



УЧЕБНИКИ И УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ
ДЛЯ СТУДЕНТОВ ВЫСШИХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ



Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева

ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Допущено Главным управлением высших учебных заведений
Министерства сельского хозяйства Российской Федерации
в качестве учебного пособия для студентов высших
учебных заведений по агрономическим специальностям

Издание 4-е, переработанное и дополненное



МОСКВА "КОЛОС" 1993

ББК 40.5

Т34

УДК 579.64(075.8)

Рецензенты: доктор биологических наук, профессор Санкт-Петербургского Государственного агропромышленного университета *В. М. Бурень*, кандидат биологических наук, доцент университета *И. А. Подвалкова*

Редактор *Е. В. Кирсанова*

Федеральная целевая программа книгоиздания России

Теппер Е. З. и др.

Т34 Практикум по микробиологии/Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. — 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Колос, 1993. — 175 с.: ил. — (Учебники и учеб. пособия для высш. учеб. заведений). ISBN 5-10-002834-3

Показаны приемы исследования микроорганизмов. Приведены методы изготовления и стерилизации питательных сред, количественного и качественного учета бактерий и грибов на различных субстратах. Описаны работы, посвященные микробиологическому анализу почвы, бактериальных препаратов и кормов.

Для студентов вузов по агрономическим специальностям.

Т-3702010000 - 096
035(01) - 93 КБ-48-27-92

ББК 40.5

ISBN 5-10-002834-3

© ВО "Агропромиздат", 1987
© Издательство "Колос", 1993, с изменениями

РАЗДЕЛ ПЕРВЫЙ

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

ГЛАВА 1

МИКРОСКОП И ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРОВАНИЯ

1.1. УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПА

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

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

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

1.1.1. Механическая часть микроскопа. К ней относят штатив, предметный столик и тубус (труба). Штатив имеет основание в виде подковы и колонку (тубусодержатель) в форме дуги. К нему примыкает коробка механизмов, система зубчатых колес для регуляции положения тубуса. Система приводится в движение вращением макрометричного и микрометричного винтов.

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

Микрометричный винт (микровинт) используют для последующей, более четкой установки на фокус. При полном повороте микрометричного винта тубус передвигается на $0,1 \text{ мм}$ (100 мкм). При вращении винтов по часовой стрелке тубус опускается по направлению к препарату, при вращении против нее идет от препарата.

На предметный столик помещают препарат с объектом исследования. Предметный столик вращается и перемещается во взаимно перпендикулярных плоскостях при помощи винтов. В центре столика находится отверстие для освещения препарата снизу лучами света, направляемыми зеркалом микроскопа. В столик вмонтированы два зажима (клеммы) – пружинящие металлические пластинки, предназначенные для закрепления препарата.

Если необходимо исследовать поверхность препарата, не допуская

пропусков (это важно при подсчете), или если во время работы требуется повторное наблюдение какого-либо определенного участка препарата, на предметный столик помещают препаратоводитель. На этом приспособлении имеется система линеек — нониусов, при помощи которых можно заординировать любую точку исследуемого объекта. Для этого при установке препаратоводителя совмещают центр вращения столика и оптическую ось системы микроскопа с центрировочной пластинкой препаратоводителя по кресту (отсюда предметный столик с препаратоводителем называют иногда крестообразным).

Тубус — это оправка, в которую заключены элементы оптической системы микроскопа. К нижней его части прикрепляют револьвер (объективодержатель) с гнездами для объективов. Современные модели микроскопов имеют наклонный тубус с дугообразным тубусодержателем, что обеспечивает горизонтальное положение предметного столика.

1.1.2. Оптическая часть микроскопа. Она состоит из основного оптического узла (объектив и окуляр) и вспомогательной осветительной системы (зеркало и конденсор). Все части оптической и осветительной систем строго центрированы в отношении друг друга. Во многих современных микроскопах зеркало и конденсор заменены вмонтированным в прибор регулируемым источником света.

Осветительная система находится под предметным столиком. Зеркало отражает падающий на него свет в конденсор. Одна сторона зеркала плоская, другая — вогнутая. При работе с конденсором необходимо пользоваться только плоским зеркалом. Вогнутое зеркало применяют при работе без конденсора с объективами малых увеличений.

Конденсор (от лат. *condenso* — уплотняю, сгущаю) состоит из двух-трех короткофокусных линз. Он собирает лучи, идущие от зеркала, и направляет их на объект. Конденсор необходим прежде всего при работе с иммерсионной системой (см. с. 10). Линзы конденсора вмонтированы в металлическую оправу, соединенную с зубчатым механизмом, позволяющим перемещать конденсор вверх и вниз специальным винтом.

Для регулирования интенсивности освещения в конденсоре есть ирисовая (лепестковая) диафрагма, состоящая из стальных серповидных пластинок. Чтобы получить более четкое изображение исследуемого объекта, регулируют степень раскрытия диафрагмы. Окрашенные препараты лучше рассматривать при почти полностью открытой диафрагме, неокрашенные — при уменьшенном отверстии диафрагмы.

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

Объектив (от греч. *objectum* — предмет исследования) — наиболее важная часть микроскопа. Это многолинзовая короткофокусная система, от качества которой зависит в основном изображение объекта.

Наружная линза, обращенная плоской стороной к препарату, называется фронтальной, она обеспечивает увеличение. Остальные линзы в системе объектива выполняют преимущественно функции коррекции оптических недостатков, возникающих при исследовании объектов.

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

Хроматическая aberrация 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.

К объективам, устраняющим сферическую aberrацию и частично хроматическую, относятся ахроматы. Они содержат до шести линз, корректируют первичный спектр (желто-зеленую часть спектра), но не устраняют вторичного спектра. Объективы, устраняющие хроматическую aberrацию и для вторичного спектра, называются апохроматами. В их составе может быть до 12 линз. В объективах-планахроматах и планапохроматах скорректированы и сферическая, и хроматическая aberrации. Их используют при микрофотографировании.

Апохроматы дают возможность устранить окрашивание объекта и получить одинаково резкое изображение от лучей разного цвета. Максимального эффекта при работе с апохроматами можно достичь, одновременно используя компенсационные окуляры, возмещающие оптические недостатки объективов. Хроматическая ошибка таких окуляров обратна хроматической ошибке объектива. В результате хроматическая aberrация микроскопа оказывается почти полностью компенсированной.

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

При работе с иммерсионным объективом между покровным стеклом и линзами объектива помещают кедровое масло, показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла. Кедровое масло получают из семян виргинского можжевельника *Juniperus virginiana* L. или зеравшанской арчи *Juniperus seravschana* Kom. Последнее время иммерсионной жидкостью чаще служат синтетические продукты, соответствующие по оптическим свойствам кедровому маслу. Лучи в оптически однородной гомогенной среде не меняют

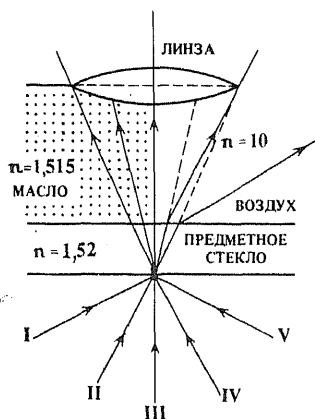


Рис. 1. Ход лучей в сухой и иммерсионной системах:

$I...V$ – лучи света

направления. На оправе иммерсионных объективов есть черная круговая нарезка и обозначения: I – immersion (иммерсия), HI – homogen immersion (однородная иммерсия), OI (oil immersion), MI – масляная иммерсия.

Объективы различают по увеличению. Собственное увеличение объективов определяют по формуле

$$V = l/f,$$

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. Чем больше фокусное расстояние, тем меньше увеличение объектива.

Обозначения увеличений 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 (объекта) больше, чем у объективов с большим увеличением. В связи с этим необходимо строго следить, каким винтом – макрометрическим или микрометрическим – пользоваться при фокусировке объектива. Так, у объективов с увеличением 8х, 40х и 90х рабочие расстояния соответственно 13,8; 0,6 и 0,12 мм. Для иммерсионного объектива рабочее расстояние составляет 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 начинать исследование препарата с небольшого увеличения.

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

Одна из важных характеристик объектива – разрешающая способность, определяющая в конечном итоге разрешающую способность микроскопа в целом. Она определяет наименьшее расстояние между

двумя точками на препарате, которые будут видны отдельно. Разрешающая способность объектива (d) зависит от его числовой (численной, или нумерической) апертуры (A) и длины волны света (λ), при которой идет наблюдение объекта:

$$d = \lambda / A.$$

Длина волны света, воспринимаемая человеческим глазом, составляет 0,4...0,7 мкм. Отсюда среднее значение $\lambda = 0,55$ мкм.

При определении разрешающей способности микроскопа следует различать два случая: освещение прямое (лучи падают параллельно оптической оси микроскопа) и косое. При косом освещении разрешающая способность микроскопа бывает в два раза меньше, чем при прямом:

$$d = \lambda / 2A.$$

Предел разрешающей способности объектива или наименьшее значение величины d можно представить следующим образом. Пусть значение λ — наименьшее (для более коротких, чем видимые, ультрафиолетовых лучей оно равно 350 нм), а значение A — максимальное (в наиболее совершенных иммерсионных системах 1,4...1,6). В этом случае разрешающая способность объектива будет наибольшей 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. Числовая апертура объектива характеризует его светособирательную способность и определяется по формуле

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

где n — показатель преломления светового луча, проходящего через предметное стекло в среду между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом; α — угол, одна сторона которого совпадает с оптической осью, другая образована линией, соединяющей точку выхода эффективных лучей из объектива с границей действующего отверстия объектива; $\frac{1}{2} \alpha$ — половинный угол входного отверстия объектива.

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

Важно также, чтобы значение величины $\sin \frac{1}{2} \alpha$ было максимальным. Чем больше $\sin \frac{1}{2} \alpha$, тем выше числовая апертура и разрешающая способность объектива. Предел повышения $\sin \frac{1}{2} \alpha$ зависит от степени

кривизны фронтальной линзы (это учитывается при изготовлении иммерсионных объективов) и числовой апертуры конденсора.

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

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

Окуляр служит как бы непосредственным продолжением "линз" человеческого глаза. Преломляющую систему глаза можно рассматривать как двояковыпуклую линзу со средним фокусным расстоянием 15 см (расстояние наилучшего зрения 25 см). Тесная связь с глазом человека отражена в названии окуляра (от греч. *okulus* – 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.

Назначение окуляра – в прямом мнимом увеличении действительного обратного и увеличенного изображения, которое дает объектив. Увеличение окуляра выгравировано на оправе. Рабочее увеличение окуляров колеблется в пределах от 4х до 15х. Собственное увеличение окуляра вычисляют по формуле, применяемой для определения увеличения луп:

$$K = L/F,$$

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

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

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

При длительной работе с микроскопом следует пользоваться двойными окулярами – бинокулярной насадкой. Бинокулярные насадки часто имеют собственное увеличение (около 1,5х) и снабжены коррек-

ционными линзами. Корпуса насадки могут раздвигаться в пределах 55...75 мм в зависимости от расстояния между глазами наблюдателя. Работа с бинокулярной насадкой улучшает видимость объекта, снижает яркость изображения и тем самым сохраняет зрение.

1.2. ОСНОВНЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОСКОПА

Качество микроскопа определяется его увеличительной и разрешающей способностями.

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

$$D = KV.$$

Теоретически микроскоп может дать увеличение 2000х раз и более. Однако следует различать полезное и бесполезное увеличения микроскопа. Пределы полезного увеличения в обычно используемых микроскопах достигают 1400х. 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 40х, имеющего числовую апертуру 0,65, полезное увеличение составляет 325...650х. Такое увеличение позволяет различить все структуры, разрешаемые данным объективом. Поэтому для объектива 40х следует брать окуляр 15х, чтобы получить общее увеличение в пределах полезного.

Какие бы более сильные окуляры ни применялись, более тонких деталей структур выявить не удастся. Более того, применение окуляра с большим увеличением приведет к уменьшению количества света, попадающего в глаз наблюдателя, и возрастанию искажений, вызываемых дефектами зрения.

Если объектив имеет увеличение 90х (числовая апертура 1,25), то полезное увеличение для него равно 1250х. Следовательно, и здесь не надо применять окуляры с увеличением более 15х, 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.

1.2.2. Разрешающая способность микроскопа. Эта характеристика особенно важна при исследовании микрообъектов и их структур. Если увеличительная способность микроскопа зависит от объектива и окуляра, то разрешающая способность определяется главным образом объективом и конденсором (см. 1.1.2). Расчет разрешающей способности микроскопа проводят по формуле

$$d = \lambda/2A.$$

Максимальная разрешающая способность светового микроскопа 0,2 мкм. Разрешающая способность микроскопа тем лучше, чем меньше абсолютная величина d .

Пример расчета разрешающей способности микроскопа. Если увеличение объектива $V = 40\times$, $A = 0,65$, то

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

если $V = 90\times$, $A = 1,25$, то

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

Среди существующих моделей современных микроскопов наиболее распространены МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3, МБИ-6, МБИ-10, МБР-1, МБР-1А.

1.3. РАБОТА С МИКРОСКОПОМ

1.3.1. Общие правила работы с микроскопом. Место для микроскопа выбирают дальше от прямого солнечного света. Работа на столе с темной поверхностью меньше утомляет глаза. Лучше смотреть в окуляр левым глазом, не закрывая правого. При работе с бинокулярной насадкой сначала регулируют расстояние между окулярами в соответствии с расстоянием между глазами наблюдателя так, чтобы поля зрения обоих окуляров сливались в одно.

Переносят микроскоп, держа одной рукой за штатив, другой – за 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.

Линзы должны быть всегда чистыми. Микроскоп следует хранить в чехле. Нельзя касаться пальцами оптических поверхностей.

1.3.2. Работа с иммерсионной системой микроскопа. При работе с иммерсионным объективом ($V = 90\times$; $A = 1,25$) устанавливают зеркало плоской стороной и поднимают конденсор.

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

Глядя сбоку на предметное стекло, опускают объектив до поверхности масляной капли. Далее, глядя в окуляр, осторожно опускают объектив при помощи макровинта, следя при этом за появлением изображения. Когда оно появится, для регулирования изображения пользуются микровинтом. Если изображение нерезкое, тусклое или плывет, что-то сделано неправильно: загрязнена фронтальная линза

объектива, мешают пузырьки воздуха в масле, случайно закрыта диафрагма, сдвинута лампа или зеркало. Причину некачественного изображения надо устранить.

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

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

1.3.3. Установка освещения. Удобнее пользоваться искусственным источником света – он более постоянен, чем дневной, лучше освещает объект, что важно при работе с сильными объективами (90×). Наиболее известен метод освещения препарата по Келеру. Рациональное освещение объекта достигается при использовании осветителей типа ОИ-7, ОИ-9 и ОИ-19. Осветитель с низковольтной лампой устанавливают на расстоянии 25...30 см от микроскопа при помощи соединительной планки (крестовины). Полевая диафрагма осветителя открыта; используют объектив 8×, зеркало с плоской поверхностью; конденсор поднят.

Препарат в поле зрения микроскопа фокусируют при открытых диафрагмах осветителя и конденсора. Из осветителя удаляют матовое стекло. Полевую диафрагму осветителя закрывают. На зеркало помещают белый лист бумаги для получения четкого изображения нити лампы осветителя.

Движением зеркала перемещают световой поток в поле зрения микроскопа. 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. Наблюдая в микроскоп, постепенно открывают полевую диафрагму осветителя так, чтобы освещенный круг ее заполнил все поле зрения микроскопа; лучше, если он немного выйдет за пределы поля зрения.

Положение осветителя, зеркала, конденсора микроскопа в дальнейшем не менять! Порядок установки света по Келеру рекомендуют также и при темнопольной и фазово-контрастной микроскопии.

1.3.4. Измерение объектов. Измерять клетки микроорганизмов в микрометрах можно на фиксированных и живых препаратах при помощи шкалы окулярного микрометра (окулярмикрометра) – окулярной линейки. У кокков определяют диаметр клеток, у других форм бактерий – длину и ширину.

Окулярная линейка – круглая стеклянная пластинка, посередине которой нанесена шкала делений (50 или 100 делений) общей длиной 5 мм. Вывинчивают линзу окуляра и окулярную линейку устанавливают шкалой вверх на диафрагму окуляра. Ставят препарат и определяют, скольким делениям линейки соответствует длина и ширина клетки. Измеряют не менее 10...20 клеток.

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

Объектный микрометр помещают вместо препарата на столик микроскопа, фокусируют изображение линейки при малом увеличении, затем перемещают в центр поля и меняют объектив на тот, при котором измеряли клетки. 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 черт шкалы окулярного микрометра с чертой объектного микрометра и находят следующее совмещение. Допустим, в двух делениях объектного микрометра (20 мкм) умещается пять делений окулярного микрометра, тогда одно деление окулярного микрометра при данном увеличении равно 4 мкм (20:5).

Зная, скольким делениям окулярной линейки соответствует длина и ширина изучаемых клеток, умножают цену деления окулярного микрометра на эти числа. Вычисленные значения цены делений линейки справедливы только для данной системы окуляр – объектив.

ГЛАВА 2

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, ПОСЕВ, ХРАНЕНИЕ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

2.1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ

2.1.1. Основные термины. Выращивание микроорганизмов на питательных средах называют культивированием (от лат. *cultus* – выращивание), а развившиеся в результате микроорганизмы – культурой. При развитии в жидкой среде культуры образуют суспензии, осадок или пленку, при развитии в плотной среде – колонии. Культура может быть чистой, т.е. содержит потомство клетки только одного вида, и накопительной, т.е. состоять преимущественно из клеток одного вида микроорганизмов.

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

Обычно микроорганизмы выращивают при определенной постоянной температуре в термостатах (деревянных или металлических шкафах) или термостатных комнатах. В тех и других постоянную температуру поддерживают при помощи терморегуляторов.

Культивирование при определенной температуре называют инкубацией, или инкубированием (от лат. *incubatio* – выращивание при искусственно созданной температуре).

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

В пробирках микроорганизмы культивируют как в жидких, так и на плотных средах. Жидкой средой для аэробных культур пробирки обычно заполняют на 1/3, для анаэробных – на 2/3 объема. Если плотная среда в пробирке предназначена для выращивания микроорганизмов в той же пробирке, при подготовке к стерилизации среду наливают в пробирки на 1/3...1/4 объема. После стерилизации пробирки с еще не застывшей средой раскладывают на ровной поверхности стола в наклонном под небольшим углом положении для получения скошенной поверхности агар-агара. Это так называемые "косяки" – косые, или скошенные, среды.

Плотную среду, застывшую при вертикальном положении пробирки, называют столбиком. Столбики, занимающие 1/3...1/2 часть пробирки, используют для посева культуры уколом. Столбики питательной среды, занимающие 2/3 объема, после стерилизации применяют для заливки стерильных чашек Петри, предназначенных для микробиологических посевов.

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

Микроорганизмы в колбах культивируют только на жидких питательных средах. Для аэробных микроорганизмов среду наливают тонким слоем (например, 30 мл в колбы Эрленмейера на 100 мл), для анаэробных колбу заполняют на 2/3 объема.

В чашках Петри микроорганизмы культивируют лишь на плотных средах. Высота этой посуды ~ 1,5 см, диаметр ~ 8...10 см, причем диаметр верхней чашки несколько больше диаметра нижней.

Для работы с микроорганизмами используют специальные бактериологические иглы, петли и шпатели (рис. 2). Их изготавливают из платиновой проволоки, которую закрепляют в специальных металлических держателях или впаивают в стеклянные палочки. Толщина игл и петель не должна превышать 0,5 мм, шпателя может быть 1,5 мм и более. При посевах и пересевах культур микроорганизмов из колоний, выросших на плотных средах, применяют иглы или шпатели. Последние используют

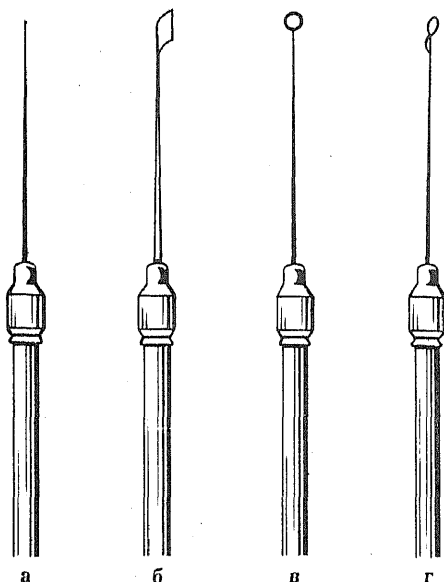


Рис. 2. Инструменты, используемые при работе с микроорганизмами:

а — бактериологическая игла; б — шпатель; в, г — петли, сделанные соответственно правильно и неправильно

ют и для взятия клеток микроорганизмов из колоний, вырастающих в субстрат. Суспензии микроорганизмов берут петлей.

При приготовлении препаратов микроорганизмов предметные стекла удерживают на весу пинцетами Корнэ или специальными пинцетами-держателями. Сушить препараты целесообразно на верхнем ярусе сушильного металлического столика Коха. Промывать их удобно на приспособлениях-перекладках 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.

2.1.2. Техника посева. Посев или пересев всегда выполняют вблизи горелки. При посеве клеток микроорганизмов из пробирки в пробирку обе пробирки (одну с культурой, другую со стерильной питательной средой) берут в левую руку. Одну пробирку зажимают между указательным и средним пальцами (первая пробирка), нижний конец ее свободно лежит на большом пальце с левой стороны его 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 наклонно, чтобы гарантировать стерильность культуры. Если располагать их вертикально, то возможно попадание из воздуха клеток посторонних микроорганизмов.

В пламени горелки тщательно обжигают бактериологическую иглу (петлю), держа ее в правой руке отвесно. 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 легким движением, не разрезая среды, проводят прямую или волнообразную черту по поверхности среды – посев штрихом. Если высевают в столбик, иглу вводят в центральную часть питательной среды, в толщу ее – посев уколом. Если посев делают в жидкую среду или из жидкой среды, наклонять пробирки следует слегка, чтобы не смочить пробку и края пробирки. Пробки, перед тем как закрыть ими пробирки, обжигают в пламени. Удобнее сначала закрывать первую пробирку, потом вторую.

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

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

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

2.2. МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

2.2.1. Техника взятия культуры для приготовления препарата. Пробирку с культурой держат в левой руке почти в горизонтальном положении вблизи горелки. Обожженной в пламени бактериологической иглой из пробирки 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 держат в правой руке большим, указательным и средним пальцами.

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

2.2.2. Исследование живых клеток микроорганизмов методами "раздавленной" и "висячей" капли. В обоих случаях возможно окраши-

вание объекта "прижизненными" красителями — витальная окраска. Прижизненными красителями могут служить метиленовый синий, нейтральный красный в концентрациях от 0,001 до 0,0001 %.

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

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

Метод "раздавленной" капли. На чистое предметное стекло наносят каплю водопроводной воды. В нее вносят культуру и смешивают с водой. Накрывают каплю покровным стеклом так, чтобы под ним не образовывались пузырьки воздуха. Стеклопалочкой прижимают покровное стекло к предметному и удаляют избыток воды фильтровальной бумагой, поднося ее к краям покровного стекла. При просмотре приготовленного препарата под микроскопом с иммерсионным объективом на покровное стекло наносят каплю кедрового масла.

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

2.2.3. Фиксированные препараты микроорганизмов. В микробиологии часто готовят фиксированные препараты. Их рассматривают под микроскопом окрашенными. Под фиксацией подразумевают такую обработку живого объекта, которая дает возможность быстро прервать течение жизненных процессов в нем, сохранив тонкую структуру. В результате фиксации клетки прочно прикрепляются к стеклу и лучше прокрашиваются. Фиксация необходима в случае работы с патогенными микроорганизмами для 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. Эту операцию выполняют вдали от горелок. Прокаленной бактериологической иглой из пробирки с культурой берут небольшое количество микробной массы и вносят в каплю. Каплю тщательно размазывают петлей по стеклу на площади приблизительно 4 см².

Густую суспензию сначала разводят водой. Стерильной петлей

берут немного суспензии и переносят в каплю воды на другое предметное стекло. Суспензию нормальной густоты размазывают тонким слоем по стеклу, затем мазок сушат на воздухе при комнатной температуре или слабом нагревании, держа препарат высоко над пламенем горелки. Сильное нагревание препарата при сушке не рекомендуется, так как белки коагулируют, искажая структуру и форму клеток. Высушенный препарат фиксируют.

Фиксация мазка. Проводят над пламенем горелки при исследовании формы клеток или при помощи химических соединений для исследования внутренней структуры клеток. В первом случае препарат три-четыре раза медленно проводят нижней стороной над пламенем горелки. Во втором используют хромовые соединения, формалин, осмиевую кислоту, ацетон.

Один из распространенных приемов фиксации – обработка препарата 96 %-м спиртом или смесью равных объемов этилового спирта и эфира (жидкость Никифорова). Для этого 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 вида красителя и цели исследования продолжительность окрашивания меняется от 1 до 5 мин, в отдельных случаях до 3 мин и дольше. По окончании окрашивания препарат промывают водой, фильтровальной бумагой удаляют воду, подсушивают на воздухе и микроскопируют.

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

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

Из основных красителей наиболее часто в микробиологии применяют: красные – нейтральный красный, сафранин, фуксин, гематоксилин; синие – виктория, метиленовый синий; фиолетовые – генциан фиолетовый, кристаллический фиолетовый, метиленовый фиолетовый; зеленые – янус зеленый, метиленовый зеленый, малахитовый зеленый; коричневые – везувин, хризоидин; черные – индулин. Кислые красители могут быть следующие: красные и розовые – кислый фуксин, эритрозин; черные – нигрозин; желтые – конго, пикриновая кислота, флуоресцин.

Красители можно разделить на позитивные и негативные. Позитивные красители окрашивают клетки (при комнатной температуре в

течение 30...60 с); негативные – пространство, окружающее микроорганизмы. В результате клетки выглядят силуэтами на фоне красителя.

Некоторые микроорганизмы (спирохеты) и отдельные структуры (внеклеточная слизь), плохо выявляемые при помощи позитивных красителей, становятся хорошо заметными при окрашивании препаратов негативными красителями. Споры без соответствующей обработки не окрашиваются, поэтому при окрашивании клеток бацилл позитивными красителями они окрашиваются как бы негативным способом: имеют вид преломляющих свет включений в вегетативных клетках.

Материалы и оборудование. Культуры микроорганизмов, пробирки, колбы, чашки Петри, бактериологические иглы, петли, шпатели, штативы, предметные и покровные стекла, красители.

ГЛАВА 3

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

3.1. ФОРМА КЛЕТОК

3.1.1. Бактерии. Под общим понятием "бактерии" описано свыше 1600 видов микроорганизмов – прокариот, не имеющих настоящего сложноорганизованного ядра. Большинство представителей бактерий – одноклеточные организмы, различающиеся размерами и физиологическими свойствами. По форме все бактерии можно разделить на шаровидные, палочковидные, извитые и нитчатые. Из почвы выделены также бактерии, имеющие довольно своеобразную форму.

С основными формами бактерий можно познакомиться на примере следующих представителей (рис. 3).

Бактерии шаровидные, или кокки (от греч. *coccus* – зерно, шарик). Среди них выделяют следующие группы:

микрококки, встречающиеся в природе в виде одиночных шаровидных клеток; к ним относят *Micrococcus agilis* (от лат. *micro* – маленький, *agilis* – подвижный);

диплококки (от лат. *diploos* – двойной) – шаровидные бактерии, соединенные по две клетки; к ним относят *Azotobacter chroococcum*; родовое название вида отражает способность этих бактерий фиксировать азот атмосферы, видовое – продуцировать коричневый пигмент (лат. *chroo* – коричневеющий);

стрептококки (от лат. *streptos* – цепь) – шаровидные клетки, образующие в результате деления 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 – принадлежность стрептококка к молочнокислому брожению (от лат. *lactis* – молочный);

сарцины (от лат. *sarceo* – соединяю) – шаровидные бактерии, группирующиеся по восемь клеток; располагаются в виде куба (с

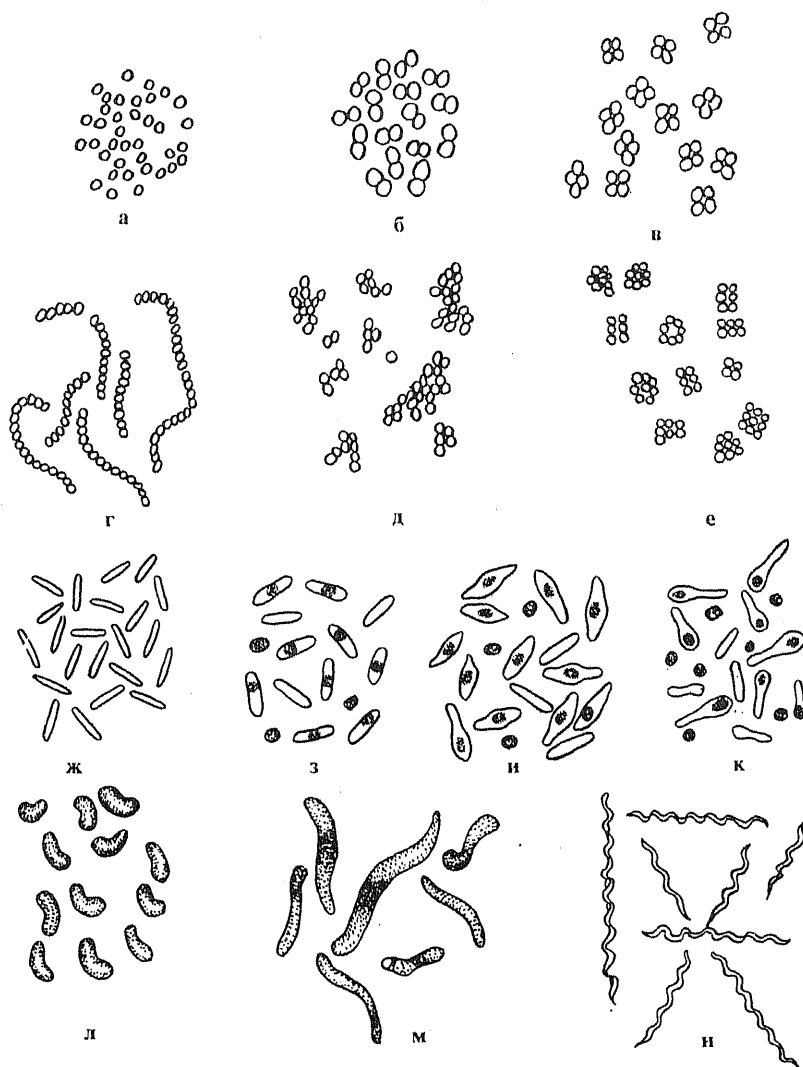


Рис. 3. Форма бактерий:

шаровидная: а – микрококки; б – диплококки; в – тетракокки; г – стрептококки; д – стафилококки; е – сарцины; палочковидная: ж – не образующие спор; з, и, к – спорообразующие (з – бациллярного, и – клостридиального, к – плектридиального типов спороношения); извитая: л – вибрионы; м – спириллы; н – спирохеты

каждой стороны по четыре клетки); такая форма возникает в результате деления клетки в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, отдельные виды сарцин формируют большие сарциноподобные кубообразные пакеты, но уже с каждой стороны находится не по четыре клетки (субъединицы сарцины), а по четыре сарцины; удобна для просмотра *Sarcina flava* (сарцина желтая) — наиболее обычный представитель микрофлоры воздуха.

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

Палочковидные бактерии. К ним относят формы, образующие споры (роды *Bacillus*, *Clostridium* и др.) и не образующие их (роды *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Lactobacillus* и др.). При окрашивании клеток *Pseudomonas stutzeri* цитоплазма их прокрашивается равномерно, поскольку это неспорообразующая палочка, и под микроскопом клетки выглядят как тонкие, четко очерченные, прокрашенные палочки.

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

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

Палочковидные бактерии также просматривают на фиксированных и окрашенных фуксином препаратах.

Нитчатые формы. Представляют собой цепочки цилиндрических клеток, часто окруженные общим влагалищем, или чехлом. Нитчатые бактерии распространены в илах, почве и водоемах, особенно с высоким содержанием железа. В водоемах эти бактерии часто образуют охристые осадки. Для знакомства с нитчатыми бактериями рекомендуют брать пробу воды с охристыми отложениями из естественных водоемов.

Препарат готовят в раздавленной капле и просматривают с иммерсионной системой. Наиболее часто на нем встречаются железобактерии рода *Leptothrix*, окисляющие закисные формы железа в окисные. Гидрат окиси железа откладывается во влагалищах, отчего микроорганизмы приобретают желтовато-бурую (охристую) окраску. На препарате часто

обнаруживаются остатки ожелезненных влагалищ в виде тонких трубок и другие ожелезненные структуры.

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

Извитые формы. Среди бактерий данной группы выделяют следующие формы:

вибрионы (от лат. *vibrio* — трепещущий, вибрирующий) — слегка изогнутые клетки; изгиб их меньше половины окружности;

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

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

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

Для ознакомления со спирохетами следует приготовить фиксированный крашеный препарат зубного налета. Особенно удачны препараты соскоба из кариесного (гнилого) зуба. Зубные спирохеты чрезвычайно тонкие, почти волосовидные.

Миксобактерии, или слизистые бактерии. Группа бактерий, стоящих на более высокой ступени развития, чем описанные выше. У отдельных представителей миксобактерий (*Sorangium*, *Polyangium*) даже в световой микроскоп четко видно дифференцированное ядро. Вегетативные клетки имеют палочковидную форму с заостренными или округлыми концами. По мере старения они укорачиваются и переходят в микроспоры, соединяющиеся впоследствии слизью и образующие первичные и вторичные цисты. Из последних в дальнейшем формируются плодовые тела. Для наблюдений за формой миксобактерий берут колонии, развившиеся вокруг комочков почвы на гелевых пластинах, на которых единственным источником углерода служит целлюлоза (см. 7.2.1).

3.1.2. Актиномицеты (от лат. *actis* — луч, *myces* — гриб) — лучистые грибы (рис. 4, а). Эта группа микроорганизмов занимает промежуточное положение между бактериями и грибами, поэтому ее представителей называют грибобактериями. Они одноклеточные, как бактерии, и обра-

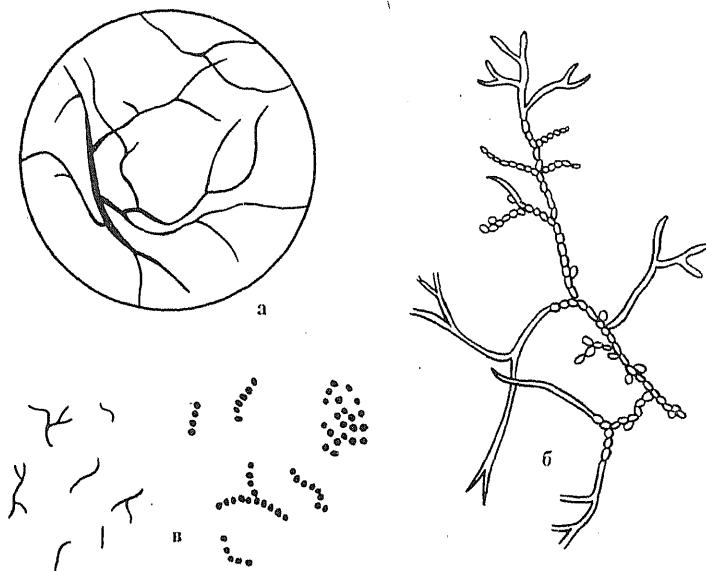


Рис. 4. Актиномицеты (а), нокардии (б) и микобактерии (в)

зуют мицелий, как грибы. Диаметр нитей у этих микроорганизмов очень мал, как у бактерий (0,5...0,8 мкм), гифы мицелия длинные и ветвистые, как у грибов. Например, у актиномицетов длина ветвящихся нитей достигает нескольких миллиметров, у настоящих грибов – нескольких сантиметров. С грибами актиномицетов объединяет также способность размножаться спорами (см. с. 24).

На питательных средах актиномицеты формируют пушистые, бархатистые, мучнистые, преимущественно плотные кожистые колонии, срастающиеся с субстратом и иногда имеющие характерный землистый запах. Мицелий актиномицетов на питательных средах дифференцирован: одна часть погружена в субстрат (субстратный мицелий). Многие представители актиномицетов продуцируют пигменты, поэтому их воздушный мицелий и колонии окрашены в голубые, синие, фиолетовые, розовые, бурые, коричневые или черные тона. Актиномицеты, образующие диффундирующие в питательную среду пигменты, окрашивают и ее в соответствующий цвет.

Чтобы выявить характерные морфологические признаки колонии актиномицета, сначала рассматривают их при малом увеличении на питательной среде в чашках Петри или по краю колонии в пробирке. При этом можно видеть, что гифы мицелия частично внедряются в субстрат, частично стелются по его 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, 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 этот кусочек к стеклу, раздавливают и размазывают с водой. Далее сушат, фиксируют, красят. На фиксированном окрашенном препарате дифференциации мицелия не видно, как правило, не видны и споры, однако четко просматриваются мицелиальные одноклеточные нити.

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

3.1.3. Нокардия. Это формы микроорганизмов, переходные между актиномицетами и микобактериями. Воздушный мицелий у них отсутствует или развит слабо. На питательных средах развиваются колонии тестообразной (мягкой) консистенции с характерным мицелиальным ободком. Окраска их также разнообразна, как и у истинных актиномицетов. В молодом возрасте проактиномицеты образуют мицелий, который вскоре начинает септироваться (в нитях образуются перегородки) и расчленяться на палочковидные фрагменты, в дальнейшем переходящие в укороченные палочки, но чаще в кокки.

Для знакомства с проактиномицетами можно воспользоваться чистой культурой *Nocardia rubra*, образующей красные (от лат. *rubra* – красный) колонии (рис. 4,б).

3.1.4. Микобактерии (рис. 4,в). Это наиболее низкоорганизованные актиномицеты. В некоторых классификациях их относят к бактериям. Настоящего мицелия микобактерии не образуют. Колонии тестообразной консистенции, продуцируют пигмент. В молодой культуре формируются палочки искривленной формы с неровным контуром: звездообразные, иногда довольно длинные, с боковыми отростками. В старых культурах ветвистые палочки часто распадаются сначала на более короткие палочки, затем на кокки.

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

Грибы относят к эукариотам. Тело гриба состоит из мицелия, или грибницы, – сплетения тонких ветвящихся нитей – гиф.

Зигомицеты. Низшие грибы, имеют хорошо развитый ветвистый одноклеточный мицелий. Размножаются половым путем и бесполом, т.е. при помощи спор. Представитель класса – мукор (*Mucor mucedo*) развивается в виде войлочного белого или серого налета на продуктах растительного происхождения и навозе травоядных животных.

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

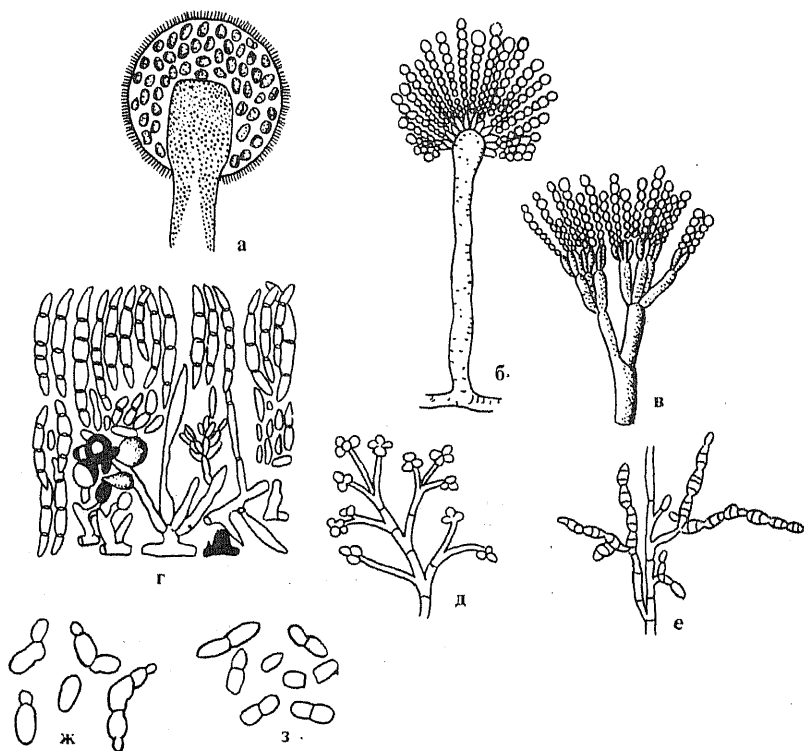


Рис. 5. Микроскопические грибы:

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

Перегорodka, отделяющая спорангий от спорангиеносца, проходит куполообразно, поэтому верхняя часть спорангиеносца оказывается внутри спорангия. Эту часть спорангиеносца называют колонкой, у разных видов мукоровых грибов она имеет неодинаковую форму (грушевидная, шаровидная, цилиндрическая).

Для просмотра осторожно берут препаровальной иглой небольшое количество мицелия, другой препаровальной иглой снимают 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 спорангии покрыты тонкими шипами кристаллов оксалата кальция.

Затем на поверхность препарата наносят каплю воды, накрывают его покровным стеклом. Оболочка спорангия при этом разрушается, и споры вываливаются. Рассматривают их последовательно при малом и большом увеличении без иммерсии.

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 три-четыре дня под стеклянный колпак на тарелку с влажной фильтровальной бумагой или сырым песком.

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

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

Пенициллы и аспергиллы имеют хорошо развитый многоклеточный мицелий. Размножаются преимущественно конидиальным спороношением. Наблюдаются в виде налетов голубого, зеленого, сизого, реже других цветов 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) называют кистевиками, так как конидии у них формируются на концах мутовчато разветвленных 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 мицелия (~0,5 мм²) на границе между зеленым и белым участками. Гриб к занятию выращивают в чашке Петри. Если он старый и мицелий уже весь зеленый, просмотр будет неудачным. Осторожно при помощи двух препаровальных игл кусочек мицелия снимают со среды и помещают в каплю воды на предметное стекло. Сверху кладут покровное стекло.

Поскольку мицелиальная пленка гриба довольно толстая, может получиться так, что под покровным стеклом вода не окружает мицелий со всех сторон. В этом случае из капельницы под покровное стекло добавляют воду до тех пор, пока кусочек мицелия не будет окружен ею. Стеклянной палочкой или препаровальной иглой слегка надавливают на центр покровного стекла. Избыток воды удаляют фильтровальной бумагой.

Препарат просматривают сначала при малом увеличении, уделяя основное внимание краям, так как на них обычно хорошо видны кисти конидиеносцев. Когда подходящий участок найден, переходят с объектива 8х на объектив 40х и детально рассматривают кисточки. Во время

просмотра при малом увеличении конденсор несколько опускают, при переводе на объектив 40х регулируют освещенность поднятием конденсора.

Для грибов рода *Aspergillus*, или леечная плесень (рис. 5,б), обычны 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.

Со строением конидиеносцев аспергиллов знакомятся на примере *Aspergillus niger*. Препаровальной иглой берут небольшое количество мицелия на границе между черным и коричнево-бурым участками колонии и вносят в каплю воды на предметном стекле. Далее поступают так же, как и при просмотре пеницилла. В начальной стадии спорообразования аспергилл похож на мукор (бесцветные головки), затем с возрастом головки покрываются стеригмами, на которых развиваются споры. В результате получаются 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).

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

Среди грибов рода *Fusarium* (рис. 5,з) есть сапротрофы, живущие в почве и на растительных остатках, и паразиты, вызывающие заболевания многих видов растений (увядание, гнили корней, стеблей, плодов, полегание семян древесных и кустарниковых пород, болезни семян).

Колонии отдельных видов фузариума на питательных средах (сусло-агар) разнообразны по структуре: они могут быть рыхлыми, ватообразными, пышными воздушными или плотными пленчатыми. Колонии бывают белые или различных тонов розового или желтого цвета. Нередко питательная среда тоже 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,д) легко выделить из почвы на подкисленном сусло-агаре. Через два-три дня инкубации при 23...25 °C

на поверхности среды появляются сначала белые, затем с оттенками зеленого 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 головки, каждая из которых состоит из 10...20 одноклеточных бесцветных конидий.

Разные виды рода *Alternaria* (рис. 5, е) можно выделить с поверхности листьев пораженных этим грибом растений картофеля или томата, семян капусты и других растений, из почвы. Альтернрии характеризуются своеобразным строением многоклеточных грушевидных конидий, соединенных цепочками. Колонии на сусло-агаре сначала светлые, пушистые, затем зеленовато-серые или оливково-черные, бархатистые или ворсистые, нередко с ясно выраженной концентрической зональностью; иногда с самого начала сажисто-черные, во многих случаях темный пигмент диффундирует в среду.

Дрожжи. По современным представлениям, дрожжи – сборная группа одноклеточных микроскопических организмов, относящихся к разным классам грибов. Преимущественно они представлены в классе Аскомицеты.

Диаметр клеток дрожжей колеблется от 8 до 15 мкм. Форма их разнообразна: эллипсоидная, грушевидная, округлая, цилиндрическая. Размножаются вегетативно – почкованием, делением и половым путем с образованием спор. К почкующимся дрожжам (рис. 5, ж) относят представителей “культурных” дрожжей рода *Saccharomyces* (сахаромицеты), к делящимся – виды рода *Schizosaccharomyces* (шизосахаромицеты).

При половом процессе слияние вегетативных клеток дрожжей ведет к образованию сумок со спорами, иногда сначала формируются споры, которые впоследствии копулируют друг с другом. В каждой сумке образуется от двух до восьми, иногда 12 спор. Среди дрожжей есть аспорогенные ложные дрожжи, не способные к половому процессу и спорообразованию. Они относятся к классу Несовершенные грибы.

С делящимися дрожжами (рис. 5, з) можно познакомиться на примере *Schizosaccharomyces pombe* (от лат. *schizo* – рваться, делиться, *saccharomyces* – сахарный гриб, *pombe* – название африканского напитка, из которого этот организм выделен). Дрожжам размножение делением несвойственно. Шизосахаромицеты служат как бы отклонением от нормы. Эти грибы размножаются половым путем, связанным со спорообразованием, что характерно для сумчатых грибов. Рассматривают виды рода на фиксированных окрашенных фуксином препаратах. Это цилиндрической формы крупные клетки с округлыми концами. Размножение делением характерно также для дрожжей рода *Endomyces*.

Из почкующихся дрожжей наиболее окультурены дрожжи пивные, или пекарские, – *Saccharomyces cerevisiae*. Форма их разнообразна,

размножаются почкованием и аскоспорами. При почковании на материнской клетке возникает маленькая выпуклость – "почка" – это дочерняя клетка, в которую переходит одно ядро, клетка увеличивается в размерах и отделяется. Если условия для такого размножения благоприятны (достаточное количество сахара, соответствующая температура, аэрация), процесс идет очень быстро. У некоторых представителей рода клетки после почкования не успевают разъединиться и возникает псевдомицелий (ложный мицелий).

Для лабораторных занятий могут быть использованы пивные дрожжи. Небольшой кусочек дрожжевой массы за несколько часов до занятий помещают в теплую подсахаренную воду и ставят в теплое место. Образуется беловатая мутная жидкость. На предметное стекло наносят ее каплю, закрывают покровным стеклом, наносят сверху кедровое масло и просматривают препарат с иммерсионной системой. Клетки хорошо видны и при меньших увеличениях.

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

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

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

Материалы и оборудование. Коллекцию культур следует пересевать каждые два-три месяца на свежие питательные среды: бактерии и актиномицеты на мясопептонный агар, дрожжевые и плесневые грибы на сусло-агар. За два-три дня до занятий культуры пересевает в пробирки (бактерии и актиномицеты) или чашки Петри (грибы из расчета по две пробирки каждой культуры и одну-две чашки Петри на группу студентов из 10...15 человек).

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

3.2. СТРОЕНИЕ (ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ)

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

Для изучения внутреннего строения клеток применяют специальные способы окраски – цитохимические методы исследования. Многие из этих методов преследуют диагностические цели. По форме клетки

микроорганизмов не слишком разнообразны, и в ряде случаев, чтобы установить принадлежность микроба к тому или иному роду и виду, необходимо провести специальное окрашивание клетки или вещества, накапливающегося в ней.

