

УЧЕБНИКИ И УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ ДЛЯ ВЫСШИХ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ

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

■

ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

■

Издание второе,
переработанное и дополненное

Допущено Главным управлением высшего
и среднего сельскохозяйственного образо-
вания МСХ СССР в качестве учебного по-
собия для агрономических специальностей
сельскохозяйственных вузов



МОСКВА «КОЛОС» 1979

57А
Т34
УДК 576.8+631.461] (076.5)

Теппер Е. З. и др.

Т 34 Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. — Изд. 2-е, перераб. и доп. — М.: Колос, 1979. — 216 с., ил. — (Учебники и учеб. пособия для высш. с.-х. учеб. заведений).

В пособии дано описание техники микроскопирования, культивирования и исследования микробной клетки, методов приготовления и стерилизации питательных сред, количественного учета микроорганизмов в различных субстратах; содержатся сведения о микробиологии кормов и методах их анализа.

Т 0306—161
035(01)—79 178—79. 3802010000

57А+630.6

© Издательство «Колос», 1979.

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Глава I

МИКРОСКОП И ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРОВАНИЯ

Для изучения клеток микроорганизмов, не видимых невооруженным глазом, применяют специальные оптические приборы — микроскопы (греч. *micro* — малый, *scopos* — смотрю), обеспечивающие увеличение исследуемых объектов в сотни (световые микроскопы) и десятки тысяч (электронные микроскопы) раз.

С помощью светового микроскопа в микробиологии изучают морфологию и строение клеток микроорганизмов, их рост и развитие, проводят первичную идентификацию (лат. *identitas* — отождествление) исследуемых организмов, ведут наблюдения за характером развития микробных ценозов (сообществ) в почве и других субстратах.

Существует несколько моделей световых микроскопов, среди которых наиболее распространены МБИ-1, МБР-1, МБР-1А.

С помощью электронного микроскопа в микробиологии исследуют субмикроскопическое (лат. *sub* — внутрь, *super* — вверх) строение клеток микроорганизмов, выявляют неизвестные ранее своеобразные формы мельчайших микроорганизмов, ведут их учет.

1. СВЕТООПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ

Устройство микроскопа

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

К механической части относятся штатив, предметный столик, тубус (труба).

Штатив состоит из основания и колонки (тубусодержателя). Основание сделано в виде подковы для устойчивости микроскопа. Колонка имеет форму дуги, что создает удобство для перестановки микроскопа.

К штативу примыкает коробка механизмов, система зубчатых колес для регуляции движения тубуса. Система приводится в действие вращением макрометрического и микрометрического винтов.

Макрометрический винт (кремальера, зубчатка, макровинт) служит для предварительной ориентировочной установки изображения рассматриваемого объекта на фокус.

Микрометрический винт (микровинт) используется для последующей, более четкой установки на фокус. При полном повороте микрометрического винта 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 — от препарата.

Предметный столик служит для помещения 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. На столике вмонтированы два зажима (железны) — пружинящие металлические пластинки, предназначенные для закрепления препарата.

Если необходимо исследовать поверхность препарата, не допуская пропусков (что важно при подсчете), или если во время работы требуется повторное наблюдение какого-либо определенного участка на препарате, на предметный столик помещают препарат в одитель. На нем имеется система линеек — нониусов, с помощью которых можно заординировать любую точку исследуемого объекта. Для этого следует при установке препаратопроводителя совместить центр вращения столика и оптическую ось системы микроскопа с центрировочной пластинкой препаратопроводителя по кресту (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 в отношении друг друга.

Осветительная система предназначена для наилучшего освещения препарата. Под конденсором у основания микроскопа расположены два зеркала — с плоской и вогнутой поверхностью, сложенные тыльными сторонами и заключенные в одну кольцевидную оправу, закрепленную в полукруглой вилке. С ее помощью зеркала перемещаются в любом направлении. Это дает возможность регулировать подачу света на объект.

При работе с объективами, требующими применения конденсора, следует пользоваться зеркалом с плоской поверхностью. При работе с низкоапертурными объективами с большими полями зрения рекомендуется использовать зеркало с вогнутой поверхностью. Его же применяют и в случае отсутствия конденсора.

Конденсор (лат. *condenso* — уплотняю, сгущаю) представляет собой оптическую систему из 2—3 короткофокусных линз. Конденсор концентрирует лучи, идущие от плоского зеркала, и направляет их под большим углом на объект. Линзы конденсора вмонтированы в цилиндрическую оправу, соединяющуюся с зубчатым механизмом, позволяющим перемещать конденсор вверх и вниз вдоль оси микроскопа специальным винтом.

Верхняя фокальная плоскость конденсора должна лежать в плоскости объекта (при работе с иммерсионными объективами, стр. 7—9).

Для регулировки интенсивности освещения конденсор снабжен ирисовой (лепестковой) диафрагмой, состоящей из тонких непрозрачных серповидных пластинок. При передвижении рычага диафрагмы, расположенного в нижней части оправы конденсора, пластинки одновременно вращаются и плавно меняют диаметр действующего отверстия.

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.

У многих современных видов микроскопов конденсор и источник света вмонтированы в микроскоп.

Объективы (греч. *objectum* — предмет исследования) являются наиболее важной частью микроскопа. Это многолинзовые короткофокусные системы, от качества которых зависит в основном изображение объекта. При внешнем осмотре объектива видна только линза, обращенная к препарату, — фронтальная линза. Ее наружная поверхность обычно плоская.

Объектив дает действительное увеличенное и обратное изображение предмета.

Как и всяким другим линзам, линзам объективов свойственны дефекты сферической и хроматической аберрации. Сферическая аберрация связана 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, рассматриваемой через оптическую систему, распределяется в пространстве между местами пересечения краевых и центральных лучей и приобретает вид расплывчатого пятна.

Явление хроматической аберрации возникает при прохождении через линзу пучка лучей с различной длиной волны. Преломляясь 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. Для устранения дефектов сферической и хроматической аберрации применяют коррекционные (исправляющие) объективы: ахроматы, апохроматы, планахроматы. Апохроматы используют для изучения окрашенных объектов.

Ахроматы устраняют практически полностью дефект сферической и частично хроматической аберрации. Они хорошо скоррегированы для первичного спектра (в частности, для желто-зеленой части спектра), но не устраняют вторичного спектра. Изображение, получаемое с помощью ахроматов, не окрашено, но края 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, исправленные в отношении хроматической аберрации и для вторичного спектра, называются апохроматами. Линзы их 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 одновременном использовании компенсационных окуляров, возмещающих оптические недостатки объективов. В компенсационных окулярах хроматическая ошибка обратна хроматической ошибке объектива, и в результате хроматическая аберрация микроскопа оказывается почти полностью скомпенсированной.

Планахроматы — разновидность апохроматов с плоским полем зрения. Объективы-планахроматы полностью устраняют искривление поля зрения, которое определяет неравномерность фокусировки объекта (при кривизне поля зрения фокусируется только часть поля). Планахроматы и планапохроматы используются при микрофотографии.

Объективы бывают сухие и погружные (иммерсионные). При работе с сухими объективами между фронтальной линзой объектива и объектом исследования находится воздух. В случае использования иммерсионных объективов между фронтальной линзой объектива и объектом исследования должна находиться жидкость. Оптический расчет иммерсионных объективов предусматривает их работу при погружении в жидкую однородную среду.

Рассмотрим, какие жидкости могут удовлетворять требованиям иммерсионной среды. Объект обычно заключен между предметным и покровным стеклом. Если между покровным стеклом и линзами объектива находится воздух, световые лучи, переходя из более плотной среды в менее плотную, преломляются (рис. 1).

Если между покровным стеклом и линзами объектива поместить кедровое масло*, показатель преломления

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

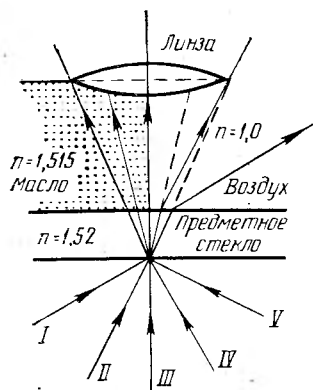


Рис. 1. Ход лучей в сухой и иммерсионной системах:
I—V — лучи света.

которого близок к показателю преломления стекла, то преломления световых лучей не произойдет. Лучи, по существу, остаются в оптически однородной гомогенной среде и не меняют своего направления.

Иммерсионные объективы в отличие от сухих на оправе имеют черную круговую нарезку. Кроме того, выгравированы обозначения: *I* — immersion (иммерсия), *HI* — homogen immersion (однородная иммерсия), *OI* — oil immersion (масляная иммерсия), *MI* — масляная иммерсия.

Объективы различают по их увеличению.

Собственное увеличение объективов определяют по формуле

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

где l — оптическая длина тубуса или расстояние между фокальной плоскостью объектива и плоскостью изображения. Для разных объективов оно колеблется в диапазоне 128—180 мм;

f — фокусное расстояние объектива. Слабые объективы имеют фокусное расстояние 50—60 мм, сильные — до 1,3 мм, т. е. чем больше фокусное расстояние, тем меньше увеличение объектива.

Увеличение объективов наносят на их оправу.

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. В зависимости от этого в процессе работы необходимо строго следить, каким винтом (макрометрическим или микрометрическим) следует пользоваться при фокусировке объектива. Так, объективы с увеличением 8×, 40× и 90× имеют соответственно рабочие расстояния 13,8; 0,6 и 0,12 мм. Иммерсионный объектив имеет рабочее расстояние до объектива 0,12 мм, поэтому его нередко

называют «близоруким». У объективов малых увеличений не только большие рабочие расстояния, но и большие поля зрения. В связи с этим рекомендуется исследование препарата начинать с небольшого увеличения.

Средняя толщина покровных стекол в большинстве случаев 0,16—0,18 мм. На оправе объективов она указана в виде цифры 0,17. Если приходится работать с покровными стеклами, у которых толщина больше или меньше этих значений, лучше использовать объектив с коррекционной оправой, позволяющей исправлять сферическую aberrацию, вызываемую покровным стеклом.

Одна из важных характеристик объективов — их разрешающая способность, определяющая в конечном итоге разрешающую способность микроскопа в целом.

Разрешающая способность определяет то наименьшее расстояние между двумя точками, в котором просматриваются какие-либо детали. Иными словами, физический смысл разрешающей способности любого оптического прибора, в частности объектива, заключается в характеристике той наименьшей детали, которая хорошо различается с его помощью. Разрешающая способность объектива зависит от его числовой апертуры и длины волны света, при которой ведется наблюдение объекта.

Математически такая зависимость выражается формулой

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

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

При определении разрешающей способности микроскопа следует различать два случая: освещение прямое (лучи падают параллельно оптической оси микроскопа) и 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 (например, для более коротких, чем видимые лучи, — ультрафиолетовых — оно равно 350 нм), а значение A — максимальное (как в наиболее совершенных иммерсионных системах — 1,4—1,6). В этом случае разрешающая способность объектива будет наибольшей по физическому смыслу и наименьшей по абсолютной величине.

Для условий работы наших микроскопов величина λ постоянна, так как объекты исследуются при обычном свете ($\lambda=0,55$ мкм). Следовательно, предел разрешающей способности зависит исключительно от возможности повышения числовой апертуры A .

Числовая (численная, или нумерическая) апертура объектива характеризует светособирательную способность его и определяется по формуле

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

где n — показатель преломления светового луча, проходящего через предметное стекло в среду, находящуюся между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом;

$\frac{\sin \alpha}{2}$ — половинный угол входного отверстия объектива (угол, одна сторона которого совпадает с оптической осью, другая образована линией, соединяющей точку выхода эффективных лучей из объектива с границей действующего отверстия объектива).

Важно, чтобы величина n была максимальной. Повысить её можно введением в промежуток между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом среды с n , близким к n стекла. Это достигается на практике использованием иммерсионных объективов с введением кедрового масла (n в этом случае равно 1). Дальнейшего повышения n можно достичь введением среды с n , более высоким, чем у стекла.

Важно также, чтобы величина $\sin \frac{\alpha}{2}$ была максимальной. Чем больше $\sin \frac{\alpha}{2}$, тем выше числовая апертура и разрешающая способность объектива. Предел повышения $\sin \frac{\alpha}{2}$ зависит от степени кривизны фронтальной линзы (это учитывается при изготовлении

иммерсионных объективов) и числовой апертуры конденсора. Высокоапертурные объективы необходимо применять в работе одновременно с высокоапертурным конденсором. Если апертура конденсора меньше апертуры объектива, то возможности его оказываются не полностью использованными.

Следует помнить, что повысить величину $\sin \frac{\alpha}{2}$ при использовании иммерсионных объективов можно максимальным поднятием конденсора. Это определяется светособирающей функцией конденсора. Поскольку линзы его короткофокусные, световые лучи фокусируются конденсором на близком от него расстоянии (предусматривается фокусировка в плоскости объекта). Если же конденсор будет опущен, его функция будет, по существу, нарушена.

Окуляр является как бы непосредственным продолжением «линз» человеческого глаза*. Его тесная связь с глазом человека отражена в названии (okulus — по-гречески глаз). 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. Глазная линза, подобно простой лупе, увеличивает действительное изображение, даваемое объективом.

Назначение окуляра состоит в прямом мнимом увеличении того действительного обратного и увеличенного изображения, которое дает объектив.

Увеличение окуляра наносят на оправу. Рабочее увеличение окуляров колеблется в пределах от 4 до 15 \times . Вычисляют собственное увеличение окуляра по формуле, применяемой для определения увеличения луп:

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

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

* Преломляющая система глаза может рассматриваться как двояковыпуклая линза со средним фокусным расстоянием 15 см (расстояние наилучшего зрения 25 см).

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 плоско-выпуклых линз, обращенных выпуклой стороной к объективу. Линза поля зрения (нижняя) 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 1,5X) 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.

Основные технические характеристики микроскопа. Качество микроскопа определяется его увеличительной и разрешающей способностями.

Увеличительная способность микроскопа. Коэффициент увеличения микроскопа определяется произведением увеличения окуляра K и увеличения объектива V и выражается формулой

$$D = KV.$$

Теоретически микроскоп может дать увеличение 2000X и более раз. Однако следует различать полезное и бесполезное увеличения микроскопа. Пределы полезного увеличения в обычно используемых микроскопах достигают 1400X. При превышении границ полезного увеличения возникают дифракция и другие явления, обусловленные волновой природой света, которые 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 40X, имеющего числовую апертуру 0,65, полезное увеличение составляет 325—650X. С помощью этого увеличения можно различить все структуры, разрешаемые данным объективом. Поэтому для объектива 40X следует брать окуляр 15X, чтобы получить общее увеличение в пределах полезного. Какие бы более сильные окуляры ни применялись, более тонких деталей структур выявить не удастся. Хуже того, повышение увеличения окуляра приведет к уменьшению количества света, попадающего в глаз наблюдателя, и к возрастанию искажений, вызываемых дефектами зрения.

Если объектив имеет увеличение 90X (числовая апертура 1,25), то полезное увеличение для него равно 1250X. Следовательно, и здесь не надо применять окуляры с увеличениями более 15X, чтобы не выходить за пределы полезного увеличения.

Бесполезные увеличения могут принести пользу лишь при подсчете мельчайших частиц в поле зрения, если при этом не требуется рассмотрения их структуры.

Разрешающая способность микроскопа. Эта характеристика микроскопа 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. Она вычисляется по формуле: $d = \frac{\lambda}{2A}$. Физический и математический смысл этого свойства мы обсуждали ранее (стр. 9). Максимальная разрешающая способность светового микроскопа 0,2 мкм.

Пример — расчет разрешающей способности микроскопов
Если увеличение объектива $V=40X$, $A=0,65$, то

$$d = \frac{0,55 \text{ мкм}}{2 \cdot 0,65} = 0,42 \text{ мкм.}$$

Если V объектива $=90X$, $A=1,25$, то

$$d = \frac{0,55 \text{ мкм}}{2 \cdot 1,25} = 0,22 \text{ мкм.}$$

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

Основные правила работы с микроскопом (общие замечания). Место для микроскопа выбирается подале от прямого солнечного света. Работа на столе с темной поверхностью способствует меньшему утомлению глаз.

Рекомендуется смотреть в окуляр левым глазом, не закрывая правого. В случае работы с бинокулярной насадкой сначала регулируется 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 держат штатив, другой — основание микроскопа. Следует предохранять микроскоп от толчков, соприкосновения с сильнодействующими веществами типа кислот, щелочей. Не рекомендуется вынимать окуляр из трубы, чтобы не загрязнять пылью трубу и объективы. Во время работы желательно защищать микроскоп от дыхания, так как конденсация паров ведет к его порче.

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

Надо наносить каплю иммерсионной жидкости (кедрового масла) на препарат, не размазывая ее по стеклу. Погружать в иммерсионную жидкость можно только иммерсионные объективы (не сухие!). За погружением фронтальной линзы в иммерсионную жидкость следует наблюдать сбоку.

После ориентировочной установки на фокус макрометрическим винтом в процессе работы необходимо всегда пользоваться микрометрическим винтом.

Иммерсионную жидкость (кедровое масло) рекомендуется хранить в специальных масленках, состоящих из флаконов, герметически вставленных один в другой. В наружный флакон наливают ксилол или очищенный бензин для очистки объективов от масла (по окончании работы), во внутренний — кедровое масло. Флакон с маслом закрывается герметически входящей длинной (до дна флакона) стеклянной палочкой, которой наносят каплю масла на препарат.

Установка освещения. Удобнее пользоваться искусственным источником света — он более постоянен, чем

дневной, и лучше освещает объект, что важно при работе с сильными объективами ($90\times$).

Освещение препарата по Келеру осуществляется с помощью осветителей.

1. Осветитель (с низковольтной лампочкой) устанавливают на расстоянии 25—30 см от микроскопа с помощью соединительной планки (крестовины). Полевая диафрагма осветителя открыта. У микроскопа используют объектив $8\times$, зеркало с плоской поверхностью; конденсор поднят.

2. Препарат в поле зрения микроскопа фокусируют при открытых диафрагмах осветителя и конденсора.

3. Полевую диафрагму осветителя закрывают. К зеркалу микроскопа подносят белый лист бумаги и ищут резкое изображение спирали осветителя на бумаге (зеркале).

4. Смотрят в микроскоп. Слегка передвигая зеркало, находят свет. Фокусируют препарат. Опускают конденсор до тех пор, пока изображение (проекция) краев полевой диафрагмы осветителя в плоскости препарата не станет четким. Центрируют легкими движениями зеркала изображение отверстия диафрагмы.

5. Наблюдая в микроскоп, постепенно открывают полевую диафрагму осветителя так, чтобы освещенный круг ее заполнял поле зрения микроскопа (лучше, если освещенный круг немного выйдет за пределы поля зрения).

Положение осветителя, зеркала, конденсора микроскопа в дальнейшем изменять не следует.

Установка света по Келеру рекомендуется как при обычной микроскопии в проходящем свете, так и при фазово-контрастной микроскопии и микроскопии в темном поле.

Измерение объектов с помощью светооптического микроскопа. В практике микробиологии часто бывает необходимо измерить клетки микроорганизмов. Это осуществляется на фиксированных препаратах. Определение ведут с помощью шкалы окулярного микрометра — окулярной линейки. Она представляет собой круглую стеклянную пластинку, посреди которой нанесена шкала делений (50 или 100 делений) общей длиной 5 мм. Вывинчивают линзу окуляра и окулярную линейку вставляют в окуляр (стороной с делением вверх на диафрагму окуляра). Записывают длину клеток a — ко-

личество делений линейки, помещающихся в длине клетки; ширину клеток b — количество делений линейки, помещающихся в ширине клетки. Для того чтобы рассчитать истинные размеры клеток, измеряют цену делений окулярной линейки с помощью объектного микрометра. Объектный микрометр представляет собой предметное стекло, в центре которого находится покровное стекло с линейкой (шкала из 100 делений). Общая длина шкалы объектного микрометра 1 мм, величина одного деления шкалы 10 мкм (0,01 мм). Объектный микрометр помещают вместо препарата на столик микроскопа и сначала фокусируют при малом увеличении. Изображение линейки перемещают в центр поля зрения и только после этого меняют объектив на тот, при котором определяли размеры клеток. Перемещая 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 черточек шкалы окулярного микрометра с какой-нибудь черточкой объектного микрометра и затем находят следующую совмещение. Устанавливают, скольким делениям объектного микрометра соответствует одно деление окулярного микрометра. Допустим, два деления объектного микрометра (20 мкм) соответствуют пяти делениям окулярного микрометра, тогда одно деление окулярного микрометра равняется 4 мкм (20:5). Если теперь на столик микроскопа поместить препарат с клетками микроорганизмов, то при том же увеличении можно измерить величину клеток.

Для этого определяют, какому числу делений окулярной линейки соответствует величина измеряемого объекта, и умножают это число на цену деления окулярного микрометра.

2. МИКРОСКОПИЯ В ТЕМНОМ ПОЛЕ

Метод наблюдения в темном поле, разработанный австрийским ученым Зигмонди, дает возможность повысить разрешающую способность микроскопа в 10 раз. В основе метода лежит явление Тиндалля — освещение объекта косыми лучами света. Эти лучи, не попадая в объектив, остаются невидимыми для глаза, поэтому по-

ле 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. Тогда наблюдатель видит в темном поле интенсивно светящиеся объекты, поскольку лучи света идут именно от них.

Темное поле зрения можно создать в светооптическом микроскопе, заменив обычный конденсор темнопольным и применив для освещения источник сильного света. Однако эффект темного поля может быть достигнут только в том случае, если апертура конденсора превышает на 0,2—0,4 единицы апертуру объектива. Для исследования в темном поле рекомендуется 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 с целью исследования живых клеток микроорганизмов. Особенно он ценен для функционально-морфологического изучения крупных объектов типа дрожжей. Цитоплазма дрожжевых организмов (при условии яркого источника света и хорошего апохроматического иммерсионного объектива) слабо и равномерно опалесцирует. На ее фоне четко различаются черные оптически пустые вакуоли. Капли жира выделяются как сильно блестящие гранулы. Протопласт погибающих клеток опалесцирует молочно-белым цветом.

3. ФАЗОВО-КОНТРАСТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Человеческий глаз выявляет только различия в длине (цвете) и амплитуде (интенсивности, контрастности) световой волны, но не улавливает различий в фазе.

Почти все живые клетки прозрачны, так как световые лучи, проходя через живую клетку, 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 малоприменим), либо снижая апертуру конденсора путем прикрывания

диафрагмы (прием также нежелателен, так как снижается разрешающая способность микроскопа).

Метод фазово-контрастной микроскопии, предложенный голландским физиком Цернике для наблюдения за прозрачными объектами, основан на преобразовании фазовых изменений, претерпеваемых световой волной при прохождении через объект, в видимые амплитудные, с помощью специального 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, в которой имеется прозрачная щель 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 $\frac{1}{4}$ длины волны) и можно наблюдать эффект фазового контраста. Фазовые изменения переходят в амплитудные, и препарат становится контрастным.

Для проведения исследований необходимо в дополнение к световому микроскопу иметь фазово-контрастное устройство (в настоящее время наиболее широко применяется 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 физиологические процессы изучаемых объектов.

4. ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ [ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ] МИКРОСКОПИЯ

В СССР метод люминесцентной микроскопии разработан М. Н. Мейселем. Суть метода в следующем. Некоторые биологические объекты способны при освещении коротковолновыми лучами (сине-фиолетовыми, ультрафиолетовыми) поглощать их и испускать лучи с более длинной волной (светиться желто-зеленым или оранжевым светом). Это так называемая собственная, или первичная, люминесценция.

Нелюминесцирующие объекты можно обработать специальными флуорохромами (акридином желтым, акридином оранжевым, аурамином, примулином, тиофлавином, конго красным, тетрациклином, хинином) и также наблюдать люминесценцию, но это уже будет наведенная, или вторичная, люминесценция, которая гораздо чаще используется в микроскопии.

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 обычной схемой выбором источника света (обычно ртутная лампа, но в случае возбуждения люминесценции объекта сине-фиолетовыми лучами можно использовать и низковольтные лампы) и наличием на пути лучей двух светофильтров: синий светофильтр перед конденсором, пропускающий сине-фиолетовые лучи видимого спектра, и желтый светофильтр в окуляре микроскопа, убирающий синие лучи, мешающие выявлению люминесценции.

Преимущества люминесцентной микроскопии по сравнению с обычной заключаются в следующем: сочетание цветного изображения и контрастности объектов; возможность изучения морфологии живых и убитых клеток микроорганизмов в питательных средах и тканях животных и растений; исследование клеточных структур, избирательно поглощающих различные флуорохромы, которые являются при этом как бы специфическими цитохимическими индикаторами; изучение функционально-морфологических изменений клеток; использование флуорохромов при иммунологических реакциях и подсчете бактерий в образцах с невысоким их содержанием.

Глава II

ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О КУЛЬТИВИРОВАНИИ, ТЕХНИКЕ ПОСЕВА И НЕОБХОДИМОМ ОБОРУДОВАНИИ ДЛЯ РАБОТЫ С МИКРООРГАНИЗМАМИ

Выращивание микроорганизмов на питательных средах называется культивированием (лат. *cultus* — выращивание), развившиеся микроорганизмы — куль-

турой. При развитии в жидкой среде культуры образуют суспензии, осадок или пленку, при развитии в плотной среде — колонии. Культуры могут быть чистыми (содержат потомство клеток только одного вида) и накопительными (состоят преимущественно из клеток одного вида микроорганизма).

Внесение клеток микроорганизмов или какого-либо исследуемого материала (образца почвы, пробы воды) в стерильную питательную среду для получения чистой или накопительной культуры называется посевом. Перенесение уже выращенных клеток из одной среды в другую (стерильную) называется пересевом, или пасированием (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 (лат. *incubatio* — выращивание при искусственно созданной температуре).

Выращивают микроорганизмы в стеклянной посуде*: пробирках, колбах или чашках Петри.

В пробирках микроорганизмы культивируют как в жидких, так и на плотных средах. Жидкой средой для аэробных культур заполняют обычно $\frac{1}{3}$ пробирки, для анаэробных — $\frac{2}{3}$. Если плотная среда в пробирке предназначается для выращивания микроорганизмов в этой же пробирке, ее при подготовке к стерилизации наливают в пробирку на $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{4}$ их объема. 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 — косяе или скошенные среды. Плотная среда, застывшая при вертикальном положении пробирки, называется столбиком. Столбики ($\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ пробирки) используют для посева культуры уколom (стр. 22). Столбики питательной среды ($\frac{2}{3}$ объема) после стерилизации также

* Стеклянную посуду, не бывшую в употреблении, очищают от щелочи кипячением в растворе, содержащем $K_2Cr_2O_7$ и крепкую H_2SO_4 (по 6% каждой).

применяют для заливки стерильных чашек Петри при микробиологических посевах.

Пробирки со средами и культурами при работе следует устанавливать на штативах; пробирки со средами, подготовленными к стерилизации, помещать в проволочные корзины или металлические ведра с отверстиями; пробирки с культурами при инкубации или хранении — в картонные коробки.

При выращивании микроорганизмов в колбах используют только жидкие питательные среды. Для культивирования аэробных микроорганизмов среду наливают тонким слоем (например, 30 мл в колбы Эрленмейера на 100 мл), для выращивания анаэробных микроорганизмов колбу заполняют на $\frac{2}{3}$.

В чашках Петри (двойные чашки) микроорганизмы культивируют лишь на плотных средах. Эти чашки имеют высоту ~1,5 см, диаметр ~8—10 см (диаметр крышки несколько больше, чем диаметр нижней чашки).

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, шпателя — 1,5 мм и более. При посевах (и пересевах) культур микроорганизмов из колоний, выросших на плотных средах, применяются иглы или шпатели. Последние используют для взятия клеток микроорганизмов из колоний, растущих 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 су-

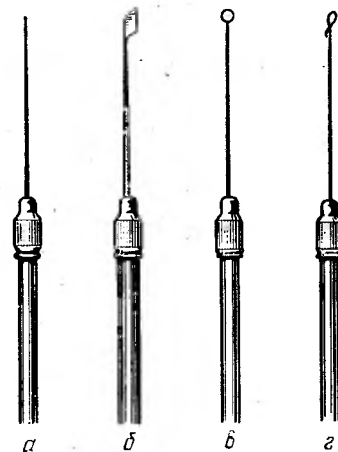


Рис. 2. Бактериологическая игла (а), шпатель (б), петли, сделанные правильно (в) и неправильно (г).

шильного металлического столика Коха. 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.

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 пальцем (первая пробирка). Нижний конец ее свободно лежит на большом пальце (с его левой стороны; со стороны сочленения с указательным). Другую пробирку зажимают между средним и безымянным пальцами (вторая пробирка). 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; он слегка удерживает пробирки в параллельном по отношению друг к другу положении.

Пробирки при взятии мазка необходимо удерживать в наклонном положении, чтобы гарантировать стерильность культуры. Если их держать вертикально, то возможно попадание 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.

Если высевают в плотную скошенную среду, иглой с культурой проводят прямую или волнообразную черту по поверхности среды легким движением (не разрезая среды) — посев штрихом. Если высевают в столбик питательной среды, иглу вводят в центральную часть в толщу ее — посев уколом. Если посев дела-

ют в жидкую среду (или из жидкой среды), наклонять пробирки следует слегка, чтобы не смочить пробку и края пробирки.

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

Глава III

МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

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

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

Исследование живых клеток микроорганизмов методами «раздавленной» и «висячей» капли. В обоих случаях возможно окрашивание объекта «прижизненными» красителями — «витальная» окраска. В качестве прижизненных красителей можно использовать метиленовый синий, нейтральный красный в концентрациях от 0,001 до 0,0001 %.

Оба метода применяются для выявления подвижности клеток микроорганизмов, наблюдений за размножением, образованием и прорастанием спор, для установления реакции микроорганизмов на химические соединения и физические факторы воздействия, при изучении размеров клеток, характера их расположения и выявления запасных веществ клетки.

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

В случае метода раздавленной капли на чистое предметное стекло наносят каплю водопроводной воды. В каплю 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 иммерсионной системой объектива на покровное стекло наносят каплю кедрового масла.

Для длительных наблюдений за клетками микроорганизмов применяют метод висячей капли. На стерильное покровное стекло наносят иглой негустую суспензию микроорганизмов, выращенных в жидкой питательной среде или подготовленных для данной цели в физиологическом растворе (0,5% NaCl). Покровное стекло перевертывают и помещают на стерильное предметное стекло с лункой посередине так, чтобы капля свободно свисала над лункой. Для герметичности края лунки смазывают вазелином.

Фиксированные препараты микроорганизмов. В микробиологии часто применяют эти 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 и 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. Обезжиривание проводят вдали от горелок.

Прокаленной бактериологической иглой из пробирки с культурой микроорганизмов берут небольшое количество микробной массы и вносят в каплю. Каплю тщательно размазывают петлей по стеклу на площади приблизительно 4 см². Очень густую суспензию разводят водой. Для этого стерильной петлей берут немного суспензии и переносят в каплю воды на другое предметное стекло. Суспензию размазывают тонким слоем, затем мазок сушат, желательно на воздухе при комнатной температуре или при слабом нагревании, держа препарат высоко над пламенем горелки. Сильный нагрев препарата при подсушке мазка не рекомендуется, так как белки клеток свертываются, искажая структуру и форму клеток. Высушенный препарат фиксируют.

Фиксацию мазка проводят или над пламенем горелки (при исследовании формы клеток), или с помощью химических соединений (для исследования внутренней структуры клеток). В первом случае препарат 3—4 раза медленно проводят тыльной стороной над пламенем горелки. При фиксации с помощью химических веществ используют хромовые соединения, формалин, осмиевую кислоту, ацетон.

Один из наиболее распространенных приемов фиксации — обработка препарата 96%-ным спиртом или смесью равных объемов этилового спирта и эфира (жидкость Никифорова). При этом препараты погружают на некоторое время в фиксирующую жидкость.

Окрашивание препарата. При окрашивании мазка препарат помещают на препаратодержатель. На мазок наносят несколько капель красителя. В зависимости от красителя и целей исследования продолжительность окрашивания различна (1—5 мин, в отдельных случаях 30 мин и дольше). После окончания окрашивания препарат промывают водой, фильтровальной бумагой удаляют воду, подсушивают на воздухе и микрокопируют.

Существуют простые и дифференцированные методы окраски. При простой окраске используют один какой-либо краситель, например метиленовый синий, фуксин, генциан фиолетовый в щелочных или карболовых растворах. Прокрашивается вся клетка. При дифференцированной окраске разными красителями окрашиваются отдельные структуры клетки. Таковы методы окраски по Граму, окраска спор.

Красители, у которых при диссоциации выделяются водородные ионы, придающие красителю кислый характер, называются **кислыми**. Они окрашивают (в виде аниона) вещества основной природы. Красители, у которых при диссоциации выделяются гидроксильные ионы, называются **основными**. Основные красители окрашивают (в виде катона) вещества кислотной природы. Так как в клетках микроорганизмов имеются и кислотные, и основные радикалы — COOH и NH_2 , то они могут окрашиваться и основными, и кислыми красителями.

В микробиологической практике кислые и основные красители используются в виде солей, так как они способны вступать в реакцию с кислотами и основаниями. Основные красители чаще применяются в виде солей соляной, реже уксусной и серной кислот; кислые красители — в виде натриевых или калийных солей. Ниже приведены наиболее часто употребляемые красители.

Красители основной природы, применяемые в микробиологии

Красные	Зеленые
Нейтральный красный	Янус зеленый
Пирюин	Метиловый зеленый
Сафранин	Малахитовый зеленый
Фуксин	Коричневые
Гематоксилин	Везувин
Тионин	Хризоидин
Синие	Черные
Виктория	Индулин
Метиленовый синий	
Фиолетовые	
Генциан фиолетовый	
Кристаллический фиолетовый	
Метиловый фиолетовый	

Красители кислой природы, применяемые в микробиологии

Красные и розовые	Черные	Желтые
Кислый фуксин	Нигрозин	Конго
Энтрозин		Пикриновая кислота
		Флуоресцин

Основные красители окрашивают объект интенсивнее в более щелочной среде, кислые — в более кислой. Чтобы различить растворы кислых или основных красителей, погружают в раствор полоску фильтровальной бумаги. Она несет отрицательный электрический заряд. В случае основного окрашивающего раствора его катион, обуславливающий окрашивающую способность, фиксируется отрицательным зарядом бумаги, и по ней вследствие капиллярности будет распространяться только вода (в виде бесцветной полосы). Если раствор содержит кислый краситель, его анион будет подниматься по бумаге и окрасит ее.

Окрашивание живых клеток микроорганизмов (витальная окраска) — трудоемкий процесс и поэтому используется редко. Предполагают, что при фиксировании увеличивается число свободных амино- и карбоксильных групп, в результате повышается сродство клетки к красителю.

Красители можно разделить на позитивные и негативные. 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 фоне красителя.

Некоторые микроорганизмы (например, спирохеты) и отдельные структуры (внеклеточная слизь), плохо выявляемые с помощью позитивных красителей, легко выявляются при окрашивании негативными красителями. Споры без соответствующей обработки не окрашиваются, поэтому при окрашивании клеток бактерий позитивными красителями они окрашиваются как бы негативным способом: имеют вид преломляющих свет включений в вегетативных клетках.

Глава IV

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНОЙ КЛЕТКИ

1. ФОРМА КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ

Бактерии

Под общим понятием «бактерии» в настоящее время описано свыше 1600 видов микроорганизмов-прокариот, не имеющих настоящего сложно организованного ядра. Большинство представителей бактерий — одноклеточные организмы, разнообразные по размерам и физиологическим свойствам. По форме все бактерии можно разделить на шаровидные (кокки), палочковидные, извитые и нитчатые. В последние годы из почвы выделены также бактерии, имеющие своеобразные формы.

Знакомство с основными формами бактерий проводится на примере следующих представителей (рис. 3).

Бактерии шаровидные — кокки (греч. *coccus* — зерно, шарик) делятся на следующие группы.

Микрококки в природе встречаются в виде одиночных шаровидных клеток. В качестве примера можно взять клетки *Micrococcus agilis* (micro — маленький, *agilis* — подвижный).

Диплококки (diploos — двойной) — шаровидные бактерии, соединенные по две клетки. К диплококкам относится *Azotobacter chroococcum*. Родовое название отражает его физиологическую функцию — фиксирование азота атмосферы, видовое — способность продуцировать коричневый пигмент (chroo — коричневеющий) и шаровидную форму (coccum).

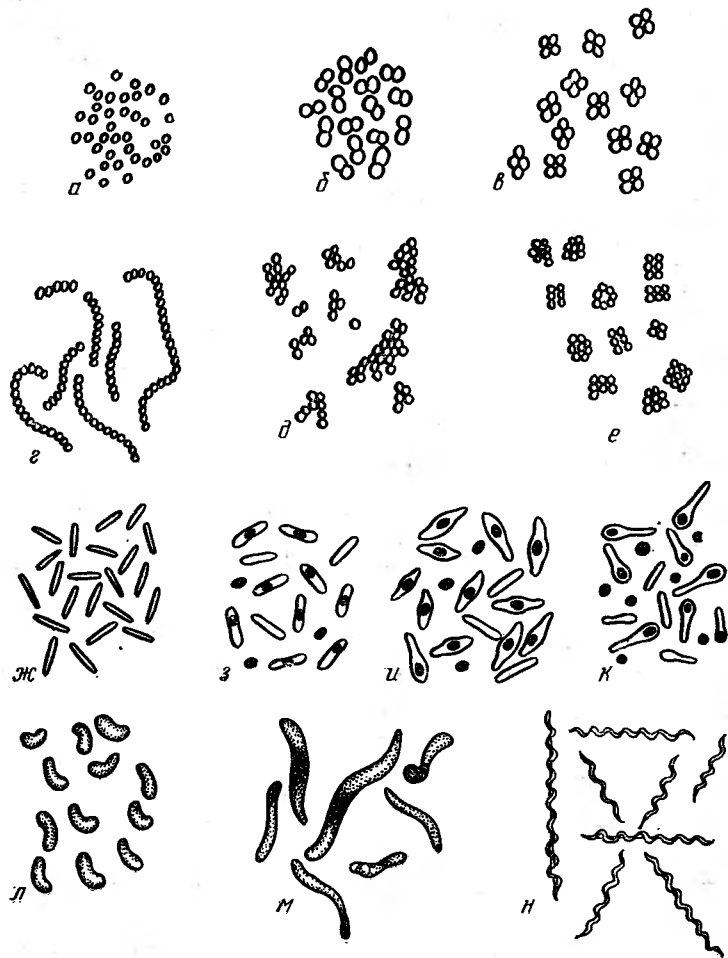


Рис. 3. Формы бактерий:

а — микрококки; б — диплококки; в — тетракокки; г — стрептококки; д — стафилококки; е — сарцины; ж — палочковидные, не образующие спор бактерии; з — к — палочковидные спорообразующие бактерии бациллярного (з), клостридиального (и) и плектридиального (к) типов спорообразования; л — вибрионы; м — спириллы; н — спирохеты.

Стрептококки (streptos — цепь) — шаровидные бактерии, образующие в результате деления клеток в одной плоскости разнообразной длины цепочки. С этими бактериями знакомятся при изучении молочнокислого брожения на примере *Streptococcus lactis*. Родовое название отражает характер расположения шаровидных клеток в виде цепочки, видовое — причастность стрептококка к молочнокислому брожению (lactis — молочный).

Сарцины (sarceo — соединяю) — шаровидные бактерии, группирующиеся по 8 клеток. Располагаются они 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, но уже с каждой стороны находят не по 4 клетки (субъединицы сарцины), а по 4 сарцины.

Удобна для просмотра *Sarcina flava* (сарцина желтая) — наиболее обычный представитель микрофлоры воздуха.

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

Бактерии палочковидные делятся на две группы: бациллы и бактерии. Бациллы образуют споры, бактерии их не образуют (роды *Bacterium*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* и др.). К бактериям принадлежит *Pseudomonas stutzeri*, относящаяся к денитрификаторам. Поскольку это неспорообразующая палочка, цитоплазма окрашивается равномерно, и под микроскопом клетки выглядят как тонкие, четко очерченные, прокрашенные палочки.

С представителями бацилл можно познакомиться на примере *Bacillus mycoides* или *Bacillus mesentericus*. В видовом названии *Bacillus mycoides* отражена ее способность развиваться на питательных средах в виде ложногрибовидного налета (mycoides — грибовидный). Налет имеет вид сложно переплетенных нитей, напоминающих мицелий грибов. Поскольку *Bacillus mycoides* — спорообразующая палочка, цитоплазма клетки, приступившей к спорообразованию, красителем прокрашивается, а спорогенная зона не прокрашивается, и под микроскопом клетки выглядят неравномерно окрашенными. Спорогенная зона, как более плотная и непрокра-

шенная, иначе преломляет свет, чем цитоплазма клетки. Клетки *Bacillus mycoides* относятся к стрептобациллам, так как обычно располагаются цепочками. Для просмотра лучше брать клетки в возрасте 2—3 суток. В более позднем возрасте все клетки переходят в стадию спор.

Bacillus mesentericus (картофельная палочка) также относится к стрептобациллам.

Палочковидные бактерии просматриваются на фиксированных и окрашенных фуксином препаратах.

Бактерии нитчатой 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 они 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 у них откладывается во влагалищах, отчего они имеют желтовато-бурую (охристую) окраску. Размножаются *Leptothrix* делением концевой (молодой) клетки, обращенной внутрь влагалища. При этом старые клетки как бы 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 влагалищ (в виде тонких трубок) и другие ожелезненные структуры (см. рис. 30).

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, для которых свойственна дифференциация нити.

Бактерии извитой формы. *Вибрионы* (лат. *vibrio* — трепещущий, вибрирующий) — слегка изогнутые клетки. Изгиб их меньше половины окружности.

Спириллы (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 (в виде латинской буквы S) или несколько (в виде спирали).

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, и среди них часто встречаются извитые формы.

Спирохеты — длинные и тонкие клетки с большим количеством мелких, но крутых завитков. Длина спирохет превышает толщину в 5—200 раз. Для ознакомления с этой формой бактерий следует приготовить фиксированный крашенный препарат из зубного налета. Особенно удачны препараты, если взять соскоб из кариесного (гнилого) зуба. Зубные спирохеты чрезвычайно тонкие, почти волосовидные.

Миксобактерии (слизистые бактерии). Группа бактерий, стоящих на более высокой ступени развития, чем бактерии, описанные выше.

У отдельных представителей миксобактерий (*Sorangium*, *Polyangium*) даже в световом микроскопе четко видно дифференцированное ядро. Вегетативные клетки имеют палочковидную форму с заостренными или округлыми концами. По мере старения клетки укорачиваются и переходят в микроцисты, соединяющиеся впоследствии слизью и образующие первичные и вторичные цисты, из которых в дальнейшем формируются плодовые тела. Для наблюдений за формой миксобактерий используют колонии, развившиеся вокруг комочков почвы на гелевых пластинах с клетчаткой в качестве единственного источника углерода.

Актиномицеты (лат. *actis* — луч, *myces* — гриб) — лучистые грибы (рис. 4,а). Это группа микроорганизмов, занимающая промежуточное положение между бактериями и грибами (отсюда их называют грибобактериями). Они одноклеточные, как бактерии, и образуют ми-

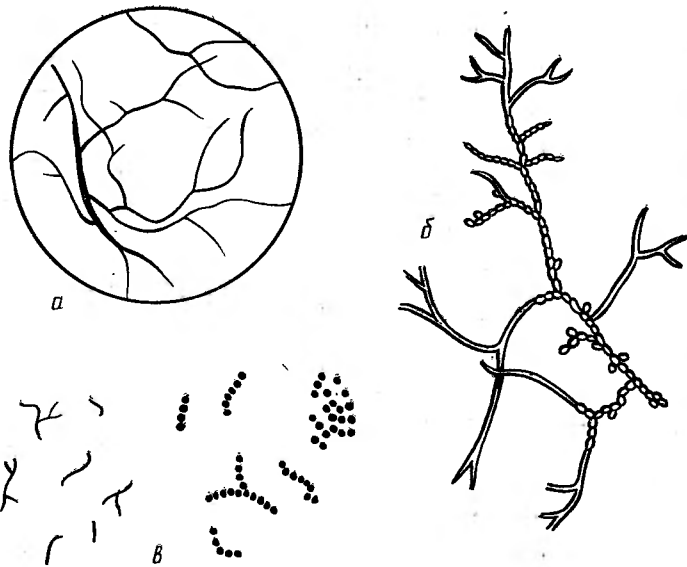


Рис. 4. Актиномицеты (а), проактиномицеты, или нокардии (б), микобактерии (в).

целий, как грибы; диаметр нитей у них очень мал, как у бактерий (не выше 0,5—0,8 мкм), гифы мицелия длинные и ветвистые, как у грибов (у актиномицетов длина ветвящихся нитей достигает нескольких миллиметров, у грибов мицелий достигает в длину нескольких сантиметров). С грибами их объединяет также способность размножаться спорами.

Много общего с актиномицетами имеют нокардия (проактиномицеты) и микобактерии, генетически с ними связанные.

На питательных средах актиномицеты образуют пушистые, бархатистые, мучнистые, преимущественно плотные кожистые колонии, срастающиеся с субстратом, иногда с характерным земляным запахом. Мицелий актиномицетов на питательных средах дифференцирован: одна часть 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 голубые, синие, фиолетовые, розовые, бурые, коричневые или черные тона. Актиномицеты, образующие диффундирующие в питательную среду пигменты, окрашивают ее в соответствующий цвет.

Чтобы выявить характерные морфологические признаки колоний актиномицета, сначала следует рассматривать 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 спораносцы со спорами. Спораносцы по строению бывают прямыми, волнистыми, спиральными и мутовчатыми.

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

Нокардия (проактиномицеты) — форма, переходная от актиномицетов к микобактериям. Воздушный мицелий отсутствует или слабо развит. Колонии на питательных средах тестообразной (мягкой) консистенции с характерным мицелиальным ободком. Окраска их также разнообразна, как и у истинных актиномицетов. В молодом возрасте образуют мицелий, который вскоре начинает септироваться (в нитях образуются перегородки) и расчлениваться 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 (rubra) колонии (рис. 4, б).

Микобактерии (рис. 4, в) — наиболее низко организованные актиномицеты. В некоторых классификациях их относят к бактериям. Настоящего мицелия не образуют. Колонии на питательных средах тестообразной консистенции. Продуцируют пигмент. В молодом воз-

расте формируют 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.

Грибы

Объектами микробиологии являются и многие виды микроскопических грибов, поэтому с некоторыми их представителями следует познакомиться на практических занятиях.

Грибы — бесхлорофилльные растения, эукариоты. Их вегетативное тело организовано в виде мицелия, или грибницы, — сплетения тонких ветвящихся нитей (гиф).

Зигомицеты — низшие грибы, имеют хорошо развитый ветвистый одноклеточный мицелий. Размножаются половым путем и бесполом (при помощи спор). Представитель зигомицетов мукор (*Mucor mucedo*) развивается в виде войлоковидного белого или серого налета на продуктах растительного происхождения, навозе травоядных животных.

Мицелий мукоровых грибов пронизывает субстрат и частично стелется на его поверхности. Вверх от него отходят особые воздушные гифы — спорангиеносцы, вздувающиеся на концах. Эти вздутия (спорангии) в дальнейшем отделяются от спорангиеносцев перегородкой, и в них бесполом путем образуются многочисленные спорангиоспоры — эндоспоры (эндо — внутренние).

