных — *Proteus vulgaris*, из анаэробных — *C. putrificus*, *C. sporogenes*.

Для выявления анаэробов поверхность мяса двух сортов (свежее и несвежее) прижигают нагретым шпателем, стерильным ножом делают надрез и берут из глубины по небольшому кусочку. Соблюдая правила асептики, опускают их в пробирки с расплавленным и предварительно охлажденным до 50 °С МПА. Вращая пробирки между ладонями, следят, чтобы кусочки мяса осели на дно пробирок.

Кроме того, один кусочек свежего мяса опускают в пробирку со стерильной водой и в течение 5 мин вращают ее между ладонями, затем стерильной пипеткой берут из нее суспензию и наносят каплю на поверхность МПА в 1-й чашке Петри. Шпателем Дригальского вблизи горелки втирают каплю досуха, а затем этим же шпателем проводят по поверхности среды 2-й и 3-й чашек Петри с МПА. Эти чашки с выросшими колониями бактерий потребуются для оценки их чувствительности к антибиотикам (см. 15.4).

Опытные пробирки с МПА, содержащие свежее и несвежее мясо, помещают в термостат при 40 °С. После инкубирования посевов в термостате в течение нескольких дней пробирки просматривают визуально.

Если мясо несвежее, на МПА развиваются газообразующие анаэробные формы и в среде обнаруживаются разрывы агара в результате выделения микроорганизмами газа.

В пробирках со свежим мясом столбик МПА будет плотным, не содержащим разрывов и трещин, так как газообразующие анаэробные формы в нем не развиваются.

Материалы и оборудование

Пробирки с МПА, стерильные пипетки, стерильные чашки Петри, мясо свежее и несвежее, водяная баня, ножи, скальпели, шпа-

тели Дригальского, пробирки со стерильной водой, фуксин, спирт с эфиром, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

15.4. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

Широкое использование антибиотиков, в частности биомицина, тетрациклина и других, в рационе животных, а также для лечения и профилактики болезней, привело к появлению форм микроорганизмов, резистентных (устойчивых) к различным антибиотикам, в том числе к пенициллину.

Для того чтобы определить наличие в свежем мясе резистентных к антибиотикам бактерий, используют **метод бумажных дисков**, пропитанных данными антибиотиками. Предпочтительнее использовать антибиотики тетрациклинового комплекса, широко применяемые при выпаивании телят и кормлении взрослых животных.

Метод основан на диффузии антибиотика из пропитанного антибиотиком диска фильтровальной бумаги в плотную питательную среду. Содержание большинства антибиотиков в дисках колеблется от 1 до 50 мкг. На практике пользуются стандартными дисками, выпускаемыми промышленностью (см. 6.2.7).

В стерильные предварительно подсушенные чашки Петри разливают по 20 мл МПА. На поверхность среды высевают суспензию суточной агаровой культуры микроорганизма. Градуированной пипеткой берут 0,02 мл этой суспензии (одна капля) и стерильным шпателем растирают досуха на питательной среде в чашке Петри у пламени горелки. Затем стерильным пинцетом раскладывают диски фильтровальной бумаги, пропитанные разными антибиотиками, — не менее 4—6 дисков.

Чашки выдерживают 30 мин при комнатной температуре (период преддиффузии препаратов в среду). Затем чашки помещают в термостат при 37 °С на 16—18 ч.

При оценке результатов опыта измеряют диаметр зон задержки роста микроорганизмов вокруг дисков с антибиотиками, включая диаметр самих дисков. Отсутствие зоны задержки роста микроорганизма означает, что испытуемый штамм устойчив к данному препарату. Зоны диаметром до 10 мм

указывают на малую чувствительность, зоны диаметром больше 10 мм — на чувствительность микроорганизма.

Результаты опыта записывают в следующую таблицу:

Антибиотик	Диаметр зоны задержки роста микроорганизма	Заключение
------------	--	------------

Материалы и оборудование

Стерильный МПА в колбах или пробирках, стерильные чашки Петри, диски, пропитанные антибиотиками, чистые культуры микроорганизмов, стерильные градуированные пипетки на 1 мл, стерильные шпатели, стерильная вода (по 5 мл) в пробирках.

