

Федеральное агентство по образованию
Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра экологии, ботаники и охраны природы

Т.А. Овчинникова, Т.А. Панкратов

МЕТОДЫ ЭКОЛОГИИ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

*Рекомендовано Учебно-методическим Советом по почвоведению при УМО
по классическому университетскому образованию
в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений,
обучающихся по направлению высшего профессионального образования
020700 «Почвоведение»*

Самара
Издательство «Самарский университет»
2009

УДК 631.46
ББК 28.081
О 35

Рецензент профессор кафедры биохимии ГОУ ВПО
«Самарский государственный университет», доктор биологических наук
Н.А. Клёнова

Овчинникова Т. А.

О 35 **Методы экологии почвенных микроорганизмов : учебное пособие / Т.А. Овчинникова, Т.А. Панкратов. – Самара : Изд-во «Самарский университет», 2009. – 62 с.**

В учебном пособии представлены анализ современных методов, используемых в экологических исследованиях почвенной микрофлоры, а также даны описания основных методов, широко применяемых с целью экологического мониторинга почв и исследования почвенной микрофлоры. Содержание данного пособия соответствует программе практической части спецкурса «Экология почв и почвенных микроорганизмов».

Предназначено для студентов очного отделения биологического факультета и аспирантов, ведущих исследования в области почвенной микробиологии.

УДК 631.46
ББК 28.081

© Овчинникова Т. А., Панкратов Т.А., 2009
© Самарский государственный университет, 2009
© Оформление. Издательство «Самарский университет», 2009

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Часть 1. Методика отбора почвенных проб и их подготовка к микробиологическому анализу	5
Часть 2. Методы количественного учета микроорганизмов в почве и определение их биомассы	7
Часть 3. Методы определения биологической активности почв	21
Часть 4. Методы исследования экологических функций почвенных микроорганизмов	30
Часть 5. Методы определения токсичности почв и наличия антибиотиков в почве	39
Часть 6. Определение ферментативной активности почв	43
Часть 7. Молекулярные методы детекции микроорганизмов в почвах	50
Рекомендуемый библиографический список	61

Введение

Экология почвенных микроорганизмов – молодая бурно развивающаяся наука, зародившаяся на стыке разных областей знаний: собственно почво-ведения, экологии, разных разделов биологии почв – почвенной альгологии, микологии, микробиологии и биохимии. В своем активе она содержит большое разнообразие методов, возникших в лоне каждой из этих наук и модифицированных для исследования почвенной микрофлоры, и современных методов, принадлежащих собственно экологии почвенных микроорганизмов, а также более поздних, связанных с использованием совершенных микроскопов, люминесцентных красителей, с применением методов генетического анализа, молекулярно-экологических исследований почвенной микробиоты.

Данное учебное пособие служит для краткого ознакомления студентов с разнообразием методов, существующих в экологии почвенных микроорганизмов в настоящее время. Более подробно в пособии изложены методы, часто используемые при исследовании почвенной микрофлоры в практических целях. Дается оценка достоинств и недостатков описываемых методов.

Учебное пособие состоит из 7 частей. В них описаны правила отбора и хранения почвенных образцов в зависимости от цели исследования, представлены разные методы количественного учета бактериальной, грибной и водорослевой микрофлоры почв, приведены расчетные и биохимические методы определения их биомассы, методы оценки экологической роли почвенных микроорганизмов, их участия в углеродном и азотном циклах, методы определения ферментативной активности почв.

Особо выделена группа методов исследования биологической активности почв, которые могут быть использованы для определения плодородия почв, для экологической экспертизы их состояния, а также методов, используемых в системе мониторинга загрязнения почв. Эти методы отличается относительная простота и скорость получения показателей состояния почв. Наряду с широко применяемыми приводятся более новые экспресс-методы определения биологической активности почв. В описании ряда методов содержатся сведения о конкретных значениях изучаемых показателей для почв г. Самары и Самарской области.

Представленные в пособии практические задачи апробированы и обеспечены приборной и материальной базой лаборатории экологии почвенных микроорганизмов кафедры экологии, ботаники и охраны природы СамГУ.

ЧАСТЬ 1.

МЕТОДИКА ОТБОРА ПОЧВЕННЫХ ПРОБ И ИХ ПОДГОТОВКА К МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ

Результаты микробиологического анализа зависят от правильности взятия образцов почвы. Необходимо учитывать, что микроорганизмы в почве распространены очагами, а поверхностный слой ее (окультуренной почвы) обеднен микроорганизмами, и перед взятием проб его следует снимать. В целом методика отбора зависит от целей исследования.