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

При просмотре мукора следует осторожно взять препаратной иглой небольшое количество мицелия и другой препаратной 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 щавелевокислого кальция. Затем

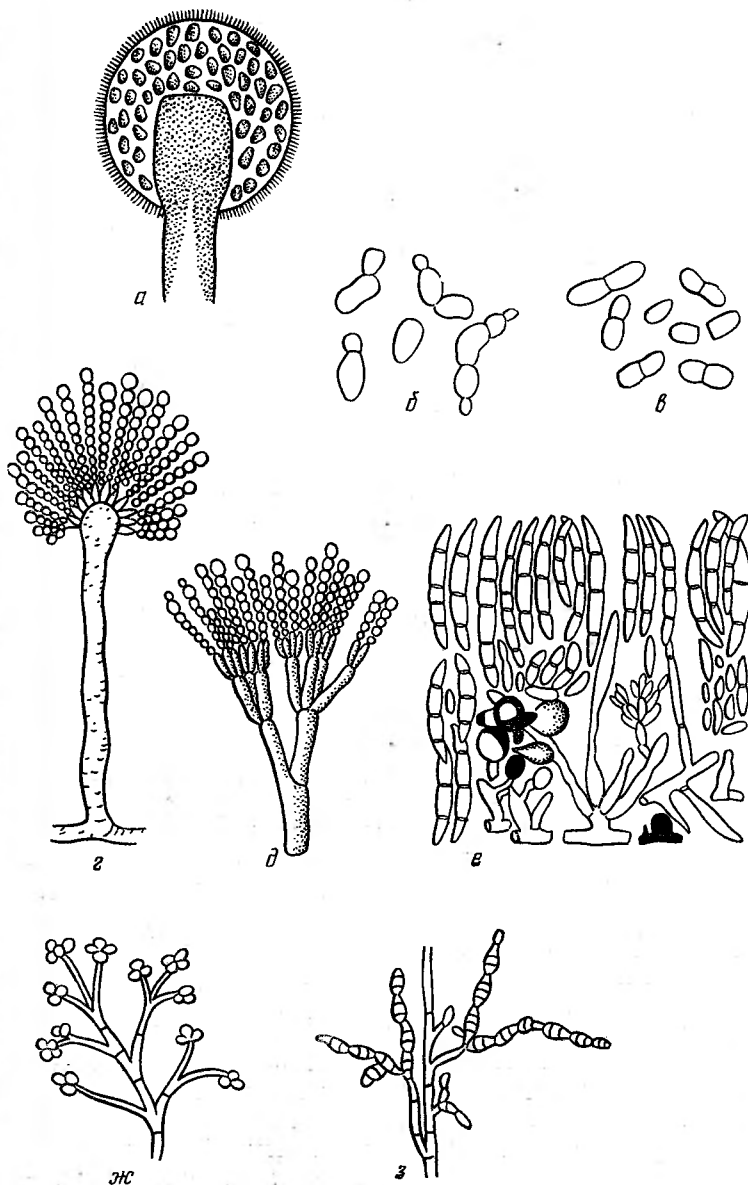


Рис. 5. Грибы микроскопические:

а — *Mucor*; б — дрожжи почкующиеся; в — дрожжи делящиеся; г — *Aspergillus*; д — *Penicillium*; е — *Fusarium*; ж — *Trichoderma*; з — *Alternaria*.

на поверхность препарата наносят каплю воды, накрывают его покровным стеклом и рассматривают последовательно при малом и большом увеличении (без иммерсии) микроскопа. Оболочка спорангия при этом разрушается и споры вываливаются.

Представители рода *Mucor* (рис. 5, а) могут быть выделены из почвы при посеве пылевидных ее частиц на поверхность сусло-агара в чашках Петри или на свежем конском навозе, помещенном на 3—4 дня под стеклянный колпак на тарелку с влажной фильтровальной бумагой или сырым песком.

Аскомицеты (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 образуются в результате полового процесса на поверхности или внутри плодовых тел, образуемых сплетением гиф мицелия (возможно и бесполое размножение экзогенно образующимися спорами — конидиями), и гемiasкомицетов, у которых плодовые тела отсутствуют. К гемiasкомицетам относятся большинство дрожжей, которые мы рассмотрим отдельно (стр. 39).

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

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

Грибы рода *Penicillium* (рис. 5, б) называются кистевиками, так как они образуют конидии на концах мутовчаторазветвленных конидиеносцев, напоминающих кисть руки. Иногда отдельный пучок конидиеносцев, выходящих как бы из одной точки и отчленяющих конидии, напоминает рисовальные кисти.

При просмотре строения конидиеносцев *Penicillium glaucum* препаровальной иглой вырезают кусочек мице-

лия ($\sim 0,5$ мм²) на границе между его зеленым и белым участками. Гриб к занятию подается выращенным в чашке Петри. Если он старый и мицелий уже весь зеленый, просмотр будет неудачным. Осторожно с помощью двух препаровальных игл кусочек 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 целиком окружает 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.

Стеклянной палочкой (или препаровальной иглой) покровное стекло слегка надавливают в центре. Избыток воды можно удалить фильтровальной бумагой. Препарат сначала просматривают при малом увеличении, уделяя основное внимание его краям, так как на краях обычно хорошо видны кисти конидиеносцев. Когда подходящий участок найден, переводят объектив 8X на 40X и детально рассматривают кисточки. В случае просмотра при малом увеличении конденсор несколько опускают, при переводе на объектив 40X снова регулируют освещенность поднятием конденсора.

Aspergillus, или леечная плесень (рис. 5, в) 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 гриба на границе между черным и коричнево-бурым участком колонии и вносят в каплю воды на предметном стекле. Далее поступают так же, как и в случае просмотра 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 по присутствию таких головок. У мукора головки гладкие — «лысые», так как споры его эндогенного происхождения (внутренние), а у аспергилла и пеницилла — экзогенного (внешние).

Несовершенные грибы имеют многоклеточный мицелий, но у них не установлены половой процесс и совершенная стадия спороношения. Размножаются бесполом путем при помощи конидий или вегетативно — участками гиф. В природе широко распространены представители родов *Fusarium*, *Trichoderma*, *Alternaria*. Встречаются на растительных остатках, плодах, семенах и в почве.

Грибы рода *Fusarium* (рис. 5, e) встречаются и как сапрофиты, живущие в почве и на растительных остатках, и как паразиты, вызывающие заболевания многих видов растений (увядание, гнили корней, стеблей, плодов, полегание сеянцев древесных и кустарниковых пород, болезни семян).

Колонии разных видов фузариума на питательных средах (сусло-агаре) могут быть рыхлыми, ватообразными, пышными, воздушными или плотными, пленчатыми. Они либо белые, либо окрашены в различные тона розового или желтого цвета. Нередко и питательная среда окрашивается в разные цвета и оттенки от розового до коричневого. 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. У многих видов фузариума образуются еще овальные, мелкие, бесцветные, чаще одноклеточные микроконидии.

Грибы рода *Trichoderma* (рис. 5, ж) легко выделить из почвы на подкисленном сусло-агаре. Через 2—3 дня инкубации при 23—25°C на поверхности среды появляются сначала белые, затем со всеми оттенками зеленого цвета участки с рыхлой клочковатой или войлочной поверхностью, образованной мицелием и скоплением конидиеносцев. С возрастом они становятся темно-зелеными. При большом увеличении микроскопа видны прямостоячие, многократно супротивно разветвленные конидиеносцы, приподнимающиеся над мицелием. На вершине конидиеносцев расположены шаровидные го-

ловки, каждая из которых состоит из 10—20 одноклеточных бесцветных конидий (в масле все они кажутся ярко-зелеными).

Разные виды рода *Alternaria* (рис. 5, з) можно выделить с листьев пораженных растений картофеля или томата, с семян капусты и других растений, из почвы. Они характеризуются своеобразным строением многоклеточных грушевидных конидий, соединенных цепочками. Их колонии на сусло-агаре сначала светлые, пушистые, затем зеленовато-серые или оливково-черные, бархатистые или ворсистые, нередко с ясно выраженной концентрической зональностью; иногда колонии с самого начала сажисто-черные, 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 дрожжи входят в класс аскомицетов.

Диаметр клеток дрожжей колеблется от 8 до 15 мкм. Форма их разнообразна: эллипсовидная, 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. 5, б) 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, неспособные к половому процессу и спорообразованию. Они относятся к классу несовершенных грибов.

С делящимися дрожжами (рис. 5, в) 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 как бы 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 способ размножения) и половым путем. При почковании на материнской клетке возникает маленькая выпуклость — «почка» — дочерняя клетка, в нее переходит одно ядро, она 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 не успевают разъединиться и возникает псевдомицелий (ложный мицелий).

Для лабораторных занятий могут быть использованы обычные дрожжи. Небольшой кусочек дрожжевой массы помещают за несколько часов до занятий в теплую подсахаренную воду и ставят в теплое место. Образуется беловатая мутная жидкость. На предметное стекло наносят каплю этой жидкости, закрывают покровным стеклом, наносят на него кедровое масло и рассматривают препарат с иммерсионной системой микроскопа. Клетки хорошо видны и при меньших увеличениях. В пекарских дрожжах обычно присутствуют две расы дрожжей — одна раса представлена округло-эллипсоидными клетками, быстро разъединяющимися при почковании, другая — удлиненно-цилиндрическими клетками, 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 *Torula lactis* (молочные дрожжи). Клетки *Torula lactis* мелкие, их диаметр около 5 мкм.

Размножение у дрожжеподобных организмов может происходить также в результате распада гиф на отдель-

ные клетки — оидии или артроспоры, как у *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*), который изучается в процессе молочнокислого брожения (стр. 92).

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 две пробирки каждой культуры и 1—2 чашки Петри на группу студентов в 10—15 человек.

При проведении занятий необходимы микроскопы и все принадлежности к ним, предметные и покровные стекла, бактериологические петли (иглы), препаратальные иглы, свежий 5%-ный фуксин.

2. СТРОЕНИЕ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ (ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ)

Микробная клетка — сложная живая система, характеризующаяся высокой степенью упорядоченности составляющих ее структур. Каждая структура выполняет определенное жизненное назначение. Взаимодействие структур обеспечивает существование клетки, ее целостность.

Для изучения внутреннего строения клеток применяют специальные методы окраски (цитохимические методы исследования). Многие из этих методов преследуют диагностические цели. По форме клетки микроорганизмы не слишком разнообразны, и в ряде случаев, чтобы установить принадлежность микроба к тому или иному роду и виду, необходимо провести специальное окрашивание той или иной структуры (или вещества, накапливающегося в клетке).

3. ОКРАСКА КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ ПО ГРАМУ

Датский ученый Грам в 1884 г. предложил метод дифференциации микробных клеток, основанный на различии в химическом составе клеточных оболочек. Сущность метода заключается в том, что в клетках одних видов микроорганизмов образуется нерастворимое в спирте соединение йода с основным красителем, у других видов это соединение появляется временно и после

обработки спиртом растворяется. Первые микроорганизмы называются грамположительными, вторые — 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 несколько наклонном положении. Сливают краситель и, не промывая препарат водой, наносят на него раствор Люголя на 1 мин (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. Время обесцвечивания очень существенно, при превышении определенного срока обесцвечиваются и грамположительные клетки, при недостаточном сроке обработки препарат окажется переокрашенным в дальнейшем.

Промыв препарат водой, его окрашивают фуксином Пфейфера в течение 1 мин. Грамположительные микроорганизмы окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные — имеют только цвет дополнительной окраски (фуксина).

Результаты окраски по Граму зависят от возраста культуры. В старых культурах мертвые клетки всегда окрашиваются грамотрицательно. Некоторые бактерии (коринебактерии, протей) окрашиваются грамвариантно (часть клеток как грамположительные, а часть — как грамотрицательные).

В качестве объектов для окраски клеток микроорганизмов по Граму рекомендуются дрожжи, *Bacillus mesentericus* или *Bacillus subtilis* (грамположительные) и кишечная палочка *Escherichia coli* (грамотрицательная).

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 (в высушенном виде бумага может долго храниться). На бумагу наносят 2—3 капли воды и оставляют ее на препарате 2 мин.

В дальнейшем окраску проводят по вышеописанной методике. Модификация Синева нашла широкое применение в практике.

Метод Грама в модификации Калины. На предметное стекло наносят небольшую каплю дистиллированной воды, вносят 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 йода, 10 мл ацетона и 70 мл 0,5%-ного раствора йодистого калия. Затем препарат опускают на одно мгновение в этиловый спирт (96%-ный) и быстро высушивают фильтровальной бумагой.

Рецепты красителей и вспомогательных растворов 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 (йодистый калий — 2 г, йод кристаллический — 1 г, вода дистиллированная — 300 мл). Вначале готовят концентрированный раствор йодистого калия в 5 мл воды, в нем растворяют йод, потом добавляют воду до 300 мл.

3. Спирт 96%-ный.

4. Фуксин Пфейфера (водный раствор карболового фуксина Циля): 1 мл карболового фуксина Циля (рецепт приведен на стр. 46) и 9 мл дистиллированной воды.

4. ОКРАСКА СПОР У БАКТЕРИЙ

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 образуется спора, клетка называется *бацилярной*, если превышает, то в зависимости от расположения споры (в центре или на конце клетки) — *кlostридиальной* или *плектридиальной*. В бацилярной клетке спора может размещаться и в

центре клетки (центральное положение) и на конце (терминальное), и ближе к одному из концов (субтерминальное).

При наблюдении за живыми спорообразующими бактериями их споры можно различить по более сильному преломлению световых лучей. Споры кислотоустойчивы и с трудом окрашиваются красителями. Объясняется это наличием плотной оболочки, низкой концентрацией свободной воды и высоким содержанием липидов.

В препаратах, окрашенных простыми способами или по Граму, споры остаются бесцветными (негативная окраска).

В связи с особенностями физико-химического состава спор и плотной малопроницаемой оболочкой при окраске их применяют сначала химические вещества, изменяющие структуру оболочки. Однако при последующем прокрашивании споры одновременно прокрашивается и цитоплазма клетки, поэтому под микроскопом последняя выглядит однородно окрашенной. Чтобы добиться прокраски только споры, следует такой «перекрашенный» препарат частично обесцветить, отнимая краситель у цитоплазмы и оставляя его в споре. Это достигается довольно просто, так как адсорбированный спорой краситель удерживается прочнее, чем краситель, адсорбированный цитоплазмой клетки.

Таким образом, все способы окраски спор основаны на одном принципе. Сначала споры протравливают разными веществами — хромовой, соляной, серной, уксусной кислотами, аммиаком, едким натром или перекисью водорода, затем окрашивают клетку со спорой при нагревании, 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 (стр. 23). 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, обильно смачивают бумагу карболовым фуксином Циля. Подогревают препарат над пламенем горелки до появления паров (не до кипения), потом отводят его в сторону и добавляют новую порцию красителя.

Так продолжают в течение 7 мин. При этом 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 клетку 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 (мерно считая вслух от 21 до 37—40). При превышении времени обесцвечивания может обесцветиться и спора. Затем препарат промывают водой и окрашивают метиленовым синим в течение 2 мин. Если все операции проделаны правильно, окраска получается контрастной и споры, окрашенные в ярко-красный цвет, четко выделяются на голубом фоне цитоплазмы.

Метод Пешкова. На фиксированный в пламени препарат наливают метиленовый синий Леффлера, доводят его до кипения и кипятят на протяжении 15—20 с, держа над пламенем горелки. Препарат промывают водой и докрашивают в течение 30 с 0,5%-ным водным раствором нейтрального красного. Снова промывают, подсушивают и исследуют препарат с масляной иммерсией объектива. Споры получаются голубые или синие, цитоплазма — розовая.

Метод Ожешко. На высушенный, но нефиксированный препарат наливают 0,5%-ный раствор HCl и подогревают до появления паров 1—2 мин. Остудив, сливают кислоту, осторожно промывают препарат водой, сушат на воздухе, фиксируют на пламени.

Далее препарат обрабатывают по методу Циля — Нильсена (окраска карболовым фуксином через фильтровальную бумагу с подогреванием, обесцвечивание цитоплазмы кислотой и ее докрашивание метиленовым синим).

Рецепты красителей и вспомогательных растворов для окраски спор. 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.

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

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.

Для исследования спор хорошими объектами могут служить *Bacillus mesentericus* и *Bacillus tycooides* в возрасте четырех суток.

5. ОКРАСКА КАПСУЛ

Некоторые виды бактерий образуют слизистые капсулы. При обычных методах окраски они остаются бесцветными. Для выявления их применяют специальные негативные методы окраски (стр. 27).

Негативный метод Бурри. 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 рассматривают с иммерсионной системой микроскопа. На темно-дымчатом фоне ясно видны неокрашенные капсулы и клетки бактерий.

Метод Гинса. Приготавливают негативно окрашенный по способу Бурри препарат и фиксируют его 7%-ным водным раствором сулемы в течение 2—3 мин, или метиловым спиртом — 5 мин, или смесью спирта и эфира (жидкость Никифорова) на протяжении 10—15 мин, промывают водой и окрашивают в течение 3—5 мин карболовым фуксином Циля, разведенным водой в соотношении 1:3. Препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсией. При микроскопировании на темном фоне препарата контрастно выделяются неокрашенные капсулы, внутри которых заключены бактерии ярко-малинового цвета.

Рецепт приготовления туши. Одну часть туши смешивают с девятью частями дистиллированной воды и стерилизуют при 1 атм в течение 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.

Для исследования капсул наиболее удобно использовать клетки азотобактера.

6. ОКРАСКА ЖГУТИКОВ

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. Подготовку культуры ведут за несколько суток до просмотра. Рекомендуется ежедневно несколько дней подряд делать пересевы на свежую питательную среду (в жидкую среду или в конденсационную воду свежей скошенной агаризованной среды). Кроме того, в день просмотра можно брать петлей материал и переносить в пробирку с 5—6 мл стерильной водопроводной воды, нагретой до 37°C. Не рекомендуется болтать петлей в воде, бактериальная масса сама должна в течение 30—60 мин разойтись в ней. Прежде чем приступить к работе, необходимо проверить подвижность клеток в висячей капле. В случае отсутствия подвижности следует оставить пробирку в термостате на 1½—2 суток.

Для приготовления препаратов необходимы совершенно чистые предметные стекла. Их кипятят в растворе двуххромовокалиевой соли в крепкой серной кислоте, затем дважды промывают в растворе едкого натра. После этого стекла промывают водой и помещают для хранения в банку с 96%-ным спиртом. Перед приготовлением мазка следует сильно нагреть ту сторону стекла, на которую будет нанесен мазок, но наносят его на охлажденное стекло.

Метод Леффлера. Суспензию бактерий наносят на предметное стекло и сушат при комнатной температуре. Допускается фиксация препарата быстрым одноразовым проведением через пламя. Далее препарат обрабатывают протравителем в течение 3—5 мин, нагревая его до появления паров, или 15—20 мин при комнатной температуре, потом промывают сильной струей дистил-

лированной воды в течение 30 с и высушивают на воздухе.

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

Рецепты протравителя: А. 1 мл насыщенного водного раствора фуксина, смесь из 10 мл 25%-ного водного раствора танина с 5 мл насыщенного водного раствора сернистого железа. Готовят за несколько дней, перед употреблением фильтруют. Б. 1) насыщенный спиртовой раствор фуксина (несколько кристаллов фуксина, растворенных в 10 мл 96%-ного спирта оставляют в термостате при температуре 50° С на 1—2 ч); 2) 20%-ный водный раствор танина; 3) насыщенный на холоде водный раствор сернистого закисного аммиачного железа $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$.

Реактив получают, смешивая 1 мл раствора 1 с 10 мл раствора 2, и к смеси прибавляют 5,5 мл раствора 3. Лучшие результаты дает смесь, выдержанная 2—3 дня. Действие смеси можно улучшить, добавляя на каждые 10 мл по 0,1—0,2 мл 1 н. раствора NaOH.

В. 12 г танина растворяют при нагревании в 48 мл воды, добавляют 30 мл насыщенного водного раствора железного купороса 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. Карандашом для стекла на одной половине стекла по границе вычерчивают прямоугольник. Петлей наносят суспензию бактерий на площадь прямоугольника. Наклоняя стекло, дают возможность стечь избытку жидкости на противоположную сторону. Препарат сушат при комнатной температуре на воздухе.

На мазок наносят точно 1 мл парарозанилинового красителя, следя за тем, чтобы он не стекал за нанесенные на стекло линии. Поскольку в красителе содержится таниновая кислота, предварительной фиксации не требуется. Окрашивание длится 7—15 мин (время следует определять в каждом конкретном случае экспериментально). Для уточнения правильности срока окраски препарат помещают на черный фон и, пользуясь осветителем, освещают сбоку. Как только по всему мазку выпадет осадок, избыточный краситель удаляют слабой струей дистиллированной воды (не отмывая выпав-

ший в осадок краситель). Если клетки бактерий не окрасились в красный цвет, их докрасивают метиленовым синим.

Для приготовления парарозанилина необходимы следующие растворы: 1. 1,5%-ный раствор NaCl в дистиллированной воде. 2. 3%-ный раствор таниновой кислоты в дистиллированной воде (раствор должен быть светло-желтым). 3. 0,9%-ный раствор парарозанилинацетата или 0,3%-ный раствор парарозанилигидрохлорида в 96%-ном этиловом спирте. Для их растворения 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 этих трех растворов и смесь хранят в плотно закупоренной склянке. В ней краситель сохраняет свойства в течение нескольких недель при температуре 4° С в течение и даже лет при —10, —20° С.

Метод серебрения жгутиков по Морозову. Готовят три реактива: 1) 1 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл формалина, 100 мл дистиллированной воды; 2) 5 г танина, 1 мл жидкой карболовой кислоты (феиола), 100 мл дистиллированной воды; 3) 5 г кристаллического азотнокислого серебра (AgNO_3) растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

К 80 мл раствора серебра (20 мл отливают) по каплям приливают водный раствор аммиака (нашатырного спирта), пока не растворится образовавшийся осадок и останется легкая опалесценция. Если аммиака будет добавлено слишком много, то из отлитых в другой сосуд 20 мл раствора серебра надо по каплям приливать раствор до получения нужной опалесценции. Для окраски препарата раствор серебра разводят дистиллированной водой в соотношении 1:100. Техника окраски следующая: на одну минуту на препарат наливают первый реактив, сливают, промывают водой, наливают второй реактив, подогревают на слабом пламени до появления паров (1 мин), тщательно промывают водой, 1—2 мин при подогревании обрабатывают препарат третьим реактивом до появления темно-коричневой окраски мазка, тщательно промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсией.

Окраска жгутиков относится к числу наиболее тонких методов исследования строения микробной клетки, поэтому для практических занятий лучше воспользоваться заранее приготовленными, наиболее удачными препаратами.

7. ОКРАСКА ЯДЕРНОГО ВЕЩЕСТВА БАКТЕРИЙ

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

Метод Романовского — Гимза. Этим методом в клетках микроорганизмов одновременно выявляют ядерные вещества и волютин. Препарат фиксируют в течение 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 споласкивают слабощелочной (рН 7,2) водой, высушивают и микроскопируют. Ядерные вещества окрашиваются в красно-фиолетовый цвет, цитоплазма — в слабо-розовый.

Реакция Фельгена. Ее применяют для окраски ДНК. При слабом кислотном гидролизе ядерных нуклеопротеидов происходит отщепление пуриновых и пиримидиновых оснований, ведущее к высвобождению дезоксирибозы, входящей в ДНК. При гидролизе дезоксирибозы она переходит в β -гидроксилевулиновый альдегид, который взаимодействует с сернистой частью бесцветной фуксинсернистой кислоты, выделяя фуксин (окрашенный в красный цвет). В результате ядерные вещества становятся окрашенными.

Препараты бактерий обрабатывают фиксатором Карнуа 5 мин, промывают абсолютным спиртом, гидролизуют в течение 7 мин в растворе 1 н. HCl, подогретой до 60°C, погружают на 1—2 мин в холодную 1 н. HCl и переносят в фуксинсернистую кислоту (реактив Шиффа) на 3—4 ч.

Препараты последовательно промывают в трех кюветках с сернистой водой, по 20 мин в каждой кювете, затем споласкивают дистиллированной водой, высушивают и микроскопируют. Ядерное вещество окрашено в фиолетовый цвет.

* Содержит абсолютный спирт, хлороформ, ледяную уксусную кислоту в соотношении 6 : 3 : 1.

** Продажный препарат состоит из смеси азура (органический краситель, полученный 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.

8. ОКРАСКА ВКЛЮЧЕНИЙ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ

Окраска волютина (метахроматических зерен). Термин «волютин» предложен Мейером, обнаружившим его впервые у бактерий *Spirillum volutans*. Волютин — запасное фосфор- и азотсодержащее вещество, производное нуклеиновой кислоты. Характерное свойство волютина — его метахромазия — способность окрашиваться в иной цвет, чем цвет окрашивающего вещества (метиленовый синий окрашивает волютин в фиолетово-красный цвет).

Метод Нейссера. Фиксированный на пламени мазок окрашивают в течение 1—2 мин раствором Нейссера I (смешивают 2 части раствора А с одной частью раствора Б; раствор А состоит из 1 г метиленового синего, 20 мл 96%-ного спирта, 50 мл ледяной уксусной кислоты и 1 л дистиллированной воды; раствор Б — из 1 г кристаллического фиолетового, 10 мл 96%-ного спирта, 300 мл дистиллированной воды; оба раствора смешивают непосредственно перед употреблением). Краситель сливают и препарат окрашивают в течение 1—2 мин раствором Нейссера III (1 г хризоидина, 300 мл дистиллированной воды).

Цитоплазма бактерий окрашивается в желтый, а волютин — в темно-синий, почти черный цвет.

Метод Мейера. Готовят параллельно два препарата, фиксируют их на пламени, в течение 10 мин окрашивают метиленовым синим Леффлера. Затем один препарат погружают на 5 мин в 1%-ный раствор серной кислоты (препарат К), другой — на столько же в 4%-ный водный раствор KOH (препарат Ц).

Не промывая, препараты подсушивают фильтровальной бумагой и докрашивают 0,25%-ным раствором светлого зеленого или хризоидина. Затем промывают водой и высушивают. На препарате К цитоплазма бактерий окрашена в желто-коричневый цвет, включения волютина — в вишнево-красный. На препарате Ц гранулы волютина обесцвечены.

Окраска гликогена. Гликоген — это углевод, животный крахмал (полисахарид). Часто он накапливается в клетках дрожжей, бацилл. Для обогащения дрожжевых клеток гликогеном их выращивают на солодовой среде.

На чистое предметное стекло наносят небольшую каплю суспензии микроорганизма и к ней добавляют

такую же каплю раствора йода в йодистом калии (7 г йода и 20 г йодистого калия в 100—300 мл дистиллированной воды). Сверху помещают покровное стекло, избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Препарат просматривают с масляной иммерсией (на покровное стекло наносят каплю масла).

Включения гликогена хорошо исследовать в клетках *Saccharomyces cerevisiae* и *Bacillus mycoides* 1—2-суточного возраста.

Окраска гранулезы. Гранулеза — углевод, крахмалоподобное вещество. В больших количествах накапливается в клетках маслянокислых бактерий (*Clostridium butyricum*) перед спорообразованием.

В небольшую каплю суспензии маслянокислых бактерий добавляют такую же каплю раствора Люголя, закрывают покровным стеклом, удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой, на покровное стекло наносят каплю масла и просматривают под микроскопом с иммерсионной системой.

В качестве объекта следует воспользоваться накопительной культурой маслянокислых бактерий. Ее получают таким образом: за 3—4 суток до занятий в пробирки помещают мелконарезанный картофель с шелухой (1/3 пробирки), на кончике ножа вносят мел и заливают доверху водопроводной водой. Пробирки помещают в водяную баню и нагревают при 70°C в течение 10 мин, затем охлаждают и ставят в термостат при 30°C.

Для приготовления препарата маслянокислых бактерий берут пипеткой каплю суспензии из придонного слоя жидкости.

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 микроба. Формалин убивает клетку и разрушает оболочку. 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*.

Судан III готовят следующим образом: 0,1 г судана III растворяют в 200 мл 96%-ного спирта или концентрированной молочной кислоте.

Глава V

ПИТАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

1. ЗНАЧЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

В состав клеток микроорганизмов входят органические (C, O, H, N), зольные элементы (P, S, K, Mg, Ca, Fe) и микроэлементы, которые в малых дозах стимулируют рост клеточной массы, а в больших тормозят его. К ним относятся Zn, Mn, B, Cu, Mo, Co и др.

В сухом веществе клеток содержится: углерода — 50%, азота — 10—13, водорода — 8, кислорода — 20, P₂O₅ — 4, K₂O — 3, SO₃ — 1, MgO — 0,8, CaO — 1, Fe₂O₃ — 0,08%, микроэлементов — следы.

Чтобы установить значение отдельных питательных элементов для развития микроорганизмов, можно поставить опыт с грибом *Aspergillus niger*.

Готовят несколько вариантов питательных сред, из которых один — полная питательная среда без микроэлементов (*Aspergillus niger* развивается на этой среде хорошо), все остальные — та же среда с исключением того или иного элемента или с добавлением микроэлемента.

По росту гриба на питательных средах судят о значении исключаемого элемента или добавленного микроэлемента для развития гриба.

Варианты питательных сред следующие.

1. Полная питательная среда без микроэлементов (в %):

сахароза	10,0	MgSO ₄	0,05
NH ₄ NO ₃	0,3	FeSO ₄	0,01
KH ₂ PO ₄	0,2		

2. Та же среда без углерода. Из среды исключают сахарозу (для компенсации осмотической активности

среды можно внести соответствующее по осмотическому эквиваленту количество хлористого натрия).

3. *Та же среда без азота.* Из среды исключают NH_4NO_3 .

4. *Та же среда без фосфора.* KH_2PO_4 заменяют другой солью, например KCl^* , не содержащей фосфора, но включающей эквивалентное количество калия.

5. *Та же среда без калия.* KH_2PO_4 заменяют эквивалентным количеством NaH_2PO_4 .

6. *Та же среда без серы.* MgSO_4 и FeSO_4 заменяют эквивалентными количествами MgCl_2 и FeCl_3 (закисную соль железа можно заменить окисной).

7. *Та же среда без магния.* MgSO_4 заменяют эквивалентным количеством Na_2SO_4 .

8. *Та же среда без железа.* FeSO_4 заменяют эквивалентным количеством Na_2SO_4 .

9—11. *Та же среда с добавлением микроэлементов.* В одном варианте в состав среды вводят ZnSO_4 , в другом — MnSO_4 , в третьем — H_3BO_3 (в концентрации 0,01%).

Перед составлением питательных сред нужно рассчитать эквивалент — процент тех солей, которые вводят вместо исключаемых.

Пример расчета. Вариант среды без фосфора. KH_2PO_4 заменяют KCl . Молекулярная масса KH_2PO_4 — 136 (39+2+31+64), а KCl — 74 (39+35), KH_2PO_4 нужно было ввести в состав среды 0,2%.

Сначала определяют процент заданного калия в среде (x). Его вычисляют из пропорции:

$$\frac{136 - 0,2}{39 - x} = \frac{39 \cdot 0,2}{136}$$

Затем устанавливают эквивалентное количество KCl (U):

$$\frac{39 \cdot 0,2}{136} - 39 = \frac{74 \cdot U - 0,2\%}{136 \cdot 39} = 0,1\%$$

Таким образом, для определения эквивалентного процента замещающей соли (U) в нашем опыте нужно молекулярную массу ее умножить на процент заменяемой соли и разделить на молекулярную массу последней.

* При замене одной соли другой катион замещается натрием, анион — хлором; NaCl не оказывает влияния на развитие гриба.

Состав питательной среды в четвертом варианте (без фосфора) такой же, как и в первом, но KH_2PO_4 заменяют KCl .

При постановке опыта для каждого варианта рассчитывают количество всех веществ в граммах на 30 мл среды. Так как *Aspergillus niger* — аэробный организм, то опыты ставят в колбах Эрленмейера емкостью 75—100 мл.

Пример расчета. Задано создать концентрацию NH_4NO_3 — 0,3%, следовательно на 100 мл надо взять 0,3 г соли, тогда на 30 мл потребуется ее x г:

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

Соответствующее количество веществ на 30 мл среды набирают объемно: сахарозу из 20%-ного, микроэлементы из 1%-ного, а все остальные соли из 10%-ных растворов. Навеску NH_4NO_3 — 0,09 г набирают из 10%-ного раствора. Поэтому надо определить, сколько миллилитров 10%-ной соли надо взять, чтобы внести соответствующую навеску.

В 10%-ном растворе соли в 100 мл содержится 10 г NH_4NO_3 , а 0,09 г NH_4NO_3 в Y мл 10%-ного раствора,

$$Y = \frac{100 \cdot 0,09}{10} = 0,9 \text{ мл 10\%-ного раствора } \text{NH}_4\text{NO}_3.$$

Подобным образом рассчитывают все ингредиенты для каждого варианта в миллилитрах и вносят в колбу. Далее миллилитры суммируют и вычитают из 30 мл. Полученная разность показывает, сколько дистиллированной воды надо добавить.

Все необходимые соли и сахарозу вносят тщательно отмытыми пипетками (сначала их моют под струей водопроводной воды, затем споласкивают дистиллированной водой).

Целые миллилитры вносят градуированной пипеткой на 10 мл с делениями 0,1 мл, а десятые и сотые доли — микропипеткой на 1 мл с делениями 0,01 мл.

30 мл среды в колбе заражают спорами гриба *Aspergillus niger*. Каждую колбу закрывают ватной пробкой и прикрепляют этикетку с указанием варианта.

Среды перед внесением спор гриба не стерилизуют, так как высокая концентрация сахара и кислая реакция (за счет кислой соли KH_2PO_4) будут препятствовать росту бактерий. Каждый вариант желательно ставить в двукратной повторности. Опытные колбы помещают в термостат при 28—30°C.

Спустя 7 суток проводят анализ опыта. Выросшую пленку в первом варианте берут за стандарт. Обычно в этом варианте рост гриба хороший (пленка мощная). С первым вариантом сравнивают все остальные. Оценка роста гриба визуальная.

Для более точной оценки роста гриба в каждом варианте пленки его можно высушить при 105°C до постоянной массы. Первый вариант принимается за 100%.

На средах с исключением того или иного элемента (особенно если в нем большая потребность) гриб не растет (или растет очень слабо). Если элемент требуется в очень небольших количествах (например, FeSO_4 — 0,01%), то исключение его мало сказывается на росте клеточной массы, так как гриб использует примеси этого элемента в реактивах. При полном выделении из питательной среды необходимого элемента гриб развиваться не будет.

Материалы и оборудование. Культуры гриба *Aspergillus niger*, 20%-ный раствор сахарозы, 1%-ные растворы ZnSO_4 , H_3BO_3 , MnSO_4 и 10%-ные NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , KCl , NaH_2PO_4 , MgSO_4 , MgCl_2 , FeSO_4 , FeCl_3 , колбочки на 75—100 мл, цилиндры на 100 мл, градуированные пипетки на 10 мл, градуированные микропипетки на 1 мл, препаровальные иглы, вата и бумажные этикетки.

2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

При составлении питательных сред для микроорганизмов необходимо учитывать их потребность в элементах питания. По составу питательные 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. Основой таких сред являются различные части зеленых растений, животные ткани, солод, дрожжи, овощи, навоз, почва, вода морей, озер и минеральных источников. Большинство из них используется в виде экстрактов или настоев. На естественных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, так как в этих средах имеются, обычно, все компоненты, необходимые для роста и развития. Однако среды с неопределенным составом мало пригодны для изучения физиологии обмена веществ микроорганизмов, поскольку они не

позволяют учесть потребление ряда компонентов среды, а с другой стороны, выяснить, какие вещества образуются по ходу развития микроорганизмов. Это связано с тем, что состав естественных сред очень сложен; кроме того, он не является постоянным, так как существенно колеблется в зависимости от сырья и способа приготовления сред. Это заметно влияет на рост микроорганизмов. Естественные среды неопределенного состава используются главным образом для поддержания культур микроорганизмов, накопления их биомассы и для диагностических целей.

К числу сред неопределенного состава относят и так называемые полусинтетические среды. В их состав наряду с соединениями известной химической природы входят вещества неопределенного состава.

Синтетические среды — это такие среды, в состав которых входят только определенные, химически чистые соединения, взятые в точно указанных концентрациях. Синтетические среды следует готовить на дистиллированной воде. Для разработки синтетических сред, обеспечивающих нормальный рост изучаемого микроорганизма или максимальный биосинтез какого-либо продукта его жизнедеятельности, необходимо знать особенности обмена веществ данного организма и его потребности в источниках питания. В настоящее время в распоряжении микробиологов имеется достаточное количество синтетических сред, не уступающих по своим качествам сложным средам неизвестного состава. Синтетические среды могут иметь относительно большой набор компонентов, но могут быть и довольно простыми по составу. Синтетические среды наиболее удобны для исследования обмена веществ микроорганизмов. Зная точный состав и количество входящих в среду компонентов, можно изучить их потребление и превращение в соответствующие продукты обмена.

С. Н. Виноградским в практику микробиологии введены селективные (избирательные) среды для определенных групп микроорганизмов. Эти среды обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы родственных микроорганизмов и менее пригодны или совсем не пригодны для развития других.

Зная физиологические особенности соответствующей группы микробов, можно подобрать такие условия культивирования (состав среды, ее активную кислотность,

условия аэрации, температуру и др.), при которых будут развиваться лишь микроорганизмы этой группы. Это позволяет вести различные биологические процессы в лаборатории и в производстве без предварительной стерилизации среды. Такие среды применяются главным образом для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания, для получения накопительных культур. Понятие «элективные среды» входит в более широкое понятие «элективные условия».

Питательные среды применяют различной консистенции: жидкие, плотные, полужидкие.

Плотные питательные среды используют для учета количества бактерий, выделения их в чистую культуру и других целей. Такие среды готовят из жидких, добавляя 1,5—2,5% агар-агара или 10—15% желатины. При приготовлении полужидких сред вносят агар-агар в количестве 0,1—0,2%.

Агар-агар — растительный коллоид, получаемый из некоторых морских водорослей. В его состав входят главным образом полисахариды с ничтожным содержанием азотистых веществ. Желатина — кислый азотсодержащий продукт, добываемый путем выварки костей и хрящей.

В качестве плотных питательных сред широко применяют также гелевые пластины, введенные в микробиологическую практику С. Н. Виноградским.

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

Мясо-пептонный бульон (МПБ). Для приготовления мясо-пептонных сред используют мясной бульон, который получают так: 500 г мелко изрубленного свежего мяса без костей, жира и сухожилий заливают в эмалированной кастрюле 1 л водопроводной воды, нагретой до 50°C, и оставляют настаиваться 12 ч при комнатной температуре или 1 ч при 50—55°C. Мясо отжимают, экстракт процеживают через марлю со слоем ваты, кипятят в течение 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°C 20 мин (пробки колб закрывают сверху колпачками из бума-

ги). Ватные пробки должны быть плотными, так как они являются 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 излишня.

Нередко в лабораторных условиях мясной настой кипятят вместе с мясом, а затем мясо отжимают. Бульон получается хорошего качества. Если желательно иметь мясной бульон особо высокой питательности, во время настаивания мяса с водой добавляют немного пепсина и подкисляют бульон соляной кислотой. Пепсин дополнительно гидролизует белковые соединения мяса, и количество усвояемых бактериями питательных веществ возрастает.

Мясо можно заменить мясным экстрактом, беря его по 5 г на 1 л среды.

Для приготовления мясо-пептонного бульона к 1 л мясного бульона добавляют 5—10 г пептона (пептон — первый продукт гидролиза белка с высокой молекулярной массой) для повышения калорийности среды и 5 г поваренной соли с целью 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; при этом фенолфталеин еще не показывает щелочную реакцию — при добавлении его к среде в фарфоровой чашке розовая окраска не выявляется). Удобно использовать индикатор бромтимолблау. 1—2 капли его вносят стеклянной палочкой в фарфоровую чашку и добавляют каплю бульона. В нейтральной среде бромтимолблау бутылочно-зеленый, в кислой — желтый, в щелочной — синий.

После установления реакции среду снова кипятят 5—10 мин и белки, свернувшиеся от изменения реакции, отфильтровывают через бумажный фильтр без осветления бульона или осветлив его белком*. Прозрачный мясо-пептонный бульон разливают в пробирки, закры-

* Свежий яичный белок взбивают с двойным по объему количеством воды и смешивают с охлажденным до 50°C бульоном. Смесь кипятят на слабом огне 10 мин, помешивая, затем фильтруют.

вают ватными пробками и стерилизуют при 120°C в течение 20 мин.

Мясо-пептонный агар (МПА). К 1 л мясо-пептонного бульона добавляют 15—20 г мелко нарезанного агара агара. Среду нагревают до растворения агара (температура плавления его 100°C, застывания —40°C), устанавливают слабощелочную реакцию среды 20%-ным раствором Na₂CO₃ и через воронки разливают в пробирки (~по 10 мл для разливок в чашки — агар столбиком и по 5 мл для получения скошенного, наклонного агара). При разливе агара необходимо следить за тем, чтобы края пробирки были сухими, иначе пробки прилипают к стеклу.

Пробирки со средой стерилизуют в автоклаве при 120°C в течение 20 мин.

Мясо-пептонная желатина (МПЖ). В 1 л мясо-пептонного бульона помещают 100—150 г желатины. Температура плавления зависит от процентного содержания в среде. 10%-ная желатина плавится при 24°C, 15%-ная — при 25°. В летнее время среды готовят, добавляя 15% желатины.

После растворения желатины при осторожном нагревании в среде устанавливают слабощелочную реакцию (как и для МПБ и МПА), кипятят в течение 5 мин, затем охлаждают до 40—50°C. Одновременно яичный белок взбивают с небольшим количеством воды, вливают его в охлажденную желатиновую среду, хорошо взбалтывают и снова нагревают. Среда после выпадения белков становится прозрачной. Ее фильтруют через горячую воронку, разливают в пробирки и стерилизуют в кипятильнике Коха текучим паром, прогревая среду по 30 мин через 24 ч 3 раза.

Картофельный агар. 200 г очищенного и промытого водой картофеля нарезают ломтиками, заливают 1 л водопроводной воды, варят 30 мин. Отвар фильтруют через вату и доводят до первоначального объема. К полученной жидкости прибавляют 2% агара, кипятят до его растворения и устанавливают нейтральную реакцию среды (рН 7,0). Среду стерилизуют при 1 атм в течение 20 мин.

Пивное сусло. Зерна ячменя замачивают в холодной воде и прорастивают при 35°C. После того как ростки будут вдвое больше длины зерна, последнее высушивают до воздушно-сухого состояния (можно при слабом

подогревании) и получают солод. Для приготовления сусла солод крупно размалывают и 250 г его берут на 1 л воды. Смесь подогревают при 57°C (для лучшего выделения фермента амилазы) до исчезновения реакции на крахмал (синее окрашивание с йодом). 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. Определив его содержание по плотности раствора с помощью сахариметра, сусло разбавляют водой до концентрации сахара 6—8%, стерилизуют при 115°C (давление 0,5 атм) в течение 30 мин.

Готовое сусло можно получить на пивоваренном заводе.

Сусло-агар. К приготовленному суслу добавляют 2,5—3% агара, кипятят до его расплавления, фильтруют через вату и стерилизуют таким же способом, как пивное.

Обезжиренное молоко. Для приготовления питательных сред употребляют снятое молоко, так называемый обрат (жир в молоке неблагоприятно влияет на рост некоторых микроорганизмов). Обрат получают сепарированием молока, нагретого до 34°C. Жир можно удалять и при отстаивании молока.

При стерилизации молока следует учитывать, что его 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°C (давление 0,5 атм) 15 мин. Перед стерилизацией кислотность обрата не должна превышать 22° Тернера, иначе молоко свернется. После стерилизации его выдерживают трое суток в термостате при 30°C, чтобы спровоцировать развитие спорообразующих и других стойких к нагреванию форм. Через 3 дня каждую пробирку с молоком просматривают и пробирки, в которых развились микроорганизмы, выбраковывают.

При стерилизации в автоклаве иногда наблюдается побурение молока вследствие карамелизации молочного сахара и пептонизации казеина. При длительной стерилизации на дно пробирки выпадает осадок казеина, который может частично пептонизоваться. Перегретое,

побуревшее молоко в качестве среды использовать нельзя.

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

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

Дрожжевой экстракт. 1 кг прессованных дрожжей разводят в 1 л воды, смесь кипятят 1 ч, трижды отфильтровывают через бумажный фильтр и стерилизуют при 115°C 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 при давлении пара 1,5 атм в течение 30 мин.

3. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Стерилизация, или обеспложивание (*sterilis* — бесплодный), — это полное уничтожение зародышей микроорганизмов в питательных средах, посуде и пр. Этот прием широко используется в микробиологической практике.

Известно несколько методов стерилизации. Чаще всего применяют стерилизацию нагреванием (рис. 6).

Прокаливание (фламбирование). 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.

Стерилизация сухим жаром. Ее применяют для обработки посуды и сухих материалов (например, крахмала, мела) нагреванием в течение 2 ч при 170°C (считая с того момента, как установлена необходимая температура) в печи Пастера (рис. 6, а) или в электросу-

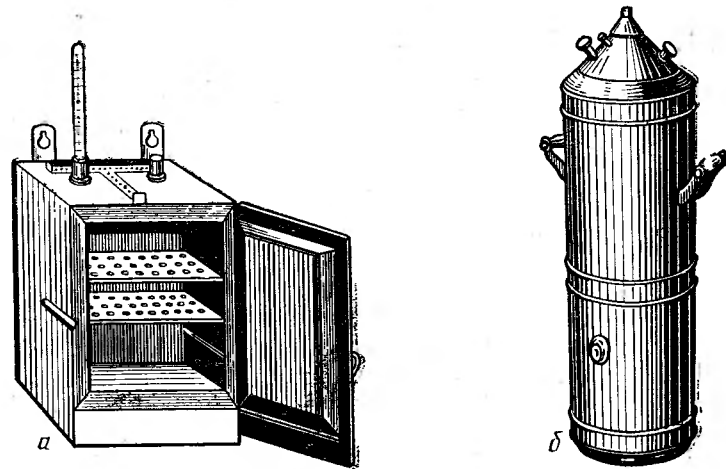


Рис. 6. Оборудование для стерилизации:
а — печь Пастера, б — кипятыльник Коха.

шильных шкафах с нагревом до 200°C. Температура выше 170°C не рекомендуется, потому что при 180° ватные пробки и бумага начинают разрушаться (буреют, становятся ломкими).

Перед стерилизацией стеклянную посуду закрывают ватными пробками, отверстия колб обвязывают бумагой, чашки, пробирки, пипетки, вату, марлю завертывают в бумагу или помещают в особые футляры и пеналы, в которых может храниться стерильная посуда после стерилизации.

По окончании стерилизации шкаф открывают только после того, как температура снизится до комнатной, иначе вследствие действия струи холодного воздуха стекло может лопнуть.

Стерилизация текучим паром. Текучим паром (100°C) обрабатывают предметы, портящиеся от сухого жара, и некоторые питательные среды, не выдерживающие более высокой температуры (среды с углеводами, МПЖ, молоко). Такую стерилизацию проводят в кипятыльнике Коха (рис. 6, б) по 30 мин в течение трех дней ежедневно. Эта стерилизация называется дробной.

Кипятыльник Коха — высокий металлический цилиндр с двойным дном, свободно закрывающийся кону-

сообразной крышкой с отверстием для термометра. Снаружи цилиндр покрыт асбестом или линолеумом. На дно кипятивника 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°C.

При однократном прогреве при температуре 100°C в течение 30 мин погибают вегетативные клетки, споры же многих микроорганизмов остаются жизнеспособными. После такого прогрева среду помещают на 24 ч в термостат с температурой 28—30°C. Споры, сохранившиеся при первом нагревании, успевают за это время прорасти в вегетативные формы, которые при последующем нагревании погибают. Эту операцию повторяют 3 раза.

Стерилизация насыщенным паром под давлением — наиболее быстрый и надежный способ стерилизации, ве-

дущий к гибели самых устойчивых спор. Этим методом стерилизуют большинство питательных сред, посуду. Обработку насыщенным паром проводят в герметически закрытом котле — автоклаве (рис. 7). На массивной крышке или сбоку котла есть кран для выхода пара, манометр и предохранительный клапан. Манометр показывает давление пара внутри котла. Для предотвращения взрыва при превышении предельного давления предохранительный клапан устанавливают так, чтобы дать выход пару.