3.2.1. Окраска клеток микроорганизмов по Граму. Этот метод дифференциации микробных клеток основан на различии в химическом составе клеточных оболочек. Сущность его в том, что в клетках одних видов микроорганизмов образуется нерастворимое в спирте соединение йода с основным красителем, у других видов это соединение появляется временно и после обработки спиртом растворяется. Микробов первой группы называют грамположительными, второй – грамотрицательными.

Техника окраски по Граму. На хорошо обезжиренное предметное стекло наносят три тонких мазка разных культур микроорганизмов (два из них – контрольные, с заведомо известным отношением к окраске по Граму). Мазки высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки и окрашивают в течение 1 мин феноловым раствором генциана фиолетового (или кристаллического фиолетового), держа стекло в 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 %-м спиртом в течение 15...20 с. Время обезцвечивания очень существенно, при превышении указанного срока обезцвечиваются и грамположительные клетки, при недостаточном сроке обработки препарат оказывается перекрашенным.

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

Результаты окраски по Граму зависят от возраста культуры: в старых мертвые клетки всегда окрашиваются грамотрицательно. Некоторые бактерии (протей) окрашиваются грамвариабельно, т. е. часть клеток – как грамположительные, а часть – как грамотрицательные.

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

Метод Грама в модификации Синева. На фиксированный мазок накладывают полоску фильтровальной бумаги шириной 3 см, предварительно пропитанную 1 %-м спиртовым раствором кристаллического фиолетового и высушенную (в высушенном виде бумага может долго храниться). На бумагу наносят две-три капли воды и оставляют ее на препарате 2 мин. В дальнейшем окраску проводят по вышеописанной методике. Модификацию Синева широко применяют на практике.

Метод Грама в модификации Калины. На предметное стекло наносят небольшую каплю дистиллированной воды, помещают в нее минимальное количество клеток микроорганизмов и петлей добавляют 0,5 %-й 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 %-го раствора фуксина Пфейфера, 10 мл 10 %-го раствора йода, 10 мл ацетона и 70 мл 0,5 %-го раствора йодида калия. Затем препарат опускают на мгновение в 96 %-й этиловый спирт и быстро высушивают фильтровальной бумагой.

Красители и растворы для окраски по Граму. 1. *Феноловый раствор генциана фиолетового.* Генциан фиолетовый – 1 г, спирт 96 %-й – 10 мл, фенол кристаллический – 2 г, вода дистиллированная – 100 мл.

2. *Спиртовой раствор генциана фиолетового.* Генциан фиолетовый (или кристаллический фиолетовый) – 1 г, спирт 96 %-й (ректификат) – 100 мл, глицерин – 5 мл. Бутылку со смесью ставят в термостат на 24 ч (можно и дольше), затем фильтруют.

3. *Раствор Люголя.* Йодид калия – 2 г, йод кристаллический – 1 г, вода дистиллированная – 300 мл. Вначале готовят концентрированный раствор йодида калия в 5 мл воды, в нем растворяют йод, потом добавляют воду до 300 мл.

4. *Спирт 96 %-й.*

5. *Фуксин Пфейфера.* Это водный раствор карболового фуксина Циля. Для приготовления берут 1 мл карболового фуксина Циля (см. с. 31) и 9 мл дистиллированной воды.

3.2.2. Выявление кислотоустойчивости у бактерий методом Циля–Нильсена. Кислотоустойчивость – свойство, характерное для микобактерий и некоторых актиномицетов. Оно связано с особенностями химического состава клеточных стенок, главным образом с наличием в них миколовых кислот. Кислотоустойчивость проявляется в способности клеток трудно воспринимать красители, а при окрашивании – прочно их удерживать.

До фиксации мазка на пламени препарат готовят обычным способом (см. 2.2.3). Далее на фиксированный в пламени и остывший препарат помещают полоску фильтровальной бумаги, обильно смачивают бумагу карболовым фуксином Циля и нагревают препарат над пламенем 5 мин. Нельзя допускать высыхания препарата, при необходимости на него добавляют одну-две капли воды. Нельзя также доводить краситель до кипения: как только появятся пары, препарат отводят в сторону.

По окончании окрашивания и охлаждения препарата бумагу удаляют, а мазок промывают слабой струей водопроводной воды до исчезновения окраски в стоке. Затем препарат промокают фильтровальной бумагой и погружают на 3...5 с в 5 %-й раствор H₂SO₄ или 3 %-й раствор HCl. Снова промывают препарат водой, промокают и окрашивают в течение 3...5 мин метиленовым синим Леффлера. Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в красный цвет, некислотоустойчивые – в синий.

Красители и реактивы для окраски кислотоустойчивых бактерий. 1. Карболовый фуксин Циля: фуксин основной – 1 г, карболовая кислота кристаллическая (фенол) – 5 г, спирт 96 %-й – 10 мл, глицерин – несколько капель, вода дистиллированная – 100 мл. Основной фуксин растворяют в этаноле и затем добавляют растворенный в воде фенол. Объединенный раствор тщательно перемешивают и оставляют на несколько дней, перед использованием его фильтруют.

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

3. Серная кислота – 5 %-й раствор или соляная – 3 %-й.

3.2.3. 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 эллипсовидные образования. Если диаметр споры не превышает диаметра клетки, в которой образуется спора, клетку называют бациллярной, если превышает, то в зависимости от расположения споры в центре или на конце клетки соответственно клостридиальной или плектридиальной. В бациллярной клетке спора может размещаться в центре клетки – центральное положение, 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, поэтому с трудом окрашиваются красителями. Объясняется это большой плотностью оболочки, низкой концентрацией свободной воды в ней и высоким содержанием липидов в спорах. В препаратах, окрашенных простыми способами или по Граму, споры остаются бесцветными (негативная окраска).

В связи с особенностями физико-химического состава и плотной малопроницаемой оболочкой для окраски спор применяют сначала химические вещества, меняющие 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. Этого достигнуть нетрудно, так как краситель, адсорбированный спорой, удерживается прочнее, чем адсорбированный цитоплазмой клетки.

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

Метод Циля–Нильсена в модификации Мюллера. До фиксации мазка на пламени препарат готовят обычным способом (см. 2.2.3). Далее на фиксированный в пламени и остывший препарат наносят 5 %-й раствор хромовой кислоты. Через 5...10 мин кислоту

смывают водой. Препарат накрывают полоской фильтровальной бумаги, обильно смачивают бумагу карболовым фуксином Циля. Подогревают препарат над пламенем до появления паров (не до кипения), отводят его в сторону и добавляют новую порцию красителя. Так 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 препарат 1 %-м раствором соляной или серной кислоты 15...30 с. При приготовлении препарата спор *Bacillus mycoides* или *B. mesentericus* рекомендуется обесцвечивать цитоплазму 16...18 с (мерно считая вслух от 21 до 40). При превышении этого времени может обесцветиться и спора.

Затем препарат промывают водой и окрашивают метиленовым синим 2 мин. Если все операции проделаны правильно, окраска получается контрастной и споры ярко-красного цвета будут четко выделяться на голубом фоне цитоплазмы.

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

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

Реактивы для окрашивания спор бактерий. 1. Карболовый фуксин Циля (см. с. 31).

2. Метиленовый синий Леффлера (см. с. 31).

3. Метиленовый синий, насыщенный водный раствор: 2 г красителя и 100 мл дистиллированной воды.

4. Хромовая кислота, 5 %-й раствор.

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

3.2.4. Окраска капсул. Некоторые виды бактерий образуют слизистые капсулы. При обычных методах окраски данные структуры остаются бесцветными. Для их выявления применяют специальные негативные методы окраски.

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. На темно-дымчатом фоне ясно видны неокрашенные капсулы и клетки бактерий.

Для исследования капсул наиболее удобно использовать клетки азотобактера.

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

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

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

Прежде чем приступить к работе, проверяют подвижность клеток в вислячей капле. При отсутствии подвижности пробирку оставляют в термостате еще на 1½...2 сут.

Для приготовления препаратов необходимы совершенно чистые предметные стекла. Их кипятят в растворе бихромата калия в крепкой серной кислоте, затем дважды промывают в растворе едкого натра. После этого стекла промывают водой и хранят в банке с 96 %-м спиртом. Перед приготовлением мазка сильно нагревают ту сторону стекла, на которую будет нанесен мазок. Наносят мазок на уже охлажденное стекло.

Метод Леффлера. Суспензию бактерий наносят на предметное стекло и сушат при комнатной температуре. Допускается фиксация мазка быстрым однократным проведением через пламя. Далее препарат обрабатывают протравителем 3...5 мин, нагревая его до появления паров, или 15...20 мин при комнатной температуре, потом промывают сильной струей дистиллированной воды 30 с и высушивают на воздухе.

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

Приготовление протравителя. 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 %-м спирте. Смесь готовят за несколько дней до употребления, хранят в склянке с притертой пробкой в темном месте. Перед началом работы протравитель 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 стекла. 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 определяют в каждом конкретном случае экспериментально). Для уточнения срока окраски препарат помещают на черный фон и освещают сбоку. Как только по всему мазку выпадет осадок, избыточный краситель удаляют слабой струей дистиллированной воды, не отмывая выпавший в осадок краситель. Если клетки бактерий не окрасились в красный цвет, их докрасивают метиленовым синим.

Приготовление парарозанилина. Для этого необходимы три раствора: первый – 1,5 %-й NaCl в дистиллированной воде; второй – 3 %-й таниновой кислоты в дистиллированной воде (раствор должен быть светло-желтым); третий – 0,9 %-й парарозанилинацетата, или 0,3 %-й парарозанилингидрохлорида в 96 %-м этиловом спирте. Для растворения требуется несколько часов даже при взбалтывании. Вместо соли розанилина можно применить основной фуксин в виде 1,2 %-го раствора в 96 %-м этиловом спирте.

Для приготовления красителя смешивают равные объемы всех трех растворов и смесь хранят в плотно закупоренной склянке. Краситель сохраняет свойства несколько недель при 4 °С и месяцы и даже годы при минус 10...20 °С.

Метод серебрения жгутиков по Морозову. Готовят три реактива: первый – 1 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл формалина, 100 мл дистиллированной воды; второй – 5 г танина, 1 мл жидкой карболовой кислоты (фенола), 100 мл дистиллированной воды; третий – 5 г кристаллического нитрата серебра (AgNO_3) растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

К 80 мл раствора серебра 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 оставшихся 20 мл раствора серебра добавляют несколько капель до получения нужной опалесценции.

Для окраски препарата полученный 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 1 мин до появления паров, 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.

3.2.6. Окраска ядерного вещества бактерий. О наличии ядра (нуклеуса) при цитохимических исследованиях судят по качественной 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 5 мин метиловым спиртом или фиксатором Карнуа. В последнем случае для удаления следов уксусной кислоты препарат промывают спиртом и тщательно высушивают на воздухе. Окрашивают препарат красителем Романовского–Гимза в течение суток, затем ополаскивают слабощелочной (pH 7,2) водой, высушивают и микроскопируют. Ядерные вещества окрашиваются в красно-фиолетовый цвет, цитоплазма – в слабо-розовый.

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

Краситель Романовского–Гимза. Промышленность выпускает препарат 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 (pH 7,2), прибавляют десять капель красителя.

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 дезоксирибоза переходит в β -гидроксилевулиновый альдегид, который взаимодействует с сернистой частью бесцветной фуксинсернистой кислоты, выделяя фуксин красного цвета. В результате ядерные вещества становятся окрашенными.

Препараты бактерий обрабатывают фиксатором Карнуа 5 мин, промывают абсолютным спиртом, гидролизуют 7 мин в растворе 1 н. HCl, подогретой до 60 °С, 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 кюветах с сернистой водой по 20 мин в каждой, затем ополаскивают дистиллированной водой, высушивают и микроскопируют. Ядерное вещество окрашивается в фиолетовый цвет.

3.2.7. Окраска включений клеток микроорганизмов. Включения представляют собой вещества, возникающие в результате метаболизма клетки.

Окраска волютина (метахроматических гранул) методом Омелянского. Волютин – полифосфат, запасное фосфор- и азотсодержащее вещество, производное нуклеиновой кислоты. Характерное его свойство – сродство к основным красителям и метахромазия, т. е. способность приобретать иной цвет, чем цвет окрашивающего вещества.

Метод окраски основан на плохой растворимости волютина в растворах кислот. На обезжиренное стекло наносят тонкий мазок бактерий, сушат на воздухе, фиксируют над пламенем и окрашивают карболовым фуксином Циля. Через 0,5...1 мин промывают препарат

водой, обесцвечивают 20...30 с 1 %-м раствором H_2SO_4 , промывают, промокают фильтровальной бумагой, наносят масло и смотрят с иммерсионной системой. Видны гранулы волютина, окрашенные в красный цвет, на фоне синей цитоплазмы.

Можно окрашивать фиксированные препараты 10...30 с метиленовым синим Леффлера или 1 %-м раствором толудинового синего. Затем препарат промывают водой, промокают фильтровальной бумагой и смотрят. В первом случае (метиленовый синий) гранулы имеют цвет от синих до фиолетовых, во втором они красные на фоне голубой цитоплазмы.

Окраска гликогена. Гликоген – углевод, животный крахмал. 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 йодиде калия (7 г йода и 20 г йодида калия на 100...300 мл дистиллированной воды). Сверху помещают покровное стекло, избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Препарат просматривают с масляной иммерсией.

Включения гликогена хорошо исследовать в одно-двухсуточных культурах *Saccharomyces cerevisiae* и *Bacillus mycoides*.

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, накрывают покровным стеклом, удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой и просматривают с масляной иммерсией.

Объектом исследования может служить накопительная культура маслянокислых бактерий. Ее получают таким образом: за трое-четверо суток до занятий в пробирки помещают мелко нарезанный неочищенный картофель (1/3 пробирки), на кончике ножа вносят мел и доливают доверху водопроводной водой. Пробирки помещают на водяную баню и при 70 °C нагревают 10 мин, затем охлаждают и ставят в термостат при 30 °C.

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

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

На предметное стекло наносят небольшую каплю 40 %-го раствора формалина. Петлей вносят в нее культуру микроба. Формалин убивает клетку и разрывает оболочку. Через 5 мин в эту же каплю добавляют небольшую каплю метиленового синего, а спустя 10 мин каплю судана III – индикатора жироподобных веществ, растворимого в жире. Образовавшуюся общую каплю накрывают покровным стеклом, удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой и микроскопируют с им-

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

Объекты для исследования – старые культуры дрожжей, *Bacillus mycoïdes*, *B. megaterium*.

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

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

ГЛАВА 4

ПИТАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

4.1. ЗНАЧЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

Микроорганизмам для роста, развития и размножения необходимы питательные элементы. Синтетические возможности микроорганизмов и способы получения ими энергии весьма разнообразны. В связи с этим различны и требования микроорганизмов к источникам питания.

В состав клеток микроорганизмов входят органогенные (С, О, Н, N), зольные элементы (Р, S, К, Mg, Са, Fe) и микроэлементы, которые в малых дозах стимулируют рост клеточной массы, а в больших тормозят его. К ним относятся Zn, Mn, В, Cu, Мо, Со и др.

В сухом веществе клеток содержится, %: С – 50, N – 10–13, Н – 8, О – 20, P_2O_5 – 4, K_2O – 3, SO_3 – 1, MgO – 0,8, CaO – 1, Fe_2O_3 – 0,08, а также следы микроэлементов.

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), 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, %: сахара — 10,0; NH_4NO_3 — 0,3; KH_2PO_4 — 0,2; MgSO_4 — 0,05; Fe_2SO_4 — 0,01.

2. Та же среда без углерода. Исключена сахара. Для компенсации осмотической активности среды можно внести соответствующее по осмотическому эквиваленту количество хлорида натрия (NaCl), который не оказывает влияния на развитие гриба.

3. Та же среда без азота. Исключен NH_4NO_3 .

4. Та же среда без фосфора. Исключен KH_2PO_4 , он заменен другой солью, содержащей эквивалентное количество калия, например KCl . При замене одной соли другой катион замещается калием, анион — хлором; NaCl не оказывает влияния на развитие гриба.

5. Та же среда без калия. Исключен KH_2PO_4 , он заменен эквивалентным количеством NaH_2PO_4 .

6. Та же среда без серы. MgSO_4 и FeSO_4 заменены эквивалентными количествами MgCl_2 и FeCl_3 , закисную соль железа можно заменить окисной.

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

8. Та же среда без железа. FeSO_4 заменен эквивалентным количеством Na_2SO_4 .

9...11. Та же среда с добавлением микроэлементов. В одном варианте в состав среды вводят ZnSO_4 , в другом — MgSO_4 , в третьем — H_3BO_3 . Концентрация во всех трех случаях — 0,01 %.

Перед составлением питательных сред рассчитывают эквивалент — процентное содержание 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). Нужно было ввести в состав среды 0,2 % KH_2PO_4 .

Сначала определяют содержание (%) заданного калия в среде. Его вычисляют из пропорции:

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

Затем устанавливают эквивалентное количество HCl (U) по пропорции:

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

$$U \text{ — } 74$$

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

При постановке опыта для каждого варианта рассчитывают количество всех веществ в граммах на 30 мл среды. Поскольку *Aspergillus niger* – аэробный организм, то опыт ставят в колбах Эрленмейера объемом 75...100 мл.

Пример расчета. Необходимо создать раствор, концентрация NH_4NO_3 в котором составляет 0,3 %, следовательно, можно составить пропорцию:

$$\begin{array}{l} 100 \text{ мл воды} - 0,3 \text{ г соли} \\ 30 \text{ мл} - \text{---} x \end{array} \quad x = \frac{30 \cdot 0,3}{100} = 0,09 \text{ г.}$$

Соответствующее количество веществ на 30 мл среды набирают объемно: сахарозу из 20 %-го раствора, микроэлементы – из 1 %-го, а все остальные соли из 10 %-х растворов. Поскольку навеску NH_4NO_3 в 0,09 г набирают из 10 %-го раствора, надо определить, сколько миллилитров этого раствора следует взять, чтобы внести соответствующую навеску.

Составляем пропорцию:

$$\begin{array}{l} 100 \text{ мл } 10 \text{ \% -го раствора} - 10 \text{ г } \text{NH}_4\text{NO}_3 \\ y \text{ мл } 10 \text{ \% -го раствора} - 0,09 \text{ г } \text{NH}_4\text{NO}_3 \end{array}$$

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

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

Все необходимые соли и сахарозу вносят тщательно отмытыми пипетками. Сначала пипетки моют под струей водопроводной воды, затем ополаскивают дистиллированной водой. Объемы, составляющие целое число миллилитров, вносят градуированной пипеткой на 10 мл с делениями 0,1 мл, а десятые и сотые их доли – микропипеткой на 1 мл с делениями 0,01 мл.

Колбы со средой 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 препятствуют росту бактерий. Каждый вариант желательно ставить в двукратной повторности. Опытные колбы помещают в термостат при 28...30 °С.

Спустя семь суток анализируют опыт. Выросшую пленку в первом варианте берут за стандарт. Обычно в этом варианте рост гриба хороший (пленка мощная). С первым вариантом сравнивают все остальные. Оценку роста гриба дают по визуальным данным. Для более точной оценки в каждом варианте пленку гриба можно высушить при 105 °С до постоянной массы. Первый вариант принимают за 100 %.

На средах с исключением того или иного элемента, особенно при большой потребности в нем, грибок не растет или растет очень слабо. В

тех случаях, когда элемент требуется в очень небольших количествах (например, FeSO_4 – 0,1 %), исключение его мало сказывается на росте клеточной массы, так как гриб может использовать примеси этого элемента в реактивах. При полном удалении из питательной среды одного из необходимых элементов гриб развиваться не будет.

Материалы и оборудование. Культуры гриба *Aspergillus niger*, 20 %-й раствор сахарозы, 1 %-е растворы ZnSO_4 , H_3BO_3 , MnSO_4 и 10 %-е 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.

4.2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

4.2.1. Общие сведения. При составлении питательных сред необходимо учитывать потребность микроорганизмов в элементах питания. По составу среды подразделяют на две группы: естественные (натуральные) и синтетические.

Естественными обычно называют среды, которые состоят из продуктов животного или растительного происхождения и имеют сложный неопределенный химический состав. Их основа – различные части растений, животные ткани, солод, дрожжи, навоз, почва, вода морей, озер и минеральных источников. Большинство таких сред используют в виде экстрактов или настоев.

На естественных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, так как в них есть все компоненты, необходимые для роста и развития. Однако среды с неопределенным составом малопригодны для изучения физиологии обмена веществ микроорганизмов, поскольку не позволяют учесть потребление ряда компонентов среды, а также выяснить, какие вещества синтезируют микроорганизмы.

Указанные недостатки связаны с тем, что состав естественных сред очень сложен и непостоянен, существенно колеблется в зависимости от сырья и способа приготовления сред. Это заметно влияет на рост микроорганизмов. Естественные среды используют главным образом для поддержания культур микроорганизмов; накопления их биомассы и диагностических целей.

Синтетические среды – это такие, в состав которых входят в точно указанных концентрациях только известные химически чистые соединения. Данные среды по составу бывают простыми или с относительно сложным набором компонентов. Синтетические среды широко используют для исследований, связанных с изучением обмена веществ микроорганизмов.

Существуют так называемые полусинтетические среды, относящиеся к средам с неопределенным составом. В них наряду с соединениями известной химической природы входят вещества неопределенного состава. Например, в мясо-пептонную среду кроме сложного и неопределенного по химическому составу веществ (мясной бульон) иногда входят пептон, глюкоза или сахароза, поваренная соль, фосфат

калия; картофельные среды содержат глюкозу и пептон. Полусинтетические среды широко используют в микробиологической практике для получения витаминов, антибиотиков, аминокислот и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

С. Н. Виноградским в практику микробиологии введены элективные, или избирательные, среды, предназначенные для определенных групп микроорганизмов. Такие среды обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы родственных микроорганизмов и менее пригодны или совсем непригодны для развития других.

Зная физиологические особенности соответствующей группы микробов, можно подобрать такие условия культивирования (состав, активную кислотность среды, условия аэрации, температуру и др.), при которых будут развиваться лишь представители данной группы. Элективные среды позволяют вести биологические процессы в лаборатории и на производстве без предварительной стерилизации среды. Эти среды применяют главным образом для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания и получения накопительных культур. Понятие "элективные среды" входит в более широкое понятие "элективные условия".

Питательные среды могут быть различной консистенции: жидкие, плотные, полужидкие. Плотные питательные среды используют для учета количества бактерий, выделения чистой культуры и других целей. Такие среды готовят из жидких, добавляя 1,5...2,5 % агар-агара или 10...15 % желатины. При приготовлении полужидких сред вносят 0,1...0,2 % агар-агара.

Агар-агар – это растительный коллоид, получаемый из некоторых морских водорослей. В его состав входят главным образом полисахариды с ничтожным содержанием азотистых веществ. Желатина – кислый азотсодержащий продукт, добываемый при выварке костей и хрящей. Плотными питательными средами служат также гелевые пластины, введенные в микробиологическую практику С. Н. Виноградским (см. 7.2.1).

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

4.2.2. 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 °С, и оставляют настаиваться 12 ч при комнатной температуре или 1 ч при 50...55 °С. Мясо отжимают, экстракт процеживают через марлю со слоем ваты, кипятят 30 мин для свертывания коллоидных белков и фильтруют дважды (первый раз через марлю с ватой, второй – через бумажный фильтр). Фильтрат доливают водой до 1 л, разливают в колбы, закрывают ватными пробками и стерилизуют при 120 °С 20 мин (пробки колб закрывают сверху колпачками из бумаги). Ватные пробки должны

быть плотными, так как служат фильтрами, препятствующими проникновению бактерий из воздуха после стерилизации.

Мясной бульон может быть использован в любое время для приготовления соответствующих сред. Если их готовят сразу после получения бульона, то предварительная стерилизация излишня.

Нередко в лабораторных условиях мясной настой кипятят вместе с мясом, а затем мясо отжимают. Бульон также получается хорошего качества. Если желательно иметь мясной бульон особо высокой питательности, во время настаивания мяса с водой добавляют немного пепсина, а готовый бульон подкисляют соляной кислотой. Пепсин дополнительно гидролизует белковые соединения мяса, и количество усвояемых бактериями питательных веществ возрастает. Мясо можно заменить мясным экстрактом из расчета 5 г на 1 л среды.

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

Затем устанавливают нейтральную или слабощелочную реакцию среды, приливая 20 %-й раствор Na_2CO_3 до посинения влажной красной лакмусовой бумажки (фенолфталеин не показывает щелочную реакцию — при добавлении его к среде в фарфоровой чашке розовая окраска не появляется). Удобно использовать индикатор бромтимолблау, одну-две капли которого 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 осветляют бульон белком. В последнем случае свежий яичный белок взбивают с двойным по объему количеством воды и смешивают с охлажденным до 50 °С бульоном. Смесь кипятят на слабом огне 10 мин, помешивая, затем фильтруют. Прозрачный мясо-пептонный бульон разливают в пробирки, закрывают ватными пробками и стерилизуют при 120 °С 20 мин.

4.2.3. Мясо-пептонный агар (МПА). Добавляют к 1 л МПБ 15...20 г мелко нарезанного агар-агара. Среду нагревают до растворения агар-агара (температура плавления его 100 °С, застывания 40 °С), устанавливают слабощелочную реакцию среды 20 %-м раствором Na_2CO_3 и через воронки разливают в пробирки (приблизительно по 10 мл агар-агара столбиком для разлива в чашки Петри, по 5 мл — для получения скошенного, наклонного агара).

При разливе необходимо следить за тем, чтобы края пробирки были сухими, иначе пробки будут прилипать к стеклу. Пробирки со средой стерилизуют 20 мин в автоклаве при 120 °С.

4.2.4. Мясо-пептонная желатина (МПЖ). Вносят в 1 л-мясо-пептонного бульона 100...150 г желатины. Температура плавления желатины зависит от ее концентрации в среде: 10 %-я желатина плавится при

24 °С, 15 %-я – при 25 °С. В летнее время среды готовят, добавляя 15 % желатины.

После растворения желатины при осторожном нагревании устанавливают слабощелочную реакцию среды (как для МПБ и МПА), кипятят 5 мин, затем охлаждают до 40...50 °С. 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 три раза по 30 мин каждые 24 ч.

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

4.2.6. Пивное сусло. Зерна ячменя замачивают в холодной воде и проращивают при 35 °С. После того как ростки станут 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. Для лучшего выделения фермента амилазы смесь подогревают при 57 °С 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. Точное его содержание определяют по плотности раствора при помощи сахариметра. Сусло разбавляют водой до концентрации сахара 6...8 % и стерилизуют 30 мин при 115 °С и давлении 0,5 атм.

Готовое сусло можно получить на пивоваренном заводе.

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

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

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

* По системе СИ давление принято выражать в паскалях (Па): 1 атм = 1,01325 × 10⁵ Па ≈ 10² кПа.

Обезжиренное молоко разливают в стерильные пробирки и выдерживают 10 мин при 115 °С и давлении 0,5 атм. Перед стерилизацией кислотность обрат не должна превышать 22 °Т (см. с. 71), иначе молоко свернется. После стерилизации его выдерживают трое суток в термостате при 30 °С, чтобы спровоцировать развитие спорообразующих и других стойких к нагреванию форм. Через три дня пробирки с молоком просматривают и те из них, в которых развились микроорганизмы, выбраковывают.

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

4.2.9. 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 30 мин ежедневно в течение трех суток.

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 °С двое суток, доводят до pH 7,4, кипятят 30 мин, фильтруют через фумажный фильтр, разливают в посуду и стерилизуют 30 мин при 115 °С.

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

4.2.10. Бобовый отвар. Заливают 50 г фасоли (лучше белой) 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 водой до первоначального объема. Устанавливают слабощелочную реакцию среды, разливают в колбы и стерилизуют 30 мин в автоклаве при давлении пара 1,5 атм.

4.3. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

4.3.1. Прокаливание, или фламбирование. В микробиологии стерилизация, или обеспложивание (от лат. *sterilis* – бесплодный), вообще означает полное уничтожение зародышей микроорганизмов в питательных средах, посуде и пр. Известно несколько способов стерилизации.

Чаще всего применяют стерилизацию нагреванием. Так, прокаливанием стерилизуют непосредственно перед употреблением платиновые петли, иглы, шпатели, мелкие металлические предметы (ножницы, ланцеты, пинцеты), а также стеклянные палочки, предметные, покровные стекла и т. д.

4.3.2. Стерилизация сухим жаром. Применяют для обработки посуды и сухих материалов, например крахмала, мела, для чего нагревают их в

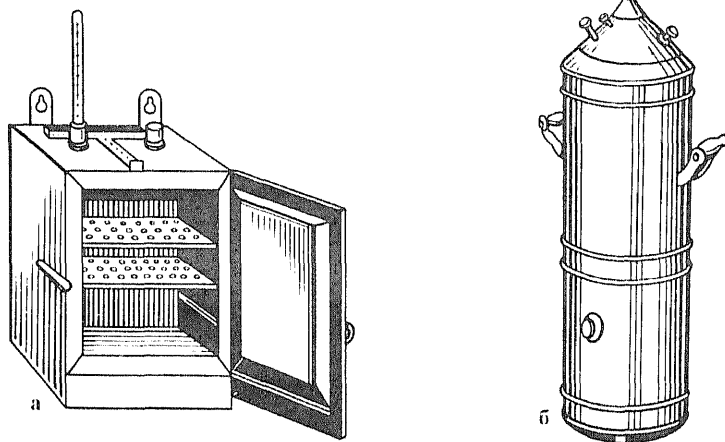
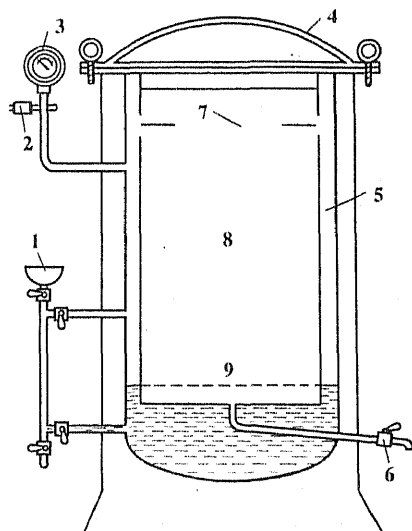


Рис. 6. Оборудование для стерилизации:

а – печь Пастера; б – кипятыльник Коха

Рис. 7. Схема автоклава:

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



течение 2 ч при 170 °С с того момента, как установлена необходимая температура, в печи Пастера (рис. 6,а) или в электросушильных шкафах с нагревом до 200 °С. Температура выше 170 °С не рекомендуется: 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 заворачивают в бумагу или помещают в особые футляры и пеналы, в которых стерильная посуда может храниться после стерилизации.

По окончании стерилизации шкаф открывают только после того, как температура в нем снизится до комнатной, иначе под действием холодного наружного воздуха стекло может лопнуть.

4.3.3. Стерилизация текущим паром. Текущим паром (100 °С) обрабатывают предметы, портящиеся от сухого жара, и некоторые питательные среды, не выдерживающее более высокой температуры (среды с углеводами, МПЖ, молоко). Данную стерилизацию выполняют в кипятильнике Коха (рис. 6,б) в течение трех дней по 30 мин ежедневно. Эту стерилизацию называют дробной.

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

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

4.3.4. Стерилизация насыщенным паром под давлением. Наиболее быстрый и надежный способ стерилизации, при котором гибнут самые устойчивые споры. Так стерилизуют большинство питательных сред, посуду. Обработку насыщенным паром выполняют в герметично закрывающемся толстостенном котле – автоклаве (рис. 7). На массивной крышке или сбоку котла есть кран для выхода пара, манометр и предохранительный клапан. Манометр показывает, на сколько давление пара внутри котла выше нормального атмосферного. Для предотвращения взрыва при превышении предельного давления предохранительный клапан устанавливают так, чтобы дать выход пару.

Показателям манометра в физических атмосферах соответствует определенная температура:

Давление, атм

0,5

1,0

1,5

2,0

Температура, °С

115

120

127

133

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

Стерилизацию ведут следующим образом. Наливают воду в автоклав, помещают в него стерилизуемые предметы, закручивают 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 на этом уровне 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.

Для контроля за работой автоклавов среди стерилизуемых предметов можно закладывать специальные тесты-ампулы, содержащие химические вещества, которые плавятся при определенной температуре. Например, у бензонафта температура плавления 110 °С, у антипина 113.

Автоклав используют и для дробной стерилизации текучим паром. В этом случае крышку не закручивают, чтобы дать свободный выход пару.

4.3.5. Пастеризация. Представляет собой неполную, или частичную, стерилизацию, что означает нагревание при 65...80 °С 30 мин с последующим быстрым охлаждением до 10...11 °С. Прием был предложен Л. Пастером.

4.3.6. Стерилизация фильтрованием через мелкопористые фильтры. Применяют для обработки сред, компоненты которых легко разлагаются при нагревании. 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 при помощи масляных насосов. Фильтр соединяют с приемником для жидкой среды, которым служит колба Бунзена. Оттянутый конец колбы закрывают ватной пробкой. Смонтированные фильтры с приемником стерилизуют.

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

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

Материалы и оборудование. МПБ, агар-агар, лакмус красный, фенолфталеин, бромтимолблау, фарфоровые пластинки с лунками или чашки, стеклянные палочки, 20 %-й Na_2CO_3 , пробирки в штативах (для разливки агара), воронки, вата, чашки Петри, пипетки Мора на 1 мл, бумага для обертывания чашек и пипеток, колбы на 250 мл, суровые нитки; для демонстрации ставят пептон, желатину, агар-агар.

ГЛАВА 5

УЧЕТ ЧИСЛЕННОСТИ И ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

5.1. МЕТОДЫ УЧЕТА ЧИСЛЕННОСТИ

5.1.1. Учет численности бактерий в почве методом питательных пластин (метод Коха). Почва – наиболее благоприятная среда для развития микроорганизмов. В связи с большой гетерогенностью состава для учета численности микроорганизмов почвы с исследуемого участка берут среднюю почвенную пробу (см. 9.1.1).

При определении численности бактерий сначала готовят суспензии (методом разведения), содержащие разные концентрации почвы в 1 мл. Для этого на стерильное часовое стекло стерильным фарфоровым шпателем или алюминиевой чайной ложкой берут из банки или мешка навеску почвы в 1 г. Часовое стекло, шпатель, ложку обжигают в пламени горелки или фламбируют горящим спиртом. Чтобы при взвешивании в почву не попали бактерии из воздуха, часовое стекло накрывают другим стерильным часовым стеклом.

Навеску почвы, соблюдая условия асептики, вносят в первую колбу на 250 мл с 99 мл стерильной воды. Смесь взбалтывают 5 мин осторожно, не смачивая пробку. Стерильной пипеткой берут 1 мл суспензии, содержащей (предположительно при условии равномерного перемешивания) 10^{-2} г почвы, и переносят в пробирку с 9 мл стерильной водопроводной воды. Пипетку неоднократно промывают водой в пробирке, чтобы максимально смыть клетки с ее стенок. Другой стерильной пипеткой берут из первой колбы еще 1 мл суспензии и помещают во вторую колбу, тоже содержащую 99 мл стерильной водопроводной воды. Пипетку промывают, как и в первом случае. Пробирку и вторую колбу взбалтывают 1 мин. В пробирке получают концентрацию клеток 10^{-3} г, во второй колбе – 10^{-4} г.

Аналогично новыми стерильными пипетками переносят по 1 мл суспензии из второй колбы во вторую пробирку с 9 мл и в третью колбу с 99 мл стерильной водопроводной воды и готовят новые суспензии, содержащие соответственно в 1 мл 10^{-5} и 10^{-6} г почвы.

Для определения численности бактерий в каждом разведении методом питательных пластин выполняют глубоинный или поверхностный посев. Последний сложнее и занимает больше времени. Для освое-

ния подсчета численности бактерий в почве методом питательных пластин можно ограничиться глубинным посевом, а поверхностный использовать при учете численности различных физиологических групп микроорганизмов на плотных средах (см. главу 10).

Для определения количества живых клеток, содержащихся в 1 мл суспензии каждого разведения, берут 1 мл суспензии из каждого разведения и переносят в стерильные чашки Петри, используя каждый раз новую стерильную пипетку (лучше пипетку Мора). На крышках чашек восковым карандашом отмечают почву и разведение. Затем в них вливают расплавленный МПА, заранее приготовленный и разлитый в пробирки на 20 мл (2/3 объема) из расчета одна пробирка на чашку.

Температура агар-агара должна быть примерно 45 °С. Ее устанавливают следующим образом: пробирку с расплавленным агар-агаром прикладывают к щеке, если щека выдерживает эту температуру, то массу можно вылить в чашку Петри. Осторожным круговым движением чашки, не смачивая крышку, агар-агар перемешивают с суспензией. Чашки с застывшим агар-агаром переворачивают вверх дном, чтобы избежать попадания на его поверхность конденсационной влаги с крышки, и помещают в термостат при 28...30 °С.

Клетки микроорганизмов, попав в питательную среду, начинают размножаться и образуют видимые невооруженным глазом колонии. Через 48 ч инкубации чашки вынимают из термостата и предварительно подсчитывают число колоний. Так как существуют медленнорастущие формы фактерий, окончательный подсчет делают на пятые сутки.

Количество клеток бактерий в 1 г сырой почвы устанавливают, умножая число колоний в чашке на степень разведения, т. е. число, показывающее, во сколько раз в каждом конкретном случае разбавили 1 г почвы. Во всех случаях, казалось бы, должно получиться примерно одинаковое число, однако практически это не совсем так.

Иногда клеток так много, что развившиеся колонии микроорганизмов сливаются, что часто наблюдается в чашках при разведении 10⁻². При высоких разведениях вырастают единичные колонии (меньше десяти), которые могут образоваться от случайно попавших клеток из воздуха, при внесении в чашку суспензии или питательной среды. Учет таких чашек сделает подсчет недостоверным. Для правильного определения численности клеток подсчитывают только такие чашки, в которых колоний свыше десяти и не более 250...300 (в последнем случае при условии, если колонии очень мелкие).

При подсчете колоний чашки просматривают в проходящем свете и, чтобы дважды не подсчитывать одни и те же колонии, отмечают подсчитанные чернилами или тушью. Чтобы не пропустить мелкоточечные колонии, чашки дополнительно просматривают под лупой. Можно использовать и специальный прибор для подсчета колоний.

Бывают случаи, когда в последнем разведении (10⁻⁶) число колоний значительно больше 300. Такой посев желательно повторить, увеличив число разведений. Если это невозможно, подсчет выполняют, учитывая,

что он даст представление лишь о минимальной численности микроорганизмов в почве.

Метод питательных пластин легко выполним, но имеет ряд недостатков, самый существенный из них — отсутствие универсальной среды, на которой развивались бы все бактериальные зародыши, обитающие в почве. Питание бактерий специфично, и на каждой среде выявляется довольно узкая физиологическая группа микроорганизмов. Так, на МПА развиваются в основном гнилостные бактерии, способные усваивать легкодоступные органические формы азота. Нитрифицирующие, целлюлозоразрушающие, азотфиксирующие и другие микроорганизмы на такой среде не развиваются.

Для более полного представления о населенности почвы делают посевы на специальные избирательные среды или используют метод прямого подсчета микроорганизмов под микроскопом.

Второй недостаток метода — возможность неполного учета клеток в образце в связи с тем, что в одном месте на агар-агаре может застыть не одна, а несколько клеток. Образованные ими колонии сольются, создавая впечатление одной колонии. Однако для данных колоний часто характерен неоднородный характер роста. В таком случае можно внести поправку при подсчете, для чего из колоний с неоднородным ростом готовят окрашенный препарат. Если под микроскопом обнаруживаются разные формы клеток, например кокки, палочки, сарцины, то вносят поправку и колонию считают не за одну, а за три. Если все формы одинаковые, то считают, что она произошла от одной клетки, хотя в указанном месте одинаковых клеток могло быть пять, десять и более.

Для сравнения количества бактерий в разных почвах подсчитывают их число на 1 г абсолютно сухой почвы. С этой целью одновременно со взятием навески почвы для приготовления разведений в отдельный бюкс (металлический или стеклянный), высушенный до постоянной массы, берут навеску (5...10 г) для определения влажности почвы. Сушат почву при 105 °С до постоянной массы. Число клеток микроорганизмов в 1 г сырой почвы определяют по разности между массами сырой и сухой почвы, разделенной на массу навески и умноженной на 100. Затем число клеток в 1 г сырой почвы делят на массу абсолютно сухой почвы, содержащейся в 1 г сырой почвы.

Пример расчета. 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:

$$\frac{0,7 \text{ г} - 5600}{1 \text{ г} - x} = \frac{5600}{0,7} = 8000.$$

Таким образом, в 1 г абсолютно сухой почвы содержится 8000 живых клеток.

5.1.2. Учет численности микроорганизмов в воде и других жидкостях. Число микроорганизмов в воде, навозной жиже, огуречном рассоле и других жидких средах можно определять различными методами.

Если исследование ведут, пользуясь методом питательных пластин, то сначала воду и другие жидкости 3 мин хорошо взбалтывают. Берут стерильной пипеткой 1 мл жидкости и вносят в 99 мл стерильной водопроводной воды. Параллельно другой стерильной пипеткой берут 10 мл исследуемой жидкости и вносят в 90 мл воды. Затем 5 мин взбалтывают, готовят методом разведения разные концентрации жидкости и определяют число бактерий в 1 мл.

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

При прохождении воздуха через воду бактерии остаются в ней. Численность микроорганизмов затем определяют так же, как и в воде: после приготовления соответствующих разведений методом питательных пластин или последующей фильтрацией через мембранные фильтры. Зная объем воздуха, прошедшего через воду, делают пересчет на 1 м³ воздуха.

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

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

Пример расчета. В чашке Петри диаметром 10 см выросло 45 колоний. Площадь чашки (πr²) составит 3,14 · 5² = 78,5 см². Чтобы подсчитать число клеток на 100 см² (равнозначных 10 л, или 0,01 м³ воздуха), составляют пропорцию:

$$\frac{78,5 \text{ см}^2 - 45}{100 \text{ см}^2 - X} \quad X = \frac{100 \cdot 45}{78,5} = 57.$$

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

Чашки Петри с агар-агаром в исследуемых помещениях лучше размещать по две или три. После подсчета в них микроорганизмов выводят среднее арифметическое.

Для определения качественного состава микроорганизмов колонии на чашках группируют по культуральным признакам, из каждой группы готовят препараты и микроскопируют (см. 6.1.3). По морфологическим и культуральным признакам устанавливают род, а в отдельных случаях и вид бактерий.

Если чашки выставляют в разных помещениях в одно и то же время, то по результатам анализа можно судить об относительной чистоте воздуха каждого помещения. Чем больше пыли в воздухе, тем больше в нем микроорганизмов. По данным А. Ф. Войткевича, в Арктике при 70° с. ш. в 1 м³ воздуха содержится от одной до десяти клеток. Морской воздух в таком же объеме содержит одну-две клетки, воздух городского парка – 200, улицы в городе – 5000, жилого помещения – 20 000, скотного двора – 1...2 млн.

5.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ

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

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

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

Чистую культуру из накопительной получают из одной клетки или отдельной колонии. В последнем случае из накопительной культуры после разведения делают высев на плотную среду по методу Коха. Каждую образовавшуюся колонию считают развившейся из одной клетки.

Для выделения чистых культур аэробных бактерий делают высев на чашки Петри из накопительной культуры. Ее каплю (лучше из соответствующего разведения) наносят и осторожно размазывают стерильным стеклянным шпателем по поверхности плотной среды, после чего этим же шпателем протирают последующих трех-четырёх чашек. Чашки выдерживают от двух до семи суток, так как скорость роста различных микроорганизмов неодинакова. Выросшие изолированные колонии отсевают петлей в пробирки на поверхность скошенной плотной среды или в жидкую среду.

Высев из накопительной культуры микроорганизмов, относящихся к

факультативным аэробам или факультативным анаэробам, для получения изолированных колоний делают методом глубинного посева в пробирки со столбиком стерильного агара. Стерильной иглой берут чистую культуру из колоний, одновременно вынимают пробку, обжигают края пробирки, держа ее вверх дном, и иглой над горелкой делают прокол до дна. Выделение чистой культуры анаэробных бактерий по методу Коха возможно только при ограничении доступа кислорода.

Материалы и оборудование. Свежие почвенные пробы в стеклянных банках, проба навоза и навозной жижи, пробы воды, часовые стекла, ложки алюминиевые чайные или шпатели, пинцеты, весы, разновесы, стеклянные или металлические бюксы, колбы на 250 мл с 99 мл стерильной водопроводной воды, пробирки с 9 мл стерильной водопроводной воды, прибор для взбалтывания почвенной суспензии, стерильные пипетки Мора на 1 мл, пробирки со столбиком МПА (2/3 объема), стерильные чашки Петри, восковые карандаши, водяная баня, бумажные этикетки. Чашки Петри с посевом, лупы, счетная камера Вольфюгеля, микроскопы, иглы, пробирки со скошенным МПА, восковые карандаши и все необходимое для микроскопирования.

ГЛАВА 6

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

6.1. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ МИКРООРГАНИЗМОВ

6.1.1. Морфологические признаки. При определении вида бактерий и актиномицетов учитывают морфологические, культуральные и физиолого-биохимические признаки, а у последних также и химический состав клеточной стенки. К морфологическим признакам относят форму бактерий (шаровидные, палочковидные и извитые). У палочковидных отмечают форму концов клеток (они могут быть вогнутые, закругленные или усеченные).

Клетки могут быть одиночные, соединенные попарно, в цепочки или в виде пакетов.

Морфологическими признаками микроорганизмов служат: размеры клеток в микрометрах (поперечное сечение, длина палочки, диаметр шаровидных форм); способность к спорообразованию и расположение в клетках спор (бациллярное, клостридиальное и плектридиальное); наличие капсул и клеточные включения; способность к движению и тип жгутикования (один жгутик – монотрих, пучок жгутиков на одном конце – лофотрих, по всей поверхности клетки – перитрих). Чаще жгутики бывают у палочковидных бактерий, реже – у кокков, коринеподобных бактерий, в единичных случаях – у актиномицетов. Важный морфологический признак – окраска по Граму и кислотоустойчивость.

К морфологическим признакам актиномицетов относят тенденцию этих микроорганизмов к образованию ветвящихся гиф, в некоторых семействах развивается и мицелий. Гифы могут быть очень короткими или хорошо развитыми, диаметр их варьирует в пределах 0,5...2 мкм,

обычно менее 1 мкм. Гифы можно наблюдать не всегда, так как в отдельных семействах они легко фрагментируются. Иногда фрагментация гиф ведет к образованию кокковидных, удлинённых или дифтероидных элементов.

Для некоторых семейств актиномицетов характерно формирование истинных спор на воздушных или субстратных гифах. Споры могут располагаться по одной на гифе, парами или цепочками из разного числа клеток. При большом числе споры складываются в цепочки: прямые, в виде петли или спиральные. Такие цепочки могут возникнуть на гифе по одной или в виде мутовок. В одном и том же семействе споры в спорангии отдельных видов микроорганизмов бывают подвижными или неподвижными в зависимости от рода.

Актиномицеты — грамположительные микроорганизмы, хотя с возрастом культуры окраска по Граму может меняться. Среди актиномицетов есть кислото- и спиртоустойчивые, иногда слабокислотоустойчивые виды. Почти все представители группы актиномицетов аэробы, за исключением некоторых родов, включающих виды анаэробных или факультативно-анаэробных микроорганизмов.

6.1.2. Культуральные признаки. Характер роста культуры на МПБ и других жидких средах или колоний на МПА в других плотных средах (сусло-агар, агаризованная синтетическая среда) — важные систематические признаки микроорганизмов. В первом случае отмечают: характер развития пленки (тонкая, сухая, складчатая, слизистая) и ее цвет; наличие мути (слабая, умеренная, сильная); присутствие, характер осадка (обильный, плотный, хлопьевидный) и его цвет.

Культуральные признаки на плотных средах в чашках Петри следующие: форма колонии (рис. 8), профиль колоний (рис. 9), край колонии (гладкий, волнистый, зубчатый, лопастный, реснитчатый, ворсистый, ветвистый); ее поверхность (гладкая, шероховатая, складчатая, бугристая); размеры (диаметром 10 мм и более — крупная, от 1 до 10 — средней величины, не превышает 1 мм — точечная); оптические свойства (прозрачная, просвечивающая, непрозрачная, блестящая, матовая, флуоресцирующая); цвет (грязно-белый, белый, желтый, оранжевый, сиреневый, синий, красный, черный и т. д.); структура колонии (однородная, мелко- или крупнозернистая, пленчатая, врастающая в агар-агар, легко снимающаяся иглой с агар-агара); консистенция (маслянистая, тестообразная, слизистая, сухая, плотная, врастающая в агар).