Отбор проб производится лопатой, ножом или почвенным буром. Перед отбором все оборудование дезинфицируют спиртом, поджигая его пары. В полевых условиях стерилизацию заменяет неоднократное втыкание предварительно промытого ножа в исследуемую почву. Способ отбора образцов зависит от задачи. Общее правило – рандомизированный, т.е. случайный, отбор проб в пределах однородной территории (синузии, поля, участка луга и т.д.), как правило, в шахматном порядке. Отобранные образцы смешивают на стерильной бумаге стерильными инструментами. Полученный смешанный образец сыпают в стерильный бумажный пакет. Его подписывают мягким простым карандашом и доставляют в лабораторию.

Обычно отдельно анализируют ризосферную почву, в которой микробов содержится больше и они отличаются по качественному составу. Растения (10 экз. и более) подкапывают лопатой и после извлечения их из почвы стряхивают с корней непрочную удерживающуюся на них почву и оставляют почву, прочно связанную с корнями. Затем корни срезают в стерильный пергаментный пакет, который немедленно доставляют в лабораторию, где проводится микробиологический анализ. Часто отдельно анализируют микроорганизмы, располагающиеся на поверхности корней растений в ризоплане.

Микробиологические исследования должны быть сделаны в день взятия образцов, так как при хранении влажных образцов состав микроорганизмов в них сильно изменяется. При невозможности проведения анализа за 24 часа прибегают к высушиванию образцов. Следует иметь в виду, что в сухих образцах обнаруживается гораздо меньше микроорганизмов и, что особенно важно отметить, сильно искажаются соотношения между отдельными группами микроорганизмов. Если все-таки анализ сразу провести нельзя и высушивание необходимо, то проводить его следует непосредственно после взятия образцов за 2-4 ч при температуре не выше 30°C. Хранить сухие образцы нужно в стерильных пергаментных пакетах, заложенных в полотняные мешочки. Иногда прибегают к замораживанию образцов. Почвенные образцы непосредственно после взятия помещают в широкогорлые сосуды Дьюара с сухим льдом (твердый CO₂). Хранят их в замороженном состоянии, посев же проводят непосред-

ственно после оттаивания. Целью подготовки почвы является диспергирование образцов и получение однородной суспензии почвы, в которой клетки бактерий одиночно располагаются среди ее частичек. Это позволяет повысить выход клеток при высеве на твердые питательные среды. Наиболее простой способ – растирание почвы со стерильной водой или физиологическим раствором до пастообразного состояния. Обработка 0,1%-ным раствором пиррофосфата натрия повышает выход клеток.

Приготовление разведений

Навеску почвы (просеянной через сито с диаметром ячеек 1 мм) массой 10 г помещают в стерильную фарфоровую чашку и увлажняют 10 мл стерильной воды, взятой из колбы с 90 мл воды. Затем приготовленную суспензию вливают в эту колбу. Получают разведение 1:10. Все операции (в том числе и приготовление дальнейших разведений) производят в соответствии с общепринятыми методами микробиологии.

ЧАСТЬ 2.

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА МИКРООРГАНИЗМОВ В ПОЧВЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ БИОМАССЫ

Многокомпонентность и гетерогенность почвы обуславливает многообразие методов изучения почвенных микроорганизмов

Классический и до сих пор наиболее часто используемый метод оценки численности микроорганизмов – посев на твердые агаризированные среды. Среда различного состава используются для определения числа зародышевых клеток бактерий, грибов, актиномицетов в различных почвах. Микробиологи, работающие с образцами почвы, стараются использовать среды, близкие по составу к естественной среде обитания микроорганизмов, что и позволяет им учитывать значительно большую часть микроорганизмов по сравнению с богатыми средами, содержащими продукты животного происхождения. Однако следует заметить, что количество микроорганизмов, вырастающих на средах, составляет не более 1% от общего числа микроорганизмов, обитающих в почве (Звягинцев Д.Г., 1980 г.). Это обстоятельство способствовало совершенствованию методической базы экологических исследований, что привело к созданию десятков новых методов определения биомассы и численности почвенных микроорганизмов. Их можно разделить на две большие группы:

1) прямые микроскопические методы, введенные в практику С.Н. Виноградским (1952 г.) в начале века и усовершенствованные в последнее время;

2) разработанные в последней четверти XX века биохимические методы, большая часть которых основана на определении содержания в почве химических соединений, входящих в состав биомассы микроорганизмов или являющихся продуктом их метаболизма.