Показателям манометра в физических атмосферах соответствует определенная температура:

Давление (в атм*)

Температура (в °C)

0,5	115
1,0	120
1,5	127
2,0	133

* В настоящее время давление принято выражать в паскалях, 1 физическая атмосфера = 1,01325 · 10⁵ Па ≈ 10² кПа.

Надежная стерилизация достигается нагреванием при 120°C (давление 1 атм) в течение 20 мин.

Стерилизацию ведут следующим образом. Наливают воду в автоклав, помещают в него стерилизуемые предметы, завинчивают крышку 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 его на этом уровне в течение 20—30 мин. Затем нагрев прекращают, ждут, пока стрелка манометра дойдет до 0, осторожно открывают кран и спускают пар. Только потом отвинчивают крышку автоклава. Если кран будет открыт раньше, чем упадет давление, то жидкость в стерилизуемых сосудах закипит и вытолкнет из них пробки.

Автоклав можно использовать и для дробной стерилизации текучим паром. В этом случае крышку не завинчивают, чтобы оставался свободный выход пара.

Пастеризация — неполная или частичная стерилизация (нагревание при 65—80°C в течение 30 мин с последующим быстрым охлаждением до 10—11°C). Прием был предложен Пастером.

Стерилизация фильтрованием через мелкопористые фильтры применяется для обработки изменяющихся и легко портящихся от нагревания жидкостей. Через мелкие поры фильтра могут пройти только ультрамикробы (вирусы, бактериофаги).

Наиболее часто используют фильтры из каолина (полые цилиндры, закрытые с одной стороны). Чтобы жидкость прошла через такой фильтр, необходимо создать разницу давления по обе стороны цилиндра. Этого достигают нагнетанием или откачиванием воздуха с помощью масляных насосов.

Фильтр соединяют с приемником для жидкой среды, в качестве которого используют колбу Бунзена. Оття-

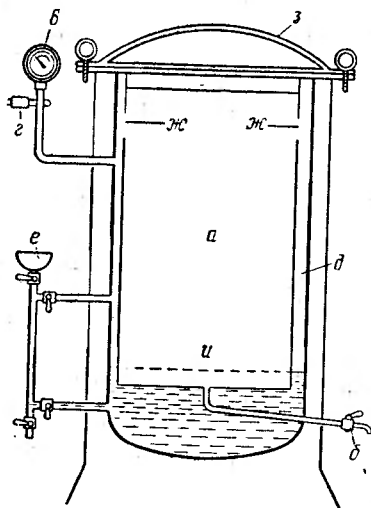


Рис. 7. Схема автоклава:

а — стерилизационная камера; б — кран для выхода воздуха; в — манометр; г — предохранительный клапан; д — водопаровая камера; е — воронка для заполнения автоклава водой; ж — отверстия для поступления пара в стерилизационную камеру; з — крышка автоклава; и — подставка для размещения стерилизуемых материалов.

нутый конец ее 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. Так как внутри фильтра давление будет ниже, чем над его поверхностью, жидкость под давлением будет проходить через фильтр в приемник. Бактерии останутся с внешней стороны фильтра.

Неудобство этого метода заключается в медленной фильтрации и необходимости частой очистки фильтров.

Материалы и оборудование. Мисо-пептонный бульон, агар-агар, лакмус красный, фенолфталеин, бромтимолблау, фарфоровые пластинки с лунками или чашки, стеклянные палочки, 20%-ный 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 (для демонстрации выставить пептон, желатину, агар-агар).

Глава VI

УЧЕТ ЧИСЛЕННОСТИ БАКТЕРИЙ И ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

1. УЧЕТ ЧИСЛЕННОСТИ БАКТЕРИЙ В ПОЧВЕ МЕТОДОМ ПИТАТЕЛЬНЫХ ПЛАСТИН (МЕТОД КОХА)

Почва обильно населена микроорганизмами и служит основным поставщиком их во все другие естественные среды.

В связи с большой гетерогенностью состава почвы для учета численности микроорганизмов в ней с исследуемого участка берут среднюю почвенную пробу (стр. 146). Пробу берут стерильным буром, стерильной лопатой и стерильным ножом в заранее подготовленные стерильные полиэтиленовые, пергаментные мешки или в стерильные широкогорлые банки, закрывающиеся корковыми пробками, обернутыми ватой. Бур, лопату и нож стерилизуют (фламбированием) в поле перед взятием образца. Тщательно отмытые предметы обжигают горящим спиртом и неоднократно погружают в почву. На мешок или банку наклеивают этикетку с указанием места взятия образца, горизонта, даты. До анализа и между определениями пробы хранят в холодильнике.

При определении численности бактерий в почве сначала готовят методом разведения суспензии, содержащие разные концентрации почвы в 1 мл (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}).

Для этого на стерильное часовое стекло стерильным фарфоровым шпателем или алюминиевой чайной ложкой берут из банки навеску почвы 1 г. Предварительно почву в банке тщательно перемешивают. Ложку и часовое стекло обжигают в пламени горелки. Чтобы при взвешивании почвы в нее не попали из воздуха бактерии, часовое стекло накрывают другим часовым стеклом.

Навеску почвы, соблюдая условия асептики, переносят в колбу на 250 мл с 99 мл стерильной водопроводной воды. Смесь взбалтывают в течение 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 из пробирки, чтобы максимально смыть клетки со стенок пипетки, и оставляют. Другой стерильной пипеткой берут из колбы еще 1 мл суспензии и помещают во вторую колбу, тоже содержащую 99 мл стерильной водопроводной воды, пипетку так же промывают и оставляют. Пробирку и вторую колбу взбалтывают 1 мин. В пробирке в 1 мл концентрация 10^{-3} г, а во второй колбе — 10^{-4} г. Точно так же переносят стерильными пипетками по 1 мл суспензии из второй колбы во вторую пробирку с 9 мл и в третью колбу с 99 мл стерильной водопроводной воды, готовят суспензии, содержащие соответственно в 1 мл 10^{-5} и 10^{-6} г почвы.

Для определения численности бактерий методом питательных пластин можно провести глубинный или поверхностный посев. Поверхностный посев более сложен и занимает больше времени. Поэтому для усвоения принципа подсчета численности бактерий методом питательных пластин на первых порах ограничимся проведением глубинного посева. Поверхностный посев будет использован при проведении общего микробиологического анализа почвы (глава X).

Чтобы определить, сколько клеток содержится в 1 мл суспензии каждого разведения, отдельными стерильными пипетками берут 1 мл суспензии из соответствующего разведения и переносят в стерильные чашки

Петри. На крышке чашки восковым карандашом отмечают разведения. Затем в каждую чашку с суспензией вливают расплавленный столбик мясо-пептонного агара, заранее приготовленный и разлитый в пробирки ($\frac{2}{3}$ объема их) из расчета один столбик на чашку. Температура расплавленного агара должна быть примерно 45°C . Ее устанавливают следующим образом: пробирку с расплавленным агаром прикладывают к щеке, если щека выдерживает температуру, столбик агара можно вылить в чашку Петри. Осторожным круговым вращением чашки агар перемешивают с суспензией. Чашки с застывшим агаром переворачивают вверх дном (чтобы избежать попадания на поверхность агара конденсационной воды с крышки), и помещают в термостат при $28-30^{\circ}\text{C}$.

Клетки микроорганизмов, попав в питательную среду, начинают размножаться и образуют колонии, видимые невооруженным глазом. Через 48 ч инкубации чашки вынимают из термостата и в них подсчитывают число колоний. Окончательно подсчитывают колонии на 5-е сутки.

Чтобы подсчитать число бактерий в 1 г сырой почвы, число колоний на чашке умножают на степень разведения (число, показывающее, во сколько раз в каждом конкретном случае разбавили 1 г почвы). При умножении числа колоний на степень разведения во всех случаях, казалось бы, должно получиться примерно одинаковое число зародышей в 1 г почвы. Однако практически это не совсем так.

Иногда может оказаться так много клеток, что при развитии микроорганизмов колонии сольются; это часто наблюдается в чашках при разведении 10^{-2} . Редко в чашках с суспензией из высоких разведений вырастают единичные колонии (меньше десяти), которые могут образоваться от случайно попавших клеток из воздуха. Поэтому при подсчете цифры могут сильно отклоняться, и результат будет недостоверным. Для правильного учета подсчитывают только такие чашки, в которых колоний свыше десяти и не более 200 (в последнем случае при условии, если колонии мелкие).

Чашки просматривают в проходящем свете, и, чтобы дважды не подсчитывать одни и те же колонии, их отмечают чернилами или тушью. Чтобы не упустить мелкоточечные колонии, чашки дополнительно просмат-

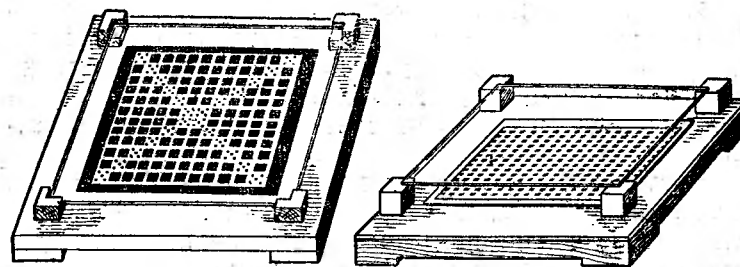


Рис. 8. Камера Вольфюгеля.

ривают с лупой. Можно использовать специальный прибор для подсчета колоний.

В лабораторной практике встречаются случаи, когда в последнем разведении (10^{-6}) число колоний значительно больше 200. В этих случаях посев желательнее повторить, увеличив число разведений. Если, однако, новый посев осуществить невозможно, чашки подсчитывают, но исследователь может получить представление лишь о минимальном количестве микроорганизмов в почве. Для подсчета большого числа колоний (более 200) используют счетную камеру Вольфюгеля (рис. 8). Перевернутые вверх дном чашки Петри помещают на подставку камеры и накрывают стеклянной пластинкой, на которой нанесены квадратные сантиметры или более мелкие единицы. Число колоний подсчитывают в разных местах чашки в 20—25 квадратах, выводят среднее арифметическое на 1 см^2 и делают пересчет на общую площадь чашки, равную площади круга (πR^2).

Метод питательных пластин легковосполним, но имеет ряд недостатков. Существенным из них является отсутствие универсальной среды, на которой развивались бы все бактериальные зародыши, обитающие в почве. Питание у бактерий специфично, и на каждой среде выявляется довольно узкая группа микроорганизмов. Так, на МПА развиваются в основном бактерии, способные усваивать органические формы азота. Нитрифицирующие, целлюлозоразрушающие, азотфиксирующие и другие микробы на этой среде не выявляются. Для более полного представления о населенности почвы делают посевы также и на специальные избирательные среды или используют метод прямого подсчета микроорганизмов под микроскопом.

При методе питательных пластин возможен и неполный учет клеток в образце в связи с тем, что в одном месте на агаре может застыть не одна, а несколько клеток. Изолированные на агаре в одном месте клетки размножаются, их колонии сливаются, создавая впечатление только одной.

Частично можно внести поправку в счет колоний. Для этого из колонии с неоднородным характером роста готовят окрашенный препарат. Если под микроскопом обнаружатся разные формы (кокки, палочки, сарцины), то вносят поправку и колонию считают не за одну, а за три. Если же все клетки одинаковые, то считают, что колония произошла от одной клетки, хотя в этом месте одинаковых клеток могло быть 5, 10 и больше.

Для сравнения численности бактерий в разных почвах необходимо подсчитать их количество на 1 г абсолютно сухой почвы. С этой целью одновременно со взятием навески почвы для приготовления разведений в отдельный металлический или стеклянный бюкс берут навеску почвы (5—10 г) для определения влажности ее. Сушат почву при 105°C до постоянной массы. Затем число клеток в 1 г сырой почвы надо разделить на навеску абсолютно сухой почвы, содержащейся в 1 г сырой почвы.

Пример. В 1 г сырой почвы содержится 5600 клеток. При влажности почвы 30% это число клеток будет соответствовать 0,7 г абсолютно сухой почвы. Для определения численности клеток в 1 г абсолютно сухой почвы составляют пропорцию:

$$0,7 \text{ г} - 5600 \quad x = \frac{5600}{0,7} = 8000.$$

$$1 \text{ г} - x$$

Таким образом, нами подсчитано, что в 1 г абсолютно сухой почвы содержится 8 тыс. клеток.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА БАКТЕРИЙ

Колонии на чашке сначала группируют по культуральным признакам. К ним относятся: 1) цвет колонии (белый, серый, розовый, желтый, зеленый и т. д.); 2) форма колоний (округлая, амёбовидная, ризоидная, плоская) (рис. 9, а); 3) размеры колонии (10 мм и более в диаметре — крупная, от 1 до 10 мм — средняя,

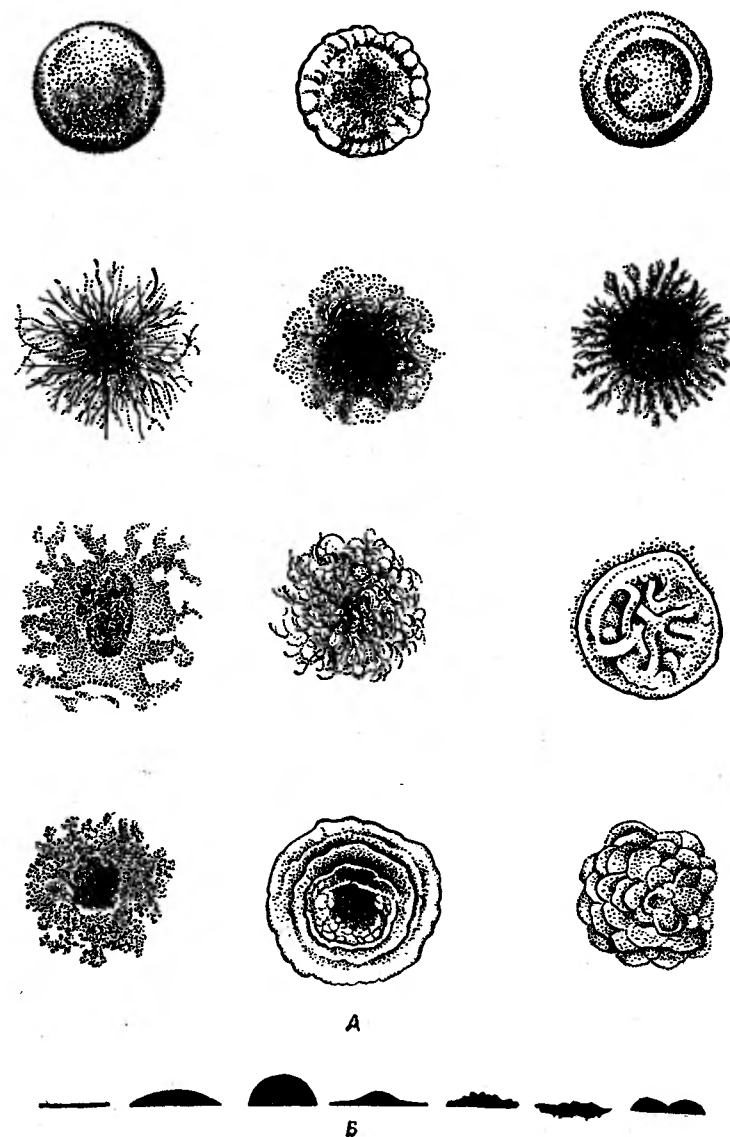


Рис. 9. Характер роста колоний на питательном агаре: А — вид колоний сверху; Б — в профиль.

1 мм — точечная); 4) поверхность (гладкая, шероховатая, складчатая, сухая, морщинистая, блестящая, в виде мучнистой присыпки); 5) профиль (конусовидный, плоский, выпуклый, кратерообразный) (рис. 9, б); 6) край колонии (ровный, волнистый, лопастный, зубчатый, бахромчатый); 7) консистенция (тестообразная, пастообразная, водянистая, тянущаяся, плотная, мажущаяся, маслянистая, пленчатая). Консистенцию колонии устанавливают прикосновением к ее поверхности микробиологической петлей или иглой.

Из каждой группы готовят препарат и определяют, к какому роду они относятся. В отдельных случаях можно установить и видовую принадлежность их.

Из общего числа микроорганизмов, развивающихся на МПА, выделяют следующие роды: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Actinomyces* (*Streptomyces*).

Характерная особенность *Pseudomonas* — образование сине-зеленого или желто-зеленого флуоресцирующего пигмента. У некоторых пигмент диффундирует в субстрат. Колонии круглые, неправильной формы, плоские и выпуклые, слизистые и пастообразные, просвечивающие, бесцветные или пигментированные (грязно-белые, синие, сине-зеленые, красные, желтые, бурые и черные). Клетки неспороносные прямые, часто с заостренными концами, размеры клеток $0,3-0,7 \times 0,3-1,5$ мкм.

Представители рода *Flavobacterium* образуют колонии (2—3 мм в диаметре), чаще круглые, гладкие, желтого цвета (за счет каротиноидных пигментов, не диффундирующих в среду). Клетки мелкие ($0,3-0,25 \times 1-4,0$ мкм), слегка искривленные (для них характерен снаппинг-тип обособления).

Виды рода *Achromobacter* образуют мелкие, круглые, гладкие мажущиеся или шероховатые сухие, белого или серого цвета колонии. Палочки $0,5-2,3 \times 0,1-1,0$ мкм.

Виды *Micrococcus* образуют, как правило, мелкие колонии (2—4 мм в диаметре). Матовые, влажные, блестящие, маслянистые, плоские, выпуклые, гладкие, зернистые, мелкоскладчатые, пастообразной или слизистой консистенции. Клетки шаровидные, $0,2-1,5$ мкм в диаметре.

У рода *Sarcina* колонии средних размеров, круглые, выпуклые, плоские, гладкие, зернистые, бугристые или

складчатые, матовые или жирноблестящие, белые, белоснежные, желтые, лимонно-желтые, иногда розовые, красные, клетки сферические, образуют скопления кубической формы.

У рода *Mycobacterium* колонии средние, круглые, приподнятые, мягкие, пастообразные, слизистые (растекающиеся по субстрату). Иногда они сухие, крошащиеся, бугристые, складчатые, матовые, блестящие, бесцветные или окрашенные (красные, оранжевые, желтые, зеленые, синие, бурые, черные), пигменты в субстрат не выделяются. Молодые клетки ветвистые или угловатые с неправильными контурами палочки ($3-7-0,7$ мкм). С возрастом палочки распадаются на овальные и кокковидные клетки. Обособление делящихся клеток происходит по снаппинг-типу.

К роду *Bacillus* относятся палочковидные бактерии, характеризующиеся бациллярным типом спорообразования (в период формирования споры сохраняется палочковидная форма или наблюдается небольшое утолщение).

По характеру роста колоний на МПА можно определить и видовую принадлежность бацилл (см. рис. 10).

У *Bac. subtilis* колонии сухие мелкоморщинистые, бархатистые, бесцветные или розовые, сростающиеся с агаром; край колонии волнистый или слегка волнистый (рис. 10, в), палочки $3-5 \times 0,6$ мкм.

Bac. mesentericus образуют тонкие, сухие, морщинистые, серовато-белые или желто-бурые колонии, сростающиеся с агаром (рис. 10, б). Палочки $3-10 \times 0,5-0,6$ мкм.

У *Bac. mycoides* (рис. 10, а) колонии стелющиеся по агару, грибовидные, палочки $3-5 \times 0,6$ мкм.

Bac. megaterium образуют гладкие, матовые, блестящие, белые или кремовые, выпуклые или слегка приподнятые колонии с концентрическими кругами; края резко очерчены или слегка волнистые; клетки $1,2-2 \times 3-10$ мкм.

Bac. cereus образуют плоские, мелкобугристые (крупитчатые), слегка вогнутые, матовые, с волнистыми краями колонии. Палочки $1,0-1,5 \times 3-5$ мкм.

У *Bac. idosus* колонии желтовато-серые, полусухие, морщинистые, целиком снимающиеся с поверхности агара (рис. 10, г). Палочки $2-3 \times 0,6$ мкм.

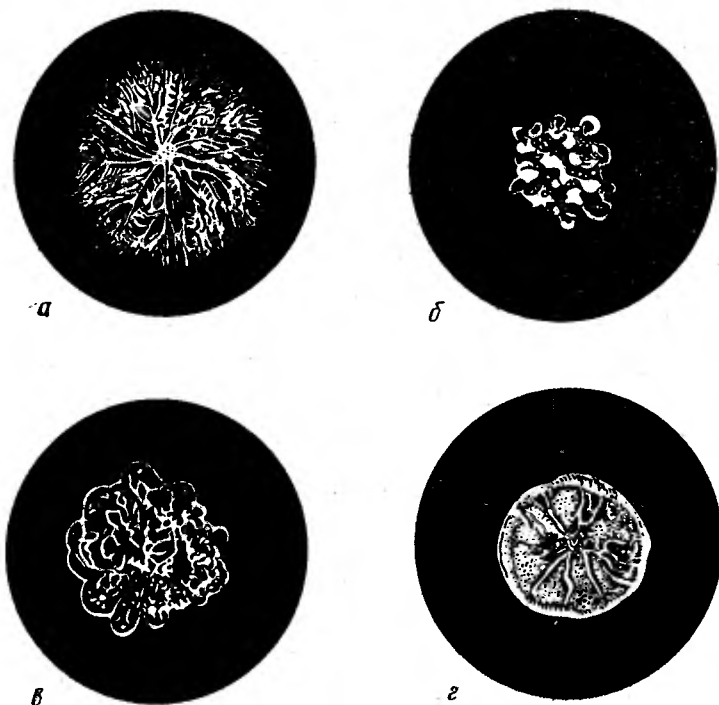


Рис. 10. Формы колоний спорообразующих бактерий: а — *Bac. mycoides*; б — *Bac. mesentericus*; в — *Bac. subtilis*; г — *Bac. idosus*.

Bac. agglomeratus образуют мелкие, белые или серовато-белые, плоские, нежные, гомогенные колонии. Палочки $3-6 \times 0,4-0,5$ мкм.

Bac. virgulus дают колонии слизистые, сероватые, тянущиеся. Клетки $4-10 \times 0,7-0,8$ мкм.

Bac. brevis образуют белые, иногда с желтоватым оттенком, выпуклые или плоские, блестящие колонии маслянистой консистенции, с зубчатым краем. Клетки $3-5 \times 0,7-1,0$ мкм. Споры расположены на концах клеток и слегка ее утолщают.

У *Bac. polymyxa* колонии бесцветные, плоские или выпуклые, гладкие и слизистые, края пальчатые. Палочки размером $2,0-7,0 \times 0,6-1,0$ мкм. При спорообразовании лимонovidно раздуваются.

Bac. asterosporus образуют белые или сероватые с

зеленоватым отливом, плоские, нежные, слизистые гомогенные колонии. Палочки $3-7 \times 1,0-1,2$ мкм. Споры расположены в центре клетки и слегка раздувают ее.

Виды рода *Actinomyces-Streptomyces* (лучистые грибки) образуют плотные кожистые колонии различной структуры (гладкие, бугристые, складчатые, бородавчатые) с мучнистым налетом. Колонии срастаются с субстратом и состоят из несептированных ветвящихся нитей.

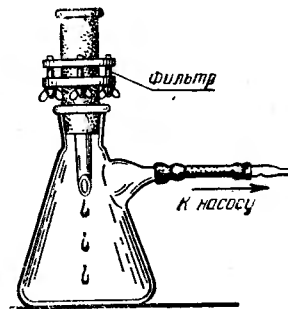


Рис. 11. Фильтр Зейтца.

3. УЧЕТ ЧИСЛЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ВОДЕ И ДРУГИХ ЖИДКОСТЯХ

Если жидкости содержат значительное количество бактерий, их можно учитывать также методом питательных пластин.

Стерильной пипеткой берут 1 мл исследуемой жидкости и готовят методом разведения разные концентрации. Количество бактерий определяют на 1 мл.

Если обсемененность жидкости микроорганизмами очень низкая, число клеток учитывают прямым счетом под микроскопом на мембранном фильтре. Определенный объем жидкости, используя фильтр Зейтца (рис. 11), пропускают через мембранные фильтры*.

Бактерии на фильтре фиксируют 40%-ным формалином 10 мин, красят эритрозинем в продолжение 30-60 мин, иногда более (до суток). Лишнюю краску смывают водой, сушат при температуре 30-40°C. Перед микроскопированием высушенные фильтры смачивают кедровым маслом (фильтр становится прозрачным). Препарат просматривают с иммерсионной системой. Определяют число зародышей в поле зрения. Таких по-

* Мембранные фильтры готовят из коллодия, ацетата, целлюлозы и других материалов. Это диски толщиной около 0,1 мм; отечественные мембранные фильтры диаметром 35 мм. В зависимости от размеров пор они обозначаются: № 1, 2, 3, 4 и 5; средний диаметр их соответственно равен (в мкм): 0,35, 0,5; 0,7; 0,9; 1,2. Для стерилизации жидких сред используют фильтр № 1.

лей зрения для большей достоверности подсчитывают 100, затем выводят среднее арифметическое на одно поле. После этого пересчитывают количество зародышей на общую рабочую площадь мембранного фильтра.

Устанавливают, сколько полей зрения помещается на рабочей площади мембранного фильтра, деля P на p , где P — рабочая площадь мембранного фильтра, а p — площадь поля зрения.

Так как P и p — площади круга, то эти величины находят по формуле πR^2 . Диаметр поля зрения измеряют объектным микрометром, а диаметр рабочей площади фильтра — с помощью миллиметровой бумаги.

Полученное число клеток на фильтре делят на объем пропущенной через фильтр жидкости и получают число зародышей в 1 мл воды или другой жидкости.

4. УЧЕТ ЧИСЛЕННОСТИ БАКТЕРИЙ В ВОЗДУХЕ

При определении численности микроорганизмов в воздухе в пробирку с 10 мл стерильной водопроводной воды пропускают определенный объем воздуха. Для этого пробирка с водой закрывается стерильной пробкой с двумя стеклянными трубками. Одна трубка, сообщающаяся с воздухом, опускается в воду до дна пробирки, а другая трубка, соединенная с аспиратором, оканчивается сразу под пробкой. По количеству воды (в л), выпущенной из аспиратора, устанавливают объем воздуха, прошедшего через стерильную воду в пробирке. При прохождении воздуха через воду бактерии остаются в воде. Их численность затем определяют так же, как и в воде, после приготовления соответствующих разведений методом питательных пластин, или последующей фильтрацией через мембранные фильтры, подсчитав число зародышей на чашке или на мембранных фильтрах. Зная объем воздуха, прошедшего через воду, делают потом пересчет численности бактерий на 1 м^3 воздуха.

Для определения численности бактерий в воздухе можно использовать более простой, но менее точный метод Коха (осаждением зародышей 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 в силу тяжести оседают на поверхность плотной среды.

После 48-часовой инкубации при $28\text{--}30^\circ\text{C}$ осевшие бактерии образуют колонии на среде, и их можно подсчитать. Учитывая, что некоторые микроорганизмы развиваются медленно, окончательный подсчет проводят на пятые сутки.

По приблизительному расчету, на площадь в 100 см^2 в течение 5 мин осаждаются примерно столько бактериальных зародышей, сколько находится в 10 л воздуха ($0,01 \text{ м}^3$). Зная площадь чашки Петри, по этим данным можно подсчитать число микробных клеток в 1 м^3 воздуха. Для этого число колоний, выросших в чашке Петри, относят к общей площади чашки, затем пересчитывают, сколько таких колоний поместилось бы на 100 см^2 и переводят на 1 м^3 воздуха.

Пример. В чашке Петри диаметром 10 см выросло 45 колоний. Площадь чашки $3,14 \cdot 5^2 = 78,5 \text{ см}^2$. Чтобы подсчитать число клеток на 100 см^2 (равнозначных 10 л, или $0,01 \text{ м}^3$ воздуха), составляют пропорцию ($78,5 \text{ см}^2 : 45 = 100 \text{ см}^2 : X$):

$$X = \frac{100 \cdot 45}{78,5} = 57.$$

Таким образом, в $0,01 \text{ м}^3$ воздуха находится 57 зародышей, а в 1 м^3 будет в 100 раз больше (5700).

При проведении анализа чашки Петри с агаром размещают попарно, затем выводят среднее арифметическое из двух или трех чашек.

Для определения качественного состава микроорганизмов, колонии на чашках группируют по культуральным признакам, из каждой группы готовят препараты и микроскопируют их.

По морфологическим и культуральным признакам устанавливают род, а в отдельных случаях и вид бактерий.

Если чашки выдерживают в разных помещениях в одно и то же время, то относительно можно судить о чистоте воздуха каждого помещения. Чем больше пыли в воздухе, тем больше в нем микроорганизмов. По данным А. Ф. Войткевича, в Арктике под 70° с. ш. в 1 м^3 воздуха обнаруживается от 1 до 10 клеток. Морской воздух в таком же объеме содержит 1—2 клетки, городской парк — 200, городская улица — 5 тыс., жилое помещение — 20 тыс., скотный двор — 1—2 млн.

5. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ

Чистой культурой бактерий называют культуру, полученную из одной клетки. Она необходима для изучения морфологических, физиологических особенностей организма и для установления видовой принадлежности (для таксономии). С этой целью сначала из различных мест обитания необходимо получить накопительную культуру, в которой преобладают представители данной группы микроорганизмов. Для этого создают селективные (избирательные) условия среды, обеспечивающие преимущественное развитие выделяемых микроорганизмов.

Чистая культура из накопительной может быть получена или из одной клетки, или из отдельной колонии. В последнем случае из накопительной культуры или после ее разведения делают высев на плотную среду по методу Коха.

Образовавшуюся на плотной среде колонию считают развившейся из одной клетки.

При выделении чистых культур аэробных микроорганизмов высев из накопительной культуры проводят на поверхность плотной среды. Нанесенную каплю накопительной культуры (или из соответствующего разведения ее) осторожно распределяют стерильным стеклянным шпателем по поверхности плотной среды, после чего этим же шпателем протирают поверхность среды последующих 3—4 чашек.

Чашки выдерживают от 2 до 7 суток, так как скорость роста различных микроорганизмов неодинакова. Выросшие изолированные колонии отсеивают петлей в пробирку 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 проводят методом глубинного посева.

Выделение чистой культуры анаэробных микроорганизмов по методу Коха требует создания условий, ограничивающих доступ кислорода к культуре.

Выделение чистой культуры из одной клетки. Для получения чистой культуры из одной клетки можно использовать капельный метод Линднера, микроманипулятор или микроселектор Перфильева.

Капельный метод используют при работе с крупными микроорганизмами (дрожжи, плесневые грибы, водоросли).

Накопительную культуру разводят в стерильной среде с расчетом, чтобы в одной капле были единичные клетки. Затем на поверхности стерильного покровного стекла готовят висячую каплю, нанося ее на стекло стальным пером, и микроскопируют ее. При этом отмечают висячую каплю, в которой обнаружена только одна клетка, и помещают ее в стерильную чашку Петри, на дне которой находится увлажненная фильтровальная бумага. После 12—24-часовой инкубации в термостате отмеченный препарат микроскопируют. Если в капле произошло размножение клетки, ее осторожно снимают с покровного стекла кусочком стерильной фильтровальной бумаги и переносят в пробирку со стерильной жидкой средой.

Микроманипулятор (прибор, изобретенный Петерфи и Чамберс) снабжен точными механизмами, позволяющими выполнять очень тонкие операции, в частности захватить одну клетку бактерий специальной микроскопической пипеткой. Все операции на микроманипуляторе делают под микроскопом, который устанавливают между двумя операционными штативами. Штативы снабжены микроскопическими винтами, с помощью которых осуществляется движение держателей с микроинструментами (микропипетка, микроигла, микрошпатель, микроскальпели и т. д.).

Для того чтобы изолировать одну клетку, небольшую каплю взвеси исследуемой культуры наносят на стерильное покровное стекло. Край капли устанавливают в середину поля зрения микроскопа и рядом с ней наносят из пипетки каплю питательного раствора. Микропетлей набирают питательный раствор и подводят ее к капле с микроорганизмами, захватывают у края одну клетку, переносят в питательный раствор и выращивают чистую культуру.

Б. В. Перфильев сконструировал специальный прибор — микроселектор; наиболее существенной его частью является стеклянный микрокапилляр, имеющий прямоугольное сечение. Канал микрокапилляра хорошо просматривается под микроскопом даже с иммерсионным объективом. Стерильный капилляр заполняют исследуемой суспензией клеток и при большом увели-

чении микроскопа находят участок с одной клеткой. Специальным приспособлением этот участок капилляра под микроскопом (под контролем глаза) стерильно выбивают в приемник с питательным субстратом. Микроселектор Перфильева может быть использован для выделения как крупных, так и мелких микроорганизмов.

Кроме указанных, разработаны и другие методы. Многие из них описаны в практическом руководстве под редакцией Н. А. Красильникова (Изд-во МГУ, 1966).

Чистота культуры проверяется одновременно несколькими способами: визуальным, микроскопированием и посевом на питательных средах.

При визуальном контроле просматривается характер роста культуры на скошенном агаре. Если характер роста на поверхности скошенного агара однороден, то культура считается чистой. Если штрих неоднороден, культура считается загрязненной.

При микроскопическом контроле выбирают колонию с однородным характером роста и изолированную от других колоний и готовят фиксированный и окрашенный препарат, который просматривается под микроскопом с иммерсионной системой. Если в препарате все клетки морфологически однородны, культура считается чистой.

Чистоту культуры проверяют также посевом на ряд питательных сред, в том числе на мясо-пептонный агар. Однородность характера роста колонии свидетельствует о чистоте выделенной культуры микроорганизмов. Набор сред определяется особенностями выделяемых микроорганизмов и их возможных спутников.

Материалы и оборудование. При постановке опыта: свежие почвенные пробы в стерильных банках, проба навоза и навозной жижи, проба воды, часовые стекла, ложки алюминиевые чайные или шпатели, пинцеты, весы и разновесы, стеклянные или металлические бюксы, колбы емкостью 250 мл с 99 мл стерильной водопроводной воды, пробирки с 9 мл стерильной водопроводной воды, прибор для взбалтывания почвенных суспензий, стерильные пипетки Мора на 1 мл, пробирки со столбиком мясо-пептонного агара (2/3 объема), стерильные чашки Петри, восковые карандаши, водяная баня, бумажные этикетки.

При анализе опыта: чашки с посевом, лупы, счетная камера Вольфганга, микроскопы, иглы, пробирки со скошенным мясо-пептонным агаром, восковые карандаши и все необходимое для микроскопирования.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДА БАКТЕРИЙ

При определении вида бактерий учитывают морфологические, культуральные, биохимические и физиологические признаки.

Морфологические признаки: форма, размеры, расположение (у палочковидных отмечают еще концы клеток), способность к движению и характер размещения жгутиков, способность к спорообразованию, форма и расположение спор, наличие капсул и клеточных включений, отношение к окраске по Граму и кислотоустойчивость.

У актиномицетов важным морфологическим признаком являются также органы плодоношения (изучают их на среде Чапека с глюкозой и мелом); отмечают строение мицелия, характер его ветвления, форму спораносцев и спор.

Для изучения морфологических признаков микроорганизмы выращивают на синтетических и естественных средах.

Культуральные признаки: характер роста культуры на мясо-пептонном бульоне (или другой жидкой среде); характер роста колоний на мясо-пептонном агаре и других плотных средах (сусло-агаре и агаризованной синтетической среде).

При росте на МПБ и жидких средах отмечают: характер развития пленки (тонкая, сухая, складчатая, слизистая и цвет пленки); наличие мути (слабая, умеренная, сильная); наличие и характер осадка (обильный, плотный, хлопьевидный, цвет осадка).

Характер роста при посеве уколом* (отмечают в верхней, средней и нижней части укола).

При характеристике актиномицетов обращают особое внимание на пигменты и обусловленную ими окраску культуры (окраска колоний в целом, мицелия, воздушного мицелия и среды). Пользуются специальными пособиями (шкала цветов Бондарцева) для определения цвета. Значение имеют консистенция колонии (плотная, кожистая, рыхлая); поверхность (мучнистая, бархатистая) и запах (землистый, эфирный, фруктовый и т. д.).

*Иглу с культурой микроорганизмов вводят в столбик агара, находящийся в пробирке, и прокалывают его до конца.

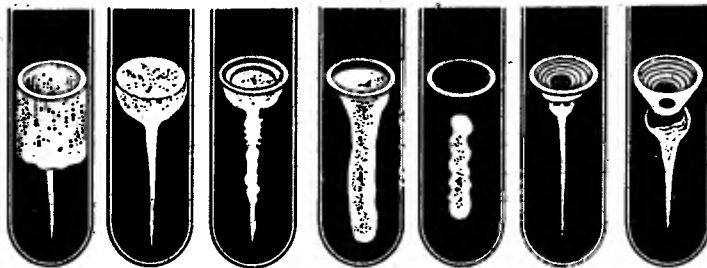


Рис. 12. Типы разжижения желатинь.

Физиолого-биохимические признаки. При изучении этих признаков микроорганизмов исследуют: ферментативную активность; отношение бактерий к различным источникам углерода и азота; продукты жизнедеятельности, накапливающиеся в среде (кислоты, спирты, газы); отношение к кислороду и щелочам; отношение к различным факторам внешней среды.

Ферментативная активность. При изучении биохимических особенностей культуры определяют активность протеиназ по разжижению желатинь (скорость и характер разжижения при уколе столбика желатинь, рис. 12); свертывание и пептонизацию молока (отмечается кислотное свертывание по покраснению синей лакмусовой бумаги с образованием устойчивого сгустка и коагуляции с последующей пептонизацией), а также пептонизацию без предварительного свертывания и скорость изменения молока; активность амилазы по величине зоны гидролиза крахмала (проба с раствором Люголя на 3—4-е сутки посева культуры штрихом на крахмало-аммиачном агаре); активность целлюлозы по степени распада клетчатки на среде Гетчинсона; активность β-фруктофуранозидазы (инвертазы) по гидролизу сахарозы (с помощью реактива Фелинга*); активность уреазы по накоплению аммиака (используется реактив Несслера), нитратредуктазы по восстановлению нитрата (на среде Гильтая) до нитрита (нитрит проверяют в кислой среде реактивом цинк-йод-крахмалом).

* Реактив Фелинга — щелочной раствор окиси меди (окисляет альдегидные соединения; окись меди переходит в закись в форме красного осадка).

У актиномицетов, кроме того, один из важных биохимических признаков — образование антибиотиков.

Отношение к источникам углерода. Для установления доступных источников углерода готовят синтетическую среду, содержащую (в г на 1 л дистиллированной воды):

(NH ₄) ₂ HPO ₄	3,0	CaCl ₂	0,1
KH ₂ PO ₄	2,0	FeCl ₃	0,01
NaCl	0,5	Смесь микроэлементов	по
MgSO ₄	0,3	М. В. Федорову	— 1 мл

К минеральной среде добавляют 1% источника углерода. Обычно испытывают: пентозы — арабиноза, ксилоза; гексозы — глюкоза, левулеза, галактоза (эти вещества стерилизуют при 100°C в кипятильнике Коха); дисахариды — сахароза, мальтоза, лактоза; полисахариды — декстрины, крахмал, клетчатка; соли органических кислот — муравьиная, уксусная, масляная, янтарная, щавелевая, щавелевоуксусная, яблочная, винная, лимонная, пировиноградная, глюконовая, салициловая, бензойная и протокатеховая; спирты — этиловый, глицерин, эритрит, маннит, дульцит; жиры и углеводороды.

Отношение к источникам азота. При испытании источников азота в основной минеральной среде аммоний фосфорнокислый заменяют двузамещенным фосфорнокислым калием (K₂HPO₄) и к среде добавляют глюкозу или другой доступный углевод в 1%-ной концентрации. В качестве источника азота обычно используют: альбумин, пептон, аспарагин, глицин и другие аминокислоты, мочевины, аммиачные, азотисто- и азотнокислые соли в количестве 0,1—0,2% объема питательной жидкости и молекулярный азот.

Изучение продуктов жизнедеятельности. При использовании источников углерода (в частности, углеводов) в качестве продуктов жизнедеятельности нередко образуются газы, кислоты и спирты.

Для обнаружения газов на твердых средах используют посев уколом в агаровую среду в пробирке (при появлении газов столбик агара разрывается) или в жидкую среду с перевернутыми вверх дном поплавками*.

* Поплавок — небольшая узкая пробирка (0,5×3—4 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) и количественно по титрованию их 0,1 н. щелочью. При наличии мела кислоты связываются в виде кальциевых солей, которые можно обнаружить добавлением к 5 мл среды 1 мл концентрированного раствора щавелевокислого аммония. В присутствии кислот выпадает белый осадок, нерастворимый в воде при подкислении уксусной кислотой. Образование спирта устанавливают при отгоне части субстрата с последующей пробой на спирт (реакция на появление йодоформа).

При изучении доступных источников азота в качестве продуктов жизнедеятельности часто появляется аммиак (проба с реактивом Несслера), сероводород и меркаптаны (проба с фильтровальной бумагой, смоченной уксуснокислым свинцом), индол (проба с азотистой кислотой), нитрит (проба с цинк-йод-крахмалом в кислой среде). Редуктазную способность исследуемых культур выявляют обесцвечиванием метиленовой сини.

Отношение бактерий к кислотам и щелочам. Для этой цели к питательной среде добавляют буферные смеси для поддержания соответствующего рН (для рН от 3,6 до 4,0 — цитратно-фосфатный буфер; от 4,5 до 9,2 — фосфатный; выше 9,0 — буферные смеси, состоящие из различных соотношений Na_2CO_3 и HCl , а также NaOH и K_2HPO_4). После 8—10 дней при 28—30°C по росту клеточной массы* устанавливают предельные значения рН, при которых еще возможно развитие бактерий.

Отношение к кислороду. Об отношении 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.

Устойчивость к различным факторам внешней среды (температуре, свету, концентрации солей, высушиванию и замораживанию). Для определения стойкости микроорганизмов к концентрациям солей выращивают культу-

ру на основной питательной среде с добавлением доступного источника углерода и азота и NaCl или Na_2SO_4 в разных концентрациях. После инкубации при температуре 28—30°C по росту 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 росту клеточной массы выявляют оптимальные, минимальные и максимальные температуры. Аналогично, создавая соответствующие условия, обнаруживают влияние других факторов внешней среды на развитие микроорганизмов.

Отношение бактерий к антибиотикам. Его можно выявить на агаровых пластинках методами агаровых блоков или штриха*.

В чашки Петри на агаровой питательной пластине, густо засеянной тест-организмом, накладывают агаровые блоки с антибиотиками. Для получения блоков с этими веществами на поверхность питательной среды (на которой выращивают продуцент антибиотиков) высевают сплошным «газоном» соответствующую культуру микробов.

После того как эти микробы разовьются и образуют антибиотические вещества, диффундирующие в толщу агара (бактерии на 4—5-е сутки, грибы на 6—8-е и актиномицеты на 8—10-е), стерильным пробочным сверлом вырезают агаровые блоки.

По окончании инкубации в термостате (время ее зависит от скорости роста тест-культуры) вокруг агаровых блоков с антибиотиками возникают зоны, где не наблюдается роста тест-организма. По диаметру зоны судят о его чувствительности к тем или иным антибиотикам.

При использовании метода штриха на питательный агар в чашки Петри по диаметру высевают культуру продуцента антибиотика. К выросшему организму вплотную подсевают перпендикулярно штрихи тест-культуры. Нечувствительные к антибиотику тест-культуры развиваются от края штриха продуцента. Чем чув-

* Рост клеточной массы можно определить по оптической плотности на ФЭК.

* Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов. Под редакцией Н. А. Красильникова. Изд-во МГУ, 1966.

ствительнее тест-организм к антибиотику, тем дальше он развивается от штриха.

Для продуцента антибиотиков актиномицетов важным признаком является специфика антагонизма и антимикробный спектр.

Глава VIII

ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ БЕЗАЗОТИСТЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Микроорганизмы в основном получают энергию при освобождении ее из безазотистых органических веществ. Только небольшая часть бактерий может использовать солнечную энергию или энергию окисления минеральных соединений. В зависимости от того, как освобождается энергия из энергетического материала, различают брожение (освобождение энергии, происходящее без доступа свободного кислорода) и дыхание (или окисление), когда выделение энергии происходит в аэробных условиях. В последнем случае энергия освобождается полностью и в качестве конечных продуктов окисления выделяются CO_2 и H_2O .

ПРОЦЕССЫ БРОЖЕНИЯ

Брожение сопровождается частичным высвобождением энергии, связанной в энергетическом веществе. Поэтому среди конечных продуктов всегда находятся продукты неполного окисления, содержащие запасы химической энергии, — спирт, молочная кислота и др. В зависимости от основного продукта, образующегося в ходе этих процессов, брожения получили соответствующие названия: спиртовое, молочнокислое, маслянокислое и др.

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

При изучении различных процессов, вызываемых микроорганизмами, удобно пользоваться методом селективных (избирательных) культур, разработанным С. Н. Виноградским (см. стр. 57—58).

1. СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ

Спиртовое брожение углеводов вызывается дрожжами, некоторыми видами бактерий (*Sarcina ventriculi* и др.) и отдельными представителями мукоровых грибов. Однако практическое значение имеют только дрожжи.

Дрожжи относятся к порядку первично сумчатых грибов *Protascales*. Они встречаются на поверхности растений, плодов, ягод, зерна, в воздухе, почве. Это одноклеточные, неподвижные организмы диаметром 8—10 мкм (диаметр бактериальной клетки 0,5—0,7 мкм). Клетки их круглой, овальной или несколько удлинённой формы. Содержат хорошо заметное под микроскопом ядро. В клетках встречаются различные включения: капли жира и волютина, сильно преломляющие свет, гликоген, зерна белковых веществ.

Дрожжи размножаются обычно бесполым путем: почкованием (*Saccharomyces* и др.) или реже делением (*Schizosaccharomyces*), но могут размножаться и спорами. Последние образуются или без предварительного слияния двух клеток, или им предшествует половой процесс.

При половом размножении происходит слияние содержимого двух клеток. Из образовавшейся зиготы развивается сумка, в которой формируются 1—12 спор, чаще 1—4. Если образованию спор не предшествует слияние двух клеток, то сумки со спорами возникают непосредственно из вегетативных клеток. Однако образование спор у дрожжей наблюдается редко. Их появлению способствует резкий переход культуры с богатого питательного субстрата на бедный при хорошей аэрации.

Среди дрожжевых грибов есть и такие, которые не образуют спор. Поэтому дрожжи подразделяют на спорообразующие (типичные) и неспорообразующие (нетипичные).

Дрожжи сбраживают углеводы (моно- и дисахариды) с образованием этилового спирта и CO_2 по уравнению:



В качестве источника азота используют пептоны, аминокислоты и аммонийные соли. Дрожжи дезаминируют аминокислоты. Освобождающийся в этом процессе азот потребляется ими, а образующиеся высокомолекулярные спирты составляют главную часть сивушных масел. Лучше всего дрожжи развиваются при кислой или слабокислой реакции (рН 4—6). Устойчивы к высоким концентрациям сахара (до 70%) и спирта (до 14%) в среде.

Спиртовое брожение лежит в основе винокурения, виноделия, пивоварения, хлебопечения.

В хлебопекарной промышленности дрожжи выполняют роль биологических разрыхлителей теста. При брожении образуется CO_2 , который увеличивает объем теста при выпечке хлеба. В хлебе появляется пористость. Большинство видов культурных дрожжей, используемых в бродильных производствах, принадлежит к роду *Saccharomyces*.

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

Для изучения спиртового брожения пользуются синтетической средой следующего состава (в объемных процентах):

сахароза	15,0
пептон	0,5
KH_2PO_4	0,3
$MgSO_4$	0,1

По М. В. Федорову, опыт ставят так. 100 мл среды наливают в эрленмейеровскую или плоскодонную круглую колбу емкостью 250—300 мл и вносят туда кусочек прессованных дрожжей (около 0,5 г). Колбу закрывают каучуковой пробкой, в которую вставлен затвор Мейссля с каучуковым клапаном Бунзена (рис. 13). Затвор легко пропускает выделяющийся при брожении углекислый газ, но задерживает пары воды. Это достигается тем, что газообразные продукты проходят в затворе через слой крепкой серной кислоты. На затвор надевается толстостенная каучуковая трубка, верхний конец ее закрыт стеклянной бусиной, а трубка имеет небольшой продольный надрез (клапан Бунзена). Клапан пропу-

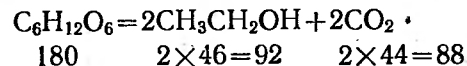
Рис. 13. Колба с затвором Мейссля для изучения спиртового брожения.