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

При изучении культуральных признаков актиномицетов обращают особое внимание на пигмент и обусловленную им окраску воздушного мицелия и среды. Обычно пользуются специальными пособиями (шкала цветов Бондарцева и другие для определения цвета). Значение имеют консистенция колонии (плотная, кожистая, врастающая в агар, рыхлая), мицелиальный ободок, поверхность колонии (мучнистая, бархатистая) и ее запах (землистый, эфирный, фруктовый и т. д.).

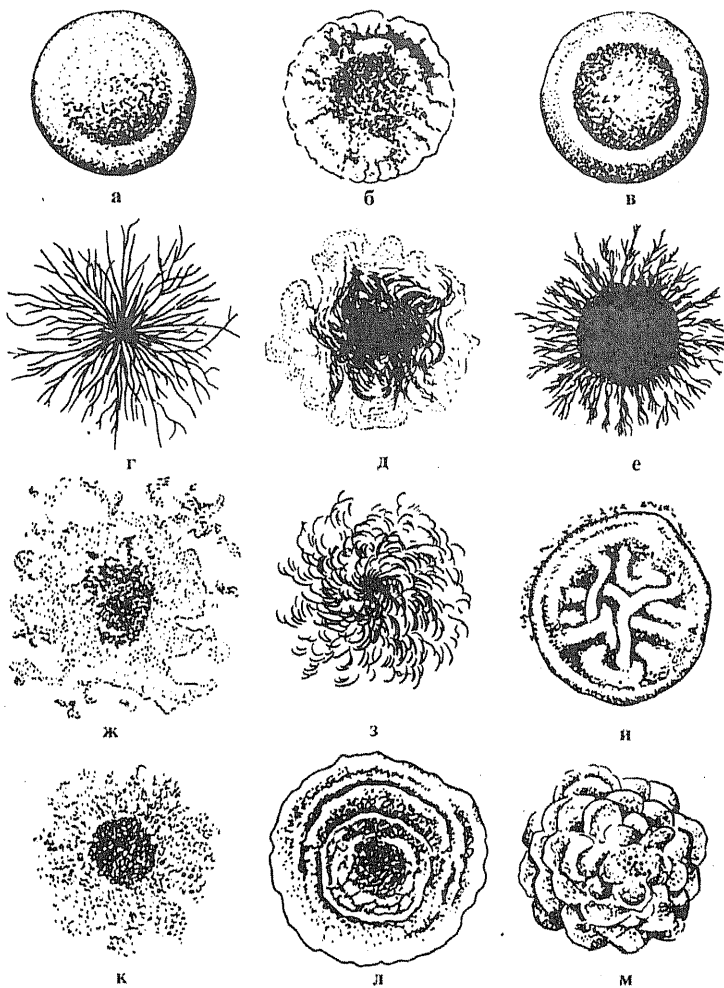


Рис. 8. Форма колоний:

а – круглая; б – круглая с фестончатым краем; в – круглая с валиком по краям; г, д – ризоидные; е – круглая с ризоидным краем; ж – амёбовидная; з – нитевидная; и – складчатая; к – неправильная; л – концентрическая; м – сложная

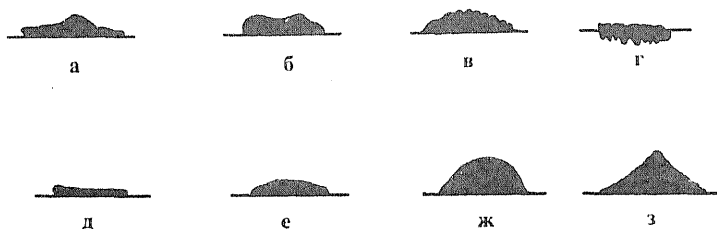


Рис. 9. Профиль колоний:

а — изогнутый; б — кратероидный; в — бугристый; г — растущий в агар-агар; д — плоский; е — выпуклый; ж — каплевидный; з — конусовидный

6.1.3. Определение качественного состава микроорганизмов по культуральным и морфологическим признакам. Из каждой группы колоний, выросших на плотных средах, готовят препарат и определяют по форме клеток, к какому роду микроорганизмов они относятся. Из общего числа микроорганизмов, развивающихся на МПА, можно выделить следующие роды: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Mycobacterium*, *Actinomyces*.

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

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

Клетки *Pseudomonas* прямые или изогнутые, часто с заостренными концами, но не спиральные. Они располагаются одиночно, парами или короткими цепочками. Размеры клеток $0,5...1 \times 1,5...4$ мкм. Двигаются эти организмы при помощи жгутиков (монотрихи или лофотрихи), не образуют чехлов; для них неизвестны стадии покоя. Чаще всего это аэробы, но отдельные виды в анаэробных условиях способны использовать для дыхания кислород нитратов. Клетки грамотрицательные.

Род *Flavobacterium*. На МПА дают колонии диаметром 2...3 мм, чаще гладкие, матовые, прозрачные, желтого цвета за счет каротиноидных пигментов, не диффундирующих в среду, встречаются желтовато-оранжевые колонии, иногда и красные.

Клетки палочковидной формы ($0,25...0,3 \times 4$ мкм), слегка искривленные, большинство их неподвижны (подвижны только перитрихи). Расположены флавобактерии одиночно, парами и в виде коротких цепочек,

иногда в виде нити. Характерен защелкивающийся тип деления, или снэппинг-тип обособления делящихся клеток. Эндоспор виды рода не образуют. Грамотрицательные.

Род *Micrococcus*. На МПА, как правило, дают колонии мелких и средних размеров (диаметр 2...4 мм). Колонии могут быть: матовые, блестящие, маслянистые; гладкие, выпуклые, плоские; зернистые, мелкоскладчатые, пастообразной или слизистой консистенции, иногда встречаются сухие плотные; цвет колоний может быть белый, серый, реже они бесцветные; встречаются буроватые, желтовато-зеленые, розовые и красные. Пигменты в среду не диффундируют. Клетки мелкие (диаметр 0,2...1,5 мкм), одиночные и соединенные в пары, в ряд или бесформенные скопления. Клетки неподвижные, не образуют эндоспор. Грамположительные.

Род *Sarcina*. Колонии средних размеров; круглые, компактные, выпуклые, плоские, гладкие, бугристые или складчатые, зернистой структуры; матовые или жирно-блестящие; белые, желтые, лимонно-желтые, иногда розовые, красные. Клетки сферические (диаметр 1,8...3 мкм) соединены в пакеты из восьми или более клеток.

Род *Mycobacterium*. Относится к группе актиномицетов. На МПА микобактерии растут медленно. Вначале образуют мелкие, круглые компактные колонии, иногда приподнятые, мягкие, пастообразной или слизистой консистенции (растекающиеся по субстрату), бывают сухие крошащиеся; бугристые складчатые; матовые, блестящие, бесцветные или окрашенные (красные, оранжевые, желтые, зеленые, синие, бурые, черные). Пигмент в среду не выделяют. Молодые клетки ветвистые или угловатые с неправильными контурами (3,0...7,0 × 0,7 мкм); с возрастом у большинства видов клетки распадаются на кокковидные и овальные образования. Обособление делящихся клеток происходит по снэппинг-типу. Большинство видов грамположительные.

Род *Bacillus*. Палочковидные бактерии, способные образовывать более или менее термоустойчивые споры. Во время формирования споры сохраняется палочковидная форма клетки или наблюдается небольшое ее утолщение. По характеру роста колоний на МПА (или МПА + сусло-агар) можно иногда определить видовую принадлежность бактерий. Клетки грамположительные. Аэробные.

B. megaterium – колонии гладкие, белые, выпуклые, жирно-блестящие, редко складчатые (рис. 10, а); края колонии резко очерчены или волнисто-бахромчатые. Споры овальные или цилиндрические, не шире материнской клетки, в поперечнике достигают 2 мкм. Длина клеток 5...7 мкм и более (рис. 10, б).

B. subtilis – сенная палочка. Колонии сухие мелкоморщинистые, бархатистые, бесцветные или розовые, срастающиеся с агар-агаром; край колоний волнистый или слегка волнистый (рис. 11, а). Палочки короткие тонкие – 3...5 × 0,9 мкм (рис. 11, б). Споры овальные (0,9 × 0,6 мкм), расположены не строго центрально, но на некоторых средах ближе к центру. Клетки подвижные (перитрихи).

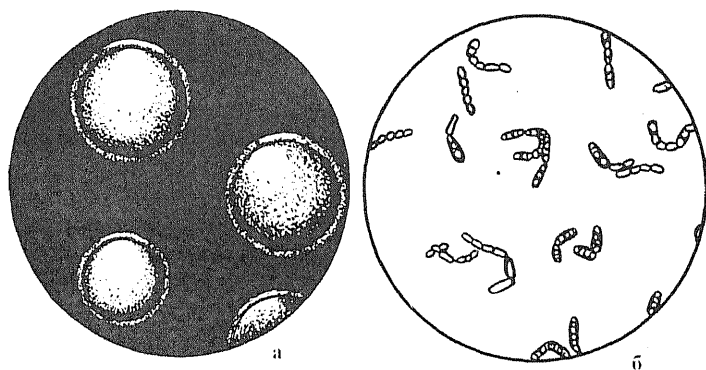


Рис. 10. *Bacillus megaterium*:

а – колонии; б – клетки двухсуточной культуры на МПА

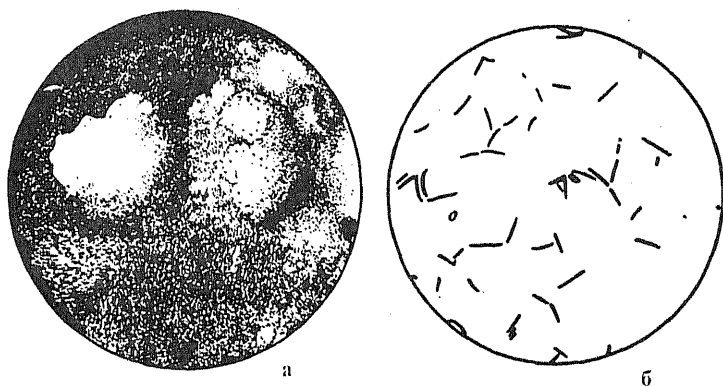


Рис. 11. *Bacillus subtilis*:

а – колонии и б – клетки суточной культуры на МПА

B. mesentericus – картофельная палочка. Колонии на МПА тонкие, сухие, морщинистые, серовато-белые, не срастаются с субстратом (рис. 12,а). Палочки тонкие, длинные и короткие, подвижные ($3...10 \times 0,5...0,6$ мкм), иногда соединены в длинные нити (рис. 12,б). Споры овальные и продолговатые ($0,9...0,5$ мкм). При формировании спор клетки не теряют палочковидной формы. Прорастание спор экваториальное.

B. mycoides – грибовидная палочка. Образует характерные колонии: плоские, ризоидные или мицелиевидные, стелющиеся по поверхности

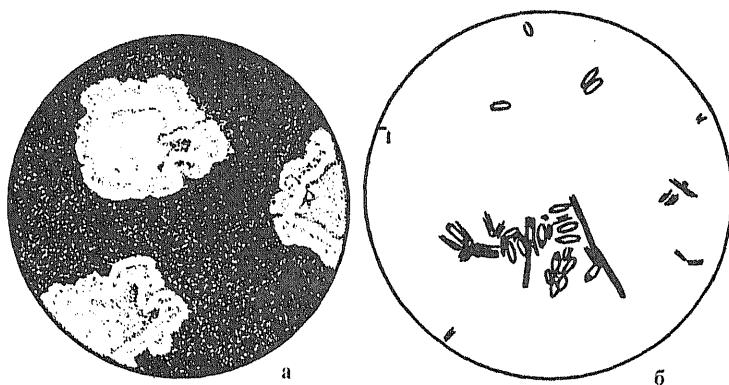


Рис. 12. *Bacillus mesentericus*:

а – колонии и б – клетки суточной культуры на МПА

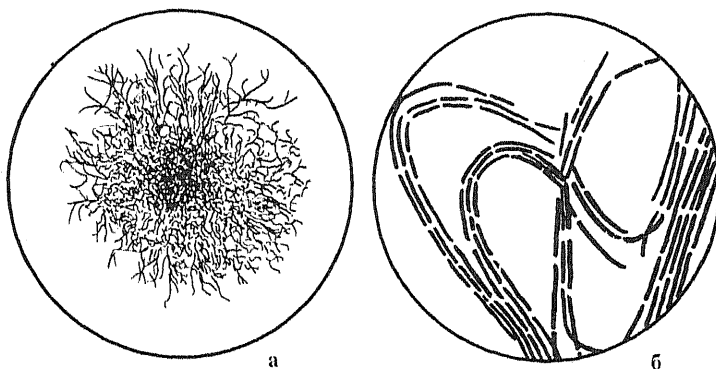


Рис. 13. *Bacillus mycoides*:

а – колонии и б – клетки трехсуточной культуры на МПА

агар-агара (рис. 13,а). Пучки нитей отходят от края колонии, создавая иллюзию ветвления; нити изгибаются направо или налево, образуя право- или левовращающиеся формы колоний. Диаметр клеток 0,8... 1,2 мкм, длина в зависимости от среды 5...7, часто 10 мкм и более (рис. 13, б). Цитоплазма вакуолизирована, с гранулами запасных питательных веществ. Клетки подвижны (перитрихи). Вид имеет много вариантов.

B. cereus – колонии толстые, компактные, матовые со складчатым центром и ризоидными волнистыми краями; иногда мелкобугристые, с бахромчатыми краями, от которых отходят тонкие сплетения нитей.

Клетки толстые, диаметром 1...1,5 мкм, длиной 3...5, иногда более; одиночные или соединены в цепочки, нити. Споры овальные (1,2...1,5×0,9 мкм), расположены субтерминально, прорастают полярно.

B. idosus — колонии сухие, матовые, плоские, мелкоморщинистые, целиком снимающиеся с поверхности агар-агара. Клетки — тонкие прямые палочки (2...3×0,6 мкм), подвижные. Споры овальные, несколько толще материнских клеток, вследствие чего последние раздуваются при спорообразовании. Чаще споры образуются в центральной части клеток.

B. agglomeratus — колонии на МПА мелкие, белые, плоские, слизистые. Клетки палочковидные (3...6×0,4...0,5 мкм), одиночные или в парах, иногда соединены в короткие цепочки; подвижные (перитрихи). Споры овальные, диаметром 0,5 мкм, расположены эксцентральны.

B. virgulus — колонии на агаризованных средах мелкозернистые или волнистые с бахромчатыми краями. Микроорганизм образует длинные нити с частыми перегородками, распадающиеся на отдельные клетки разной длины (4...10×0,7...0,8 мкм). Споры овальные, в поперечнике более диаметра клетки, поэтому при их формировании клетки раздуваются, принимают веретенообразную или булавовидную форму. Условный анаэроб.

B. brevis — колонии белые, иногда с желтоватым оттенком, гладкие, выпуклые или плоские блестящие с зубчатым краем, лучше развиваются на синтетических средах. Клетки (3...5×0,7...1 мкм) подвижные (перитрихи), реже соединены в цепочки. Споры овальные, диаметром 0,8...1 мкм, расположены на концах клеток, раздувают их оболочки. Бывают грамположительными и грамотрицательными.

B. polymyxa — колонии бесцветные плоские или вогнутые, гладкие и слизистые, иногда края имеют пальчатые выросты. Рост колоний на средах умеренный или хороший. Клетки (2,0...7,0×1,0...1,7 мкм) одиночные, парные или в коротких цепочках; подвижные. Споры овальные, продолговатые (2,6×1,7 мкм), расположены в центре. При спорообразовании клетки раздуваются кlostридиально или лимоновидно. Факультативный аэроб.

B. asterosporus — колонии мелкие белые или сероватые с зеленоватым отливом плоские, нежные, слизистые, гомогенные. Клетки — толстые палочки (3...7×1,0×1,2 мкм), одиночные или в парах, подвижные. Споры цилиндрические или продолговатые (1,5...2,0×1,0 мкм), расположены в центральной части клеток, последние при спорообразовании принимают кlostридиальную форму.

B. simplex — колонии гладкие, жирно-блестящие, иногда слизистые; выпуклые, рост хороший. В старых культурах отдельные штаммы приобретают желтовато-бурую окраску. Клетки мелкие (2,5×0,6 мкм), обычно одиночные, цепочки не образуют. Споры овальные (0,9×0,6 мкм), расположены субтерминально; встречаются в почве.

Род *Actinomyces* — лучистые грибы. Образуют плотные кожистые колонии различной структуры (гладкие, бугристые, складчатые,

бородавчатые с мучнистым налетом), они могут быть разных оттенков, срastaются с субстратом и состоят из несептированных ветвящихся нитей.

6.2. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ МИКРООРГАНИЗМОВ

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

Среди биохимических свойств культуры особенно важно определение ее ферментативной активности. Активность протеаз устанавливают: во-первых, по разжижению желатины, учитывая скорость и характер разжижения при уколе столбика желатины (рис. 14); во-вторых, по свертыванию и пептонизации молока, т. е. отмечают кислотность по покраснению синей лакмусовой бумаги, образование устойчивого сгустка и коагуляцию с последующей пептонизацией, пептонизацию без предварительного свертывания, а также скорость происходящих изменений.

Активность амилазы определяют по величине зоны гидролиза крахмала, для этого делают пробы с раствором Люголя на третьи-четвертые сутки после посева культуры на крахмалоаммиачном агар-агаре. Активность целлюлазы устанавливают по степени распада целлюлозы на среде Гетчинсона; активность β -фруктофуранозидазы (инвертазы) — по гидролизу сахарозы при действии реактива Фелинга (щелочной раствор оксида меди), который окисляет альдегидные соединения, при этом оксид меди переходит в закись — появляется красный осадок. Активность уреазы определяют по накоплению аммиака, используя реактив Несслера; нитратредуктазы — по восстановлению нитрата на среде Гильята до нитрита (нитрит устанавливают в кислой среде реактивом цинк-йод-крахмал).

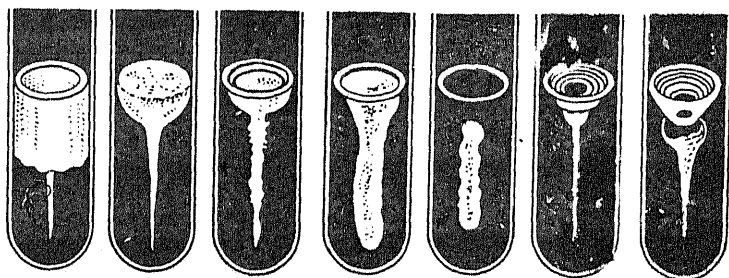


Рис. 14. Типы разжижения желатины

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

6.2.2. Отношение к источникам углерода и азота. Чтобы установить доступные источники углерода, готовят основную синтетическую среду, содержащую, г на 1 л дистиллированной воды: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 - 3,0$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 2,0$; $\text{NaCl} - 0,5$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,3$; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,1$; $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O} - 0,01$. Кроме того, в среду входит смесь микроэлементов по М. В. Федорову – 1 мл, которая содержит, г на 1 л дистиллированной воды: $\text{H}_3\text{BO}_3 - 5$; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 - 5$; $\text{KCl} - 0,5$; $\text{NaBr} - 0,52$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,2$; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 - 0,3$.

К готовой минеральной среде добавляют 1 % источника углерода. Обычно испытываемые пентозы (арабиноза, ксилоза), гексозы (глюкоза, левулеза, галактоза) стерилизуют при 100°C в кипятильнике Коха; дисахариды (сахароза, мальтоза, лактоза), полисахариды (декстрин, крахмал, клетчатка), соли органических кислот (муравьиная, уксусная, масляная, янтарная, щавелевоуксусная, яблочная, винная, лимонная, пировиноградная, глюконовая, салициловая, бензойная, протокатеховая), спирты (этиловый, глицерин, эритрит, маннит, дульцит), жиры и углеводы стерилизуют 30 мин в автоклавах при 1 атм.

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

6.2.3. Изучение продуктов жизнедеятельности. При использовании микроорганизмами источников углерода, в частности углеводов, продуктами их жизнедеятельности нередко бывают газы, кислоты и спирты. Для обнаружения газов применяют посев уколом в агаровую среду в пробирки. При появлении газов столбик агар-агара разрывается. Используют также жидкую среду с перевернутыми вверх дном поплавками. Поплавок представляет собой небольшую узкую пробирку ($0,5 \times 3 \dots 4$ 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, а их количество – по титрованию 0,1 н. раствором щелочи. При наличии мела кислоты связываются в кальциевые соли, которые можно обнаружить добавлением к 5 мл среды 1 мл концентрированного раствора оксалата аммония. В присутствии кислот (например, уксусной) выпадает белый осадок, не растворимый в воде.

Образование спирта определяют при отгоне части субстрата с последующей пробой на спирт (реакция на появление йодоформа).

Продуктами жизнедеятельности микроорганизмов на доступных источниках азота часто бывают: аммиак (проба с реактивом Несслера), сероводород и меркаптан (проба с фильтровальной бумагой, смоченной уксусом свинца), индол (проба с азотистой кислотой), нитрит (проба с цинк-йод-крахмалом в кислой среде). Редуктазную способность культур выявляют обесцвечиванием метиленового синего.

6.2.4. Отношение к кислотам и щелочам. Для выявления отношения микроорганизмов к кислотности питательной среды добавляют буферные смеси, поддерживающие соответствующую реакцию среды (рН 3,6...4 – цитратно-фосфатный буфер; 4,5...9,2 – фосфатный; выше 9 – буферные смеси Na_2CO_3 и HCl в различных соотношениях, а также NaOH и K_2HPO_4). После восьми–десяти дней инкубации при 28...30 °С по росту клеточной массы устанавливают предельные значения кислотности среды, при которых еще возможно развитие бактерий. Рост клеточной массы можно определить по оптической плотности на ФЭК.

6.2.5. Отношение к кислороду. Об отношении микроорганизмов к кислороду судят по росту культуры при посеве уколом в пробирку с агаровой или желатиновой средой (см. 5.2). Аэробы развиваются в верхней части укола – рост в виде гвоздя; факультативные анаэробы – равномерно по всему уколу; анаэробы – в нижней его части.

6.2.6. Устойчивость к факторам внешней среды. Для определения устойчивости микроорганизмов к высоким концентрациям солей выращивают культуру 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 °С 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, как и в первом случае, выявляют оптимальные, минимальные и максимальные температуры. Аналогично, создавая соответствующие условия, обнаруживают влияние других факторов внешней среды на развитие микроорганизмов.

6.2.7. Отношение к антибиотикам и лизоциму. Отношение микроорганизмов к антибиотикам можно выявить на агаровых пластинах методами агаровых блоков или штриха. В чашках Петри на агаровую питательную пластину, густо заселенную тест-организмом, помещают агаровые блоки с антибиотиками. Для получения блоков с этими веществами на поверхность питательной среды, предназначенной для выращивания продуцента антибиотика, высевают сплошным "газоном" соответствующую культуру.

После того как микроорганизмы разовьются и образуют антибиотические вещества, диффундирующие в толщу агара (бактерии – на четвертые-пятые сутки, грибы – на шестые-восьмые; актиномицеты – на восьмые-десятые), стерильным пробочным сверлом вырезают

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

При использовании метода штриха на питательном агаре по диаметру чашек Петри высевают культуру продуцента антибиотика. К выросшему организму вплотную подсевают перпендикулярно штрихи тест-культуры. Нечувствительные к антибиотику тест-культуры развиваются от самого края штриха продуцента. Чем чувствительнее тест-организм к антибиотику, тем дальше от штриха он развивается. Важный признак продуцента антибиотиков — специфика антагонизма и антимикробный спектр.

Лизоцимы — это белки-ферменты, широко распространенные в мире животных, особенно в слюне и слезах. При концентрации 1 мкг/мл они гидролизуют хитин и его производные, разрушают клеточные оболочки микроорганизмов, особенно эффективно действуют на грамположительные бактерии — *Bacillus megaterium*, *Sarcina lutea*, *S. flava* и др.

Материалы и оборудование. Чистые культуры бактерий на МПА, пробирки со столбиками мясо-пептонной желатины (МПЖ), пробирки с жидкой средой (МПБ) с разными концентрациями NaCl, стерильные пипетки Мора на 1 мл, бактериологические иглы, чашки Петри с пластинами МПА, шпатели Дригальского, агаровые блоки с антибиотиками актиномицета.

ГЛАВА 7

ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ БЕЗАЗОТИСТЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

7.1. БРОЖЕНИЕ

7.1.1. Общие сведения. Микроорганизмы в основном получают энергию при высвобождении ее из безазотистых органических веществ. Только небольшая группа микроорганизмов может использовать солнечную энергию или энергию окисления минеральных соединений. В зависимости от того, каким путем идет разложение органических веществ, различают брожение, при котором высвобождение энергии происходит без доступа свободного кислорода, и дыхание, или окисление, когда выделение энергии происходит в аэробных условиях. В последнем случае энергия высвобождается полностью и выделяются конечные продукты окисления — CO_2 и H_2O .

Брожение сопровождается частичным высвобождением энергии, связанной в органических веществах. Поэтому среди конечных продуктов этого процесса всегда находятся не полностью окислившиеся вещества, содержащие запасы химической энергии, — спирт, молочная кислота и др. В зависимости от основного продукта, образующегося в ходе брожения, процессы получили соответствующие названия: спиртовое брожение, молочнокислое, маслянокислое и др.

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

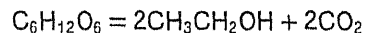
При изучении процессов, вызываемых микроорганизмами, удобно пользоваться методом элективных культур, разработанным С. Н. Виноградским (см. 4.2.1).

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

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

Дрожжи обычно размножаются бесполым путем: почкованием (*Saccharomyces* и др.), реже делением (*Schizosaccharomyces*), но могут образовывать и споры. Последние могут формироваться без предварительного слияния двух клеток или после полового процесса, т. е. после слияния содержимого двух клеток. В первом случае сумки со спорами возникают непосредственно из вегетативных клеток, во втором — из образовавшейся зиготы развивается сумка, в которой формируется от одной до 12 спор, чаще одна-четыре. Однако образование спор у дрожжей наблюдается редко. Их появлению способствуют резкий переход культуры с богатого питательного субстрата на бедный и хорошая аэрация.

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



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

Спиртовое брожение лежит в основе винокурения, виноделия, пивоварения. В хлебопекарной промышленности дрожжи выполняют роль биологическихрыхлителей теста, так как при брожении и дыхании образуется CO₂, благодаря чему увеличиваются объем теста при выпечке и пористость хлеба. Большинство видов культурных дрожжей, используемых в бродильных производствах, принадлежит к роду *Saccharomyces*.

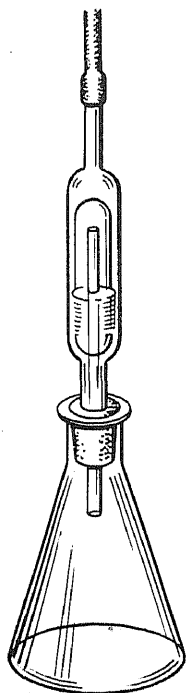


Рис. 15. Колба с затвором Мейссля для изучения спиртового брожения

В пивоварении главное внимание обращают на полноту сбраживания мальтозы. В виноделии более ценны побочные продукты, создающие "букет" вина.

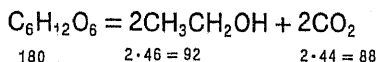
Постановка опыта. Для изучения спиртового брожения пользуются синтетической средой следующего состава, в % по объему: сахара — 15,0; пептон — 0,5; KH_2PO_4 — 0,3; MgSO_4 — 0,1.

Наливают 100 мл среды в колбу Эрленмейера или плоскодонную на 250...300 мл, вносят туда около 0,5 г прессованных дрожжей. Колбу закрывают каучуковой пробкой, в которую вставлен затвор Мейссля с резиновым клапаном Бунзена (рис. 15). Затвор легко пропускает выделяющийся при брожении диоксид углерода, но задерживает пары воды. Это достигается тем, что газообразные продукты проходят в затворе через слой крепкой серной кислоты.

На затвор надевают толстостенную резиновую трубку с небольшим продольным надрезом (клапан Бунзена), верхний конец ее закрыт стеклянной бусиной. Клапан пропускает из колбы диоксид углерода, но не дает возможности серной кислоте соприкоснуться с наружным воздухом. Колбу взвешивают на технических весах с точностью до 0,01 г и ставят в термостат при 25 °С.

К условиям, способствующим преимущественному развитию дрожжей по сравнению с другими микроорганизмами, можно отнести высокую концентрацию сахара, слегка кислую среду за счет KH_2PO_4 , анаэробные условия, накопление значительного количества спирта. В сумме перечисленные факторы делают среду элективной для дрожжей.

Определение CO_2 . Диоксид углерода, образующийся при брожении, определяют по разности массы колбы при постановке опыта и после его окончания. Конец брожения устанавливают по прекращению газообразования. Брожение обычно продолжается два-три дня. Несмотря на то что колбу взвешивают только на технических весах, учет CO_2 получается достаточно точный, так как в процессе брожения газа выделяется много. Почти 50 % сброженного сахара превращается в диоксид углерода:



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

Расчет количеств образовавшегося спирта и сброженного сахара делают по массе выделившегося диоксида углерода, исходя из уравнения спиртового брожения.

Пример расчета. Образовалось 6 г CO_2 . Чтобы найти массы сброженного сахара (Y) и выделившегося спирта (X), составляем пропорции:

$$\begin{array}{l} 88 - 92 \\ 6 \text{ г} - X \end{array} \qquad \begin{array}{l} 180 - 88 \\ Y - 6 \text{ г} \end{array}$$

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

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

Пример расчета. Если 100 мл среды содержат 15 г сахара (100 %), то 12,3 г сброженного сахара составят X, %:

$$\begin{array}{l} 15 - 100 \\ 12,3 - X \end{array}$$

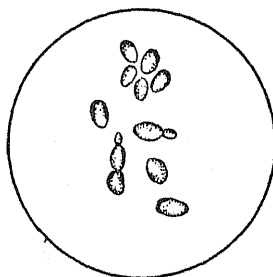
$$X = \frac{12,3 \cdot 100}{15} = 82, \text{ т. е. интенсивность брожения равна } 82 \text{ \%}.$$

Микроскопирование. Познакомиться с морфологией дрожжей можно при исследовании препарата, приготовленного из бродящей жидкости. Для этого стеклянной палочкой наносят каплю культуральной жидкости на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и после нанесения капли кедрового масла микроскопируют с иммерсионной системой объектива. При микроскопировании препарата раздавленной капли конденсор немного опускают. На препарате находят клетки в стадии почкования и зарисовывают их (рис. 16).

Качественные реакции на этиловый спирт. После взвешивания бродильных колб и определения CO_2 культуральную жидкость переносят в плоскодонную круглую колбу на 700...800 мл для отгона этилового спирта.

Колбу соединяют с обратным холодильником, устанавливают на асбестовой сетке над газовой горелкой и начинают нагревать. Жидкость

Рис. 16. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* в стадии почкования

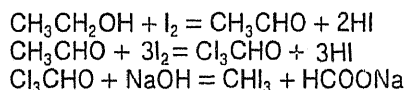


закипает. Спирт улетучивается вместе с парами воды и, охлаждаясь в холодильнике, каплями стекает в приемную колбу.

При анализе интересно получить несколько последовательных порций отгона. Для этого ставят три-четыре приемные колбы, в каждую набирают примерно 10...15 мл отгона. Пробы из разных порций наносят на фарфоровую пластину и зажигают. Первые порции отгона горят интенсивнее, так как они содержат больше спирта, чем последующие. Первые две-три фракции используют для качественных реакций 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 %-го раствора Na_2CO_3 и около 0,1 г кристаллического йода в порошке. Смесь взбалтывают, нагревают на водяной бане при 60...70 °C до полного растворения и обесцвечивания йода. При охлаждении раствора из него выпадают мелкие светло-желтые кристаллы йодоформа с характерным резким запахом. Весь процесс протекает по следующей схеме:



Из летучих органических соединений йодоформенную пробу дают уксусный альдегид и ацетон. В их присутствии в отгоне убеждаются при помощи фуксинсернистой кислоты или аммиачного раствора серебра. В присутствии альдегидов фуксинсернистая кислота краснеет, аммиачный раствор серебра чернеет вследствие выпадения металлического серебра.

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

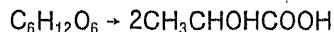
Материалы и оборудование. Питательная среда с сахарозой, дрожжи, плосдонные колбы на 250 мл с затвором Мейссля, весы и разновесы, цилиндры на 100 мл, этикетки, колба на 700...800 мл, отгонный аппарат Либиха, микроскопы и все необходимое для микроскопирования, пробирки, 20 %-й раствор Na_2CO_3 , кристаллический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

7.1.3. Молочнокислое брожение. Молочнокислое брожение лежит в основе силосования, квашения овощей, переработки молока в кисломолочные продукты и сыр; кислый вкус черного хлеба определяется молочной кислотой. Данные процессы вызывает группа молочнокислых бактерий, которая очень разнообразна и широко распространена в природе.

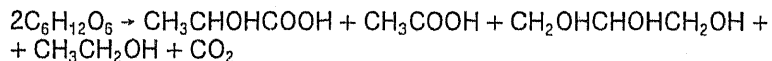
Молочнокислые бактерии обитают на поверхности растений, в молоке, на пищевых продуктах, в кишечнике человека и животных. Они имеют много общих признаков, важнейшие из которых следующие: способность к синтезу молочной кислоты; грамположительность; отсутствие спор; неподвижность; форма (кокки или палочки), требовательность к источникам азота (многие из них не развиваются на простых синтетических средах); отсутствие фермента каталазы; участие в расщеплении перекиси водорода до воды и кислорода. Последнее свойство выявляется, если на колонию молочнокислых бактерий нанести каплю 3 %-го раствора перекиси водорода; выделения кислорода при этом не наблюдается. Колонии бактерий, синтезирующих каталазу, в таких условиях покрываются пузырьками кислорода.

Молочнокислые бактерии можно разделить на две группы:

гомоферментативные, образующие из сахара в основном молочную кислоту по схеме:



и гетероферментативные, образующие наряду с молочной кислотой значительные количества побочных продуктов:



Молочнокислые бактерии сбраживают моно- и дисахариды. Часто те микроорганизмы, которые обитают в молоке, сбраживают лактозу, но не действуют или почти не действуют на сахарозу.

Источником азота для группы молочнокислых бактерий служат пептоны, смесь аминокислот. Эти бактерии требовательны к витаминам.

При изучении молочнокислого брожения лучшая питательная среда — молоко. В нем есть все необходимые для развития молочнокислых бактерий питательные элементы. В такой среде могут хорошо развиваться и другие бактерии (гнилостные, маслянокислые), но молочная кислота быстро подавляет их. Критические значения реакции среды (pH) для развития разных групп бактерий следующие:

молочнокислые	4,0...3,5
маслянокислые	5,0...4,7
гнилостные	5,5...5,0

Постановка опыта. Определив начальную кислотность молока титрованием 0,1 н. раствором NaOH (см. с. 71), разливают его в колбы Эрленмейера на 100 мл приблизительно по 40...50 мл и закрывают ватными пробками.

Параллельно выполняют второй вариант опыта. Разливают молоко в колбы, закрывают ватными пробками, ставят на асбестовые сетки и доводят молоко до кипения.

Колбы с кипяченым и некипяченым молоком помещают в термостат при 30 °С. Через 10...12 ч свежее (некипяченное) молоко скисает. В колбе

образуется ровный плотный сгусток без следов газа, если в опыте используют хорошее молоко. Сгусток получается вследствие того, что молочная кислота реагирует с казеинатом кальция и казеиновая кислота выпадает в осадок.

Молочнокислые бактерии не образуют спор, поэтому в кипяченом молоке они погибают, споры же маслянокислых бактерий сохраняются. При инкубации в термостате эти споры прорастают и осуществляют маслянокислое брожение лактозы. В результате реакции масляной кислоты с казеинатом кальция в этом варианте также выпадает казеиновая кислота, которая в дальнейшем подвергается пептонизации. Сыворотка приобретает кремовый цвет, неприятный запах масляной кислоты (запах пота) и прогорклый вкус.

Микроскопирование бактерий. Если простокваша долго сохраняется при комнатной температуре, то на ее поверхности появляется белая бархатистая морщинистая пленка. Такая же пленка обычно бывает на поверхности рассола при квашении огурцов, капусты и других овощей. Это молочная плесень – *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*), она всегда сопутствует молочнокислому брожению и служит нежелательным его спутником. Окисляя молочную кислоту, образуемую молочнокислыми бактериями, до CO_2 и H_2O , молочная плесень снижает кислотность. В результате в среде развиваются гнилостные бактерии и кисломолочные и квашеные продукты начинают портиться.

Молочная плесень – аэробный микроорганизм, поэтому она бывает только на поверхности. Для этого вида характерен многоклеточный мицелий, который распадается на отдельные клетки, так называемые оидии, по форме напоминающие дрожжи и служащие для размножения.

Для микроскопических наблюдений за 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 погибают и прикрепляются к стеклу бактерии, и параллельно эфиром извлекается и удаляется жир. Последнее необходимо, потому что капли жира на препарате мешают окраске и микроскопированию.

Фиксированный препарат окрашивают метиленовым синим 2... 3 мин, промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсией. Метиленовый синий – лучший краситель для молочнокислых бактерий в молоке, так как он слабо окрашивает основной фон (казеин) и хорошо – клетки. Препараты получаются четкими.

Под микроскопом на них видно преобладание мелких округлых клеток *Streptococcus lactis*, соединенных в короткие цепочки (рис. 17,б). Этот микроорганизм – возбудитель естественного скисания молока в наших широтах. Оптимальная температура для его развития 30 °С. В результате жизнедеятельности молочного стрептококка накапливает до 1 % молочной кислоты.

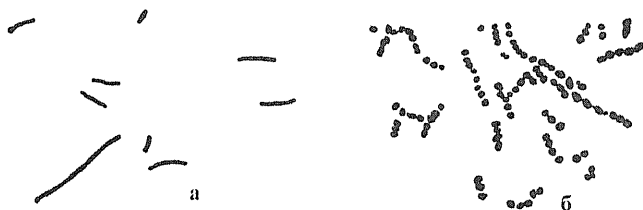


Рис. 17. Возбудители молочнокислого брожения:
а – *Lactobacillus bulgaricus*; б – *Streptococcus lactis*

Нередко на препарате видны тонкие палочки рода *Lactobacillus* разных размеров, иногда содержащие зерна волютина. Чаще встречается *L. bulgaricus* (рис. 17,а) – возбудитель естественного скисания молока в южных широтах. Оптимальная температура его развития 40 °С, он кислотоустойчив, накапливает до 3,5 % молочной кислоты. На плотных средах этот микроорганизм образует мелкие характерные колонии в виде комочков ваты.

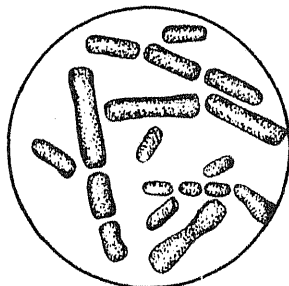
Если на поверхности прокисшего молока появилась пленка, то в мазке обнаруживается также и молочная плесень (рис. 18) – четырехугольные или овальные клетки ее отличаются от клеток молочнокислых бактерий большими размерами.

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

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

Кислотность молока выражают в градусах Тернера или процентах

Рис. 18. Молочная плесень – *Geotrichum candidum*



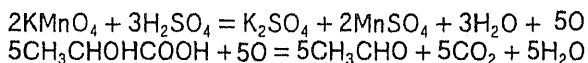
молочной кислоты. Так, 1 °Т соответствует 1 мл 0,1 н. раствора щелочи, пошедшей на титрование 100 мл. Следовательно, если на титрование 10 мл молока пошло X мл щелочи, то для выражения кислотности молока в градусах Тернера (°Т) нужно значение X умножить на 10.

Чтобы выразить кислотность в процентах молочной кислоты, количество 0,1 н. раствора NaOH (в мл), потраченное на титрование 100 мл молока, умножают на 0,009, так как 1 мл 0,1 н. NaOH нейтрализует эквивалентное количество молочной кислоты. Молекулярная масса молочной кислоты составляет 90. Для приготовления 1 л 1 н. раствора требуется 90 г кислоты. В 1 л 0,1 н. раствора содержится 9 г, а в 1 мл – 0,009 г молочной кислоты.

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

Перевод молочной кислоты в уксусной альдегид происходит в кислой среде при температуре кипения в присутствии KMnO_4 . Уксусный альдегид с аммиачным раствором серебра дает характерную реакцию "серебряного зеркала".

Реакцию проводят следующим образом. В коническую колбу на 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 %-го раствора KMnO_4 , который обесцвечивается. Молочная кислота переходит в уксусный альдегид. Происходящую при этом химическую реакцию можно выразить следующими уравнениями:



Для распознавания уксусного альдегида быстро покрывают горлышко колбы фильтровальной бумагой или часовым стеклом, смоченными аммиачным раствором AgNO_3 .

Аммиачный раствор нитрата серебра готовят следующим образом: к 1...2 мл 10 %-го раствора AgNO_3 в пробирке добавляют по каплям аммиак; сначала появляется осадок Ag_2O , который затем растворяется в избытке аммиака. Аккуратно, чтобы не разорвать, фильтровальную бумагу прижимают к краям горла колбы и продолжают нагревание. Уксусный альдегид улетучивается и, реагируя с аммиачным раствором AgNO_3 , вызывает почернение бумаги с серебристой побелалостью – это выделяется металлическое серебро.

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

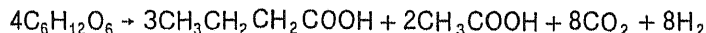
Материалы и оборудование. Свежее молоко, колбы на 100 мл, цилиндр на 100 мл, пипетки на 5 и 10 мл, 0,1 н. раствор NaOH, фенолфталеин, треножник с сеткой, микроскопы и все необходимое для приготовления препаратов, воронки, фильтры, 10 %-й раствор AgNO₃, 13 %-й раствор NH₄OH, H₂SO₄ (плотность 1,84), 5 %-й раствор KMnO₄, метиленовый синий.

7.1.4. Маслянокислое брожение. Возбудители маслянокислого брожения – строгие анаэробы, подвижные палочки с клостридиальным или плектридиальным типом спорообразования.

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

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

Процесс маслянокислого брожения протекает по схеме:



Кроме масляной в процессе брожения в заметных количествах образуется уксусная кислота, а при 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 моносахариды, органические кислоты (молочная и пировиноградная) и спирты (маннит и глицерин). В качестве источника азота бактерии используют самые различные азотистые соединения: пептон, аминокислоты, аммиачные соли, а некоторые даже атмосферный азот.

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

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

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

Присоединив колбу через каучуковую трубку к насосу (водоструйный, или лучше масляный Камовского), 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 30...35 °С.

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

Элективные условия создают: крахмалом — источником углерода, используемым только микроорганизмами, содержащими фермент амилазу; пастеризацией; анаэробизмом (высокий столбик жидкости в пробирке и выделение в процессе брожения CO_2 и H_2 , вытесняющих воздух). Через два-три дня картофель всплывает вследствие бурно идущего газообразования.

По окончании брожения культуральную жидкость используют для исследования морфологии маслянокислых бактерий и качественного определения продуктов брожения.

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

При микроскопировании препарата обнаруживаются клетки *Clostridium butyricum*, *C. butylicum*, *C. pasteurianum* (рис. 19) и других бактерий, имеющих подобную форму. В клетках можно заметить овальные тельца, сильно преломляющие свет. Это споры. В тех местах клетки, где содержится гранулеза, наблюдается сине-фиолетовое окрашивание. Зарисовывают только окрашенные клетки, явно относящиеся к группе маслянокислых бактерий.

Качественные реакции на масляную кислоту. Получение маслянокислого железа — реакция с FeCl_3 . Нейтральные растворы

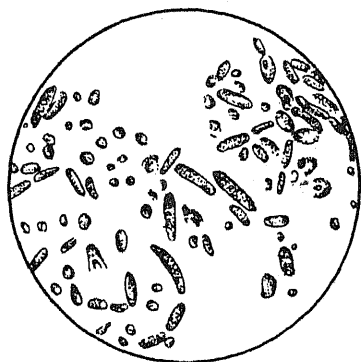
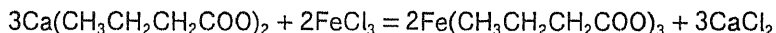


Рис. 19. Маслянокислые бактерии — *Clostridium butyricum* — после добавления к культуре раствора Люголя

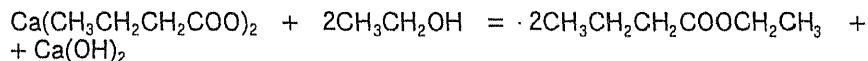
маслянокислых солей при нагревании с FeCl_3 приобретают коричневое окрашивание вследствие образования маслянокислого железа. В пробирку наливают 3...5 мл сброженной жидкости, добавляют 1...2 мл 5 %-го хлорида железа и нагревают на пламени. Реакция идет по уравнению



Раствор маслянокислого железа в отраженном свете приобретает буровато-коричневое окрашивание, а в проходящем свете – кроваво-красное.

При получении этилового эфира масляной кислоты – ананасовой эссенции – в пробирку к 3...5 мл культуральной жидкости прибавляют 0,5 мл 96 %-го этилового спирта и 1...2 мл крепкой серной кислоты. При взбалтывании и нагревании появляется характерный запах эфира (аромат ананаса).

Реакция протекает по уравнению



Материалы и оборудование. МПБ, глюкоза, картофель, мел, колбы Вюрца, винтовые зажимы, каучуковые пробки и трубки, водоструйный насос или масляный Камовского, пробирки, пипетки, водяная баня, раствор Люголя (I + KI), 5 %-й раствор FeCl_3 , предметные и покровные стекла, микроскопы.

7.1.5. Брожение пектиновых веществ. Пектиновые (межклеточные) вещества (от 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 костью и паренхимой при помощи пектиновых веществ. Поэтому брожение последних нашло широкое применение при технической обработке волокнистых растений.

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

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

Постановка опыта. Снопик льняной соломы высотой 6...7 см перевязывают в двух местах ниткой и вносят в пробирки, лучше большего, чем стандартные, размера, наполненные на 2/3 водопроводной водой, зажимают пинцетом и кипятят на горелке 2...3 мин для удаления

экстрактивных (легкосбраживаемых) веществ, которые могут служить источником углерода для других маслянокислых бактерий. Вода приобретает желто-зеленый цвет. Ее сливают. Вновь наполняют пробирку водопроводной водой, кипятят несколько минут и сливают. Так поступают пять-шесть раз. После последнего кипячения жидкость не сливают. Охлаждают пробирку под краном и в снопок вводят свежий стебель, не подвергавшийся нагреванию.

Пробирку со снопиком ставят в термостат при 30...35 °С. Через два-три дня в ней начинается брожение, а через пять-восемь оно заканчивается. Накопление в культуральной жидкости масляной кислоты наряду с уксусной, возникающей при гидролизе пектина, можно обнаружить при помощи качественных реакций (см. 7.1.4).

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

На препарате обычно видны крупные палочковидные бактерии с плектридиальным типом спорообразования (барабанная палочка) и прерывистым расположением гранулезы, окрашенной в синий цвет. Это *Clostridium pectinovorum* (рис. 20). Нередко обнаруживается *C. felsineum* — палочки меньшего размера сигарообразной формы со спорой на конце. Гранулеза может заполнять всю вегетативную часть клетки.

Материалы и оборудование. Льняная солома, пробирки, ножницы, водяная баня, раствор Люголя, 5 %-й раствор FeCl_3 , пипетки, пинцеты, скальпели, предметные и покровные стекла, микроскопы.

7.1.6. Брожение целлюлозы. Вводные пояснения. Целлюлоза разрушается в анаэробных условиях под влиянием различных спорообразующих бактерий, распространенных в почве, навозе, неразлагающихся растительных тканях, в рубце жвачных животных. Упрощенно этот процесс может быть представлен в виде следующей схемы.