Усовершенствование прямого подсчета клеток микроорганизмов велось на основе использования люминесцентных микроскопов и различных красителей, в том числе и флюоресцентных. Благодаря чему ученые смогли не только увидеть мельчайшие микроорганизмы почвы, но и разделить их на активные (живые) и мертвые (покоящиеся) формы. Вновь предложенные методы оказались важны для исследовательской работы, они дают представление о реальной численности микроорганизмов в почве и, соответственно, их биомассе. Серьезным минусом прямых методов исследования является трудоемкость определений, большое зрительное напряжение при работе с микроскопом. Кроме того, для получения надежных показателей численности у исследователя должен быть достаточно большой опыт работы с люминесцентным микроскопом.

Именно поэтому взоры исследователей устремились на «косвенные» (биохимические) методы оценки биомассы микроорганизмов, позволяющие по какому-либо показателю судить о биомассе микробов, осуществляющих данный процесс.

Очень часто для того, чтобы характеризовать влияние различных природных и антропогенных факторов на микроорганизмы почвы, целесообразно оценить интегральную активность почвенной микрофлоры на основе второй группы методов. Такие методы, в отличие от «прямых» микроскопических методов, дают более адекватную величину активности, поскольку исключается влияние таких интерферирующих факторов, как адсорбция клеток, их экранирование почвенными частицами, гибель микроорганизмов при диспергировании почвы и т.п. Важным преимуществом биохимических методов является лучшая воспроизводимость результатов и меньшая трудоемкость.

Определение микробной биомассы ведется на основе определения тех или иных «маркерных» соединений, количество которых пропорционально либо общей микробной биомассе, либо специфично для более узкой группы почвенной микробиоты: АТФ, ДНК, ДАПК, мурамовой кислоты, эргостерона. Наиболее популярно измерение количества АТФ (люциферин-люциферазным методом) и общего содержания адениновых нуклеотидов с последующим пересчетом на содержание углерода клетки или веса сухой биомассы. Люциферин-люциферазный метод позволяет быстро и точно измерить содержание АТФ только в свежесобранных образцах, так как при подсыхании почвы (отмирании части микрофлоры) пул АТФ в ней резко снижается или исчезает вовсе. Общий пул аденилатов ($A = \text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ}$) не зависит от метаболического состояния клетки и более полно соответствует содержанию анализируемой пробы. Недостатком биохимических методов является главным образом то, что связь перечисленных показателей с биомассой не всегда однозначна и меняется не только у разных микроорганизмов, но и в зависимости от условий роста. Тем не менее эти методы наиболее прогрессивны, в настоящее время активно применяются, постоянно модифицируются, а также активно дискутируются в научной литературе. К ним относятся, в частности, кинетический (респирометрический) и регидратационный методы.

Прямой подсчет общей численности микроорганизмов (по Виноградскому в модификации Шульгиной)

Этот метод основан на том, что используемые растворы кислых красителей (3%-ный раствор эритрозина на 5%-ной карболовой кислоте) окрашивают клетки микробов в розовый цвет, но не окрашивают органические и минеральные частицы почвы.

Ход работы

На чистом, хорошо обезжиренном предметном стекле вычерчивают квадрат площадью 4 см. Из отстоявшейся почвенной взвеси (разведение 1:10) берут 0,05 мл и равномерно распределяют их на поверхности квадрата. Полученный мазок высушивают на воздухе, фиксируют метанолом или 96%-ным этанолом (20-30 мин) и окрашивают карболовым эритразином (от 2 до 24 ч). Затем краску сливают, мазок высушивают на воздухе и с помощью иммерсионного объектива подсчитывают число клеток в поле зрения микроскопа. Всего просчитывают не менее 50 полей зрения. Определив среднее число клеток, приходящееся на 1 поле зрения, делают пересчет на площадь квадрата, а потом на 1 г почвы. Для этого с помощью объект-микрометра определяют площадь поля зрения по формуле $S = \pi R^2$. Объект-микрометр помещают на предметный столик микроскопа, наносят на него каплю иммерсионного масла и определяют вначале диаметр, а затем радиус поля зрения.