скает из колбы углекислый газ, но не дает возможности серной кислоте соприкасаться с наружным воздухом.

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

К условиям, способствующим развитию дрожжей, но препятствующим развитию других микроорганизмов, можно отнести следующие: 1) высокую концентрацию сахара; 2) слегка кислую среду за счет KH_2PO_4 ; 3) анаэробные условия; 4) накопление в процессе опыта значительного количества спирта. Сумма этих факторов делает среду селективной для дрожжей.

Определение CO_2 . Углекислый газ, образующийся при брожении, определяют по разности массы колбы при постановке опыта и после его окончания. Конец брожения устанавливают по прекращению газообразования. Брожение обычно продолжается 2—3 дня. Несмотря на то что колбу взвешивают только на технических весах, учет углекислого газа получается достаточно точный, так как его в процессе брожения выделяется много (на долю CO_2 приходится почти 50% сброженного сахара):



В опыте среда содержит 15 г сахара. Из этого количества может выделиться около 7—7,5 г CO_2 .

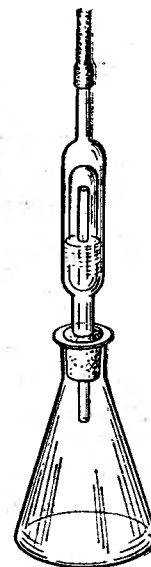
Расчет количества образовавшегося спирта и сброженного сахара. По массе выделившегося углекислого газа легко рассчитать количества образовавшегося спирта и сброженного сахара.

Например, образовалось 6 г CO_2 .

$$88 - 92 \quad 180 - 88$$

$$6 \text{ г} - X \quad Y - 6 \text{ г}$$

$$X = \frac{6 \cdot 92}{88} = 6,3 \text{ г спирта} \quad Y = \frac{6 \cdot 180}{88} = 12,3 \text{ сброженного сахара.}$$



Определение интенсивности брожения. Под интенсивностью брожения понимают количество сброженного сахара в процентах от исходного за определенный промежуток времени.

Если 100 мл среды содержат 15 г сахара, то 12,3 г сброженного сахара составят:

$$15 - 100\%$$

$$12,3 - X$$

$$X = \frac{12,3 \cdot 100}{15} = 82, \text{ т.е. интенсивность брожения равна } 82\%.$$

Микроскопическое изучение дрожжей. Познакомиться с морфологией дрожжей можно путем микроскопирования бродящей жидкости. Для этого стеклянной палочкой наносят каплю культуральной жидкости на предметное стекло, закрывают покровным стеклом и после нанесения капли кедрового масла микроскопируют с иммерсионной системой объектива. При микроскопировании препарата в раздавленной капле конденсор следует немного опустить.

При микроскопировании препарата следует искать клетки в стадии почкования и зарисовать их (рис. 14).

Определение этилового спирта. После взвешивания бродильных колб и определения CO_2 культуральную жидкость переносят в плоскодонную круглую колбу емкостью 700—800 мл для отгона этилового спирта.

Колбу, соединив с обратным холодильником, устанавливают на асбестовой сетке над газовой горелкой и начинают нагревать. Жидкость закипает. Спирт летит вместе с парами воды и, охлаждаясь в холодильнике, каплями стекает в приемную колбу. При анализе интересно получить несколько последовательных порций отгона. Для этого ставят 3—4 приемные колбы (в каждую набирают примерно 10—15 мл отгона).

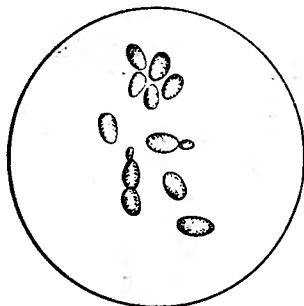


Рис. 14. Дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*) в стадии почкования.

Пробы из разных порций наносят на фарфоровую пластину и зажигают. Первые порции отгона горят интенсивнее, так

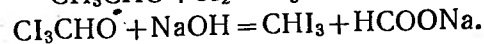
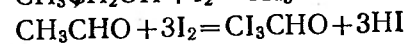
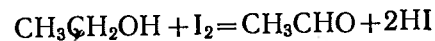
как они содержат больше спирта, чем последующие порции.

Первые две-три фракции используют для проведения качественных реакций на этиловый спирт.

Качественные реакции на этиловый спирт. Получение йодоформа (CHI_3). Реакция основана на том, что спирт с кристаллическим йодом в щелочной среде при нагревании до 60—70°C образует йодоформ.

Берут в пробирку 3—5 мл отгона, прибавляют столько же 20%-ного раствора Na_2SO_3 и около 0,1 г кристаллического йода в порошке. Смесь взбалтывают, нагревают на водяной бане при 60—70°C до полного растворения йода и его обесцвечивания. При охлаждении выпадают мелкие светло-желтые кристаллы йодоформа с характерным резким запахом.

Образование CHI_3 из спирта протекает по следующей реакции:



Из летучих органических соединений йодоформенную пробу дают уксусный альдегид и ацетон, в отсутствие которых в отгоне убеждаются с помощью фуксинсернистой кислоты или аммиачного раствора серебра. В присутствии альдегидов фуксинсернистая кислота краснеет, а аммиачный раствор серебра чернеет от выпадения металлического серебра.

Перевод спирта в уксусный альдегид с помощью двуххромовокислого калия. К 5 мл отгона прибавляют несколько капель 10%-ного раствора H_2SO_4 и небольшой кристалл $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. При слабом нагревании образуется уксусный альдегид (температура кипения 21°C). Для его обнаружения покрывают отверстие пробирки фильтровальной бумагой, смоченной аммиачным раствором азотнокислого серебра. При наличии спирта образуется уксусный альдегид и бумажка чернеет.

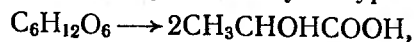
Материалы и оборудование. Питательная среда с сахарозой, дрожжи, плоскодонные колбы емкостью 250 мл с затвором Мейсля, весы и разновесы, цилиндры на 100 мл, этикетки, колба емкостью 700—800 мл, отгонный аппарат Либиха, микроскопы и все необходимое для микроскопирования, пробирки, 20%-ный раствор Na_2CO_3 , кристаллический йод, небольшой стеклянный шпатель и водяная баня с водой.

2. МОЛОЧНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ

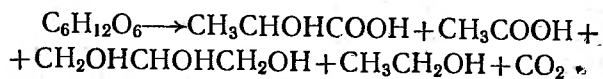
Молочнокислое брожение лежит в основе сидосования, квашения овощей, переработки молока в кисло-молочные продукты и сыр; кислый вкус черного хлеба определяется молочной кислотой. Это брожение вызывается группой молочнокислых бактерий, которая очень разнообразна и широко распространена в природе.

Молочнокислые бактерии обитают на поверхности растений, в молоке, на пищевых продуктах, в кишечнике человека и животных. Они имеют много общих признаков, важнейшие из них следующие: образуют молочную кислоту, положительно окрашиваются по Граму, обычно не образуют спор, неподвижны, кокки или палочки требовательны к источникам азота (многие не развиваются на простых синтетических средах), не образуют каталазу, которая расщепляет перекись водорода на воду и кислород. Если на колонию молочнокислых бактерий на питательной среде нанести каплю 3%-ного раствора перекиси водорода, выделения кислорода не наблюдается. Колонии бактерий, образующих каталазу, в этих условиях покрываются пузырьками кислорода.

Молочнокислые бактерии можно разделить на две группы: 1) гомоферментативные, образующие из сахара в основном молочную кислоту по уравнению:



2) гетероферментативные, которые наряду с молочной кислотой образуют значительные количества побочных продуктов:



Молочнокислые бактерии сбраживают моно- и дисахариды. Часто те из них, которые обитают в молоке, сбраживают лактозу, но не сбраживают или хуже сбраживают сахарозу. Молочнокислые бактерии, распространенные на растениях, лучше сбраживают сахарозу.

В качестве источника азота эта группа бактерий использует пептоны, смесь аминокислот. Требовательна к витаминам.

Для изучения молочнокислого брожения лучше всего в качестве питательной среды воспользоваться моло-

ком. В нем имеются все необходимые питательные элементы для развития молочнокислых бактерий. В этой среде могут хорошо развиваться и другие бактерии (гнилостные, маслянокислые), однако молочнокислые быстро подавляют их развитие вследствие накопления молочной кислоты.

Критические значения рН для развития разных групп бактерий:

Группа бактерий	рН
Молочнокислые	4,0—3,5
Маслянокислые	5,0—4,7
Гнилостные	5,5—5,0

Постановка опыта проста. Определив начальную кислотность молока (титрованием 0,1 н. NaOH 10 мл молока с добавлением 20 мл дистиллированной воды и 2—3 капель фенолфталеина), разливают его в эрленмейеровские колбы объемом 100 мл приблизительно по 40—50 мл, закрывают их ватными пробками. Параллельно осуществляют второй вариант опыта. Разлив молоко в колбы, закрывают их ватными пробками, ставят на асбестовые сетки и доводят молоко до кипения. Колбы с кипяченым и некипяченым молоком помещают в термостат при 30°C.

Через 10—12 ч свежее (некипяченое) молоко скисает. В колбе образуется ровный плотный сгусток без следов газа (если в опыте используется хорошее молоко). Сгусток получается вследствие того, что молочная кислота реагирует с казеином кальция и казеин выпадает в осадок.

В кипяченом молоке молочнокислые бактерии, поскольку они не образуют спор, погибают, споры же маслянокислых бактерий сохраняются. При инкубации в термостате они прорастают, осуществляют маслянокислое брожение лактозы. В результате реакции масляной кислоты с казеином кальция в этом варианте также выпадает казеиновая кислота. В дальнейшем она подвергается пептонизации; осадок переходит в кремовую жидкость с неприятным запахом масляной кислоты (запах пота) и прогорклым вкусом.

Микроскопическое исследование молочнокислых бактерий. Если простокваша долго сохраняется при комнатной температуре, то на ее поверхности появляется белая бархатистая морщинистая пленка. Такая же пленка

обычно наблюдается на поверхности рассола при квашении огурцов, капусты и других овощей. Это молочная плесень *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*), которая всегда сопутствует молочнокислому брожению и является нежелательным его спутником. Она окисляет молочную кислоту, образуемую молочнокислыми бактериями, до CO_2 и H_2O , и кислотность снижается. Кисломолочные и квашеные продукты начинают портиться, так как в этой среде получают развитие гнилостные бактерии.

Молочная плесень — аэробная форма, поэтому она развивается только на поверхности. Близко примыкает к дрожжам. Имеет многоклеточный мицелий, который распадается на отдельные клетки, так называемые оидии, по форме напоминающие дрожжи и служащие для размножения.

Для микроскопических наблюдений над молочнокислыми бактериями готовят препарат из прокисшего молока. Бактериологическую петлю вводят в сгусток и, повернув вокруг оси, извлекают, прикасаясь ею и к пленке. Сгусток размазывают на предметном стекле 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 параллельно эфиром извлекается и удаляется жир. Это необходимо, потому что капли жира на препарате мешают окраске и микроскопированию.

Фиксированный препарат окрашивают метиленовым синим в течение 2—3 мин, промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсией. Метиленовый синий — лучший краситель для молочнокислых бактерий в

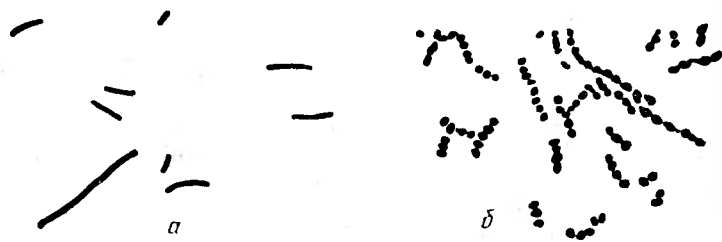


Рис. 15. Возбудители молочнокислого брожения: а — *Lactobacterium bulgaricum*; б — *Streptococcus lactis*.

молоке, так как он слабо окрашивает основной фон (казеин) и хорошо окрашивает клетки; получаются наиболее четкие препараты (рис. 15).

На препарате преобладают мелкие округлые клетки *Streptococcus lactis*, соединенные в короткие цепочки (рис. 15, б). Этот микроорганизм является возбудителем естественного скисания молока в наших широтах. Оптимальная температура его развития 30°C . Он накапливает до 1% молочной кислоты. Нередко на препарате наблюдаются тонкие палочки рода *Lactobacterium*, варьирующие в размере, иногда содержащие зерна волютина. Чаще встречается *Lactobacterium bulgaricum* (рис. 15, а) — возбудитель естественного скисания молока в южных широтах. Оптимальная температура его развития 40°C . Кислотоустойчив, накапливает до 3,5% молочной кислоты. На плотных средах этот микроорганизм образует мелкие характерные колонии в виде комочков ваты.

Если на поверхности прокисшего молока появилась пленка, то в мазке обнаруживается также и молочная плесень (рис. 16), четырехугольные или овальные клетки которой отличаются от молочнокислых бактерий своими размерами.

Определение накопившейся молочной кислоты. Количество ее определяют по разности миллилитров 0,1 н. NaOH , пошедшей на титрование молока в конце опыта и при постановке.

Для титрования берут 5—10 мл (лучше 10 мл) молока (свежего или прокисшего), помещают в колбу Эрленмейера емкостью 100 мл, добавляют двойное количество (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.

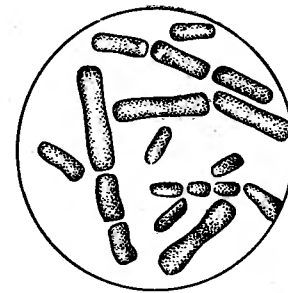


Рис. 16. Молочная плесень — *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*).

Кислотность молока выражают или в процентах молочной кислоты, или в градусах Тернера. 1°Т — это 1 мл 0,1 н. щелочи, пошедшей на титрование 100 мл. Следовательно, если на титрование 10 мл молока пошло какое-то количество щелочи, то для выражения кислотности молока в градусах Тернера (°Т) нужно это количество умножить на 10.

Чтобы выразить кислотность в процентах молочной кислоты, следует количество миллилитров 0,1 н. NaOH, потраченное на титрование 100 мл молока, умножить на 0,009, так как 1 мл 0,1 н. NaOH нейтрализует эквивалентное количество молочной кислоты.

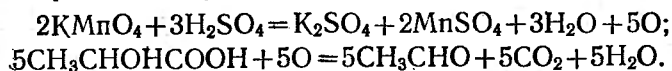
Молекулярная масса молочной кислоты равна 90. Для приготовления 1 л 1,0 н. раствора требуется 90 г этой кислоты. В 1 л 0,1 н. раствора содержится 9 г, а в 1 мл — 0,009 г молочной кислоты.

Качественные реакции на молочную кислоту. После определения титруемой кислотности оставшееся молоко (скисшее) отфильтровывают через бумажный складчатый фильтр. Фильтрат используют для качественной реакции на молочную кислоту.

Перевод молочной кислоты в уксусный альдегид. Молочная кислота в кислой среде при температуре кипения окисляется $KMnO_4$ в уксусный альдегид, который с аммиачным раствором серебра дает характерную реакцию «серебряного зеркала».

Реакцию проводят следующим образом. В коническую колбу емкостью 100 мл берут пипеткой 5 мл фильтрата, добавляют 2 мл крепкой серной кислоты и нагревают на асбестовой сетке при взбалтывании до начала кипения. Затем, продолжая кипячение и помешивание, пипеткой по каплям приливают 5 мл 5%-ного раствора $KMnO_4$, который обесцвечивается. В этих условиях молочная кислота переходит в уксусный альдегид.

Происходящую при этом химическую реакцию можно выразить следующими уравнениями:



Для распознавания уксусного альдегида быстро открывают горлышко колбы фильтровальной бумагой (можно часовым стеклом), смоченной аммиачным раствором $AgNO_3$ (аммиачный раствор азотнокислого се-

ребра 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). Этим раствором и смачивают фильтровальную бумагу. Аккуратно, чтобы не разорвать, прижимают ее к краям горла колбы, продолжая нагревание. Уксусный альдегид улетучивается и, реагируя с аммиачным раствором $AgNO_3$, вызывает почернение бумаги с серебристой побелостью. Выделяется металлическое серебро. Реакция вполне надежна.

Реакция с тиофеном. К 1—2 мл фильтрата в пробирке прибавляют 5 мл крепкой серной кислоты и 0,5 мл насыщенного раствора $CuSO_4$. Смесь взбалтывают, нагревают в течение 5 мин на водяной бане при 100°С и после охлаждения добавляют несколько капель 0,2%-ного спиртового раствора тиофена. В присутствии молочной кислоты получается вишнево-красное окрашивание. Реакция очень чувствительна и специфична.

Материалы и оборудование. Свежее молоко, колбы емкостью 100 мл, цилиндр объемом 100 мл, пипетки на 5 и 10 мл, 0,1 н. раствор NaOH, фенолфталеин, тρειожник с сеткой, микроскопы и все необходимое для приготовления препаратов, воронки, фильтры, 10%-ный раствор $AgNO_3$, 13%-ный раствор NH_4OH , серная кислота (плотность 1,84), 5%-ный раствор $KMnO_4$, метиленовый синий.

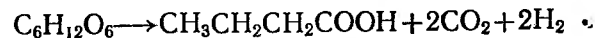
3. МАСЛЯНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ

Возбудители маслянокислого брожения — строгие анаэробы, подвижные палочки с клостридиальным или плектридиальным типом спорообразования.

По преобладанию тех или иных конечных продуктов маслянокислое брожение подразделяется на: 1) собственно маслянокислое брожение (брожение глюкозы, крахмала); 2) ацетонобутиловое брожение; 3) брожение пектиновых веществ.

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

Собственно маслянокислое брожение осуществляется по уравнению:



Кроме масляной кислоты, в процессе брожения в заметных количествах образуется уксусная кислота, а при смещении реакции в кислую сторону (до pH 5,5) — в больших количествах бутиловый спирт и ацетон.

Энергетическим материалом для маслянокислых бактерий служит крахмал, водорастворимые углеводы типа декстринов, ди- и моносахаридов, органические кислоты (молочная и пировиноградная) и спирты — маннит и глицерин. В качестве источника азота они используют самые различные азотистые соединения: пептон, аминокислоты, аммиачные соли, а некоторые даже атмосферный азот.

Характерная особенность маслянокислых бактерий — способность накапливать в клетках гранулы в период образования спор и перед ним.

Для изучения маслянокислого брожения можно воспользоваться питательной средой, состоящей из мясопептонного бульона с добавлением 3—5% глюкозы.

Чтобы в этой среде развивались преимущественно маслянокислые бактерии, следует создать в ней строго анаэробные условия и после заражения ее почвой нагреть до кипения. При нагревании споры маслянокислых бактерий остаются жизнеспособными, а попавшие спочвой неспорообразующие бактерии погибают.

Опыт ставят следующим образом. В колбу Вюрца объемом 250—500 мл наливают 30—50 мл питательной среды, вносят примерно 0,5 г почвы для заражения и четверть чайной ложки мела для нейтрализации образующейся в процессе брожения масляной кислоты. На асбестовой сетке нагревают колбу до кипения, не закрывая пробкой. Сняв колбу с огня, ее 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 масляному насосу Камовского; удобнее пользоваться последним), открывают винтовой зажим и выкачивают из колбы воздух (до появления пузырьков в среде). Затем каучуковую трубку зажимают винтовым зажимом и колбу ставят в термостат при температуре 30—35°C.

Для изучения маслянокислого брожения крахмала опыт ставят на среде с картофелем. Сырой неочищенный картофель нарезают мелкими кубиками, заполняют ими

$\frac{1}{3}$ высокой пробирки, добавляют немного мела (для нейтрализации масляной кислоты), заливают водопроводной водой на $\frac{2}{3}$ и помещают в водяную баню при температуре 80°C на 10 мин (для пастеризации). В среду не вносят ни почвы, ни маслянокислых бактерий, так как на кожуре картофеля споры их всегда имеются.

Элективные условия создаются следующими факторами: 1) крахмалом (источник углерода), используемым только микроорганизмами, содержащими фермент амилазу; 2) пастеризацией; 3) анаэробизмом — высокий столбик жидкости в пробирке и выделение в процессе брожения CO_2 и H_2 , вытесняющих воздух.

Через 2—3 дня картофель всплывает вверх вследствие бурно идущего газообразования.

По окончании брожения культуральную жидкость используют для микроскопирования 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, погрузив ее 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 (I+KI) и покрывают покровным стеклом, на которое помещают каплю кедрового масла. При микроскопировании препарата обнаруживаются клетки *Clostridium butyricum*, *Clostridium butylicum*, *Clostridium pasteurianum* (рис. 17) и других бактерий, имеющих подобную форму.

В клетках можно заметить овальные тельца, сильнее преломляющие свет. Это споры. В тех местах клетки, где содержится гранула, возникает синее окрашивание. Зарисовывают только окрашенные клетки, явно относящиеся к группе маслянокислых бактерий. Особенно хороший материал для микроскопических 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 вслед-

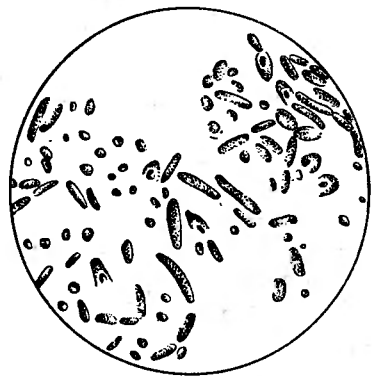
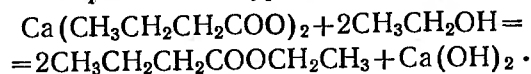


Рис. 17. Маслянокислые бактерии *Clostridium butyricum*.

ет буровато-коричневое окрашивание, а в проходящем свете — кроваво-красное.

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 крепкой серной кислоты. При взбалтывании и нагревании появляется характерный запах эфира (запах ананаса).

Реакция протекает по уравнению:



Материалы и оборудование. Мясо-пептонный бульон; глюкоза; картофель; мел; колбы Вюрца; каучуковые пробки; винтовые зажимы; каучуковые трубки; водоструйный или масляный насос Камовского; пробирки; пипетки; водяная баня; раствор Люголя (I+KI); 5%-ный раствор хлорного железа; предметные и покровные стекла; микроскопы.

4. БРОЖЕНИЕ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Пектиновые (межклетные) вещества (греч. *pectus* — студень) 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 пектиновое брожение нашло широкое

применение при технической обработке волокнистых растений.

Пектин разрушается микроорганизмами, содержащими фермент пектиназу. Химизм брожения пектиновых веществ состоит из двух последовательно идущих стадий. В первой стадии осуществляется гидролиз пектиновых веществ до сахаров, во второй происходит дальнейшее сбраживание отдельных продуктов гидролиза (галактозы и арабинозы) до масляной кислоты, CO_2 и H_2 или H_2O .

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

Для знакомства с брожением пектиновых веществ можно поставить следующий опыт. Снопик льняной соломой высотой 6—7 см перевязывают в двух местах ниткой и вносят в пробирки, лучше большего размера, чем стандартные. Пробирки наполняют на $\frac{2}{3}$ водопроводной водой, зажимают пинцетом и кипятят на горелке 2—3 мин для удаления экстрактивных (легко сбраживаемых) веществ, которые могут служить источником углерода для других маслянокислых бактерий. Вода приобретает желто-зеленый цвет. Ее сливают. Наполнив пробирку вновь водопроводной водой, вторично кипятят несколько минут и снова сливают жидкость. Так поступают 5—6 раз. После последнего кипячения жидкость не сливают. Охлаждают пробирку под краном и в снопик вводят свежий стебель, не подвергавшийся нагреванию.

Пробирку со снопиком ставят в термостат при 30—35°C. Через 2—3 дня в ней начинается брожение, а через 5—8 дней оно заканчивается.

Накопление в культуральной жидкости масляной кислоты (наряду с уксусной кислотой, возникающей при гидролизе пектина) можно обнаружить с помощью качественных реакций.

Микроскопирование возбудителей брожения пектиновых веществ. Извлекают снопик из пробирки, берут из середины его несколько соломинок и выжимают из них немного жидкости на предметное стекло. Добавляют

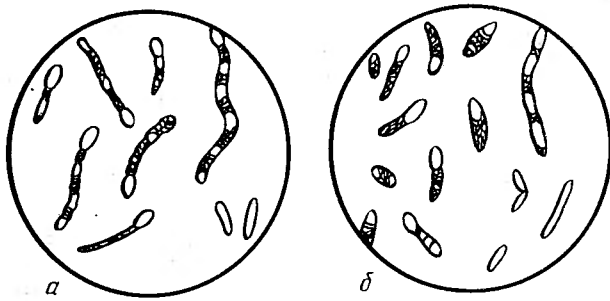


Рис. 18. Возбудители брожения пектиновых веществ
а — *Clostr. pectinovorum*; б — *Clostr. felsineum*.

каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют с иммерсионной системой.

На препарате обычно выявляются крупные палочковидные бактерии с плектридиальным типом спорообразования (барабанная палочка) и прерывистым расположением гранулы, окрашенной в синий цвет. Это *Clostridium pectinovorum* (рис. 18).

Нередко на препарате обнаруживается *Clostridium felsineum* — палочки меньшего размера, сигарообразной формы со спорой на конце. Гранула может заполнять всю вегетативную часть клетки.

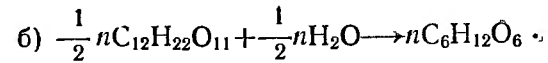
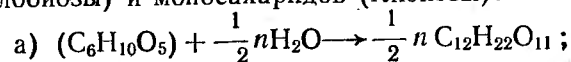
Материалы и оборудование. Льняная солома; пробирки; ножницы; водяная баня; раствор Люголя (I+KI); 5%-ный раствор хлорного железа; пипетки; пинцеты, скальпели; предметные и покровные стекла; микроскопы.

5. БРОЖЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

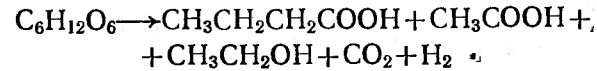
Целлюлоза (клетчатка) разрушается в анаэробных условиях под влиянием различных анаэробных спорообразующих бактерий, распространенных в почве, навозе, на разлагающихся растительных тканях, в рубце жвачных животных.

Упрощенная схема анаэробного разложения целлюлозы может быть представлена в виде следующих реакций.

I. Гидролиз целлюлозы и образование дисахаридов (целлобиозы) и моносахаридов (глюкозы):



II. Сбраживание моносахаридов (глюкозы):



Опыт по брожению целлюлозы ставят таким образом: в круглую плоскодонную колбу вносят около 1—2 г фильтровальной бумаги (или вату), нарезанной мелкими полосками, и заливают доверху средой следующего состава (в %):

KNH_4HPO_4	0,2	пептон	0,1
KH_2PO_4	0,1	$MgSO_4$	0,05
$CaCl_2$	0,03	$CaCO_3$	0,5

Среду заражают небольшим количеством почвы и закрывают колбу корковой пробкой с отверстием для выхода газов.

Элективные условия в данном случае определяются следующими факторами: 1) клетчаткой (источник углерода), которая может потребляться только специфичными целлюлозоразлагающими бактериями, имеющими фермент целлюлазу; 2) анаэробизмом.

Пептон, введенный в среду в небольшом количестве, практически не нарушает элективности среды, но сильно стимулирует процесс.

Через несколько дней при температуре 30—35°C начинается брожение клетчатки, которое длится 2—3 недели. Фильтровальная бумага по мере сбраживания слегка ослизнется, желтеет и постепенно разрушается бактериями.

Для получения накопительной культуры термофильных целлюлозоразлагающих бактерий можно пользоваться питательной средой следующего состава (в г на 1 л водопроводной воды):

$NaNH_4HPO_4$	1,0	$MnSO_4$	следы
KH_2PO_4	0,5	$FeSO_4$	»
K_2HPO_4	0,5	пептон	0,5
$MgSO_4$	0,4	$CaCO_3$	0,5
$NaCl$	0,1		

На дно длинных пробирок помещают полоски фильтровальной бумаги слоем 1,5—2 см, заливают средой на $\frac{2}{3}$ и заражают небольшим количеством конского наво-

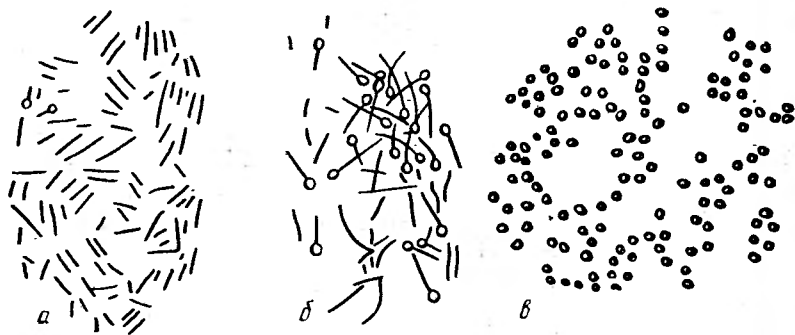


Рис. 19. *Clostridium omelianskii*:
а — молодые клетки; б — клетки со спорами; в — споры.

за. Пробирки инкубируют при температуре 60°C. Через несколько дней начинают интенсивно выделяться газы. Бумага приобретает желтую окраску и постепенно превращается в аморфную массу.

Микроскопирование целлюлозоразлагающих бактерий. Извлекают пинцетом со дна колбы кусочек разлагающейся бумаги и размазывают на предметном стекле (без добавления воды). Мазок сушат обычным способом, фиксируют на пламени горелки и окрашивают фуксином.

В колбах, инкубируемых при температуре 30°C, развиваются длинные тонкие палочки с круглой спорой на конце — *Clostridium omelianskii* (рис. 19).

В накопительной культуре термофильных целлюлозоразлагающих бактерий чаще всего выявляются длинные крупные палочки с грушевидной спорой на конце — *Clostridium dissolvens*.

Материалы и оборудование. Соли: KNO_3 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 , CaCO_3 ; фильтровальная бумага; пептон; колбы круглые плоскодонные на 100—150 мл; корковые пробки с отверстиями; почва; пинцеты, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

6. ОКИСЛЕНИЕ КЛЕТЧАТКИ

В окислении клетчатки в аэробных условиях участвуют аэробные бактерии, актиномицеты и грибы.

Эти микроорганизмы выделяют ферменты — целлюлазу и целлобиазу, разлагающие клетчатку до глюко-

зы, которую они окисляют до CO_2 и H_2O ; промежуточным продуктом являются оксикислоты.

За окислением клетчатки можно наблюдать, пользуясь методом Виноградского на гелевых пластинах.

Промытые и прокипяченные гелевые пластины пропитывают 2—3 мл питательной среды следующего состава (в г на 200 мл дистиллированной воды):

KNO_3	2,5	NaCl	0,5
K_2HPO_4	1,0	FeSO_4	0,01
MgSO_4	0,5	$\text{Mn}_2(\text{SO}_4)_3$	0,01

Поверхность геля покрывают стерильным кружком фильтровальной бумаги, по которому раскладывают (по трафарету) 50 комочков почвы (диаметром 1—2 мм) или наносят суспензию соответствующего разбавления. Чашки помещают во влажную камеру и ставят в термостат при температуре 28—30°C.

На 8—10-е сутки вокруг комочков появляются колонии в виде розовых, зеленых, желтых, буровато-желтых пятен. Микроскопирование препаратов, приготовленных из таких колоний, позволяет обнаружить разные виды целлюлозоразрушающих бактерий (рис. 20): а) *Cytophaga* — бактерии со сложным циклом развития, относящиеся к миксобактериям. В молодом возрасте клетки с заостренными концами (рис. 20, а), при старении они переходят в укороченные палочки с округлыми концами. На клетчатке колонии в виде желтых, розовых, коричневатых пятен; б) миксобактерии родов *Polyangium* (рис. 20, г) и *Sorangium* (рис. 20, д) — молодые клетки палочковидные, при старении они укорачиваются и образуют микроцисты, которые собраны по 12—40 клеток в цисты. Из них формируются плодовые тела. На клетчатке образуют колонии в виде слизистого налета желтого, оранжевого или темно-коричневого цвета; в) вибрионы рода *Cellobacterium* (рис. 20, б) — слегка изогнутые палочки с закругленными концами. Формируют колонии в виде охристых или зеленых пятен; г) *Cellfalcicula* — палочковидные клетки, утолщенные в центре, с заостренными концами (рис. 20, в). Образуют на клетчатке слизистые зеленые колонии.

Активно разлагают клетчатку отдельные представители несовершенных грибов родов *Trichoderma*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Stachybotrys*, *Cladosporium*, *Dematium* и др. (см. стр. 159), а также актиномицеты.

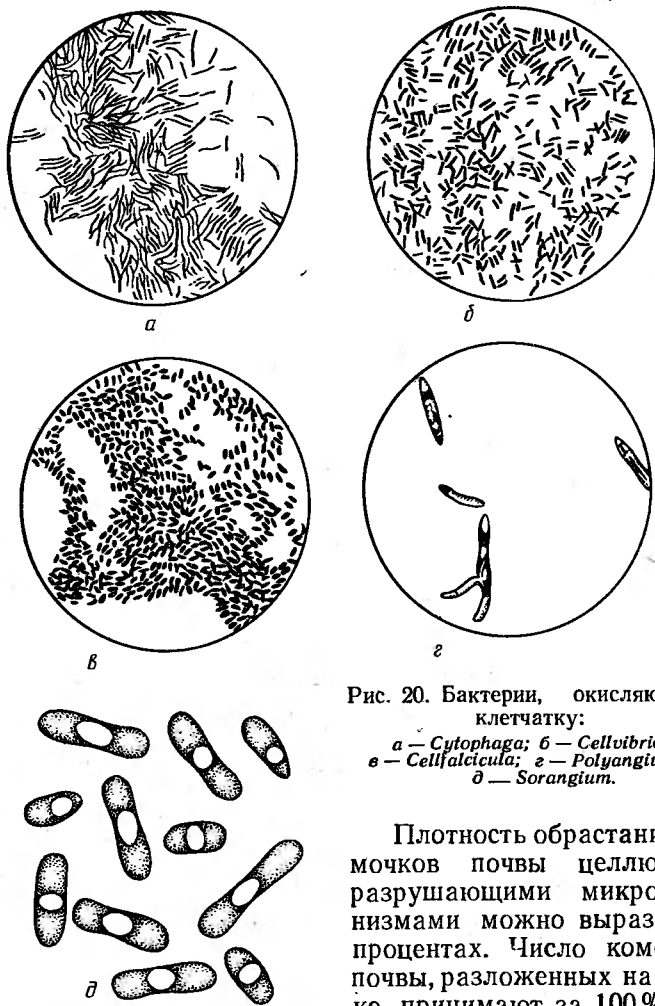


Рис. 20. Бактерии, окисляющие клетчатку:

a — *Cytophaga*; *б* — *Cellvibrio*;
в — *Cellfalcicula*; *г* — *Polyangium*;
д — *Sorangium*.

Плотность обрастания комочков почвы целлюлозоразрушающими микроорганизмами можно выразить в процентах. Число комочков почвы, разложенных на чашке, принимают за 100%. За-

тем высчитывают процент комочков почвы, давших вокруг себя колонии целлюлозоразрушающих микробов.

При отсутствии гелевых пластин микроорганизмы, окисляющие клетчатку, можно выявить по методу В. Л. Омелянского. Для этого в эрленмейеровские колбы емкостью 100—150 мл наливают 30 мл питательной среды, содержащей 0,1% NH_4Cl , 0,05% K_2HPO_4 и водопроводную воду.

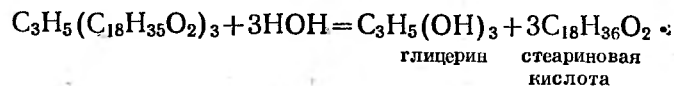
В этот раствор погружают складчатый фильтр конусом вверх. На границе между воздухом и средой на клетчатке будут развиваться аэробные целлюлозоразрушающие бактерии.

Миксобактерии из рода *Sorangium* легко обнаруживаются в подзолистых почвах, под луговой растительностью и на окультуренных почвах. В этих же почвах при благоприятном азотном режиме можно выявить еще и *Cellvibrio*, а в унавоженных почвах — *Cytophaga*. В степных почвах наряду с грибами встречаются миксобактерии рода *Polyangium*.

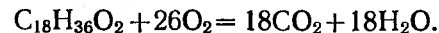
Материалы и оборудование. Гелевые пластины, пропитанные средой для целлюлозоразрушающих бактерий, покрытые кружком фильтровальной бумаги (при отсутствии гелевых пластин следует изготовить жидкую минеральную среду Омелянского), образцы свежей почвы, часовые стекла, трафареты и стеклянные палочки с заостренным концом, кружки фильтровальной бумаги, мерные цилиндры на 100 мл, колбы Эрленмейера емкостью 100—150 мл, микроскоп и все материалы для получения окрашенных препаратов и микроскопирования.

7. ОКИСЛЕНИЕ ЖИРА

Жир попадает в почву с растительными и животными остатками, с отмершими клетками микроорганизмов. Микроорганизмы, окисляющие жир, выделяют фермент липазу, который вызывает гидролиз жира по уравнению:



Продукты гидролиза в дальнейшем окисляются до углекислого газа и воды:



3. Для знакомства с процессом окисления жира и его возбудителями достаточно сначала приготовить элективную минеральную среду, не содержащую источника углерода, — среду Рана:

K_2HPO_4 — 5 г; CaCl_2 — 1 г; $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ — 5 г; NaCl — следы; MgSO_4 — 1 г; FeCl_3 — следы, дистиллированная вода — 1 л. Затем наливают 30 мл в эрленмейеровскую колбу емкостью 100 мл и добавляют одну треть чайной ложки почвы (для внесения возбудителей процесса). В качестве источника углерода добавляют жир — кусо-

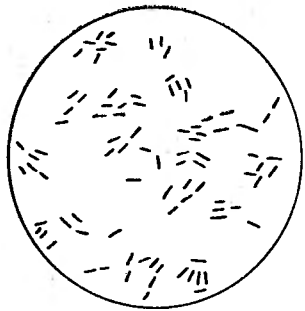


Рис. 21. *Pseudomonas fluorescens*.

чек расплавленного свиного сала или говяжьего жира. Хорошо получается культура жиророкисляющих бактерий и грибов на касторовом масле. В 30 мл среды достаточно внести 1 мл масла.

По мере развития жиророкисляющих микроорганизмов прозрачное касторовое масло превращается в белые хлопья нерастворимых в воде жирных кислот.

О степени омыления жира можно судить по его кислотному числу, которое определяют титрованием раствора жира и жирных кислот в смеси спирта с эфиром (1:1) 0,1 н. спиртовым раствором КОН.

В качестве индикатора при титровании применяется фенолфталеин.

Для микроскопических наблюдений готовится препарат с поверхности жирных кислот или из жидкости колбы.

Сушат препарат при комнатной температуре, фиксируют смесью спирта с эфиром (1:1), удаляя одновременно остатки жира, затем красят фуксином.

При микроскопировании можно обнаружить непорочную палочку типа *Pseudomonas fluorescens* (рис. 21), *Pseudomonas stutzeri*, иногда на жире развиваются актиномицеты и грибы *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*).

Материалы и оборудование. При постановке опыта: минеральная среда Рана, свежая почва, колбы Эрлейнмейера емкостью 100 мл, мерные цилиндры на 200 мл, алюминиевые ложки (или металлические, или фарфоровые шпатели), пипетки Мора на 1 мл.

При анализе опыта: микроскопы и все для приготовления окрашенных препаратов и микроскопирования, смесь спирта с эфиром (1:1), бюретки с 0,1 н. NaOH, фенолфталеин.

8. ОКИСЛЕНИЕ УГЛЕВОДОРОДОВ

В связи с широкой механизацией сельского хозяйства в почву попадает значительное количество углеводов. Так, керосин и бензин, используемые в качестве топлива в тракторных, автомобильных и других двига-

телях, являются продуктами перегонки нефти или переработки нефтепродуктов. В их состав входит высокий процент парафиновых, нафтеновых и ароматических углеводородов. В почве эти продукты подвергаются окислению микроорганизмами.

Для получения накопительной культуры углеводородокисляющих бактерий в колбу емкостью 250 мл наливают 100 мл жидкой питательной среды (или в колбу емкостью 150 мл — 30 мл среды) следующего состава (в %): KNO_3 —0,4; KH_2PO_4 —0,06; Na_2HPO_4 —0,06; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ —0,14; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,08; водопроводная вода (рН среды — 7,2—7,3 — устанавливают по бромтимолблау).

В качестве единственного источника углерода добавляют 2 мл керосина или 2 мл вазелинового масла. Для заражения среды в колбу помещают одну треть чайной ложки почвы из пробы, отобранной у бензоколонки или у гаража. Колбы помещают на качалку в термостат при 30°C.

После 4—6-дневной инкубации опыт снимают. Для знакомства с микроорганизмами, окисляющими углеводороды, из накопительной культуры готовят фиксированный и окрашенный препарат. Углеводороды хорошо окисляют представители микобактерий (*Mycoplana bu-lata*), *Arthrobacter* и нокардии.

Материалы и оборудование. При постановке опыта: основная жидкая питательная среда для накопительной культуры без источника углерода, склянка с керосином или вазелиновым маслом, почвенный образец, колбы на 250 и 100 мл, цилиндр на 100 мл, алюминиевая чайная ложка, вата для пробок, пипетки моровские на 1 мл.

При снятии опыта: микроскопы и все необходимое для микроскопирования, колбы с накопительными культурами.

Для проверки способности чистых культур окислять парафин можно использовать метод Маккланга (1955). Для этого готовят стерильную агаризованную среду следующего состава (в г на 1 л дистиллированной воды): NaNO_3 —2,0; MnSO_4 —0,008; K_2HPO_4 —1,0; ZnSO_4 —0,002; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,5; агар—20; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ —0,01.

Стерильный расплавленный агар разливают в стерильные чашки Петри, в которые одновременно вносят стерильной пипеткой 3—4 капли расплавленного стерильного парафина, и перемешивают его со средой. После охлаждения на поверхности застывшего агара

образуются островки парафина в виде тонких пленок. По поверхности агара сплошным газонм высевают суспензию чистой культуры углеводородокисляющих бактерий, для чего на поверхность агара наносят каплю (0,05 мл) суспензии чистой культуры и шпателем растирают ее по поверхности агара. Чашку помещают во влажную камеру и ставят в термостат при 28°C.

После 2—3 недель инкубации микроорганизмы, способные окислять парафин, разрастаются вокруг пленок парафина и покрывают пленку сплошным толстым слоем.

Глава IX

ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ ОРГАНИЧЕСКИХ И МИНЕРАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ АЗОТА

1. АММОНИФИКАЦИЯ

Аммонификация — это превращение органических форм азота в аммиачный азот. Вызывается она различными микроорганизмами (бактериями, актиномицетами и грибами).

Аммонификация белковых веществ

Микроорганизмы, вызывающие аммонификацию белковых веществ, выделяют в окружающую среду протеолитические ферменты, под действием которых эти вещества гидролизуются до аминокислот. Последние поступают в клетку и в ней дезаминируются с образованием аммиака, органических кислот и других продуктов. В белке отношение $C:N=3,5:1$.

При разложении белка выделяются также H_2S , меркаптаны, скатол и индол, имеющие неприятный запах.

Для изучения аммонификации белковых веществ в качестве питательной среды можно использовать мясной бульон с добавлением 3% пептона.

По 30 мл среды разливают в эрленмейеровские колбы емкостью 100 мл и добавляют по одной трети чайной ложки почвы. Колбы закрывают ватными пробками. Над средой подвешивают две бумажки — красную

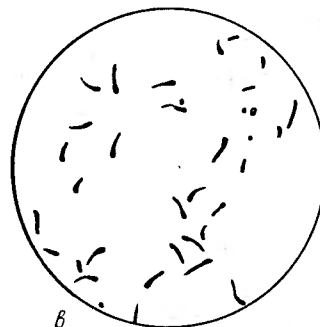
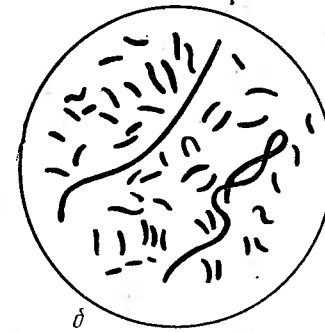
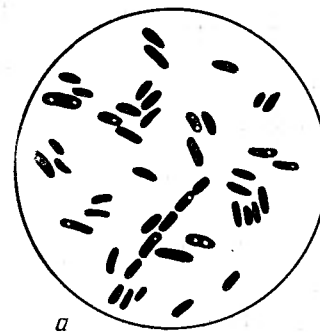


Рис. 22. Возбудители аммонификации белковых веществ:
а — *Bac. mycooides*; б — *Proteus vulgaris*;
в — *Clostr. putrificus*.

лакмусовую, смоченную дистиллированной водой (для обнаружения выделяющегося аммиака), и фильтровальную, смоченную уксуснокислым свинцом* (для выявления сероводорода и меркаптана), закрепляя их между пробкой и стенками

горлышка колбы. Бумажки не должны касаться среды. Сверху колбы прикрывают пергаментной бумагой.

На 3—5-е сутки инкубации при температуре 28—30°C опыт заканчивают и содержимое в колбе анализируют. Определяют продукты жизнедеятельности микроорганизмов при разложении белка и возбудителей процесса.

Исследование возбудителей гнилостного распада белковых веществ. Для обнаружения возбудителей готовят препарат живых бактерий (в раздавленной капле), а также фиксированный и окрашенный (рис. 22). Чаще других в препарате встречаются подвижные клетки *Proteus vulgaris* (рис. 22, б), преобладающие на первых стадиях распада белков. Это неспорообразующие, неодинаковой длины палочки. Кроме того, на препарате много спорообразующих клеток *Bac. mycooides*

* Разбавленный уксуснокислый свинец обрабатывают раствором NaOH до тех пор, пока осадок не растворится.

(рис. 22, а) и *Bac. putrificus* (рис. 22, в). У последних споры расположены терминально, и диаметр их шире клетки.

Bac. mycoides вызывает аммонификацию белковых веществ в аэробных условиях. *Proteus vulgaris* — факультативный анаэроб, а *Clostridium putrificus* вызывает аммонификацию в анаэробных условиях. Последняя форма может развиваться как аэроб, если в среде находятся аэробные микроорганизмы, поглощающие кислород.

Для определения продуктов гнилостного распада белка делают следующие анализы.

Проба на аммиак. Выделяющийся в атмосферу NH_3 улавливается подвешенной красной лакмусовой бумажкой, которая при этом синее.

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

Проба на сероводород. Его обнаруживают с помощью подвешенной фильтровальной бумажки, смоченной уксуснокислым свинцом $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$, бумажка чернеет. Если она покрывается серебристым налетом, это свидетельствует о том, что наряду с сероводородом выделяются еще и меркаптаны (например, метилмеркаптан CH_3SH).

Проба на индол. Для выявления индола пользуются или реакцией Сальковского, или реакцией с парадиметиламидобензальдегидом**. В первом случае к 10 мл субстрата добавляют 1 мл 0,2%-ного KNO_2 и несколько капель крепкой 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

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

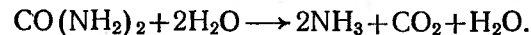
5 мл парадиметиламидобензальдегида и 5 мл насыщенного раствора сернокислого калия. При наличии индола возникает интенсивно-красное окрашивание.

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

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 (в г на 1 л дистиллированной воды):

К или Na виннокислый (можно и соль яблочной кислоты)	5,0
мочевина	50,0
K_2HPO_4	0,5
MgSO_4	0,2

Среду разливают по 30 мл в эрленмейеровские колбы емкостью 100 мл, заражают почвой (или навозом) и ставят в термостат при 25—30°C. Для обнаружения аммиака, выделяющегося в атмосферу, под ватную пробку подвешивают красную лакмусовую бумажку, смоченную дистиллированной водой.