15.5. Микробиологический контроль воды

15.5.1. Общие сведения

Степень микробного загрязнения воды важно учитывать в технологии пищевых производств. Вода, поступающая на производство, по качеству должна соответствовать санитарным нормам. Для контроля за санитарным состоянием такой воды регулярно проводят ее микробиологический анализ. Водопроводную воду исследуют не реже одного раза в месяц, артезианскую — не реже одного раза в год, воду открытых водоемов и колодцев — ежедневно.

Пробы воды для микробиологического исследования отбирают с соблюдением правил асептики (стерильности) в стерильную стеклянную посуду с притертыми или ватно-марлевыми пробками. Перед взятием пробы из водопроводного крана, трубы или колодца с насосом воду спускают в течение 5—10 мин, а края спускной трубы перед набором воды обжигают пламенем. Из открытых водоемов пробы воды отбирают при помощи специальных приборов — **батометров** — на расстоянии 10—15 см от дна. В проточных водоемах пробы отбирают около берега и в центре течения.

При обычном плановом санитарном контроле должно быть взято не менее 500 мл воды, для исследования на присутствие патогенных микроорганизмов — не менее 1 л. Пробы отбирают в часы наибольшего расходования воды на предприятии. Микробиологический анализ воды выполняют не позднее

2 ч с момента взятия пробы. В исключительных случаях допускается удлинение срока до 6 ч при обязательном хранении проб при низких положительных температурах (1—5 °С). При транспортировке в теплое время года пробы предохраняют от нагревания, а в зимнее время — от замораживания.

При санитарно-микробиологическом исследовании воды определяют микробное число и количество бактерий группы кишечной палочки (коли-титр).

15.5.2. Определение микробного числа

Микробное число — общая микробная загрязненность — определяется числом микробных колоний, которые вырастают на простой питательной среде (МПА) при 37 °С в течение 24 ч из посева 1 мл исследуемой пробы воды.

Данный показатель позволяет учитывать не все микроорганизмы, содержащиеся в 1 мл воды, а лишь способные расти на простых средах при указанной температуре (мезофильные, сапротрофные). Однако число сапротрофных микроорганизмов, вырастающих на МПА, обычно соответствует степени загрязненности воды органическими веществами и, таким образом, косвенно характеризует ее санитарное состояние.

Для определения микробного числа делают посева с соблюдением правил асептики в чашки Петри с МПА методом заливки с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 30 до 300 колоний. Поэтому из проб артезианской и водопроводной воды (содержащей обычно меньше микроорганизмов) высевают соответственно объемы в 1 мл и 0,1 мл из неразведенных проб. При исследовании воды открытых водоемов высевают по 1 мл из предварительно приготовленных в стерильной воде десятикратных разведений исследуемой пробы (10^{-1} — 10^{-3} и более, в зависимости от предполагаемого загрязнения).

Указанные выше объемы проб воды (1 мл, 0,1 мл) или ее разведений (по 1 мл каждого) вносят стерильной пипеткой в пустые стерильные чашки Петри, в которые затем наливают расплавленный теплый МПА (с температурой не выше 45—46 °С). Воду и МПА тщательно перемешивают и после застывания среды посева выращивают в термостате при 37 °С в течение 24 ч. Затем подсчитывают микробные колонии.

Общее число микробных колоний, выросших на всей чашке Петри, умножают на разведения, из которых был сделан

высев 1 мл (чтобы перевести на 1 мл исследуемой воды). Затем определяют среднее арифметическое число колоний — микробное число исследуемой пробы.

15.5.3. Определение коли-титра и коли-индекса

Кишечная палочка — самый многочисленный и постоянный обитатель толстого отдела кишечника человека и всех теплокровных животных. Она выделяется во внешнюю среду с фекальными массами, поэтому используется как индикатор фекального загрязнения внешней среды и косвенный показатель наличия в воде болезнетворных микробов — возбудителей кишечных инфекций человека, выделяемых с фекалиями в воду и другие объекты.