Пример расчета: одно деление объект-микрометра равно 0,01 мм. Пусть в поле зрения микроскопа вместились 10 делений, т.е. диаметр равен 0,1 мм ($0,01 \cdot 10$), значит, K будет равно 0,05 мм ($0,1/2$), а $S=0,0078 \text{ мм}^2$ ($3,14 \cdot 0,05^2$). Допустим, в среднем на одно поле зрения приходится 30 клеток, тогда на площади квадрата в 4 см (или 400 мм) их будет:

$$30 - 0,0078$$

$$X - 400$$

$$X = 30 \cdot 400 / 0,0078 = 1\,538\,000.$$

Если на площадь квадрата нанесено 0,05 мл взвеси, то на 1 мл придется следующее количество клеток:

$$1538 \cdot 10^3 - 0,05$$

$$X - 1$$

$$X = 1538 \cdot 10^3 / 0,05 = 30\,760 \cdot 10^3.$$

Если в 1 мл содержалось 0,1 г почвы (разведение 1:10), то в 1 г ее микроорганизмов будет $30\,760 \cdot 10^4$ клеток ($30\,760 \cdot 10^3 \cdot 10$). Зная влажность почвы, можно сделать пересчет на 1 г абсолютно сухой почвы: $x - 100$

$$C = X \cdot 100 / (100 - D),$$

где C – количество клеток в 1 г абсолютно сухой почвы; X – количество клеток в 1 г исходной почвы; D – влажность почвы, %.

Люминесцентно-микроскопическое изучение почвенных микроорганизмов

Теоретическая основа данного метода заключается в способности атомов некоторых химических соединений менять свое положение в молекуле – возбуждаться. При возвращении в исходное энергетическое состояние атомы отдают полученную энергию в виде светового излучения – *люминесценции*. Люминесценция, длительность которой после прекращения действия возбуждающего фактора не превышает 0,001 сек, называется *флуоресценцией*.

Собственная люминесценция характерна, например, для молекулы хлорофилла. Большинству бактериальных клеток не свойственна собственная люминесценция в отраженном свете. Поэтому их окрашивают специальными красителями – *флуорохромами*. К флуорохромам относят органические соединения, как правило, циклической природы (молекула содержит бензольные кольца). Это акридиновый оранжевый, аурамин, ауорофосфин, этидиум бромид и др. Связываясь с белками, нуклеиновыми кислотами, красители локализуются в соответствующих частях клеток – основные красители главным образом в ядре и клеточной оболочке, а кислотные – в клеточных структурах, содержащих ацидофильные компоненты.

В зависимости от исходного состояния окрашиваемого объекта (мертвый, живой), его физиологического статуса, длительности окрашивания, концентрации красителя и т. д. может меняться спектр флуоресценции (от синего до темно-красного).

Наиболее часто используемый краситель – акридиновый оранжевый. В проходящем свете с длиной волны до 380 нм он люминесцирует чаще ярко-зеленым и желтым цветом. Значительно реже – красным.

Основная масса бактерий в *почвах* при окрашивании акридиновым оранжевым имеет ярко-зеленое или желтое свечение (более 95% клеток). Значительно реже встречаются красные клетки. В опытах с лабораторными культурами различных микроорганизмов выяснилось, что при данных режимах окрашивания (см. ниже) красное свечение обнаруживается у клеток молодых культур. Красное свечение переходит в зеленое при выдерживании культур в воде (т. е. при голодании) в течение 12-24 ч. Зеленым светятся клетки из культур в стационарной фазе роста и клетки из старых культур. Многие клетки из старых культур совсем не обнаруживают свечения, но бывают видны в фазовом контрасте. Красное свечение клеток переходило в зеленое после обработки РНКазой. Клетки с красным свечением, таким образом, могут оказаться (как показано у ряда авторов) либо мертвыми, либо активными, либо суммой и тех, и других. Красным светом светятся относительно крупные клетки почвенных микроорганизмов, напоминающие по форме и размерам клетки бактерий из лабораторных культур. Содержание красных клеток может быть увеличено в 2-3 раза без

заметного изменения общего числа клеток после инкубирования почвенной суспензии в течение 5-6 часов или после обработки ультразвуком. В последнем случае красное свечение, вероятно, будет связано как с увеличением проницаемости клеток, так и с их гибелью в процессе озвучивания (при обработке исходной суспензии ультразвуком). При окрашивании препаратов из почвенной суспензии по прописи на обнаружение нуклеиновых кислот выяснилось, что приготовление раствора акридинового оранжевого на фосфатно-цитратном буфере (рН 4,2-4,5) и промывка препаратов в этом буфере позволяют получить более четкую и контрастную картину.