На 3—5-е сутки опыт заканчивают и культуру подвергают анализу.

Устанавливают выделение аммиака по посинению красной лакмусовой бумажки, а накопление его в субстрате — капельной реакцией с реактивом Несслера.

К капле этого реактива (на фарфоровой пластинке) добавляют каплю субстрата. Образуется буроватый осадок.

Для изучения возбудителей аммонификации мочевины из едва заметной пленки на субстрате готовят препарат и окрашивают его фуксином. Чаще всего под мик-

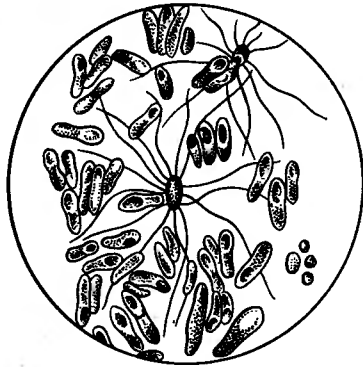


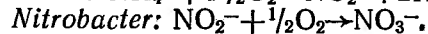
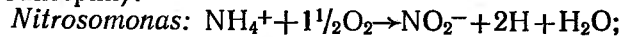
Рис. 23. *Bac. pasteurii*.

роскопом встречаются клетки *Bac. pasteurii* (рис. 23), реже *Planosarcina ureae* и др.

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

2. НИТРИФИКАЦИЯ

Под нитрификацией понимают процессы окисления аммиака до нитрита и нитрата. Превращение аммиака в нитрит и нитрат идет в две фазы и вызывается главным образом бактериями двух родов (нитрифицирующие бактерии):



Энергию, возникающую при окислении аммиака и нитрита, бактерии используют для ассимиляции углекислого газа. Микроорганизмы, осуществляющие этот процесс, относятся к хемолитоавтотрофам и являются облигатными аэробами.

Для выявления бактерий первой фазы нитрификации и определения относительной плотности населения их в почве, используют метод Виноградского на гелевых пластинках.

Промытые, прокипяченные чашки Петри с кремнекислым гелем пропитывают 3—5 мл питательной среды следующего состава (в г на 200 мл дистиллированной воды): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^*$ — 2,0; K_2HPO_4 — 1,0; MgSO_4 — 0,5; NaCl — 0,4; FeSO_4 — 0,4; MgCO_3 или CaCO_3 — 5,0.

При этом MgCO_3 , CaCO_3 перед приготовлением среды растирают пестиком в стерильной ступке.

* По данным доктора Роммеля, лучшие результаты получаются, если $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ заменить фосфорноаммонийномагниевою солью $(\text{NH}_4\text{MgPO}_4)$.

Питательную среду в чашках упаривают (при 40—50°C) до образования белой блестящей эмалевой поверхности, возникающей за счет равномерного распределения слоя MgCO_3 или CaCO_3 .

Оба эти слоя служат индикаторами процесса нитрификации, так как в тех местах на геле, где развиваются эти бактерии, появляются зоны растворения карбонатов, в которых и обнаруживают нитрифицирующие бактерии.

По эмалевой поверхности пластины раскладывают определенное число комочков свежей почвы. Для этого берут два часовых стекла, стерилизуют их (фламбированием), затем в одно часовое стекло помещают почву, а в другое наливают дистиллированную воду. Палочкой с оттянутым концом (предварительно ее слегка проводят над огнем и смачивают водой) захватывают комочек почвы (диаметр 1—2 мм) и по трафарету помещают на поверхность эмалевой пластины.

Чашки помещают во влажную камеру и ставят в термостат при температуре 28—30°C. Через некоторое время в зависимости от активности нитрифицирующих бактерий (спустя 7, 14, 21 день) вокруг отдельных комочков почвы появляются зоны растворения мела, свидетельствующие об обрастании комочков почвы нитрифицирующими бактериями. Чашки вынимают и подвергают анализу: определяют процент обрастания комочков почвы нитрифицирующими бактериями, изучают по морфологии их представителей и продукты жизнедеятельности.

Для изучения процента обрастания комочков почвы сначала подсчитывают общее число комочков почвы, разложенных на чашке, и принимают их за 100%. Затем подсчитывают число комочков почвы, давших зоны растворения мела, и высчитывают, какой процент они составляют от общего числа комочков почвы. Эта величина не показывает абсолютное количество этих бактерий в почве. Однако если сопоставить процент обрастания ими комочков разных почв, то этот показатель позволит судить о том, какая почва более богата нитрифицирующими бактериями.

Чтобы познакомиться с продуктами жизнедеятельности бактерий первой фазы нитрификации, надо чистым ланцетом вырезать по три кусочка геля из зон растворения мела и с мест, в которых мел не растворился, поме-

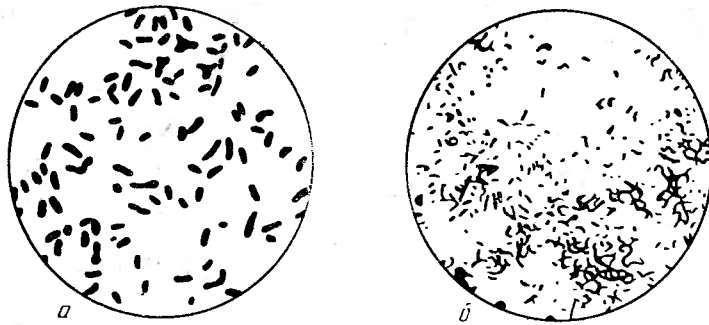


Рис. 24. Нитрифицирующие бактерии:
а — *Nitrosomonas*; б — *Nitrospira*.

стить эти кусочки изолированно в лунки белой фарфоровой пластины или в фарфоровые чашки. Сначала делают пробы с кусочками геля с контрольных участков (где мел не растворился). Пробу делают на аммиак с реактивом Несслера; гель приобретает желтовато-оранжевую окраску, что свидетельствует о присутствии аммиака. Затем пробу делают на нитрит с реактивом Грисса или цинк-йод-крахмалом, добавляя каплю 10%-ной серной кислоты; гель остается без изменения, 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 (гель не окрашивается). Реактив Грисса окрашивает его в красный цвет, а с цинк-йод-крахмалом в кислой среде гель окрашивается в темно-синий цвет, 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 нуль, — *Nitrosomonas* (рис. 24, а) и *Nitrospira*. Первые встречаются в старопашотных почвах, вторые — в целинных. В почвах Европы чаще встречаются *Nitrosomonas europaea*.

Микроорганизмы, вызывающие вторую фазу нитрификации, можно наблюдать на чашках с культурой первой фазы при более длительном стоянии их. После ис-

чезновения аммиака образовавшийся нитрит может окисляться до нитрата. В этом легко убедиться по исчезновению 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-йод-крахмалом в кислой среде. С другим кусочком геля делают пробу на нитрат с дифениламиноом в растворе крепкой серной кислоты. В присутствии азотной кислоты гель приобретает темно-синий цвет (реакцию на нитрат с дифениламиноом 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 *Nitrospira* (рис. 24, б).

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

Для выявления нитрифицирующих бактерий обеих фаз из культуры на гелевых пластинах разработан прием (Е. З. Теппер), который дает весьма удовлетворительные результаты. В чашку, в которой прошли процессы нитрификации, осторожно вливают дистиллированную воду, бактерии при этом собираются на поверхности воды. Если к поверхности воды прикоснуться чистым обезжиренным предметным стеклом, то на нем остаются нитрифицирующие бактерии. После сушки и фиксации препарата его красят фуксином и рассматривают под микроскопом с иммерсионной системой.

В 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 пластинах. Их пропитывают 2—3 мл питательной среды следующего состава (в г на 200 мм дистиллированной воды): $NaNO_2$ — 1,0; Na_2CO_3 (безводный) — 1,0; $NaCl$ — 0,5; K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4$ — 0,5; $FeSO_4$ — 0,4.

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

Жидкие культуры нитрифицирующих бактерий

Первую и вторую фазы нитрификации можно наблюдать и в жидких средах. Однако в них процессы менее наглядны.

Состав питательной среды для первой фазы (в %): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,2; K_2HPO_4 — 0,1; MgSO_4 — 0,05; NaCl — 0,2; FeSO_4 — 0,04; CaCO_3 или MgCO_3 — 0,5.

Состав питательной среды для второй фазы (в %): NaNNO_2 — 0,1; Na_2CO_3 (безводный) — 0,1; NaCl — 0,05; K_2HPO_4 — 0,05; MgSO_4 — 0,05; FeSO_4 — 0,04.

Для получения накопительной культуры среды после хорошего встряхивания (взбалтывания) разливают по 30 мл в эрленмейеровские колбы емкостью 100 мл, заражают небольшим количеством почвы (четверть чайной ложки) и ставят в термостат при температуре 25—30°C. Спустя 7 дней (а иногда 14 или 21 день) в среде для первой фазы нитрификации появляется азотистая, а в среде для второй — 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 капельная с реактивом Грисса или цинк-йод-крахмалом в кислой среде). При исследовании второй фазы — после исчезновения нитрита проводят капельную реакцию на нитрат с дифениламинем. Для изучения возбудителей первой и второй фазы нитрификации из соответствующих культур с поверхности среды петлей захватывают немного материала и готовят мазок.

Приготовление кремнекислого геля. Соляную кислоту плотностью 1,19 в высоком цилиндре разбавляют водой до плотности 1,10 (на каждые 500 мл крепкой соляной кислоты можно добавить примерно 500 мл дистиллированной воды). Жидкое стекло наливают в высокий цилиндр и разводят водой до плотности 1,06—1,08; на 500 мл воды можно прилить 100 мл стекла (его можно заменить 35%-ным раствором кремнекислого натрия).

Цилиндры и ареометр после разбавления стекла тщательно отмывают.

Соляную кислоту плотностью 1,10 смешивают с жидким стеклом плотностью 1,06 (а для более плотного геля — 1,08) в равных объемах; стекло осторожно прибавляют (при постоянном помешивании) к соляной кислоте. Для устранения возможности появления в толще геля чечевицеобразных полостей при стерилизации (по Н. М. Лазареву) раствор соляной кислоты и стекла нагревают до кипения и смешивают. Затем смесь перемешивают и разливают в чашки слоем не менее 0,7 см. Через 8—12 ч образуется гель. Дав ему хорошо застыть и обсохнуть сверху, чашки с гелем помещают в эмалированную кастрюлю или в большой стеклянный сосуд и ставят под кран для промывки. На водопроводный кран надевают толстую каучуковую трубку, конец которой опускают на дно кастрюли или сосуда. Струя воды должна быть слабая. Промывают кремневые пластины до исчезновения следов хлора (проба 1%-ного AgNO_3 в присутствии HNO_3), окунают в кипящую воду, а при необходимости стерилизуют в кипятильнике Коха при температуре 100°C 30 мин (3 раза через 24 ч).

Приготовление реактивов и ход реакций. 1. *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. В пробирку наливают по 10 мл обоих растворов и 10 мл исследуемого раствора и кипятят. В присутствии азотистой кислоты появляется красное окрашивание (реактив очень чувствителен к HNO_2).

2. *Цинк-йод-крахмал.* 4 г крахмала размешивают с небольшим количеством воды, затем при постоянном помешивании прибавляют к кипящему раствору хлористый цинк (20 г в 100 мл воды). Смесь кипятят до растворения крахмала, добавляют 2 г сухого йодистого цинка и доливают водой до 1 л. Раствор хранят в темном месте.

Реакцию проводят следующим образом: в лунку фарфоровой пластинки вносят каплю цинк-йод-крахмала, каплю 10%-ной серной кислоты и каплю исследуемого субстрата. В присутствии азотистой кислоты появляется темно-синее окрашивание.

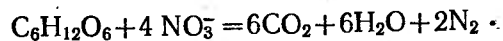
3. *Дифениламин в растворе крепкой серной кислоты.* Каплю дифениламина вносят в лунку фарфоровой пла-

стинки и к ней добавляют каплю испытуемого раствора. 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.

Материалы и оборудование. Гелевые пластины, пропитанные соответствующей питательной средой, свежая почва, часовые стекла, палочки с оттянутым концом и трафарет, соответствующие жидкие среды, эрленмейеровские колбочки, почва, алюминиевые ложки, реактив Несслера и цинк-йод-крахмал, 10%-ная H_2SO_4 (или реактив Грисса), микроскопы и все необходимое для приготовления препаратов и микроскопирования, фарфоровые пластинки с лунками, дифениламин, растворенный в крепкой серной кислоте.

3. ДЕНИТРИФИКАЦИЯ (НИТРАТНОЕ ДЫХАНИЕ)

Нитратное дыхание — это дыхание с использованием связанного кислорода (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. При этом органические субстраты окисляются до CO_2 и H_2O . Суммарно процесс можно выразить следующим уравнением:



Микроорганизмы, осуществляющие процесс денитрификации, широко распространены в природе. Большинство относятся к родам *Pseudomonas* и *Micrococcus* (*Ps. denitrificans*; *Ps. fluorescens*; *Ps. stutzeri*; *Micrococcus denitrificans*). Процесс протекает в основном в анаэробных условиях, когда нет доступа кислорода.

Для наблюдения за процессом денитрификации и получения накопительной культуры денитрифицирующих бактерий обычно пользуются средой Гильята (стр. 144) или средой более простого состава (в г): сегнетова соль (натриевокалиевая соль винной кислоты) или лимоннокислый натрий 20 г, KNO_3 —2,0; K_2HPO_4 —0,5; $MgSO_4$ —0,2; $FeSO_4$ —следы; дистиллированная вода — 1000 мл.

Техника постановки опыта следующая: в склянку или колбу Эрленмейера наливают немного питательной среды и к ней добавляют одну треть 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 трубка, расширенная в средней части. Пробка вытесняет часть жидкости в стеклянную трубку (рис. 25). Под пробкой не должны оставаться пузырьки воздуха. В трубку над средой наливают вазелиновое масло небольшим слоем, и таким образом в сосуде с жидкой средой создаются анаэробные условия. Отсутствие углеводов в среде исключает процесс брожения. В этих условиях будут развиваться лишь микроорганизмы, способные использовать кислород связанных соединений (в первую очередь нитрата).

При постановке опыта наличие в среде нитрата устанавливается реакцией (капельной) с дифениламином, растворенным в крепкой серной кислоте. В лунку фарфоровой пластинки вносят каплю реактива — дифениламина в крепкой серной кислоте. К ней добавляют каплю субстрата; при наличии нитрата капля окрашивается в темно-синий цвет. Прибор со средой и почвой помещают в термостат при температуре 28—30°C. После 5—6 дней инкубации культуру подвергают анализу: отмечают появление пузырьков газа под пробкой и цвет среды. Для знакомства с возбудителями денитрификации из середины субстрата чистой пипеткой берут каплю и готовят фиксированный и окрашенный препарат, затем рассматривают его под микроскопом с иммерсионной системой. В препарате преобладают неспоровые палочки *Pseudomonas denitrificans*. Нередко наблюдается позеленение среды (особенно при использовании углерода лимонной кислоты), что указывает на развитие *Pseudomonas fluo-*



Рис. 25. Прибор для культивирования денитрифицирующих бактерий.

rescens (см. рис. 21). На среде с сегнетовой солью чаще развивается *Pseudomonas stutzeri*.

Для определения продуктов жизнедеятельности денитрифицирующих бактерий из культуральной жидкости делают пробы: на нитрат (NO_3) с дифениламином в крепкой серной кислоте; на нитрит (NO_2) с цинк-йод-крахмалом в кислой среде или с реактивом Грисса и на аммиак с реактивом Несслера. Обычно после шести дней 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). Образование аммиака показывает, что эти же бактерии вызывают аммонификацию нитрата, ассимилируя аммиак как источник азота.

Материалы и оборудование. При постановке опыта: питательная среда Гильтая или заменяющая ее, прибор для постановки опыта, свежая почва, фарфоровая пластинка с лунками, чайная алюминиевая ложка или шпатель (фарфоровый или металлический), пипетки Мора на 1 мл, реактив — дифениламин в крепкой серной кислоте. Для анализа опыта: цинк-йод-крахмал (или реактив Грисса), 10%-ная H_2SO_4 , реактив Несслера, дифениламин в крепкой серной кислоте, микроскопы и все необходимое для микроскопирования и приготовления окрашенных препаратов.

4. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФИКСАЦИЯ АТМОСФЕРНОГО АЗОТА

Ассимиляция атмосферного азота микроорганизмами имеет важное значение в общем балансе азота в почве. Особая роль в фиксации азота в почве принадлежит бактериям, которые усваивают элементарный азот атмосферы и таким образом обогащают почву связанным азотом.

Знакомство с клубеньковыми бактериями

Клубеньковые бактерии рода *Rhizobium* образуют клубеньки на корнях более чем 1300 видов бобовых растений. Внедрившиеся в ткань корня клубеньковые бактерии распространяются обычно в виде инфекционных нитей — колоний размножившихся клеток бактерий. Когда инфекционные нити достигают меристемной ткани, клетки последней под воздействием клубеньковых бактерий начинают усиленно делиться, приводя в конечном итоге к формированию клубенька. Бактерии из ин-

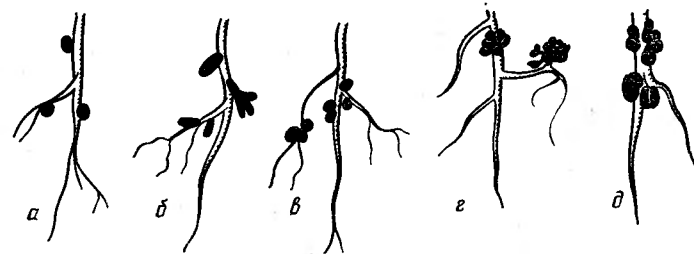


Рис. 26. Форма клубеньков у разных видов бобовых растений: а — чины; б — клевера; в — гороха, вики; г — люцерны; д — люпина.

фекционной нити могут проникать в цитоплазму растительных клеток. В зрелой клубеньковой ткани бактериальные клетки превращаются в бактериоиды. В отличие от бактериальной клетки, имеющей форму палочки, бактериоиды — грушевидные, сферические или ветвистые образования в 3—4 раза более крупных размеров. Зона клубенька с клетками как бактериальной, так и бактериоидной формы получила название бактериоидной. В клубеньке развивается собственная сосудистая система, примыкающая к сосудистым пучкам центрального цилиндра корня; по сосудам происходит обмен веществ между клубеньковыми бактериями и растением. Растения снабжают клубеньковые бактерии углеводами и минеральными солями, а ризобии 70% ассимилируемого ими азота отдают бобовым растениям. Форма и размеры клубеньков разных бобовых растений неодинаковы (рис. 26). У клевера они продолговатые и мелкие, у гороха и вики — округлые и крупные, у фасоли и сои их диаметр достигает 1 см. У люпина клубеньки крупные (иногда достигают величины грецкого ореха). Разрушение клубеньков сопровождается деградацией элементов растительной клетки и лизисом части бактериоидов, тогда как остальная часть образует мелкие кокковидные клетки — своеобразные артроспоры, выполняющие функцию размножения. При изучении клубеньковых бактерий в оптическом микроскопе артроспоры не видны. Их можно обнаружить лишь при большом увеличении в электронном микроскопе.

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 раз-

давленной капле при разных увеличениях. В сухой системе просматривают структуру клубенька, обнаруживают бактериоидную ткань, а затем при достаточной тонкости среза препарат исследуют в иммерсионной системе объектива. В иммерсионной системе хорошо просматривается бактериоидная зона клубенька.

Клубеньковые бактерии объединены в род *Rhizobium* (rhizo — корень, bio — жизнь; жизнь на корнях), а видовое название в большинстве случаев отражает способность вызывать образование клубеньков у определенных растений. Так, клубеньковые бактерии клевера получили наименование *Rhizobium trifolii*, фасоли — *Rh. phaseoli*, люпина — *Rh. lupini* и т. д.

На питательных средах молодые клетки ризобий представляют собой подвижные неспороносные грамотрицательные палочки. Среди них встречаются и мелкие угловатые и кокковидные клетки. В старых культурах клетки более крупные, палочковидные, неподвижные, изредка встречаются Т-образные бактериоидные формы.

По скорости роста клубеньковые бактерии делят на медленнорастущие (клубеньковые бактерии люпина, сои и др.) и быстрорастущие (гороха, клевера и др.).

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

Мелкие клубеньки (2—3 клубенька) помещают на предметное стекло, добавляют каплю воды и прижимают сверху другим предметным стеклом. Выдавленное содержимое размазывают по стеклу, мазок сушат, фиксируют и красят. Красить можно карболовым эритрозинном, фуксином или генцианом фиолетовым. Хорошая окраска получается в случае применения смеси равных частей фуксина и метиленового синего, растворенных в 1%-ной уксусной кислоте. В смеси красок препарат выдерживают 3—5 мин. Ткань клубенька окрашивается в синий цвет, а бактерии — в красный. Формы и размеры клубеньковых бактерий, в том числе и бактериоидов из разных

бобовых, следует зарисовать и подписать их наименование.

Для получения культур клубеньковых бактерий из клубеньков кусочек корня с клубеньком тщательно промывают в стерильной воде, стерилизуют поверхность клубенька в растворе сулемы и спирте, затем вновь промывают в стерильной воде, раздавливают клубенек в капле стерильной воды и суспензию высевают на пластинках из бобового агара или среды Фреда (см. стр. 183).

Материалы и оборудование. Зафиксированные (в формалине) корни разных бобовых растений с клубеньками, ботаническая бритва, препаровальные иглы и все необходимое для приготовления препаратов и микроскопирования.

Свободноживущие азотфиксирующие бактерии

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

Cl. pasteurianum, изолированный впервые в чистую культуру С. Н. Виноградским в 1893 г., — облигатный анаэроб. Энергию для всех процессов жизнедеятельности, в том числе и ассимиляции атмосферного азота, они получают за счет маслянокислого брожения. Сбраживают они моно- и дисахара и некоторые полисахариды. В молодой культуре клетки *Cl. pasteurianum* имеют форму палочек с перитрихально расположенными жгутиками, затем клетка образует споры, которая располагается поближе к краю, а чаще в середине клетки. Споры овальные, окружены капсулой. Клетки имеют клостридиальную форму (рис. 27). *Cl. pasteurianum* накапливает в клетках запасное питательное вещество — гранулезу (полисахарид, близкий к крахмалу), который окрашивается при воздействии раствора Люголя в фиолетовый цвет. В период образования спор гранулеза постепенно исчезает. Анаэробные азотфиксаторы широко распространены в природе. Они встречаются почти повсеместно в почвах и загрязненных водоемах (подробные сведения об анаэробных азотфиксаторах можно получить в монографии Е. Н. Мишустина и В. Т. Емцева, 1974).

Для знакомства с анаэробным азотфиксатором *Cl. pasteurianum* и продуктами его жизнедеятельности до-

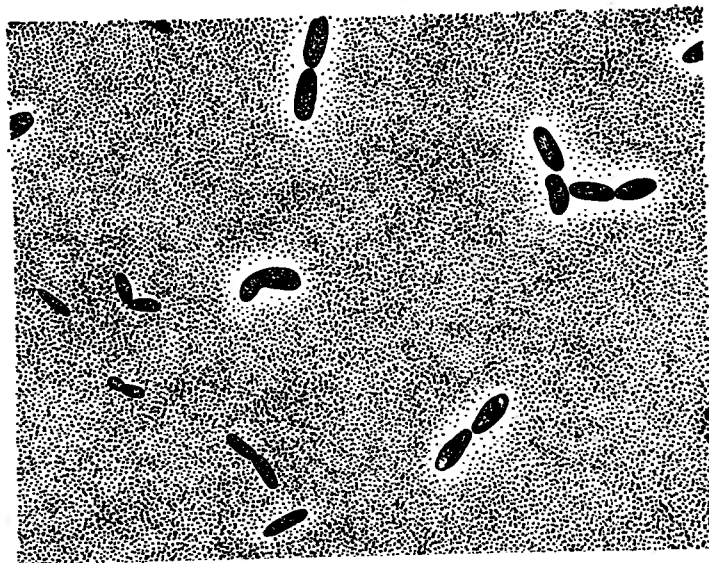


Рис. 27. *Clostridium pasteurianum*.

статочно получить накопительную культуру, используя для этой цели селективную среду Виноградского (в г на 1 л дистиллированной воды): глюкоза — 20,0; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4$ — 0,5; NaCl — 0,5; $CaCO_3$ — 20,0*.

Колбу Эрленмейера емкостью 100—150 мл заполняют на $\frac{2}{3}$ ее объема жидкой средой, предварительно взболтав ее. Для инокуляции в среду вносят одну треть чайной ложки почвы. Элективность среды создается отсутствием в среде связанного азота и анаэробными условиями. Мел добавляют для нейтрализации масляной кислоты. Опыт можно ставить также в высоких пробирках. Колбы с посевом помещают в термостат при 25—30°C. Через несколько дней можно отметить помутнение среды и обильное образование газов.

На поверхности среды развиваются аэробные микроорганизмы, поглощающие кислород атмосферы. После 4—5 дней инкубации культура подвергается анализу.

* Для учета *Cl. pasteurianum* в почве используют среду Емцева следующего состава: на 1 л воды NH_2PO_4 — 0,5 г; K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4$ — 0,5; NaCl — 0,5; $FeSO_4$ — 0,01; $MnSO_4$ — 0,01 г; смесь микроэлементов по Федорову — 1 мл, глюкоза — 20 г; пептон — 5 г, дрожжевой автолизат — 0,2 мл, $CaCO_3$ — 10 г; pH 7,0.

Для обнаружения *Cl. pasteurianum* содержимое колбы хорошо размешивают и в течение 15—20 с дают осесть грубым частицам, после чего из середины субстрата пипеткой берут немного материала и наносят каплю на предметное стекло. К ней добавляют каплю раствора Люголя, затем накрывают покровным стеклом и микроскопируют с иммерсионной системой объектива. Клетки *Cl. pasteurianum*, содержащие гранулезу, приобретают фиолетовый цвет. Как правило, преобладают веретенообразные формы.

Из продуктов жизнедеятельности, кроме газов (CO_2 , H_2), можно обнаружить масляную кислоту (реакция с $FeCl_3$). К 5 мл субстрата, внесенного в пробирку, добавляют 2 мл хлорного железа и нагревают до кипения. Образующийся раствор маслянокислого железа в проходящем свете имеет кроваво-красный или вишнево-красный цвет.

Чистую культуру *Cl. pasteurianum* выделяют из колоний, полученных при посеве накопительной культуры (после обязательной пастеризации ее) на агаризованной среде Виноградского или на картофельно-морковном агаре В. Т. 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, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ следы; пептон — 5 г; дрожжевой автолизат — 0,02 мл; $CaCO_3$ — 40 г; агар — 6 г. Отвары готовят следующим образом: 0,5 кг очищенного картофеля и 0,5 кг моркови заливают 2 л дистиллированной воды, кипятят 10 мин, фильтруют, затем добавляют дистиллированной воды до первоначального уровня.

Материалы и оборудование. При постановке опыта: жидкая среда С. Н. Виноградского, колбы Эрленмейера емкостью 100—150 мл или высокие пробирки, почвенные пробы, алюминиевые чайные ложки или шпатель.

Для анализа культуры: микроскопы и все необходимое для микроскопирования препаратов в раздавленной капле, раствор Люголя, пробирки обычные, 10%-ное хлорное железо.

Azotobacter фиксирует азот в аэробных условиях. Впервые выделен в 1901 г. Бейеринком под названием *Azotobacter chroococcum*. Затем были выделены и другие виды азотобактера. *Azotobacter chroococcum* характеризуется темно-коричневым, почти черным цветом колоний. В жидких культурах образует пленку, а на агаре и на гелевых пластинках — слизистые колонии.

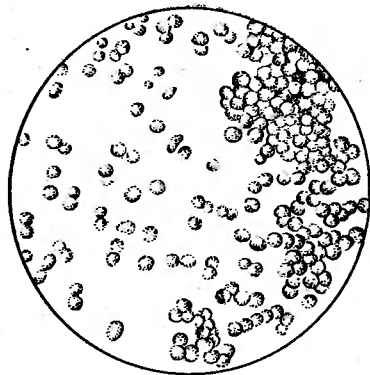


Рис. 28. *Azotobacter chroococcum*.

Молодые клетки азотобактера имеют вид попарно соединенных крупных, коротких палочек с закругленными концами. По мере развития клетки становятся эллипсоидными, а затем круглыми (рис. 28). Клетки азотобактера часто окружены слизистой капсулой, которая выявляется после окраски клеток фуксином и смешивания с разбавленной тушью. Внутри клеток наблюдается ясно выраженная зернистость.

Azotobacter vinelandii на плотных средах образует сарциноподобные скопления.

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

Для выявления азотобактера в почве и определения относительного его содержания можно использовать метод Виноградского на гелевых пластинах. Отмытые от следов хлора гелевые пластины пропитывают 3—5 мл питательной среды следующего состава (в г на 200 мл дистиллированной воды): маннит или тростниковый сахар — 20,0; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4$ — 0,5; $NaCl$ — 0,5; $FeSO_4$ — 0,01; $MnSO_4$ — 0,01; $CaCO_3$ — 5,0.

После упаривания среды до исчезновения избыточной влаги на поверхности геля раскладывают (по трафарету) 50 комочков почвы. С этой целью берут два часовых стекла, после фламбирования их в одно часовое стекло помещают исследуемую почву, а в другое — дистиллированную воду. Палочку с оттянутым концом проводят над огнем, смачивают водой и захватывают ею комочек почвы диаметром примерно 2 мм, который помещают на поверхности гелевой пластины. Элективность среды создается отсутствием связанного азота и аэробными условиями среды.

Чашки с посевом помещают во влажную камеру, и

после 5—6 дней инкубации при наличии клеток азотобактера комочки почвы обрастают его колониями.

Для сравнительной оценки населенности азотобактера в разных почвах определяют процент обросших комочков почвы азотобактером от общего числа комочков на чашке. Это дает возможность установить, какая почва богаче азотобактером.

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

Для знакомства с возбудителями аэробной азотфиксации из колонии готовят фиксированный и окрашенный препарат и просматривают с иммерсионной системой объектива. Клетки азотобактера шаровидные, среди них часто встречаются диплококки.

Для получения накопительной культуры азотобактера можно использовать жидкую среду Бейеринка (в г на 1 л водопроводной воды): маннит (или глюкоза) — 20,0; K_2HPO_4 — 0,2; $CaCO_3$ — 5,0; смесь микроэлементов по Федорову — 1 мл*; $MgSO_4$ — 0,2.

В колбы Эрленмейера емкостью 100 мл наливают 30 мл жидкой среды для азотобактера и добавляют одну треть чайной ложки почвы. Колбы помещают в термостат при 28—30°C. После 5—6 дней инкубации опыт снимают; на поверхности среды при наличии азотобактера образуется пленка.

Для выделения чистой культуры азотобактера после проверки культуры под микроскопом делают посев на агаризованную среду Эшби следующего состава (в г на 1 л): маннит — 20,0; K_2HPO_4 — 0,2; $MgSO_4$ — 0,2; $NaCl$ — 0,2; K_2SO_4 — 0,1; $CaCO_3$ — 5,0; агар — 20,0.

Материалы и оборудование. Для постановки опыта: гелевые пластины, пропитанные средой Виноградского для азотобактера (при отсутствии гелевых пластин используют жидкую питательную среду Виноградского или Бейеринка), часовые стекла, почвенные

* Смесь микроэлементов по Федорову содержит (в г на 1 л дистиллированной воды): H_3BO_3 — 5; $(NH_4)MoO_4$ — 5; KI — 0,5; $NaBr$ — 0,52; $ZnSO_4$ — 0,2, $Al_2(SO_4)_3$ — 0,3.

пробы, палочки с оттянутым концом, цилиндры, колбы Эрленмейера на 100 мл.

Для анализа опыта: микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

Глава X

ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ СОЕДИНЕНИЙ СЕРЫ, ЖЕЛЕЗА И ФОСФОРА

1. ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ СОЕДИНЕНИЙ СЕРЫ

Окисление сероводорода. Образующийся в почве и загрязненных водоемах сероводород (H_2S) окисляется вследствие жизнедеятельности тионовых и серобактерий до H_2SO_4 .

Серобактерии подразделяют на две группы: бесцветные и окрашенные. К бесцветным относятся различные виды *Beggiatoa* (свободноплавающие длинные нити) и *Thiothrix* (отличающиеся неподвижным образом жизни). Внутри клеток серобактерий или непосредственно на их поверхности отлагаются капли серы. По типу углеродного питания они являются миксотрофами. За счет энергии окисления H_2S они могут ассимилировать углекислый газ (CO_2), но одновременно нуждаются также в органических соединениях.

К цветным серобактериям относятся пурпурные и зеленые бактерии-литотрофы, имеющие хлорофилл. Источником энергии для автотрофной ассимиляции CO_2 служит свет. Фотосинтез у них протекает в анаэробных условиях и не сопровождается выделением кислорода. Донором водорода для восстановления CO_2 у них служит H_2S , эти организмы — фотоавтотрофы (фотоавтотрофы).

Тионовые бактерии — это мелкие одиночные клетки, которые при окислении сероводорода не отлагают серы в клетке и на ее поверхности. Энергию окисления восстановленных соединений серы в серную кислоту они используют для поддержания всех процессов жизнедеятельности, для ассимиляции углерода из CO_2 (они относятся к облигатным хемоавтотрофам).

Для получения культуры серобактерий С. Н. Виноградский рекомендует на дно высокого цилиндра или

аквариума бросить немного ила, гипса для усиления выделения H_2S , остатки водных растений и доверху залить водой. Примерно через месяц на поверхности возникает серовато-белая хрупкая пленка, состоящая из крупных нитей серобактерий с отложениями капельно-жидкой серы. Среди них наиболее часто встречаются представители рода *Beggiatoa*.

Доказать присутствие серы в клетках серобактерий можно следующим образом:

1) если добавить к препарату с клетками серобактерий каплю сероуглерода, то капельки жидкой серы в них растворяются;

2) если перенести клетки *Beggiatoa*, содержащие капельно-жидкую серу, в чистую воду, в которой нет H_2S , то через несколько часов вся сера из клеток исчезнет.

Для выявления тионовых бактерий можно использовать среду следующего состава (в г на 1 л дистиллированной воды): Na_2SO_3 (гипосульфит натрия) — 5,0; $NaHCO_3$ — 1,0; K_2HPO_4 — 0,2; NH_4Cl — 0,1; $MgCl$ — 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 $30^\circ C$. Через несколько дней в среде появляется свободная сера и обнаруживаются бактерии, сходные с *Pseudomonas*, — *Thiobacillus thioparus*.

Для получения накопительной культуры фотосинтезирующих серобактерий используют среду Ван-Ниля следующего состава (в %): $NaHCO_3$ — 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 желательно добавить соль органической кислоты (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.

Реакцию среды по бромтимолблау устанавливают до рН 7,0—7,5.

В склянки с притертыми пробками емкостью 100—150 мл вносят 5—10 мл инокулята (исходным материалом может служить ил разных водоемов); затем добавляют питательную среду Ван-Ниля до верха, закрывают стеклянными пробками, вытесняя часть жидкости. Таким образом, в склянках создаются анаэробные условия. Склянки со средой и инокулятом помещают в

люминостаг с температурой 30°C. После 4—7 дней инкубации в среде развиваются пурпурные или зеленые серобактерии (в зависимости от посевного материала). В случае развития пурпурных серобактерий среда приобретает сначала розовый, а затем красный цвет, при развитии зеленых она окрашивается в желто-зеленый цвет.

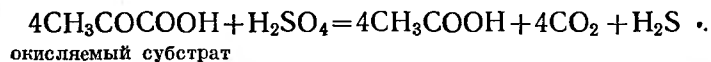
Для знакомства с фотоавтотрофными бактериями из накопительной культуры готовят препарат в раздавленной капле и просматривают его с иммерсионной системой объектива. В подвижных клетках серобактерий просматриваются включения серы.

Материалы и оборудование. Для выявления тионовых бактерий: жидкая среда с гипосульфитом натрия, эрленмейеровские колбы емкостью 100—150 мл, речной ил, сточная вода.

Для получения накопительной культуры фотоавтотрофных серобактерий: среда Ван-Нилля, склянки с притертыми пробками, илы из разных водоемов.

Для анализа культур: микроскопы и все необходимое для микроскопирования, приготовления фиксированных препаратов и препаратов в раздавленной капле.

Восстановление сульфатов. Разложение органических серосодержащих соединений (белки, аминокислоты) сопровождается выделением сероводорода. Источником образования сероводорода является также восстановление серноокислых и серноватистокислых солей. Большое количество сероводорода образуют сульфатредуцирующие бактерии в процессе сульфатного дыхания. Эти бактерии в отличие от денитрифицирующих бактерий являются облигатными анаэробами, а в качестве доноров водорода они используют главным образом органические кислоты, спирты и молекулярный водород. Органические субстраты окисляются ими не до конца. Чаще всего конечным продуктом окисления является уксусная кислота. Акцентором водорода у сульфатредуцирующих бактерий являются сульфаты:



Использовать кислород сульфатов в актах дыхания способна лишь небольшая группа микроорганизмов: 1) из *Desulfovibrio* — *D. desulfuricans* и *D. vulgaris* — вибрионы размером 2—4×1—0,9 мкм, имеющие один полярный жгутик (рис. 29), и 2) из рода *Desulfotomacu-*

lum — *D. nigricans* — 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).

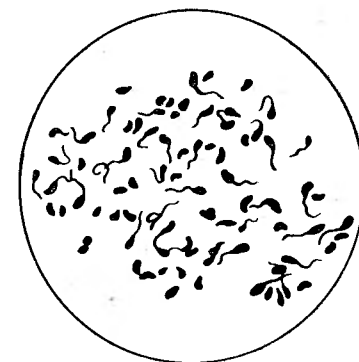


Рис. 29. *Desulfovibrio desulfuricans*.

Для получения накопительной культуры сульфатредуцирующих бактерий можно использовать жидкую среду Ван-Дельдена следующего состава (в г на 1 л воды исследуемого водоема): натрий молочнокислый (можно заменить виннокислым, яблочнокислым или янтарнокислым) — 5,0; аспарагин — 1,0; MgSO₄ — 1,0; K₂HPO₄ — 0,5. Значение рН довести до 7,0. К среде рекомендуется добавить 0,1—0,5 г лимоннокислого железа, при образовании сероводорода среда окрашивается в черный цвет.

В стеклянный сосуд наливают 5—10 мл инокулята (сероводородный ил или вода 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 добавляется слой вазелинового масла для создания анаэробных условий.

Прибор с инокулированной средой помещают в термостат при 28—30°C. Через несколько дней появляется сероводород. При добавлении к среде лимоннокислого железа она чернеет.

Материалы и оборудование. При постановке опыта: жидкая среда Ван-Дельдена, прибор, состоящий из склянки, резиновой пробки со стеклянной трубкой, проба ила, в котором происходит распад органических веществ, или проба воды из загрязненного водоема, вазелиновое масло, алюминиевые чайные ложки (шпатель фарфоровый или металлический).

Для анализа опыта: микроскопы и все необходимое для микроскопирования, фарфоровые пластины с лунками или фарфоровые чашки, лимоннокислое железо.

2. УЧАСТИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРЕВРАЩЕНИИ ЖЕЛЕЗА

Железо поступает в биологический круговорот после мобилизации его из минералов и комплексных органических соединений железа, представленных в почве гуминовыми соединениями.

Восстановление окисного железа в закисное. Если почва насыщена водой, в ней происходят процессы восстановления железа, приводящие к оглеению почвы. Роль микроорганизмов в восстановлении железа может быть двоякой: 1) восстановление железа может быть результатом накопления восстановленных продуктов (H_2S , H_2 и CH_4), выделяющихся в процессе брожения, реагирующих с окисным железом; 2) восстановление железа может быть и результатом непосредственного воздействия специфичной группы микроорганизмов на окисное железо, подобно процессу денитрификации, имеющей для них энергетическое значение. Однако этот вопрос окончательно не решен (Заварзин, 1972).

Окисление закисного железа в окисное. В среде, насыщенной атмосферным кислородом, закисное железо окисляется в окисное. Это имеет место при выходе подземных или почвенных вод, содержащих закисное железо, на дневную поверхность. Процесс этот осуществляется особой группой бактерий, известных под названием железобактерий. Железобактерии имеют нитчатое строение и ведут прикрепленный образ жизни. В процессе жизнедеятельности, окисляя закисное железо в окисное [$2FeCO_3 + \frac{1}{2}O_2 + 3H_2O = 2Fe(OH)_3 + 2CO_2$], образуют охристые осадки, которые могут засорять водопроводные трубы при водоснабжении глубинными водами, и дренажные системы, сооружаемые при осушении торфяно-болотных почв. В последнем случае железобактерии причиняют большой ущерб народному хозяйству.

К железобактериям, образующим охристые осадки, относятся роды *Leptothrix*, *Crenothrix*, *Gallionella*, *Siderococcus*. Физиология этих микроорганизмов мало изучена, так как чистые культуры их не выделены, поэтому значение для них окисления железа не выяснено.

Наиболее широкое распространение имеет *Leptothrix ochracea*. Это нитчатый организм, состоящий из цепочки палочковидных клеток (рис. 30,а), окруженных труб-

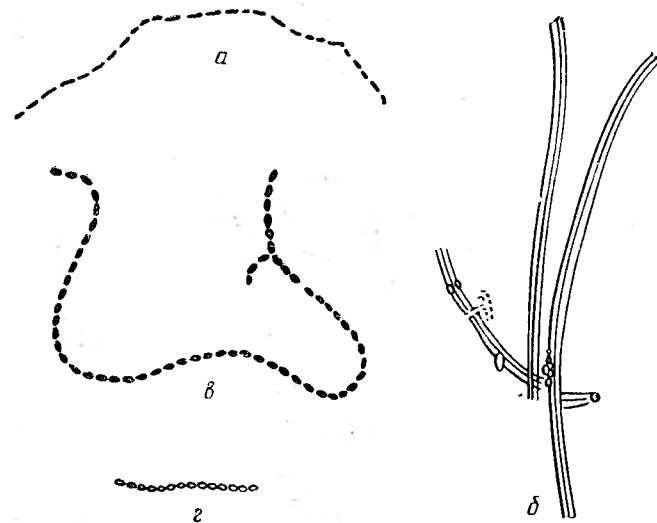


Рис. 30. Железобактерии:

а — вегетативные клетки *Leptothrix ochraceae*; б — ожезненные влагалища их; в — вегетативные клетки *Cladothrix*; г — *Gallionella*.

чатым неветвящимся влагалищем, пропитанным окислом железа. Клетки часто выскальзывают из влагалища, поэтому в большинстве случаев встречаются пустые влагалища (рис. 30,б). Нити свободно плавают. В настоящее время считают (Заварзин, 1972), что *L. ochracea* является литогетеротрофом (миксотрофом), так как для развития культуры наряду с закисным железом требуется в низкой концентрации глюкоза. Оптимум развития при pH 7,0—7,5.

Другой представитель *Leptothrix*, также широко распространенный в природе, — *L. crassa* — представляет собой цепочку крупных клеток (10—15 мкм), погруженную в толстое гранулированное влагалище с суженным концом. Внешние и внутренние контуры его нерезко очерчены. Во влагалище накапливается гидрат окиси железа или марганца. Нити образуют ложное ветвление. Размножаются подвижными клетками, которые после потери способности к движению прикрепляются к подводным предметам. Организмы этого вида — гетеротрофы. Развиваются на моно- и дисахаридах, спиртах

и аминокислотах (полисахариды и органические кислоты не используют). Нуждаются в витамине В₁₂ (всего описано 5 видов *Leptothrix*).

Представители рода *Crenothrix* неподвижные нити, прикрепляющиеся к подводным предметам. Клетки дисковидные или цилиндрические, окруженные влагалищем конической формы. Узким концом влагалища они прикрепляются к субстрату. У верхнего конца (ширина варьирует от 6 до 9 мкм) клетки размножаются поперечным и продольным делением. После деления клетки выскальзывают из влагалища и дают начало новым нитям. Кроме естественных водоемов, они встречаются в водопроводных трубах.

Представители рода *Cladothrix* образуют длинные нити толщиной от 1 до 5 мкм и дают ложное дихотомическое ветвление (рис. 30, в).

Gallionella характеризуется образованием скрученных ветвящихся нитей (рис. 30, г) покрытых гидроксидом железа. Они образуют нитевидные структуры (стебельки), покрытые оксидами железа. Нитевидные структуры состоят из пучков очень тонких волокон в виде ленты, скрученной в винт, или двух нитей, перевитых друг с другом. На концах нити иногда обнаруживаются вибриоидные клетки. В настоящее время установлено, что, кроме концевых клеток, у *Gallionella* имеются боковые клетки и мембранные мешки (5 мкм) с мелкими тельцами внутри. Предполагают, что у *Gallionella* сложный жизненный цикл, в котором участвуют фильтрующиеся формы (Заварзин, 1972).

Способность к окислению Fe²⁺ в Fe³⁺ и ассимиляции CO₂ указывает на хемоавтотрофный тип питания. *Gallionella* развивается в массовых количествах в железистых водах при pH 7,0 и при пониженном давлении кислорода, и вместе с *L. ochracea* участвует в отложении охристых осадков.

Окисление органических соединений железа. В почве образование отложений железа может происходить за счет разрушения органических комплексов железа. Химия этих соединений пока плохо изучена. Отдельные опыты показали, что ряд микроорганизмов, развиваясь на среде, содержащей соли железа, лимонной или щавелевой кислоты, и на гуминовых соединениях железа (Аристовская, 1965), образуют железистые отложения. К бактериям, окисляющим органические соединения

железа, относятся представители родов: 1) *Siderocapsa*; 2) *Seliberia*; 3) *Pedomicrobium*.

Представители *Siderocapsa* — мелкие сферические или эллипсоидные клетки, погруженные (по 2—8 и более) в общую рыхлую слизистую капсулу, пропитанную оксидами железа или марганцем (эпифитные, развивающиеся на растениях, растущих в воде со значительным количеством железа).

Seliberia — микроорганизмы, образующие микроколонию в виде розетки, состоящие из удлинённых клеток спиральной структуры и покрытые оксидами железа.

Pedomicrobium состоит из круглых, овальных, реже вытянутых клеток (0,4×2,0 мкм), соединённых тонкими ветвящимися нитями. Все эти микроорганизмы широко распространены в подзолистых почвах и являются причиной образования в них ортштейнов.

Для знакомства с железобактериями, образующими охристые осадки, можно заложить стекла обрастания по методу Холодного в железистые водоемы. С этой целью в пробку заделывают предметные стекла и опускают ее в водоем стеклами вниз. Просмотр таких стекол с иммерсионной системой позволит обнаружить длинные желтоватые нити диаметром 2—3 мкм, принадлежащие к *Leptothrix ochracea* или *L. crassa*, имеющие большой диаметр клеток, а иногда встречаются перекрученные ожелезненные нити *Gallionella*. При добавлении одной капли 10%-ной соляной кислоты под покровное стекло железо растворяется, а нити обесцвечиваются. Если после обесцвечивания нанести каплю желтой кровяной соли K₄[Fe(CN)₆], то в присутствии окисного железа образуется темно-синий осадок берлинской лазури.

Для знакомства с морфологией железобактерий препарат обрабатывают соляной кислотой, 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 почки клеток, вышедших из нитей (рис. 30, а). Аналогичным путем можно наблюдать клетки *Siderocapsa*, если стекла обрастания поместить в корневой зоне растений, растущих в воде, содержащей значительное количество железа.

Для получения накопительной культуры *Leptothrix crassa* по Виноградскому в высокий стеклянный цилиндр вносят небольшое количество сена, свежесажженный гидрат окиси железа $Fe(OH)_3$ и немного ила в качестве инокулята, затем цилиндр заполняют водопроводной водой или водой исследуемого водоема и оставляют при комнатной температуре.