Таким образом, кишечная палочка служит *санитарно-показательным микроорганизмом воды*. Поскольку она не образует спор и гибнет при относительно щадящих методах обеззараживания, ее присутствие в консервированных продуктах или воде указывает на нарушение режима консервирования и на недостаточность обработки воды, так как если кишечная палочка сохранила жизнеспособность, значит, могли выжить и другие неспорообразующие бактерии, такие, как дизентерийная шигелла, брюшнотифозная сальмонелла и другие патогенные бактерии — возбудители желудочно-кишечных заболеваний.

Коли-индекс (индекс кишечной палочки) — это число кишечных палочек, обнаруженных в 1 л исследуемой воды (по международным стандартам — в 100 мл).

По существующим нормативам **коли-титр** питьевой воды не должен быть *менее 333 мл* (в Москве — не менее 500 мл), а **коли-индекс** — *не более 3* (см. 15.1.4.).

Коли-титр определяют **методами бродильных проб**. Данные методы основаны на способности кишечной палочки теплокровных животных и человека развиваться при повышенных температурах (43—44 °С) и сбраживать сахара (маннит, глюкозу и др.) с выделением газа. Существуют двух- и трехэтапные бродильные методы.

Трехэтапный бродильный метод заключается в следующем. На первом этапе ставят первую бродильную пробу: различные разведения исследуемой воды при помощи стерильных пипеток вносят в колбы и пробирки со специальными углеводными жидкими средами (среда Булира, среда Эйкмана, розоловая и др.) и поплавками.

В зависимости от предполагаемого микробного загрязнения водоисточника применяют разные схемы посева. Так, при исследовании водопроводной воды делают посевы в общем объеме 300 мл (2 объема по 100 мл и 10 объемов по 10 мл). Воду городов Москвы и Санкт-Петербурга засевают в объеме 500 мл (4 объема по 100 мл и 10 объемов по 10 мл). При исследовании воды открытых водоемов (речной, озерной и т. д.) необходимо посеять воду в общем объеме 111,1 мл (1 объем — 100 мл; 1 объем — 10 мл и по одному объему в 1 мл и 0,1 мл).

Соотношение между средой и засеваемой водой должно быть 1 : 2. Поэтому посевы малых количеств воды (1 мл, 0,1 мл) выполняют в пробирки с разведенной средой (обычной концентрации), а большие объемы воды (100 мл и 10 мл) — в концентрированную среду.

Посевы выращивают в термостате при 43—44 °С в течение 24 ч. При указанной температуре подавляется развитие микроорганизмов, не имеющих санитарно-показательного значения для воды. Затем просматривают посевы для выявления признаков роста кишечной палочки (наличие пузырьков газа в поплавках, изменение цвета, помутнение).

На втором этапе для подтверждения правильности обнаружения роста кишечной палочки в жидкой среде из посева с признаками роста при помощи бактериальной петли делают высев в чашки Петри со средой Эндо и выращивают культуру при 37 °С 24 ч.

Среда Эндо состоит из МПА, лактозы и обесцвеченного индикатора (фуксин обесцвечен сульфитом натрия). На данной среде бактерии группы кишечной палочки теплокровных животных образуют типичные темно-красные, ярко-красные или розовые колонии с темным центром, имеющие металлический блеск или без него. Столь характерный рост на среде Эндо этих бактерий обусловлен тем, что они активно сбраживают лактозу, продукты расщепления которой вызывают восстановление индикатора фуксина, окрашивающего колонии. При отсутствии характерного роста на пробу дают *отрицательный ответ*.

При наличии типичных колоний из них делают мазки, которые окрашивают по Граму и микроскопируют. Если в мазках обнаруживают мелкие неспорообразующие грамотрицательные палочки, то переходят к третьему этапу для окончательного подтверждения результатов исследования.

На третьем этапе из типичных колоний, в которых при микроскопировании обнаружены характерные микробные

клетки, делают пересев в разведенную жидкую углеводную среду (Булира, Эйкмана и др.). Посевы выращивают при 43—44 °С в течение 24 ч, после чего учитывают окончательно. При наличии в посевах помутнения, газообразования и изменения цвета дают *положительный ответ*, результаты которого выражают в виде коли-титра. При отсутствии газообразования дается *отрицательный ответ*, т. е. данные первой бродильной пробы подтверждаются.