При использовании люминесцентной микроскопии достигается более уверенный подсчет микроорганизмов в почве по сравнению с методом Виноградского с использованием световой микроскопии. Яркие зеленые и желтые клетки хорошо заметны на темном или красном фоне почвенных частиц и препарата, причем микроскопия в отраженном свете позволяет учитывать адсорбированные клетки.

Ход работы

Почвенную суспензию (1:10; навеска почвы – 1 г) обрабатывают на магнитной мешалке при 1000 об/мин в течение 3 мин, затем переносят в высокий цилиндр на 100 мл и доводят объем суспензии до 100 мл. После двухминутного отстаивания микрошпипеткой на 0,1 или 0,2 мл отбирают суспензию из средней фракции (на уровне отметки на цилиндре 50 мл) и наносят на обезжиренные предметные стекла (0,01 или 0,02 мл на препарат) и равномерно распределяют по площади 4 см² (рис. 1). После полного высыхания на воздухе при комнатной температуре проводят фиксацию легким нагреванием над пламенем спиртовки. Препараты окрашивают водным раствором (рабочим, не хранящимся больше суток) акридинового оранжевого (1:10000, 1-2 мин) Исходный раствор готовится из расчета 1 мг на 1 мл воды (1:1000) и может храниться в холодильнике около месяца. Для экономии красителя его раствор можно наносить на кусочки, соответствующие размеру квадратиков, фильтровальной бумаги. Избыток флуорохрома удаляют, погружая стекла на 10 мин в стакан с дистиллированной водой. Для более четкой и контрастной картины рекомендуется промывать препараты фосфатно-цитратным буфером (рН 4,2-4,5). Степень разведения исходной почвенной суспензии и количество наносимой на предметное стекло суспензии зависит от исходной численности бактерий в почве.



Рис. 1. Графарет для приготовления препаратов (сторона квадрата – 2 см)

После высушивания препараты просматривают на люминесцентном микроскопе «Люам Р-1» или «Люам И-3». Из каждого образца почвы

готовят 6 препаратов (2 стекла) и на каждом препарате подсчитывают клетки в 20 полях зрения.

Количество микробных клеток, содержащихся в 1 г почвы, вычисляют по формуле

$$N = 4na \cdot 10^{10} / S,$$

где N – количество клеток в 1 г почвы; a – среднее число клеток в поле зрения; S – площадь поля зрения (в мкм²); N – разведение.

При приготовлении суспензий из почв с большим содержанием неразложившейся органики (кусочки листьев, «лигноцеллюлозная» пыль, торфяная пыль и т. д.) следует экспериментально подбирать время обработки суспензии на мешалке и при необходимости использовать замачивание сухих навесок (не более 1 ч). В отсутствие ультразвукового диспергатора это позволяет повысить выход клеток с поверхности субстрата в суспензию. Для этих целей используют также пирофосфат калия, другие химические десорбенты.

Учет биомассы грибов с помощью люминесцентной микроскопии

Ход работы

Три навески почвы по 1 г растирают в ступке резиновым пестиком до однородного состояния с небольшим количеством воды (консистенция жидкой сметаны). Мягкое растирание почвы в ступке не должно приводить сильному разрушению целостности нитей мицелия. Самые мелкие кусочки мицелия, которые берутся в расчет определения его общей длины при микроскопировании препарата, не должны иметь длину менее 30 мкм.

Разведения приготавливают с учетом приблизительной оценки биомассы в субстрате. Препараты готовят так же, как и при подсчете бактерий. На предметное стекло наносят микропипеткой 0,04 мл из исходной почвенной суспензии 1:100, при низкой биомассе грибов в почве может быть использована суспензия либо 1:25, либо 1:50. Для окрашивания грибных спор и мицелия используют люминесцентный краситель калькофлуор белый, рабочий раствор (1:10000). Техника приготовления раствора и окрашивания сходна с приведенной выше для акридинового оранжевого. Иногда используют калькофлуор (0,01%-ный раствор) в сочетании с метиленовой синью (0,1%-ный раствор).