Анаэробное разложение растительных остатков сопровождается выделением углекислого газа CO_2 и восстановленных продуктов (H_2 , H_2S и CH_4), необходимых для превращения окисного железа в закисное. Растворимый $FeCO_3$ в верхних слоях воды окисляется железобактериями, и через некоторое время на стенках сосуда появляются темно-бурые пятна, состоящие из скоплений (колоний) железобактерий, которые подвергаются микроскопическому контролю.

Более элективной средой является среда Виноградского следующего состава: NH_4NO_3 , $NaNO_3$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ по 0,5 г, $CaCl_2$ — 0,2 г, аммиачножелезной соли лимонной кислоты — 10 г в 1000 мл воды.

Для выделения чистой культуры *L. ochracea* Лиске рекомендует марганца уксуснокислого 1,0 г, агара 10 г на 1000 мл воды.

Молиш рекомендует для выделения *L. crassa* (= *L. discophora*) марганца и пептона по 0,25% и желатин 10%.

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.

3. ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ СОЕДИНЕНИЙ ФОСФОРА

Микроорганизмы имеют огромное значение в мобилизации доступных форм фосфора в почве для растений.

Превращение органических соединений фосфора. Значительное количество (до 30—35%) фосфора в почве находится в органической форме, малодоступной для растений. К ним относятся в основном следующие фосфорные эфиры: нуклеиновые кислоты, инозитфосфаты и фосфолипиды.

Микроорганизмы, продуцирующие активные фосфатазы, способны отщеплять от органических фосфатов фосфорную кислоту. Последняя, взаимодействуя с катионами, переходит в соли фосфорной кислоты, доступные для растений.

Для наблюдения процесса 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}). После нескольких дней инкубации при 28—30°C чашки просматривают. Если в почве присутствовали бактерии, выделяющие фосфатазу, они развиваются на этой среде и отщепляют фосфорную кислоту, образующую вокруг колоний зону растворения мела. На такой среде Р. А. Менкина выделила культуру, состоящую из крупных споронных палочек, соединенных попарно и в виде коротких цепочек (рис. 31), идентифицированную как *Bac. megaterium* var. *phosphaticum*.

Дальнейшие исследования показали, что *Bac. megaterium* не единственная форма, способная отщеплять фосфорную кислоту из органофосфатов. Имеются беспоровые палочки (типа *Pseudomonas*), также участвующие в мобилизации фосфорной кислоты из липидов и других фосфорорганических соединений.

Мобилизация доступных форм фосфора из растворенных солей фосфорной кислоты. Значительный процент фосфора в почве находится в виде трикальциевых фосфатов $Ca_3(PO_4)_2$ и других труднорастворимых солей фосфора. Наличие специфичных микроорганизмов, растворяющих трикальциевые фосфаты, не установлены. Микроорганизмы в этом процессе участвуют косвенно. Так, нитрифицирующие бактерии, окисляя аммоний,

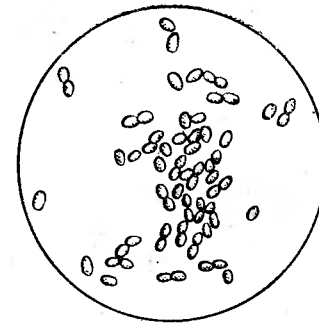
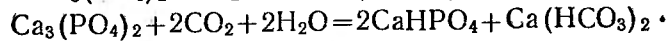
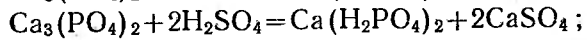
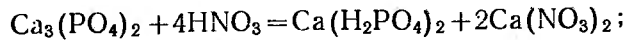


Рис. 31. *Bac. megaterium*.

образуют азотную кислоту; серобактерии, окисляя сероводород и серу, образуют серную кислоту, а другие микроорганизмы в процессах дыхания выделяют углекислый газ, переходящий в углекислоту. Все эти кислоты взаимодействуют с трикальциевым фосфатом и образуют дифосфат и монофосфат кальция, доступные растениям:



Аналогичные влияния могут оказать и другие бактерии, образующие органические кислоты из углеводов.

Для обнаружения растворяющей способности таких бактерий М. Ф. Федоров (1957) рекомендует на дно чашки Петри насыпать 0,1—0,2 г $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и налить в нее расплавленный агар с 2% глюкозы в почвенном экстракте, при осторожном перемешивании фосфат равномерно распределить по чашке. Если такой агар засеять бактериями, образующими кислоту, то при их развитии получатся колонии, окруженные прозрачным ореолом за счет растворения фосфата.

Материалы и оборудование. При постановке опыта: стерильные чашки Петри, элективная среда Р. А. Менкиной, стерильные пробирки с водой, стеклянные шпатели Дригальского и образцы почвы, богатые гумусом, или чистую культуру *Vac. megaterium*, стерильные пипетки Мора на 1 мл и стерильные градуированные пипетки на 1 мл.

Для анализа опыта: микроскоп и все необходимое для микроскопирования.

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Глава XI

ОБЩИЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЧВЫ

1. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В лабораторной практике для учета микроорганизмов в почве используют разные методы, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки.

Наиболее полно отражает численность клеток в почве метод прямого подсчета под микроскопом, требующий высокой квалификации исследователя. Для подсчета зародышей методом Виноградского в модификации Шульгиной на предметное стекло наносят определенный объем суспензии, готовят из него мазок на определенной площади, затем мазок фиксируют, красят и подсчитывают под микроскопом количество клеток микроорганизмов. Фиксация препарата не дает возможности выявить количество жизнеспособных клеток. В какой-то мере этот недостаток можно устранить при использовании метода флуоресцентной микроскопии.

Значительно меньшее число зародышей обнаруживается при посеве почвенной суспензии на жидких средах методом предельных разведений, но он более удобен и требует меньших затрат времени.

Широко применяется метод Коха для учета почвенных микроорганизмов. При этом почвенную суспензию из определенного разведения высевают на плотных питательных средах. Этот метод дает возможность убедиться в наличии живых зародышей, выявить их качественный состав и выделить чистые культуры. Этим методом выявляется больше зародышей, чем методом предельных разведений на жидких средах.

Для определения относительной заселенности той или иной группы микроорганизмов в почве используют ме-

год обрастания ими комочков почвы. В зависимости от физиологической группы микроорганизмов используют соответствующие элективные питательные среды.

2. ГРУППЫ МИКРООРГАНИЗМОВ, СОСТАВ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Группы микроорганизмов, выявляемые на плотных средах. *Микроорганизмы, использующие органические формы азота*, выявляют на мясо-пептонном агаре (МПА) (стр. 60). Для учета бациллярных форм микроорганизмов по Е. Н. Мишустину рекомендуется применять смешанный агар — МПА + сусло = агар в отношении 1 : 1.

Мясо-пептонный агар 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 температуре 70°C в течение 15 мин (бациллярных форм выявляется больше, если почву предварительно перед приготовлением разведений подсушить при комнатной температуре).

Микроорганизмы (в том числе актиномицеты), способные использовать минеральные формы азота, чаще выявляют на крахмало-аммиачном агаре (КАА), содержащем (в г на 1 л дистиллированной воды): крахмал (растворимый) — 10; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2; K_2HPO_4 — 1; MgSO_4 — 1, NaCl — 1; CaCO_3 — 3; агар — 20.

Крахмал приливают к среде, предварительно растворив его в небольшом количестве воды.

Для выявления этой группы микроорганизмов можно использовать и среду Чапека следующего состава (в г на 1 л дистиллированной воды): сахароза или глюкоза — 20,0; NaNO_3 — 2,0; K_2HPO_4 — 1,0; MgSO_4 — 0,5; KCl — 0,5; CaCO_3 — 3,0; агар — 20,0.

При изучении актиномицетов используют также среды с глюкозой.

Среда I (в г на 1 л дистиллированной воды): глюкоза — 14,0; CaCO_3 — 0,7; KNO_3 — 0,7; MgSO_4 — 0,35; NaCl — 0,35; K_2HPO_4 — 0,35; FeSO_4 — следы; агар — 20,0.

Среда II (в г на 1 л дистиллированной воды): глюкоза — 10; натрий лимоннокислый — 11,2; KH_2PO_4 — 2,38; K_2HPO_4 — 5,65; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,64; MgCl_2 — 1,21; ZnSO_4 — 0,012; FeSO_4 — 0,11; CuSO_4 — 0,006; MnCO_3 — 0,0012; агар — 20,0.

Микроорганизмы, участвующие в минерализации гумусовых веществ (автохтонной микрофлоры), обнаруживают на следующих средах.

1. Водный агар (по Эрскову). К 1 л водопроводной воды прибавляют 2—2,5% хорошо отмытого агара и стерилизуют при 120°C в течение 20 мин.

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 в течение 30 мин. Почвенную вытяжку лучше готовить по Фишеру: к 1 кг почвы с высоким содержанием перегноя веществ (гумуса) приливают 1 л 0,1%-ного раствора соды (Na_2CO_3) и нагревают в автоклаве при 115°C 30 мин. Вытяжку фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Если фильтрат получается мутным, его осветляют кипячением с тальком и снова фильтруют. 100 мл экстракта разбавляют в 900 мл воды.

3. Исследования (Теппер, 1963) показали, что представители автохтонной микрофлоры лучше выявляются на нитритном агаре, приготовленном по методу Виноградского, так как нитрит ингибирует рост бациллярных форм, подавляющих развитие микроорганизмов автохтонной группы.

*Азотобактер и олигонитрофильные микроорганизмы, в том числе дрожжи *Lipomyces**, учитывают на среде Эшби следующего состава (в г на 1 л дистиллированной воды): сахароза — 20,0; K_2HPO_4 — 0,2; MgSO_4 — 0,2; NaCl — 2,0; K_2SO_4 — 0,1; CaCO_3 — 5,0; агар — 20,0.

Миксобактерии из почвы и других мест обитания выявляют на средах, рекомендуемых А. А. Имшенецким и Л. И. Солнцевой.

1. Навозный агар. Берут 100 г кроличьего навоза и отваривают в 1 л водопроводной воды. К полученному отвару (после фильтрации через марлю) добавляют 5 г крахмала, 20 г агара и стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 мин.

2. Грибной агар. 50 г измельченного подберезовика или подосиновика отваривают в 1 л водопроводной воды. Полученный отвар фильтруют. В фильтрат

вносят 5 г крахмала и 20 г агара, стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 мин.

3. Картофельный агар.

Микроскопические грибы чаще обнаруживают на сусло-агаре, но можно использовать также кислую среду Чапека.

Для приготовления сусло-агара берут 7-баллинговое сусло, разводят в 3 раза водой и добавляют 2% агара. Среду стерилизуют в автоклаве (при 0,5 атм 30 мин) или кипятыльнике Коха при температуре 100°C в течение 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, двухзамещенный фосфорнокислый калий заменяют эквивалентным количеством однозамещенного фосфорнокислого калия.

Перед тем как среду Чапека внести в чашки Петри, к расплавленному агару этой среды добавляют 4 мл (на 1 л) стерильной концентрированной молочной кислоты.

Группы микроорганизмов, учитываемые на жидких средах (методом предельных разведений). *Аэробные целлюлозоразрушающие микроорганизмы* количество можно учесть на среде Имшенецкого и Солнцевой, содержащей (в %): NaNO_3 —0,25; K_2HPO_4 —0,1; MgSO_4 —0,03; NaCl —0,1; CaCl_2 —0,01; CaCO_3 —0,5; добавлять мел не обязательно.

По 5 мл среды разливают в пробирки, а в качестве источника углерода опускают полоску фильтровальной бумаги (длиной 7—10 см), не содержащей крахмала (реакция с раствором Люголя). Полоска на 4—5 см должна выступать над средой.

Нитрифицирующие бактерии учитывают на жидкой среде Виноградского для бактерий первой фазы нитрификации (стр. 118).

Среды разливают по 25 мл в эрленмейеровские колбы емкостью 100 мл и стерилизуют.

Денитрифицирующие бактерии выявляют чаще на среде Гильтая. Готовят два раствора: 1) KNO_3 —

2,1 г; аспарагин—1,0 г; дистиллированная вода—250 мл; 2) лимоннокислый натрий—5,0 г; KH_2PO_4 —2,0; MgSO_4 —2,0; CaCl_2 —2,0; FeCl_3 —следы; дистиллированная вода—500 мл.

Растворы сливают вместе, устанавливают pH 6,8—7,0 и объем доводят дистиллированной водой до 1000 мл. Хорошие результаты получаются и на более простой среде (стр. 120).

Анаэробные азотфиксаторы (Clostridium pasteurianum) учитывают на среде Виноградского следующего состава (в г на 1 л дистиллированной воды): глюкоза—20,0; K_2HPO_4 —1,0; MgSO_4 —0,5; NaCl —0,5; CaCO_3 —5,0; MgSO_4 —следы; FeSO_4 —следы.

Среду разливают по 9 мл в пробирку (половину пробирки). Перед стерилизацией в пробирку опускают опрокинутый поплавок для улавливания газов (стр. 83).

Группы микроорганизмов, выявляемые методом обростания комочков почвы. *Аэробные целлюлозоразрушающие микроорганизмы.* Для определения качественного состава и относительной оценки населенности их в почве используют гелевые пластины или пластины из «голодного» агара.

На пластинах помещают кружок стерильной фильтровальной бумаги, увлажненной стерильной средой Виноградского (стр. 105) или средой Гатчинсона, затем по фильтровальной бумаге раскладывают (по трафарету) 50 комочков почвы диаметром 1—2 мм.

Среда Гатчинсона (в г на 1 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; pH среды доводят до 7,2 добавлением 20% раствора Na_2CO_3 .

Нитрифицирующие бактерии выявляют на гелевых пластинах, пропитанных 5 мл питательной среды Виноградского (стр. 118) для первой или для второй фазы нитрификации.

Пластины подсушивают в сушильном шкафу при температуре 50°C 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 (стр. 128).

3. ВЗЯТИЕ СРЕДНЕЙ ПОЧВЕННОЙ ПРОБЫ И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА К МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ

Среднюю почвенную пробу получают смешиванием отдельных образцов, количество которых зависит от микрорельефа (ровный, волнистый, склон и т. д.) и площади. Н. К. Красильников (1966) рекомендует с площади 100 м² брать пробу из трех точек, с более 100 м² — из пяти, с гектара и более — из 15. При исследовании пашни пробы берут с глубины всего пахотного слоя, снимая верхний двухсантиметровый слой, при изучении микрофлоры почвенного профиля — по генетическим горизонтам (снизу вверх).

Почвенный образец берут стерильным буром; стерильной лопатой и стерильным ножом в заранее приготовленную стеклянную широкогорлую стерильную банку, закрывающуюся корковой пробкой, обернутой стерильной ватой, или в стерильные полиэтиленовые мешки, или в мешки из пергаментной бумаги. На пакеты или банки наклеивают этикетки с указанием места взятия пробы, горизонта и других необходимых сведений.

Бур, лопату и нож в поле перед взятием образца тщательно очищают, затем обжигают горящим спиртом.

Почвенные образцы анализируют в первые сутки. В случае необходимости допускается хранение их в холодном помещении (в холодильнике) в течение двух дней. Для большей однородности среднего образца, соблюдая все условия асептики, его тщательно перемешивают, вынимают корни растений, различные включения (камни).

4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПОЧВЕННОЙ СУСПЕНЗИИ

На стерильное часовое стекло стерильным шпателем (или алюминиевой ложкой) помещают 10 г почвы и взвешивают. Чтобы при взвешивании в почву не попали бактерии из воздуха, часовое стекло накрывают другим часовым стеклом (предварительно стекла тарируют). Часовые стекла, шпатели и ложки стерилизуют проведением их над пламенем (фламбированием).

Навеску почвы переносят в колбу емкостью 250 мл с 90 мл стерильной водопроводной воды, взбалтывают в течение 10 мин, лучше на механической качалке (рис. 32), и дают отстояться грубым частицам почвы.

Затем методом разведения готовят суспензии, содержащие разные количества почвы.

Одновременно со взятием 10 г почвы для анализа из средней пробы отбирают 10—20 г почвы для определения влажности, так как полученные данные пересчитывают на 1 г абсолютно сухой почвы.

Д. Г. Звягинцев (1966) установил, что значительно больше зародышей выявляется в почве, если навеску ее предварительно поместить в стерильную фарфоровую чашку или ступку, увлажнить (0,4—0,8 мл воды или 0,1%-ным раствором пиррофосфата $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ на 1 г почвы) и в течение 5 мин растереть стерильным резиновым пестиком или пальцем в стерильной резиновой перчатке до пастообразного состояния. Перед приготовлением суспензии для каждого образца готовят две стерильные колбы емкостью 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 почвенной суспензией встряхивают на протяжении 5 мин, оставляют на 30 с и готовят разведения, содержащие разные концентрации почвы. Последующие колбы встряхивают в течение 1 мин.

1 мл суспензии в первой колбе, приготовленной тем или иным методом, соответствует разведению 10^{-1} . Последующие разведения (10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} и т. д.) лучше делать в колбах на 250 мл с 90 мл стерильной водопроводной воды.

Из каждого предыдущего разведения отдельной стерильной пипеткой берут 10 мл почвенной суспензии и переносят в следующую колбу, содержащую 90 мл воды. Каждый раз пипетку ополаскивают и отстаивают. Последующие колбы встряхивают в течение 1 мин.

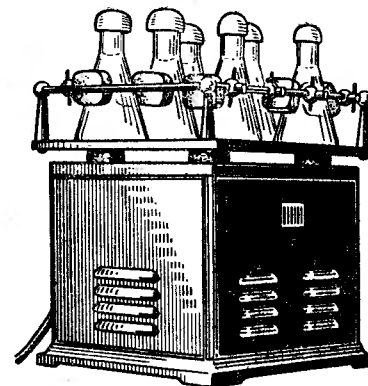


Рис. 32. Механическая качалка для взбалтывания почвенной суспензии.

Из полученных разведений проводят посев на плотные и жидких средах. Набор этих сред зависит от задач, которые ставят перед собой исследователи при бактериологическом анализе почвы.

Суспензии почвы на плотные питательные среды высевают 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 чашках).

При определении количества бактерий в почве пахотного слоя для посева на МПА, 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 ниже на один порядок.

В случае глубинного посева берут 1 мл почвенной суспензии из более низкого разведения (соответственно на один порядок ниже), чем для поверхностного посева. Суспензию вносят в стерильную чашку Петри, заливают расплавленным агаром (охлажденным до 45°C) и перемешивают с ним. При глубинном посеве показатели получаются более низкие, чем при поверхностном.

При учете микроорганизмов почвы в жидких средах последние разливают в колбы или пробирки и стерилизуют. Затем из каждого разведения, начиная с самого высокого, отдельной стерильной пипеткой берут 1 мл суспензии и переносят в жидкую среду. Из каждого разведения засевают минимум две 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 (реакция с AgNO_3 с последующим добавлением HNO_3) и прокипяченные (или простерилизованные) гелевые пластинки пропитывают 3—5 мл элективной среды, приготовленной для соответствующей группы

микробов (обычно среду упаривают в сушильном шкафу при 50°C до образования эмалевой поверхности). 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 зародыши, то они начинают развиваться и формируют вокруг комочков колонии. Затем вычисляют процент обросших комочков почвы от их исходного числа.

После определенного срока инкубации при температуре 28—30°C культуры анализируют.

5. УЧЕТ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ

Учет на плотных средах (на 1 г абсолютно сухой почвы). После инкубации засеянные среды вынимают из термостата и в них подсчитывают число колоний.

Одновременно после сушки бюксов с навесками почвы при температуре 105°C до постоянной массы определяют содержание абсолютно сухой почвы в 1 г анализируемой сырой почвы.

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 их колонии отмечают чернилами или тушью. Чтобы не пропустить мелкие колонии, чашки дополнительно просматривают под лупой. Желательно для подсчета использовать специальный прибор с арифмометром. Если на чашке больше 200 колоний, то их можно подсчитывать с помощью камеры Вольфюгеля (рис. 8). Число колоний на бедных средах (нитритный агар, «голодный» агар, агаризованный почвенный экстракт и т. д.) определяют под микроскопом (окуляр 10X и объектив 3X, в крайнем случае окуляр 10X и объектив 8X).

В чашках Петри сначала подсчитывают 100 полей зрения, затем выводят среднее арифметическое на одно поле. Для определения числа колоний на чашке среднее число их на одно поле зрения переводят на общую площадь чашки. Устанавливают площадь чашки Петри (P) и площадь поля зрения (p), с тем, чтобы выявить, сколько полей зрения используемой системы помещается на площади чашки, для чего площадь чашки делят на площадь поля зрения и получают коэффициент K

$\left(\frac{P}{p}=K\right)$, на который умножают среднее число колоний в поле зрения на чашке. Площади чашки Петри и поля зрения определяют по формуле πr^2 .

Диаметр чашки Петри устанавливают визуально, а поля зрения — под микроскопом, используя для малых увеличений миллиметровую бумагу, а для больших (объективы 40 и 90) — объектный микрометр.

Подсчитав при поверхностном посеве число колоний на чашке, находят содержание зародышей в 1 мл соответствующего разведения, умножив число колоний на 20 (так как посеяно было 0,05 мл), а чтобы определить количество клеток микроорганизмов в 1 г сырой почвы, полученное число клеток в 1 мл умножают на степень разведения (10^3 , 10^4 , 10^5 и т. д.).

Для учета числа зародышей 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. 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 на 1 г абсолютно сухой почвы

$$X = \frac{52 \cdot 20 \cdot 1000}{0,75} = 1\ 386\ 666.$$

При глубинном посеве число колоний на 1 г абсолютно сухой почвы подсчитывают таким же образом, но не умножают на 20, так как при высеве используют 1 мл суспензии.

Подсчет желательнее вести и 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 визуально на четвертый день после посева. При наличии колоний *Vac. mycoides* количество микробов определяют на второй или третий день. После подсчета всех колоний на чашке их группируют по культуральным признакам и определяют роды (а иногда и виды) микроорганизмов, входящих в состав этих колоний.

Учет микрофлоры на крахмало-аммиачном агаре. Колонии на таком агаре подсчитывают на 7—10-й день. Из общего количества микроорганизмов отдельно учитывают: 1) пигментные — желтые и другие микробактерии,

образующие мелкие куполообразные колонии; 2) *Actinomyces* (= *Streptomyces*) — организмы с хорошо развитым несептированным мицелием и особыми органами плодоношения.

Отмечают окраску колоний, воздушного мицелия (серый, белый, зеленовато-серый, розовый) и среды (выделение пигмента в субстрат). Для описания пигментации можно использовать специальные пособия для определения цвета.

При дифференциации актиномицетов описывают консистенцию колоний (плотные, кожистые, рыхлые), поверхность (мучнистая, бархатистая) и запах (землистый, эфирный, фруктовый) колоний.

Учет микроорганизмов на бедной среде (нитритном агаре). Колонии на бедной среде учитывают под микроскопом на 6—7-й день культивирования. Если на колониях появляются *Protozoa* (о их наличии судят по образованию цист, которые хорошо просматриваются при малом увеличении объектива), подсчет проводят после шести дней инкубации.

При дифференциации колоний по культуральным признакам выделяют следующие роды.

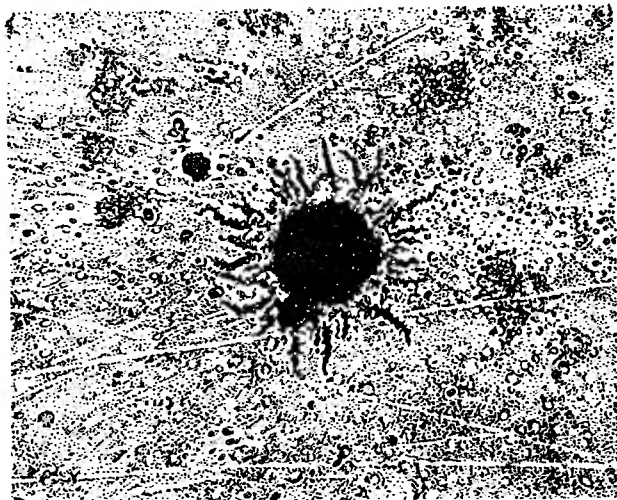
1. *Nocardia* (= *Proactinomyces*) — колонии пастообразные, слизистые, сухие, по периферии образуется мицелиальная зона или мицелиальный ободок (рис. 33, а), состоящий из субстратного и надсубстратного мицелия. В центре колонии чаще преобладают кокковидные клетки. Колонии бесцветные, лимонно-желтые, желтые, розовые, красные.

2. *Mycobacterium*.

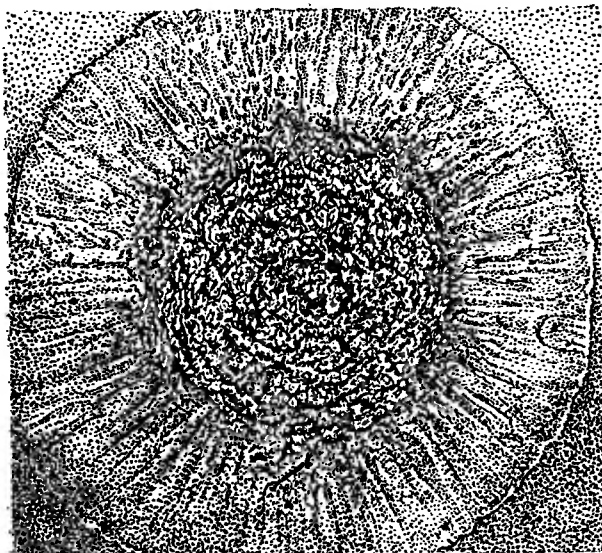
3. *Arthrobacter* — колонии мелкие, плоские или слегка приподнятые, бесцветные, иногда с зеленовато-желтым оттенком. По периферии колонии образуется круговой или складчатый ободок. У отдельных представителей края колоний зазубренные, а молодая культура состоит из мелких искривленных палочек, затем они довольно быстро распадаются, чаще на кокковидные клетки.

5. Переходные формы от нокардий к микобактериям — в центре, а чаще по периферии колоний образуется недоразвитый мицелий. В редких случаях мицелий вырастает в субстрат, в виде кустистых образований.

5. *Микромоноспоры* — компактный мицелий полностью погружается в субстрат и становится едва замет-



а



б

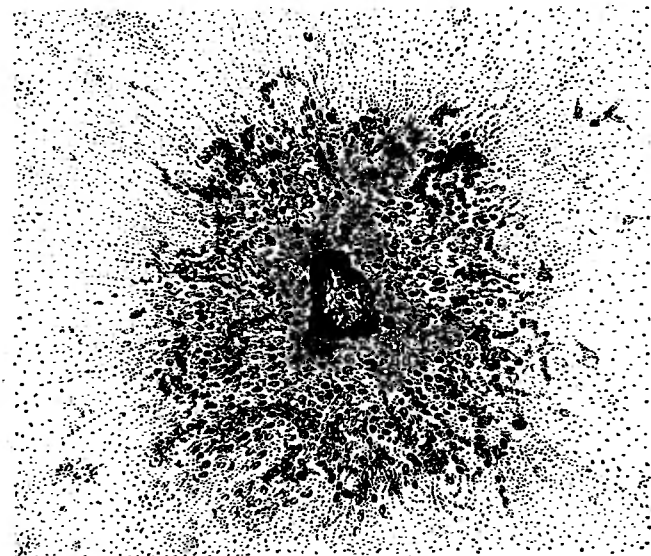
Рис. 33. Характер роста колоний
а — *Nocardia*; б — *Bactoderma*;

ным под микроскопом, а на поверхности агара кольцеобразно или радиально располагаются комочки слизи (бесцветные или темноокрашенные), содержащие споры этих микроорганизмов (рис. 33, б).

6. *Bactoderma* — колонии мелкие, в виде розоватого бархатистого налета, состоящего из пленки; в центре пленка складчатая, а по периферии — стекловидная. Край колонии волнистый или лопастный (рис. 33, в).

Учет на среде Эшби проводят на 5—6-е сутки. Отдельно подсчитывают колонии азотобактера — плоские, слизистые, мажущей консистенции, диаметром 5—10 мм и олигонитрофильные бактерии — мелкие слизистые бесцветные колонии. Олигонитрофильные дрожжи — *Lipomyces* образуют слизистые молочно-белые колонии.

Учет миксобактерий (на картофельном агаре) — колонии амёбовидные, так как бактерии по среде продвигаются «всем фронтом». Вегетативные клетки расположены на слизи по краю колонии, а плодовые тела — ближе к центру концентрическими кольцами. Дифференцировка видов, родов и семейств основывается на



в

на бедной среде (нитритном агаре):
в — сем. *Micromonosporaceae*.

характере плодовых тел. Однако не все виды миксобактерий при выращивании на агаровых средах образуют плодовые тела;

1. Род *Archangium* — колонии или псевдоплазмодии не образуют закругленных цист, но скручиваются, формируя брыжейкоподобные массы.

2. Род *Sorangium* — колонии образуют оформленные угловатые цисты, соединенные в закругленные плодовые тела.

3. Род *Polyangium* — колонии или псевдоплазмодии образуют закругленные или сферические цисты, окруженные мембраной или тесно сжатые, погруженные в слизистый слой.

4. Род *Mucosoccus* — плодовые тела сферические или удлиненные (колонкоподобные). У основания образуют обилие слизи. В плодовых телах палочки укорачиваются, формируя круглые микроцисты.

Учет количества грибов на агаровых средах. Колонии грибов на сусло-агаре или среде Чапека подсчитывают через двое суток инкубации. После семи дней определяют их родовой состав.

В почве часто встречаются грибы родов: *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Macrosporium*, *Chaetomium*, *Cephalosporium*, *Phoma coremium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Stachybotrys*.

При минимальной технической ошибке опыта возможна статистическая обработка материала. Наиболее вероятное количество микроорганизмов, содержащееся в 1 г (1 мл) исходного субстрата, при уровне достоверности 95% ($P_0, 95$) вычисляют по формуле:

$$(\bar{X} \pm 2\sigma_{\bar{X}}) \cdot K \cdot \frac{1}{V}$$

где $\bar{X} = \frac{\Sigma X}{n}$ — среднее число колоний, выросшее при посеве из данного разведения;

ΣX — общее количество подсчитанных колоний при посеве данного разведения;

n — число повторностей;

$\sigma_{\bar{X}} = \pm \frac{\sqrt{\Sigma X}}{n}$ — среднее квадратическое отклонение;

2 — (t) — критерий при $P_0, 95$;

K — разведение, из которого проведен посев;

V — объем суспензии, взятый для посева (в мл).

Если уровень достоверности 99%, то (t)-критерий соответствует 2,7, поэтому для $P_0, 99$ формула имеет следующий вид:

$$(\bar{X} + 2,7\sigma_{\bar{X}}) \cdot K \cdot \frac{1}{V}$$

1. Численность колоний микроорганизмов, выросших на МПА

Разведение	Повторность	Количество колоний в чашках	Σx	\bar{x}	δx	Наиболее вероятное количество микроорганизмов в 1 г исходного субстрата при $P_0, 95$ (доверительный интервал)
10^{-4}	1	125				
	2	127				
	3	129				
	4	130				
	5					
10^{-5}	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
10^{-6}	1					
	2					
	3					
	4					
	5					

Учет микроорганизмов на жидких средах. При определении численности зародышей на этих средах отмечают крестом пробирки с разведением, в которых наблюдается развитие микроорганизмов данной группы. Затем для более точного подсчета зародышей используют таблицу Мак-Креди, составленную на основании обработки многочисленных результатов методом вариационной статистики. В соответствии с требованиями, предъявляемыми при расчете, необходимо составить числовую характеристику из трех цифр.

Первая цифра отвечает числу параллельно засеянных пробирок (отмечается то последнее разведение, в котором рост микроорганизмов наблюдается во всех параллельных пробирках). Следующие две цифры обозначают число пробирок, где происходит развитие микробов в последующих двух разведениях. В таблице Мак-Креди находят вероятное число клеток, соответствующее числовой характеристике, и умножают на степень раз-

ведения, в котором был отмечен рост во всех параллельных пробирках.

Пример	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
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 будет 421; вероятное число клеток 9,5 (найденно в таблице). Для учета зародышей на 1 г абсолютно сухой почвы полученное число делят на количество 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 равно

$$\frac{9,5 \cdot 1000}{0,75} = 12\ 666.$$

Наличие нитрифицирующих бактерий первой фазы определяют по образованию нитритов (реакция с цинк-йод-крахмалом в кислой среде). Пробы берут через 7, 14 и 21 день инкубации.

Наличие денитрифицирующих бактерий и анаэробных азотфиксаторов (Clostridium pasteurianum) устанавливают на 5—6-е сутки культивирования по присутствию газов в поплавках.

Наличие аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов определяют на 8—10-й день инкубации в термостате по образованию колоний и разрушению клетчатки на границе между жидкой средой и воздухом.

Учет микроорганизмов методами обрастания комочков почвы. При этих методах подсчитывают комочки, образовавшие вокруг себя колонии, а затем определяют, какой процент они составляют от общего числа комочков почвы (относительная оценка плотности населения учитываемых групп микроорганизмов в почве).

Рост нитрифицирующих бактерий устанавливают по образованию зон растворения CaCO₃ или MgCO₃. Кроме того, из этих зон вырезают кусочки геля и делают пробу на NH₃ (реактив Несслера), на нитрит (цинк-йод-крахмал в присутствии H₂SO₄) и на нитрат (дифениламин).

Колонии азотобактера на гелевых пластинах определяют на 3—5-е сутки инкубации по сероватым слизистым колониям, которые постепенно приобретают тем-

2. Быстрая обработка результатов учета микробов по методу предельных разведений (таблица Мак-Креди)

Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микробов при заражении параллельных пробирок				Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микробов при заражении параллельных пробирок			
	2	3	4	5		2	3	4	5
000	0,0	0,0	0,0	0,0	232	—	4,0	—	—
001	0,5	0,3	0,2	0,2	240	—	—	2,0	1,4
002	—	—	0,5	0,4	241	—	—	3,0	—
003	—	—	0,7	—	300	—	2,5	1,1	0,8
010	0,5	0,3	0,2	0,2	301	—	4,0	1,6	1,1
011	0,9	0,6	0,5	0,4	302	—	6,5	2,0	1,4
012	—	—	0,7	0,6	303	—	—	2,5	—
013	—	—	0,9	—	310	—	4,5	1,6	1,1
020	0,9	0,6	0,5	0,4	311	—	7,5	2,0	1,4
021	—	—	0,7	0,6	312	—	11,5	3,0	1,7
022	—	—	0,9	—	313	—	16,0	3,5	2,0
030	—	—	0,7	0,6	320	—	9,5	2,0	1,4
031	—	—	0,9	—	321	—	15,0	3,0	1,7
040	—	—	0,9	—	322	—	20,0	3,5	2,0
041	—	—	1,2	—	330	—	25,0	3,0	1,7
100	0,6	0,4	0,3	0,2	331	—	45,0	3,5	2,0
101	1,2	0,7	0,5	0,4	332	—	110,0	4,0	—
102	—	1,1	0,8	0,6	333	—	140,0	5,0	—
103	—	—	1,0	0,8	340	—	—	3,5	2,0
110	1,3	0,7	0,5	0,4	341	—	—	4,5	2,5
111	2,0	1,1	0,8	0,6	350	—	—	—	2,5
112	—	—	1,1	0,8	400	—	—	2,5	1,3
113	—	—	1,3	—	401	—	—	3,5	1,7
120	2,0	1,1	0,8	0,6	402	—	—	5,0	2,0
121	3,0	1,5	1,1	0,8	403	—	—	7,0	2,5
122	—	—	1,3	1,1	410	—	—	3,5	1,7
123	—	—	1,6	—	411	—	—	5,5	2,0
130	—	1,6	1,1	0,8	412	—	—	8,0	2,5
131	—	—	1,4	1,0	413	—	—	11,0	—
132	—	—	1,6	—	414	—	—	14,0	—
140	—	—	1,4	1,1	420	—	—	6,0	2,0
141	—	—	1,7	—	421	—	—	9,5	2,5
200	2,5	0,9	0,6	0,5	422	—	—	13,0	3,0
201	5,0	1,4	0,9	0,7	423	—	—	17,0	—
202	—	2,0	1,2	0,9	424	—	—	20,0	—
203	—	—	1,6	1,2	430	—	—	11,5	2,5
210	6,0	1,5	0,9	0,7	431	—	—	16,5	3,0
211	13,0	2,0	1,3	0,9	432	—	—	20,0	4,0
212	20,0	3,0	1,6	1,2	433	—	—	30,0	—
213	—	—	2,0	—	434	—	—	35,0	—
220	25,0	2,0	1,3	0,9	440	—	—	25,0	3,5
221	70,0	3,0	1,6	1,2	441	—	—	40,0	4,0
222	110,0	3,5	2,0	1,4	442	—	—	70,0	—
223	—	4,5	—	—	443	—	—	140,0	—
230	—	3,0	1,7	1,2	444	—	—	160,0	—
231	—	3,5	2,0	1,4	450	—	—	—	4,0

Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микробов при заражении параллельных пробирок				Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микробов при заражении параллельных пробирок			
	2	3	4	5		2	3	4	5
451	—	—	—	5,0	532	—	—	—	14,0
500	—	—	—	2,5	533	—	—	—	17,5
501	—	—	—	3,0	534	—	—	—	20,0
502	—	—	—	4,0	535	—	—	—	25,0
503	—	—	—	6,0	540	—	—	—	13,0
504	—	—	—	7,5	541	—	—	—	17,0
510	—	—	—	3,5	542	—	—	—	25,0
511	—	—	—	4,5	543	—	—	—	30,0
512	—	—	—	6,0	544	—	—	—	35,0
513	—	—	—	8,5	545	—	—	—	45,0
520	—	—	—	5,0	550	—	—	—	25,0
521	—	—	—	7,0	551	—	—	—	35,0
522	—	—	—	9,5	552	—	—	—	60,0
523	—	—	—	12,0	553	—	—	—	90,0
524	—	—	—	15,0	554	—	—	—	100,0
525	—	—	—	17,5	555	—	—	—	180,0
530	—	—	—	8,0	—	—	—	—	—
531	—	—	—	11,0	—	—	—	—	—

но-бурый пигмент (*Azotobacter chroococcum*) или зеленый пигмент (*Azotobacter agile*).

Аэробные целлюлозоразрушающие микроорганизмы на гелевых пластинах учитывают на 8—10-й день инкубации. Кроме общего подсчета обросших комочков почвы, отдельно определяют процент комочков, обросших бактериями, актиномицетами и грибами.

Из бактерий можно выделить следующие роды: а) *Cytophaga* — колонии желтые, гладкие, плоские, слизистые, состоящие из палочек с заостренными концами; б) *Cellvibrio* — вибрионы, образующие охристые, зеленые и бесцветные колонии, развиваются быстро; в) *Muxococcus* — шаровидные клетки, создающие колонии на клетчатке в виде слизистых пятен розового, желтого цвета (иногда бесцветные); г) *Polyangium* и *Soran-gium* (см. «Окисление клетчатки», стр. 106).

Из грибов, разрушающих клетчатку, часто можно обнаружить представителей следующих родов: а) *Dematiium* — образуют одноклеточные бесцветные конидии округлой или овальной формы. Вегетативные клетки состоят из цепочки темных цилиндрических клеток (рис. 34, а). Колонии на клетчатке имеют вид черных пятен;

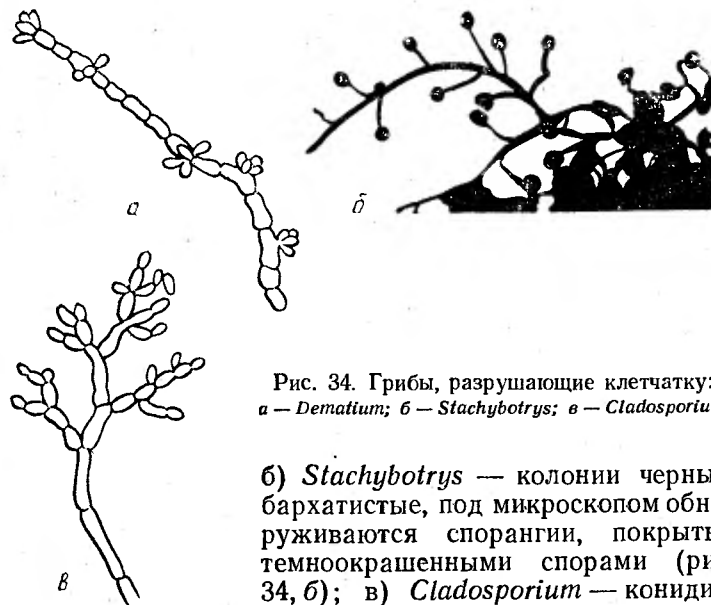


Рис. 34. Грибы, разрушающие клетчатку: а — *Dematiium*; б — *Stachybotrys*; в — *Cladosporium*.

б) *Stachybotrys* — колонии черные, бархатистые, под микроскопом обнаруживаются спорангии, покрытые темноокрашенными спорами (рис. 34, б); в) *Cladosporium* — конидиеносцы длинные многоклеточные, отделяют неправильной формы конидии (рис. 34, в). Колонии окрашены в светлый оливково-зеленый цвет; г) *Fumago* — колонии на клетчатке темные и состоят из скоплений (в виде узелков) темных овальных и округлых клеток; д) *Chaetomium* — образуют перитеции серого или зеленоватого цвета; е) аспорогенные грибы — образуют желтый или белый мицелий, без спороношения; ж) олигонитрофильные дрожжи (*Lipomyces*) образуют вокруг комочков почвы слизистые молочно-белые колонии через 15—20 суток инкубации.

Материалы и оборудование. Питательные среды в колбах (МПА и КАА), жидкие среды в пробирках: среда для аэробных целлюлозоразрушающих бактерий, среда Гильтая, среда для анаэробных азотфиксаторов (*Clostridium pasteurianum*); силикагелевые пластины, пропитанные питательной средой для азотобактера и аэробных целлюлозоразрушающих бактерий, стерильные чашки Петри, колбы со стерильной водопроводной водой по 90 мл, стерильные моровские пипетки на 10 мл, стерильные градуированные пипетки на 1 мл, стерильные шпатели Дригальского, часовые стекла, стеклянные палочки с оттянутыми концами, свежие почвенные пробы (почвы разных типов), чайные ложки, пинцеты, трафареты, счетные камеры Вольфюгеля, лупы, микроскопы, предметные стекла и все необходимое для приготовления окрашенных препаратов, препаратов в раздувленной капле и для микроскопирования.

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ В ПОЧВЕ МЕТОДОМ ПРЯМОГО СЧЕТА ПОД МИКРОСКОПОМ

Метод Виноградского в модификации Шульгиной. Для более полного выявления численности микроорганизмов в почве используют и прямые методы их изучения (Виноградский, 1952; Штруггер, 1949; Звягинцев, 1959).

Прямой метод подсчета бактерий в почве стал возможным после того, как Конн предложил применять для окрашивания почвенной суспензии кислые красители, хорошо прокрашивающие клетки микроорганизмов и слабо — почвенные частицы.

С. Н. Виноградский установил, что разные почвенные фракции содержат неодинаковое количество микроорганизмов. Для более точного определения их численности в почве он предложил из почвенной суспензии готовить несколько фракций. Из каждой фракции, согласно его методу, приготавливают препарат на площади 1 см². На аналитических весах устанавливают точную массу высушенного препарата (предварительно взвешивают на этих весах чистое стекло) и после фиксации окрашивают эритрозином в феноловой воде.

Под микроскопом подсчитывают число зародышей в поле зрения. Зная площадь и массу мазка, а также площадь поля зрения, вычисляют количество бактерий в данной фракции почвы и в 1 г.

Исследования по методу Виноградского показали, что меньше всего микроорганизмов во фракции крупных частиц почвы и больше в самой дисперсной фракции, содержащей максимум органического вещества. Метод имеет ряд достоинств, но он очень громоздок для широкого пользования. В лабораторной практике этот метод чаще применяют в упрощенной модификации О. Г. Шульгиной. Из тщательно отобранной средней почвенной пробы берут 5 г и вносят в эрленмейеровскую колбу емкостью 250 мл, содержащую 50 мл стерильной водопроводной воды.

Согласно Д. Г. Звягинцеву (см. стр. 147), навеску почвы следует предварительно растереть в стерильной агатовой или фарфоровой ступке с небольшим количеством стерильной воды. Для черноземов и темно-каштановых почв растирают навеску с 0,1%-ным рас-

вором пиррофосфата натрия. После встряхивания в течение 5 мин с водой или раствором пиррофосфата дают осесть грубым частицам (2—5 с), из полученной взвеси стерильной градуированной пипеткой берут 0,01 мл и переносят на хорошо обезжиренное предметное 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 графарету на 4 см² (графарет делают следующим образом: на миллиметровой бумаге тушью заштриховывают 4 см² и бумагу приклеивают к предметному стеклу с нижней стороны).

Препарат подсушивают, фиксируют 96%-ным спиртом и красят карболовым эритрозином (от 30 мин до суток). При окрашивании стекла погружают в раствор эритрозина. Остаток красителя смывают опусканием стекла в воду тыльной стороной, затем препарат подсушивают и просматривают под микроскопом с иммерсионной системой объектива.

Для получения более точных результатов подсчитывают число зародышей в 100 полях зрения и определяют среднее количество на одно поле зрения. Одновременно устанавливают площадь поля зрения (p), которое представляет собой площадь круга πr^2 . Диаметр поля зрения измеряют при помощи объектного микрометра. После определения площади поля зрения находят, сколько полей зрения размещается на площади

мазка—400 мм² (P), для чего P делят на $p \left(\frac{P}{p} \right)$. Если диаметр поля зрения равен 0,16 мм, площадь поля зрения 0,02 мм², то $\frac{P}{p} (K) = \frac{400 \text{ мм}^2}{0,02 \text{ мм}^2} = 20 \text{ 000}$.

Среднее число клеток в поле зрения умножают на 20 000 и устанавливают число клеток в 0,01 мл суспензии. Для определения количества их в 1 мл суспензии умножают полученное число на 100, а для определения 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 бактерий в почве показало, что в ней содержится в сотни и тысячи раз больше клеток микроорганизмов по сравнению с

тем, что удастся учесть методом питательных пластин. Большой недостаток метода — невозможность установить число жизнеспособных зародышей. В какой-то мере его можно устранить при использовании метода флуоресцентной микроскопии.

Определение общего количества бактерий в почве с использованием метода флуоресцентной микроскопии (в модификации Звягинцева). Метод основан на контрастной окраске почвенных частиц и клеток микроорганизмов в флуоресцентном микроскопе.

При окрашивании почвы раствором акридина оранжевого почвенные частицы в флуоресцентном микроскопе выглядят красными, а клетки микроорганизмов — зелеными. Метод дает возможность подсчитывать не только свободные клетки, но и клетки в микроколонии, адсорбированные на поверхности почвенных частиц и микроагрегатов, а также рассматривать вегетативные клетки, клетки в состоянии спор и частично дифференцировать живые и мертвые клетки. Водоросли и содержащие хлорофилл микроорганизмы рассматривают в флуоресцентном микроскопе без окрашивания почвенной суспензии, так как пигмент сам обладает интенсивной красной флуоресценцией.

Д. Г. Звягинцев (1966) рекомендует микроорганизмы в флуоресцентном микроскопе подсчитывать следующим образом.

Сначала готовят суспензию разведения 10^{-2} , затем пипеткой отбирают пробы по 1 мл в 5—10 пробирок.

В каждую из этих пробирок добавляют по 1 мл раствора акридина оранжевого из следующих концентраций: 1:500; 1:1000; 1:2000; 1:4000; 1:8000; 1:16 000; 1:32 000. Для почв с большим количеством коллоидов применяют более концентрированные растворы акридина оранжевого, для остальных — более разбавленные. После определения концентрации красителя готовят еще более дробные его разведения и определяют оптимальную концентрацию акридина оранжевого.

Для многих почв (черноземные, темно-каштановые и др.) Д. Г. Звягинцев рекомендует растирать навеску и готовить суспензию с пирофосфатом натрия. При этом следует испытать 5%, 1% и 0,1%-ные концентрации.