Коли-индекс определяют **методом мембранных фильтров**. Для этой цели используют мембранные фильтры № 3 (ультра-фильтры) — пористые пленки, изготовленные из микроклетчатки (нитроцеллюлозы), с диаметром пор 0,7 мкм. Перед фильтрацией их подвергают стерилизации двойным кипячением в дистиллированной воде в течение 15—20 мин. Затем стерильным пинцетом фильтры помещают на предварительно профламбированную поверхность фильтровального прибора Зейтца. Через фильтр Зейтца проводят фильтрацию под вакуумом определенного количества исследуемой воды (через один мембранный фильтр — не более 100 мл воды).

По окончании фильтрации освобождают фильтровальную пластинку, частично разбирая прибор. При помощи стерильного пинцета фильтр кладут осадком вверх на поверхность среды Эндо, залитой в чашку Петри, плотно прижимая к среде. В одну чашку можно поместить 4—5 фильтров. После культивирования в термостате при 37 °С в течение 18—24 ч подсчитывают выросшие на фильтре колонии, характерные для группы кишечной палочки. Из 2—3 колоний, типично окрашенных и бесцветных, берут материал для мазков, окрашивают их по Граму и микроскопируют с иммерсионным объективом.

Если в мазках присутствуют мелкие грамтрицательные неспорообразующие палочки, из оставшейся части колонии делают пересев в пробирки с небольшим объемом жидкой углеводной среды (среда Булира или др.). Посевы выращивают при 43—44 °С в течение 24 ч. Наличие газообразования — последний показатель присутствия бактерий группы кишечной палочки.

Материалы и оборудование

Среда Булира в пробирках с поплавками, стерильные моровские пипетки на 1 мл, стерильные чашки Петри, среда Эндо агаризованная, простерилизованная вода в пробирках по 9 мл, образцы воды для исследования.

Список использованной и рекомендуемой литературы

- Большой практикум по микробиологии / Под ред. Г. Л. Селибера. М., 1962.
- Бабьева И. П., Агре Н. С. Практическое руководство по биологии почв. М., 1971.
- Воробейков Г. А. Микроорганизмы, урожай и биологизация земледелия. СПб., 1998.
- Добровольская Т. Т. Структура бактериальных сообществ почв. М., 2002.
- Емцев В. Т., Мишустин Е. Н. Микробиология. М., 1994.
- Емцев В. Т., Шильникова В. К. Микробиология. М., 1990.
- Емцев В. Т., Переверзева Г. И., Храмцов В. В. Микробиология, гигиена, санитария в животноводстве. М., 1985.
- Заварзин Г. А., Колотилова Н. Н. Введение в природоведческую микробиологию. М., 2001.
- Звягинцев Д. Г. Почва и микроорганизмы. М., 1987.
- Зенова Г. М., Степанов А. Л., Лихачева А. А. и др. Практикум по биологии почв. М., 2002.
- Методы изучения микроорганизмов и их метаболитов / Под ред. Н. А. Красильникова. М., 1966.
- Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д. Г. Звягинцева. М., 1992.
- Мишустин Е. Н., Шильникова В. К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. М., 1973.
- Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. 9-е изд. в 2-х томах. М., 1997.
- Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н. С. Егорова. 3-е изд. М., 1995.
- Скворцова И. Н. Методы идентификации и выделения почвенных бактерий. М., 1981.
- Теппер Е. З. Микроорганизмы рода *Nocardia* и разложение гумуса. М., 1976.
- Теппер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по микробиологии. М., 1994.
- Федоров М. В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М., 1957.
- Хотянович А. В. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применения препаратов на их основе. Л., 1991.
- Шильникова В. К., Серова Е. Я. Микроорганизмы — азотоаккумуляторы на службе растений. М., 1983.