Расчет биомассы грибов ведут, подсчитывая длину мицелия с помощью окулярной сетки. Затем общую длину мицелия (в расчете на 1 г почвы) умножают на диаметр гиф (равный в среднем 5 мкм). Диаметр гиф определяют с помощью микрометра при увеличении микроскопа 90x15 (масляная иммерсия). Объем гиф рассчитывается по формуле

$$V = a\lambda r^2.$$

Масса мицелия в 1 г почвы будет равна (г):

$$C = 19,6a \cdot 10^{-8} \cdot 1,05,$$

где 1,05 – удельная масса мицелия.

Длину мицелия рассчитывают по формуле

$$a = (bx \cdot 10^4 \cdot 400n \cdot 10^{-2}) / (50Pvc \cdot 10),$$

где a – общая длина мицелия в 1 г почвы (см); b – суммарная длина гиф в 50 полях зрения в единицах окуляр-микрометра; x – цена деления окуляр-микрометра.

Удельная масса биомассы спор равна 1,2. Объем клетки рассчитывается $V = (\pi / 6) \cdot (ab \cdot 10^9)$, где a – больший диаметр клетки, b – меньший диаметр (мкм).

Количественный учет водорослей

(метод С. Н. Виноградского в модификации Э.А. Штиной)

Метод позволяет достаточно точно определять содержание клеток водорослей в почвенных образцах. Учитывать можно либо только одноклеточные водоросли (зеленые, желто-зеленые, диатомовые, эвгленовые), либо и количество клеток (отдельно), содержащихся в трихомах.

Отбор почвенных проб для оценки численности почвенных водорослей берется в виде среднего образца из 5-10 индивидуальных проб с площади > 10 м с глубины 0-5 см. Подсчет водорослей ведется в свежих образцах с использованием микроскопа. Если немедленная обработка образцов невозможна, они фиксируются 4%-ным формалином. К 1 см³ добавляют 4-5 мл формалина. Пробы хранят в пенициллиновых пузырьках.

Необходимо максимально гомогенизировать образец, то есть добиться отрыва водорослевой пленки от почвенных частичек.

Ход работы

Почвенную суспензию (1:20) в течение 5 мин обрабатывают на магнитной мешалке при 5000 об/мин. После полуминутного отстаивания в пробирке берется 1 капля (0,025 мл) суспензии на глубине 1 см, помещается на предметное стекло и закрывается покровным стеклом. После этого в поле зрения микроскопа устанавливают край покровного стекла и просматривают

10 продольных полос, равных по ширине диаметру поля зрения, от края до края почвенного стекла.

Данные пересчета 3 повторностей (каждого покровного стекла) суммируют, делят на 3 и получают среднее число клеток в 10 продольных полосках (это восьмая часть покровного стекла, т. к. покровное стекло состоит из 40 полос, равных по ширине диаметру поля зрения). Подсчет клеток производится под увеличением 40x15.

Пересчет клеток на 1 г почвы

Найденное среднее число клеток (a) в 10 продольных полосках умножают на коэффициент, полученный от перемножения знаменателя дробной части капли, установленного числа капель в 1 мл взвеси и числа миллилитров взвеси:

$$N = aK,$$

где N – число клеток в 1 г почвы; a – среднее число клеток в продольных полосках; K – коэффициент.

Например, в наших опытах была просчитана 1/4 часть капли, и в 1 мл 25 капель, а всей взвеси было 20 мл.

Вычисляем коэффициент:

$$K = 4 \cdot 25 \cdot 20.$$
$$K = 2000, \text{ тогда } N = 2000a.$$

Количественный учет водорослей с помощью люминесцентной микроскопии (по Домрачевой, Кожевину)

С помощью люминесцентной микроскопии удастся обнаружить на 1-2 порядка большее количество водорослей, нежели при использовании светового микроскопа, а потому подсчет становится менее утомительным.

Ход работы

Почвенную суспензию 1:50 гомогенизируют на магнитной мешалке при 5000 об/мин. После отстаивания в течение 30 сек каплю жидкости объемом 0,01 мл равномерно распределяют на площади 4 см² предварительно прокаленной микробиологической петлей. Препарат просматривается под люминесцентным микроскопом в 10 больших квадратах при увеличении 40x7. Клетки водорослей слабо флюоресцируют. Если естественная флюоресценция хлорофилла слаба, то препараты окрашивают акридиновым оранжевым по методике определения численности бактерий. Затем ведут подсчет количества клеток по размеру, характерному для

водорослей от 15 до 25 мкм. Пересчет количества клеток на массу почвы производят по формулам, представленным в работе по определению бактерий люминесцентным методом с учетом площади большого квадрата.