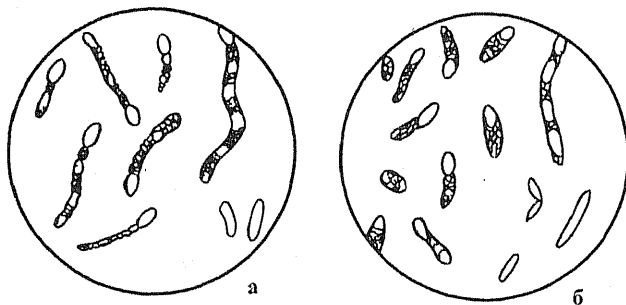
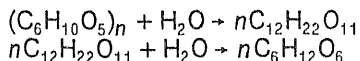


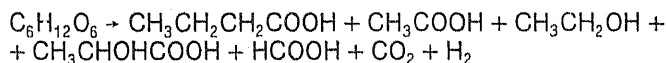
Рис. 20. Возбудители брожения пектиновых веществ:

а — *Clostridium pectinovorum* в клетках паренхимы стебля льна; б — *Clostridium felsineum* на крапивной среде

Первый этап – гидролиз целлюлозы и образование дисахаридов (целлобиозы) и моносахаридов (глюкозы):



Второй этап – сбраживание моносахаридов (глюкозы):



Постановка опыта. В круглую плоскодонную колбу вносят около 1...2 г фильтровальной бумаги или вату, нарезанную узкими полосами, и заливают доверху средой следующего состава, %: KNH_4HPO_4 – 0,2; KH_2PO_4 – 0,1; $CaCl_2$ – 0,03; пептон – 0,1; $MgSO_4$ – 0,05, $CaCO_3$ – 0,5.

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

Элективные условия в данном случае определяются присутствием целлюлозы – источника углерода, которая может потребляться только специфичными целлюлозоразлагающими бактериями, имеющими фермент целлюлазу, и анаэробными условиями. Пептон, введенный в среду в небольшом количестве, практически не нарушает элективности среды, но сильно стимулирует процесс.

Через несколько дней при температуре 30...35 °С начинается брожение целлюлозы, которое длится две-три недели. Фильтровальная бумага по мере сбраживания слегка ослизнется, желтеет и постепенно разрушается.

Для получения накопительной культуры термофильных целлюлозоразлагающих бактерий можно пользоваться питательной средой следующего состава, г на 1 л водопроводной воды: $NaNH_4HPO_4$ – 1,0; KH_2PO_4 – 0,5; K_2HPO_4 – 0,5; $MgSO_4$ – 0,4; $NaCl$ – 0,1; $MnSO_4$ и $FeSO_4$ – следы; пептон – 0,5; $CaCO_3$ – 0,5.

На дно длинных пробирок помещают полоски фильтровальной бумаги слоем 1,5...2 см, заливают на 2/3 средой и заражают небольшим количеством конского навоза. Пробирку инкубируют при 60 °С. Через несколько дней начинают интенсивно выделяться газы. Бумага приобретает желтую окраску и постепенно превращается в аморфную массу.

Микроскопирование. 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 30 °С, развиваются длинные тонкие палочки с круглой спорой на конце – *Clostridium omelianskii* (рис. 21). В накопительной культуре термофильных целлюлозоразлагающих бактерий чаще всего наблюдают длинные крупные палочки с грушевидной спорой на конце – *C. dissolvens*.

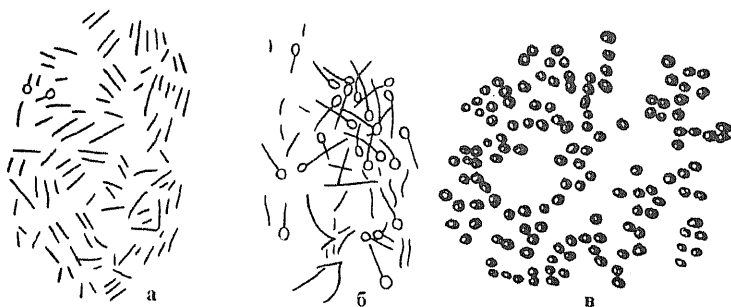


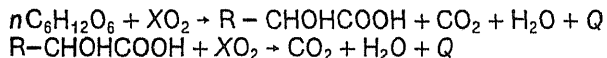
Рис. 21. *Clostridium omelianskii*:

а – молодые клетки; б – клетки со спорами; в – споры

Материалы и оборудование. Соли: KNH_4HPO_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.

7.2. Окисление

7.2.1. Окисление целлюлозы. Этот процесс наиболее широко распространен в природе, так как целлюлоза составляет подавляющую часть растительных остатков. В хорошо аэрируемой почве это окисление выполняют аэробные микроорганизмы (бактерии, грибы и актиномицеты). Они вырабатывают ферменты целлюлозу и целлобиазу, вызывающие гидролиз целлюлозы до глюкозы (см. 7.1.6), которую затем окисляют до CO_2 и H_2O ; промежуточными продуктами служат оксикислоты:



Постановка опыта. За окислением целлюлозы хорошо наблюдать, поставив опыт по методу Виноградского на гелевых пластинах. Для приготовления пластин из кремнекислого геля берут соляную кислоту плотностью (d) 1,9 в высоком цилиндре и разбавляют водой до $d = 1,10$. На каждые 500 мл крепкой соляной кислоты можно добавить примерно 500 мл дистиллированной воды. Жидкое стекло ($\text{XNa}_2\text{O} \cdot 9\text{SiO}_2$) наливают в другой высокий цилиндр и разводят дистиллированной водой до $d = 1,06...1,08$. На 500 мл воды можно прилить 100 мл жидкого стекла (можно заменить 35 %-м раствором силиката натрия). Цилиндры и ареометры после разбавления жидкого стекла и кислоты тщательно отмывают.

Полученные при разбавлении соляную кислоту и жидкое стекло смешивают в равных объемах; при этом второе вещество осторожно прибавляют к первому при постоянном помешивании. Чтобы устранить возможность появления в толще геля чечевицеобразных полостей,

полученный раствор нагревают до кипения, хорошо перемешивают и разливают в чашки Петри слоем не менее 0,7 см. Через 8..10 ч образуется гель. Дав ему хорошо застыть и обсохнуть сверху, чашки с застывшим гелем помещают в эмалированную кастрюлю или большой стеклянный сосуд и ставят под кран для промывания. На водопроводный кран надевают толстую каучуковую трубку, конец которой опускают на дно кастрюли или сосуда.

Струя воды должна быть слабая. Промывают до исчезновения следов хлора 1 %-м AgNO_3 в присутствии HNO_3 . Отмытые от следов хлора чашки с кремневыми пластинами окунают в кипящую воду, а при необходимости стерилизуют в кипятильнике Коха при 100°C три раза по 30 мин через 24 ч.

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

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

Микроскопирование. На препаратах, приготовленных из таких колоний, можно обнаружить виды разных родов. Наиболее часто встречаются следующие.

Cytophaga (рис. 22, а) — бактерии со сложным циклом развития, относящиеся к миксобактериям. Клетки — слегка извитые, довольно длинные (3...8 мкм) палочки с заостренными концами, при старении они переходят в укороченные палочки с округлыми концами, а могут перейти и в шаровидную форму — микроспоры или микроцисты, покрытые с поверхности слизью (покоящееся состояние). На основании исследования строения и цикла развития бактериям рода *Cytophaga* было присвоено новое название — род *Мухососсис*. Разные виды этого рода образуют на клетчатке колонии в виде желтых, розовых и коричневых пятен, иногда бесцветные.

Cellvibrio — мелкие, слегка изогнутые в виде полумесяца, неспорообразующие палочки с закругленными концами, длина их 3...4 мкм, ширина 0,4...0,5 мкм (рис. 22, б). По поверхности фильтровальной бумаги они распространяются очень быстро и окрашивают ее в охряно-желтый цвет.

Cellfalcicula — палочковидные клетки, утолщенные в центре, с заостренными концами (рис. 22, в). Образуют на целлюлозе слизистые зеленые колонии, пигмент легко диффундирует в среду и окрашивает гель в зеленый цвет.

Polyangium (рис. 22, г) и *Sorangium* (рис. 22, д). Клетки этих двух родов — палочковидные, при старении укорачиваются и образуют

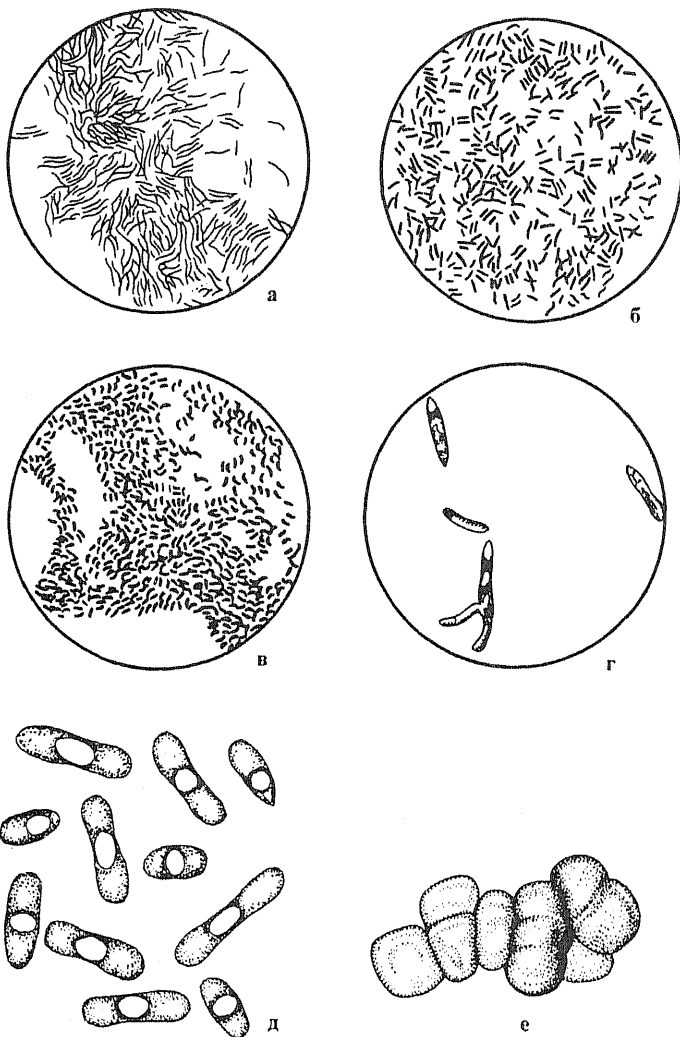


Рис. 22. Бактерии, окисляющие целлюлозу:
 а – *Cytophaga*; б – *Cellvibrio*; в – *Cellfalcicula*; г – *Polyangium*; д –
Sorangium; е – плодовые тела бактерий рода *Polyangium*

микроцисты, которые собраны по 12...40 клеток в цисту. Из них формируются плодовые тела. Плодовые тела *Polyangium luteum* видны на рисунке 22,е. На клетчатке эти микробы образуют колонии в виде слизистого налета желтого, оранжевого или темно-коричневого цвета.

Trichoderma, *Fusarium*, *Alternaria*, *Stachybotris*, *Cladosporium*, *Dema-tium* – представители несовершенных грибов; эпифитный гриб *Fumago* (см. рис. 31,з) и другие грибы также интенсивно разлагают целлюлозу.

Активное участие в разложении клетчатки принимают некоторые актиномицеты – *Actinomyces violaceus*, *A. cellulosaе* и *Micromonospora chaliceae*.

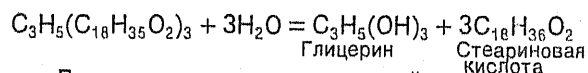
Плотность обрастания комочков почвы целлюлозоразрушающими микроорганизмами можно выразить в процентах. Число комочков почвы, разложенных на чашке, принимают за 100 %. Затем подсчитывают процент комочков почвы, вокруг которых развились колонии целлюлозоразрушающих микроорганизмов.

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

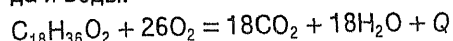
Миксобактерии рода *Sorangium* легко обнаружить в подзолистых почвах под луговой растительностью и на окультуренных почвах. В этих же почвах при благоприятном режиме можно выявить и бактерий рода *Cellvibrio*, а на унавоженных – *Cytophaga*. В степных почвах наряду с грибами встречаются бактерии рода *Polyangium*.

Материалы и оборудование. Гелевые пластины, пропитанные средой для целлюлозоразрушающих бактерий, покрытые кружком стерильной фильтровальной бумаги; стеклянные палочки с заостренными концами; образцы свежей почвы; часовые стекла; трафареты. При отсутствии гелевых пластин жидкая минеральная среда Омелянского; мерные цилиндры на 100 мл; колбы Эрленмейера на 100...150 мл, стерильные кружки фильтровальной бумаги. Микроскопы, все материалы для приготовления окрашенных препаратов и микроскопирования.

7.2.2. Окисление жира. Жиры попадают в почву с растительными и животными остатками, отмершими клетками микроорганизмов. Микроорганизмы, окисляющие жиры, выделяют фермент липазу, который катализирует гидролиз жиров по уравнению:



Продукты гидролиза в дальнейшем окисляются до диоксида углерода и воды:



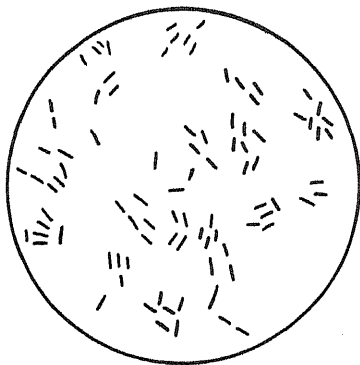


Рис. 23. *Pseudomonas fluorescens*

Постановка опыта. Для знакомства с процессом окисления жиров и его возбудителями достаточно сначала приготовить электролитную минеральную среду Рана, не содержащую источник углерода: K_2HPO_4 — 5 г; $CaCl_2$ — 1 г; $(NH_4)_3PO_4$ — 5 г; $NaCl$ — следы; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1 г; $FeCl_3 \cdot 7H_2O$ — следы, дистиллированная вода — 1 л. Затем наливают 30 мл в колбу Эрленмейера на 100 мл и добавляют 1/3 чайной ложки почвы. Как источник углерода добавляют кусочек расплавленного свиного сала или говяжьего жира.

Хорошо получается культура жирокисляющих бактерий и грибов на касторовом масле. В 30 мл среды достаточно внести 1 мл масла. По мере развития жирокисляющих микроорганизмов в прозрачном касторовом масле появляются белые хлопья нерастворимых в воде жирных кислот.

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

Микроскопирование. Готовят препарат с поверхности или из жидкости колбы. Сушат его при комнатной температуре, фиксируют смесью спирта с эфиром (1:1), удаляя остатки жира, затем красят фуксином.

При микроскопировании можно обнаружить неспороносную палочку типа *Pseudomonas fluorescens* (рис. 23), *P. stutzeri*, иногда на жире развиваются актиномицеты и дрожжеподобные организмы *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*).

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

ГЛАВА 8

ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ ОРГАНИЧЕСКИХ И МИНЕРАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ АЗОТА

8.1. АММОНИФИКАЦИЯ

8.1.1. Аммонификация белковых веществ. Аммонификация – это превращение органических форм азота в аммиачный азот. Ее вызывают различные микроорганизмы (бактерии, актиномицеты и грибы). Микроорганизмы, вызывающие аммонификацию белковых веществ, выделяют в окружающую среду протеолитические ферменты, под действием которых эти вещества гидролизуются до аминокислот. В свою очередь, аминокислоты поступают в клетку и в ней дезаминируются с образованием аммиака, органических кислот и других продуктов. В белке отношение C:N равно 3,5:1. При разложении белков выделяются также H_2S , меркаптаны, скатол и индол, имеющие неприятный запах.

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

По 30 мл среды разливают в четыре-пять колб Эрленмейера на 100 мл и добавляют по 1/3 чайной ложки почвы. Колбы закрывают ватными пробками. Над средой подвешивают две бумажки – красную лакмусовую, смоченную дистиллированной водой, для обнаружения выделяющегося аммиака, и фильтровальную, смоченную щелочным раствором ацетата свинца, для выявления сероводорода и меркаптана. Закрепляют их между пробкой и стенками горлышка колбы. Бумажки не должны касаться среды. Сверху колбы прикрывают пергаментной бумагой.

На третьи–пятые сутки инкубации при 28...30 °C опыт заканчивают и содержимое колбы анализируют. Определяют продукты жизнедеятельности микроорганизмов при разложении белка и возбудителей процесса.

Микроскопирование. Для обнаружения возбудителей гнилостного распада белковых веществ готовят препарат живых бактерий в раздавленной капле, а также фиксированный и окрашенный. Чаще других на препарате встречаются подвижные клетки *Proteus vulgaris* (рис. 24,б), преобладающие на первых стадиях распада белков. Это неспорообразующие, неодинаковой длины палочки. Кроме того, на препарате много спорообразующих клеток *Bacillus mycoides* (рис. 24,а) и *Clostridium putrificus* (рис. 24,в). У последних споры расположены терминально и диаметр их шире клетки.

Bac. mycoides вызывает аммонификацию белковых веществ в аэробных условиях, а *Cl. putrificus* – в анаэробных, но последняя форма может развиваться как аэроб, если в среде находятся аэробные микроорганизмы, поглощающие кислород.

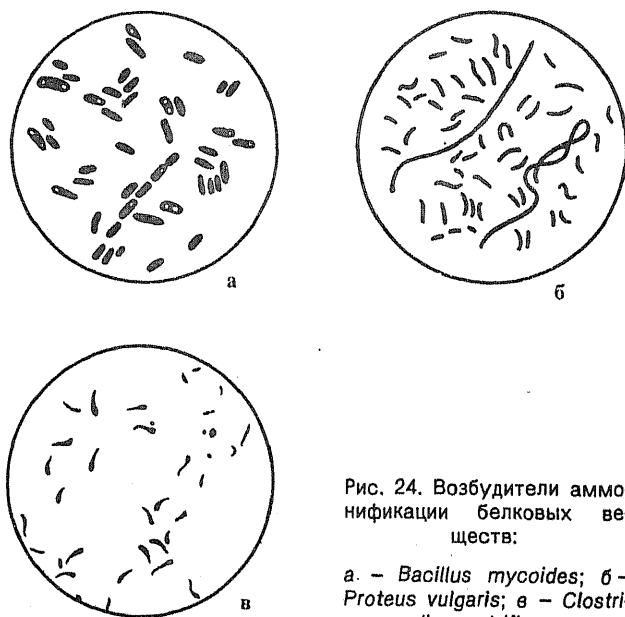


Рис. 24. Возбудители аммонификации белковых веществ:

а. — *Bacillus mycoides*; б — *Proteus vulgaris*; в — *Clostridium putrificus*

Качественные реакции на продукты гнилостного распада белка. Аммиак выявляют в атмосфере и в субстрате. Выделяющийся в атмосферу NH_3 окрашивает подвешенную в пробирке красную лакмусовую бумажку в синий цвет. Накопление аммиака в субстрате устанавливают при помощи реактива Нesslera. Реакция капельная. На фарфоровые пластинки с лунками или в чашки помещают каплю реактива, затем каплю субстрата. При большом количестве аммиака образуется коричневый или буроватый осадок, при небольшом — появляется оранжевая или желтая окраска.

Сероводород обнаруживают при помощи подвешенной фильтровальной бумажки, смоченной ацетатом свинца $[\text{Pb} (\text{CH}_3\text{COO})_2]$. Бумажка чернеет под действием сероводорода. Если она покрывается серебристым налетом, следовательно, наряду с сероводородом выделяются и меркаптаны (например, метилмеркаптан CH_3SH).

Для выявления индола пользуются реакцией Сальковского или реакцией с парадиметиламинобензальдегидом. В первом случае к 10 мл субстрата добавляют 1 мл 0,2 %-го KNO_2 и несколько капель крепкой серной кислоты. При взаимодействии этих веществ с индолом получается красно-фиолетовое окрашивание. Ту же реакцию дает индолилуксусная кислота.

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

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

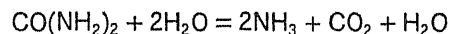
Приготовление реактивов. Разбавленный ацетат свинца обрабатывают раствором NaOH до тех пор, пока осадок не растворится (0,25 М).

Реактив Несслера готовят следующим образом: 20 г KI растворяют в 50 мл воды, к раствору добавляют до насыщения (около 32 г) небольшими порциями HgI₂. После этого приливают 460 мл воды и вносят 134 г КОН. Отстоявшуюся жидкость сливают в темную склянку.

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

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

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



Источником углерода служат некоторые углеводы и соли органических кислот.

Для наблюдения за аммонификацией мочевины можно использовать питательную среду следующего состава, г на 1 л дистиллированной воды: тартрат К или Na (виннокислые, можно соль яблочной кислоты) — 5,0; мочевины — 50,0; K₂HPO₄ — 0,5; MgSO₄·7H₂O — 0,2.

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

Через три—пять суток культуру подвергают анализу. Устанавливают выделение аммиака по посинению красной лакмусовой бумажки, а накопление его в субстрате — капельной реакцией с реактивом Несслера (см. 8.1.1).

Для изучения возбудителей аммонификации мочевины из едва заметной пленки на субстрате готовят препарат и окрашивают его фуксином. Чаще всего под микроскопом встречаются клетки *Bac. pasteurii* (рис. 25), реже *Planosarcina ureae* и др.

Материалы и оборудование. Среда для аммонификации мочевины, цилиндры на 100 мл, колбы Эрленмейера на 100 мл, почва, алюминиевые ложки, полоски красной

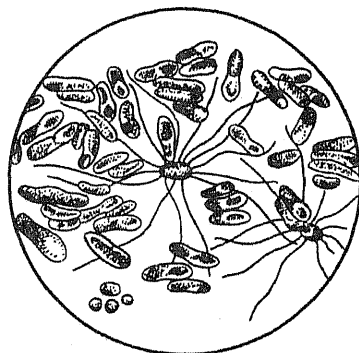
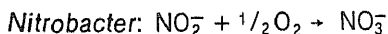
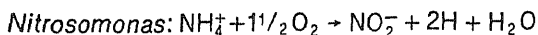


Рис. 25. *Bacillus pasteurii*

лакмусовой бумажки, вата, белые фарфоровые пластинки с лунками, реактив Несслера, пипетки, микроскопы и все необходимое для приготовления препаратов и просмотра их под микроскопом.

8.2. НИТРИФИКАЦИЯ И ДЕНИТРИФИКАЦИЯ

8.2.1. Выявление бактерий различных фаз нитрификации. Под нитрификацией понимают процессы окисления аммиака до нитрита и нитрата. Эти превращения аммиака идут в две фазы, их вызывают нитрифицирующие бактерии главным образом двух родов:



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

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

Промытые и прокипяченные пластины кремнекислого геля пропитывают 3...5 мл среды Виноградского. Минеральная основа среды имеет следующий состав, 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; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4; MgCO_3 или CaCO_3 – 5,0. Источник азота $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2 г. Лучшие результаты получают при замене $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на фосфорно-аммонийно-магниевою соль – $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot \text{MgCO}_3$, кроме того, важно растереть CaCO_3 перед приготовлением среды пестиком в стерильной ступке.

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

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

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

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

Степень обрастания комочков почвы определяют так. Общее число комочков почвы, разложенных на чашке, принимают за 100 %. Затем подсчитывают число комочков, давших зоны растворения мела, и устанавливают, какой процент они составляют от общего числа комочков почвы.

Полученная величина, однако, не дает представления об абсолютном количестве нитрифицирующих бактерий в почве. Если сопоставить степень обрастания ими комочков разных почв, то установленный показатель позволит судить о том, какая почва более богата нитрифицирующими бактериями.

Чтобы познакомиться с продуктами жизнедеятельности бактерий первой фазы нитрификации, чистым ланцетом вырезают по три кусочка геля из зон растворения мела и с мест, в которых мел не растворился, помещают их изолированно в лунки белой фарфоровой пластины или в фарфоровые чашки. Сначала делают пробы с кусочками геля из контрольных участков, где мел не растворился.

Пробу на аммиак выполняют с реактивом Несслера; гель приобретает желтовато-оранжевую окраску, что свидетельствует о присутствии аммиака. Затем делают пробу на нитрит с реактивом Грисса или цинк-йод-крахмалом, добавляя каплю 10 %-го раствора 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, т. е. гель не окрашивается. Реактив Грисса окрашивает гель в красный цвет, а цинк-йод-крахмал в кислой среде — в темно-синий, что свидетельствует о появлении азотистой кислоты.

Для знакомства с возбудителями первой фазы нитрификации из зон растворения мела берут иглой немного материала и готовят окрашенный препарат. При его микроскопировании можно обнаружить овальные клетки, похожие на ноль, — *Nitrosomonas* (рис. 26,а) и *Nitrospira*. Первые встречаются в старопашотных почвах, вторые — в целинных. В почвах Европы чаще встречаются *Nitrosomonas europaea*.

Вторая фаза. Микроорганизмы, вызывающие вторую фазу нитрификации, можно наблюдать на чашках с культурой первой фазы при более длительном их стоянии. После исчезновения аммиака образовавшийся нитрит может окисляться до нитрата, в чем 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 дифениламином в растворе крепкой серной кислоты. В присутствии азотной кислоты гель приобретает

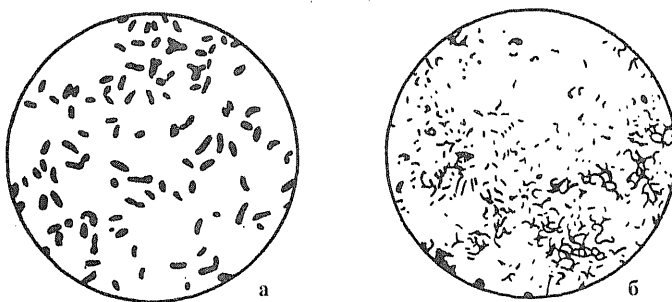


Рис. 26. Нитрифицирующие бактерии:

а – *Nitrosomonas*; б – *Nitrobacter*

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 *Nitrobacter* (рис. 26,б).

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

Для выявления бактерий обеих фаз нитрификации из культуры на гелевых пластинах Е.З. Теплер разработал специальный прием. В чашку, в которой прошли процессы нитрификации, осторожно вливают 6...8 мл дистиллированной воды, бактерии при этом собираются на ее поверхности. Если к поверхности воды прикоснуться чистым обезжиренным предметным стеклом, то на нем остаются нитрифицирующие бактерии. После сушки и фиксации препарат красят фуксином и рассматривают под микроскопом с иммерсионной системой (см. 10.3.3).

На препаратах из чашек, в которых прошли первая и вторая фазы нитрификации, можно легко обнаружить представителей обоих родов нитрифицирующих бактерий и их спутников, в частности бактерий рода *Bactoderma*, всегда сопровождающих 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, г на 200 мл дистиллированной воды: NaNO_2 – 1,0; Na_2CO_3 (безводный) – 1,0; NaCl – 0,5; K_2HPO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4.

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

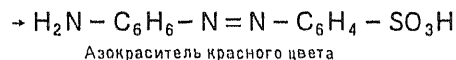
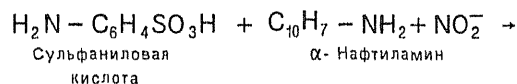
8.2.2. Жидкие культуры нитрифицирующих бактерий. Первую и вторую фазы нитрификации можно наблюдать и в жидких средах. Однако в них процессы менее наглядны.

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

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

Для получения накопительной культуры среды после хорошего взбалтывания разливают по 30 мл в колбы Эрленмейера на 100 мл, вносят в них четверть чайной ложки почвы и ставят в термостат при 25...30 °С. Спустя семь 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). В пробирку наливают по 1 мл растворов, составляющих реактив Грисса, и 10 мл исследуемого раствора и кипятят. В присутствии азотистой кислоты появляется красное окрашивание. Реактив очень чувствителен к HNO_2 . Ход реакции следующий:



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

При исследовании второй фазы нитрификации после исчезновения нитрита в лунку фарфоровой пластинки одну каплю H_2SO_4 и один кристалл дифениламина, затем 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.

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

Материалы и оборудование к работам 8.2.1 и 8.2.2. Гелевые пластины, пропитанные соответствующей питательной средой, свежая почва, часовые стекла, палочки с

оттянутым концом и трафарет, соответствующие жидкие среды, колбы Эрленмейера, почва, алюминиевые ложки, реактив Несслера и цинк-йод-крахмал, 20 %-й раствор 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.

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

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

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



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

Для наблюдения за денитрификацией и получения накопительной культуры денитрифицирующих бактерий обычно пользуются средой Гильта (см. 9.2.2) или средой более простого состава, г: сегнетова соль (натриевокалиевая соль винной кислоты) или цитрат натрия – 20; KNO_3 – 2,0; K_2HPO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – следы; дистиллированная вода – 1000 мл.

Постановка опыта. В склянку или колбу Эрленмейера наливают немного питательной среды и к ней добавляют 1/3 чайной ложки почвы. Среду тщательно перемешивают с почвой для удаления пузырьков воздуха, затем наполняют склянку или колбу питательной средой до края и закрывают каучуковой пробкой, в которую вставлена открытая с двух сторон стеклянная трубка, расширенная в средней части. Пробка вытесняет часть жидкости в стеклянную трубку (рис. 27).

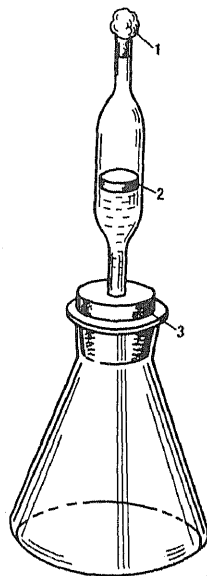
Под пробкой не должны оставаться пузырьки воздуха. В трубку над средой наливают вазелиновое масло небольшим слоем для создания анаэробных условий. Отсутствие углеводов в среде исключает процесс брожения. В полученных условиях будут развиваться лишь микроорганизмы, способные использовать кислород связанных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

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

Прибор со средой и почвой помещают в термостат при температуре

Рис. 27. Прибор для культивирования денитрифицирующих бактерий:

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



28...30 °С. После пяти-шести дней инкубации культуру подвергают анализу: отмечают появление пузырьков газа под пробкой и цвет среды.

Анализ. Для микроскопирования возбудителей денитрификации из середины субстрата чистой пипеткой берут каплю и готовят фиксированный и окрашенный препарат. Его рассматривают под микроскопом с иммерсионной системой.

На препарате преобладают неспорообразующие палочки *Pseudomonas denitrificans*. Нередко наблюдается позеленение среды, особенно при использовании углерода лимонной кислоты, что указывает на развитие *P. fluorescens* (см. рис. 23). На среде с сегнетовой солью чаще развивается *P. stutzeri*.

Для определения продуктов жизнедеятельности денитрифицирующих бактерий из культуральной жидкости делают пробы: на нитрат – с дифениламином, на нитрит – с цинк-йод-крахмалом в кислой среде или с реактивом Грисса, 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. Питательная среда Гильята 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, дифениламин в крепкой серной кислоте, цинк-йод-крахмал (или реактив Грисса), 20 %-й раствор H_2SO_4 , реактив Несслера, микроскопы и все необходимое для микроскопирования и приготовления окрашенных препаратов.

8.3. АЗОТФИКСАЦИЯ

8.3.1. Знакомство с клубеньковыми бактериями. Ассимиляция атмосферного азота микроорганизмами имеет большое 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.

Клубеньковые бактерии образуют клубеньки на корнях более чем 1300 видов бобовых растений. Внедрившись в ткань корня, эти бактерии

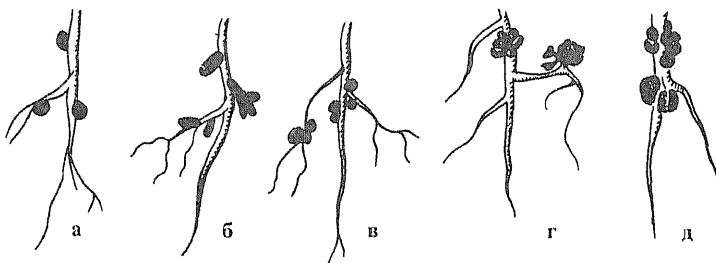


Рис. 28. Форма клубеньков у бобовых растений:

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

распространяются обычно в виде инфекционных нитей — колоний размножившихся клеток бактерий.

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

Форма и размеры клубеньков разных бобовых растений неодинаковы (рис. 28). У клевера они продолговатые и мелкие, у гороха и вики — округлые и крупные. У фасоли и сои диаметр клубеньков достигает 1 см, а у люпина они иногда достигают величины грецкого ореха. Разрушение клубеньков сопровождается деградацией элементов растительной клетки и лизисом части бактериоидов, тогда как остальная их часть образует мелкие кокковидные клетки — своеобразные артросторы, выполняющие функцию размножения.

При изучении клубеньковых бактерий в оптическом микроскопе артросторы не видны. Их можно обнаружить лишь при большом увеличении под электронным микроскопом.

На питательных средах клетки ризобий — подвижные неспоронозные граммотрицательные палочки. Среди них встречаются 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 медленно растущие, например у люпина, сои; быстрорастущие — у гороха, клевера и др.

Строение клубеньков бобовых изучают на срезах, которые делают острой ботанической бритвой или готовят на микротоме. Тонкий срез, продольный или поперечный, помещают на предметное стекло и просматривают в раздавленной капле при разных увеличениях. В сухой системе просматривают структуру клубенька, обнаруживают бактериоидную ткань, а затем, если срез достаточно тонкий, препарат исследуют

с иммерсионной системой, где хорошо просматривается бактериодная зона клубенька.

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

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

Хорошая окраска получается при использовании смеси равных частей фуксина и метиленового синего, растворенных в 1 %-м растворе уксусной кислоты. 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 бактериодов разных бобовых, следует зарисовать и подписать наименования.

Культуру клубеньковых бактерий готовят так. Кусочек корня с клубеньком тщательно промывают в стерильной воде, стерилизуют поверхность клубенька в растворе спирта, затем вновь промывают стерильной водой, раздавливают клубенек в капле стерильной воды и суспензию высевают на бобовый агар или среду Фреда (см. 11.5.1).

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

8.3.2. Свободноживущие азотфиксирующие бактерии. Среди свободноживущих азотфиксирующих бактерий наибольший интерес представляют виды родов *Clostridium* и *Azotobacter*.

Вводные пояснения. 1. *C. pasteurianum* — это облигатный анаэроб. Энергию для всех процессов жизнедеятельности, в том числе и ассимиляции атмосферного азота, бактерии этого вида получают за счет маслянокислого брожения (см. 7.1.4). Сбраживают они моно- и дисахара и некоторые полисахариды.

В молодой культуре клетки *C. pasteurianum* имеют форму палочек с перитрихально расположенными жгутиками. Затем клетка образует споры, которая иногда располагается поближе к краю, а чаще в середине клетки. Споры овальные, окружены капсулой.

Клетки имеют клостридиальную форму, накапливают запасное питательное вещество — гранулезу (полисахарид, близкий к крахмалу), которая окрашивается при воздействии раствора Люголя в сине-фиолетовый цвет. В период образования спор гранулеза постепенно исчезает.

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

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

Колбу Эрленмейера на 100...150 мл заполняют на 2/3 жидкой средой, предварительно взболтав ее. Для инокуляции в среду вносят 1/3 чайной ложки почвы. Элективность среды обеспечивает отсутствие связанного азота и анаэробные условия. Для нейтрализации масляной кислоты добавляют мел. Опыт можно ставить в высоких пробирках. Колбы с посевом помещают в термостат при 35...30 °C.

Через несколько дней отмечают помутнение среды и обильное образование газов. На поверхности среды развиваются аэробные микроорганизмы, поглощающие кислород атмосферы. После четырех-пяти дней инкубации культуру анализируют.

Микроскопирование и получение чистой культуры 1. 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, накрывают покровным стеклом и микроскопируют с иммерсионной системой. Клетки *C. pasteurianum*, содержащие гранулезу, приобретают сине-фиолетовую окраску. Как правило, преобладают веретенообразные формы.

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

Чистую культуру *C. pasteurianum* выделяют из колоний, полученных при посеве накопительной культуры после обязательной пастеризации на агаризованной среде Виноградского (2 % агара) или на картофельно-морковном агаре Емцева: картофельный отвар — 500 мл; морковный отвар — 500 мл; глюкоза — 20 г; K_2HPO_4 — 1 г; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5 г; NaCl, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — следы; пептон — 5 г; дрожжевой автолизат — 0,02 мл; $CaCO_3$ — 40 г; агар-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 дистиллированную воду до первоначального объема.

Материалы и оборудование 1. Жидкая среда Виноградского, колбы Эрленмейера на 100...150 мл или высокие пробирки, почва, алюминиевые чайные ложки или шпатели. Микроскопы и все необходимое для микроскопирования препарата в раздавленной капле, раствор Люголя, пробирки обычные, 10 %-й раствор хлорного железа.

Вводные пояснения 2. *Azotobacter chroococcum* фиксирует азот в аэробных условиях. Колонии темно-коричневого, почти

черного цвета. В жидких культурах бактерии образуют пленку, а на агар-агаре и на гелевых пластинах — слизистые колонии.

Молодые клетки азотобактера имеют вид попарно соединенных крупных, коротких палочек с закругленными концами. По мере развития они становятся эллипсоидными, а затем круглыми (рис. 29), часто окружены слизистой капсулой, которая выявляется после окраски клеток фуксином и смешивания с разбавленной тушью. Внутри клеток ясно выражена зернистость. *A. vinelandii* на плотных средах образует сарциноподобные скопления.

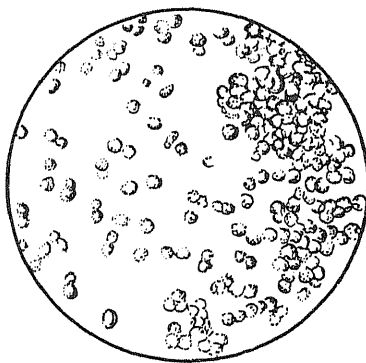


Рис. 29. *Azotobacter chroococcum*

Азотобактер более требователен к условиям окружающей среды, поэтому менее распространен в почве, чем *C. pasteurianum*. Источником углерода для него служат моно-, дисахара, спирты и соли органических кислот, в том числе и бензойная.

Постановка опыта 2. Для выявления азотобактера в почве и определения относительного его содержания используют метод Виноградского на гелевых пластинах (см. 7.2.1). Отмытые от следов хлора гелевые пластины пропитывают 3...5 мл питательной среды следующего состава, г на 200 мл дистиллированной воды: маннит или тростниковый сахар — 20,0; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; $NaCl$ — 0,5; $FeSO_4 \times 7H_2O$ — 0,01; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ — 0,01; $CaCO_3$ — 5,0.

После уравнивания среды до исчезновения избыточной влаги на поверхности геля раскладывают по трафарету 50 комочков почвы (см. с. 86). С этой целью берут два часовых стекла, фламбируют их, затем в одно помещают исследуемую почву, а в другое — дистиллированную воду. Смоченной водой палочкой с оттянутым концом, проводя ее каждый раз над огнем, захватывают комочки почвы диаметром примерно 2 мм и помещают их на поверхность гелевой пластины. Элективность среды создают отсутствием связанного азота и аэробными условиями.

Чашки с посевом помещают во влажную камеру, и после пяти-шести дней инкубации, при наличии клеток азотобактера, комочки почвы обрастают его колониями.

Для сравнительной оценки населенности азотобактером разных почв определяют степень обрастания им комочков почвы по отношению к общему числу комочков на чашке. Это дает возможность установить, какая почва богаче азотобактером.

Если колонии со временем приобретают бурую окраску, их относят к *A. chroococcum*; если они образуют зеленый флуоресцирующий пигмент, то в зависимости от морфологии их относят либо к *A. agile*,

либо к *A. vinelandii* (*A. agile*, как правило, обитает в воде). Бесцветные слизистые колонии образуют виды рода *Beijerinckia*, их можно обнаружить в кислых тропических почвах (красноземах).

Микроскопирование и получение накопительной и чистой культуры 2. Для знакомства с возбудителями азотфиксации из колонии готовят фиксированный и окрашенный препараты и просматривают с иммерсионной системой. Клетки азотобактера шаровидные, среди них часто встречаются диплококки.

Для получения накопительной культуры азотобактера можно использовать жидкую среду Бейеринка, 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 (см. 6.2.2); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2.

В колбы Эрленмейера на 100 мл наливают по 30 мл жидкой среды для азотобактера и добавляют 1/3 чайной ложки почвы. Колбы помещают в термостат при 28...30 °С. После пяти-шести дней инкубации опыт снимают; на поверхности среды при наличии азотобактера образуется пленка.

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

Материалы и оборудование 2. Гелевые пластины, пропитанные средой Виноградского для азотобактера (при отсутствии гелевых пластин используют жидкую питательную среду Виноградского или Бейеринка), часовые стекла, почва, палочки с оттянутым концом, цилиндры, колбы Эрленмейера на 100 мл, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

8.3.3. Знакомство с новыми формами азотфиксирующих бактерий. Кроме азотобактера и клостридий азотфиксирующая активность обнаружена у представителей многих групп бактерий: *Achromobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Dexia*, *Desulfovibrio*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Xanthobacter*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Spirillum* и *Aquaspirillum*.

Учет общей численности ассоциативных азотфиксирующих бактерий. Обычно используют глюкозавтолизатную среду, минеральной основой которой служит среда Федорова — Калининской, г на 1 л дистиллированной воды: K_2HPO_4 — 1,74; KH_2PO_4 — 0,91; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,3; NaCl — 0,5, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,1; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ — 0,01. К ней добавляют, г: глюкозу — 10, дрожжевой автолизат — 0,1, бромтимолблау — 0,2, а также смесь витаминов, мкг: биотин — 10, рибофлавин — 200, витамин B_{12} — 2; тиамин, пиридоксин, пантотенат Ca, никотиновую кислоту и парааминобензойную кислоту — по 100.

Среду разливают по 30 мл в конические колбы на 100...150 мл, стерилизуют в течение 20 мин при давлении 0,5 атм и инокулируют в трехкратной повторности разведениями почвенной суспензии от 1:100

до 1:10 000 000. Культивируют при 25...28 °С в течение трех-четырех недель. При подкислении среды до pH 6,0 (желтое окрашивание) добавляют для нейтрализации стерильный раствор NaOH (0,1...0,2 н.). По окончании опыта в вариантах, где есть рост бактерий, определяют азот методом Кьельдаля (см. с. 136). Увеличение исходного содержания азота (0,5...0,7 мг на колбу) на 0,3 мг и более служит показателем азотфиксации. Подсчет наиболее вероятного количества азотфиксирующих ассоциаций в образце проводят по таблицам Мак-Креди (см. табл. 2.).

Если азотфиксирующую активность определяют ацетиленовым методом (см. 11.4.1), поступают так: через пять—семь дней от начала опыта переносят 3 мл культуральной среды в стерильные пенициллиновые флаконы, закрывают их резиновыми пробками с зажимами и инкубируют в атмосфере, где присутствует 10 % ацетилена, в течение суток. Наличие азотфиксации определяют по восстановлению ацетилена до этилена.

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

На описанной среде растут бактерии рода *Xanthobacter*, которые в чистой культуре не используют углеводы. Развиваются также факультативные анаэробы *B. polymyxa*, энтеробактерии. Клостридии и азотобактер на данной среде не развиваются.

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

Азоспириллы — извитые клетки шириной около 1 мкм, подвижные за счет одного или пучка жгутиков в молодом возрасте и теряющие подвижность при переходе в состояние цист в старых культурах. В клетках высоко содержание поли-β-оксимасляной кислоты.

Получение культуры азоспирилл. Отмытые кусочки корней длиной 5...8 мм размягчают при помощи профламбированного пинцета и помещают в элективную полужидкую среду без азота состава, г: L-яблочная кислота — 5; K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2; NaCl — 0,1; $CaCl_2$ — 0,02; KOH — 4; агар-агар — 7,75; дистиллированная вода —

1 л; сюда же добавляют, мл: раствор микроэлементов — 2; бромтимоловый синий (5 %-ный спиртовой раствор); Fe-ЭДТА (1,64 %-ный раствор) — 4, раствор витаминов — 1.

Раствор микроэлементов включает, г на 200 мл дистиллированной воды: $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0,235; H_3BO_3 — 0,28; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,008; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,024; раствор витаминов, г на 10 мл дистиллированной воды: биотин — 10, пиридоксин — 20. Доводят pH среды до 6,8, кипятят до растворения агар-агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С. Не перемешивая среды после инокуляции корнями или почвой инкубируют флаконы 40 ч при 32 °С. Затем проверяют нитрогеназную активность. Если развившиеся на поверхности среды плотные пленки культуры восстанавливают ацетилен, делают рассев на чашки с этой же средой с 1,5 % агар-агара и 20 мг дрожжевого экстракта на 1 л. Через неделю мелкие белые плотные колонии пересевают на полужидкую среду BMS, где микроорганизмы развиваются в виде типичных розовых, реже красных и желтых, часто складчатых колоний. Среду BMS готовят следующим образом. Берут 200 г отмытого очищенного картофеля, нарезанного ломтиками. В марлевом мешке его кипятят 30 мин в 1 л воды, экстракт фильтруют через вату и фильтрат сохраняют. Затем 2,5 г L-яблочной кислоты растворяют в 50 мл воды и добавляют две капли бромтимолового синего и КОН (2 г), пока раствор яблочной кислоты не станет зеленым (pH 7,0).

Готовые растворы яблочной кислоты, витаминов (1 мл) и агар-агар (15 г) добавляют к фильтрату, доводят объем дистиллированной водой до 1 л, кипятят до растворения агар-агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С. Хорошие результаты дает использование картофельного агара без яблочной кислоты и витаминов. При изучении кислых лесных почв, не содержащих ни азоспирилл, ни азотобактера, яблочная среда может быть использована для выделения и учета энтеробактерий (инкубация при комнатной температуре).

Количественный учет ксантобактера. Выполняют в атмосфере H_2 , CO_2 и O_2 по Калининской—Редькиной. Можно определять численность методом предельных разведений на жидкой среде с метанолом. Состав среды на 1 л: минеральная основа по Федорову — Калининской (см. с. 96) и витамины (можно использовать только биотин — 10 мкг/л), метанол — 2,0 г и дрожжевой автолизат — 0,06 г. Ацетилен вводят во флаконы на второй-третий день после посева. Количество образующегося этилена определяют на седьмые сутки инкубации. Численность рассчитывают по таблице Мак-Креди (см. табл. 2). Микрокопируют после высева на минеральные агаризованные среды с метанолом или на картофельный агар.

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

РАЗДЕЛ ВТОРОЙ

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

ГЛАВА 9

ОБЩИЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЧВЫ

9.1. ПОДГОТОВКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ АНАЛИЗА

9.1.1. Взятие средней почвенной пробы и подготовка образца. Среднюю почвенную пробу получают смешиванием отдельных образцов, количество которых зависит от микрорельефа (ровный, волнистый, склон и т. д.) и площади. Рекомендуют с площади 100 м² брать пробу из трех точек, с более 100 м² — из пяти, с 1 га и более — из 15 точек. При исследовании пашни пробы берут с глубины всего пахотного слоя, снимая верхний толщиной 2 см, при изучении микрофлоры почвенного профиля — по генетическим горизонтам (снизу вверх).

Почвенный образец берут стерильным буром, стерильной лопатой и стерильным ножом. Для этого в поле перед взятием образца их тщательно очищают, затем обжигают горящим спиртом. Укладывают образец в заранее приготовленную стеклянную широкогорлую стерильную банку, закрывающуюся корковой пробкой, обернутой стерильной ватой, либо в стерильные полиэтиленовые и пергаментные мешки. На пакеты, банки наклеивают этикетки с указанием места взятия пробы, горизонта и других сведений.

Почвенные образцы анализируют в первые сутки. При необходимости допускается хранение их в холодном помещении (в холодильнике) в течение двух дней. Для придания среднему образцу большей однородности, соблюдая все условия асептики, тщательно перемешивают почву, вынимают корни растений, различные включения.

9.1.2. Приготовление почвенной суспензии и посев. На стерильное часовое стекло стерильным шпателем (или алюминиевой ложкой) помещают 10 г почвы. Чтобы при взвешивании в почву не попали бактерии из воздуха, часовое стекло накрывают другим часовым стеклом. Предварительно стекла взвешивают. Часовые стекла, шпатели и ложки стерилизуют фламбированием.