Пирофосфат способствует диспергированию почвы и десорбции микроорганизмов, а также частичному

затуханию красной флуоресценции; зеленые микробные клетки вырисовываются четче. В качестве тушителя применяют также фуксин Циля и диазоновый зеленый.

Подсчитывают микроорганизмы в специальных камерах глубиной 10—25 мкм и в счетных капиллярах Перфильева. Камеру Горяева для этой цели использовать нельзя.

Можно проводить подсчет в раздавленной капле; края покровного стекла заливают парафином для предохранения суспензии от высыхания. В этом случае непосредственно под микроскопом, используя деления у микровинта, определяют слой жидкости между предметным и покровным стеклом.

Микроскопируют препарат с объективом $90\times$ (апертура 1,3) или $60\times$ (апертура 1,0). Применяют нефлуоресцирующее парафиновое масло, которое можно приобрести в аптеке. Лучше использовать окуляр, увеличением $5-7\times$. В него вставляют из картона бленду*, которая в 2—3 раза уменьшает площадь зрения микроскопа. Ее определяют объективным микрометром.

В поле зрения должно находиться 10—20 клеток микроорганизмов. Если их меньше или больше, следует изменить концентрацию суспензии. Для большей достоверности рекомендуется просчитывать 100—500 полей зрения.

Окрашивают препараты за 10—20 мин до их просмотра, так как окрашенные клетки остаются живыми и могут размножаться.

Студентам рекомендуется применять метод прямого счета бактерий Виноградского в модификации Шульгиной.

Материалы и оборудование. Средняя почвенная проба, эрленмейеровские колбы емкостью 250 мл, содержащие 50 мл стерильной водопроводной воды, пустые стерильные колбы на 250 мл, 0,1%-ный раствор пирофосфата натрия, фарфоровая ступка с пестиком, спирт 96%-ный, хорошо обезжиренные предметные и покровные стекла, стерильные градуированные пипетки на 1 мл, 0,1%-ный агар, карболовый раствор эритрозина, трафареты на 4 см^2 , объектный микрометр, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

* Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболизма. Изд-во МГУ, 1966, стр. 28—30.

ИЗУЧЕНИЕ ЦЕНОЗОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

1. МЕТОД ОБРАСТАНИЯ СТЕКОЛ ПО Н. Г. ХОЛОДНОМУ

На ровной поверхности почвы делают ножом разрез, глубина которого зависит от исследуемого почвенного горизонта. Отмытые и обезжиренные стекла плотно прикладывают к вертикальной стенке разреза. Одновременно закапывают несколько стекол, плотно прижимая их к стенке. В пахотном слое стекла закапывают на 3—5 см ниже поверхности. Сверху разрез закрывают почвой и место, где заложены стекла, отмечают этикеткой. Стекла выдерживают в почве в зависимости от задачи исследования от недели до нескольких месяцев.

Затем с тыльной стороны стекла почву откапывают, стекло откидывают от стенки и вынимают. Нижнюю сторону вытирают сухой тряпкой, а верхнюю — высушивают на воздухе и фиксируют на пламени горелки. После фиксации стекло погружают в воду верхней стороной вниз, не доводя 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 и выдерживают с красителем от 30 мин до 24 ч.

Окрашенные препараты исследуют под микроскопом с иммерсионной системой объектива. Конденсор также погружают в масло.

При микроскопировании отмечают характер микрофлоры, плотность обрастания и доминирующие формы. Отдельные ассоциации можно запечатлеть, используя микрофотосъемку.

2. ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБНЫХ ЦЕНОЗОВ В ПОЧВЕ
ПО МЕТОДУ ПЕРФИЛЬЕВА И ГАБЕ

Учитывая, что в естественных условиях в почве микроорганизмы развиваются в основном в капиллярах, стенки которых представляют почвенные частицы, Б. В. Перфильев и Д. Р. Габе сконструировали капиллярный прибор — педоскоп (рис. 35). Он состоит из наборов пятиходовых капиллярных ячеек с тонкой

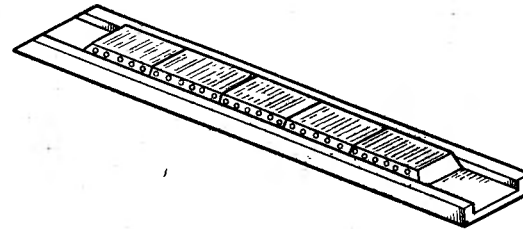


Рис. 35. Общий вид капиллярного педоскопа.

кровлей, вставленных в стеклянную обойму или держатель. В него можно вставить 5—7 ячеек. Держатель представляет собой стеклянный желоб длиной 70 мм, шириной 8—11 мм, с плоским дном и наклонными (под углом 45°) боковыми стенками.

Оси каналов капилляров должны быть ориентированы перпендикулярно к оси держателя.

Педоскопы нумеруют. Цифры на стекло наносят тушью, сверху покрывают клеем БФ-2 и помещают в сушильный шкаф при температуре 170°C. Пленка становится водонепроницаемой. По несколько педоскопов, завернутых в бумагу, помещают в чашки Петри и стерилизуют сухим жаром.

В рыхлые почвы педоскопы вставляют легко, в уплотненные сначала вводят специальный металлический пробойник — металлический стержень с заостренным концом, сделанный по величине педоскопа и вставленный в тонкостенный футляр из жести.

После экспозиции в течение 30 дней или более педоскопы извлекают из почвы, поверхность их тщательно очищают от приставших частиц и рассматривают микроорганизмы, развившиеся в каналах капилляров.

Педоскопы, извлеченные из почвы, устанавливают на специальный столик, предохраняющий содержимое капилляров от высыхания. Микробы в педоскопах могут быть зафиксированы и окрашены. Фиксируют их в парах осмиевой кислоты (ячейки на 10 мин помещают в чашки Петри, в которые налито несколько капель 2%-ной осмиевой кислоты) или в парах 40%-ного раствора формалина. Красят эритрозином, промывают в стакане с водой. Ячейки с помощью канадского бальзама укрепляют на тонкой стеклянной пластине (0,2—0,3 мм толщиной) и в специальном держателе ставят на крестообразный столик микроскопа. В каналы капилляров вводят кедровое масло и просматривают с иммерсионной системой объектива.

3. МЕТОД КАПИЛЛЯРОВ ПЕРФИЛЬЕВА В МОДИФИКАЦИИ АРИСТОВСКОЙ

Т. В. Аристовская использовала метод Перфильева и Габе для изучения ценозов почвы, участвующих в разложении находящихся в ней гумусовых веществ. Стенки педоскопов покрывают питательной средой, содержащей фракцию гумуса. В качестве питательного субстрата применяют органо-минеральные комплексы гумуса, свойственные исследуемому типу почв.

50 г почвы заливают 1 л 0,1 н. раствора NaOH и через 18—20 ч отфильтровывают, pH фильтрата осторожно доводят 0,2 н. HCl до 5. Затем в него по каплям прибавляют 20%-ный раствор FeCl₃ до полного выпадения гумусовых веществ в форме геля, который отфильтровывают и отмывают от следов хлора (проба с 1%-ным раствором AgNO₃ с добавлением азотной кислоты).

Около 5 мл геля растирают в ступке, взбалтывают в 1 л воды, вносят 0,1%-ный раствор агара и стерилизуют.

Для покрытия стенок капилляров средой педоскоп боковой стороной помещают в чашку Петри с агаризованным расплавленным субстратом, который заполняет отверстия капилляров. Затем поверхность педоскопа тщательно протирают стерильной ватой, можно подсушить его со средой; она покроет только стенки капилляров. Следует тщательно следить, чтобы среда не образовала в каналах капилляров перемычек, которые будут мешать циркуляции по капиллярам почвенного раствора и затруднят окрашивание микроорганизмов.

4. ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ АУТОХТОННОЙ ГРУППЫ, УЧАСТВУЮЩЕЙ В РАЗЛОЖЕНИИ ГУМУСОВЫХ ВЕЩЕСТВ, ПО МЕТОДУ ВИНОГРАДСКОГО В МОДИФИКАЦИИ ТЕППЕР

Для выявления аутохтонной (местной) группы микробов С. Н. Виноградский рекомендует отмытые от следов хлора (реакция с AgNO₃ с последующим добавлением азотной кислоты) и прокипяченные гелевые пластины пропитать минеральной средой без источников углерода и азота (в г на 200 мл дистиллированной воды).

K ₂ HPO ₄	1,0	FeSO ₄	0,01
MgSO ₄	0,5	Mn ₂ (SO ₄) ₃	0,01
NaCl	0,5		

В чашку вносят 3—5 мл среды и добавляют гуматы кальция. После упаривания среды (при температуре 40—50°C) до образования эмалевой поверхности по ней раскладывают 40—50 комочков почвы или перед упариванием добавляют почвенную суспензию.

Исследования Е. З. Теппер* показали, что вместо Са-гуматов лучше использовать Na-гуматы (8—10 мг на чашку).

Более крупные колонии микроорганизмов получают, если гуматы используют только как источник углерода. В этом случае в минеральную среду вносят еще азот в виде KNO₃ (14 мг на чашку). Гелевые пластины с гуматами помещают во влажную камеру и выдерживают при 25—28°C 40—50 дней и больше. Вокруг комочков почвы на гуматах появляются специфические бурые колонии, диффундирующие в гель, или колонии в виде тонких бархатистых налетов розового или белого цвета (колонии *Bactoderma alba* и *Bactoderma rosea*).

Исследования показали, что часть бурых колоний состоит из нокардий (проактиномицетов) и микобактерий. Часть бурых колоний образует микромоноспоры и артробактер. Эти микроорганизмы можно затем выделить на нитритном агаре.

5. ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РАЗЛОЖЕНИИ ГУМУСОВЫХ ВЕЩЕСТВ, ПО МЕТОДУ ТЕППЕР

Чтобы установить, какие микроорганизмы в данной почве реагируют на отдельные фракции гумуса, нужно из средней пробы взять навеску почвы в 25 г и поместить на гелевые пластины, пропитанные минеральной средой Виноградского без источников углерода и азота. Почву смачивают до полного насыщения слабым раствором Na-гумата (или другой фракцией гумусовых веществ), содержащего примерно 0,5 мг* углерода в 1 мл гумата. Часть гуматов при этом проникает в гель.

* Теппер Е. З. Микробиология, т. 32, вып. 4.

Чашки помещают во влажную камеру и выдерживают при температуре 25—28°C 50—60 суток и более. Если в почве находится специфичная микрофлора, разлагающая гуматы, она начинает развиваться и образует бурые колонии на поверхности комочков почвы или колонии в виде тонких бархатистых налетов. Иногда бурые колонии диффундируют также в гель.

Выделить чистую культуру из бурых колоний и колоний в виде налетов на бедной среде (лучше на нитритном агаре).

Глава XIII

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ ПО ИНТЕНСИВНОСТИ РАЗЛОЖЕНИЯ ПОЛОТНА (МЕТОД МИШУСТИНА, ВОСТРОВА И ПЕТРОВОЙ)

Чем выше в почве содержание подвижного азота и других элементов питания, тем активнее в ней происходят процессы окисления клетчатки.

Так как целлюлозоразрушающие микроорганизмы, разлагая клетчатку, синтезируют и частично выделяют в среду аминокислоты, при обработке остатков полуразрушенного полотна 0,5%-ным раствором нингидрина в тех местах, в которых активно развивались микробы и разлагалась клетчатка, на полотне образуются сиреневые пятна (реакция аминокислоты с нингидрином).

При постановке опыта обшивают льняным полотном хорошо отмытые стекла (10×50), стерильной лопатой и стерильным ножом делают почвенный разрез на глубине 35 см. К ровной стенке разреза по профилю прикладывают стекло с полотном, с противоположной стороны стекло засыпают почвой, плотно прижимая к стенке. Полотно закладывают, отступя от поверхности почвы на 2—3 см. В том месте, где помещают полотно, ставят этикетку.

После экспозиции в течение 20—30 дней стекло откапывают от стенки, подсушивают полотно и осторожно стряхивают с него почвенные частицы. Для выявле-

ния аминокислот полотно обрабатывают 0,5%-ным раствором нингидрина в ацетоне.

Для выражения степени разложения полотна в процентах вырезают определенную его площадь на глубину горизонта (анализ проводят по горизонтам), промывают остаток полотна водой, высушивают и взвешивают. Такую же площадь вырезают с полотна, которое служит контролем. Затем определяют степень разложения полотна.

Метод широко используют в агрономической практике для оценки микробиологической активности почвы.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ ПО ВЫДЕЛЕНИЮ УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА

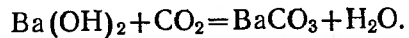
В почве без корней растений источником образования CO_2 , являются микроорганизмы, выделяющие его при дыхании. Этот углекислый газ определяют, улавливая баритом или в аппарате Варбурга.

В первом случае 150—200 г почвы, просеянной через сито с ячейками 2 мм, помещают в стерильную склянку Тищенко емкостью 500—600 мл с двумя отводными трубками. Влажность почвы стерильной водой доводят до 60% общей влагоемкости. Воздух, предварительно очищенный от углекислого газа (протягиванием через две последовательно соединенные склянки Тищенко, содержащие 30%-ный раствор едкого натра и стерильную воду, предназначенную для увлажнения почвы), пропускают через почву по нижней отверстию склянки. Прошедший сквозь почву воздух выходит через выходную трубу в последовательно соединенные две склянки Дрекслея на 250—300 мл, содержащие по 100 мл 0,1 н. раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$ с индикатором 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 в 1 ч при помощи аспиратора или водоструйного насоса.

После окончания опыта или по мере нейтрализации барита углекислым газом, определяют (титрованием 0,1 н. щавелевой кислотой) не использованный в реак-

ции $\text{Ba}(\text{OH})_2$. По его расходу и устанавливают количество выделившегося CO_2 , используя уравнение:



Для каждого почвенного образца параллельно определяют содержание углекислого газа в двух пробах. Пропускают воздух 10—12 дней.

Количество выделяемого углекислого газа за определенный промежуток времени пересчитывают на 1 г абсолютно сухой почвы или на 1 г гумуса.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АММОНИФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ

100 г свежей почвы, просеянной через стерильное сито с ячейками 2 мм, помещают в стерильные эрленмейеровские колбы емкостью 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% общей влагоемкости. Колбы закрывают ватными пробками и ставят в термостат при 28—30°C. Через 7 дней компостирования почвы опытных вариантов и контрольную почву подвергают анализу.

Для этого из тщательно перемешанной почвы берут навеску в 3—5 г, помещают ее в эрленмейеровскую колбу на 250 мл и добавляют 100 мл 1 н. раствора KCl или же 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 с индикатором. 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.

Очень хорошие результаты дает определение аммиака в чашках Конвея (рис. 36). Эти чашки состоят из двух цилиндров, имеющих общее дно. Чашку плотно

закрывают хорошо пришлифованной к верхнему краю внешнего цилиндра стеклянной крышкой, которую для лучшей герметичности смазывают смесью воска и вазелина. 1 мл титрованного раствора 0,1 н. H_2SO_4 вносят во внутреннюю часть чашки и приливают 1—2 капли индикатора (метилоранж). Держа чашку наклонно, во внешнюю часть наливают 1—2 мл исследуемого раствора. Затем чашки ставят горизонтально и, держа левой рукой наготове крышку, помещают в противоположный конец внешней части 1 мл насыщенного раствора углекислого калия (можно заменить 10%-ным раствором едкого кали). Потом быстро закрывают чашку крышкой и вращательным движением перемешивают содержимое внешней части чашки. Контролем служит «слепая проба». Вместо исследуемого раствора берут дистиллированную воду. Заготовленные чашки (в нескольких повторностях) оставляют на сутки при комнатной температуре или на несколько часов ставят в термостат с температурой 35—37°C. После этого крышку снимают и титруют 0,02 н. или более слабым раствором щелочи до изменения окраски индикатора.

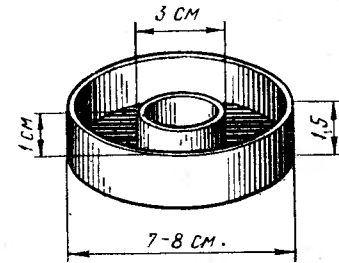


Рис. 36. Чашка Конвея.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АММОНИФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для определения аммонифицирующей способности микроорганизмов М. В. Федоров рекомендует приготовить минеральную питательную среду следующего состава (в г на 1 л дистиллированной воды): K_2HPO_4 —2; KH_2PO_4 —2; MgSO_4 —0,3. К этой среде добавляют пептон и глюкозу с таким расчетом, чтобы отношение $\text{C}:\text{N}$ было равно 5:1; 10:1; 15:1; 20:1 и 30:1. Источником азота служит пептон. При желании можно использовать и другие источники азота (гороховую и люпиновую муку, гуматы). На 100 мл субстрата берут 1 г пептона, содержащий 0,15 г азота и 0,5 г углерода. Для создания $\text{C}:\text{N}=5:1$ к 100 мл среды добавляют

0,625 г глюкозы; для С: N=10:1 — 2,5 г; для более широкого отношения С: N соответственно увеличивают содержание глюкозы. Питательную среду разливают по 100 мл в колбы Эрленмейера емкостью 300 мл и стерилизуют. Затем среду заражают исследуемыми микроорганизмами и ставят на неделю в термостат при 28—30°C. Опыт проводят минимум в двух повторностях.

После инкубации накопившийся аммиак определяют диффузионным методом в чашках Конвея. Параллельно устанавливают общее количество выросших клеток методом прямого счета под микроскопом или методом питательных пластин на МПА.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРИФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ

Из почвенного образца, просеянного через сито с отверстиями 2 мм, отбирают навеску в 100 г и помещают в стерильную эрленмейеровскую колбу емкостью 250 мл. Почву смачивают до 65% общей влагоемкости, 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 с температурой 27—28°C на 30 дней. Контролем служит почва без сернокислого аммония.

Влажность почвы должна быть постоянной. Для этого через каждые семь дней колбы взвешивают и стерильной дистиллированной водой доводят до первоначального уровня.

По окончании опыта определяют нитрат в опытных и в контрольных почвах по методу Грандваль — Ляжу.

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕНИТРИФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ

При определении денитрифицирующей активности почвы возникают большие затруднения, так как способность восстанавливать нитраты не единственная функция денитрифицирующих бактерий в почве. Они с таким же успехом развиваются в присутствии молекулярного кислорода, окисляя белки, жиры и другие соединения.

Для определения денитрифицирующей активности почвы М. В. Федоров рекомендует навеску свежей почвы (50 г) поместить в стерильную колбу объемом 250 мл, увлажнить ее до 60% общей влагоемкости (стерильной водой) и добавить 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.

Определение денитрифицирующей активности почвы и изучение смены процессов в замкнутой системе почва — атмосфера, путем применения ацетилена по методу Федоровой*

Используемый в микробиологической практике для определения денитрифицирующей активности почв метод сравнения данных по количеству нитрата, нитрита и аммония в разных образцах после инкубации их с селитрой в течение 14 суток (требует многих химических анализов) и недостаточно точен. За такой длительный срок в почве может произойти смена многих процессов, направленность и интенсивность которых определяются природой образца. Таким образом, в каждом конкретном случае соотношение анализируемых азотсодержащих соединений может быть результатом не только активности денитрификаторов, но и неучтенной активности микроорганизмов других физиологических групп, которые также принимают участие в превращениях азота.

Применение Р. И. Федоровой ацетилена (C_2H_2) позволяет вычленить денитрификацию из прочих метаболических реакций и количественно оценить процесс методом газовой хроматографии.

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 ацети-

* Федорова Р. И., Милехина Е. И., Ильюхина Н. И. — «Известия АН СССР, сер. биологическая», 1973, № 6, с. 797.

лена ингибируют редукцию закиси азота (N_2O) денитрификаторами без заметного угнетения восстановления других продуктов диссимилиации NO_3^- .

Известно, что денитрификация, как доминирующий процесс, закономерно сменяется азотфиксацией. Это обусловлено изменением соотношения легкодоступного связанного азота и углерода и уровня окислительно-восстановительного потенциала, который в значительной мере определяется присутствием нитрата в среде. Активность нитрогеназы подавляется нитратами, и азотфиксаторы, обладая нитрат- и нитритредуктазой предпочитают использовать нитраты и нитриты по сравнению с N_2O и N_2 .

Таким образом, при наличии в почве NO_3^- и NO_2^- азотфиксаторы размножаются, но не фиксируют газообразный азот. В замкнутом объеме в этот период происходит накопление N_2O за счет активности денитрифицирующих микроорганизмов и CO_2 в результате интегральной жизнедеятельности, в частности и денитрификаторов и азотфиксаторов.

Фиксация N_2 микрофлорой при наличии достаточно 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 N_2 и некоторой убыли N_2 .

Принцип метода определения денитрифицирующей активности почвы состоит в том, что введение ацетилена в исходную атмосферу дает возможность фиксировать количество выделившейся закиси азота в процессе диссимилиации 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 микрофлоры. Анализ газовой фазы на указанные компоненты в динамике позволяет определить максимальное количество N_2O , образовавшейся в опыте, и рассчитать по нему количество восстановленных до закиси азота нитратов и нитритов. Все необходимые газы составляющие могут быть идентифицированы на одном детекторе.

Определение удобно проводить в стеклянных сосу-

дах, 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 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, наполняя его газом с помощью шприца и затем откачивая газ через боковой отросток. Для этой цели применяют Ag или He , который соответственно используют в качестве основы экспериментальной газовой смеси.

Затем половину сосудов заполняют газовой смесью с 1,5% C_2H_2 , а другую — с 10%-ным C_2H_2 . Большая концентрация C_2H_2 оказывает большее тормозящее действие на утилизацию N_2O микроорганизмами, что дает возможность надежно фиксировать максимум образовавшегося в процессе денитрификации NO и позволяет подстраховать исследователя в том случае, когда в вариантах с меньшим содержанием ацетилена он не будет уловлен.

Газовые смеси готовят в газовых смесителях (за 24 ч). Количество образовавшегося N_2O определяют 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.

7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТФИКСИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

При определении азотфиксирующей активности чистых культур микроорганизмов, выделенных из почвы или других мест обитания, М. В. Федоров предлагает следующее: в эрленмейеровские колбы емкостью 300 мл наливают 100 мл питательной среды для азотобактера, содержащей 2% глюкозы. После стерилизации при давлении 0,5 атм. в течение 30 мин среду заражают суспен-

зией чистой культуры микроорганизмов и ставят в термостат при температуре 30°C. Для контроля оставляют колбочки без заражения. Повторность опыта минимум двукратная. По окончании опыта (через 15 или 30 суток) из контрольных и опытных колб берут соответствующий объем субстрата для определения остатка глюкозы в нем (по методу Бертрана или другим методом) и общего азота (по методу Кьельдаля).

Азотфиксирующую активность выражают в миллиграммах азота на 1 г использованной глюкозы. При высокой азотфиксирующей активности на 1 г углевода будет усваиваться около 15—20 мг атмосферного азота, а при низкой — 2—3 мг.

Определение азотфиксирующей активности ацетиленовым методом

Нитрогеназный комплекс азотфиксирующих микроорганизмов способен восстанавливать ацетилен C_2H_2 до этилена C_2H_4 . Оба указанных непредельных углеводорода легко идентифицируются с помощью газового хроматографа. Поскольку процессы восстановления молекулярного азота и ацетилена аналогичны, последний стал широко применяться для моделирования и изучения азотфиксации. Метод определения азотфиксирующей активности микроорганизмов по восстановлению C_2H_2 в C_2H_4 * детально разработан Харди с соавторами (Hardy et al., 1968). Чувствительность данного метода позволяет обнаружить до 10^{-12} М этилена, она превосходит чувствительность масс-спектрометрического определения N_2^{15} в 10^3 раз, выше метода определения азота по Кьельдалю в 10^6 раз. Питательную среду с культурой помещают в 10-миллилитровые шприцы фирмы «Chigapa». Атмосферный воздух эвакуируют с помощью вакуумного насоса, соединенного со шприцем и манометром, и содержимое шприца (инокулят) трижды промывают аргоном (Ar). Затем шприцы заполняют газовой смесью Ar+2% C_2H_2 (для анаэробов). Для аэробных микроорганизмов в газовую смесь вводят O_2 (2—10%). После заполнения шприца газовой смесью иглу снимают и отверстие закрывают силиконовой пробкой, через

* Милехина Е. И., Рахлеева Е. Е., Иванов И. Д. — «Известия АН СССР, сер. биологическая», 1971, № 2, с. 255—260.

которую впоследствии берут газовые пробы инсулиновым шприцем для анализа на газовом хроматографе. В конце опыта реакцию восстановления C_2H_2 прекращают, добавляя к культуральной среде 0,2 мл 40%-ного NaOH. Газовую смесь готовят в газовых смесителях заранее (за 24 ч), 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 в диаметре) заполняют сорбентом (силикагелем АСК). В качестве газа-носителя используют водород, расход которого устанавливают равным 36 мл за 1 мин (хроматограф «Becker Delft»). Температура колонки 50°C, объем вводимой газовой пробы 0,5 мл. Количество C_2H_2 и C_2H_4 рассчитывают по калибровочной кривой.

Поскольку в длительных экспериментах, работая со шприцами, трудно обеспечить их полную герметичность, для определения азотфиксирующей активности почвы, удобнее пользоваться флакончиками из-под пенициллина или стеклянными сосудиками (16 см³) с силиконовой пробкой сверху и боковым отростком, перекрывающимся притертым стеклянным затвором**. В последнем случае через боковой отросток легко осуществляется эвакуация и наполнение сосуда необходимым инертным газом.

Глава XIV

ИЗУЧЕНИЕ БАКТЕРИЙ КОРНЕВОЙ ЗОНЫ РАСТЕНИЙ И НА КОРНЯХ

Чем ближе почва расположена к корневой системе растений, тем больше бактерий в ней содержится. Особенно много их на поверхности корня.

К корневой системе растений бактерий привлекают питательные вещества. В почве, непосредственно при-

* Определение этилена и ацетилена можно проводить, используя другие детекторы и хроматографы, в частности, приборы ХГ 1302 (СССР) и «Varian-Aerograph» модель 1868 (США).

** Федорова Р. И., Милехина Е. И., Ильюхина Н. И., Бражников В. В. «Известия АН СССР, сер. биологическая», 1973, № 1, с. 106—113.

легающей к корням, получившей название ризосферы, дополнительным источником питания служат в основном отмирающие клетки эпидермиса и корневые волоски. Питательными веществами для бактерий, развивающихся на корнях, являются продукты экзосмоса растений (корневые выделения).

В ризосфере развиваются те же формы бактерий, что и в почве, отдаленной от корней. Как правило, на корнях преобладают неспороносные палочки рода *Pseudomonas* и микобактерии. При этом на корнях злаковых, бобовых и других растений часто поселяются разные виды и разновидности. Это объясняется неодинаковым обменом веществ у разных растений.

Бактерии в корневой зоне растений, используя корневые выделения, в известной мере играют роль санитаров, очищая зону корня 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, могут оказать положительное влияние на рост растений. Однако необходимо отметить, что многие бактерии, развивающиеся в корневой зоне и на корнях, обладают денитрифицирующей способностью и в определенных условиях могут вызвать большие потери азота из почвы.

1. УЧЕТ БАКТЕРИЙ В РИЗОСФЕРЕ МЕТОДОМ КРАСИЛЬНИКОВА

Стерильной лопатой подкапывают почву под растениями, стерильным пинцетом извлекают корни. Приставшую к корням почву стряхивают в стерильную чашку Петри, тщательно перемешивают и из нее берут навеску в 1 г (одновременно берут навеску почвы для определения влажности). Навеску помещают в 100 мл стерильной водопроводной воды и готовят ряд разведений.

При поверхностном посеве из полученных разведений стерильной микропипеткой наносят 0,05 мл на поверхность питательных пластин (МПА, крахмало-аммиачный агар и др.) 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 в чашку добавляют соответствующую агаризованную питательную среду.

Выросшие на агаре колонии подсчитывают визуально и под лупой. Для определения числа зародышей в 1 г почвы при глубинном посеве количество выросших на чашке колоний умножают на соответствующее разбавление и делят на массу абсолютно сухой почвы, содержащейся в 1 г сырой почвы. При поверхностном посеве (чтобы установить число зародышей в 1 мл) количество колоний на чашке еще умножают на 20.

Для определения качественного состава бактерий колонии на чашке группируют по культуральным признакам. Из каждой группы готовят препарат и выявляют форму бактерий. Для установления видовой принадлежности из колонии делают пересев на скошенный агар и после очистки культуры изучают ее морфологические и физиологические признаки.

2. УЧЕТ РИЗОСФЕРНОЙ И КОРНЕВОЙ МИКРОФЛОРЫ МЕТОДОМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ ОТМЫВАНИЙ КОРНЕЙ ПО Е. З. 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 почвы для определения влажности).

Корни помещают в колбу со 100 мл стерильной водопроводной воды и взбалтывают в течение 2 мин. Стерильным крючком (приготовленным из обычной проволочной иглы) корни извлекают из колбы и переносят последовательно во вторую, третью, четвертую, пятую, шестую и седьмую колбы, также содержащие по 100 мл стерильной водопроводной воды. В каждой колбе корни отмывают по 2 мин. Желательно, чтобы в последней колбе (7-й) в воду перед стерилизацией было добавлено 3—5 г песка.

Для качественного анализа бактерий ризосферы и на корнях из каждой колбы отдельно стерильной пипеткой берут 0,05 мл отмывной воды, наносят на поверхность питательной пластины (МПА) и отдельным шпателем, держа полуоткрытую чашку около пламени горелки, втирают досуха. Чашки помещают в термо-

стат при температуре 28—30°C. Спустя 3—5 суток чашки можно анализировать.

По мере отмывания корней численность бактерий не убывает, а в ряде случаев даже увеличивается. При этом в чашках с посевом из первых отмываний много крупных колоний, состоящих из спорозных форм микроорганизмов, а по мере отмывания количество колоний бациллярных форм уменьшается и возрастает число мелкоточечных колоний, представляющих неспорозные формы рода *Pseudomonas* и микобактерий. Колонии микобактерий часто окрашены в желтый или оранжевый цвета.

Для определения количества микроорганизмов в ризосфере и на корнях суспензию из первого отмывания дополнительно взбалтывают 5 мин, затем из нее готовят разведения, из которых делают поверхностные посеы. Содержимое остальных шести колб сливают вместе и также готовят последовательные разведения; из них проводят поверхностные посеы на МПА.

Для подсчета зародышей в 1 г абсолютно сухой почвы ризосферы число колоний на чашке умножают на 20 (чтобы определить число зародышей в 1 мл) и на степень разведения, а затем делят на массу абсолютно сухой почвы ризосферы. Количество ризосферной почвы, попавшей с корнями в первую колбу, находят по разности первоначальной навески и навески отмывных 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 на чашке, умножают на 20, на степень разведения и на 600 (6 смывов по 100 мл в каждой) и делят на массу сырых корней.

В зависимости от задач, поставленных исследователем, можно использовать различный набор сред для культивирования микроорганизмов, развивающихся в корневой зоне растений. В лабораторной практике часто применяют следующие среды:

1. Мясо-пептонный агар с глюкозой (5—10 г глюкозы на 1 л МПА).

2. Синтетическая среда Чапека для актиномицетов (см. стр. 142).

3. Крахмало-аммиачный агар.

4. Среда Боннера (в г на 1 л дистиллированной воды):

Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,23	K ₂ HPO ₄	0,012
KNO ₃	0,001	Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,002
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,036	глюкоза	20,0
KCl	0,065	агар	10—15

5. Нитритный агар.

6. По данным М. В. Федорова, хорошие результаты получают при использовании среды, содержащей в качестве источника углерода соль органической кислоты, а в качестве источника азота наряду с минеральным азотом аспарагин.

Состав среды (в г на 1 л дистиллированной воды) следующий:

яблочнокислый натрий	2С—30	Ca ₃ (PO ₄) ₂	0,5
аспарагин	0,5—1,0	MgSO ₄	0,5
KNO ₃	0,5	FeSO ₄	0,1
K ₂ HPO ₄	0,5—1,0	агар	15,0—20,0

Студентам микрофлору ризосферы и корней рекомендуется изучать методом последовательных отмываний при посеве на МПА.

Материалы и оборудование. Монолит с растениями (10×10 см) или вегетационный сосуд с растениями, пинцеты, ножницы, часовые стекла, колбы емкостью 250 мл, содержащие по 100 мл стерильной водопроводной воды (для последних разбавлений нужны колбы, в которых в 100 мл стерильной воды должно быть 3—5 г стерильного песка), крючки из проволоки, стерильные градуированные и моровские пипетки на 1 мл, стерильные шпатели, счетная камера Вольфюгеля, лупы, микроскопы и все необходимое для приготовления окрашенных препаратов и микроскопирования их, скошенный МПА в пробирке.

3. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ, КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ В ПОЧВЕ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ АКТИВНОСТИ И ВИРУЛЕНТНОСТИ

Выделение чистой культуры клубеньковых бактерий. От тщательно промытого в водопроводной воде корня бобового растения отрезают наиболее крупные клубеньки, промывают их в трех-четыре порциях стерильной воды и опускают в чашку Петри с 0,1%-ным раствором сулемы. Покачивая чашку, выдерживают 5 мин, затем переносят клубеньки стерильным пинцетом в чашку Петри со стерильной водой, выдерживая

в ней 5 мин, затем переносят в чашку Петри со спиртом, где выдерживают 1 мин. Спирт удаляют обжиганием.

Далее стерильным пинцетом помещают клубеньки в стерильную чашку Петри и стерильным ножом разрезают на части. Из содержимого клубенька берут бактериологической петлей небольшое количество взвеси, переносят в каплю стерильной воды на поверхность агаровой питательной среды в чашке Петри и размазывают шпателем. Этим же шпателем делают посев последовательно еще на двух пластинах.

В качестве питательной среды можно использовать среду Фреда: 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 — 0,9 л или бобовый агар: бобовый отвар* — 1000 мл; сахароза — 2 г; KH_2PO_4 — 1,0 г; MgSO_4 — 0,3 г; агар — 15,0 г.

Устанавливают рН до 7,0 (добавлением соды) и стерилизуют среду при 120°C в течение 30 мин. На этих средах клубеньковые бактерии образуют слизистые, беловатые, непрозрачные колонии, похожие на капли стеарина.

Из изолированной колонии с однородным характером роста выделяют чистую культуру. Предварительно клетки просматривают под микроскопом, а затем из них делают отсев в пробирки на скошенный бобовый агар или на среду Фреда.

Клубеньковые бактерии хорошо растут также на средах Лазаревой (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%), Норриса (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 на 1 л среды, рН 7,2).

Для медленно растущих клубеньковых бактерий (сои, люпина) следует использовать среду Исварана (маннит или сахароза — 10 г; K_2HPO_4 — 0,5 г;

* 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), доводят водопроводной водой до 1 л и добавляют остальные компоненты среды.

MgSO_4 — 0,2 г; NaCl — 0,1 г; глюконат кальция — 1,5 г; FeCl_3 — 0,01 г; дрожжевой экстракт — 2 г; агар — 2% на 1 л среды).

Количественный учет клубеньковых бактерий в почве проводят методом Вильсона (Wilson, 1926) или его модификациями, например методом Красильникова и Коренько (1940).

При использовании метода Вильсона (так же как и метода Красильникова и Коренько) на стерильном субстрате выращивают стерильные семена бобовых растений, бактериализованные водными разведениями анализируемой почвы. По существу, здесь используется метод определения клеток бактерий с помощью титра. Наблюдая за образованием клубеньков при инокуляции растений почвой в разных разведениях, устанавливают численность клубеньковых бактерий в почве и их видовую принадлежность. Пересчет клубеньковых бактерий на 1 г почвы проводят по таблицам Мак-Креди.

Для лучшего отделения клубеньковых бактерий от сапрофитной сопутствующей микрофлоры почвы Н. Ф. Быстрый (1941) рекомендует добавлять в питательную среду для ризобий кристаллический фиолетовый в концентрации 1 : 50 000—1 : 100 000 (краситель предварительно растворяют отдельно в этаноле), подавляющий развитие многих почвенных микроорганизмов и не влияющий на рост ризобий.

Для выделения клубеньковых бактерий из почвы можно использовать также среду Грэхема (Graham, 1969) следующего состава (в г на 1 л): маннит и лактоза — по 0,5; K_2HPO_4 — 0,5; NaCl и CaCl_2 — по 0,2; MgSO_4 и FeCl — по 0,1; дрожжевой экстракт — 0,5; агар — 20,0. После стерилизации в автоклаве к среде добавляют (в мг): циклогексимид — 200; пентахлорнитробензол — 100; бензилпенициллин натрия — 25; хлоромицетин — 10; сульфатиазол — 25 и неомидин — 2,5.

Можно по желанию добавлять также конго красный — 2,5 мл 1%-ного раствора, рН среды доводят до 7,0.

При выделении ризобий из почвы методами Быстрого или Грэхема необходима проверка действительной принадлежности выделенных бактерий к роду *Rhizobium*. Это осуществляется путем бактериализации выде-

ленными бактериями соответствующих видов бобовых растений.

В тех случаях, если наличие клубеньковых бактерий в почве не удается выявить ни одним из указанных методов, следует применять метод Емцева, Шильниковой, Агаджанян (1964), являющийся комбинацией методов Вильсона и Быстрого. Сущность метода заключается в следующем: на чашки Петри со средой Быстрого с кристаллическим фиолетовым высевается почва в разведениях от 1:10 до 1:100 000; с поверхности среды стерильной водой смываются выросшие колонии бактерий; полученными суспензиями бактерируются семена. Метод дает возможность обогащения суспензии клетками клубеньковых бактерий при некотором подавлении кристаллическим фиолетовым сопутствующей микрофлоры. Метод дает значительное увеличение количества клубеньков по сравнению с заражением семян соответствующими небогащенными суспензиями.

Отбор активных (или эффективных) культур клубеньковых бактерий. Некоторые клубеньковые бактерии образуют клубеньки, но усвоения молекулярного азота при этом в бобово-ризобинальном симбиозе не происходит или происходит в слабой степени и потребность растений в азоте не удовлетворяется. Такие клубеньки являются неактивными или неэффективными. Они обычно мелкие, разбросаны по всему корню, содержат мало бактериальной ткани и быстро разрушаются. Бывают случаи, когда клубеньковые бактерии образуют клубеньки, паразитирующие на растении. В связи с этим для получения высоких урожаев важно подобрать высокоэффективные культуры, изучить их особенности. При отборе высокоэффективных клубеньковых бактерий основным наиболее надежным критерием служит результативность их влияния на урожай растений и содержание в них азота. Предварительный отбор можно проводить сначала в условиях лабораторного, затем вегетационного опыта, окончательно эффективность проверяется в условиях полевых опытов.

Подбор активных культур клубеньковых бактерий по З. Г. Разумовской проводится в условиях лабораторного или вегетационного опыта. Для этого можно использовать большие пробирки со средой следующего состава: K_2HPO_4 — 1,0 г; $MgSO_4$ — 1,0 г; $CaCO_3$ — 0,5 г;

$FeSO_4$; H_3BO_3 ; $MnSO_4$ — следы; агар — 1,0 г; дистиллированной воды — 1000 мл.

Питательную среду разливают в пробирки невысоким слоем (4 см высоты), закрывают ватными пробками и стерилизуют при $120^\circ C$ в течение 20 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 и крупные в течение 4—5 мин. По прошествии срока обработки семена неоднократно промывают стерильной водой, соблюдая правила асептики. Стерилизовать семена можно, по рекомендации Натмана (Nutman, 1949), концентрированной серной кислотой. Условия обработки следующие: мелкие семена погружают на 1—2 мин, крупные на 3—5 мин в серную кислоту, налитую в коническую колбу емкостью 0,7—1,0 л, слегка покачивая колбу. По прошествии срока обработки кислоту сливают и в колбу сразу же вливают большую порцию стерильной водопроводной воды (если приливать воду медленно или вливать небольшое количество воды, семена могут перегреться). Воду сменяют несколько раз. После окончания промывки поверхность семян должна быть нейтральной (по реакции с лакмусовой бумагой или на вкус).

Можно стерилизовать семена парами хлороформа (20 мин) или диоцидом (20 мин, 1:1000). Проверка стерильности семян проводится при посеве части семян на МПА или бобовый агар. После прорастания семян их переносят стерильным пинцетом в пробирки с агаровой средой, куда одновременно с посевом семян вносят 1 мл взвеси культуры клубеньковых бактерий. Пробирки снаружи обертывают плотной бумагой так, чтобы она закрывала слой агара и семена (для создания корням затемненных условий). Растения выращивают при естественном или искусственном освещении. По мере развития растений проводят наблюдения за образованием клубеньков, за массой растений и содержанием в них азота. Контролем служат пробирки, в которые не вносили бактерий. Активные или эффектив-

ные клубеньковые бактерии характеризуются высокой азотфиксирующей способностью в симбиозе. Клубеньки активного бобово-ризобияльного симбиоза обычно крупные, с большим количеством бактериальной ткани, располагаются они на главном корне у его основания, имеют розовую окраску, обусловленную наличием леггемоглобина, и довольно долго функционируют, разрушаясь в период плодоношения растений.

Для определения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза по нитрогеназной активности можно применить метод Парийской и Гореловой («Микробиология», 1975, т. 44, вып. 5).

Определение вирулентности клубеньковых бактерий. Для того, чтобы обеспечить высокоэффективный симбиоз, необходимо, чтобы активные культуры клубеньковых бактерий обладали еще высокой вирулентностью — способностью проникать в клетки корня растения, размножаться там и образовывать клубеньки. Для определения вирулентности культур ризобий необходимо применять стерильный песчаный субстрат или стерильную агаризованную среду, в которых выращивают предварительно простерилизованные семена растений (стр. 185), бактериализованные монокультурами ризобий. Вирулентность определяют по сроку появления первых, видимых невооруженным глазом клубеньков.

Отбор вирулентных культур клубеньковых бактерий мелкосеменных растений можно также осуществить, используя метод Фэреуса (Шильников и В. К., Нестерова И. М. — «Известия АН СССР, сер. биологическая», 1969, № 3).

В узком пространстве между двумя предметными стеклами, заполненном питательной агаризованной средой, помещают проростки бобового растения. Через сутки среду инокулируют клубеньковыми бактериями и наблюдают за скоростью образования клубеньков.

Два предметных стекла толщиной 0,7—0,8 мм с проложенной между ними с одного конца стеклянной пластинкой располагают так, чтобы край одного стекла выступал над краем другого примерно на 3—5 мм, и прочно перевязывают нитками. Указанное расположение удобно при дальнейшем заполнении агаром пространства между стеклами и при посеве семян. Стеклянные пластинки для прокладки готовят из тонких предметных стекол. Для этого каждое стекло разрезают

поперек на три части. Систему из двух предметных стекол и одной пластинки 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 следующего состава (в г на 1 л): CaCl_2 — 0,1; MgSO_4 — 0,12·7 H_2O ; KH_2PO_4 — 0,1; K_2HPO_4 — 0,15; лимоннокислого железа — 0,005; Mo, Cu, B, Fe, Mn — следы. Среду разливают в пробирки по 60 мл. Предварительно pH среды доводят до 6,6 серной кислотой (стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм 30 мин). Кроме того, готовят агаризованную среду того же состава, добавляя 0,6% агара для заполнения пространства между стеклами; pH агаризованной среды также доводят до 6,6.

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). Расплавленной агаризованной минеральной средой с помощью стерильных пипеток заполняют пространство между предметными стеклами в подготовленной системе. После застывания агара в каждую систему помещают три проростка. Посев проводят асептически. Далее по две таких системы устанавливают в пробирки с жидкой минеральной средой. Через сутки семена и среду инокулируют тремя каплями густой суспензии двухсуточной культуры клубеньковых бактерий. Для исследований под микроскопом через 4—5 суток 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.

Материалы и оборудование. Для постановки опыта: свежие корни бобовых растений с клубеньками, стерильная вода, стерильные чашки Петри. Чашка Петри с 0,1%-ным раствором сулемы (или 1%-ной бромной водой или с крепкой H_2SO_4), пипетка, скальпель или бритва. Стерильная среда Фреда (или агаризованный бобовый отвар), стерильные пипетки Мора на 1 мл и стерильные шпатели Дригальского.

Для анализа: косяки среды Фреда или агаризованный бобовый отвар, микроскопы, все необходимое для микроскопирования и приготовления препаратов.

АНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

К бактериальным земледобрильным препаратам относятся нитрагин и азотобактерин. Первый содержит клетки клубеньковых бактерий, второй — клетки азотобактера.

Для определения количества жизнеспособных клеток в бактериальных препаратах используют соответствующие питательные среды. При установлении численности клеток азотобактера готовят безазотную минеральную среду Эшби, для быстрорастущих клубеньковых бактерий — бобовый агар (стр. 183), для медленнорастущих (соя, люпин) — маннитно-дрожжевой агар.

При определении качества бактериальных препаратов отмечают: 1) общее состояние препарата (целостность тары и сохранность упаковки, условия хранения, масса препарата, маркировка на таре; 2) количество клубеньковых бактерий в нитрагине и клеток азотобактера в азотобактерине; 3) наличие посторонней микрофлоры в препаратах определяют на МПА.

Для анализа клубеньковых бактерий в нитрагине на стерильное часовое стекло стерильной ложкой берут 10 г нитрагина, переносят его в колбу емкостью 250 мл со 100 мл стерильной водопроводной воды и встряхивают колбу в течение 5 мин. Получают разведение 10^{-1} . Затем готовят последующие разведения (10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} и 10^{-8}). Для этого из предшествующего разведения после минутного встряхивания стерильной моровской пипеткой переносят 10 мл в колбу с 90 мл воды. Из последних трех разведений берут 2 раза по 1 мл суспензии клеток и переносят в две параллельные чашки Петри. Чашки заливают 10 мл расплавленного и охлажденного до 45°C бобового агара или маннитно-дрожжевого агара.

Чашки с бобовым агаром выдерживают при температуре $28-30^{\circ}\text{C}$ 3—4 дня, а с маннитно-дрожжевым — 7—9 дней. В последнем случае чашки помещают в эксикатор с влажной фильтровальной бумагой.

После инкубации подсчитывают число колоний клубеньковых бактерий. Если в чашке Петри выросло более 300 колоний, подсчет их ведут по трем секторам,

каждый из которых равен $1/16$ площади чашки. Из двух параллельных чашек выводят среднее количество колоний. Расхождение между числом колоний в параллельных чашках не должно превышать 30 %.

Количество клубеньковых бактерий в нитрагине вычисляют по формуле: $X=K \cdot P$, где K — среднее количество колоний на чашке; P — степень разведения.

В 1 г нитрагина должно содержаться при выпуске: медленнорастущих клубеньковых бактерий (соя, сераделлы, люпина) не менее 70 млн., а быстрорастущих (гороха, вики, клевера, чины, чечевицы) — не менее 300 млн.; в течение срока годности соответственно не менее 50 млн. и 100 млн.

Одновременно с определением клубеньковых бактерий устанавливают количество посторонних микроорганизмов посевом на мясо-пептонный агар.

Для учета посторонних микробов в культурах быстрорастущих клубеньковых бактерий берут по 1 мл суспензии из разведения 10^{-6} , в культурах медленнорастущих — из разведения 10^{-5} , переносят в две параллельные чашки Петри и заливают мясо-пептонным агаром (как и в предыдущем случае). После двух суток инкубации при температуре $28-30^{\circ}\text{C}$ подсчитывают число выросших колоний по приведенной выше формуле.

Чтобы подсчитать процент посторонней микрофлоры в нитрагине, используют формулу:

$$Y = \frac{B}{A} \cdot 100,$$

где A — количество клубеньковых бактерий в 1 г; B — количество посторонних микроорганизмов; 100 — для выражения в процентах.

Определение количества клеток азотобактера в азотобактерине. 10 г почвенного препарата азотобактерина помещают в 100 мл воды, выдерживают в течение часа, периодически встряхивая. Затем энергично встряхивают содержимое 10 мин, переносят в колбу с 90 мл стерильной водопроводной воды 10 мл полученной бактериальной взвеси и встряхивают в течение 5 мин (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 две параллельные чашки Петри, заливают слоем 7 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—28°C. Подсчитывают клетки азотобактера на 3—4-е сутки по формуле: $X = K \cdot P$, где K — среднее количество колоний, P — степень разведения.