Чашечный метод определения численности микроорганизмов. Коэффициент К

Этот метод основан на учете колоний микроорганизмов, выросших на твердых питательных средах. Каждая колония развивается из одной клетки, и по числу колоний можно судить о *примерном* числе клеток, содержащихся в той или иной почве. На твердых питательных средах развиваются микроорганизмы, находящиеся в почве в активном состоянии, поэтому данный метод выявляет $\approx 1\%$ от всего почвенного микробного населения. Разведение для каждого конкретного образца почвы подбирают в зависимости от численности микроорганизмов. Для достоверного количественного подсчета в одной чашке Петри должно содержаться не менее 50 и не более 200 колоний бактерий и актиномицетов и от 30 до 50 колоний грибов. Посев на агаризованные среды производят двумя способами — поверхностным и глубинным (метод заливки). Второй способ используется в основном для учета грибов и актиномицетов.

Для посева необходимо подготовить на каждый почвенный образец следующее:

- 1) колбу на 250 мл со 100 мл стерильной воды;
- 2) пробирки, содержащие по 10 мл стерильной воды, для приготовления разведений (количество необходимых пробирок определяется тем, какое последнее разведение необходимо приготовить для посева, обычно берут 2-3 пробирки);
- 3) стерильные пипетки на 1 мл. Для каждого нового разведения нужна новая пипетка, кроме того, нужна пипетка для нанесения суспензии на чашки Петри;
- 4) стерильные шпатели. По одному на каждое разведение, из которого будут делать посев;
- 5) стерильные чашки Петри из расчета, что для каждого разведения, из которого делается посев, и для каждого почвенного образца требуется не менее 3-5 повторных чашек.

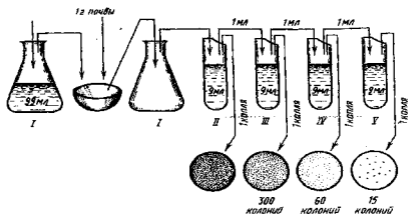


Рис.2 Схема приготовления разведения почвы:

1 – колбы для приготовления исходной суспензии;
 II – V – пробирки для последовательных 10-кратных разведений

Ход работы

При поверхностном посеве агаризованные среды разливают по 20-30 мл в чашки Петри. Застывший агар подсушивают до удаления с его поверхности водной пленки (во избежание расплывания бактерий по поверхности), оставляя его на сутки при комнатной температуре или в термостате при температуре 40-50°C на 20 мин. Стерильной пипеткой берут 0,1 мл суспензии нужного разведения и наносят в центр агаровой пластинки. После этого микробиологическим шпателем распределяют по поверхности агара. Засеянные чашки подписывают, переворачивают крышками вниз в термостат при необходимой температуре (чаще 28-30°C). Посев делают на 3-5 параллельных чашках. Учет выросших колоний производят через 2-3 суток, иногда до 5 суток. При этом подсчитывают число колоний в каждой чашке. Подсчет производят по формуле

$$X = (10an) / K,$$

где X – количество клеток в 1 г почвы; a – число колоний в чашке; n – показатель разведения (100, 10³, 10⁴ и т. д.); K – коэффициент пересчета на абсолютно сухую почву.

Пример расчета коэффициента K: пусть влажность почвы исследуемого образца 30%, это значит, что в навеске почвы в 100 г содержалось 30 г воды и 70 г сухого вещества, а в 1 г – в 100 раз меньше, т.е. 0,7 г. Число бактерий (например 8-10), рассчитанное на 1 г почвы

исходной влажности, соответствует такому в 0,7 г абсолютно сухой почвы, т.е.

$$\frac{0,7 - 8 \cdot 10^7}{1 - X}$$

$$X = 8 \cdot 10^7 / 0,7 = 11,43 \cdot 10^7.$$

При глубинном посеве на дно стерильных пустых чашек Петри вносят по 1 мл почвенной суспензии соответствующих разведений, заливают расплавленной и охлажденной агаризованной средой и быстро перемешивают быстрым вращением чашки. После застывания среды чашки ставят в термостат при 28-30°C. Учет количества выросших на среде колоний производят через различные сроки в зависимости от вида микроорганизмов. Плесневые грибы и дрожжи учитывают через 5 суток; актиномицеты – на 7-9-е сутки. Подсчитывают число колоний, делают пересчеты на абсолютно сухую почву. При этом учитывается исходная навеска почвы, разведение, из которого производился высев, и объем высеванной на одну чашку суспензии.