Навеску почвы переносят в колбу на 250 мл с 90 мл стерильной водопроводной воды, взбалтывают 10 мин, лучше на механической качалке, и дают отстояться грубым частицам почвы.

Одновременно со взятием навески для анализа из средней пробы отбирают 10...20 г почвы для определения ее влажности, так как полу-

ченные при анализе данные пересчитывают на 1 г абсолютно сухой почвы.

Значительно больше микроорганизмов выявляется, если навеску предварительно поместить в стерильную фарфоровую чашку или ступку, увлажнить (0,4...0,8 мл воды или 0,1 %-м раствором пирофосфата $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ на 1 г почвы) и 5 мин растереть стерильным резиновым пестиком или пальцем в стерильной резиновой перчатке до пастообразного состояния.

Перед приготовлением суспензии для каждого образца готовят две стерильные колбы на 250 мл: одна содержит 100 мл стерильной водопроводной воды, другая — пуста. Водой из первой колбы растертую почвенную массу смывают в пустую стерильную колбу. Колбу с суспензией встряхивают 5 мин, оставляют на 30 с и готовят разведения, содержащие разные концентрации почвы. В первой колбе 1 мл суспензии, 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 тоже делать в колбах на 250 мл с 90 мл стерильной водопроводной воды.

Из каждого предыдущего разведения отдельной стерильной пипеткой берут 10 мл суспензии и переносят в следующую колбу с 90 мл воды. Каждый раз пипетку ополаскивают и отставляют. Последующие колбы встряхивают в течение 1 мин.

Из полученных разведений делают посев на плотных и жидких средах. Набор сред зависит от задач бактериологического анализа почвы.

На плотные питательные среды посев проводят преимущественно поверхностно. Для этого агаризованные питательные среды разливают в стерильные чашки Петри и после охлаждения подсушивают в термостате при 40 °С. 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 вертикально около пламени горелки. Посев из каждого выполняют минимум на двух-трех параллельных чашках (желательно на пяти).

При определении количества бактерий в почве пахотного слоя для посева на МПА, крахмалоаммиачном агаре (КАА), среде Чапека используют разведения 10^{-3} и 10^{-4} ; на сусло-агаре, МПА + сусло-агар, бедных средах (нитритный агар), на среде Эшби — разведения 10^{-2} и 10^{-3} . Для почв нижних горизонтов соответственно используют разведения на один порядок меньше.

Для глубинного посева берут 1 мл почвенной суспензии из разведения на порядок меньшего, чем для поверхностного посева.

Суспензию вносят в стерильную чашку Петри, заливают агар-агаром, расплавленным и охлажденным до 45 °С, 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 на 20 мл и стерилизуют. Из каждого разведения, начиная с самого высокого, отдельной стерильной пипеткой берут по 1 мл суспензии и переносят в жидкую среду. Из каждого разведения засевают минимум две пробирки или колбы, лучше три—пять.

Когда численность отдельных групп микроорганизмов в почве невысокая, их выявляют методом обрастания комочков почвы по Виноградскому (см. 10.2.1). Отмытые от следов хлора (см. 7.2.1) и прокипяченные или простерилизованные гелевые пластинки пропитывают 3...5 мл элективной среды для соответствующей группы микроорганизмов. Обычно среду упаривают в сушильном шкафу при 40...50 °С до образования эмалевой поверхности (см. 8.2.1). По поверхности раскладывают по трафарету 40...50 комочков почвы диаметром 1...2 мм.

Чашки помещают во влажную камеру и ставят в термостат. Если в комочках почвы находятся соответствующие микроорганизмы, то они начинают развиваться и формируют вокруг комочков колонии. Затем вычисляют количество обросших комочков почвы (в % их исходного числа). После определенного срока инкубации при 28...30 °С культуры анализируют.

9.2. Состав и приготовление питательных сред для разных групп микроорганизмов

9.2.1. Группы микроорганизмов, выявляемые на плотных средах. Микроорганизмы, использующие органические формы азота, выявляют на МПА. Для учета бациллярных форм микроорганизмов по Е. Н. Мишустину рекомендуют применять смешанный агар: МПА + сусло в отношении 1:1. МПА готовят обычным способом, сусло-агар — из семи-баллингового сусла (рН 7,0) и 2 % агар-агара. Смешивают МПА и сусло-агар перед посевом и разливают в чашки Петри.

Почвенную суспензию из соответствующего разведения (10^{-1} и 10^{-2}) в течение 15 мин пастеризуют перед посевом при 70 °С. Бациллярных форм выявляется больше, если почву перед приготовлением разведений подсушить при комнатной температуре.

Микроорганизмы (в том числе актиномицеты), способные использовать минеральные формы азота, чаще выявляют на КАА, содержащем, (грамм на 1 л дистиллированной воды): крахмала (растворимый) — 10; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2; K_2HPO_4 — 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1; NaCl — 1; CaCO_3 — 3; агар-агара — 20. Крахмал приливают к среде, предварительно растворив в небольшом количестве воды.

Для выявления указанной группы микроорганизмов можно использовать и среду Чапека следующего состава, грамм на 1 л дистиллированной воды: сахароза или глюкоза — 20,0; NaNO_3 — 2,0; K_2HPO_4 — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; KCl — 0,5; CaCO_3 — 3,0; агар-агар — 20,0.

При изучении актиномицетов используют также среды с глюкозой: среда 1, грамм на 1 л дистиллированной воды: глюкоза — 14,0;

CaCO_3 — 0,7; KNO_3 — 0,7; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,35; NaCl — 0,35; K_2HPO_4 — 0,35; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — следы; агар-агар — 20,0;

среда 2, грамм на 1 л дистиллированной воды: глюкоза — 10; цитрат натрия — 11,2; KH_2PO_4 — 2,38; K_2HPO_4 — 5,65; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,64; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 1,21; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,012; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,11; CuSO_4 — 0,006; MnCO_3 — 0,0012; агар-агар — 20,0.

Микроорганизмы, участвующие в минерализации гумусовых веществ (автохтонной микрофлоры), обнаруживают на следующих средах.

Водный агар (по Эрскову): к 1 л водопроводной воды прибавляют 2...2,5 % хорошо отмытого агар-агара и 20 мин стерилизуют при 120 °С.

Агаризованная почвенная вытяжка: к 1 л почвенной вытяжки добавляют 0,5 г K_2HPO_4 и 20...25 г агар-агара. Среду стерилизуют при 0,5 атм 30 мин. Почвенную вытяжку лучше готовить по Фишеру: к 1 кг почвы с высоким содержанием гумуса приливают 1 л 0,1 %-го Na_2CO_3 и нагревают 30 мин в автоклаве при 115 °С.

Вытяжку фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Если фильтрат получается мутным, его осветляют кипячением с тальком и снова фильтруют. К 100 мл экстракта добавляют 900 мл воды.

На нитритном агаре, приготовленном по методу Виноградского, лучше выявляются представители автохтонной микрофлоры, так как нитрит ингибирует рост бациллярных форм, подавляющих микроорганизмы автохтонной группы. Нитритный агар готовят следующим образом: к среде для второй фазы нитрификации (см. 8.2.2) добавляют 20 г/л хорошо вымоченного в дистиллированной воде агар-агара и стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Азотобактер и олигонитрофильные микроорганизмы (в том числе дрожжи *Lipomyces*) учитывают на среде Эшби (см. 8.3.2).

Микроскопические грибы чаще обнаруживают на сусло-агаре, но можно использовать также кислую среду Чапека.

Для приготовления сусло-агара берут семибаллинговое сусло, разводят в три раза водой и добавляют 2 % агар-агара. Среду стерилизуют 30 мин в автоклаве при 0,5 атм или кипятильнике Коха при 100 °С также 30 мин три раза через сутки (дробная стерилизация).

Перед добавлением к почвенной суспензии, внесенной в чашки Петри, расплавленного сусло-агара к нему приливают 2 мл стерильной молочной кислоты (на 1 л субстрата) или 0,5 г стерильной лимонной кислоты.

При приготовлении среды Чапека для грибов в среде, подготовленной для выявления актиномицетов, двузамещенный фосфат калия заменяют эквивалентным количеством однозамещенного фосфата калия (см. выше).

Перед тем как расплавленную среду Чапека внести в чашки Петри к ней добавляют 4 мл/л стерильной концентрированной молочной кислоты.

9.2.2. Группы микроорганизмов, выявляемые на жидких средах

(метод предельных разведений). Аэробные целлюлозоразрушающие микроорганизмы количественно можно учесть на среде Имшенецкого и Солнцевой, содержащей, %: NaNO_3 — 0,25; K_2HPO_4 — 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,03; NaCl — 0,01; CaCl_2 — 0,01; CaCO_3 — 0,5; добавлять мел необязательно.

По 5 мл среды разливают в пробирки, источником углерода берут полоску фильтровальной бумаги длиной 7...10 см, не содержащей крахмала (реакция с раствором Люголя). Полоска на 4...5 см должна выступать над средой. Стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Нитрифицирующие бактерии учитывают на жидкой среде Виноградского для бактерий первой фазы нитрификации (см. 8.2.2). Среды разливают по 25 мл в колбы Эрленмейера на 100 мл и стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Денитрифицирующие бактерии выявляют на среде Гильята. Готовят два раствора: первый — KNO_3 — 2,1 г; аспарагин — 10 г; дистиллированная вода — 250 мл; второй — цитрат натрия — 5,0 г; KH_2PO_4 — 2,0 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 2,0 г; CaCl_2 — 2,0 г; FeCl_3 — следы; дистиллированная вода — 500 мл.

Растворы сливают вместе, устанавливают pH 6,8...7,0, объем доводят дистиллированной водой до 1000 мл. Хорошие результаты получаются и на более простой среде (см. 8.2.3).

Анаэробные азотфиксаторы (*Clostridium pasteurianum*) учитывают на среде Виноградского (см. 8.3.2). Источником углерода служит глюкоза — 20,0 г на 1 л дистиллированной воды.

Среду разливают по 9 мл в пробирки (половину пробирки). Перед стерилизацией в них опускают опрокинутый поплавочек для улавливания газов (см. 6.2.3).

9.2.3. Группы микроорганизмов, выявляемые методом обрастания комочков почвы. Для определения качественного состава почвы и относительной оценки населенности почвы аэробными целлюлозоразрушающими микроорганизмами используют гелевые пластины или пластины из "голодного" агара.

На пластинах помещают кружок стерильной фильтровальной бумаги, увлажненной стерильной средой Виноградского (см. 7.2.1) или средой Гетчинсона, затем по фильтровальной бумаге раскладывают (по трафарету) 50 комочков почвы диаметром 1...2 мм.

Среда Гетчинсона имеет следующий состав, г 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 %-го раствора Na_2CO_3 .

Нитрифицирующие бактерии выявляют на гелевых пластинах, пропитанных 5 мл питательной среды Виноградского (см. 8.2.2) для первой или для второй фазы нитрификации. Пластины подсушивают в сушильном шкафу при 40...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 (см. 8.3.2).

9.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛЕННОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ

9.3.1. Учет на плотных средах (на 1 г абсолютно сухой почвы). Заселенные среды после инкубации вынимают из термостата и подсчитывают в них число колоний. Одновременно после сушки бюксов с навесками при 105 °С до постоянной массы определяют содержание абсолютно сухой почвы в 1 г анализируемой сырой почвы (см. 5.1.1).

При подсчете колоний на богатых плотных питательных средах (МПА, МПА + сусло-агар; КАА, сусло-агар, среда Чапека, среда Эшби и т. д.) закрытые чашки Петри просматривают в проходящем свете и с внешней стороны отмечают колонии чернилами или тушью. Чтобы не пропустить мелкие колонии, чашки дополнительно просматривают под лупой. Желательно использовать специальный прибор с арифмометром. Если на чашке больше 200 колоний, то их можно подсчитывать с помощью камеры Вольфюгеля.

Число колоний на бедных средах (нитритный агар, "голодный" агар, агаризованный почвенный экстракт и т. д.) определяют под микроскопом (окуляр 10х и объектив 3х, в крайнем случае — окуляр 10х и объектив 8х).

В чашках Петри сначала учитывают 100 полей зрения, затем выводят среднее арифметическое на одно поле. Для определения числа колоний в чашке среднее число на одно поле зрения переводят на общую ее площадь. Устанавливают площадь чашки Петри (P) и площадь поля зрения (p), в тем чтобы выявить, сколько полей зрения используемой системы помещается на площади чашки. Для этого площадь чашки делят на площадь поля зрения и получают коэффициент ($K = P/p$), на который умножают среднее число колоний в поле зрения на чашке.

Устанавливают диаметр чашки Петри визуально, а поля зрения — под микроскопом, используя для малых увеличений миллиметровую бумагу, а для больших (объективы 40х и 90х) — объективный микрометр.

Подсчитав при поверхностном посеве число колоний на чашке, находят содержание зародышей в 1 мл соответствующего разведения, умножая число колоний на 20, так как посеяно было 0,05 мл. Чтобы определить число клеток в 1 г сырой почвы, их содержание в 1 мл умножают на степень разведения (10^3 , 10^4 , 10^5 и т. д.).

Для учета микроорганизмов в 1 г абсолютно сухой почвы число клеток в 1 г сырой почвы делят на количество абсолютно сухой почвы, содержащейся в 1 г сырой почвы.

Пример расчета. Установлено, что при поверхностном посеве почвенной суспензии из разведения 10^{-3} число колоний на чашке равно 52; влажность почвы 25 %; при такой влажности 1 г сырой почвы содержит 0,75 г абсолютно сухой почвы. Число клеток на 1 г абсолютно сухой почвы (X) определяют по формуле

$$X = \frac{52 \cdot 20 \cdot 1000}{0,75} = 1\,386\,666.$$

При глубинном посеве число колоний на 1 г абсолютно сухой почвы подсчитывают так же, но не умножают на 20, так как при высеве используют 1 мл суспензии.

Подсчет желательно 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. Определяют визуально на четвертый день после посева. При наличии колоний *B. 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.

Учет микрофлоры на КАА. Колонии на таком агаре подсчитывают на седьмой—десятый день. Из общего числа микроорганизмов отдельно учитывают: пигментные — желтые и другие микобактерии, образующие мелкие куполообразные колонии, актиномицеты (*Streptomyces*).

Отмечают окраску колоний, воздушного мицелия (серый, белый, зеленовато-серый, розовый) и среды (выделение пигмента в субстрат). Для описания пигментации можно использовать специальные пособия по определению цвета.

При идентификации актиномицетов описывают консистенцию колоний (плотные, кожистые, рыхлые), поверхность (мучнистая, бархатистая) и запах (землистый, эфирный, фруктовый).

Учет микроорганизмов на бедной среде (нитритный агар — см. 9.2.1). Колонии определяют под микроскопом на шестой—седьмой 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.

По культуральным признакам выделяют следующие роды:

Nocardia (= *Proactinomyces*) — колонии пастообразные, слизистые, сухие; по периферии образуется мицелиальная зона или мицелиальный ободок (рис. 30, а), состоящий из субстратного и надсубстратного мицелия; в центре колонии чаще преобладают фрагментированные гифы, состоящие из палочковидных и кокковидных клеток; колонии бесцветные, лимонно-желтые, желтые, розовые, красные;

Mycobacterium (см. с. 57).

Arthrobacter — колонии мелкие, плоские или слегка приподнятые, бесцветные, иногда с зеленовато-желтым оттенком; по периферии образуется круговой или складчатый ободок (рис. 30, г); у отдельных представителей края колоний зазубренные; молодая культура состоит из мелких искривленных палочек, затем они довольно быстро распадаются, чаще на кокковидные клетки;

переходные формы от *Nocardia* к микобактериям — в центре, а чаще по периферии колонии образуется недоразвитый мицелий, в редких случаях мицелий врастает в субстрат в виде кустистых образований;

микромоноспоры — компактный мицелий полностью погружен в субстрат и едва заметен под микроскопом. На поверхности агар-агара

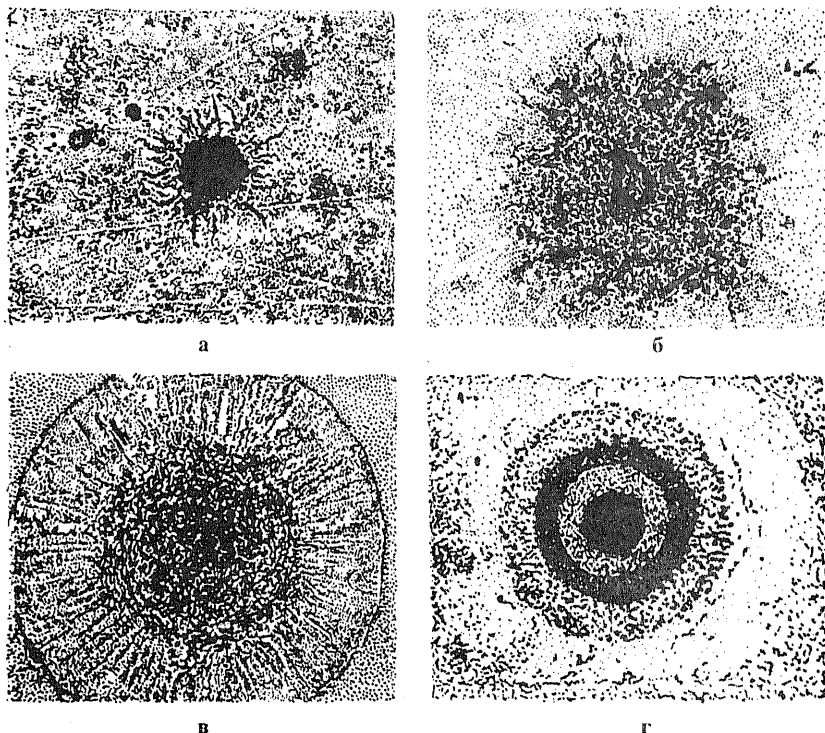


Рис. 30. Характер роста колоний на бедной среде (нитритном агаре):
а – *Nocardia*; б – *Bacteroides*; в – *Micromonosporaceae*; г – *Arthrobacter*

кольцеобразно или радиально располагаются бесцветные или темно-окрашенные комочки слизи, содержащие споры (рис. 30, в);

Bacteroides – колонии мелкие в виде розовой или белой бархатистой пленки; в центре она складчатая, а по периферии – стекловидная; край колонии волнистый или лопастный (рис. 30, б).

Учет на среде Эшби. Проводят на пятые-шестые сутки. Отдельно подсчитывают колонии азотобактера – плоские, слизистые, мажущейся консистенции, диаметром 5...10 мм и олигонитрофильные бактерии – мелкие слизистые бесцветные колонии. Олигонитрофильные дрожжи – *Lipomyces* – образуют слизистые молочно-белые колонии.

Учет грибов на агаровых средах. Колонии грибов на сусло-агаре или среде Чапека подсчитывают через двое суток инкубации. После семи дней определяют 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

$$\bar{X} \pm 2\sigma_{\bar{X}} K 1/V,$$

где $\bar{X} = \Sigma X/n$ – среднее число колоний, выросших при посеве из данного разведения; ΣX – общее число подсчитанных колоний при посеве данного разведения; n – число повторностей; $\sigma_{\bar{X}} = \pm \sqrt{\Sigma X/n}$ – среднее квадратическое отклонение; 2 – (t)-критерий при $P_0, 95$; K – разведение, из которого проведен посев; V – объем суспензий, взятый для посева, мл.

Если уровень достоверности 99 %, то (t)-критерий равен 2,7, поэтому для $P_0, 99$ формула имеет следующий вид:

$$\bar{X} \pm 2,7\sigma_{\bar{X}} K 1/V.$$

Пример учета численности колоний микроорганизмов приведен в таблице 1.

1. Численность колоний микроорганизмов, выросших на МПА (пример)

Разведение	Повторность	Число колоний в чашках	$\Sigma \bar{X}$	\bar{X}	$\sigma_{\bar{X}}$	Наиболее вероятное число микроорганизмов в 1 г исходного субстрата при $P_0, 95$ (доверительный интервал)
10 ⁻⁴	1	125				
	2	127				
	3	129				
	4	130				

9.3.2. Учет на жидких средах. При определении численности микроорганизмов на этих средах отмечают крестом пробирки с разведением, в которых развились представители данной группы. Затем для более точного подсчета 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 (табл. 2).

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 умно-

**2. Экспресс-обработка результатов учета микроорганизмов
по методу предельных разведений (таблица Мак-Креди)**

Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микробов при заражении параллельных пробирок			
	2	3	4	5
000	0,0	0,0	0,0	0,0
001	0,5	0,3	0,2	0,2
002	—	—	0,5	0,4
003	—	—	0,7	—
010	0,5	0,3	0,2	0,2
011	0,9	0,6	0,5	0,4
012	—	—	0,7	0,6
013	—	—	0,9	—
020	0,9	0,6	0,5	0,4
021	—	—	0,7	0,6
022	—	—	0,9	—
030	—	—	0,7	0,6
031	—	—	0,9	—
040	—	—	0,9	—
041	—	—	1,2	—
100	0,6	0,4	0,3	0,2
101	1,2	0,7	0,5	0,4
102	—	1,1	0,8	0,6
103	—	—	1,0	0,8
110	1,3	0,7	0,5	0,4
111	2,0	1,1	0,8	0,6
112	—	—	1,1	0,8
113	—	—	1,3	—
120	2,0	1,1	0,8	0,6
121	3,0	1,5	1,1	0,8
122	—	—	1,3	1,1
123	—	—	1,6	—
130	—	1,6	1,1	0,8
131	—	—	1,4	1,0
132	—	—	1,6	—
140	—	—	1,4	1,1
141	—	—	1,7	—
200	2,5	0,9	0,6	0,5
201	5,0	1,4	0,9	0,7
202	—	2,0	1,2	0,9
203	—	—	1,6	1,2
210	6,0	1,5	0,9	0,7
211	13,0	2,0	1,3	0,9
212	20,0	3,0	1,6	1,2
213	—	—	2,0	—
220	25,0	2,0	1,3	0,9
221	70,0	3,0	1,6	1,2
222	110,0	3,5	2,0	1,4
223	—	4,5	—	—
230	—	3,0	1,7	1,2
231	—	3,5	2,0	1,4
232	—	4,0	—	—

Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микробов при заражении параллельных пробирок			
	2	3	4	5
240	-	-	2,0	1,4
241	-	-	3,0	-
300	-	2,5	1,1	0,8
301	-	4,0	1,6	1,1
302	-	6,5	2,0	1,4
303	-	-	2,5	-
310	-	4,5	1,6	1,1
311	-	7,5	2,0	1,4
312	-	11,5	3,0	1,7
313	-	16,0	3,5	2,0
320	-	9,5	2,0	1,4
321	-	15,0	3,0	1,7
322	-	20,0	3,5	2,0
330	-	25,0	3,0	1,7
331	-	45,0	3,5	2,0
332	-	110,0	4,0	-
333	-	140,0	5,0	-
340	-	-	3,5	2,0
341	-	-	4,5	2,5
350	-	-	-	2,5
400	-	-	2,5	1,3
401	-	-	3,5	1,7
402	-	-	5,0	2,0
403	-	-	7,0	2,5
410	-	-	3,5	1,7
411	-	-	5,5	2,0
412	-	-	8,0	2,5
413	-	-	11,0	-
414	-	-	14,0	-
420	-	-	6,0	2,0
421	-	-	9,5	2,5
422	-	-	13,0	3,0
423	-	-	17,0	-
424	-	-	20,0	-
430	-	-	11,5	2,5
431	-	-	16,5	3,0
432	-	-	20,0	4,0
433	-	-	30,0	-
434	-	-	35,0	-
440	-	-	25,0	3,5
441	-	-	40,0	4,0
442	-	-	70,0	-
443	-	-	140,0	-
444	-	-	160,0	-
450	-	-	-	4,0
451	-	-	-	5,0
500	-	-	-	2,5
501	-	-	-	3,0

Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микробов при заражении параллельных пробирок			
	2	3	4	5
502	-	-	-	4,0
503	-	-	-	6,0
504	-	-	-	7,5
510	-	-	-	3,5
511	-	-	-	4,5
512	-	-	-	6,0
513	-	-	-	8,5
520	-	-	-	5,0
521	-	-	-	7,0
522	-	-	-	9,5
523	-	-	-	12,0
524	-	-	-	15,0
525	-	-	-	17,5
530	-	-	-	8,0
531	-	-	-	11,0
532	-	-	-	14,0
533	-	-	-	17,5
534	-	-	-	20,0
535	-	-	-	25,0
540	-	-	-	13,0
541	-	-	-	17,0
542	-	-	-	25,0
543	-	-	-	30,0
544	-	-	-	35,0
545	-	-	-	45,0
550	-	-	-	25,0
551	-	-	-	35,0
552	-	-	-	60,0
553	-	-	-	90,0
554	-	-	-	100,0
555	-	-	-	180,0

жают на степень разведения, при которой отмечен рост во всех параллельных пробирках.

Пример расчета.

Разведение	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Число параллельно засеянных пробирок	4	4	4	4	4
Число пробирок, в которых обнаружен рост	4	4	2	1	0

Числовая характеристика составляет 421; вероятное число клеток 9,5 (найденно в таблице). Для учета зародышей в 1 г абсолютно сухой почвы полученное число клеток умножают на 1000 (поскольку первая цифра числовой характеристики определяет соответствующее разведение: 10^{-3} или 0,001) и делят на массу абсолютно

сухой почвы, содержащейся в 1 г сырой почвы (учитывая 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:

$$95 \cdot 1000/0,75 = 12\,666.$$

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 восьмой–десятый день инкубации в термостате по образованию колоний и разрушению целлюлозы на границе между жидкой средой и воздухом.

9.3.3. Учет методом обрастания комочков почвы. Подсчитывают комочки, образовавшиеся вокруг колоний, а затем определяют, какое соотношение (в %) они составляют с общим числом комочков почвы (относительная оценка плотности населения учитываемых групп микроорганизмов в почве).

Рост нитрифицирующих бактерий устанавливают по образованию зон растворения CaCO_3 или MgCO_3 . Кроме того, из этих зон вырезают кусочки геля и делают пробу на NH_3 (реактив Нesslerа), на нитрит (цинк-йод-крахмал в присутствии H_2SO_4) и на нитрат (дифениламин).

Наличие колоний азотобактера на гелевых пластинах определяют на третьи–пятые сутки инкубации по сероватым слизистым колониям, которые постепенно приобретают темно-бурый (*A. chroococcum*) или зеленый цвет (*A. agile*).

Учет аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов на гелевых пластинах выполняют на восьмой–десятый день инкубации. Кроме общего подсчета обросших комочков почвы, отдельно определяют количество комочков, обросших бактериями, актиномицетами и грибами (в %).

Можно выделить следующие роды бактерий: *Cytophaga*, *Cellvibrio*, *Mucococcus*, *Polyangium* и *Sorangium* (см. 7.2.1).

Из грибов, разрушающих целлюлозу, часто можно обнаружить представителей следующих родов:

Dematium — образуют одноклеточные бесцветные конидии округлой или овальной формы. Вегетативные клетки темные, цилиндрические, собраны в цепочки (рис. 31, а). Колонии на целлюлозе имеют вид черных пятен;

Stachybotrys — колонии черные, бархатистые, под микроскопом обнаруживаются спорангии, покрытые темноокрашенными спорами (рис. 31, б).

Cladosporium — конидиеносцы длинные, многоклеточные, от них отпочковываются неправильной формы конидии (рис. 31, в). Колонии окрашены в светлый оливково-зеленый цвет;

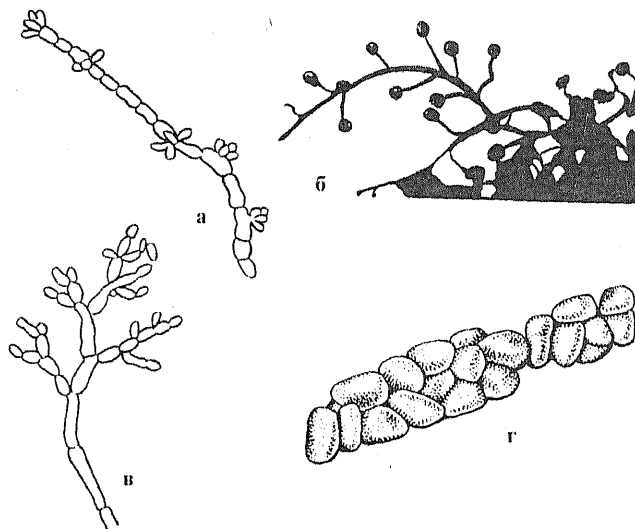


Рис. 31. Грибы, разрушающие целлюлозу:

а – *Dematium*; б – *Stachybotrys*; в – *Cladosporium*; г – хламидоспоры эпифитного гриба *Fumago* на целлюлозе

Fumago – колонии на целлюлозе темные и состоят из скоплений узелков темных овальных и округлых хламидоспор (рис. 31, г).

Chaetomium – образуют перитеции серого или зеленоватого цвета; аспорогенные грибы – образуют желтый или белый мицелий без спороношения.

Материалы и оборудование для работ 9.3.1...9.3.3. Питательные среды в колбах (МПА и КАА), жидкие среды в пробирках: среда для аэробных целлюлозоразрушающих бактерий, среда Гильтая, среда для анаэробных азотфиксаторов; силикагелевые пластины, пропитанные питательной средой для азотобактера и аэробных целлюлозоразрушающих бактерий; стерильные чашки Петри, колбы со стерильной водопроводной водой по 90 мл, стерильные пипетки Мора на 10 мл, стерильные градуированные пипетки на 1 мл, стерильные шпатели Дригальского, часовые стекла, стеклянные палочки с оттянутыми концами; свежие пробы почвы разных типов; чайные ложки, пинцеты, трафареты, лупы, микроскопы, предметные стекла и все необходимое для приготовления окрашенных препаратов, препаратов в раздавленной капле и микроскопирования.

9.3.4. Определение общей численности микроорганизмов в почве прямым подсчетом под микроскопом. Этим способом наиболее точно устанавливают численность зародышей в почве. Он стал возможным после того, как американский микробиолог Конн предложил применять для окрашивания почвенной суспензии кислые красители, хорошо прокрашивающие вегетативные клетки микроорганизмов и слабо – почвенные частицы.

Методом Виноградского наиболее точно определяют численность микроорганизмов в почве. Исследования по его методу показали, что разные почвенные фракции содержат неодинаковое число микроорганизмов. Меньше всего их во фракции крупных частиц почвы, больше всего — в дисперсной фракции, содержащей максимум органического вещества. Метод имеет ряд достоинств, но очень труден для широкого использования.

Метод Виноградского в модификации Шульгиной чаще применяют в лабораторной практике. Сущность его в следующем. Из средней почвенной пробы (см. 9.1.1) берут 5 г и вносят в колбу Эрленмейера на 250 мл, содержащую 50 мл стерильной водопроводной воды. Навеску почвы предварительно растирают в стерильной агатовой или фарфоровой ступке с небольшим количеством стерильной воды. Для черноземных и темно-каштановых почв навеску растирают с 0,1 %-м раствором пирогенфосфата натрия. Затем 5 мин встряхивают и в течение 2...5 с дают осесть грубым частицам.

Из полученной взвеси стерильной градуированной пипеткой берут 0,01 мл и переносят на хорошо обезжиренное стекло. Одновременно с суспензией на стекло помещают каплю 0,1 %-го раствора агар-агара (хорошо отмытый агар-агар готовят на дистиллированной воде). Агар-агар и суспензию на стекле перемешивают и стерильным покровным стеклом распределяют по трафарету на 4 см². Трафарет готовят следующим образом: на миллиметровой бумаге тушью заштриховывают квадрат 4 см² и приклеивают его к предметному стеклу с нижней стороны.

Препарат сушат, фиксируют 96 %-м спиртом и красят карболовым эритрозином (от 30 мин до одних суток). При окрашивании стекла погружают в раствор эритрозина. Остаток красителя смывают, опуская стекла в воду тыльной стороной. Затем препарат снова сушат и просматривают под микроскопом с иммерсионной системой.

Для получения более точных результатов подсчитывают десять полей зрения и среднее число клеток на одно поле зрения. Одновременно устанавливают площадь поля зрения: $p = \pi r^2$ (см. 5.1.3). Диаметр поля зрения измеряют при помощи объектного микрометра. Затем находят, сколько полей зрения (K) размещается на площади мазка (P) в 400 мм² по формуле $K = P/p$.

Пример расчета. Если диаметр поля зрения равен 0,16 мм, площадь поля зрения соответствует 0,02 мм², то

$$K = P/p = 400 \text{ мм}^2 / 0,02 \text{ мм}^2 = 20\,000.$$

Среднее число клеток в поле зрения умножают на K и устанавливают число клеток в 0,01 мл суспензии. Для определения численности их в 1 мл суспензии полученное число умножают на 100, а в 1 г абсолютно сухой почвы — на степень разведения и делают на навеску абсолютно сухой почвы, содержащейся в 1 г сырой почвы.

Использование метода прямого учета Виноградского в модифика-

ции Шульгиной показало, что в почве содержится в сотни и тысячи раз больше клеток микроорганизмов, чем удается учесть методом питательных пластин.

Метод учета численности бактерий в почве при помощи люминесцентной микроскопии по Звягинцеву и Кожевину дает еще более достоверный результат по сравнению с методом Виноградского. Суть его в том, что приготовленные из почвенной суспензии препараты окрашивают специальным красителем акридином оранжевым (флуорохромом). Окрашившиеся в ярко-зеленый цвет клетки хорошо заметны на темном или красном фоне почвенных частиц и препарата, причем микроскопия в отраженном свете позволяет учитывать и адсорбированные клетки, которые, как правило, не видны в проходящем свете.

Порядок подготовки препарата следующий.

1. Почвенную суспензию, взятую в соотношении 1:10 (10 г почвы на 90 мл воды), обрабатывают на ультразвуковой установке УЗДН 13 мин при силе тока 0,40 А, частоте 15 кГц. Затем переносят в мерный цилиндр на 100 мл. После отстаивания в течение 2 мин пипеткой отбирают 2 мл суспензии из средней фракции, т. е. возле отметки на цилиндре "50 мл", и переносят в колбу с 18 мл воды.

2. Колбу энергично встряхивают, суспензию из нее наносят микропипеткой на тщательно обезжиренное предметное стекло (0,01 мл на препарат) и равномерно распределяют петлей на площади 4 см² (квадрат). На каждом стекле можно приготовить три препарата. Предварительно лучше начертить расположение препаратов в натуральную величину на бумаге и на нее класть предметные стекла для приготовления препаратов.

3. Препараты высушивают на воздухе при комнатной температуре. Затем после фиксации легким нагреванием на пламени газовой горелки окрашивают водным раствором акридина оранжевого (разведение 1:10 000) 2...4 мин.

4. Избыток флуорохрома удаляют в процессе промывки, для чего стекла погружают на 10 мин в стакан или кювету с водопроводной водой. Окрашенные препараты высушивают при комнатной температуре.

5. Для микроскопии на препарат наносят каплю воды и покрывают покровным стеклом. Приготовленный препарат не должен содержать пузырьков воздуха, лишнюю воду снимают фильтровальной бумагой. Препарат просматривают на люминесцентном микроскопе МЛ-2 или МЛ-4 (фильтры ФС-1-2, ЖЭС-19, ЖС-18, объектив 90 Лх, окуляры 4х или 5х).

Число клеток микроорганизмов, содержащихся в 1 г почвы, определяют по формуле

$$M = \frac{4 \cdot a \cdot H}{p} \cdot 10^{10},$$

где 4 – площадь квадрата, см²; а – среднее число клеток в поле зрения; H – показатель разведения (в данном случае H = 100, что приемлемо для поверхностных

горизонтов почв основных типов, однако степень разведения может быть изменена в зависимости от численности микроорганизмов в конкретном образце; желательно подобрать разведение таким образом, чтобы в поле зрения было в среднем пятьдесят клеток; 10^{10} – коэффициент, который получается при измерении площади мазка в микрометрах и расчете N в миллилитрах, p – площадь поля зрения, мкм^2 .

Из каждого почвенного образца готовят два препарата и на каждом подсчитывают клетки в пяти полях зрения. Поля зрения выбирают не произвольно, а переходят к новому полю зрения, поворачивая микровинт столика на определенную величину.

Учет при помощи люминесцентной микроскопии требует соответствующего оборудования. При его отсутствии следует применять метод Виноградского в модификации Шульгиной.

Материалы и оборудование. Средняя почвенная проба, колбы Эрленмейера на 250 мл с 50 мл стерильной водопроводной воды, пустые стерильные колбы на 250 мл, 0,1 %-й раствор пирофосфата натрия, фарфоровая (или агатовая) ступка с пестиком, 96 %-й этиловый спирт, хорошо обезжиренные предметные и покровные стекла, стерильные градуированные пипетки на 1 мл, 0,1 %-й агар-агар, карболовый раствор эритрозина, трафареты на 4 см^2 , объект-микрометр, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

ГЛАВА 10

ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБНЫХ ЦЕНОЗОВ ПОЧВЫ И МИКРООРГАНИЗМОВ РИЗОСФЕРЫ

10.1. ОБЩИЙ СОСТАВ И СООТНОШЕНИЕ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

10.1.1. Метод обрастания стекол по Холодному. Сущность метода в следующем. На ровной поверхности почвы делают ножом разрез, глубина которого зависит от исследуемого горизонта. Отмытые и обезжиренные стекла плотно прикладывают к вертикальной стенке разреза (одновременно берут несколько стекол). Их плотно прижимают к стенке и засыпают почвой. В пахотном слое стекла помещают 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 убирают, стекло откидывают от стенки и вынимают. Нижнюю сторону вытирают сухой тряпкой, а верхнюю – высушивают на воздухе и фиксируют трижды, проводя нижней стороной над пламенем горелки. После фиксации стекло погружают в воду верхней стороной вниз, не доводя до дна. При этом крупные частицы почвы, отмоякая, 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 иммерсион-

ной системой. При микроскопировании отмечают характер микрофлоры, плотность обрастания и доминирующие формы. Отдельные ассоциации можно запечатлеть, используя микрофотосъемку.

10.2. МИКРООРГАНИЗМЫ, РАЗЛАГАЮЩИЕ ГУМУСОВЫЕ ВЕЩЕСТВА

10.2.1. Метод Виноградского. Для выявления автохтонной (местной почвенной) группы микроорганизмов, минерализующих гумусовые вещества, С. Н. Виноградский рекомендует отмытые от следов хлора и прокипяченные гелевые пластины пропитать минеральной средой без источников углерода и азота, г на 200 мл дистиллированной воды: K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; $NaCl$ — 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ — 0,01.

В чашку вносят 3...5 мл минеральной среды, а как единственный источник углерода и азота добавляют гумат кальция.

Чашки Петри с гелевыми пластинами с гуматами и комочками почвы (см. 8.2.1) помещают во влажную камеру крышками вниз и выдерживают при 25...28 °С 40...50 дней и более. Вокруг комочков почвы на гумате появляются специфичные бурые колонии в виде тонких бархатистых налетов розового и белого цвета — *Bactoderma alba*, *B. rosea*.

10.2.2. Метод Виноградского в модификации Теппер. В отличие от метода Виноградского Е. З. Теппер (автор модификации) добавляет к 3...5 мл минеральной среды 0,3 г $CaCO_3$, а вместо гумата кальция использует более подвижную и доступную для микроорганизмов форму — гумат натрия (10...50 мл). Вместо комочков почвы Е. З. Теппер рекомендует добавлять 1 мл почвенной суспензии разведения 10^{-2} . Содержимое чашки также тщательно перемешивают, подсушивают до эмалевой поверхности, помещают во влажную камеру и выдерживают при 25...28 °С.

Через 50...60 дней инкубации на поверхности гелевых пластин с гуматами появляются мелкие колонии бурого и желто-бурого цвета. Диаметр отдельных колоний — от 0,5 до 1,0...1,5 мм, после четырех месяцев инкубации — 1...2,5 мм. Более крупные колонии микроорганизмов образуются, если гуматы используют только как источник углерода. В этом случае в минеральную среду вносят еще азот в виде KNO_3 (14 мг на чашку).

При просмотре колоний под микроскопом с увеличением 30х и 80х у многих из них по периферии обнаруживается мицелиальная зона, состоящая из фрагментарных гифов, характерных для представителей рода *Nocardia*. При посеве бурых и желто-бурых колоний на нитритном агаре (см. 9.2.1) было показано, что часть из них образуют микроорганизмы рода *Nocardia*, микобактерии и *Arthrobacter*. Часть бурых колоний образуют на гумате представители семейства *Micromonosporaceae*.

В более поздние сроки инкубации (через пять-шесть месяцев и позже) появляются бактерии рода *Bactoderma* (*B. alba* и *B. rosea*). Для

выявления последних к нитритному агару следует добавить дрожжевой автолизат.

Описанным путем можно изучить микрофлору, участвующую в разложении не только гумата натрия, но и фульвокислот. В этом случае к основной минеральной среде, указанной выше, можно добавить 10...50 г фульвокислоты.

Метод Виноградского в модификации Теппер дает возможность изучить и сукцессию микроорганизмов, участвующих в разложении гумусовых кислот. С этой целью при постановке опыта чашки с гумусовыми кислотами (фульвокислоты или гуминовые кислоты), инфицированные почвенной суспензией (10^{-2}) в многократной повторности, помещают во влажную камеру и в термостат при 25...28 °C. В разные сроки инкубации (через два, четыре, шесть, восемь и 360 дней) вынимают две параллельные чашки и изучают в них микрофлору.

Поскольку в гумусовых кислотах отношение C:N < 25:1, то при разложении их выделяется аммиак. Однако аммиак не накапливается, а по мере образования окисляется нитрифицирующими бактериями. Поэтому в процессе окисления гумусовых кислот (через четыре, шесть и восемь месяцев инкубации) наряду с микроорганизмами автохтонной группы (*Nocardia*, *Bactoderma*, *Mycobacterium*, см. 10.3.3) на гелевых пластинах с гумусовыми кислотами обнаруживаются зоны с клетками *Nitrosomonas*.

10.3. МИКРОБНЫЕ ЦЕНОЗЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В РАЗЛОЖЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ И НЕОРГАНИЧЕСКИХ ОСТАТКОВ В ПОЧВЕ

10.3.1. Разложение микроорганизмами свежих органических остатков с образованием гумуса. Основным источником гумуса в почве, кроме пожнивных остатков, служит навоз. Однако его не всегда бывает достаточно для обеспечения потребности растений в органических веществах. В связи с этим особый интерес представляет рисовая солома, непригодная для кормовых целей.

Выход гумуса при внесении такой соломы в почву зависит от ряда факторов: типа почвы, добавления минерального азота и степени аэрации. При аэробном разложении соломы его выход значительно выше, чем в анаэробных условиях.

Поскольку растительные остатки (в частности, солома) – сложные органические соединения, состоящие из различных химических компонентов, а питание у микроорганизмов специфично, то представляет интерес смена микробных ценозов, участвующих в разложении с образованием гумусовых веществ.

Наибольший интерес представляет разложение соломы в аэробных условиях. В качестве объекта исследования можно использовать овсяную (рисовую) солому. Овсяная солома содержит примерно 65 % углерода и 0,65 % азота (C:N = 100:1).

Постановка опыта. Опыт закладывают в чашках Петри на гелевых пластинах, что обеспечивает хорошую аэрацию и в известной мере имитирует поверхностное внесение соломы в почву.

Отмытые от следов хлора гелевые пластины (см. 7.2.1) пропитывают 3 мл основной минеральной среды Виноградского без источников углерода и азота (см. 10.2.1). Поскольку соотношение C:N в соломе может быть неодинаковым, к минеральной среде добавляют раствор азота в виде KNO_3 из расчета 26 мг азота на чашку.

Как единственный источник углерода на поверхность пластины помещают 1 г абсолютно сухой измельченной (до 3...5 мм) соломы, при этом устанавливается C:N = 25:1. Солому увлажняют до 60 % НВ и добавляют к ней 1 мл почвенной суспензии разведения 10^{-2} . Затем чашки в многократной повторности помещают во влажную камеру и в термостат при 25...28 °С.

Анализ. Периодически — через 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 210, 270 и 360 дней инкубации — вынимают две параллельные чашки и подвергают микробиологическому анализу. Сроки анализа примерно приурочены к разложению отдельных химических компонентов соломы (экстрактивных веществ, межклеточных веществ, целлюлозы, лигнизированной целлюлозы и лигнина).

В последние сроки анализа (через 150, 210, 270 и 360 дней инкубации) вынимают дополнительно две параллельные чашки, в которых определяют содержание гумуса (фульвокислоты и гуминовые кислоты) в массе соломы и в геле. Извлекают гумусовые вещества 0,1 н. раствором NaOH и по методу Тюрина. В вытяжках определяют углерод гуминовой кислоты и фульвокислоты.

При микробиологических анализах визуально и при увеличении 30× и 80× просматривают разлагающуюся солому и описывают родовой состав грибов, получивших развитие в соответствующие сроки разложения соломы. Затем солому снимают с поверхности геля и помещают в колбу с 99 мл стерильной водопроводной воды, взбалтывают 10 мин и готовят разведения (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} и т. д.), из которых делают поверхностные посевы на различных средах.

Учитывают: сапротрофные бактерии — на МПА; бациллярные формы в состоянии спор после пастеризации суспензии — на МПА + сусло-агар; микроорганизмы, использующие минеральные формы азота (в том числе актиномицеты), — на КАА; микроскопические грибы — на подкисленном сусло-агаре. При развитии эпифитного гриба *Fumago* число его хламидоспор определяют методом прямого подсчета. Для этого берут небольшую навеску соломы, готовят препарат в раздавленной капле и просматривают с иммерсионным объективом. Число хламидоспор во взятой навеске пересчитывают на общую массу соломы в чашке (см. 9.3.4).

Микроорганизмы автохтонной группы (*Nocardia*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter* и *Micromonospora*) учитывают на нитритном агаре (см. 9.2.1).

Аналогичный опыт можно поставить и с рисовой соломой.

Результаты опыта с овсяной соломой, инфицированной суспензией дерново-подзолистой почвы, показали, что оптимальная численность грибов, выявляемых на сусло-агаре, отмечается на 15-е сут инкубации в период разложения экстрактивных веществ и активного разложения целлюлозы (через 90 сут компостирования).

Оптимальная численность сапротрофных бактерий, выявляемых на МПА, отмечена через 30...60 сут инкубации, а через 120 сут и до конца опыта их численность резко падает. Микроорганизмы, использующие минеральные формы азота, в том числе актиномицеты, выявляемые на КАА, наиболее активно развиваются на 30...90-е сутки разложения соломы. Оптимальное развитие целлюлозоразрушающих бактерий на среде Гетчинсона отмечается через 30 и 90 сут инкубации. Через 120 сут разложения и до конца опыта их численность резко падает. Численность микроорганизмов автохтонной группы, минерализующих лигнин и гумусовые вещества, резко возрастает от 150 сут и до конца опыта.

10.3.2. Изучение микробных ценозов, участвующих в разложении гербицидов — производных сим-триазинов в почве. Гербициды триазины (атразин и симазин) широко применяют при выращивании кукурузы, сорго, проса, плодов и овощей. Остатки их могут довольно долго (до 18 мес) сохраняться в почве и причинять существенный вред последующим культурам. В связи с этим необходимо изучить микрофлору, участвующую в деградации триазинов в почве.

Постановка опыта. Для выявления наиболее конкурентоспособных микроорганизмов, ассимилирующих триазины, можно поставить лабораторный опыт на гелевых пластинах (см. 7.2.1).

Отмытые от следов хлора и прокипяченные гелевые пластины пропитывают 3 мл минеральной среды Виноградского (см. 10.2.1) с добавлением 5 г CaCO_3 на 200 мл дистиллированной воды. В каждую чашку добавляют 1 мл раствора симазина или атразина (можно в трех вариантах) из расчета 2, 5, 10 мг д. в. и 1 мл почвенной суспензии в разведении 10^{-2} . Все растворы, внесенные в чашку, тщательно перемешивают, подсушивают при 40...45 °С до образования глянцевой (или эмалевой) поверхности. Для инкубации чашки помещают крышками вниз во влажную камеру и выдерживают в термостате при 25...28 °С.