Предисловие	3
Правила по технике безопасности при работе в микробиологической лаборатории	5

Раздел I ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Глава 1 Микроскопия

1.1. Светлопольная микроскопия	6
1.1.1. Устройство микроскопа	6
1.1.2. Основные технические характеристики микроскопа ..	14
1.1.3. Работа с микроскопом	16
1.2. Микроскопия в темном поле	19
1.3. Микроскопия с фазово-контрастным устройством	20
1.4. Люминесцентная, или флуоресцентная, микроскопия	21
1.5. Электронная микроскопия	22
1.5.1. Трансмиссионный электронный микроскоп	23
1.5.2. Сканирующий, или растровый, электронный микроскоп	23

Глава 2 Работа с микроорганизмами

2.1. Культивирование микроорганизмов	24
2.1.1. Терминология	24
2.1.2. Техника посева	27
2.1.3. Хранение микроорганизмов	28
2.2. Методы приготовления препаратов микроорганизмов	28
2.2.1. Техника взятия культуры для приготовления препарата	28
2.2.2. Исследование живых клеток микроорганизмов методами раздавленной и висячей капли	29
2.2.3. Фиксированные препараты микроорганизмов	30

Глава 3 Исследование морфологии микроорганизмов

3.1. Форма клеток	33
3.1.1. Бактерии	33
3.1.2. Актиномицеты	37
3.1.3. Нокардии	39
3.1.4. Микобактерии	39

3.1.5. Грибы	40
3.2. Цитохимические методы исследования микроорганизмов	47
3.2.1. Окраска клеток микроорганизмов по Граму	47
3.2.2. Выявление кислотоустойчивости бактерий методом Циля—Нильсена	49
3.2.3. Окраска спор у бактерий	50
3.2.4. Окраска капсул	52
3.2.5. Окраска жгутиков	53
3.2.6. Окраска генома бактерий	55
3.2.7. Окраска включений клеток микроорганизмов	56

Глава 4 Питание микроорганизмов

4.1. Значение отдельных элементов питания (на примере <i>Aspergillus niger</i>)	59
4.2. Питательные среды	63
4.2.1. Разнообразие питательных сред	63
4.2.2. Приготовление питательных сред	66
4.3. Методы стерилизации	69
4.3.1. Фламбирование, или прокаливание	70
4.3.2. Стерилизация сухим жаром	70
4.3.3. Стерилизация текучим паром	70
4.3.4. Стерилизация насыщенным паром под давлением	71
4.3.5. Пастеризация	73
4.3.6. Холодная стерилизация — фильтрование через мелкопористые фильтры	73

Глава 5 Учет численности и выделение чистой культуры микроорганизмов

5.1. Методы учета численности микроорганизмов	74
5.1.1. Учет численности микроорганизмов (КОЕ) в почве методом питательных пластин в сочетании с методом последовательных разведений	74
5.1.2. Учет численности КОЕ в воде и других жидкостях	77
5.1.3. Учет численности КОЕ в воздухе	78
5.2. Выделение чистой культуры бактерий	79

Глава 6 Идентификация микроорганизмов

6.1. Морфологические и культуральные признаки микроорганизмов	81
6.1.1. Морфологические признаки	81
6.1.2. Культуральные признаки	82

6.1.3. Определение качественного состава микроорганизмов по культуральным и морфологическим признакам	84
6.2. Физиолого-биохимические признаки микроорганизмов	88
6.2.1. Общие сведения	88
6.2.2. Отношение к источникам углерода и азота	89
6.2.3. Изучение продуктов жизнедеятельности	90
6.2.4. Отношение к кислотам и щелочам	91
6.2.5. Отношение к кислороду	91
6.2.6. Устойчивость к факторам внешней среды	91
6.2.7. Чувствительность к антибиотикам и лизоциму	92

Глава 7 Превращение микроорганизмами безазотистых органических веществ

7.1. Брожение	93
7.1.1. Общие сведения	93
7.1.2. Спиртовое брожение	94
7.1.3. Молочнокислородное брожение	99
7.1.4. Маслянокислородное брожение	105
7.1.5. Брожение пектиновых веществ	108
7.1.6. Брожение целлюлозы	110
7.2. Окисление	112
7.2.1. Окисление целлюлозы	112
7.2.2. Окисление жиров	115
7.2.3. Окисление углеводов	117
7.2.4. Окисление углеводов чистой культурой микроорганизмов (по Макклангу)	117