В 1 г азотобактерина должно быть не менее 100 млн. клеток азотобактера при выпуске.

Численность посторонней микрофлоры в азотобактерине устанавливают микроскопированием исходной суспензии и посевом ее по 1 мл в три параллельные чашки на мясо-пептонном агаре. Колонии посторонних микроорганизмов определяют через двое суток.

Материалы и оборудование. Для постановки опыта: бактериальные препараты, питательные среды (бобовый или манинно-дрожжевой агар, среда Эшби и МПА) в пробирках по 10 мл, водная баня, колбы емкостью 250 мл, содержащие 90 и 100 мл стерильной водопроводной воды, стерильные пипетки моровские на 1 и 10 мл, часовые стекла, пинцеты, чайные ложки или шпатели фарфоровые, весы, стерильные чашки Петри, восковые карандаши.

Для анализа: лупы, счетная камера Вольфюгеля, арифмометр для счета колоний, микроскопы и все необходимое для приготовления окрашенных препаратов и микроскопирования.

Глава XVI

МИКРОБИОЛОГИЯ КОРМОВ

1. ЭПИФИТНАЯ МИКРОФЛОРА ЗЕРНА И ЕЕ ИЗМЕНЕНИЕ ПРИ ХРАНЕНИИ КОРМА

На поверхности зерна обитает разнообразная микрофлора. Часть микроорганизмов попадает 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 флоросферы. Эпифиты питаются продуктами экзосмоса растений. Условия жизни эпифитных бактерий своеобразны. Они довольствуются небольшими запасами питательных веществ на поверхности растений, устойчивы к высоким концентрациям фитонцидов, выдержива-

ют периодические колебания влажности. Поэтому численность их невелика и видовой состав довольно постоянный. Более 90% эпифитных микроорганизмов составляют гнилостные бактерии. В основном эпифитная микрофлора представлена неспороносными бактериями. Большую часть бактериального населения зерна составляют неспороносные палочки рода *Pseudomonas*, активно развивающиеся на поверхности растений. Особенно часто встречается *Pseudomonas herbicola* (*Erwinia herbicola*), образующая на плотных средах золотисто-желтые колонии. Встречаются также *Pseudomonas fluorescens*, микрококки, молочнокислые бактерии, дрожжи. Бациллы и микроскопические грибы составляют небольшой процент.

В определенных условиях эпифитные микроорганизмы могут быть полезны для растений, так как препятствуют проникновению паразитов в ткани растения.

При хранении зерна эпифитные микроорганизмы могут играть отрицательную роль. В зрелом зерне вода находится в связанном состоянии и недоступна микроорганизмам. На таком зерне они находятся в состоянии анабиоза (покоя). На развитие микроорганизмов на зерне, а следовательно, на сохранность последнего решающее влияние оказывают: влажность, температура, степень аэрации, целостность зерна и состояние его покровных тканей. На зерне с повышенной влажностью микроорганизмы размножаются тем быстрее, чем выше температура.

Развитие микробиологических процессов в хранящемся зерне с повышенной влажностью приводит к заметному, а иногда и к очень значительному повышению температуры. Это явление получило название термогенеза.

Самосогревание зерна ведет к смене микрофлоры. Свойственная зерну эпифитная микрофлора исчезает. Сначала обильно размножаются непигментированные неспороносные палочки, вытесняющие *Erwinia herbicola*. Позднее появляются термостойкие (термотолерантные) микрококки, образующие на плотных средах чаще всего мелкие белые плоские колонии, плесневые грибы, актиномицеты. Дальнейшее развитие процесса самосогревания (свыше 40—50°C) способствует развитию спорообразующих и термофильных бактерий.

По мере самосогревания изменяется и видовой состав плесневых грибов. Виды *Penicillium*, которые преобладали вначале, заменяются видами *Aspergillus*.

Таким образом, по видовому составу микрофлоры можно судить не только о том, подвергалось ли зерно самосогреванию, но и насколько далеко зашел этот процесс. Преобладание *Erwinia herbicola* в микробном ценозе зерна служит показателем его хороших качеств. Большое количество спорообразующих бактерий и грибов указывает на потерю всхожести семян.

Благоприятные условия для развития на зерне микроорганизмов приводят к накоплению выделяемых ими токсинов. В результате при скармливании такого зерна скоту и домашней птице часто возникают кормовые отравления.

Таким образом, правильное хранение зерна должно сводиться к тому, чтобы не допускать развития на нем микроорганизмов.

Для количественного учета микроорганизмов 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 в течение 10 мин. Из полученной вытяжки готовят последние разведения (10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4}). Отдельными стерильными пипетками Мора берут по 10 мл суспензии и переносят в колбы, содержащие по 90 мл стерильной водопроводной воды. Затем из каждой колбы берут по 1 мл суспензии соответствующего разведения в стерильные чашки Петри в двух повторностях. В каждую чашку Петри выливают по 1 пробирке расплавленного, но предварительно охлажденного до 50°C МПА. Чашки инкубируют при температуре 30° С. Наряду с МПА используют элективные среды, описанные в разделе «Анализ силоса».

Через 3—5 дней инкубации подсчитывают общее число колоний, выросших на МПА в чашках, и рассчитывают количество микроорганизмов на 1 г зерна.

Для определения качественного состава микрофлоры зерна колонии группируют по культуральным признакам, из каждой группы колоний готовят препараты, выявляют принадлежность микроорганизмов к роду или семейству и определяют численность бактерий каждой группы в процентах от общего количества микроорганизмов.

Для идентификации выделенные культуры микроорганизмов очищают.

На основании микробиологического анализа, делают заключение о качестве зерна.

На свежем доброкачественном зерне преобладает *Erwinia herbicola* (до 80%), образующая блестящие оранжевые колонии. Встречаются *Pseudomonas fluorescens*, формирующая желтовато-зеленоватые флуоресцирующие колонии, не пигментированные неспорообразующие палочки, дрожжи (колонии блестящие, выпуклые, часто окрашенные в розовые тона). При учете на сусло-агаре с мелом выявляются молочнокислые бактерии, образующие чечевицеобразные мелкие колонии с зонами растворения мела.

На несвежем зерне, хранившемся в условиях повышенной влажности, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens* не выявляются. Обнаруживаются микрококки, образующие мелкие белые блестящие плоские колонии, спорообразующие палочки, актиномицеты, а также неспороносные 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 несвежее, 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 мл и на 1 мл. Стерильные чашки Петри. МПА в пробирках и колбах. Водяная баня, треножник. Микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

2. АНАЛИЗ СИЛОСА

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 уксусную кислоту, которые подавляют развитие гнилостных, маслянокислых и других нежелательных бактерий, портящих корм. Молочнокислые бактерии снижают рН корма до 4,2—4,0. Если кислотность силоса по тем или иным причинам уменьшается (рН становится выше 4,5—4,7), то создаются условия, благоприятствующие жизнедеятельности вредных для сохранности корма микроорганизмов.

В нем накапливаются дурно пахнущая масляная кислота, амины, аммиак и другие продукты.

Для того чтобы обеспечить нормальное развитие молочнокислых бактерий в процессе силосования, необходимо достаточное содержание сахара в силосующихся растениях и изоляция корма от доступа воздуха, т. е. создание анаэробных условий.

Плесневые грибы переносят сильное подкисление, но являются строгими аэробами, поэтому в хорошо спрессованном, укрытом, заквашенном корме размножаться не могут.

Если проследить за распадом сахара и образованием органических кислот в процессе силосования, то можно заметить, что с уменьшением сахара увеличивается количество органических кислот. Однако снижение рН зависит не только от количества молочной и уксусной кислот, но и от буферности растительного материала, которая, в свою очередь, зависит от белка, солей. Чем больше буферность растительной массы, тем больше нужно кислот, чтобы снизить рН корма, т. е. более буферный материал связывает, нейтрализует часть молочной кислоты (ионы водорода). Поэтому, несмотря на накопление кислоты, рН среды почти не снижается до тех пор, пока не 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, силосимость растений определяется также специфическими буферными свойствами.

Буферность растительной массы определяют титрованием растертой растительной массы 0,1 н. раствором молочной кислоты до рН 4,0. Выясняют, сколько потребуется молочной кислоты для смещения рН до 4,0. Поскольку для образования молочной кислоты затрачивается примерно 60% сахаров корма, то, рассчитав 100%, определяют так называемый сахарный минимум для данного растительного сырья, т. е. наименьшее количество сахара, необходимое для образования такого количества молочной и уксусной кислот, чтобы сместить рН до 4,0.

Растения хорошо силосуются, если в них много сахара, а сахарный минимум небольшой. Если фактичес-

кое содержание сахара в растениях примерно равняется сахарному минимуму, то они силосуются плохо и малейшее отклонение в процессе силосования приведет к порче силоса. Если фактическое содержание сахара меньше сахарного минимума, то такие растения не силосуются.

При силосовании сохраняются цветки и листья, содержащие наибольшее количество питательных веществ. Потери сухих веществ при правильном силосовании не превышают 10—15%. Хороший силос характеризуется следующими показателями: цвет — оливково-зеленый (лишь несколько изменяется), 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 молочнокислыми стрептококками, часто в небольших количествах встречаются дрожжи. Последние образуют эфиры, придающие силосу приятный запах и обогащающие корм белком и витаминами. Однако в больших количествах дрожжи ухудшают качество силоса — они снижают его кислотность, так как являются конкурентами с молочнокислыми бактериями в потреблении сахара.

В первый период после закладки силоса бурно развивается микрофлора смешанной фазы брожения, обычно представленная на поверхности здоровых растений: гнилостные бактерии (в основном неспорообразующие палочки), бактерии группы кишечной палочки, маслянокислые бактерии и др. При подкислении корма их сменяют молочнокислые стрептококки, а затем более кислотоустойчивые молочнокислые палочки. Через две недели (при снижении рН до 4,0 и ниже) микробиологические процессы в силосе в основном заканчиваются.

Для анализа из торцевой части траншеи, ям или наземных буртов берут среднюю пробу силоса. Для этого, сняв стерильным ножом верхний слой, вырезают кубики по средней линии бурта, с интервалом в 1 м. Их складывают в стерильную стеклянную банку емкостью 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 рекомендуется проводить не позднее суток после взятия пробы.

Микроскопическое исследование микрофлоры силоса

Для знакомства с микрофлорой силоса из него готовят препарат следующим образом. Берут пинцетом силос и плотно прижимают его к предметному стеклу без добавления воды, стараясь, 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, микроскопируют с иммерсионной системой.

На препарате выявляются тонкие неспорообразующие палочки, варьирующие в размере (молочнокислые бактерии) и молочнокислые стрептококки. Среди них обычно преобладают *Lactobacterium plantarum* — го-моферментативные мезофильные короткие палочки, часто располагающиеся параллельными рядами. Иногда встречаются клетки почкующихся дрожжей. Споровые формы бактерий наблюдаются редко. В плохом силосе выявляются спорообразующие палочки (маслянокислые бактерии, аэробные гнилостные бактерии), а также плесневые грибы.

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 в течение 10 мин. Из полученной вытяжки готовят последующие разведения (10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6}), а затем высевают из соответствующих разведений на элективные среды по 1 мл суспензии при глубинном посеве, по 0,05 мл суспензии при поверхностном посеве. Посевы выдерживают при температуре 28°C.

Определение количества молочнокислых бактерий проводят на сусло-агаре с мелом или капустном агаре с мелом (среды 1, 1а), а также на капустном агаре со спиртом и мелом (среда 2) — глубинный посев. Вокруг колоний молочнокислых бактерий вследствие накопления молочной кислоты образуются зоны растворения мела (рис. 37).

Подсчет колоний молочнокислых бактерий на сусло-агаре с мелом и капустном агаре с мелом проводят на 5—6-й день, а на капустном агаре со спиртом и мелом —

на 7—10-й день. Среда 2 необходима для выявления молочнокислых бактерий в составе эпифитной микрофлоры исходной растительной массы, так как спирт тормозит рост посторонней микрофлоры. Количество посторонней микрофлоры (аэробных гнилостных микроорганизмов) определяют глубинным посевом на пептонном агаре (среда 3). Подсчет колоний ведется на 5—7-й день.

Количество микроскопических грибов и дрожжей определяется на сусло-агаре со стрептомицином (среда 4) поверхностным посевом. Подсчет колоний ведется на 3—4-й день (при необходимости повторно на 7—8-й день).

Титр маслянокислых бактерий устанавливают на жидкой среде Емцева (среда 5а) и картофельной среде (среда 5). Для определения количества спор маслянокислых бактерий ведется посев из суспензии, после пастеризации в течение 10 мин при 75°C. Учет результатов анализа ведется по интенсивности выделения газа (кусочки картофеля всплывают на поверхность жидкости), и титр маслянокислых бактерий и их спор устанавливают методом предельных разведений по МакКреди.

Аэробные протеолитические бактерии учитывают на мясо-пептонном бульоне (среда 6) по накоплению газа в поплавках. Посевы выдерживают при 28°C в течение двух недель.

При анализе силосов из трав, выращенных по фону высоких доз азотных удобрений, проводится также учет денитрифицирующих бактерий на среде Гильтая (среда 7). Посевы выдерживают в течение 10—12 дней при 28°C. Подсчет денитрификаторов ведется по интенсивности выделения газа и изменению цвета индикатора.

При анализе силоса ведется также учет спор аэробных гнилостных бацилл. На плотной среде (среда 8)

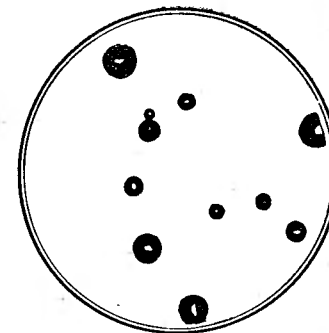


Рис. 37. Зоны растворения мела вокруг колоний молочнокислых бактерий силоса.

делают поверхностный посев. Чашки инкубируют при 28°C, подсчет колоний проводят на 4-й день.

Бактерии группы кишечной палочки учитывают на среде Кесслера или Булира по выделению газа и накоплению его в поплавках. Пробирки выдерживают 48 ч при 40—42°C.

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 в течение 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, марганец сернокислый — 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 в течение 30 мин.

Среда 2. Капустный агар со спиртом и мелом. В расплавленную и охлажденную до 50°C 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 в течение 20 мин.

Среда 4. Сусло-агар со стрептомицином. Сусло, разбавленное до 3% по Баллингу, — 1 л, агар — 25 г. Стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 мин. Перед разливкой среды в чашки Петри в сусло-агар добавляют 80—100 ед. стрептомицина на каждый миллилитр среды.

Среда 4а. Подкисленный сусло-агар. Сусло, разбавленное до 3% по Баллингу, — 1 л, агар — 20—25 г. Стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 мин. Перед разливом среды в чашки Петри в расплавленный сусло-агар добавляют 2 мл молочной кислоты (на 1 л среды), прокипяченной в течение 10 мин на водяной бане.

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 в течение 30 мин.

Среда 5а. Картофельный крахмал — 20 г, пептон — 5 г, дрожжевой автолизат — 0,2 мг/л, 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 М. В. Федорову — 1 мл, дистиллированная вода — 1 л, тногликолевая кислота — 0,05%, нейтральрот — 0,004%, pH 7,4—7,5. Стерилизация среды осуществляется при 0,5 атм в течение 30 мин. Температура инкубации посевов 30—35°C.

Среда 6. Мясо-пептонный бульон. Пептон — 10 г, $NaCl$ — 4 г, мясной бульон — 1 л. Наливают в пробирки с поплавками до $\frac{3}{4}$ объема. Стерилизуют при 1 атм в течение 20 мин.

Среда 7. Среда Гильята (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 (pH 6,8—7,0). Стерилизуют при 1 атм в течение 20 мин.

Среда 8. Мясо-пептонный агар и сусло-агар 1:1. Стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 мин.

Среда 9. Среда Кесслера. К 1 л водопроводной воды прибавляют 50 мл свежей бычьей желчи и 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 из расчета 1 г сухой краски на 25 л среды. Жидкость разливают в пробирки с поплавками и стерилизуют при 1 атм в течение 15 мин.

Среда 10. Среда Булира. К 1 л мясо-пептонного бульона добавляют 12,5 г маннита и 6 мл 1%-ного раствора нейтральрота. Среду разливают в пробирки с поплавками и стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 мин. Среда имеет вишневый цвет, при развитии кишечной палочки становится оранжевой и в поплавке скапливается газ.

Доминирующие на плотных средах колонии микроскопируют. Для обнаружения маслянокислых бактерий из пробирок с картофелем готовят препарат в раздавленной капле с добавленным раствором Люголя.

Определение кислотности

Определение общей кислотности в силосе. Берут навеску силоса 20 г и помещают в коническую колбу с обратным холодильником емкостью 500 мл. Содержимое колбы заливают 200 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают и нагревают в течение 1 ч. После охлаждения содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр и 10 мл фильтрата (с двойным количеством дистиллированной воды) оттитровывают 0,1 н. раствором едкого натра в присутствии фенолфталеина до появления устойчивой слабо-розовой окраски.

Общее содержание кислоты в силосе в переводе на молочную выражают в процентах. 1 мл 0,1 н. раствора $NaOH$ соответствует 0,009 г молочной кислоты. Умножив количество 0,1 н. $NaOH$, 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. $NaOH$, следовательно, на 200 мл пойдет 34 мл 0,1 н. $NaOH$.

200 мл вытяжки получены из 20 г силоса, а для нейтрализации 100 г силоса будет израсходовано X мл 0,1 н. $NaOH$:

$$X = \frac{100 \cdot 34}{20} = 170 \text{ мл } 0,1 \text{ н. } NaOH.$$

Умножив 170 на 0,009, получим содержание молочной кислоты в процентах:

$$170 \times 0,009 = 1,53\%$$

Достаточно точные результаты получаются и в том случае, если определение кислотности ведут следующим образом. Берут навеску силоса 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 настаивают при 10—12°C в течение 30 мин, а затем определяют кислотность вытяжки титрованием. 10 мл вытяжки (с двойным количеством дистиллированной воды) оттитровывают 0,1 н. раствором едкого натра в присутствии фенолфталеина до появления устойчивой слабо-розовой окраски.

Пример расчета. На титрование 10 мл вытяжки израсходовано 1,7 мл 0,1 н. NaOH, следовательно, на 50 мл вытяжки — 8,5 мл; 50 мл вытяжки получены из 5 г силоса, а для нейтрализации 100 г силоса будет израсходовано X мл 0,1 н. NaOH:

$$X = \frac{100 \cdot 8,5}{5} = 170 \text{ мл } 0,1 \text{ н. NaOH};$$

$$170 \times 0,009 = 1,53\% \text{ молочной кислоты.}$$

Определение рН в силосе. Приготовление вытяжки силоса для определения в нем рН проводят так же, как для определения общей кислотности в силосе. рН находят с помощью индикаторов или электрометрического определения. При использовании индикаторов поступают следующим образом. В фарфоровую чашку берут 2 мл вытяжки силоса и добавляют 2 капли индикатора (смесь равных объемов бромтимолблау и метилрога). Сравнивая цвет содержимого чашки с данными, приведенными ниже, определяют концентрацию водородных ионов.

Цвет индикатора	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

Материалы и оборудование. Весы и разновесы, конические колбы емкостью 500 мл с обратным холодильником, широкие пробирки, треножник с асбестовыми сетками, колбы емкостью 100 мл и 250 мл, воронки, бумажные фильтры, пипетки на 10 мл и 2 мл, фарфоровые чашки, пинцеты; индикаторы: смесь равных объемов бромтимолблау и метилрога, 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. Микроскоп и все необходимое для микроскопирования.

3. ДРОЖЖЕВАНИЕ КОРМА

Дрожжи содержат много легкопереваримого белка, богаты эргостерином, легко переходящим в витамин D, витаминами А, В, Е; энергично размножаются, неприхотливы к среде обитания, их можно легко выращивать на отходах сельского хозяйства и промышленности. Кормовые дрожжи в настоящее время готовят в больших количествах, размножая их на производственных отходах, в том числе растительных гидролизатах (солома, древесные отходы и т. д.). Сейчас найдены дрожжи (*Candida*), хорошо размножающиеся на углеводородах. Это дает возможность готовить дешевые кормовые дрожжи на отходах нефтяной промышленности. Помимо добавления в кормовой рацион сухих дрожжей, применяют дрожжевание корма. Для этого в измельченную и увлажненную растительную массу вносят культуру дрожжей. Периодически перемешивают. Дрожжи обильно размножаются в корме, что обычно совпадает с его подкислением. Однако накопление кислот объясняется развитием молочнокислых бактерий, всегда обитающих на растительной массе. Для активного размножения дрожжей в кормах необходим ряд условий: хорошо подготовленная питательная среда (измельченность, влажность, температура 25—27°C, достаточная аэрация, рН среды 3,8—4,2). Дрожжевать можно лишь корма, богатые моно- и дисахаридами. В противном случае дрожжи и молочнокислые бактерии развиваться не будут. Помимо концентратов, дрожжеванию подвергают сочные корма, к которым примешивают грубые корма.

При дрожжевании концентрированных кормов теряется 5—6% сухих веществ. Эти потери падают главным образом на углеводы, сбраживаемые дрожжами.

При дрожжевании кормов представляет интерес возможность обогащения корма белком за счет вносимого минерального азота. Дрожжи, потребляя соли аммония, обогащают субстрат белком на 13—17% (в расчете на сухое вещество). Дрожжевание делает корм приятно-кислым, обогащает его витаминами, возбуждает у животных аппетит, устраняет многие заболевания (паратифозные инфекции, рахит молодняка, поражения кожи и другие болезни), благоприятно влияет на продукцию молока у коров, яйценоскость птицы, увеличение привеса у животных.

В лабораторной практике дрожжевание корма можно провести на свекле, которую предварительно нарезают мелкими кусочками, или на отрубях. Корм вносят в тарированный химический стакан емкостью 100 мл со стеклянной палочкой, увлажняют в случае отрубей до консистенции густой сметаны. Стаканы с кормом взвешивают. Масса увлажненного корма должна быть около 100 г. В качестве закваски используют однодневную разводку пекарских дрожжей на сусле в количестве 5% (на 100 г корма вносят 5 мл суспензии дрожжей).

Корм тщательно перемешивают стеклянной палочкой, стакан накрывают бумажной этикеткой, на которой записывают тару стакана и массу увлажненного корма (без закваски).

Дрожжеванные корма оставляют при комнатной температуре, перемешивая содержимое стакана несколько раз в день.

Через 1—2 дня определяют количество дрожжевых клеток в корме.

Учет дрожжевых клеток в суспензии дрожжей (закваске) методом прямого их счета под микроскопом

Берут петлей определенное количество дрожжевой закваски (1 петля захватывает 0,01 мл), наносят на предметное стекло, добавляют столько же молока и размазывают на определенной площади (4 см²). Препарат сушат на воздухе, осторожно фиксируют на пламени и окрашивают метиленовым синим в течение 10 мин.

Под микроскопом с иммерсионной системой подсчитывают количество дрожжевых клеток (в 10 полях

зрения). Количество дрожжевых клеток в 1 мл закваски определяют по формуле:

$$X = \frac{S}{S_1} \cdot A \cdot 100,$$

где A — среднее количество дрожжевых клеток в одном поле зрения;

S — площадь квадрата (4 см²);

S_1 — площадь поля зрения,

$$S_1 = \pi r^2,$$

где r — радиус объектива, определяемый с помощью объектного микрометра. На объектный микрометр наносят каплю кедрового масла и с иммерсионной системой определяют на линейке объектного микрометра радиус объектива.

Если r объектива $\approx 0,08$ мм, то

$$S_1 = 3,14 \cdot 0,0064 = 0,02 \text{ мм}^2,$$

$$\frac{S}{S_1} = \frac{400 \text{ мм}^2}{0,02 \text{ мм}^2} = 20 \text{ 000}.$$

Учет дрожжевых клеток в дрожжеванном корме

Через 1—2 дня стаканы с дрожжеванным кормом взвешивают. Вследствие сбраживания сахара и испарения воды масса корма становится меньше. Берут среднюю пробу в количестве 10 г, вносят в колбу, содержащую 100 мл стерильной водопроводной воды, и взбалтывают в течение 5 мин. Затем на определенной площади предметного стекла (4 см²) размазывают определенный объем суспензии (0,01 мл—1 петля) и добавляют 0,01 мл молока. Препарат подсушивают на воздухе, фиксируют осторожно на пламени, красят метиленовым синим в течение 10 мин. Подсчитывают количество дрожжевых клеток в одном поле зрения (10 полей зрения).

Среднее количество клеток в одном поле зрения умножают на 20 000, на 100 и 10, получают количество клеток в 1 г корма. Затем эту цифру умножают на массу корма и определяют число дрожжей во всем корме.

Чтобы узнать, во сколько раз увеличилось количество дрожжей в процессе дрожжевания корма, надо разделить их число на первоначальное количество дрожжевых клеток, содержащихся в закваске. Корм считается хорошим, если в одном поле зрения встречается не

более 10 посторонних бактериальных клеток (не дрожжей).

Материалы и оборудование. Весы и разновесы, стаканы на 100 мл со стеклянными палочками, свекла, отруби, суспензия дрожжей, градуированные пипетки на 5—10 мл, петли, молоко в пробирках, предметные стекла с квадратом 4 см² из миллиметровой бумаги, объектный микрометр, индикатор метиленовый синий, стаканы с дрожжеванным кормом. Микроскоп и все необходимое для микроскопирования.

Глава XVII

МИКРОФЛОРА МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

1. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОЛОКА

Молоко является прекрасной средой для жизнедеятельности микроорганизмов. В нем содержатся белки (казеин, альбумин, глобулин); молочный жир, фосфолипиды, молочный сахар, кальциевые и магниевые соли неорганических и органических кислот и витамины. Поэтому при благоприятных температурных условиях микроорганизмы бурно размножаются в молоке и ухудшают его качество.

Обсеменение молока микробами происходит при дойке: из вымени, с кожи животного, посуды и других внешних источников. В вымя животного микробы проникают через каналы сосков, и хотя там они подвергаются бактерицидному действию ткани вымени, но наиболее стойкая часть микробов (микрококки, стрептококки) приживается в нем. При несоблюдении правил гигиены источником загрязнения молока бактериями могут быть руки и одежда доильщика, а при стойловом содержании скота молоко обсеменяется микрофлорой желудочно-кишечного тракта (кишечной палочкой и маслянокислыми бактериями).

В молоке, получаемом при соблюдении санитарных правил, преобладают микрококки, молочнокислые стрептококки (кишечного происхождения), сарцины.

Загрязненное молоко содержит значительное количество бактерий группы кишечной палочки, маслянокислых и гнилостных бактерий.

Во время хранения молока изменяется количество содержащихся в нем бактерий и соотношение между отдельными видами. Характер этих изменений зависит

от температуры, продолжительности хранения и исходного состава микрофлоры.

Отбор пробы молока проводят после тщательного его перемешивания. Стерильным черпаком отбирают 50 мл молока в стерильную посуду, закрывают стерильной ватной пробкой и немедленно приступают к анализу.

При микробиологическом анализе молока определяют общую численность бактерий, учитываемых на агаре с гидролизированным молоком, на мясо-пептонном агаре, титр кишечной палочки (coli-титр) и проводят пробу на редуктазу.

Проба на редуктазу. В молоке содержатся различные ферменты, в том числе редуктаза (анаэробная дегидрогеназа, передающая отнятый водород от окисляемого субстрата любому ненасыщенному соединению, но неспособная передать его кислороду воздуха). Редуктаза накапливается в молоке главным образом при размножении в нем микроорганизмов.

В присутствии фермента редуктазы молоко, окрашенное метиленовой синью, обесцвечивается, так как редуктаза восстанавливает метиленовую синь, переводя ее в бесцветную лейкоформу. Свежевыдоенное молоко восстанавливает метиленовую синь медленно. С увеличением числа бактерий в молоке скорость восстановления метиленовой сини возрастает. На скорости восстановления в молоке метиленовой сини и основано простое определение в нем численности бактерии и степени свежести молока — его качества. Однако строгой зависимости между числом бактерий и временем обесцвечивания в нем метиленовой сини нет, так как разные виды бактерий выделяют неодинаковое количество редуктазы.

Проба на редуктазу проводится следующим образом. В чистую высокую пробирку наливают 1 мл раствора метиленовой сини (5 мл насыщенного спиртового раствора метиленовой сини на 195 мл дистиллированной воды) и 20 мл исследуемого молока, предварительно нагретого до 38—40°C. После перемешивания пробирку ставят в редуктазник или термостат при 38—40°C (указанная температура является оптимальной для фермента редуктазы) и наблюдают за обесцвечиванием через 20 мин, 2 ч и 5,5 ч. Проба на редуктазу считается законченной, когда наступает полное обес-

цвечивание молока. По времени обесцвечивания молоко разделяют на четыре класса (табл. 3).

Определение общего количества бактерий в молоке.

Вначале готовят разведения (10^{-1} — 10^{-6}), для чего из отобранной пробы стерильной пинеткой берут 1 мл молока и переносят в пробирку, содержащую 9 мл стерильной водопроводной воды; пипетку неоднократно споласкивают водой, находящейся в пробирке, и больше не используют. Пробирку взбалтывают 1 мин и таким образом получают разведение 10^{-1} . Затем готовят последующие разведения. При обесцвечивании молока до 20 мин делают глубинный посев из разведений 10^{-4} , 10^{-5} и 10^{-6} . Для этого берут отдельной стерильной пипеткой по 1 мл суспензии и вносят в стерильные чашки Петри (в двух- или трехкратной повторности). При обесцвечивании молока после 20 минут посев делают из разведений 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . В чашки с суспензией вносят расплавленный и охлажденный до 45—50°C мясо-пептонный агар. После перемешивания суспензии с агаром чашки Петри с посевом помещают в термостат при 28—30°C. После трехдневной инкубации проводят подсчет колоний бактерий в чашках. Количество дрожжей и плесеней подсчитывают на 4-й день. Число колоний умножают на степень разведения и выводят среднее арифметическое из трех чашек. Таким образом определяют численность бактерий в 1 мл молока.

Определение титра кишечной палочки (Coli-титр).

Важное значение при оценке молока имеет определение титра кишечной палочки. Наличие в молоке бактерий группы кишечной палочки указывает на фекальное загрязнение (кишечная палочка — обитатель кишечника человека и животных), вместе с которым в молоко могут попадать микроорганизмы, патогенные для человека. Кроме того, бактерии группы кишечной палочки приводят к пороку сыра при переработке молока в сыр: вызывают вспучивание сыра на первых этапах его созревания. Титром кишечной палочки (или Coli-титром) называется наименьшее количество исследуемого материала, выраженное в миллилитрах или граммах, в котором обнаружена кишечная палочка. Для выявления кишечной палочки и определения ее титра используют газообразующую способность группы бактерий *Coli aerogenes* на жидкой среде Булира следующего состава: мясо-пептонный бульон — 1 л; маннит — 10 г; NaCl — 5 г.

Насыщенным раствором соды устанавливают нейтральную реакцию среды, затем подкрашивают насыщенным водным раствором нейтралью 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-трехкратной повторности. Пробирки с посевом выдерживают 48 ч при 42°C.

В связи с тем что в пробах молока могут быть другие бактерии, сбраживающие лактозу с образованием газа, для точного установления наличия кишечной палочки из забродившей жидкости делают посевы на специфическую среду Эндо. Если бродильная проба положительная и культура на среде Эндо дает ярко-красные колонии, можно считать установленным наличие в исследуемом субстрате кишечной палочки. Для полной же идентификации ее нужны еще дополнительные данные (отсутствие разложения желатины, отсутствие газа и кислоты при культуре на сахарозе и образование скастола и индола в мясо-пептонном бульоне).

3. Классификация молока на основании бактериологического анализа

Показатели	Классы			
	I	II	III	IV
Время обесцвечивания метиленовой сини	Более 5,5 ч	5,5—2 ч	2 ч—20 мин.	Менее 20 мин.
Примерная численность бактерий согласно пробе на редуктазу	Менее 0,5 млн	0,5 млн.—4 млн.	4 млн.—20 млн.	Более 20 млн.
Качество молока согласно пробе на редуктазу	Хорошее	Среднее	Плохое	Очень плохое
Численность бактерий, установленная при посеве испытуемой пробы	—	—	—	—
Coli-титр	0,1	0,01	0,001	10^{-6}
Оценка качества молока на основании всех показателей	Хорошее	Среднее	Плохое	Очень плохое

Материалы и оборудование. При постановке опыта: разные (по качеству) пробы молока, высокие пробирки, цилиндры, метиленовая синь, 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 стерильной средой Булира с поплавами, расплавленный мясо-пептонный агар (МПА).

2. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В ЧИСТУЮ КУЛЬТУРУ

Выделение ацидофильной палочки в чистую культуру. Ацидофильная палочка — гомоферментативная молочнокислая бактерия из числа молочнокислых палочек, обитающих в кишечнике человека и животных. Оптимальная температура ее развития 37—40°С, предельная кислотность до 220 Т° (2,0%), она отличается устойчивостью к фенолу, образует антибиотические вещества. Кисломолочный продукт, приготовленный с использованием в качестве закваски ацидофильной палочки, имеет большое значение для лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний, особенно у молодняка.

Для выделения ацидофильной палочки в чистую культуру используют кал телят. Для ознакомления с микрофлорой кала из него готовят препарат, сушат на воздухе, фиксируют на пламени и красят метиленовым синим в течение 2—3 мин. Подсчитывают количество клеток ацидофильной палочки в одном поле зрения (подсчитывают в 10 полях зрения и берут среднее). В мазке преобладают гниlostные кокковые формы, палочки и встречаются лишь единичные клетки *Lactobacterium acidophilum* — тонкие палочки, варьирующие в размере, иногда содержащие зерна волютина (хорошо красящиеся метиленовым синим в синий цвет). Затем делают посев кала в стерильное молоко и инкубируют при температуре 37—40°С, оптимальной для развития *Lactobacterium acidophilum*.

Из образовавшегося сгустка вновь делают посев в стерильное молоко и снова выдерживают в термостате при 37—40°С (таких посевов можно сделать 3—4). Постепенно ацидофильная палочка, образуя молочную кислоту и получив оптимальные условия для развития, подавляет развитие гниlostных бактерий, содержащихся в кале. Такую накопительную культуру ацидофильной палочки высевают на плотную питательную среду и

из отдельной развившейся колонии выделяют чистую культуру. В качестве плотной питательной среды используют агар с гидролизovanым обратом.

Приготовление гидролизованного обрата. В бутыль с 1 л прокипяченного и охлажденного до 45°С обрата добавляют разведенный в небольшом количестве теплой воды 1 г сухого порошка панкреатина и 5 мл хлороформа. Бутыль встряхивают, плотно закрывают корковой пробкой и выдерживают в термостате в течение 3 дней при 40°С. Ежедневно содержимое бутыли встряхивают, после чего открывают пробку для удаления паров хлороформа. Готовый раствор фильтруют и разбавляют в 4—5 раз водопроводной водой. Устанавливают реакцию среды (рН 7,0—7,2) и стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 мин.

Lactobacterium acidophilum образует мелкие колонии в глубине среды, которые следует просматривать под микроскопом (объектив 8×). Они 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, хранить их следует при температуре 10°С.

С целью проверки свойств чистых культур *Lactobacterium acidophilum* 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 1/2 — 1 пробирка чистой культуры). Стаканы закрывают этикеткой с надписью, завязывают нитками и ставят в термостат при 37°С.

После сквашивания молока проводят органолептическую оценку ацидофильного молока и определение кислотности (титрованием). Ацидофильная палочка об-

разуется в молоке однородный плотный тянувшийся сгусток казеиновой кислоты. Вкус чистый кисло-молочный с характерным металлическим привкусом.

Выделение молочнокислого стрептококка в чистую культуру. *Streptococcus lactis* — гомотренеративная молочнокислая бактерия, возбудитель естественного скисания молока в средних широтах СССР. Оптимальная температура его развития 30—35°C, предельная кислотность до 120°Т. Для выделения молочнокислого стрептококка в чистую культуру используют сметану, простоквашу.

Для знакомства с микрофлорой сметаны готовят препарат, размазывая сметану тонким слоем (без воды) на горячем (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 наблюдаются часто соединенные попарно или в виде коротких цепочек клетки *Str. lactis*

Если сметана несвежая, иногда встречаются клетки дрожжей, молочной плесени — *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*), споровых палочек. Для выделения молочнокислого стрептококка в чистую культуру используют сметану хорошего качества.

Одну петлю сметаны вносят в пробирку, содержащую 10 мл стерильной водопроводной воды. Из этого разведения берут одну петлю и вносят в пробирку с расплавленным, но предварительно охлажденным до 50°C МПА с 2% сахарозы или агаром с гидролизованным обратом.

Расплавленный агар с внесенной суспензией выливают в стерильную чашку Петри. Чашки с посевом инкубируют при температуре 30°C в течение 2—3 дней.

При посеве суспензии из сметаны на агаровые среды выявляется преимущественно *Str. lactis*, который образует поверхностные и глубинные колонии. Первый — мелкие, точкообразные, диаметром 1 мм, выпуклые, голубоватые, прозрачные. Глубинные колонии имеют форму чечевицы. Колонии *Str. lactis* просматривают под микроскопом (объектив 8×). Характерные колонии отмечают на чашке Петри восковым карандашом. Из них готовят препарат для микроскопирования, а затем петлей делают пересев в стерильный обрат в пробирках, которые ставят в термостат при 30°C.

Чистые культуры молочнокислого стрептококка образуют в молоке ровный плотный сгусток без следов газа. Для отбора активных штаммов *Str. lactis* пригодны пробирки, в которых молоко свернулось не позже чем через 18 ч. Из первых пробирок желательно сделать пересев в обрат на вторые сутки, из вторых — на третьи, из третьих — на четвертые и т. д. При этом в результате повышения бродильной активности стрептококка наблюдается ускорение свертывания обрата. Сильными молочнокислыми стрептококками являются те, которые свертывают обрат в пробирке не позже чем через 10 ч.

С целью проверки свойств чистых культур *Str. lactis* выделенные культуры используют в качестве закваски для приготовления простокваши. Простокваше дают органолептическую оценку и определяют кислотность. *Str. lactis* образует в молоке однородный плотный, ломкий сгусток казеиновой кислоты. Вкус «чистый» кисло-молочный, кислый.

3. ЗНАКОМСТВО С МИКРОФЛОРОЙ СЛИВОЧНОГО МАСЛА

Различают два основных типа сливочного масла: сладкосливочное и кислосливочное. Сладкосливочное масло готовится из пастеризованных сливок, которые не заквашиваются.

В технологии этого типа масла микрофлора нежелательна: чем меньше микроорганизмов, тем лучше масло. Понижение численности микрофлоры достигается пастеризацией сливок с последующей упаковкой и хранением масла при низких температурах (—18, —20°C) и надлежащим уходом за оборудованием. Важным фактором загрязнения масла может быть недоброкачественная вода, которая употребляется для его промывания. В 1 мл свежего сладкосливочного масла содержится 50—100 тыс. клеток бактерий.

Технология кислосливочного масла основана на использовании молочнокислых бактерий для сквашивания сливок. Для этого после пастеризации сливок в них вносят закваску, состав микрофлоры которой имеет значение для повышения прочности (устойчивости при хранении) и аромата масла. В состав закваски входят *Str. lactis*, *Str. cremoris* и ароматообразующие бактерии: *Str. diacetylactis*, *Str. citrovorus* и *Str. paracitrovo-*

rus. В 1 мл кисломолочного масла содержится от 1 млн. до 10 млн. бактерий.

Масло для исследования берут стерильным шупом из двух-трех мест по 10—15 г и помещают его 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 масло в банке расплавляют на водяной бане, нагретой до 40—50°C. Из расплавленного масла, после тщательного перемешивания, стерильной пипеткой берут 1 мл и вносят в пробирку с 9 мл стерильной воды, подогретой до 40°C. Из полученного таким образом разведения 10^{-1} готовят все последующие (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Из соответствующих разведений делают высеив на элективные среды: для учета общего количества бактерий — на агар с гидролизованным молоком или мясо-пептонный агар, для учета протеолитических бактерий — на молочный агар, для учета молочнокислых бактерий — на агар с гидролизованным обратом и мелом, для учета количества дрожжей — на сусловый агар со стрептомицином, для учета бродильного титра — на среду Кесслера.

Микроскопическое исследование микрофлоры масла

Для знакомства с микрофлорой масла (свежего и несвежего) его плавят в стеклянном стакане на водяной бане при температуре 40°C, 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 фильтрованную бумагу. Окрашивают метиленовым синим в течение 2—3 мин.

В свежем кисломолочном масле наблюдаются молочнокислые стрептококки, в несвежем — наряду с молочнокислыми бактериями встречаются дрожжи, плесени, флуоресцирующие и гнилостные бактерии.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

- Аристовская Т. В. и др. Большой практикум по микробиологии. М., «Высшая школа», 1962.
- Бабьева И. П., Агре Н. С. Практическое руководство по биологии почв. М., Изд. МГУ, 1971.
- Горбунова и др. Малый практикум по низшим растениям. М., «Высшая школа», 1976.
- Заварзин Г. А. Литотрофные микроорганизмы. М., «Наука», 1972. Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов. Под ред. Н. А. Красильникова. М., Изд. МГУ, 1966.
- Мишустин Е. Н., Емцев В. Т. Микробиология. М., «Колос», 1978.
- Мишустин Е. Н., Емцев В. Т. Почвенные азотфиксирующие бактерии рода *Clostridium*. М., «Наука», 1974.
- Мишустин Е. Н., Шильникова В. К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. М., «Наука», 1973.
- Панкратов А. Я. Микробиология. М., «Колос», 1971.
- Пименова М. Н., Гречушкина Н. Н., Азова Л. П. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М., Изд. МГУ, 1971.
- Практикум по микробиологии. Под ред. проф. Н. С. Егорова. М., Изд. МГУ, 1976.
- Теплер Е. З. Микроорганизмы рода *Nocardia* и разложение гумуса. М., «Наука», 1976.
- Федоров М. В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М., Гос. изд. с.-х. литературы, 1957.
- Черкес Ф. К. Руководство к практическим занятиям по микробиологическим исследованиям. М., «Медицина», 1974.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ	
<i>Глава I.</i>	Микроскоп и техника микроскопирования 3
	1. Светооптическая микроскопия 3
	2. Микроскопия в темном поле 16
	3. Фазово-контрастная микроскопия 17
	4. Люминесцентная (флуоресцентная) микроскопия 18
<i>Глава II.</i>	Общие представления о культивировании, технике посева и необходимом оборудовании для работы с микроорганизмами 19
<i>Глава III.</i>	Методы приготовления препаратов микроорганизмов 23
<i>Глава IV.</i>	Исследование микробной клетки 27
	1. Формы клеток микроорганизмов 27
	2. Строение клеток микроорганизмов (цитохимические методы исследования) 41
	3. Окраска клеток микроорганизмов по Граму 41
	4. Окраска спор у бактерий 43
	5. Окраска капсул 46
	6. Окраска жгутиков 47
	7. Окраска ядерного вещества бактерий 50
	8. Окраска включений клеток микроорганизмов 51
<i>Глава V.</i>	Питание микроорганизмов 53
	1. Значение отдельных питательных элементов 53
	2. Приготовление питательных сред 56
	3. Методы стерилизации 62
<i>Глава VI.</i>	Учет численности бактерий и выделение чистой культуры 66
	1. Учет численности бактерий в почве 66
	2. Определение качественного состава бактерий 70
	3. Учет численности микроорганизмов в воде и других жидкостях 75
	4. Учет численности бактерий в воздухе 76
	5. Выделение чистых культур бактерий 78
<i>Глава VII.</i>	Определение вида бактерий 81
<i>Глава VIII.</i>	Превращение микроорганизмами безазотистых органических веществ 86
Процессы брожения	86
	1. Спиртовое брожение 87
	2. Молочнокислое брожение 92
	3. Маслянокислое брожение 97

	4. Брожение пектиновых веществ 100
	5. Брожение целлюлозы 102
	6. Окисление клетчатки 104
	7. Окисление жира 107
	8. Окисление углеводов 108
<i>Глава IX.</i>	Превращение микроорганизмами органических и минеральных соединений азота 110
	1. Аммонификация 110
	2. Нитрификация 114
	3. Денитрификация (нитратное дыхание) 120
	4. Биологическая фиксация атмосферного азота 122
<i>Глава X.</i>	Превращение микроорганизмами соединений серы, железа и фосфора 130
	1. Превращение микроорганизмами соединений серы 130
	2. Участие микроорганизмов в превращении железа 134
	3. Превращение микроорганизмами соединений фосфора 138
	сельскохозяйственная микробиология
<i>Глава XI.</i>	Общий микробиологический анализ почвы 141
	1. Методы исследований 141
	2. Группы микроорганизмов, состав и приготовление питательных сред 142
	3. Взятие средней почвенной пробы и подготовка образца к микробиологическому анализу 146
	4. Приготовление почвенной суспензии 146
	5. Учет различных групп микроорганизмов 149
	6. Определение общего количества микроорганизмов в почве методом прямого счета под микроскопом 160
<i>Глава XII.</i>	Изучение ценозов микроорганизмов 164
	1. Метод обрастания стекол по Н. Г. Холодному 164
	2. Изучение микробных ценозов в почве по методу Перфильева и Габе 164
	3. Метод капилляров Перфильева в модификации Аристовской 166
	4. Выявление микроорганизмов автохтонной группы, участвующей в разложении гумусовых веществ, по методу Виноградского в модификации Теппер 166
	5. Выявление микроорганизмов, участвующих в разложении гумусовых веществ, по методу Теппер 167
<i>Глава XIII.</i>	Определение биологической активности почвы 168
	1. Определение биологической активности почвы по интенсивности разложения полотна (метод Мишустина, Вострова и Петровой) 168
	2. Определение общей микробиологической активности почвы по выделению углекислого газа 169
	3. Определение аммонифицирующей активности почвы 170
	4. Определение аммонифицирующей активности микроорганизмов 171
	5. Определение нитрифицирующей активности почвы 172
	6. Определение денитрифицирующей активности почвы 172
	7. Определение азотфиксирующей активности микроорганизмов 175

Глава XIV. Изучение бактерий корневой зоны растений и на корнях	177
1. Учет бактерий в ризосфере методом Красильникова	178
2. Учет ризосферной и корневой микрофлоры методом последовательных отмываний корней по Е. З. Теппер	179
3. Выделение чистых культур клубеньковых бактерий, количественный учет в почве, определение их активности и вирулентности	181
Глава XV. Анализ бактериальных препаратов	188
Глава XVI. Микробиология кормов	190
1. Эпифитная микрофлора зерна и ее изменение при хранении корма	190
2. Анализ силоса	193
3. Дрожжевание корма	201
Глава XVII. Микрофлора молока и молочных продуктов	204
1. Бактериологический анализ молока	204
2. Методы выделения молочнокислых бактерий в чистую культуру	208
3. Знакомство с микрофлорой сливочного масла	211
Указатель литературы	213

Екатерина Зельмановна Теппер, Викторина Кузьминична Шильникова, Генриетта Ивановна Переверзева

ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Редактор *И. И. Каримова*
 Художественный редактор *З. П. Зубрилина*
 Технический редактор *В. А. Боброва*
 Корректор *В. Л. Непомнящая*

ИБ № 1152

Сдано в набор 01.08.78. Подписано к печати 23.03.79. Формат 84×108¹/₃₂. Бумага тип. № 2. Гарнитура литературная. Печать высокая. Усл.-печ. л. 11,34. Уч.-изд л. 12,06. Изд. № 22. Тираж 20 000 экз. Заказ № 5948. Цена 40 коп.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Колос», 103716, ГСП, Москва, К-31, ул. Дзержинского, д. 1/19.

Областная типография управления издательств, полиграфии и книжной торговли Ивановского облсполкома, г. Иваново-8, ул. Типографская, 6.