Анализ. После шести месяцев инкубации опыт можно снять. Перед определением остаточного количества симазина или атразина чашки просматривают под микроскопом (при увеличениях 30×, 80× и 40×) и описывают культуральные признаки колоний. После микроскопирования препаратов из колоний суспензию последних высевает на поверхность на нитритном агаре. При инфицировании среды в чашках с триазинами суспензией дерново-подзолистой почвы развивается микрофлора, характерная для минерализации гумусовых кислот (*Nocardia*, *Arthrobacter* и представители семейства *Micromonosporaceae*), в некоторых случаях и бактерии рода *Bactoderma*.

10.3.3. Микробные пейзажи при нитрификации, разложении гумусовых кислот и деградации симазина и атразина (метод Теппер). В опытах

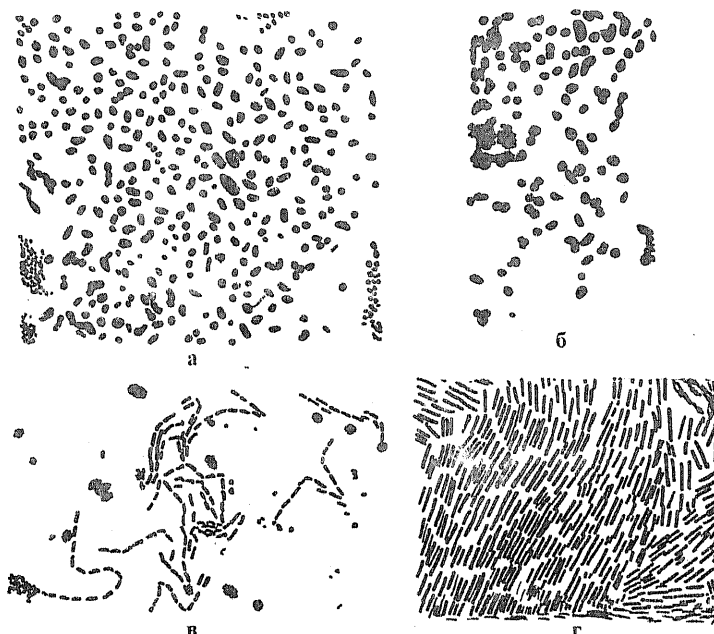


Рис. 32. Микробные пейзажи в репликах из опытов на гелевых пластинах:

а – *Nitrosomonas*; б – *Nitrosococcus*; в – фрагментированные гифы *Nocardia*; г – бактерии рода *Bactodermis*

на гелевых пластинах развивается аэробная микрофлора. Последняя, как известно, гидрофобна. Поэтому, если к чашке, в которой прошел тот или иной процесс, добавить осторожно с одного края 6...8 мл дистиллированной воды, бактерии с поверхности гелевых пластин поднимутся к поверхности воды (см. 8.2.1). Прикоснувшись к последней чистым обезжиренным предметным стеклом, получают отпечаток – реплику микроорганизмов, развившихся на гелевых пластинах. Исключение составляет мицелий актиномицетов и микромоноспор, вросших в гель. После фиксации и окраски на препарате хорошо просматриваются микробные пейзажи при использовании иммерсионной системы.

Через 21...25 сут инкубации в опытах по изучению первой фазы нитрификации при инфицировании среды дерново-подзолистой почвой обнаруживаются бактерии рода *Nitrosomonas* (рис. 32, а), а при инфицировании среды суспензией торфяно-болотной почвы низинного типа – иногда и *Nitrosococcus* (рис. 32, б).

В опытах по разложению микроорганизмами гумусовых кислот (четыре-пять месяцев инкубации и более) можно обнаружить: представителей автохтонной группы – септированные гифы, палочковидные и кокковидные фрагменты нокардий (рис. 32, в; неспороносные палочки,

выложенные в один слой клеток, соединенных в пленку, — бактерии рода *Bactoderma* (рис. 32, г); иногда в более поздние периоды в виде спутников — бактерии рода *Nitrosomonas*.

В опытах по разложению триазинов (симазина и атразина) кроме фрагментированных гиф нокардий, встречаются бактерии рода *Bactoderma*, скопления палочек и кокков представителей рода *Arthrobacter*, иногда (при более высоких дозах гербицида) развивается мицелий с одиночными спорами видов рода *Micromonospora*.

10.4. МИКРООРГАНИЗМЫ, ОБИТАЮЩИЕ В ПРИКОРНЕВОЙ ЗОНЕ И НА КОРНЯХ РАСТЕНИЙ

10.4.1. Общие сведения. Чем ближе к корневой системе расположена почва, тем больше бактерий в ней содержится. Особенно много микроорганизмов на поверхности корня. В почве, прилегающей к корням, получившей название ризосферы, как дополнительный источник питания бактерии используют отмирающие клетки эпидермиса и корневые волоски. Питательными веществами для бактерий, развивающихся на корнях, служат продукты экзоосмоса растений (корневые выделения).

В ризосфере развиваются те же формы бактерий, что и в почве, отдаленной от корней. На корнях преобладают неспорозные палочки рода *Pseudomonas* и микобактерии, причем на корнях злаковых, бобовых и других растений поселяются неодинаковые виды и разновидности. Это объясняется различием в обмене веществ у отдельных видов растений.

Бактерии в прикорневой зоне растений в известной мере играют роль санитаров, очищая ее от продуктов метаболизма растений. Минерализуя органические остатки, они в то же время переводят ряд элементов питания в доступную для растений форму. Отдельные виды бактерий, развивающиеся на корнях, продуцируя ростовые вещества и витамины, могут оказать положительное влияние на рост растений. Однако многие бактерии корневой зоны обладают денитрифицирующей способностью и в определенных условиях могут вызвать большие потери азота из почвы.

10.4.2. 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, перемешивают и из нее берут навеску в 1 г (одновременно берут навеску для определения влажности почвы). Навеску помещают в 100 мл стерильной водопроводной воды и готовят ряд разведений.

При поверхностном посеве из полученных разведений стерильной микропипеткой наносят на поверхность питательных пластин (МПА, КАА и др.) по 0,05 мл и шпателем досуха втирают в агар-агар. При глубинном посеве из разведений стерильной пипеткой берут 1 мл суспензии и вносят в стерильную чашку Петри, а затем добавляют соответствующую агаризованную питательную среду.

Выросшие на агар-агаре колонии подсчитывают визуально и под лупой (см. 5.1.1). Для определения качественного состава бактерий колонии на чашке группируют по культуральным признакам. Из каждой группы готовят препарат и выявляют форму бактерий. Видовую принадлежность устанавливают, делая пересев из колонии на скошенный агар-агар, и после очистки культуры изучают ее морфологические и физиологические признаки.

10.4.3. Учет ризосферной и корневой микрофлоры методом последовательных отмываний корней по Теппер. Из выкопанных монолитов почвы с растениями стерильными пинцетом и ножницами отбирают 1 г молодых корней примерно одного диаметра с приставшими к ним частицами почвы. Одновременно берут навеску для определения влажности почвы.

Корни помещают в колбу со 100 мл стерильной водопроводной воды и взбалтывают 2 мин. Стерильным крючком из обычной проволоочной иглы корни извлекают и переносят последовательно во вторую, третью, четвертую, пятую, шестую и седьмую колбы, также содержащие по 100 мл стерильной водопроводной воды. В каждой колбе корни отмывают по 2 мин. Желательно, чтобы в последней (седьмой) колбе в воду перед стерилизацией было добавлено 3...5 г песка.

Из каждой колбы отдельно стерильной пипеткой берут по 0,05 мл отмывной воды, наносят на поверхность питательной пластины (МПА) и каждый раз отдельным шпателем Дригальского, держа полукруглую чашку около пламени горелки, втирают досуха. Чашки помещают в термостат при 28...30 °С. Спустя три—пять суток колонии можно анализировать.

По мере отмывания корней численность бактерий не убывает, а в ряде случаев даже увеличивается. В чашках с посевом из первых отмываний много крупных колоний спороносных форм микроорганизмов, а по мере отмывания количество колоний бациллярных форм уменьшается и возрастает число мелкоточечных колоний неспороносных форм рода *Pseudomonas* и микобактерий. Колонии микобактерий часто окрашены в желтый или оранжевый цвет.

Для определения количества микроорганизмов в ризосфере и на корнях суспензию из первого отмывания взбалтывают дополнительно в течение 5 мин, затем из нее готовят разведения, из которых делают поверхностные посевы. Содержимое остальных шести колб сливают вместе и также готовят из их смеси последовательные разведения, из которых проводят поверхностные посевы 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 масс первоначальной навески и навески отмытых корней (для чего из последней порции отмывной воды корни извлекают, помещают на фильтровальную бумагу для удаления воды и взвешивают).

При определении количества микроорганизмов на 1 г корней число колоний, выросших на чашку, умножают на 20, на степень разведения и на 600 (шесть смывов по 100 мл в каждом) и делят на значение массы сырых корней.

В зависимости от задач, поставленных исследователем, можно использовать различный набор сред для культивирования микроорганизмов, развивающихся в корневой зоне растений.

Материалы и оборудование к работам 10.4.2...10.4.3. Монолит (10 × 10 см) или вегетационный сосуд с растениями, пинцеты, ножницы, часовые стекла, колбы на 250 мл, содержащие по 100 мл стерильной водопроводной воды, 3...5 г стерильного песка (для последних разведений), крючки из проволоки, стерильные градуированные и моровские пипетки на 1 мл, стерильные шпатели, счетная камера Вольфюгеля, лупы, микроскопы и все необходимое для приготовления окрашенных препаратов и микроскопирования, скошенный МПА в пробирке.

ГЛАВА 11

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЫ

11.1. ОБЩАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЫ

11.1.1. Определение общей биологической активности почвы по методу Мишустина, Вострова и Петровой (по интенсивности разложения полотна). Чем выше в почве содержание подвижного азота и других элементов питания, тем активнее идет окисление целлюлозы. Целлюлозоразрушающие микроорганизмы, разлагая клетчатку, синтезируют и частично выделяют в среду аминокислоты. При обработке остатков полуразрушенного льняного полотна 0,5 %-м раствором нингидрина в тех местах, где активно развивалась микрофлора и разлагалась целлюлоза, образуются сиреневые пятна — продукты реакции аминокислоты с нингидрином.

Льняным полотном обшивают хорошо отмытые стекла (10 × 50 см), стерильной лопатой и стерильным ножом делают почвенный разрез на глубину 35 см. К ровной стенке разреза по профилю прикладывают стекло с полотном, отступая от поверхности почвы на 2...3 см. С противоположной стороны его засыпают почвой, плотно прижимая к стенке. На поверхности почвы ставят этикетку.

Через 20...30 дней стекло откапывают, подсушивают полотно, осторожно стряхивают с него почвенные частицы и обрабатывают 0,5 %-м раствором нингидрина в ацетоне.

Для определения степени разложения полотна в процентах вырезают кусок определенной площади на глубину горизонта (анализ выполняют по горизонтам), промывают водой, высушивают и взвешивают. Потом кусок такой же площадью вырезают из контрольного полотна и тоже взвешивают. Сравнивая массу первого и второго кусков, определяют степень разложения полотна.

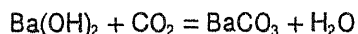
11.1.2. Метод определения общей микробиологической активности почвы по выделению диоксида углерода. В почве без корней источником

CO₂ служат микроорганизмы, выделяющие его при дыхании. Количество газа определяют, улавливая его баритом или в аппарате Варбурга.

В первом случае 150...200 г почвы, просеянной через сито с ячейками в 2 мм, помещают в стерильную склянку Тищенко на 500...600 мл с двумя отводными трубками. Влажность почвы стерильной водой доводят до 60 % общей влагоемкости. Воздух предварительно очищают от CO₂, пропуская через две последовательно соединенные склянки Тищенко, содержащие 30 %-й раствор NaOH и стерильную воду, предназначенную для увлажнения почвы. Затем воздух пропускают через почву по нижнему отверстию склянки.

Прошедший сквозь почву воздух выходит через выходную трубу в две последовательно соединенные склянки Дрекслея на 250...300 мл, содержащие по 100 мл 0,1 н. раствора Ba(OH)₂ с фенолфталеином. Выходная трубка склянки Тищенко с почвой соединена резиновой трубкой с тубусом склянки Дрекслея. Через установку во время опыта воздух продувают со скоростью 1...2 л/ч при помощи аспиратора или водоструйного насоса. Продолжительность продувания 10...12 дней.

По окончании опыта или по мере нейтрализации барита диоксидом углерода, титрованием 0,1 н. щавелевой кислотой определяют не использованный в реакции Ba(OH)₂. По его расходу устанавливают количество выделившегося CO₂ по уравнению:



Для каждого почвенного образца параллельно определяют содержание диоксида углерода в двух пробах.

Количество выделяемого диоксида углерода за определенный промежуток времени пересчитывают на 1 г абсолютно сухой почвы, или на 1 г гумуса.

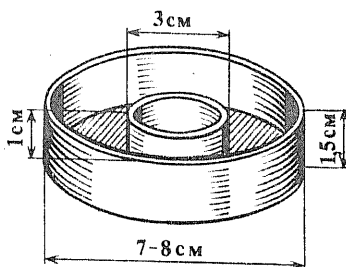
11.2. АММОНИФИЦИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЫ И МИКРООРГАНИЗМОВ

11.2.1. Определение аммонифицирующей активности почвы. 100 г свежей почвы, просеянной через стерильное сито с ячейками в 2 мм, помещают в стерильные колбы Эрленмейера на 250 мл. К почве добавляют субстрат для аммонификации (1 % кровяной муки, содержащей 11,5 % азота, или 1 % пептона, или 1...2 % гороховой муки). Влажность почвы доводят до 50...60 % наибольшей влагоемкости. Колбы закрывают ватными пробками и ставят в термостат при 28...30 °C.

Через семь дней компостирования почву опытных вариантов и контрольную подвергают анализу. Для этого из тщательно перемешанной почвы берут навеску в 3...5 г, помещают ее в колбу Эрленмейера на 250 мл, добавляют 100 мл 1 н. раствора KCl или NaCl и фильтруют через бумажный фильтр. Промывку почвы 1 н. раствором KCl продолжают до полного исчезновения аммиака (проба с реактивом Несслера).

Почвенную вытяжку в 1 н. растворе KCl доводят до определенного объема, затем из нее берут 50 мл. Аммиак отгоняют, используя отгон-

Рис. 33. Чашка Конвея



ный 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. раствором щелочи в присутствии метилового красного. Нейтрализованному аммиаком 0,1 н. раствору серной кислоты в объеме 1 мл соответствует 1,7 мг аммиака, или 1,4 мг азота.

Очень хорошие результаты дает определение аммиака в чашках Конвея (рис. 33), которые состоят из двух цилиндров, вставленных один в другой, имеющих общее дно. Чашки плотно закрывают пришлифованной к верхнему краю внешнего цилиндра стеклянной крышкой, которую для лучшей герметичности смазывают смесью воска и вазелина.

Во внутреннюю часть чашки вносят 1 мл титрованного 0,1 н. раствора H_2SO_4 и приливают одну-две капли метилового красного. Держа чашку наклонно, во внешнюю ее часть наливают 1...2 мл исследуемого раствора. Затем чашку ставят горизонтально и, держа левой рукой наготове крышку, помещают в противоположный конец внешней части 1 мл насыщенного раствора K_2CO_3 (можно заменить 10 %-м раствором KOH). Потом быстро закрывают чашку крышкой и вращательным движением перемешивают содержимое внешней части чашки.

Контролем служит "слепая проба", где вместо исследуемого раствора берут дистиллированную воду. Заготовленные чашки (в нескольких повторностях) оставляют на сутки при комнатной температуре или на несколько часов ставят в термостат при 35...37 °C. После этого крышку снимают и титруют 0,02 н. или более слабым раствором щелочи до изменения окраски индикатора.

11.2.2. Определение аммонифицирующей активности микроорганизмов. Для определения аммонифицирующей способности микроорганизмов М. В. Федоров рекомендует приготовить минеральную питательную среду следующего состава, 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 так, чтобы соотношение C:N было 5:1; 10:1; 15:1; 20:1 и 30:1. Как источник азота можно использовать гороховую и люпиновую муку, гуматы и др. На 100 мл субстрата берут 1 г пептона, содержащего 0,15 г азота и 0,5 г углерода.

Для соотношения C:N, равного 5:1, к 100 мл среды добавляют 0,625 г глюкозы; для C:N, равного 10:1, — 2,5 г; для более широкого

соотношения C:N соответственно увеличивают содержание глюкозы. Питательную среду разливают по 100 мл в колбы Эрленмейера на 300 мл и стерилизуют. Затем среду инфицируют исследуемыми микроорганизмами и ставят на неделю в термостат при 28...30 °C. Опыт ставят минимум в двух повторностях.

После инкубации накопившийся аммиак определяют диффузионным методом в чашке Конвея. Параллельно устанавливают общее количество выросших клеток методом прямого счета под микроскопом или методом питательных пластин на МПА.

11.3. НИТРИФИЦИРУЮЩАЯ И ДЕНИТРИФИЦИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЫ

11.3.1. Определение нитрифицирующей активности почвы. Из почвенного образца, просеянного через сито с отверстиями 2 мм, отбирают навеску в 100 г и помещают в стерильную колбу Эрленмейера на 250 мл. Почву смачивают до 65 % наибольшей 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 при 27...28 °C на 30 дней. Контролем служит почва без сульфата аммония.

Влажность почвы должна быть постоянной. Для этого каждые семь дней колбы взвешивают и стерильной дистиллированной водой доводят влажность до первоначального уровня.

По окончании опыта определяют нитраты в опытных и контрольных почвах по методу Гранваль-Ляжу.

11.3.2. Определение денитрифицирующей активности почвы. При определении денитрифицирующей активности почвы возникают большие затруднения, так как способность восстанавливать нитраты не единственная функция денитрифицирующих бактерий в почве. Эти микроорганизмы могут развиваться и в присутствии молекулярного кислорода, окисляя белки, жиры и другие соединения.

По М. В. Федорову, навеску свежей почвы в 50 г помещают в стерильную колбу на 250 мл, увлажняют ее стерильной водой до 60 % наибольшей влагоемкости и добавляют 0,1...0,2 г нитрата. После 14-дневного компостирования одновременно устанавливают количество нитрата, нитрита и аммиака. Сравнивая эти показатели у разных почв, можно выявить их потенциальную денитрифицирующую активность.

Недостаточная точность метода обусловлена прежде всего длительностью инкубации (14 сут). За такой срок в почве может произойти смена многих процессов, направленность и интенсивность которых зависит от природы образца.

В каждом конкретном случае соотношение анализируемых азотсодержащих соединений может быть результатом не только активности денитрификаторов, но и неучтенной активности микроорганизмов других физиологических групп, принимающих участие в трансформации азота.

Ацетиленовый метод, разработанный Р. И. Федоровой, позволяет выделить денитрификацию из всех происходящих в почве метаболических реакций и количественно оценить процесс методом газовой хроматографии.

11.4. АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

11.4.1. Определение азотфиксирующей активности ацетиленовым методом. Нитрогеназа азотфиксирующих микроорганизмов способна восстанавливать ацетилен* (C_2H_2) до этилена (C_2H_4). Оба непредельных углеводорода легко идентифицируют при помощи газового хроматографа. Поскольку процессы восстановления молекулярного азота и ацетилена аналогичны, последний широко применяют для моделирования и изучения азотфиксации. Если в газовой среде присутствует одновременно N_2 и C_2H_2 , в первую очередь произойдет восстановление ацетилена вследствие большего сродства электронов к атому углерода.

Ацетиленовый метод определения азотфиксирующей активности бактерий разработан Харди с соавторами. Чувствительность метода позволяет обнаружить до 10^{-12} М этилена и превосходит чувствительность масс-спектрометрического определения N_2^{15} в 10^3 раз, а метода определения азота по Кьельдалю – в 10^6 раз. Поскольку азотфиксацию осуществляют аэробные и анаэробные свободноживущие и симбиотические бактерии, схема экспериментов должна быть различной.

Используют несколько способов:

- отбор проб почвы (воды, других анализируемых субстратов или чистой культуры микроорганизма) с последующей инкубацией в атмосфере ацетилена;

- способ почвенных монолитов, при котором часть почвы (с растением или без него) инкубируют с ацетиленом в газонепроницаемом контейнере;

- полевой диффузионный метод "колпаков", заключающийся в том, что поверхность почвы накрывают газонепроницаемым колпаком, под который вводят ацетилен;

- выдерживание монолита почвы с растением в продуваемой через почву ацетилен-воздушной смеси. Во всех этих случаях ацетилен вводят в воздушное пространство в объеме 10 % сосуда, или "колпака", или с заведомым избытком.

Применение ацетиленового метода в полевых условиях сопряжено с некоторыми сложностями: введение в почву ацетилена может сопровождаться его адсорбцией или, напротив, затрудненной диффузией. Образующийся этилен также способен адсорбироваться почвой, а при отсутствии ацетилена, наоборот, выделяться ею. В герметичной камере,

* Ацетилен – взрывоопасен, поэтому при работе с ним надо соблюдать правила техники безопасности: хранить газ в металлических баллонах или получать из карбида кальция перед опытом.

особенно при длительной экспозиции, возникает "парниковый эффект" — увеличение концентрации CO_2 в составе газовой смеси и, как следствие, активизация фотосинтеза, в результате чего усиливается отток корневых выделений, способствующий повышению активности микроорганизмов. Кроме того, может учитываться не только азотфиксация в почве и ризосфере, но и в филлосфере растений.

По Харди с соавторами (Hardy et al., 1968), питательную среду с культурой помещают в шприцы фирмы Chigana на 10 мл. Атмосферный воздух удаляют вакуумным насосом, соединенным со шприцем и манометром, а содержимое шприца (инокулят) трижды промывают аргоном (Ar). Затем шприцы заполняют газовой смесью $\text{Ar} + 2\% \text{C}_2\text{H}_2$ (для анаэробов). Для аэробных микроорганизмов в нее вводят 2...10 % O_2 .

После заполнения шприца газовой смесью иглу снимают и отверстие закрывают силиконовой пробкой, через которую впоследствии берут газовые пробы инсулиновым шприцем для анализа на газовом хроматографе.

Продолжительность опыта определяется его целями и активностью культуры: "острый" опыт идет до трех суток. В конце опыта реакцию восстановления C_2H_2 прекращают, добавляя к культуральной среде 0,2 мл 40 %-го раствора 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 диаметром) заполняют сорбентом (силикагелем АСК). Как газ-носитель используют водород, устанавливая его расход 36 мл/мин (хроматограф "Becher Delft"). Температура колонки 50 °С, объем вводимой газовой пробы 0,5 мл. Количество C_2H_2 и C_2H_4 рассчитывают по калибровочной кривой.

В длительных экспериментах для определения азотфиксирующей активности почвы пользуются флаконами из-под пенициллина или стеклянными сосудами на 16 см³ с силиконовой пробкой и боковым отростком, перекрывающимся притертым стеклянным затвором. В последнем случае через боковой отросток легко удалять и наполнять сосуд необходимым инертным газом.

11.4.2. Определение актуальной (полевой) и потенциальной активности азотфиксации в почве методом Умарова. Для определения актуальной активности азотфиксации микроорганизмов в почве используют специальный прибор. Он представляет собой металлический цилиндр 5 (рис. 34) со съёмным колпаком из полиэтиленовой пленки 1 с резиновой пробкой 2. Цилиндр помещают в почву до кольцевой канавки 4. Для предотвращения утечки газов почву увлажняют на 10 см вокруг цилиндра. Внутрь него ставят бюкс с 25...30 г CaC_2 . На металлический обруч 3 натягивают колпак, в кольцевую канавку (водяной затвор) наливают воду, увлажняют водой карбид кальция и цилиндр

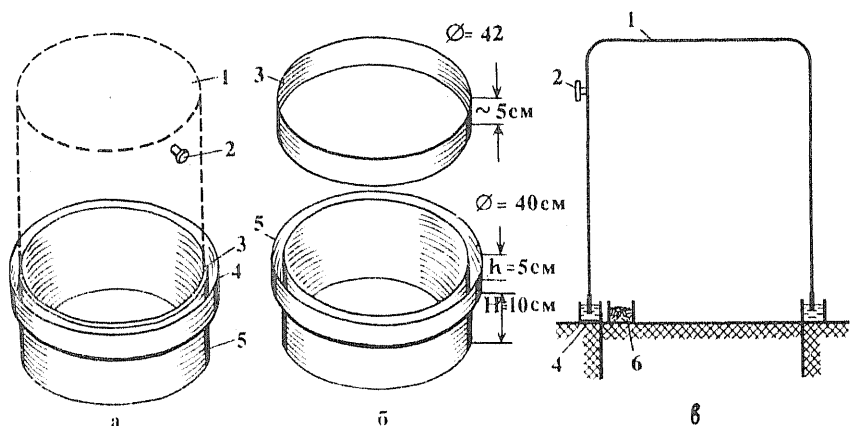


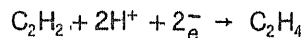
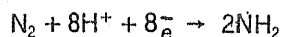
Рис. 34. Прибор для полевого определения активности азотфиксации в почве:

а – в собранном виде; б – отдельные детали прибора; в – вертикальная проекция; 1 – полиэтиленовый колпак; 2 – резиновая пробка; 3 – металлический обруч для натягивания полиэтиленового мешка; 4 – кольцевая канавка, заполненная водой (водяной затвор); 5 – металлический цилиндр для определения актуальной активности азотфиксации; 6 – бюкс с карбидом кальция

быстро накрывают колпаком. При этом обруч должен погрузиться в воду канавки. Через пробку в колпаке вводят шприцем 2...5 мл пропана (стандарт) и отмечают время начала инкубации. Количество пропана определяется объемом колпака. Продолжительность инкубации от 1 до 24 ч. По окончании опыта шприцем через резиновую пробку берут три газовые пробы по 15 мл и вводят в вакуумированный пенициллиновый флакон. Пробы можно хранить при комнатной температуре в темноте.

Поскольку этилен выделяют также почвенные грибы и корни растений, делают контрольное определение неспецифического этиленогенеза: почву, как и в опыте, инкубируют под колпаком, но без карбида кальция, т. е. без ацетилена.

Активность азотфиксации определяют по уравнениям:



Эквивалентное соотношение перевода этилена на аммиак равно трем. То есть результат, полученный для этилена, необходимо разделить на три, чтобы получить величину активности фиксации азота. Теоретически рассчитанный коэффициент в конкретных условиях может варьировать от 2,4 до 25. Это связано с тем, что на восстановление ацетилена используются все поступающие электроны, а на восстановление азота нет. Следовательно, всякий раз надо определять истинное соотношение между скоростью восстановления нитрогеназой ацетилена и азота для определенных экологических условий.

Площадь почвы внутри цилиндра (S) вычисляют по формуле $S = \pi R^2$, объем цилиндра — по концентрации пропана в газовой пробе. Активность азотфиксации в почве выражают в миллиграммах фиксированного азота на квадратный метр или гектар за сутки.

При определении потенциальной активности 5 г почвы, просеянной через сито с ячейками диаметром 1 мм, помещают в пенициллиновый флакон, вносят глюкозу — 2 % массы абсолютно сухой почвы и увлажняют до 60 % наибольшей влагоемкости. Почву тщательно перемешивают, флакон закрывают ватной пробкой и ставят в термостат при 28 °С.

Через 1 сут инкубации флаконы закрывают резиновыми пробками и вводят в них по 0,5 мл ацетилена. Еще через 1 ч инкубации в термостате берут газовую пробу (0,5 мл) для анализа на хроматографе. Контроль — флакон без ацетилена.

По окончании измерений резиновые пробки вновь заменяют на ватные, ставят флаконы в термостат на 1 сут и повторяют всю процедуру. Измерение считают завершенным, если в двух пробах количество этилена отличается не более чем на 5 %. Потенциальную активность азотфиксации выражают в миллиграммах фиксированного азота на килограмм почвы за час.

11.4.3. Определение нитрогеназной активности симбиотических азотфиксирующих бактерий. При определении нитрогеназной активности на интактных клубеньках в пенициллиновый флакон помещают отмытые и просушенные фильтровальной бумагой корни бобового растения с клубеньками. Шприцем вводят ацетилен (10 % избыточного давления ацетилена) и после экспозиции 1 ч в условиях теплицы или других помещений, в зависимости от целей эксперимента, реакцию останавливают введением 1...5 мл реактива Несслера, который связывает оставшийся ацетилен. Образцы можно хранить в холодильнике при 4 °С длительное время до анализа на хроматографе.

При определении нитрогеназной активности интактной бобово-ризобиальной системы осторожно извлекают растение с клубеньками из почвы или другого субстрата. Очищают клубеньки, стряхивая почву с корней, и помещают растение до корневой шейки в полиэтиленовый пакет. Пакет закрыт резиновой пробкой, предварительно разрезанной на две половины вдоль и с отверстием, просверленным для стебля растения. Растение размещают так, что надземная часть расположена над пробкой, а корневая система — в пакете. Щели между отверстием в пробке и стеблем заделывают замазкой.

Воздух из пакета откачивают. Через специальное отверстие в пробке шприцем вводят в пакет 50 см³ газовой смеси (15 % ацетилена, 20 % кислорода и 65 % аргона). Газовую смесь готовят непосредственно перед опытом в газометре, представляющем собой сосуд, заполненный 30 %-м раствором NaCl, объем которого равен объему вводимых газов. Через 10...15 мин шприцем отбирают из газовой смеси образец в 5 мл и переносят его в закрытый шприц-сборник для анализа методом газовой хроматографии.

В полевых условиях при определении азотфиксирующей активности

бобово-ризобийной системы методом "колпаков" цилиндр не следует углублять более чем на 10 см, так как основная масса клубеньков локализована в верхнем слое. Колпаки на герметичность проверяют водой. Для обеспечения концентрации ацетилена 5...10 % на колпак высотой 60...70 см рекомендуется вносить 35...40 г карбида кальция и 20 мл пропана.

11.4.4. Работа на газовом хроматографе. Количество образовавшегося в ходе определения азотфиксирующей активности почвы этилена определяют при помощи пламенно-ионизационного детектора на газовых хроматографах любой марки.

Для разделения газов используют сорбенты АСМ и ТЗК-М и др. Газами-носителями служат инертные газы аргон, гелий или азот. Количество восстановленного этилена определяют по стандартным пикам, для чего готовят стандартный раствор этилена.

Пример расчета. Предположим, концентрация стандартного раствора 1:1000, в этом случае 1 мл 100 %-го этилена разводят в герметичной емкости на 1 л. Исходя из закона Авогадро, 1 моль газа этилена занимает объем 22,4 л. Можно рассчитать, какое количество молей занимает интересующий нас объем (0,001 л) из соотношения:

1 моль этилена – 22,4 л
 x молей этилена – 0,001 л (1 мл).

Находим: $x = 44,6 \cdot 10^{-9}$ моля, или 44,6 наномоля. Вводя в хроматограф данное количество стандартного этилена (1 мл) с известной размерностью ($44,6 \times 10^{-9}$ моля), получаем величину стандартной пробы в сантиметрах, относительно которой рассчитывают опытные пробы.

Можно получать этилен из этиленсодержащих соединений типа гидрел, дигидрел, этефон воздействием на них концентрированных растворов NaOH или KOH.

Пробы из опытных образцов вводят в хроматограф и получают величины пиков в миллиметрах на разных шкалах чувствительности хроматографа, которые впоследствии приводят к размерности стандартной пробы и к единому объему вводимой пробы. Для сравнительной оценки активности бобово-ризобийной системы по ацетиленовому методу данные вычисляют по формуле, в наномолях восстановленного этилена за 1 ч в расчете на одно растение:

$$A = \frac{P_2 K_2 V_1 V_3}{P_1 K_1 V_2 t n} \cdot 44,6, \quad (1)$$

где A – количество этилена (C_2H_2), в наномолях на реакционный флакон – аптечный флакон на 30 мл в единицу времени; P_2 – пик диаграммы пробы из реакционного флакона, см (при наличии примеси этилена в исходном ацетилене пик фона вычитают); P_1 – усредненный пик диаграммы пробы стандарта, см; K_1 – калибровка (чувствительность) прибора при анализе пробы стандарта; K_2 – калибровка прибора при анализе пробы из флакона; V_1 – объем пробы стандарта, $см^3$; V_2 – объем испытуемой пробы из флакона, $см^3$; V_3 – объем реакционного флакона, $см^3$, t – время экспозиции, ч; n – число корней во флаконе; 44,6 – количество C_2H_4 (наномоли в $1 см^3$) в пробе стандарта.

Работу выполняют при одинаковой калибровке прибора во время анализа проб из флакона и стандарта, тогда $K_2/K_1 = 1$. Объемы проб из стандарта и флакона лучше брать равными, например по 0,5 мл, тогда $V_1/V_3 = 1$. В каждый флакон вводят ацетилен в объеме, составляющем приблизительно 5 % общего объема (во флакон на 30 мл вводят 2 см³ ацетилена, на 130 мл — 6 см³ ацетилена). Время экспозиции 1 ч. Для указанных условий формула (1) приобретает вид:

$$A = \frac{P_2 V_3}{P_1 t n} \cdot 44,6. \quad (2)$$

Вследствие того что в каждой анализируемой партии образцов величины V_3 (объем флакона) и P_1 (средняя величина пиков стандарта для всех определений) одинаковы, число корней тоже, формула еще более упрощается:

$$A = P_2 C,$$

где C — величина постоянная и равна $\frac{V_3 \cdot 44,6}{P_1 t n}$.

Таким образом, для определения количества C_2H_4 во флаконе, в наномолях за 1 ч в расчете на одно растение, пик диаграммы пробы из каждого флакона умножают на коэффициент C , предварительно рассчитанный.

Пример расчета. K_1 и $K_2 = 20 \cdot 10^{-10}$; V_1 и $V_2 = 0,5$ см³; $V_3 = 43$ см³; $t = 1$ ч; $n = 1$; отдельные показатели P_1 равны: 11,4; 11,5; 11,4; средний $P_1 = 11,4$ см. Отсюда

$$C = \frac{43 \cdot 44,6}{11,4 \cdot 1 \cdot 1} = 168,2;$$

$$A = P_2 \cdot 168,2.$$

Флакон № 1. $P_2 = 16,2$ см, $A_1 = 16,2 \cdot 168,2 = 2725$ наномолей C_2H_4 на одно растение за 1 ч.

Флакон № 2. $P_2 = 15,8$ см, $A_2 = 15,8 \cdot 168,2 = 2658$ наномолей C_2H_4 на одно растение за 1 ч и т. д.

Если результаты хотят выразить в микрограммах фиксированного азота за 1 ч на одно растение (мкг N/растение/ч), проводят пересчет: количество этилена в наномолях C_2H_4 /растение/час умножают на $28/3 \cdot 10^{-3} = 0,0093$. Последнее число определяется следующим: молекулярная масса азота — 28, при пересчете с наномолей на микрограммы появляется множитель 10^{-3} , так как 1 наномоль = 10^{-9} , а 1 мкг = 10^{-6} г. В знаменатель множителя введен коэффициент 3 (см. 11.4.2).

11.5. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

11.5.1. Выделение чистой культуры клубеньковых бактерий. Из клубеньков однолетних бобовых растений бактерии выделяют в период бутонизации — цветения растения-хозяина, у многолетних — на второй год жизни. От тщательно промытого в водопроводной воде корня отделяют пинцетом или бритвой наиболее крупные розовые клубеньки, помещают их в фарфоровый тигель Гуча с сетчатым дном и погружают тигель в несколько большие, чем он, по размеру фарфоровые чашки с 96 %-м этиловым спиртом. После этого тигель с клубеньками многократно промывают стерильной водой.

Стерильным пинцетом переносят клубеньки в стерильную чашку Петри и стерильным ножом разрезают их на части. Бактериологической петлей берут небольшое количество содержимого клубенька, переносят в каплю стерильной воды на поверхность агаровой питательной среды в чашке Петри и размазывают шпателем.

Этим же шпателем выполняют посев последовательно еще на двух-трех пластинах для получения отдельных колоний (истощающий посев). Засеянные чашки выдерживают в термостате при 25...27 °С. Быстрорастущие клубеньковые бактерии появляются на третьи-четвертые сутки, медленнорастущие — на седьмые-девятые. Появление колоний в течение первых двух суток свидетельствуют о загрязнении культуры.

Питательной средой служит среда Фреда: маннит (сахароза или глюкоза) — 10,0 г, KH_2PO_4 — 0,5 г, MgSO_4 — 0,2 г, NaCl — 0,1 г, CaCO_3 — 3,0 г, дрожжевая вода (рН 6,8) — 100 мл, агар-агар — 15 г, дистиллированная вода — 0,9 л. Можно использовать бобовый агар следующего состава: бобовый отвар (см. 4.2.10) — 1000 мл, сахароза — 2 г, KH_2PO_4 — 1,0 г, MgSO_4 — 0,3 г, агар-агар — 15,0 г. В отвар добавляют NaHCO_3 до рН 7,0 и стерилизуют среду при 120 °С 30 мин.

На этих средах клубеньковые бактерии образуют бесцветные или молочно-белые, часто слизистые колонии, за исключением розово-красных колоний клубеньковых бактерий из клубеньков *Lotononis bainesii*. На скошенном бобовом агаре быстрорастущие клубеньковые бактерии обильно развиваются, образуя довольно прозрачные слизистые, часто стекающие вниз мощные колонии — штрихи. Медленнорастущие бактерии люпина и сои образуют менее прозрачные с небольшим количеством слизи и более плотные беловатые колонии — штрихи.

Для проверки чистоты выделенной культуры делают посев на МПА. Кроме клубеньковых бактерий люцерны и донника, ни одна культура клубеньковых бактерий на МПА не развивается. Характерный тест для клубеньковых бактерий — рост на лакмус-молоке.

Лакмусовое молоко, или лакмус-молоко, готовят следующим образом: 50 г лакмуса измельчают в ступке и растворяют в 150 мл 40 %-го раствора этилового спирта. Смесь кипятят 1 мин на водяной бане, после отстаивания декантируют (при помощи делительной ворон-

ки), добавляют к осадку еще 150 мл 40 %-го раствора этилового спирта и снова кипятят 1 мин. Надосадочную жидкость декантируют, объединяют с предыдущей порцией и оставляют на ночь. Затем доводят объем 40 %-м раствором этилового спирта до 300 мл, устанавливают pH 7,0, добавляя к раствору по капле 1 н. раствор HCl (окраска становится пурпурной).

К свежеснятому (обезжиренному) молоку добавляют готовый лакмусовый раствор до бледно-лиловой или сине-фиолетовой окраски последнего (около 40 мл/л). Устанавливают pH смеси 7,0, добавляя 1 н. раствор NaOH. Стерилизуют 10 мин автоклавированием при 115 °С. Перегревание ведет к карамелизации.

Быстрорастущие клубеньковые бактерии на 10...14-е сутки подщелачивают лакмусовое молоко, которое при этом слегка синее или не меняет окраски, и образуют светлое кольцо — сывороточную зону. Только клубеньковые бактерии люцерны, донника и некоторые штаммы клубеньковых бактерий клевера подкисляют лакмусовое молоко (придают ему розовую окраску).

Медленнорастущие клубеньковые бактерии лакмус-молоко подщелачивают, но сывороточной зоны не образуют, т. е. не гидролизуют казеин. Большинство клубеньковых бактерий не способно разжижать желатину, однако некоторые штаммы разжижают ее через два месяца культивирования.

Для дифференцирования бактерий рода *Agrobacterium* от бактерий рода *Rhizobium* используют кетолактозный тест. *Agrobacterium* обильно развиваются, продуцируя 3-кетолактозу на среде Гаура и Маречковой, содержащей, г/л: лактозы — 5, KNO₃ — 1, MgSO₄ · 7H₂O — 0,1, NaH₂PO₄ безводного — 0,18, агар-агара — 12, Fe-ЭДТА, 0,25 %-го раствора, — 10 мл, MnSO₄, 33,5 %-го раствора, — 10 мл; pH 6,8. Колонии клубеньковых бактерий на этой среде обычно не растут.

Для проведения кетолактозного теста чистую культуру бактерий помещают на одни-двое суток при 25...30 °С на скошенную агаризованную среду Фреда (см. выше). Затем петлей переносят культуру небольшими комочками диаметром не более 0,5 см на агаризованную среду Гаура и Маречковой в чашки Петри. На одну чашку можно поместить четыре—шесть исследуемых культур. Чашки инкубируют одни-двое суток при 28 °С, затем наливают в них тонким слоем реактив Бенедикта следующего состава: NaCl — 250 г, NH₄NO₃ — 100 г, Cu(NO₃)₂ — 250 г, вода дистиллированная — до 1 л. Чашки оставляют при комнатной температуре. Если культура образует 3-кетолактозу (3-кетогалактопиранозилглюкозу), то вокруг нее появляется желтое кольцо Si₂O, которое хорошо видно на голубом фоне реактива. Через 1 ч кольцо достигает максимального диаметра (2...3 см). Для бактерий рода *Rhizobium* кетолактозный тест всегда отрицателен.

При просмотре под микроскопом чистой культуры живых клеток клубеньковых бактерий на препарате в раздавленной капле отмечают их большую подвижность. Каждая клетка совершает вибрирующие, "трепещущие", движения, занимая то вертикальное, то горизонтальное

по отношению к глазу исследователя положение. Бактерии очень полиморфны, но в основном мелкие. На фиксированных, окрашенных (лучше эритрозином) препаратах четко просматривается зернистость, т. е. "опоясанность" клеток.

11.5.2. Определение специфичности клубеньковых бактерий. Отбор активных (или эффективных) культур клубеньковых бактерий. Определение специфичности, или избирательной способности бактерий заражать определенный род, вид семейства бобовых растений или группу родов. Критерием служит появление хотя бы одного клубенька на корнях, инфицированных исследуемой культурой бактерий.

При отборе высокоэффективных клубеньковых бактерий основным, наиболее надежным критерием служит их влияние на урожай и содержание в растениях азота. Некоторые клубеньковые бактерии образуют клубеньки, но при этом усвоения молекулярного азота в бобово-ризобияльном симбиозе не происходит или оно происходит в слабой степени. В результате потребность растений в азоте не удовлетворяется. Такие клубеньки называют неактивными, или неэффективными. Обычно они мелкие, разбросаны по всему корню, содержат мало бактериальной ткани и быстро разрушаются. Случается, клубеньковые бактерии образуют клубеньки, паразитирующие на растении. Для получения высоких урожаев важно подобрать высокоэффективные культуры бактерий, изучить их особенности. Предварительный отбор возможен в условиях лабораторного, а затем вегетационного опыта, окончательно эффективность проверяют при полевых испытаниях.

Постановка опыта 1. Подбор активных культур клубеньковых бактерий по Разумовской проводят в лабораторных или вегетационных опытах. Для этого берут большие пробирки со средой следующего состава, г на 1 л дистиллированной воды: K_2HPO_4 — 1,0, $MgSO_4$ — 1,0, $CaCO_3$ — 0,5, $FeSO_4$, H_3BO_3 , $MnSO_4$ — следы, агар-агар — 1,0. Среду разливают в пробирки слоем 4 см, закрывают ватными пробками и 20 мин стерилизуют при 120 °C.

Одновременно стерилизуют семена концентрированной серной кислотой, налитой в коническую колбу на 0,7...1 л: мелкие погружают на 1...2 мин, крупные — на 3...5. При этом колбу слегка покачивают. После обработки кислоту сливают и сразу же быстро вливают в колбу большую порцию стерильной водопроводной воды. Если приливать воду медленно или в небольшом количестве, семена могут перегреться. Воду меняют несколько раз. По окончании промывания реакция среды на поверхности семян должна быть нейтральной (определяют лакмусовой бумагой или на вкус).

Стерильность семян проверяют посевом части их на МПА или бобовый агар. После прорастания семена переносят стерильным пинцетом в пробирки с агаровой средой одновременно с 1 мл взвеси культуры клубеньковых бактерий.

Для затемнения корней пробирки снаружи обертывают плотной бумагой так, чтобы она закрывала слой агар-агара и семена. Растения выращивают при естественном или искусственном освещении. По мере

их развития наблюдают за образованием клубеньков, массой растений и содержанием в них азота. Контролем служат пробирки, в которые не вносили бактерии.

Анализ 1. Общий азот в исследуемых растениях определяют микрометодом Кьельдаля. Навеску хорошо измельченного воздушно-сухого растительного материала массой около 0,2 г помещают в колбу Кьельдаля на 50...100 мл, приливают 10 мл фенолсерной кислоты и ставят на сжигание. Через сутки, когда жидкость приобретает желтую окраску, добавляют одну каплю хлорной кислоты (если жидкость темно-бурая, то две). По окончании сжигания жидкость обесцвечивается.

Колбу охлаждают и переносят раствор в мерную колбу на 100 мл, тщательно и многократно маленькими порциями ополаскивая колбу Кьельдаля и перенося промывные воды в ту же мерную колбу. Затем объем раствора доводят до метки и используют для дальнейшего отгона.

Прибор Кьельдаля состоит из отгонной колбы Кьельдаля, обратного холодильника, отстойника и колбы-парообразователя. В парообразователь наливают дистиллированную воду (не менее 2/3 объема), подкисленную концентрированной серной кислотой (1...2 мл) с несколькими каплями смешанного индикатора Гроака. Данный индикатор готовят так: к 100 мл 0,2 %-го спиртового раствора метилового красного добавляют 100 мл 0,1 %-го спиртового раствора метиленового синего. Хранят его в темной склянке с притертой пробкой длительное время.

В течение всей работы вода в парообразователе должна быть розовоокрашенной. В парообразователь вносят небольшое количество битого кирпича. Воду в парообразователе прогревают до начала работы. Для этого в отгонную колбу через воронку наливают около 20 мл дистиллированной воды, воронку закрывают, зажигают под парообразователем горелку и доводят воду в нем до закипания. Зажим парообразователя при этом бывает открыт, зажим отстойника закрыт.

Под холодильником, на конец которого надета резиновая трубка с капельницей, ставят рабочий стакан (пустой или с водой). Затем осуществляют "холостой" отгон так, как описано ниже, но вместо исследуемого раствора берут дистиллированную воду.

Исследуемый раствор отгоняют следующим образом. Под капельницу холодильника ставят приемную колбу или стакан. В нее наливают 10 мл 2 %-го раствора борной кислоты, подкрашенной индикатором Гроака (10 мл которого вносят на 1 л борной кислоты при приготовлении раствора). Приемную колбу ставят на подставку, чтобы капельница холодильника погрузилась в нее почти до дна.

В отгонную колбу пипеткой вносят 10 мл исследуемого раствора через воронку, ополаскивают воронку небольшими порциями дистиллированной воды, добавляют 10 мл 40 %-го раствора NaOH, снова ополаскивают воронку дистиллированной водой, кран воронки закрывают и в воронку наливают дистиллированную воду.

Открывают зажим предварительно нагретого парообразователя, выпускают пар, придвигают горелку при закрытом зажиме отстойника.

Начинает выделяться аммиак, который образовался ранее при сжигании органического вещества навески и был затем связан фенолсерной кислотой. Он отгоняется в приемник, где поглощается борной кислотой с образованием бората аммония.

Отгон аммиака прекращают через 5 мин с момента изменения розовой окраски раствора приемной колбы на зеленую. После этого капельницу холодильника вынимают из раствора кислоты и отгоняют пар еще 1...2 мин. Тщательно обмывают капельницу дистиллированной водой и титруют содержимое колбы 0,01 н. раствором серной кислоты из микробюретки до перехода зеленой окраски титруемого раствора в слабо-розовую.

После каждого определения отставляют горелку, закрывают зажим парообразователя, приемную колбу с отгоном заменяют рабочим стаканом, открывают зажим отстойника для слива раствора из отгонной колбы; когда в отстойнике остается примерно 1/3 жидкости, зажим отстойника закрывают. Прибор снова готов к определению.

Расчет 1. Количество азота, %:

$$N = \frac{100(a_2 - a_1) \cdot V \cdot 0,00014}{bH},$$

где a_1 — количество 0,01 н. H_2SO_4 , пошедшей на титрование "холостого" раствора, мл; a_2 — количество 0,01 н. H_2SO_4 , пошедшей на титрование испытуемого раствора, мл; 0,00014 — количество азота, связанное 1 мл 0,01 н. раствора H_2SO_4 , г; 100 — пересчет на %; V — объем исходного раствора, мл; b — аликвота, взятая для отгона, мл; H — навеска, г.

Постановка опыта 2. Более точные данные о размерах азотфиксации бобово-ризобияльного симбиоза можно получить, выращивая растения, инокулированные клубеньковыми бактериями в атмосфере, содержащей меченый азот — N_2^{15} с последующим определением количества фиксированного азота в масс-спектрометре.