Глава 8 Превращение микроорганизмами органических и минеральных соединений азота

8.1. Минерализация азотсодержащих органических соединений	119
8.1.1. Аммонификация белковых веществ	119
8.1.2. Аммонификация мочевины	121
8.2. Нитрификация	122
8.2.1. Выявление нитрифицирующих бактерий на плотных средах	122
8.2.2. Выявление нитрифицирующих бактерий на жидких средах	126
8.3. Денитрификация (нитратное дыхание)	128
8.3.1. Моделирование процесса денитрификации в лабораторных условиях	128
8.4. Азотфиксация	130

8.4.1. Общие сведения	130
8.4.2. Симбиотические азотфиксаторы	131
8.4.3. Свободноживущие азотфиксирующие бактерии	133
8.4.4. Ассоциативные бактерии	137

Глава 9 Роль бактерий в превращении соединений серы, железа и фосфора

9.1. Трансформация соединений серы бактериями	141
9.1.1. Окисление сероводорода	141
9.1.2. Восстановление сульфатов (десульфификация, сульфатредукция, сульфидогенез)	143
9.2. Участие бактерий в превращении железа	144
9.2.1. Восстановление окисного железа в закисное	145
9.2.2. Окисление закисного железа в окисное	145
9.2.3. Окисление органических соединений железа	146
9.3. Превращение бактериями соединений фосфора	146
9.3.1. Превращение органических соединений фосфора	147
9.3.2. Мобилизация доступных форм фосфора из нерастворимых солей фосфорной кислоты	147

Раздел II ПОЧВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Глава 10 Общий микробиологический анализ почвы

10.1. Подготовка материала для анализа	149
10.1.1. Взятие средней почвенной пробы и подготовка образца	149
10.1.2. Приготовление почвенной суспензии и посев	150
10.2. Состав и приготовление питательных сред для разных групп микроорганизмов	152
10.2.1. Группы микроорганизмов, выявляемые на плотных средах	152
10.2.2. Группы микроорганизмов, выявляемые на жидких средах (метод предельных разведений)	155
10.2.3. Группы микроорганизмов, выявляемые методом обрастания комочков почвы	155
10.3. Определение численности различных групп микроорганизмов	156
10.3.1. Учет на плотных средах	156
10.3.2. Учет на жидких средах	160
10.3.3. Учет методом обрастания комочков почвы	164
10.3.4. Определение общей численности микроорганизмов в почве методом прямого счета под микроскопом	165

Глава 11 Изучение почвенных и ризосферных микробоценозов

11.1. Состав и соотношение почвенных микроорганизмов	169
11.1.1. Метод обрастания стекол по Холодному	169
11.2. Микроорганизмы, разлагающие гумусовые вещества	170
11.2.1. Метод Виноградского	170
11.2.2. Метод Виноградского в модификации Теппер	170
11.3. Микробные ценозы, участвующие в разложении различных органических и неорганических остатков в почве	172
11.3.1. Разложение микроорганизмами свежих органических остатков с образованием гумуса	172
11.3.2. Изучение микробных ценозов, участвующих в разложении гербицидов — производных сим-триазинов в почве	175
11.3.3. Микробные пейзажи при нитрификации, разложении гумусовых кислот и деструкции симазина и атразина (метод Теппер)	176
11.4. Микроорганизмы, обитающие в ризосфере и ризоплане растений	177
11.4.1. Общие сведения	177
11.4.2. Учет бактерий в ризосфере методом Красильникова	178
11.4.3. Учет ризосферной и корневой микрофлоры методом последовательных отмываний корней (по Теппер)	178

Глава 12 Биологическая активность почвы

12.1. Общая биологическая активность почвы	180
12.1.1. Определение общей биологической активности почвы по методу Мишустина, Вострова и Петровой (по интенсивности разложения полотна)	180
12.1.2. Метод определения общей микробиологической активности почвы по выделению диоксида углерода	181
12.2. Аммонифицирующая активность почвы и микроорганизмов	182
12.2.1. Определение аммонифицирующей активности почвы	182
12.2.2. Определение аммонифицирующей активности микроорганизмов	183
12.3. Нитрифицирующая и денитрифицирующая активность почвы	184
12.3.1. Определение нитрифицирующей активности почвы	184