Инокулированные растения выращивают длительное время в изолированной камере в газовой среде, содержащей меченый N_2^{15} . При этом регулируют газовый режим, контролируют изотопный состав азота в газовой смеси и поддерживают определенную влажность.

Расчет 2. По обогащению азота газовой смеси камеры, растений и субстрата изотопом N_2^{15} рассчитывают количество азота, используемого тест-растением из воздуха, мг:

$$x = \frac{b(a_1 - 0,386)}{a - 0,386},$$

где a — обогащение азота газовой смеси изотопом N_2^{15} , % N_2^{15} ; a_1 — обогащение азота исследуемого образца изотопом N_2^{15} , % N_2^{15} ; b — содержание азота в образце, мг; 0,386 — обогащение изотопом N_2^{15} азота образца в естественном состоянии.

Постановка опыта 3. Для оценки азотфиксирующей активности бобово-ризобияльного симбиоза ацетиленовым методом растения выращивают по методу Парижской и Гореловой в пробирках

2 × 20...2 × 30 см с отростком, на который надевают тонкий резиновый шланг, герметично закрытый на конце стеклянной палочкой. Пробирки на 1/4 заполняют средой следующего состава, г/л: KCl – 0,74; K₂HPO₄ – 0,3; K₂HPO₄ – 0,3; Mg SO₄ · 7H₂O – 0,5; CaSO₄ – 0,5; FeCl₂ – 0,04; агар-агар – 8.

Клубеньковые бактерии вносят в теплую среду в концентрации 1 · 10⁷ клеток/мл. Проросшие семена, предварительно простерилизованные (см. с. 135), помещают по одному в пробирки на поверхность застывшей, заселенной ризобиями среды. Растения выращивают в оранжерее в течение месяца. Азотфиксирующую активность определяют после 16-часового светового дня, вводя в пробирки по 0,5 мл ацетилена (см. 11.4.3).

11.5.3. Определение общего и активного симбиотического потенциалов (ОСП, АСП) и удельной активности симбиоза (УАС) по методу Посыпанова. Метод определения ОСП и АСП основан на относительном постоянстве массы клубеньков в определенной фазе развития растения (в течение примерно семи–десяти дней) и зависимости активности бобово-ризобияльной системы от массы клубеньков, содержащих леггемоглобин.

Расчет ОСП, т. е. средней массы всех клубеньков за период t , и АСП, т. е. средней массы розовых клубеньков с леггемоглобином, за тот же период, кг/га, проводят по формуле

$$t(M_1 + M_2)/2,$$

где t – время между двумя анализами, сут; $(M_1 + M_2)/2$ – средняя масса всех клубеньков – для ОСП или только розовых – для АСП.

Расчет ОСП и АСП за вегетационный период делают по сумме показателей ОСП и АСП соответственно за отдельные периоды.

Массу клубеньков растений на 1 га можно определить по массе клубеньков на единице площади (0,05 м²). Для этого готовят металлическую рамку (300 × 167 мм). Для культур рядового и узкорядного посевов рамку размещают так, чтобы в нее попали два рядка – при рядовом посеве и четыре – при узкорядном. Короткие боковые грани рамки располагают на середине междурядий.

Толщина монолита должна соответствовать глубине распространения клубеньков изучаемой культуры. Корни с клубеньками отмывают от почвы и учитывают массу всех клубеньков монолита. Зная площадь монолита и среднюю густоту стояния растений, определяют массу клубеньков на 1 га или на одно растение.

Массу клубеньков на 1 га рассчитывают по формуле

$$M = 10mS,$$

где 10 – коэффициент пересчета с г/м² в кг/га; m – масса клубеньков в монолите, г; S – площадь монолита, м².

Если площадь монолита равна 0,05 м², то $M = 2000m$. Если травостой не выравнен, сначала устанавливают коэффициент выравненности.

Например, суммарная площадь, не занятая бобовыми культурами (выпады), составляет 30 %, коэффициент выравнинности – 0,7. С поправкой формула примет вид

$$M = 10mk/S,$$

где k – коэффициент выравнинности.

Для расчета массы клубеньков на одно растение среднюю массу клубеньков монолита делят на среднюю густоту стояния.

Широкорядным способом с междурядьями 45 см сеют сою, фасоль. При этом в монолит площадью 0,1 м² войдет часть рядка длиной 22,2 см. Поскольку диаметр распространения клубеньков сои не превышает 25 см, ширину монолита, не снижая точности опыта, можно сократить с 45 до 25 см. Площадь такого монолита будет равна 0,1 м² и $M = 100m$ кг/га.

Удельную активность симбиоза (УАС) определяют следующим образом. В течение 1 сут через равные промежутки времени проводят пять-шесть определений нитрогеназной активности клубеньков (см. 11.4.3). Количество фиксированного азота, г/м² за 1 сут:

$$y = \Sigma \bar{n} \frac{t}{S},$$

где t – период между двумя анализами, ч; $\bar{n} = (n_1 + n_2)/2$ – средняя нитрогеназная активность за период t , мг/ч на сосуд (n_1 и n_2 – нитрогеназная активность по двум смежным определениям); $\Sigma \bar{n} t$ – суточная нитрогеназная активность, мг N₂ в сутки на один сосуд; S – площадь сосуда, м².

Количество азота, кг/га, фиксированного из воздуха за определенный отрезок времени:

$$N = 10\bar{y}t,$$

где t – период определения, сут; $\bar{y} = (y_1 + y_2)/2$ – средняя удельная азотфиксирующая активность за время t , г/м² в 1 сут; 10 – коэффициент пересчета с г/м² в кг/га.

Суммируя количество азота, фиксированного за отдельные периоды, можно рассчитать азотфиксацию за вегетационный период. УАС определяют на единицу площади (г/м² в 1 сут) или на единицу массы клубеньков (г/кг сырых активных клубеньков в 1 сут), или за период вегетации.

11.5.4. Определение вирулентности и конкурентоспособности клубеньковых бактерий. Вводные пояснения. Вирулентность, т. е. способность клубеньковых бактерий проникать в клетки корня растения, там размножаться и вызывать образование клубеньков, определяют по времени появления первого видимого клубенька. Критерием вирулентности может также служить доза инокулюма – "инфекционная нагрузка", "запас инфицирующего начала" – для осуществления процесса инфицирования в максимально короткие сроки. Отбор вирулент-

ных культур клубеньковых бактерий мелкосемянных растений проводят методом Фэреуса*.

Определение конкурентоспособности — это способность вирулентного штамма клубеньковых бактерий в присутствии других вирулентных штаммов обеспечивать преимущественное инфицирование бобового растения. Если вирулентность штамма оценивать в монокультуре (растение выращено в условиях асептики и заражено одним штаммом), то конкурентоспособность, проявляющуюся только при наличии двух или нескольких штаммов в зоне корня растения, определить довольно трудно. Для этой цели применяют серологический метод и метод метки штамма-мутанта по его антибиотикоустойчивости.

Основное условие при определении конкурентоспособности — проверка ее только у штаммов заведомо одинаково вирулентных или даже более вирулентных по сравнению с тем, который оценивают. Иначе можно допустить ошибку, приняв за более конкурентоспособный более вирулентный штамм. Критерий конкурентоспособности — количество клубеньков, образуемых каждым из вирулентных штаммов при их одновременном воздействии на растение. Правильнее конкурентоспособность определять в лабораторных, строго контролируемых условиях.

Постановка опыта 1. При серологическом методе оценки конкурентоспособности ризобий для иммунизации кроликов в качестве антигенов используют суспензии двух-трехсуточных культур быстрорастущих и пяти-семисуточных медленнорастущих штаммов в физиологическом растворе (2 мл на скошенный агар-агар). Для освобождения от неспецифических Н-антигенов суспензии прогревают в течение 30 мин на кипящей водяной бане и выдерживают одни сутки в холодильнике.

Иммунизацию осуществляют в ушную вену кроликов-самцов массой 3,5...4,5 кг возрастающим количеством инфицирующего материала. Всего вводят не менее 20 млрд клеток с интервалом в три дня. Курс иммунизации — шесть-восемь инъекций.

Кровь у опытных животных берут на седьмой день после последней иммунизации из наружной краевой вены уха. Собирают ее в стерильный сосуд, смоченный физиологическим раствором, ставят на 1 ч в термостат при 37 °С.

Кровяной сгусток отделяют от стенок пипеткой Пастера и ставят сосуд на 18...20 ч в холодильник при 4...10 °С. Пипеткой Пастера отделяют отстоявшуюся сыворотку (антисыворотку), переносят в стерильные пробирки. Консервировать сыворотку можно тимолом или борной кислотой (2 г на 100 мл), но лучше хранить ее в лиофилизированном состоянии.

Для реакции преципитации методом Оухтерлони используют пре-

* См. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Перверзева. — М.: Колос, 1979.

дельно чистый прозрачный агар-агар (лучше агар Дифко). В стерильные чашки Петри заливают расплавленный агар-агар слоем 3...4 мм. После застывания при помощи специального штампа в агар-агаре вырезают лунки диаметром 3...4 мм. Удобнее использовать штамп из семи трубочек: одна – центральная и шесть по окружности на расстоянии 8 мм друг от друга. В лунки пипетками Пастера наливают: в центральную – антисыворотку, в периферийные – растворы антигенов. Заполнять лунки следует быстро, аккуратно, не переливая жидкость через края и не касаясь их. Чашки помещают в эксикатор с водой на дне и тимолом в качестве антисептика. Реакцию проводят при 20 °С.

Анализ 1. Линии преципитации учитывают визуально на второй–четвертый день. Если определяют долю того или иного штамма, участвующего в образовании клубеньков в почве, чтобы оценить его конкурентоспособность, в качестве антигена берут культуры клубеньковых бактерий, выделенные из клубеньков и приготовленные так, как описано выше.

Постановка опыта 2. По методу метки исследуемые штаммы клубеньковых бактерий культивируют на средах с возрастающими (от 10 до 1000 ед/мл) дозами антибиотика, в частности стрептомицина или канамицина. При этом происходит адаптация отдельных штаммов к высокой дозе антибиотика. При инокуляции такими резистентными штаммами можно определить, какое количество клубеньков образовано, и таким образом получить характеристику их конкурентоспособности.

Анализ 2. Обычно исследуют не менее 100 клубеньков. После их стерилизации с поверхности (см. 11.5.1) каждый клубенок отдельно раздавливают в капле стерильной воды и проводят посев в чашки со стрептомицином. Если клубенок образован резистентным вариантом, то на среде со стрептомицином отмечают рост клубеньковых бактерий.

ГЛАВА 12

АНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

12.1. ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

12.1.1. Экспресс-метод определения жизнеспособности клеток клубеньковых бактерий в сухом нитрагине по Шильниковой, Сигуте. К бактериальным удобрениям относятся такие препараты, как нитрагин и азотобактерин. Первый содержит клетки клубеньковых бактерий, второй – клетки азотобактера. В 1 г сухого нитрагина должно содержаться не менее 70 млн клеток медленнорастущих культур и не менее 300 млн быстрорастущих.

Постановка опыта 1. Разводят в 99 мл стерильной водопроводной воды 1 г сухого нитрагина. Быстрорастущие культуры выдержи-

вают на качалке 90 мин, медленно растущие — 120 мин (220 об/мин*, 28 °С). Определяют рабочую концентрацию клеток (10...30 млн в 1 мл). Затем суспензию исследуемых клеток помещают в две одинаковые пробирки и окрашивают: в одной пробирке примулином (разведение 1:1000), в другой — акридиновым оранжевым (разведение 1:200 000).

Через 15 мин окрашенные суспензии наносят на предметное стекло по 0,01 мл, еще через 3...5 мин суспензию накрывают покровным стеклом 18×18 мм, края препарата парафинируют и подсчитывают клетки (не менее 100 полей зрения в трех повторностях для каждого образца).

Анализ 1. Сначала просматривают препарат, окрашенный акридиновым оранжевым, с масляной иммерсией под микроскопом МЛ-2. Площадь покадровой рамки (0,00306 мм²) представляет собой площадь поля зрения. Число полей зрения в площади 18×18 мм равно 105 882. Зная среднее число бактерий в одном поле зрения и разведение, подсчитывают общее число бактерий в мазке.

Препараты, окрашенные акридиновым оранжевым, могут храниться несколько месяцев. На этих препаратах учитываются и живые, и мертвые клетки (общее число).

Соотношение живых, поврежденных и мертвых клеток (в %) определяют по препаратам, окрашенным примулином — люминесцентным красителем, импрегнирующим оболочки живых клеток только в незначительной степени и легко проникающим и накапливающимся в мертвых клетках. Благодаря этой способности красителя живые клетки тускло люминесцируют, мертвые светятся ярким зеленовато-желтым цветом. Просматривают препараты, окрашенные примулином, в свете люминесценции (при освещении объекта сверху, через объектив).

Можно исключить окраску клеток акридиновым оранжевым. В таком случае после просмотра препарата, окрашенного примулином, в свете люминесценции следует просмотреть то же поле зрения при фазово-контрастном освещении объекта снизу, через конденсор. Однако следует помнить, что при освещении снизу препарат быстро выгорает и даже гибнет. Продолжительность его анализа не более 4 ч.

Число живых (жизнеспособных) клеток определяют по формуле

$$B = A - M,$$

где A — общее число клеток на препарате, подсчитанное при окраске акридиновым оранжевым в светлопольном микроскопе или при окраске примулином в фазово-контрастном микроскопе (принято за 100 %); M — число поврежденных и мертвых клеток (принято за x %).

Постановка опыта 2. Можно использовать контрастные флуорохромы (аурамин 00 и конго красный). Первые этапы подготовки те же, что и в первом опыте. После реактивации клеток и выдерживания на качалке суспензию клеток вносят в мерные центрифужные пробирки и окрашивают 3 мин конго красным (разведение 1:2000) при

* Для перевода в единицы СИ: 1 об/мин = 0,016667 с⁻¹.

pH 9, затем центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин. Заменяют конго красный аурамином (разведение 1:20 000) при pH 4,4, выдерживают 10 мин и 0,01 мл окрашенной суспензии наносят на предметное стекло, через 3...5 мин накрывают покровным стеклом (18 × 18 мм), края препарата парафинируют.

Анализ 2. Препарат просматривают в люминесцентный микроскоп не более 30 мин, не менее 100 полей зрения в трех повторностях для каждого образца в сине-фиолетовом свете. Живые клетки светятся зеленым цветом, мертвые — красным. Продолжительность анализа не более 4 ч.

Важное условие анализа — подготовка покровных и предметных стекол. Их кипятят 20 мин в мыльном растворе нейтрального мыла типа "Детское" на дистиллированной воде; тщательно промывают проточной и ополаскивают дистиллированной водой; подсушивают и заливают хромовой смесью не менее чем на 2 ч. В этой же смеси стекла можно хранить.

После обработки хромовой смесью стекла промывают проточной водой, затем дистиллированной и кипятят 5 мин в 5 %-м растворе Na_2CO_3 . Снова споласкивают дистиллированной водой, потом слабым раствором уксусной кислоты и тщательно промывают дистиллированной водой. Сушат стекла на воздухе или в сушильном шкафу, хранят в смеси Никифорова (спирт:эфир = 1:1), но лучше использовать их сразу. Указанная подготовка стекол исключает свечение фона самих стекол при обработке препарата люминофором.

12.1.2. Экспресс-метод определения числа жизнеспособных клеток клубеньковых бактерий в ризоторфине на мембранных фильтрах по Шильниковой, Сигуте. При возделывании бобовых культур стали применять ризоторфин — сыпучую массу с влажностью 50...55 %, расфасованную в полиэтиленовые пакеты по 200, 400, 600 или 800 г. Ризоторфин для сои и люпина хранят при 12...14 °C, для остальных культур — при 3...5 °C. Срок ее годности — шесть месяцев. В 1 г ризоторфина содержится 2,5 млрд клеток клубеньковых бактерий.

Постановка опыта. Поскольку часть клеток клубеньковых бактерий в ризоторфине адсорбирована, сначала их десорбируют с торфяных частиц растиранием ризоторфина в 0,1...0,5 %-м растворе пирофосфата натрия или обработкой твином-20 (поверхностно-активное вещество).

Мембранные фильтры № 1 с диаметром пор 0,3 мкм, № 2 — 0,5 мкм или "Сынпор" (Прага) — 0,23 мкм маркируют по лицевой (матовой) стороне простым карандашом и кипятят 20...30 мин в дистиллированной воде в открытом химическом стакане с трех-пятикратной сменой воды и начальной температурой 45...50 °C (для предотвращения скручивания фильтров). При кипячении и смене воды происходит стерилизация фильтров, вытесняется воздух из пор, удаляются из фильтров растворители.

Разводят 10 г препарата ризоторфина в 90 мл стерильного раствора пирофосфата натрия, предварительно растерев его до пастообразного

состояния, и делают последовательные разведения. Прокипяченный мембранный фильтр вместе с обычным из фильтровальной бумаги, тоже прокипяченным фильтром, вкладывают на фильтроносную пластинку фильтра Зейтца, закрепляют воронкой (можно вместо фильтра Зейтца использовать специальные приборы Рублевской водопроводной станции). Фильтруют 1 мл раствора ризоторфина намеченного разведения, распределяя его равномерно по всей поверхности фильтра при отрицательном давлении, например, через воронку Бюхнера посредством водоструйного насоса.

Далее бактерии подращивают на среде Исварана: быстрорастущие клубеньковые — 6...8 ч, медленно растущие — 18...24 ч; на МПА — общую микрофлору. С этой целью фильтры маркированной стороной вверх фламбированным пинцетом переносят в чашки Петри с заранее налитой и застывшей агаризованной (0,7...1 % агар-агара) средой Исварана и МПА. На фильтре с диаметром фильтрующей поверхности около 30 мм не должно быть более 50 колоний.

Состав среды Исварана, г/л: маннита — 10; K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4$ — 0,2; NaCl — 0,1; глюконата кальция — 1,5; $FeCl_3$ — 0,01; дрожжевого экстракта — 2; pH среды 6,8 (устанавливают раствором NaOH). Стерилизуют среду при 0,5 атм 30 мин, для подавления сапротрофной микрофлоры добавляют 0,01 % кристаллического фиолетового.

Колонии на фильтрах окрашивают в течение 5 мин раствором акридинового оранжевого (1:1000) на фосфатном буфере (pH 8), промывают стерильной водопроводной водой 1...2 мин. В гашении фильтр не нуждается, поскольку кристаллический фиолетовый — прекрасный тушитель фона. Для хранения фильтры фиксируют в парах формалина, для чего 10 %-й раствор формалина наливают на дно чашки Петри; на крышку которой прикрепляют влажный мембранный фильтр с выросшими колониями. Чашку Петри помещают в термостат или на нагревательный столик при 40 °C на 15...20 мин.

Перекрашенные фильтры отмывают через влажную фильтровальную бумагу: на фильтровальную бумагу, обильно смоченную водой, помещают мембранные фильтры тыльной стороной на несколько минут. Меняя фильтровальную бумагу, доводят окраску фильтров до нужной степени яркости. Высушенные фильтры можно осветлять, нанося на них несколько капель иммерсионного масла.

Анализ. Колонии подсчитывают под люминесцентным микроскопом в сине-фиолетовом свете (объектив 10х, окуляр любой). Можно считать их на приборе для подсчета колоний визуальном, особенно если метод модифицируют для подсчета чистых культур клубеньковых бактерий, например, когда необходимо определить дозу инокулюма на препарате. В этом случае через 15...18 ч подращивания быстрорастущих культур и 36 ч подращивания медленно растущих их окрашивают 0,25 %-м раствором хризоидина, эозина или 2 %-го эритрозина в 5 %-м растворе карболовой кислоты (феноле) в течение 7 мин.

12.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА КЛЕТОК АЗОТОБАКТЕРА В АЗОТОБАКТЕРИНЕ

Помещают 10 г почвенного препарата азотобактерина в 100 мл воды, выдерживают 1 ч, периодически встряхивая. Затем энергично встряхивают содержимое 10 мин, переносят 10 мл полученной бактериальной взвеси в колбу с 90 мл стерильной водопроводной воды и встряхивают 5 мин, получают разведение 10^{-2} . Затем готовят последующие разведения: 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8} . Из последних двух три раза из каждого набирают по 1 мл суспензии, помещают в три параллельные чашки Петри, заливают слоем 7...10 мм расплавленного и охлажденного до 45 °С агара Эшби и тщательно перемешивают его с суспензией.

Как только агар-агар застынет, чашки переворачивают вверх дном и в таком положении выдерживают в термостате при 26...28 °С. Клетки азотобактера подсчитывают на третьи-четвертые сутки, общее их число определяют 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 МПА. Колонии посторонних микроорганизмов определяют через двое суток.

ГЛАВА 13 МИКРОБИОЛОГИЯ КОРМОВ

13.1. ЭПИФИТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ЗЕРНА

13.1.1. Общие сведения. На поверхности зерна обитают разнообразные микроорганизмы. Часть из них попадает туда из ризосферы, часть заносится с пылью и насекомыми. Однако на зерне, как и на прочей поверхности растений, развиваются лишь отдельные виды микроорганизмов, называемые эпифитами. Эпифитные микроорганизмы, размножающиеся на поверхности стеблей, листьев и семян растений, получили название микроорганизмов филлосферы.

Эпифиты питаются продуктами экзосмоса растений; устойчивы к высоким концентрациям фитонцидов, выдерживают периодические колебания влажности.

Численность этих микроорганизмов невелика, и видовой состав их довольно постоянен: более 90 % составляют гниlostные бактерии, в основном неспоронные бактерии (род *Pseudomonas*). Особенно часто на зерне встречается *P. herbicola* (*Erwinia herbicola*), образующая на плотных средах золотисто-желтые колонии. Встречаются также *P. fluo-*

rescens, микрококки, молочнокислые бактерии, дрожжи. Бацилл и микроскопических грибов немного.

В определенных условиях эпифитные микроорганизмы могут быть полезны для растений, так как препятствуют проникновению паразитов в ткани растения. На хранении зерна присутствие эпифитных микроорганизмов может сказываться отрицательно.

На развитие микроорганизмов на зерне, а следовательно, на сохранность последнего решающее влияние оказывают: влажность, температура, степень аэрации, целостность зерна и состояние его покровных тканей. В зрелом зерне вода находится в связанном состоянии и недоступна микроорганизмам, которые в этом случае находятся в состоянии анабиоза (покоя).

На зерне с повышенной влажностью микроорганизмы размножаются и тем быстрее, чем выше температура. Развитие микробиологических процессов на хранящемся зерне с повышенной влажностью приводит к заметному, а иногда и очень значительному повышению температуры. Это явление получило название "термогенез".

Самосогревание зерна ведет к смене микрофлоры. Свойственная зерну эпифитная микрофлора исчезает. Начинают обильно размножаться непигментированные неспороносные палочки, вытесняющие *Erwinia herbicola*. Позднее появляются термостойкие (термотолерантные) микрококки, на плотных средах чаще всего образующие мелкие белые плоские колонии, а также плесневые грибы, актиномицеты. Самосогревание свыше 40...50 °С способствует развитию спорообразующих и термофильных бактерий. По мере самосогревания изменяется видовой состав и плесневых грибов. Виды *Penicillium*, преобладающие вначале, заменяются представителями рода *Aspergillus*.

Таким образом, по видовому составу микрофлоры можно судить не только о том, подвергалось ли зерно 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 семенами всхожести.

Кроме порчи самого зерна благоприятные условия для развития на его поверхности микроорганизмов приводят к накоплению выделяемых ими токсинов. При скармливании такого зерна скоту и домашней птице возникают отравления. Таким образом, правильное хранение зерна сводится к тому, чтобы не допускать развития на нем микроорганизмов.

13.1.2. Количественный учет 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 10 мин. Из полученной вытяжки готовят разведения (10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4}). Отдельными стерильными пипетками Мора берут по 10 мл суспензии и переносят в колбы, содержащие по 90 мл стерильной водопроводной воды. Затем из каждой колбы берут по 1 мл суспензии соответствующего разведения в стерильные чашки Петри в двух пов-

торностях. В каждую чашку Петри выливают по одной пробирке расплавленного, но предварительно охлажденного до 50 °С МПА. Чашки инкубируют при 30 °С. Наряду с МПА используют элективные среды (см. 13.2.3).

Через три—пять дней инкубации подсчитывают общее число колоний, выросших на МПА в чашках, и рассчитывают количество микроорганизмов на 1 г зерна.

13.1.3. Определение 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 общего числа микроорганизмов.

На основании микробиологического анализа делают заключение о качестве зерна. На свежем доброкачественном зерне преобладает *Erwinia herbicola* (до 80 %), образующая блестящие оранжевые колонии. Встречается *Pseudomonas fluorescens*, формирующая желтовато-зеленоватые флуоресцирующие колонии; непигментированные неспорообразующие палочки; дрожжи — блестящие, выпуклые, часто окрашенные в розовые тона колонии. При учете на сусло-агаре с мелом выявляются молочнокислые бактерии, образующие чечевицеобразные мелкие колонии с зонами растворения мела.

На несвежем зерне, хранившемся при повышенной влажности, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens* не выявляются. Обнаруживаются микрококки, образующие мелкие белые блестящие плоские колонии; спорообразующие палочки; актиномицеты, а также 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 хранившееся в условиях повышенной влажности. Весы и разновесы. Часовые стекла. Колбы со стерильной водой (по 90 мл), колбы со стерильной водой (по 50 мл) и песком. Стерильные пипетки Мора на 10 и 1 мл. Стерильные чашки Петри. МПА в пробирках и колбах. Водяная баня, треножник. Микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

13.2. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИЛОСА

13.2.1. Общие сведения. 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 кислоты, подавляющие развитие гнилостных, маслянокислых и других бактерий, снижающих качество корма.

Молочнокислые бактерии снижают pH корма до 4,2...4. Если кислотность силоса по тем или иным причинам уменьшается (pH выше 4,5...4,7), то создаются условия, благоприятствующие жизнедеятельности микроорганизмов, ухудшающих хранение корма. В нем накапливаются масляная кислота, амины, аммиак и другие продукты.

Для нормального развития молочнокислых бактерий в процессе силосования необходимы достаточное содержание сахара в силосующихся растениях и анаэробных условиях. Плесневые грибы переносят сильное подкисление, но представляют собой строгих аэробов, поэтому в хорошо спрессованном, укрытом, заквашенном корме размножаться не могут.

Во время брожения с распадом сахара увеличивается количество органических кислот. Однако снижение реакции среды зависит не только от образования молочной и уксусной кислот, но и от буферности растительного материала, которая, в свою очередь, определяется присутствием белка, солей.

Чем выше буферность растительной массы, тем больше нужно кислот, чтобы увеличить кислотность корма, т. е. буферный материал связывает, нейтрализует часть молочной кислоты (ионы водорода). Поэтому, несмотря на накопление кислоты, реакция 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. Чем больше буферно исходное сырье, тем больше оно должно иметь сахаров для получения силоса хорошего качества. Таким образом, силосуемость растений определяется также их специфическими буферными свойствами.

Буферность растертой растительной массы определяют при титровании по количеству 0,1 н. раствора молочной кислоты, необходимому для смещения pH до 4. Поскольку на образование молочной кислоты затрачивается примерно 60 % сахаров корма, рассчитав, сколько сахаров составляют 100 %, определяют так называемый сахарный минимум данного растительного сырья, т. е. наименьшее количество сахара, необходимое для образования такого количества молочной и уксусной кислот, которое сместит pH до 4.

Растения хорошо силосуются, если в них много сахара, а сахарный минимум небольшой. Если фактическое содержание сахара в растениях примерно равно сахарному минимуму, то они силосуются плохо и малейшее отклонение в процессе силосования приведет к порче корма. Если фактическое содержание сахара меньше сахарного минимума, то растения не силосуются.

Хороший силос характеризуется следующими показателями: цвет – оливково-зеленый (лишь несколько изменяется), запах – приятный (моченых яблок, печеного хлеба), pH 4...4,2, общая кислотность – 2...2,5 % (в переводе на молочную кислоту), влажность – 70 %.

Микрофлора силоса хорошего качества представлена молочнокислыми палочками и молочнокислыми стрептококками, часто в небольших количествах встречаются дрожжи. Последние образуют эфиры, придающие силосу приятный запах, и обогащают корм белком и витаминами. Однако в больших количествах дрожжи ухудшают качество силоса – снижают его кислотность, так как служат конкурентами молочнокислых бактерий в потреблении сахара.

В первый период после закладки силоса бурно развивается микрофлора смешанной фазы брожения, обычно представленная на поверхности здоровых растений: гниlostные 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 pH до 4 и ниже) микробиологические процессы в силосе в основном заканчиваются.

13.2.2. Качественный состав микрофлоры силоса. Для анализа из торцевой части траншеи, ям или наземных буртов берут среднюю пробу силоса. Сняв стерильным ножом верхний слой, вырезают кубики по средней линии бурта с интервалом в 1 м. Их складывают в стерильную стеклянную колбу на 1...2 л с притертой пробкой так, чтобы силос был уложен плотно и доверху. Пробы перемешивают в стерильном кристаллизаторе, измельчают стерильными ножницами и берут навески для анализов. Исследование проводят не позднее чем через сутки после взятия пробы.

Для знакомства с микрофлорой силоса из него готовят препарат следующим образом. Берут пинцетом силос и плотно прижимают его к предметному стеклу без добавления воды так, чтобы на стекле остался отпечаток. Препарат сушат на воздухе, фиксируют на пламени и окрашивают метиленовым синим 2...3 мин. Смыв краситель водопроводной водой и высушив вдали от пламени, микроскопируют с иммерсионной системой.

На препарате видны тонкие неспорообразующие палочки, варьирующие в размере (молочнокислые бактерии), и молочнокислые стрептококки. Среди последних обычно преобладают *Lactobacillus plantarum* – гомоферментативные мезофильные короткие палочки, часто располагающиеся параллельными рядами. Встречаются клетки почкующихся дрожжей. Споровые формы бактерий наблюдают редко. В некачественном силосе на препарате видны спорообразующие палочки (маслянокислые бактерии, аэробные гниlostные бактерии), а также плесневые грибы.

13.2.3. Количественный учет микроорганизмов в силосе. Навеску силоса в 5 г помещают в колбу с 50 мл стерильной водопроводной воды и 2...3 г песка. Жидкость в колбе взбалтывают круговыми вращательными движениями 10 мин. Из полученной вытяжки готовят разведения (10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6}), а затем высевают из соответствующих разведений на элективные среды: 1 мл суспензии – при глубинном посеве, 0,05 мл суспензии – при поверхностном. Инкубация при 28 °C.

Определение количества молочнокислых бактерий проводят на сусло-агаре с мелом или капустном агаре с мелом (среда 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. 35).

Колонии молочнокислых бактерий на сусло-агаре с мелом и капустном агаре с мелом подсчитывают на пятый-шестой день, а на капуст-

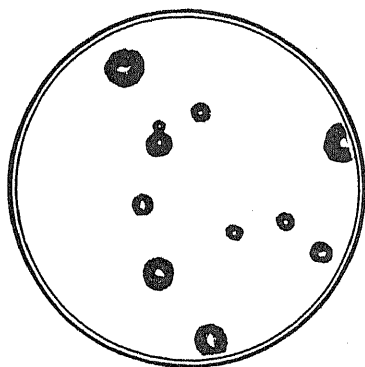


Рис. 35. Зоны растворения мела вокруг колоний молочнокислых бактерий силоса

ном агаре со спиртом и мелом — на седьмой—десятый. *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 ведут на пятый—седьмой день.

Количество микроскопических грибов и дрожжей определяется на сусло-агаре со стрептомицином (*среда 4*) поверхностным посевом. Подсчет колоний ведут на третий—четвертый день, при необходимости повторно — на седьмой—восьмой.

Титр маслянокислых бактерий устанавливают на жидкой среде Емцева (*среда 5а*) и картофельной среде (*среда 5*). Для определения количества спор маслянокислых бактерий делают посев из суспензии после ее пастеризации в течение 10 мин при 75 °С. Учет ведут по интенсивности выделения газа (кусочки картофеля всплывают), титр маслянокислых бактерий и их спор устанавливают методом предельных разведений по Мак-Креди.

Аэробные протеолитические бактерии учитывают на МПБ (*среда 6*) по накоплению газа в поплавках. Посевы выдерживают при 28 °С две недели.

При анализе силосов из трав, выращенных на фоне высоких доз азотных удобрений, денитрифицирующие бактерии учитывают на среде Гильтая (*среда 7*). Посевы выдерживают 10...12 дней при 28 °С. Количество денитрификаторов определяют по интенсивности выделения газа и изменению цвета индикатора.

При анализе силоса учитывают также споры аэробных гнилостных бацилл. На плотной среде (*среда 8*) делают поверхностный посев. Чашки инкубируют при 28 °С, подсчет колоний выполняют на четвертый день.

Бактерии группы кишечной палочки учитывают на среде Кесслера или Булора по выделению газа и накоплению его в поплавках. Пробирки выдерживают 48 ч при 40...42 °С.

Доминирующие на плотных средах колонии микроскопируют. Для обнаружения маслянокислых бактерий из пробирок с картофелем готовят препарат в раздавленной капле с добавлением раствора Люголя.

Состав элективных сред. *Среда 1* — сусло-агар с мелом. Сусло, разбавленное до 3 % по Баллингу, — 1 л, агар-агар — 20...25 г, стерильный мел — 30 г. Стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Среда 1а — капустный агар с мелом. Капустный бульон — 900 мл, дрожжевой экстракт — 100 мл, пептон — 10 г, глюкоза — 20 г, ацетат натрия — 3,35 г, MnSO_4 — 0,025 г, агар-агар — 15...20 г. Стерильный мел добавляют в колбы из расчета 5 г на 200 мл среды. Стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Среда 2 — капустный агар со спиртом и мелом. В расплавленную и охлажденную до 50 °С среду прибавляют 20 мл этилового спирта (96 %-го) 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-агар (хорошо промытый) — 15...20 г. Стерилизуют при 1 атм 20 мин.

Среда 4 — сусло-агар со стрептомицином. Сусло, разбавленное до 3 % по Баллингу, — 1 л, агар-агар — 25 г. Стерилизуют при 0,5 атм 30 мин. Перед разливкой среды в чашки Петри в сусло-агар добавляют 80...100 ед. стрептомицина на 1 л среды.

Среда 4а — подкисленный сусло-агар. Сусло, разбавленное до 3 % по Баллингу, — 1 л, агар-агар — 20...25 г. Стерилизуют при 0,5 атм 30 мин. Перед разливом среды в чашки Петри в расплавленный сусло-агар добавляют прокипяченную в течение 10 мин на водяной бане молочную кислоту (2 мл на 1 л среды).

Среда 5 — картофельная среда с мелом. В пробирки вносят стерильный мел (на кончике скальпеля), восемь-десять картофельных кубиков величиной 2...3 мм заливают водопроводной водой до 3/4 объема пробирок. Стерилизуют при 1 атм 30 мин.

Среда 5а — картофельный крахмал — 20 г, пептон — 5 г, дрожжевой автолизат — 0,2 мг, KH_2PO_4 — 0,5 г, K_2HPO_4 — 0,5 г, MgSO_4 — 0,5 г, NaCl — 0,5 г, FeSO_4 — 0,01 г, MnSO_4 — 0,01 г, CaCO_3 — 10 г, смесь микроэлементов по Федорову — 1 мл, дистиллированная вода — 1 л; тиогликолевая кислота — 0,05 %, нейтральрот — 0,004 %, pH 7,4...7,5. Стерилизуют среду при 0,5 атм 30 мин. Температура инкубации посевов 30...35 °С.

Среда 6 — МПБ: пептон — 10 г, NaCl — 4 г, мясной бульон — 1 л. Наливают в пробирки с поплавками на 3/4 объема. Стерилизуют при 1 атм 20 мин.

Среда 7 — среда Гильта (видоизмененная). Цитрат (лимоннокислый) натрия — 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 %-й раствор бромтимолблау до pH 6,8...7. Стерилизуют при 1 атм 20 мин.

Среда 8 — МПА и сусло-агар 1:1. Стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Среда 9 — среда Кесслера. К 1 л водопроводной воды прибавляют 50 мл свежей бычьей желчи 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 %-го водного раствора генциана фиолетового в пробирки с поплавками и стерилизуют при 1 атм 15 мин.

Среда 10 — среда Булира. К 1 л МПБ добавляют 12,5 кг маннита и 6 мл 1 %-го раствора нейтральрота. Среду разливают в пробирки с поплавками и стерилизуют при 0,5 атм 30 мин. Среда имеет вишневый цвет, при развитии кишечной палочки становится оранжевой, и в поплавке скапливается газ.

13.2.4. Определение кислотности силоса. Для определения общей кислотности берут навеску силоса в 20 г и помещают в коническую колбу с обратным холодильником на 500 мл. Содержимое колбы заливают 200 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают и нагревают 1 ч.

После охлаждения содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр. Затем 10 мл фильтрата (с двойным количеством дистиллиро-

ванной воды) титруют 0,1 н. раствором NaOH 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 численное значение объема 0,1 н. раствора NaOH, израсходованного на титрование экстракта из 100 г силоса, на 0,009, находят количество кислоты в силосе, %.

Пример расчета. На титрование 10 мл вытяжки израсходовано 1,7 мл 0,1 н. раствора NaOH. Следовательно, на титрование 200 мл вытяжки пойдет 34 мл этого же раствора. Из 20 г силоса получено 200 мл вытяжки, для нейтрализации 100 г силоса необходимо X мл 0,1 н. раствора NaOH. Отсюда

$$X = \frac{100 \cdot 34}{20} = 170 \text{ мл } 0,1 \text{ н. NaOH.}$$

Умножив 170 на 0,009, получим содержание молочной кислоты, %:

$$170 \cdot 0,009 = 1,53.$$

Достаточно точные результаты получают, если определение кислотности ведут следующим образом. Берут навеску силоса в 5 г, растирают в ступке и помещают в широкую пробирку диаметром 2...2,5 см. Содержимое заливают 50 мл дистиллированной воды, закрывают резиновой пробкой и тщательно перемешивают. Навеску силоса 30 мин настаивают при 10...12 °С, затем определяют кислотность вытяжки титрованием.

Титруют 10 мл вытяжки с двойным количеством дистиллированной воды 0,1 н. раствором NaOH в присутствии фенолфталеина до появления устойчивой слабо-розовой окраски.

Пример расчета. На титрование 10 мл вытяжки израсходовано 1,7 мл 0,1 н. раствора NaOH. Следовательно, на титрование 50 мл вытяжки пойдет 8,5 мл этого раствора. Из 5 г силоса получено 50 мл вытяжки, для нейтрализации 100 г силоса необходимо X мл 0,1 н. раствора NaOH. Отсюда

$$X = \frac{100 \cdot 8,5}{5} = 170 \text{ мл } 0,1 \text{ н. NaOH.}$$

Содержание молочной кислоты равно, %:

$$170 \cdot 0,009 = 1,53.$$

При установлении реакции среды силоса готовят его вытяжку, определяют в ней pH, как для определения общей кислотности. Затем находят pH при помощи индикаторов или электрометрически. При использовании индикаторов поступают следующим образом. В фарфоровую чашку помещают 2 мл вытяжки силоса и добавляют две капли индикатора (смесь равных объемов бромтимолблау и метилрота). Сравнивая цвет содержимого чашки с данными, приведенными ниже, определяют концентрацию водородных ионов:

Цвет индикатора	pH
Красный.....	4,2 и ниже
Красно-оранжевый.....	4,2...4,6
Оранжевый.....	4,6...5,2
Желтый.....	5,2...6,1
Желтовато-зеленый.....	6,1...6,4
Зеленый.....	6,4...7,2
Зелено-синий.....	7,2...7,6

Материалы и оборудование. Весы и разновесы, конические колбы на 500 мл с обратным холодильником, широкие пробирки, треножник с асбестовыми сетками, колбы на 100 и 250 мл, воронки, бумажные фильтры, пипетки на 10 и 2 мл, фарфоровые чашки, пинцеты; индикаторы: смесь равных объемов бромтимолбау и метилрота, 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, в колбах – по 50 мл. Чашки и пробирки с посевами. Микроскоп и все необходимое для микроскопирования.

ГЛАВА 14

МИКРОБИОЛОГИЯ ПРОДУКТОВ ЖИВОТНОВОДСТВА

14.1. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОЛОКА

14.1.1. Общие сведения. Молоко – хорошая среда для микроорганизмов. В нем содержатся белки, небольшое количество пептона, свободные аминокислоты, молочный жир, молочный сахар, витамины (А, D, E, С, РР и группы В) и другие соединения. При благоприятных температурных условиях микроорганизмы бурно размножаются в молоке и ухудшают его качество.

Обсеменение молока микроорганизмами происходит при доении и хранении. Бактерии попадают в молоко из вымени, с кожи животного, посуды, оборудования, из корма, с рук и одежды доильщика, а при стойловом содержании животных – из желудочно-кишечного тракта (кишечная палочка, маслянокислые и гнилостные бактерии).

В выводные протоки вымени микроорганизмы проникают через каналы сосков. Большая часть их погибает благодаря бактерицидным свойствам ткани вымени. Жизнеспособными остаются наиболее стойкие группы – микрококки, стрептококки. Вследствие неблагоприятных условий содержания животных в вымя могут попадать и болезнетворные микроорганизмы.

При соблюдении санитарных правил в молоке преобладают микрококки, молочнокислые бактерии, стрептококки (кишечного происхождения), сарцины и др. Загрязненное молоко содержит значительное количество бактерий группы кишечной палочки, маслянокислых и гнилостных.

Во время хранения изменяется количество содержащихся в молоке бактерий и соотношение между отдельными их видами. Характер изменений зависит от температуры, продолжительности хранения и первоначального состава микрофлоры молока.

При микробиологическом анализе молока определяют общую численность бактерий, учитываемых на агар-агаре с гидролизованным молоком или на МПА, титр кишечной палочки (коли-титр) и делают пробу на редуктазу.

14.1.2. Проба на редуктазу. В молоке содержатся различные ферменты, в том числе редуктаза (анаэробная дегидрогеназа, передающая водород от окисляемого субстрата любому ненасыщенному соединению, но неспособная передать его кислороду воздуха). Редуктаза накапливается в молоке главным образом при размножении в нем микроорганизмов. Поэтому количество ее в молоке – показатель бактериальной обсемененности молока. Обнаруживается редуктаза по обесцвечиванию красителей: метиленового синего или резазурина.

При редуктазной пробе с метиленовым синим прибавляют реактив в молоко, отчего оно окрашивается в синий цвет. Редуктаза восстанавливает метиленовый синий, переводя его в бесцветную лейкоформу. Поэтому в присутствии редуктазы молоко, окрашенное метиленовым синим, обесцвечивается.

Свеженадоенное молоко восстанавливает метиленовый синий медленно, с увеличением числа бактерий в молоке скорость восстановления возрастает. По скорости восстановления в молоке метиленового синего примерно определяют численность бактерий и степень загрязнения молока. Однако строгой зависимости между числом бактерий в молоке и временем обесцвечивания в нем метиленового синего нет, так как каждый вид бактерий выделяет определенное, неодинаковое количество редуктазы.

Отбор пробы делают после тщательного перемешивания молока. Стерильным черпаком отбирают 50 мл молока в стерильную посуду, закрывают стерильной ватной пробкой и немедленно приступают к анализу.

В чистую пробирку наливают 1 мл раствора метиленового синего и 20 мл исследуемого молока, предварительно нагретого до 38...40 °С. После перемешивания пробирку ставят в редуктазник или термостат при 38...40 °С (указанная температура оптимальна для редуктазы) и наблюдают за обесцвечиванием через 20 мин, 2 ч и 5,5 ч. Проба на редуктазу считается законченной, когда наступает полное обесцвечивание молока. По времени обесцвечивания выделяют молоко четырех классов (табл. 3).

Редуктазная проба с резазурином длится не более 1 ч. В стерильные пробирки наливают 10 мл анализируемого молока, 1 мл 0,0005 %-го водного раствора резазурина, тщательно перемешивают и помещают на водяную баню при 38...40 °С. Изменение окраски учитывают через 20 мин и через 1 ч (табл. 4).

3. Определение качества молока по времени его обесцвечивания

Показатель	Класс			
	1-й	2-й	3-й	4-й
Время обесцвечивания, ч	5,5	5,5...2	2...0,5	20 мин
Примерное количество бактерий, млн	0,5	0,5...4	4...20	20
Качество молока	Хорошее	Среднего качества	Плохое	Очень плохое

4. Классификация молока по редуктазной пробе с применением резазурина

Качество молока	Количество бактерий в 1 мл молока, млн	Продолжительность изменения цвета, ч	Окраска молока
Хорошее	Менее 0,5	1	Сине-стальная
Удовлетворительное	От 0,6 до 4	1	Сине-фиолетовая или сиреневая
Плохое	От 4 до 20	1	Розовая или белая
Очень плохое	Более 20	20 мин	Белая

Пробирки с молоком, обесцвеченным через 20 мин, убирают, остальные находятся в водяной бане до конца опыта.

Во многих странах официально принята десятиминутная проба с резазурином. Молоко считают пригодным, если за это время исчезает сине-фиолетовое или сине-стальное окрашивание.

14.1.3. Определение общего количества бактерий в молоке. Вначале готовят разведения (10^{-1} ... 10^{-9}), для чего из отобранной пробы стерильной пипеткой берут 1 мл молока и переносят в пробирку с 9 мл стерильной водопроводной воды (технику приготовления разведений см. 5.1.1). Затем при глубинном посеве из разведений молока, обесцвечивающегося с резазурином менее чем через 20 мин, т. е. 10^{-4} , 10^{-5} и 10^{-6} , берут отдельной стерильной пипеткой по 1 мл суспензии и вносят в стерильные чашки Петри в двух-трехкратной повторности.

При обесцвечивании молока с резазурином более чем через 20 мин посев делают из разведений 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} . В чашки с суспензией вносят расплавленный и охлажденный до 45...50 °С МПА. Суспензию с агар-агаром перемешивают и чашки Петри с посевом помещают в термостат при 28...30 °С. После трехдневной инкубации подсчитывают колонии бактерий в чашках. Число дрожжей и плесеней подсчитывают на четвертый день. Число колоний умножают на степень разведения и определяют среднее арифметическое их число после учета колоний в трех чашках.

Это соответствует числу клеток в 1 мл молока.

14.1.4. Определение титра кишечной палочки (коли-титр). Важное значение при оценке молока имеет определение титра кишечной палочки – обитателя кишечника человека и животных. Бактерии этой группы указывают на фекальное загрязнение молока. Бактерии группы кишечной палочки могут вызывать вспучивание сыра на первых этапах его созревания.

Коли-титр – титр кишечной палочки – это наименьшее число исследуемого материала в миллилитрах, в котором еще обнаруживается кишечная палочка. Для выявления кишечной палочки и определения ее титра в молоке используют газообразующую способность группы бактерий *Coli aerogenes* на жидкой среде Булира следующего состава: МПБ – 1 л, маннит – 10 г, NaCl – 5 г.

Насыщенным раствором соды устанавливают нейтральную реакцию среды, затем подкрашивают ее насыщенным водным раствором нейтральнорота 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 °С.

В связи с тем что в пробах молока могут быть другие бактерии, сбраживающие лактозу с образованием газа, точно установить наличие кишечной палочки можно, сделав посев из забродившей жидкости на специфическую среду Эндо. Если бродильная проба положительная и культура на среде Эндо дает ярко-красные колонии, то в исследуемом субстрате присутствует кишечная палочка. Для полной идентификации нужны дополнительные данные: отсутствие разложения желатины, отсутствие газа и кислоты при культуре на сахарозе и образование скатола и индола в МПБ.

На основании определения титра кишечной палочки молоко по качеству подразделяют на классы (табл. 5).

5. Определение качества молока по коли-титру

Показатель	Класс			
	1-й	2-й	3-й	4-й
Коли-титр	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Качество молока	Хорошее	Среднее	Плохое	Очень плохое

14.1.5. Определение в молоке количества спор лактатсбраживающих анаэробных бактерий. При оценке качества молока необходимо определить количество спор лактатсбраживающих анаэробных бактерий. Иногда при нормальной кислотности молоко может быть обильно обсеменено спорами маслянокислых бактерий, которые выдерживают

пастеризацию. Развитие лактатсбраживающих маслянокислых бактерий особенно опасно в сырье на поздних этапах созревания вследствие выделения большого количества газа (CO_2 и H_2). Образование масляной кислоты придает сыру прогорклый вкус и делает совсем непригодным для реализации или резко снижает его качество.