12.3.2. Определение денитрифицирующей активности почвы	185
12.3.3. Определение денитрифицирующей активности и смены процессов в замкнутой системе почва — атмосфера путем применения ацетилена по методу Федоровой	185
12.4. Азотфиксирующая активность микроорганизмов	187
12.4.1. Определение азотфиксирующей активности ацетиленовым методом	187
12.4.2. Определение актуальной (полевой) и потенциальной активности азотфиксации в почве методом Умарова	190
12.4.3. Определение нитрогеназной активности симбиотических азотфиксирующих бактерий	192
12.4.4. Работа на газовом хроматографе	193
12.5. Выделение и изучение чистых культур клубеньковых бактерий	195
12.5.1. Выделение чистой культуры клубеньковых бактерий	195
12.5.2. Определение специфичности клубеньковых бактерий. Отбор активных (эффективных) культур клубеньковых бактерий	199
12.5.3. Определение общего и активного симбиотических потенциалов и удельной активности симбиоза по методу Посыпанова	203
12.5.4. Определение вирулентности и конкурентоспособности клубеньковых бактерий	205

Глава 13 Анализ бактериальных препаратов

13.1. Определение жизнеспособности клеток клубеньковых бактерий	209
13.1.1. Экспресс-метод определения жизнеспособности клеток клубеньковых бактерий в сухом нитрагине по Шильниковой, Сигуте	209
13.1.2. Экспресс-метод определения количества жизнеспособных клеток клубеньковых бактерий в ризоторфине на мембранных фильтрах по Шильниковой, Сигуте	211
13.2. Определение числа клеток азотобактера в азотобактерине	213

Глава 14 Микробиология кормов

14.1. Эпифитные микроорганизмы зерна	215
14.1.1. Общие сведения	215
14.1.2. Количественный учет КОЕ на зерне	216
14.1.3. Определение качественного состава микроорганизмов зерна	217

14.2.	Микробиологический анализ силоса	218
14.2.1.	Общие сведения	218
14.2.2.	Исследование качественного состава микрофлоры силоса	220
14.2.3.	Количественный учет микроорганизмов в силосе	220
14.2.4.	Определение кислотности силоса	223

Глава 15 Микробиология продуктов животноводства

15.1.	Бактериологический анализ молока	226
15.1.1.	Общие сведения	226
15.1.2.	Проба на редуктазу	227
15.1.3.	Определение общего количества бактерий в молоке	229
15.1.4.	Определение титра кишечной палочки <i>Escherichia coli</i> (коли-титра, титра коли)	229
15.1.5.	Определение в молоке количества спор лактатсбраживающих анаэробных бактерий	231
15.2.	Методы выделения чистых культур молочнокислых бактерий	233
15.2.1.	Выделение чистой культуры ацидофильной палочки	233
15.2.2.	Выделение чистой культуры молочнокислого лактококка	235
15.3.	Микробиологический анализ других продуктов	236
15.3.1.	Микробиологический анализ сыра	236
15.3.2.	Микробиологический анализ сливочного масла	238
15.3.3.	Микробиологический анализ мяса	240
15.4.	Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам	243
15.5.	Микробиологический контроль воды	244
15.5.1.	Общие сведения	244
15.5.2.	Определение микробного числа	245
15.5.3.	Определение коли-титра и коли-индекса	246
	Список использованной и рекомендуемой литературы	249

Высшее образование



80000000 133066

Практикум – первая книга
комплекта по микробиологии,
результат более чем тридцатилетней
педагогической деятельности авторов –
преподавателей
Московской сельскохозяйственной
академии им. К. А. Тимирязева.

Пособие

поможет студентам в лабораторных условиях
воспроизвести микробиологические процессы,
наблюдаемые в природе.

Каждая лабораторная работа –
небольшое научное исследование.
Она включает краткое обоснование цели,
перечень материалов и оборудования
для проведения эксперимента,
а также методику его постановки и анализ
полученных результатов.

ISBN 5-7107-7437-5



9 785710 774373



ДРОФА