Метод основан на способности анаэробных бактерий развиваться и давать видимые признаки роста — разрывы среды — в посевах прогретого молока в плотной питательной среде после выдержки в течение трех суток при температуре 37 °С.

Образцы молока по 10 мл переносят пипеткой в стерильные пробирки и закрывают ватными пробками. При этом необходимо следить, чтобы капельки молока не оставались на стенках пробирки. Пробирки с образцами молока вместе с контрольной пробиркой, содержащей 10 мл молока и термометр, помещают в водяную баню. В течение 30 мин в контрольной пробирке поддерживают температуру 75 °С (вода должна быть выше уровня молока в пробирке на 10...15 мм). Затем молоко во всех пробирках быстро охлаждают, погружая пробирки в холодную воду.

Из прогретых проб готовят разведения, для чего переносят 1 мл хорошо перемешанного молока в пробирку с 9 мл стерильной водопроводной воды (разведение 10^{-1}). Из готового разведения после тщательного перемешивания другой пипеткой переносят 1 мл жидкости в следующую пробирку с 9 мл стерильной водопроводной воды и получают, таким образом, разведение 10^{-2} .

Для определения количества спор лактатсбраживающих анаэробных бактерий в молоке проводят посев 1 мл исследуемого образца молока и его разведения в пробирку с 10 мл питательной среды, прокипяченной перед анализом в течение 30 мин и охлажденной до 40 °С. Каждый образец исследуемого молока и выбранных разведений засевают в две пробирки с питательной мясо-пептонной или лактатной средой, внося посевной материал на дно пробирки и не взбалтывая. Сверху посевы заливают слоем в 1,5...2 см расплавленного и предварительно охлажденного до 45 °С агар-агара. Пробирки помещают в термостат при 37 °С на 7 ч.

При приготовлении мясо-пептонной среды к 900 мл МПБ добавляют 5 г лактата кальция, 15 г ацетата натрия, 0,8 г хлорида цистеина, 40 мл дрожжевого автолизата или 4 г сухого дрожжевого автолизата и 20 г агар-агара. Смесь нагревают до температуры 95 °С, выдерживают при постоянном помешивании до расплавления агар-агара и добавляют 10 мл 0,01 %-го водного раствора тетрабората натрия, 10 мл 1 %-го раствора кислого карбоната натрия и 1 мл 0,4 %-го водного раствора индикатора нейтрального красного. При помощи 20 %-го водного раствора молочной кислоты устанавливают pH 5,7. Приготовленную среду разливают в пробирки по 10 мл, закрывают ватными пробками и стерилизуют 20 мин при температуре 115 °С. Затем ватные пробки заменяют стерильными резиновыми.

Допустимо использовать в анализе упрощенную среду следующего

состава: МПБ — 1 л; лактат кальция — 5,5; агар-агар — 20 г; 0,4 %-й водный раствор индикатора нейтральрота; рН 5,7. Стерилизуют среду при 0,5 атм 20 мин.

Наличие спор анаэробных лактатсбраживающих бактерий определяют по разрывам агарового столбика вследствие выделения газа анаэробными бактериями и по изменению цвета питательной среды из красного на соломенно-желтый. Наиболее вероятное число спор определяют по числу пробирок, в которых они дали рост, в таблице 6.

6. Определение вероятного числа спор лактатсбраживающих анаэробных бактерий в молоке

Число пробирок с положительными результатами при посевах			Наиболее вероятное число спор в 1 мл	Число пробирок с положительными результатами при посевах			Наиболее вероятное число спор в 1 мл
1 мл	0,1 мл	0,0 мл		1 мл	0,1 мл	0,0 мл	
0	0	0	0,0	1	1	2	—
0	0	1	0,5	1	2	0	2,0
0	0	2	—	1	2	1	3,0
0	1	0	0,5	1	2	2	—
0	1	1	0,9	2	0	0	2,5
0	1	2	—	2	0	1	5,0
0	2	0	0,9	2	0	2	—
0	2	1	—	2	1	0	6,0
0	2	2	—	2	1	1	13,0
1	0	0	0,6	2	1	2	20,0
1	0	1	1,2	2	2	0	25,0
1	0	2	—	2	2	1	70,0
1	1	0	1,3	2	2	2	110 и более
1	1	1	2,0				

Результаты, в которых количество пробирок с видимыми признаками роста маслянокислых бактерий при посевах 1; 0,1; 0,0 мл молока соответственно равно 002; 012; 021; 022; 102; 112; 122; 202 (см. первые три колонки таблицы), не могут быть использованы для расчета, так как в 95 % случаев они вызваны несвоевременной техникой приготовления разведений или присутствием антибактериальных веществ. В данных случаях исследования молока надо повторить.

Материалы и оборудование для 14.1.2...14.1.5. Разные по качеству пробы молока, высокие пробирки, цилиндры, раствор метиленового синего (5 мл насыщенного раствора метиленового синего на 195 мл дистиллированной воды), редуктазник с водой, нагретой до 38...40 °С, пробирки со стерильной водопроводной водой по 9 мл в каждой, стерильные пипетки Мора на 1 мл, пробирки со стерильной средой Булира с поплавами, расплавленный МПА, агаризованная среда для анаэробных микроорганизмов.

14.2. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

14.2.1. Выделение чистой культуры ацидофильной палочки. Ацидофильная палочка — гомоферментативная молочнокислая бактерия, обитающая в кишечнике человека и животных. Оптимальная температура для ее развития 37...40 °С, предельная кислотность до 220 °Т (2,0 %). Палочка устойчива к фенолу, образует антибиотические вещества. Кисломолочный продукт, приготовленный с использованием в качестве закваски ацидофильной палочки, используют для лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний, особенно молодняка крупного рогатого скота.

Для выделения ацидофильной палочки используют кал теленка. Из него готовят препарат, сушат на воздухе, фиксируют на пламени и красят метиленовым синим 2...3 мин. Подсчитывают число клеток ацидофильной палочки в десяти полях зрения и берут среднее арифметическое. В мазке преобладают гнилостные кокковые формы, палочки, встречаются единичные клетки *Lactobacillus acidophilus* — тонкие палочки, варьирующие по размеру, иногда содержащие зерна волютина (хорошо красятся метиленовым синим в синий цвет). Затем делают посев кала в стерильное молоко и инкубируют при 37...40 °С — оптимальных для развития *L. acidophilus*.

Из образовавшегося сгустка делают пересев в стерильное молоко и снова инкубируют при 37...40 °С. Таких посевов можно сделать три-четыре. Постепенно ацидофильная палочка, образуя молочную кислоту и получая оптимальные для развития условия, подавляет развитие гнилостных бактерий, содержащихся в кале. Такую накопительную культуру ацидофильной палочки высевают на плотную питательную среду и из отдельной развившейся колонии выделяют чистую культуру.

Плотной питательной средой может служить агар-агар с гидролизovanым обратом, который готовят следующим образом. 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 три дня при 40 °С. Ежедневно содержимое бутыли встряхивают, после чего открывают пробку для удаления паров хлороформа. Готовый раствор фильтруют и разбавляют в четыре-пять раз водопроводной водой. Доводят реакцию среды до pH 7...7,2 и стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

L. acidophilus образует мелкие колонии в глубине среды. Их рассматривают под микроскопом с объективом 8х. Колонии имеют вид рыхлых тонковолокнистых скоплений неправильной формы, напоминающих кусочки ваты или мха. Иногда их называют паучками. Из характерных колоний, расположенных изолированно от других, готовят фиксированный препарат и петлей делают посев в стерильный обрат.

Ацидофильная палочка образует в стерильном обрате однородный

плотный сгусток. Газообразования в культурах не отмечено. Пересевы повторяют, выдерживая пробирки в термостате при 37...40 °С. Отбирают те, в которых молоко сбраживается не позже чем через 12...14 ч. В лаборатории чистые культуры необходимо пересевать каждые семь-десять дней и хранить при 10 °С.

Для проверки свойств чистых культур *L. acidophilus* выделенные культуры используют как закваску 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, составляющем 5 % объема молока (на 100 мл молока 1/2...1 пробирка чистой культуры). Стаканы накрывают этикетками с надписью, завязывают нитками и ставят в термостат при 37 °С.

После сквашивания молока проводят органолептическую оценку ацидофильного молока и определяют его кислотность титрованием. Ацидофильная палочка образует в молоке однородный плотный тянувшийся сгусток казеиновой кислоты. Вкус чистый, кисломолочный с характерным металлическим привкусом.

14.2.2. Выделение чистой культуры молочнокислого стрептококка. *Streptococcus lactis* – гомоферментативная молочнокислая бактерия, возбудитель естественного скисания молока в средней полосе России. Оптимальная температура развития бактерий 30...35 °С, предельная кислотность 120 °Т. Для выделения молочнокислого стрептококка в чистую культуру используют сметану, простоквашу.

Готовят препарат, размазывая сметану тонким слоем (без воды) на подогретом на пламени горелки предметном стекле. Мазок сушат на воздухе, фиксируют смесью спирта с эфиром, окрашивают метиленовым синим 2...3 мин. При микроскопировании препаратов с иммерсионной системой наблюдают соединенные попарно или в виде коротких цепочек клетки *S. lactis*.

Если сметана несвежая, встречаются клетки дрожжей, молочной плесени – *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*), споровых палочек. Для выделения чистой культуры молочнокислого стрептококка используют сметану хорошего качества.

Сгусток сметаны петлей переносят в пробирку, содержащую 10 мл стерильной водопроводной воды. После перемешивания из этого разведения другой петлей берут суспензию и вносят в пробирку с расплавленным, но предварительно охлажденным до 50 °С МПА с 2 % сахарозы или агар-агаром с гидролизированным обратом.

Расплавленный агар-агар с суспензией выливают в стерильную чашку Петри. Чашки с посевом инкубируют при 30 °С два-три дня.

При посеве суспензии из сметаны на агаровые среды выявляется преимущественно *S. lactis*, который образует поверхностные и глубокие колонии. Первые – мелкие, точкообразные, диаметром 1 мм, выпуклые, голубоватые, прозрачные, вторые имеют форму чечевицы.

Колонии *S. lactis* просматривают под микроскопом с объективом 8×. Характерные колонии отмечают на чашке Петри восковым каранда-

шом. Из них готовят препарат для микроскопирования, а затем петлей делают пересев в стерильный обрат в пробирках, которые ставят в термостат при 30 °С.

14.3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДРУГИХ ПРОДУКТОВ

14.3.1. Микробиологический анализ сыра. В основе сыроделия лежат сложные биохимические процессы, основная роль в них принадлежит молочнокислому и пропионовокислому брожению. Большое влияние на качество готового продукта оказывает качество молока, и прежде всего степень обсемененности его нежелательными микроорганизмами.

Свертывание молока (коагуляция казеина) проводят, заквашивая его молочнокислыми бактериями и вводя сычужный фермент. Получаемые в результате сыры называют сычужными. Сыры, в созревании которых участвуют только молочнокислые бактерии, называют кисломолочными.

По степени разложения казеина сычужные сыры делят на твердые и мягкие. В твердых в растворимое состояние переходит 1/3 казеина, в мягких — почти весь. Твердые сыры, в свою очередь, делят на крупные (швейцарский, советский) и мелкие (голландский, костромской и др.).

Крупные сыры имеют более длительный период созревания (шесть–девять месяцев), чем мелкие (один-два месяца), в процессе их приготовления участвуют преимущественно молочнокислые палочки *Lactobacillus casei*, *L. helveticus*, в меньшей степени — молочнокислые стрептококки *Streptococcus lactis* и ароматобразующие стрептококки.

В закваску для крупных сыров наряду с молочнокислыми бактериями включают и пропионовокислые палочки. Стадия пропионовокислого брожения следует за стадией молочнокислого брожения и сопровождается накоплением летучих кислот (пропионовой, уксусной) и диоксида углерода, образующихся при сбраживании лактатов. Выделение диоксида углерода обуславливает появление рисунка сыра — так называемых "глазков".

В мелких сырах глазки образуются в первые дни ферментации в процессе жизнедеятельности ароматобразующих стрептококков. Свойства сыра — вкус, аромат, консистенция, рисунок — формируются при сложных биохимических процессах, главная роль в которых принадлежит микроорганизмам, внесенным в сырную массу с закваской.

Наличие микроорганизмов в сыре может служить и причиной различных его пороков. Раннее вспучивание сыров вследствие образования большого количества газов (CO_2 и H_2) вызывают бактерии группы кишечной палочки (см. 14.1.4) в период, когда в сыре еще недоиспользована лактоза. Позднее вспучивание вызывают маслянокислые бактерии рода *Clostridium* (см. 14.1.5), сбраживающие молочную кислоту в масляную с выделением CO_2 и H_2 . Изъязвление корки сыра могут вызывать плесневые грибы.

При полном анализе сыра количественное определение микроорга-

низмов выполняют методом посева измельченной и растертой при подогреве до 45 °С пробы сыра на агар-агаре с гидролизованным молоком. При изучении микрофлоры сыра можно также использовать метод отпечатков, дающий представление о естественном расположении микроорганизмов в сыре.

Для исследования берут свежий сыр. Сначала фламбированным ножом срезают то место, где будет взята проба. Затем срезают тонкий кусочек сыра и плотно сдавливают его между двумя сухими чистыми предметными стеклами. Стекла осторожно разъединяют и удаляют сыр.

Полученный на стекле отпечаток сушат вдали от пламени, фиксируют смесью спирта с эфиром и окрашивают метиленовым синим. При микроскопировании крупных сыров выявляются палочковидные формы молочнокислых и пропионовокислых бактерий, при микроскопировании мелких — молочнокислые стрептококки.

Материалы и оборудование. Свежий сыр (типа голландского), метиленовый синий, микроскоп и все необходимое для микроскопирования.

14.3.2. Микробиологический анализ сливочного масла. Различают два основных типа сливочного масла: сладкосливочное и кислосливочное.

Сладкосливочное масло готовят из пастеризованных сливок, которые не заквашиваются. В технологии приготовления масла этого типа микрофлора нежелательна: чем меньше микроорганизмов, тем лучше масло. Понижения численности микрофлоры достигают пастеризацией сливок с последующей упаковкой и хранением масла при низких температурах (–20 °С) и надлежащим уходом за оборудованием. Загрязнение масла возможно вследствие недоброкачественной воды, используемой для его промывания. В 1 мл свежего сладкосливочного масла содержится 50 000...100 000 клеток бактерий.

Технология кислосливочного масла основана на использовании молочнокислых бактерий для сквашивания сливок. После пастеризации в сливки вносят закваску, состав микрофлоры которой важен для повышения прочности (устойчивости при хранении) и аромата масла. В состав закваски входят *Streptococcus lactis*, *S. cremoris* и ароматообразующие бактерии: *S. diacetibactis*, *S. citrovorus* и *S. paracitrovorus*. В 1 мл кислосливочного масла содержится от 1 до 10 млн бактерий.

Масло для учета численности микроорганизмов берут стерильным шупом из двух-трех мест по 10...15 г и помещают в стерильные банки с притертыми пробками. При исследовании на плесневые грибы делают соскобы с поверхности масла, особенно с тех мест, где простым глазом или в лупу виден мицелий гриба.

Перед исследованием пробу масла расплавляют в банке на водяной бане, нагретой до 40...50 °С. Из расплавленного масла после тщательного перемешивания стерильной пипеткой берут 1 мл и вносят в пробирку с 9 мл стерильной воды, подогретой до 40 °С. Из полученного таким образом разведения 10^{-1} готовят все последующие (10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5}). Из соответствующих разведений делают посев на

элективные среды: для учета общего количества бактерий – на агар-агар с гидролизованным молоком или МПА, для учета протеолитических бактерий – на молочный агар, для учета молочнокислых бактерий – на агар-агар с гидролизованным обратом и мелом, для учета дрожжей – на сусло-агар со стрептомицином, для учета бродильного титра – на среду Кесслера.

Для микроскопического исследования берут кисломолочное свежее и несвежее масло. Плавят в стеклянном стакане на водяной бане при температуре 40 °С, перемешивают, наливают в центрифужную пробирку и центрифугируют 10 мин. Верхний слой сливают, из осадка готовят препарат. Мазок прогревают на пламени горелки и обезжиривают, прикладывая к неостывшему мазку фильтровальную бумагу. Окрашивают метиленовым синим в течение 2...3 мин.

В свежем кисломолочном масле наблюдают молочнокислые стрептококки, в несвежем наряду с молочнокислыми бактериями встречаются дрожжи, плесневые грибы, флуоресцирующие и гнилостные бактерии.

Материалы и оборудование. Образцы сливочного масла свежего и несвежего, водяная баня, банки с притертыми пробками, стерильные пипетки; составляющие элективных сред – МПА, агар-агара с гидролизованным обратом и мелом, сусло-агара со стрептомицином, среды Кесслера; центрифуги, лупы; метиленовый синий; фильтровальная бумага, горелки; микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

14.3.3. Микробиологический анализ мяса. Мясо здорового скота практически можно считать свободным от микроорганизмов. Мясо павших больных и переутомленных животных содержит аэробные и анаэробные микроорганизмы.

Бактерии, попавшие на поверхность мяса, постепенно проникают в глубь него. Скорость проникновения зависит от температуры и вида микроорганизмов. В мясо, охлажденное до 2...4 °С, бактерии проникают через 30 дней на глубину примерно 1 см. Проникновению микроорганизмов препятствует образующаяся в результате подсыхания корочка. При хорошей корочке туша может храниться при 0 °С около восьми недель.

После убоя скота происходят изменения в мышечной ткани, наступает период созревания мяса, характеризующийся сложными физико-химическими процессами, возникающими под влиянием ферментов. При распаде гликогена в мышечной ткани накапливается молочная кислота, а в результате распада АТФ – фосфорная кислота. Для завершения созревания мяса требуется обычно несколько дней. Если мясо хранить при температурах, благоприятных для развития микроорганизмов, в нем начнутся микробиологические процессы.

Преобладающей микрофлорой в гниющем мясе становятся гнилостные палочки. Примерно через три-четыре дня в глубине мяса начинают размножаться и анаэробы (*Clostridium perfringens*, *C. sporogenes* и др.). В мясе клинически здоровых животных иногда обнаруживают болезнетворные микроорганизмы, которые вызывают мясные отравления

(пищевые токсикоинфекции). Часть их содержится в кишечнике животных и в момент убоя.

В случае убоя животных, больных сибирской язвой, туберкулезом, бруцеллезом, рожей свиней и другими инфекционными заболеваниями, микроорганизмы-возбудители, безусловно, содержатся в мясе. Условия убоя, использование и выбраковка мяса больных животных регулируются особыми ветеринарными правилами.

По степени свежести мясо подразделяют на доброкачественное, мясо сомнительной свежести и мясо, непригодное в пищу.

Доброкачественное мясо имеет сухую корочку подсыхания бледно-розового или бледно-красного цвета. На разрезе оно плотное, эластичное, ямка после надавливания быстро исчезает. Несвежее мясо покрыто плотной, темно-красной или ослизненной корочкой. Консистенция его мягкая, несколько дряблая, образующаяся при надавливании пальцем ямка не заполняется. Запах неприятный, гнилостный. Такое мясо используют только по указанию ветеринарно-санитарного надзора. Испорченное мясо с ослизненной липкой поверхностью, на разрезе имеющее зеленый цвет, дряблой, мажущейся консистенции, со слизистым жиром и прогорклым запахом бракуют.

Для анализа берут два сорта мяса: свежее и несвежее. На предметных стеклах делают по два мазка-отпечатка — один с поверхностного, другой из глубинного слоя каждого сорта. Для приготовления препарата-отпечатка из поверхностного слоя стерильными ножницами вырезают кусочек (0,5...1 г) и прикладывают срезанной стороной к поверхности обезжиренного, фламбированного предметного стекла.

Чтобы приготовить препараты-отпечатки из глубоких слоев, поверхность мяса прижигают нагретым шпателем, стерильным ножом делают надрез и также берут из глубины небольшой кусочек (0,5...1 г), который прикладывают к стеклу. Препараты подсушивают на воздухе, фиксируют смесью спирта с эфиром, окрашивают фуксином и микроскопируют, подсчитывая количество микроорганизмов в каждом поле зрения и отмечая их форму.

Препарат-отпечаток свежего мяса окрашивается обычно плохо. Если он получен из поверхностного слоя мяса, то в поле зрения встречаются единичные палочки и кокки. В препаратах из глубоких слоев они или отсутствуют, или встречаются не во всех полях зрения.

Препарат-отпечаток мяса сомнительной свежести окрашивается удовлетворительно. При просмотре в каждом поле зрения обнаруживается по несколько десятков микробов. Особенно много их на препарате из поверхностного слоя. Препарат-отпечаток мяса, непригодного в пищу, окрашивается хорошо. В поле зрения на препаратах как из поверхностных, так и из глубоких слоев встречается в среднем более 30 микробов с преобладанием палочек.

При разложении мяса кокки в отпечатках почти отсутствуют, и все поле зрения усеяно палочками. Среди гнилостных микроорганизмов в мясе преобладают микрококки, кишечная палочка, флуоресцирующие бактерии, споровые формы. Из аэробных бактерий наиболее сильно-

действующими гнилостными микроорганизмами служат: *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, из факультативно-анаэробных – *Proteus vulgaris*, из анаэробных – *C. putrificus*, *C. sporogenes*.

Для выявления анаэробов поверхность мяса двух сортов (свежее и несвежее) прижигают нагретым шпателем, стерильным ножом делают надрез и берут из глубины по небольшому кусочку. Соблюдая правила асептики, опускают их в пробирки с расплавленным и предварительно охлажденным до 50 °С МПА. Вращая пробирку между ладонями, следят, чтобы кусочек мяса осел на дно пробирки.

Опытные пробирки с МПА, содержащие свежее и несвежее мясо, помещают в термостат при 40 °С. После инкубирования посевов в термостате в течение нескольких дней пробирки просматривают визуально. Если мясо несвежее, на МПА развиваются газообразующие анаэробные формы и в среде обнаруживаются разрывы агар-агара вследствие выделения микроорганизмами газа. В пробирках со свежим мясом столбик МПА будет плотным, не содержащим разрывов и трещин, так как газообразующие анаэробные формы в нем не развиваются.

Материалы и оборудование. Опытные пробирки с посевами, мясо свежее и несвежее, пробирки с МПА, водяная баня, ножи, скальпели; фуксин, спирт с эфиром; микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

14.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ

Широкое использование антибиотиков для лечения болезней привело к появлению форм микроорганизмов, устойчивых к различным антибиотикам. Возникает необходимость проводить лекарственную антибактериальную терапию с учетом чувствительности возбудителя болезни. Данный опыт позволяет определить чувствительность чистых культур микроорганизмов к антибиотикам методом бумажных дисков, пропитанных этими препаратами.

Метод основан на диффузии антибиотика из фильтровальной бумаги (пропитанный антибиотиком диск) в плотную питательную среду. Содержание большинства антибиотиков в дисках колеблется от 1 до 50 мкг. На практике пользуются стандартными дисками, выпускаемыми промышленностью.

Для определения чувствительности в стерильные предварительно подсушенные чашки Петри разливают по 20 мл МПА. На поверхность среды высевают суспензию суточной агаровой культуры микроорганизма (1 млрд микробных клеток на 1 мл по оптическому стандарту). Градуированной пипеткой берут 0,02 мл этой суспензии (одна капля) и стерильным шпателем растирают досуха на питательной среде в чашке Петри у пламени горелки. Затем стерильным пинцетом раскладывают диски фильтровальной бумаги, пропитанные разными антибиотиками, – всего шесть дисков.

Чашки выдерживают 30 мин при комнатной температуре (период преддиффузии препаратов в среду). Затем чашки помещают в термостат при 37 °С на 16...18 ч.

При оценке результатов опыта измеряют диаметр зон задержки роста микроорганизмов вокруг дисков с антибиотиками, включая диаметр самого диска. Отсутствие зоны задержки роста микроорганизма означает, что испытуемый штамм устойчив к данному препарату. Зоны диаметром до 10 мм указывают на малую чувствительность, зоны диаметром больше 10 мм – на нормальную чувствительность микроорганизма.

Результаты опыта записывают по следующей форме:

Антибиотик	Диаметр зоны задержки роста микроорганизма	Заключение
------------	--	------------

Материалы и оборудование. Стерильный МПА в колбах или пробирках, стерильные чашки Петри, диски, пропитанные антибиотиками, чистые культуры микроорганизмов, стерильные градуированные пипетки на 1 мл, стерильные шпатели, стерильная вода (по 5 мл) в пробирках.

14.5. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ВОДЫ

14.5.1. Общие сведения. Степень микробного загрязнения воды важно учитывать в технологии пищевых производств. Вода, поступающая на производство, по качеству должна соответствовать санитарным нормам. Для контроля за санитарным состоянием такой воды регулярно проводят микробиологический анализ. Водопроводную воду исследуют не реже одного раза в месяц, артезианскую – не реже одного раза в год, воду открытых водоемов и колодцев – ежедневно.

Пробы воды для микробиологического исследования отбирают с соблюдением правил асептики (стерильности) в стерильную стеклянную посуду с притертыми или ватно-марлевыми пробками. Перед взятием пробы из водопроводного крана, трубы или колодца с насосом воду спускают в течение 5...10 мин, а края спускной трубы перед набором воды обжигают пламенем. Из открытых водоемов пробы воды отбирают при помощи специальных приборов – батометров – на уровне 10...15 см от дна. В проточных водоемах пробы отбирают около берега и в центре течения.

При обычном плановом санитарном контроле должно быть взято не менее 500 мл воды, для исследования на присутствие патогенных микроорганизмов – не менее 1 л. Пробы отбирают в часы наибольшего расходования воды на предприятии. Микробиологическое исследование выполняют не позднее 2 ч с момента взятия пробы. В исключительных случаях допускается удлинение срока, но не более чем до 6 ч при обязательном хранении проб при низких положительных температурах (1...5 °С). В теплое время года при транспортировании пробы предохраняют от нагревания, а в зимнее время – от замораживания.

При санитарно-микробиологическом исследовании воды определяют микробное число и количество бактерий группы кишечной палочки (коли-титр).

14.5.2. Определение микробного числа. Микробное число (общая микробная загрязненность) определяется числом микробных колоний, которые вырастают на простой питательной среде (МПА) при 37 °С в течение 24 ч из посева 1 мл исследуемой пробы воды.

Данный показатель позволяет учитывать не все микроорганизмы, содержащиеся в 1 мл воды, а лишь способные расти на простых средах при указанной температуре (мезофильные, сапротрофные). Однако число сапротрофных микроорганизмов, вырастающих на МПА, обычно соответствует степени загрязненности воды органическими веществами и, таким образом, косвенно характеризует ее санитарное состояние. Для определения микробного числа делают посевы с соблюдением правил асептики в чашки Петри с МПА методом заливки с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 30 до 300 колоний. Поэтому из проб артезианской и водопроводной воды (содержащей обычно меньше микроорганизмов) высевают соответственно объемы в 1 мл, 0,1 мл из неразведенных проб. При исследовании воды открытых водоемов высевают по 1 мл из предварительно приготвленных в стерильной воде десятикратных разведений исследуемой пробы (10^{-1} ... 10^{-3} и более, в зависимости от предлагаемого загрязнения).

Указанные выше объемы проб (1 мл, 0,1 мл) воды или ее разведений (по 1 мл каждого) вносят стерильной пипеткой в пустые стерильные чашки Петри, в которые затем заливают расплавленный теплый МПА с температурой не выше 45...46 °С. Воду и МПА тщательно перемешивают и после застывания среды посевы выращивают в термостате при 37 °С в течение 24 ч. Затем подсчитывают выросшие микробные колонии.

Общее число микробных колоний, выросших на всей чашке Петри, умножают на разведения, из которых был сделан высев 1 мл (чтобы перевести на 1 мл исследуемой воды). Затем выводят среднее арифметическое число колоний – микробное число исследуемой пробы.

14.5.3. Определение коли-титра (см. 14.1.4) и коли-индекса. Коли-индекс – индекс кишечной палочки – это число кишечных палочек, обнаруженных в 1 мл исследуемой воды (по зарубежному – международному и европейскому – стандарту в 100 мл).

Кишечная палочка – самый многочисленный и постоянный обитатель толстого отдела кишечника человека и всех теплокровных животных. Она выделяется во внешнюю среду с испражнениями, т. е. с фекальными массами, поэтому используется как индикатор фекального загрязнения внешней среды и косвенный показатель наличия в воде болезнетворных микробов – возбудителей кишечных инфекций человека, выделяемых с фекалиями в воду и другие объекты.

Таким образом, кишечная палочка служит санитарно-показательным микроорганизмом воды. Непосредственное определение возбудителей кишечных заболеваний – дизентерийных, брюшнотифозных, паратифозных бактерий, холерного вибриона и других – связано с большими трудностями ввиду их малочисленности в фекальных массах и прихотливости при искусственном выращивании на питательных средах. Поэтому присутствие перечисленных микроорганизмов обычно

устанавливают при определении степени зараженности исследуемой воды кишечной палочкой теплокровных животных (коли-титра и коли-индекса). Кишечная палочка — специфический представитель кишечной микрофлоры человека и животного, по сравнению с болезнетворными микроорганизмами, обитающими в кишечнике, она неприхотлива, обладает способностью сбраживать углеводы при повышенной температуре культивирования, поэтому легко обнаруживается. Сроки выживания этого микроорганизма во внешней среде примерно те же, что и у возбудителей желудочно-кишечных заболеваний человека.

Коли-титр определяют методами бродильных проб. Данные методы основаны на способности кишечной палочки теплокровных животных и человека развиваться при повышенных температурах (43...44 °C) и сбраживать сахара (маннит, глюкозу и др.) с выделением газа. Существуют двух- и трехэтапные бродильные методы.

Трехэтапный бродильный метод заключается в следующем. На первом этапе ставят первую бродильную пробу, т. е. различные убывающие пробы исследуемой воды при помощи стерильных пипеток засевают в колбы и пробирки со специальными углеводными жидкими средами (среда Булира, среда Эйкмана, розоловая и др.) и поплавками. (Среда Булира состоит из МПБ, маннита и нейтральрота.)

В зависимости от характера водоисточника, т. е. предполагаемого микробного загрязнения, применяют разные схемы посева. Так, при исследовании водопроводной воды делают посевы в общем объеме 300 мл (два объема по 100 мл и десять объемов по 10 мл). Воду Москвы и Санкт-Петербурга засевают в объеме 500 мл (четыре объема по 100 мл и десять объемов по 10 мл). При исследовании воды открытых водоемов (речной, озерной и т. д.) необходимо посеять воду в общем объеме 111,1 мл (один объем — 100 мл; один объем — 10 мл и по одному объему в 1 мл и 0,1 мл).

Соотношение между средой и засеваемой водой должно быть 1:2. Поэтому посевы малых количеств воды (1 мл, 0,1 мл) выполняют в пробирки с разведенной средой (обычной концентрации), а большие объемы воды (100 мл и 10 мл) — в концентрированную среду.

Посевы выращивают в термостате при 43...44 °C в течение 24 ч. При указанной температуре подавляется развитие микробов, не имеющих санитарно-показательного значения для воды. Затем просматривают посевы для выявления признаков роста кишечной палочки (наличие пузырьков газа в поплавках, изменение цвета, помутнение).

На втором этапе из посева с признаками роста кишечной палочки при помощи бактериальной петли делают высев в чашки Петри со средой Эндо для подтверждения правильности обнаружения роста кишечной палочки в жидкой среде и выращивают при 37 °C 24 ч.

Среда Эндо состоит из МПА, лактозы и обесцвеченного индикатора (фуксин обесцвечен сульфитом натрия). На данной среде бактерии группы кишечной палочки теплокровных животных образуют типичные темно-красные, ярко-красные или розовые колонии с темным центром, с металлическим блеском или без него. Столь характерный рост на

среде Эндо эти бактерии дают в связи с тем, что они активно сбраживают лактозу, продукты расщепления которой вызывают восстановление индикатора фуксина, окрашивающего колонии. При отсутствии характерного роста на пробу дают отрицательный ответ.

При наличии типичных колоний из них делают мазки, окрашивают последние по Граму и микроскопируют. Если в мазках обнаруживают мелкие неспоровые грамотрицательные палочки, то переходят к третьему этапу для окончательного подтверждения результатов исследования. На третьем этапе из типичных колоний, в которых при микроскопировании обнаружены типичные микробные клетки, делают пересев в разведенную жидкую углеводную среду (Булира, Эйкмана и др.). Посевы выращивают при 43...44 °С в течение 24 ч, после чего учитывают окончательно. При наличии в посевах помутнения, газообразования и изменения цвета дают положительный ответ, результаты которого выражают в виде коли-титра. При отсутствии газообразования дается отрицательный ответ, т. е. данные первой бродильной пробы подтверждаются.

Коли-индекс определяют методом мембранных фильтров. Для этой цели используются мембранные фильтры № 3 (ультрафильтры) — пористые пленки, изготовленные из микроклетчатки (нитроцеллюлозы), с диаметром пор 0,7 мкм. Перед фильтрацией их подвергают стерилизации двойным кипячением в дистиллированной воде в течение 15...20 мин. Затем стерильным пинцетом фильтры накладывают на предварительно профламбированную поверхность фильтровального прибора Зейтца. Через фильтр Зейтца проводят фильтрацию под вакуумом определенного количества исследуемой воды (через один мембранный фильтр не более 100 мл воды).

По окончании фильтрации освобождают фильтровальную пластинку, частично разбирая прибор. При помощи стерильного пинцета фильтр накладывают осадком вверх на поверхность среды Эндо, залитой в чашку Петри, плотно прижимая к среде. В одну чашку можно поместить четыре-пять фильтров. После культивирования в термостате при 37 °С в течение 18...24 ч подсчитывают выросшие на фильтре колонии, характерные для группы кишечной палочки. Из двух-трех колоний, типично окрашенных и бесцветных, берут материал для мазков, окрашивают их по Граму и микроскопируют с иммерсионным объективом.

Если в мазках присутствуют мелкие грамотрицательные неспоровые палочки, из оставшейся части колонии делают пересев в пробирки с небольшим объемом жидкой углеводной среды (Булира или др.). Посевы выращивают при 43...44 °С в течение 24 ч. Наличие газообразования — последний показатель присутствия бактерий группы кишечной палочки.

Материалы и оборудование для 14.5.1...14.5.3. Среда Булира в пробирках с поплавками. Стерильные пипетки на 1 мл моровские. Стерильные чашки Петри. Среда Эндо агаризованная. Простерилизованная вода в пробирках по 9 мл. Образцы воды для исследования.

ЛИТЕРАТУРА

•

- Асонов Н. Р. Микробиология. М.: Агропромиздат, 1989.
- Виноградский С. Н. Микробиология почв. – М.: Изд-во АН СССР, 1952.
- Ежов Г. И. Руководство к практическим занятиям по сельскохозяйственной микробиологии. – М.: Высшая школа, 1981.
- Емцев В. Т., Переверзева Г. И., Храмцов В. В. Микробиология, гигиена, санитария в животноводстве. – М.: Агропромиздат, 1985.
- Костенко Т. С., Скаршевская Е. И., Гительсон С. С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. – М.: Агропромиздат, 1989.
- Методы общей бактериологии: В 3 т. / Под ред Ф. Герхардта. – М.: Мир, 1984.
- Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д. Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991.
- Мишустин Е. Н., Емцев В. Т. Микробиология. – М.: Агропромиздат, 1987.
- Мишустин Е. Н., Шильникова В. К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. – М.: Наука, 1973.
- Посыпанов Г. С. Методы изучения биологической фиксации азота воздуха: Справочное пособие. – М.: Агропромиздат, 1991.
- Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н. С. Егорова. – М.: Изд-во МГУ, 1983.
- Теппер Е. З. Микроорганизмы рода нокардия и разложение гумуса. – М.: Наука, 1976.
- Шильникова В. К., Серова Е. Я. Микроорганизмы-азотонакопители на службе растений. – М.: Наука, 1983.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Раздел первый. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ	3
Глава 1. Микроскоп и техника микроскопирования	3
1.1. Устройство микроскопа	3
1.1.1. Механическая часть микроскопа	3
1.1.2. Оптическая часть микроскопа	4
1.2. Основные технические характеристики микроскопа	9
1.2.1. Увеличительная способность микроскопа	9
1.2.2. Разрешающая способность микроскопа	9
1.3. Работа с микроскопом	10
1.3.1. Общие правила работы с микроскопом	10
1.3.2. Работа с иммерсионной системой микроскопа	10
1.3.3. Установка освещения	11
1.3.4. Измерение объектов	11
Глава 2. Культивирование, посев, хранение и приготовление препаратов микроорганизмов	12
2.1. Общие представления	12
2.1.1. Основные термины	12
2.1.2. Техника посева	14
2.1.3. Хранение микроорганизмов	15
2.2. Методы приготовления препаратов микроорганизмов	15
2.2.1. Техника взятия культуры для приготовления препарата	15
2.2.2. Исследование живых клеток микроорганизмов методами "раз- давленной" и "висячей" капли	15
2.2.3. Фиксированные препараты микроорганизмов	16
Глава 3. Исследование морфологии микроорганизмов	18
3.1. Форма клеток	18
3.1.1. Бактерии	18
3.1.2. Актиномицеты	21
3.1.3. Нокардия	23
3.1.4. Микобактерии	23
3.1.5. Грибы	23
3.2. Строение (цитохимические методы исследования)	28
3.2.1. Окраска клеток микроорганизмов по Граму	29
3.2.2. Выявление кислотоустойчивости у бактерий методом Циля- Нильсена	30
3.2.3. Окраска спор у бактерий	31
3.2.4. Окраска капсул	32
3.2.5. Окраска жгутиков	33
3.2.6. Окраска ядерного вещества бактерий	34
3.2.7. Окраска включений клеток микроорганизмов	35

Глава 4. Питание микроорганизмов.....	37
4.1. Значение отдельных питательных элементов.....	37
4.2. Приготовление питательных сред.....	40
4.2.1. Общие сведения.....	40
4.2.2. Мясо-пептонный бульон (МПБ).....	41
4.2.3. Мясо-пептонный агар (МПА).....	42
4.2.4. Мясо-пептонная желатина (МПЖ).....	42
4.2.5. Картофельный агар.....	43
4.2.6. Пивное сусло.....	43
4.2.7. Сусло-агар.....	43
4.2.8. Обезжиренное молоко.....	44
4.2.9. Дрожжевые среды.....	44
4.2.10. Бобовый отвар.....	44
4.3. Методы стерилизации.....	44
4.3.1. Прокаливание, или фламбирование.....	44
4.3.2. Стерилизация сухим жаром.....	46
4.3.3. Стерилизация текучим паром.....	46
4.3.4. Стерилизация насыщенным паром под давлением.....	47
4.3.5. Пастеризация.....	47
4.3.6. Стерилизация фильтрованием через мелкопористые фильтры.....	47
Глава 5. Учет численности и выделение чистой культуры микроорганизмов.....	48
5.1. Методы учета численности.....	48
5.1.1. Учет численности бактерий в почве методом питательных пластин (метод Коха).....	48
5.1.2. Учет численности микроорганизмов в воде и других жидкостях.....	50
5.1.3. Учет численности бактерий в воздухе.....	51
5.2. Выделение чистой культуры бактерий.....	52
Глава 6. Идентификация микроорганизмов.....	53
6.1. Морфологические и культуральные признаки микроорганизмов.....	53
6.1.1. Морфологические признаки.....	53
6.1.2. Культуральные признаки.....	54
6.1.3. Определение качественного состава микроорганизмов по культуральным и морфологическим признакам.....	56
6.2. Физиолого-биохимические признаки микроорганизмов.....	61
6.2.1. Общие сведения.....	61
6.2.2. Отношение к источникам углерода и азота.....	62
6.2.3. Изучение продуктов жизнедеятельности.....	62
6.2.4. Отношение к кислотам и щелочам.....	63
6.2.5. Отношение к кислороду.....	63
6.2.6. Устойчивость к факторам внешней среды.....	63
6.2.7. Отношение к антибиотикам и лизоциму.....	63
Глава 7. Превращение микроорганизмами безазотистых органических веществ.....	64
7.1. Брожение.....	64
7.1.1. Общие сведения.....	64
7.1.2. Спиртовое брожение.....	65
7.1.3. Молочнокислое брожение.....	68
7.1.4. Маслянокислое брожение.....	73
7.1.5. Брожение пектиновых веществ.....	75

7.1.6. Брожение целлюлозы.....	76
7.2. Окисление.....	78
7.2.1. Окисление целлюлозы.....	78
7.2.2. Окисление жира.....	81
Глава 8. Превращение микроорганизмами органических и минеральных соединений азота.....	83
8.1. Аммонификация.....	83
8.1.1. Аммонификация белковых веществ.....	83
8.1.2. Аммонификация мочевины.....	85
8.2. Нитрификация и денитрификация.....	86
8.2.1. Выявление бактерий различных фаз нитрификации.....	86
8.2.2. Жидкие культуры нитрифицирующих бактерий.....	89
8.2.3. Денитрификация (нитратное дыхание).....	90
8.3. Азотфиксация.....	91
8.3.1. Знакомство с клубеньковыми бактериями.....	91
8.3.2. Свободноживущие азотфиксирующие бактерии.....	93
8.3.3. Знакомство с новыми формами азотфиксирующих бактерий.....	96
Раздел второй. СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ.....	99
Глава 9. Общий микробиологический анализ почвы.....	99
9.1. Подготовка микробиологического материала для анализа.....	99
9.1.1. Взятие средней почвенной пробы и подготовка образца.....	99
9.1.2. Приготовление почвенной суспензии и посев.....	99
9.2. Состав и приготовление питательных сред для разных групп микроорганизмов.....	101
9.2.1. Группы микроорганизмов, выявляемые на плотных средах....	101
9.2.2. Группы микроорганизмов, выявляемых на жидких средах (метод предельных разведений).....	102
9.2.3. Группы микроорганизмов, выявляемых методом обрастания комочков почвы.....	103
9.3. Определение численности различных групп микроорганизмов....	104
9.3.1. Учет на плотных средах.....	104
9.3.2. Учет на жидких средах.....	107
9.3.3. Учет методом обрастания комочков почвы.....	111
9.3.4. Определение общей численности микроорганизмов в почве прямым подсчетом под микроскопом.....	112
Глава 10. Изучение микробных ценозов почвы и микроорганизмов ризосферы.....	115
10.1. Общий состав и соотношение почвенных микроорганизмов.....	115
10.1.1. Метод обрастания стекол по Холодному.....	115
10.2. Микроорганизмы, разлагающие гумусовые вещества.....	116
10.2.1. Метод Виноградского.....	116
10.2.2. Метод Виноградского в модификации Теппер.....	116
10.3. Микробные ценозы, участвующие в разложении различных органических и неорганических остатков в почве.....	117
10.3.1. Разложение микроорганизмами свежих органических остатков с образованием гумуса.....	117
10.3.2. Изучение микробных ценозов, участвующих в разложении гербицидов – производных сим-триазинов в почве.....	119
10.3.3. Микробные пейзажи при нитрификации, разложении гумусовых кислот и деструкции симазина и атразина (метод Теппер).....	119

10.4. Микроорганизмы, обитающие в прикорневой зоне и на корнях растений.....	121
10.4.1. Общие сведения.....	121
10.4.2. Учет бактерий в ризосфере методом Красильникова.....	121
10.4.3. Учет ризосферной и корневой микрофлоры методом последовательных отмываний корней (по Теппер).....	122
Глава 11. Биологическая активность почвы.....	123
11.1. Общая биологическая активность почвы.....	123
11.1.1. Определение общей биологической активности почвы по методу Мишустина, Вострова, Петровой (по интенсивности разложения полотна).....	123
11.1.2. Метод определения общей микробиологической активности почвы по выделению диоксида углерода.....	123
11.2. Аммонифицирующая активность почвы и микроорганизмов.....	124
11.2.1. Определение аммонифицирующей активности почвы.....	124
11.2.2. Определение аммонифицирующей активности микроорганизмов.....	125
11.3. Нитрифицирующая и денитрифицирующая активность почвы.....	126
11.3.1. Определение нитрифицирующей активности почвы.....	126
11.3.2. Определение денитрифицирующей активности почвы.....	126
11.4. Азотфиксирующая активность микроорганизмов.....	127
11.4.1. Определение азотфиксирующей активности ацетиленовым методом.....	127
11.4.2. Определение актуальной (полевой) и потенциальной активности азотфиксации в почве методом Умарова.....	128
11.4.3. Определение нитрогеназной активности симбиотических азотфиксирующих бактерий.....	130
11.4.4. Работа на газовом хроматографе.....	131
11.5. Выделение и изучение чистых культур клубеньковых бактерий... ..	133
11.5.1. Выделение чистой культуры клубеньковых бактерий.....	133
11.5.2. Определение специфичности клубеньковых бактерий. Отбор активных (или эффективных) культур клубеньковых бактерий.. ..	135
11.5.3. Определение общего и активного симбиотического потенциалов (ОСП, АСП) и удельной активности симбиоза (УАС) по методу Посыпанова.....	138
11.5.4. Определение вирулентности и конкурентоспособности клубеньковых бактерий.....	139
Глава 12. Анализ бактериальных препаратов.....	141
12.1. Жизнеспособность клеток клубеньковых бактерий.....	141
12.1.1. Экспресс-метод определения жизнеспособности клеток клубеньковых бактерий в сухом нитрагине по Шильниковой, Сигуте.....	141
12.1.2. Экспресс-метод определения числа жизнеспособных клеток клубеньковых бактерий в ризоторфине на мембранных фильтрах по Шильниковой, Сигуте.....	143
12.2. Определение числа клеток азотобактера в азотобактерине.....	145
Глава 13. Микробиология кормов.....	145
13.1. Эпифитные микроорганизмы зерна.....	145
13.1.1. Общие сведения.....	145
13.1.2. Количественный учет микроорганизмов на зерне.....	146

13.1.3. Определение качественного состава микрофлоры зерна	147
13.2. Микробиологический анализ силоса.....	147
13.2.1. Общие сведения.....	147
13.2.2. Качественный состав микрофлоры силоса.....	149
13.2.3. Количественный учет микроорганизмов в силосе.....	149
13.2.4. Определение кислотности силоса.....	151
Глава 14. Микробиология продуктов животноводства.....	153
14.1. Бактериологический анализ молока.....	153
14.1.1. Общие сведения.....	153
14.1.2. Проба на редуктазу.....	154
14.1.3. Определение общего количества бактерий в молоке.....	155
14.1.4. Определение титра кишечной палочки (коли-титр).....	156
14.1.5. Определение в молоке количества спор лактатсбраживающих анаэробных бактерий.....	156
14.2. Методы выделения чистых культур молочнокислых бактерий....	159
14.2.1. Выделение чистой культуры ацидофильной палочки.....	159
14.2.2. Выделение чистой культуры молочнокислого стрептококка....	160
14.3. Микробиологический анализ других продуктов.....	161
14.3.1. Микробиологический анализ сыра.....	161
14.3.2. Микробиологический анализ сливочного масла.....	162
14.3.3. Микробиологический анализ мяса.....	163
14.4. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.....	165
14.5. Микробиологический контроль воды.....	166
14.5.1. Общие сведения.....	166
14.5.2. Определение микробного числа.....	167
14.5.3. Определение коли-титра и коли-индекса.....	167
Литература.....	170

УЧЕБНОЕ ИЗДАНИЕ

**Теппер Екатерина Зельмановна
Шильникова Викторина Кузьминична
Переверзева Генриетта Ивановна
ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ**

Учебное пособие для вузов

Художественный редактор **А. В. Петров**
Технический редактор **Л. А. Бычкова**
Корректор **Г. В. Абатурова**

ИБ № 7864

Сдано в набор 17.12.92. Подписано к печати 12.03.93. Формат 60 × 88^{1/16}.
Бумага кн-журн. Гарнитура Цюрих. Печать офсетная. Усл. печ. л. 10,78.
Усл. кр.-отт. 11,03. Уч.-изд. л. 12,33. Изд. № 260. Тираж 6700 экз. Заказ № 790 "С" № 096.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство "Колос", 107807, ГСП-6, Москва,
Б-78, ул. Садовая-Спасская, 18.

Московская типография № 8 Министерства печати и массовой информации Российс-
кой Федерации, 101898, Москва, Хохловский пер., 7.