Метод посева на твердые питательные среды широко используется в почвенной микробиологии. Он дает возможность довольно просто выделять чистые культуры микроорганизмов, которые впоследствии могут подвергаться идентификации и дальнейшему всестороннему изучению их физиологических и биохимических свойств. Использование селективных сред позволяет оценить количественное присутствие в суспензии бактерий, актиномицетов, грибов. *Для качественной и количественной характеристики микрофлоры почв чаще всего применяются следующие среды.*

Мясо-пептонный агар (МПА) для бактерий; питательная среда выпускается в виде порошка или стерильного раствора.

Универсальная бактериальная среда (для выявления численности почвенных бактерий (в г/л водопроводной воды); пептон – 2, глюкоза – 1, дрожжевой экстракт – 1, гидролизат казеина – 1, агар – 20.

Среда Чапека – универсальная среда, чаще используется для выявления численности грибов (в г/л дистиллированной воды); KCl – 0,5; MgSO₄ – 0,5; K₂HPO₄ – 1; FeSO₄ – 0,01; NaNO₃ – 2; CaCO₃ – 3; глюкоза или сахароза – 20; агар – 20.

Крахмало-аммиачная среда – для актиномицетов и бактерий (в г/л дистиллированной воды): (NH₄)₂SO₄ – 2; K₂HPO₄ – 1; MgSO₄ – 1; NaCl – 1; CaCO₃ – 3; крахмал растворимый – 10; агар – 20. Крахмал предварительно размешивают в небольшом количестве воды и затем приливают к основной среде.

Голодный агар – к 1 л водопроводной воды прибавляют 20 г агара. Иногда агар предварительно очищают промыванием или другими способами.

Почвенный агар Локхиды: K_2HPO_4 – 0,2 г; агар – 15 г; почвенный экстракт – 1 л. Почвенный экстракт готовят из сильноокультуренной удобренной почвы. Просеянную через 3-миллиметровое сито почву смешивают с равным по массе количеством дистиллированной воды. Смесь автоклавируют 1 ч при 120° . Горячую суспензию фильтруют через бумажный фильтр при отсасывании.

Отношение множества микроорганизмов, учитываемых при микроскопии, к множеству микроорганизмов по данным посева не является постоянным для разных почв и для образцов из различных горизонтов одной и той же почвы. Для выявления этого соотношения используют коэффициент К:

$$K = N / n,$$

где N – численность микроорганизмов по данным посева на питательные среды, а n – численность, выявленная с помощью люминесцентной микроскопии.

Коэффициент К хорошо характеризует стадии сукцессии микроорганизмов, вызываемой внесением субстрата. Высокое значение К характеризует поздние стадии микробной сукцессии, где преобладают популяции К-отбора. Низкое значение этого коэффициента указывает на увеличение доли быстрорастущих популяций г-отбора, что характерно для начальных этапов сукцессии.

Определение биомассы микроорганизмов регидратационным методом

Принцип этого метода определения микробной биомассы в почве состоит в следующем. Мягкое высушивание почвы ($65-70^{\circ}C$, 24 ч) избирательно действует на живые микробные клетки, происходит нарушение целостности цитоплазматических мембран, которое может быть в зависимости от природы микроорганизмов полным (необратимым) или обратимым. На мертвое органическое вещество почвы высушивание при относительно низкой температуре практически не действует. В ходе регидратации высушенной почвы (встряхивания почвенного образца с водой или слабым раствором нейтральной соли) внутриклеточные компоненты высвобождаются в раствор и могут быть определены любым аналитическим методом.

В практике микробиологических исследований содержание клеточных компонентов определяют по сумме органических соединений, N-содержащим соединениям, калию и фосфору. Кроме того, можно оценивать соединения индивидуальной природы, находящиеся до момента высуши-

вания внутри клеток микроорганизмов: нуклеиновые кислоты, полисахариды, белки.

Ход работы

Вариант регидратационного метода с регистрацией количества микробной массы по сумме органических веществ состоит в следующем: 5 г почвы помещают в коническую колбочку на 50 мл и оставляют в термостатируемом сушильном шкафу при температуре 65-70 на сутки. Затем готовят вытяжку из почвы 0,5 М K_2SO_4 (соотношение почва/ раствор равняется 1:5 для почв с высоким содержанием органических веществ и 1:2 для бедных почв), встряхивая суспензию на качалке или вручную в течение 30 мин. Суспензию центрифугируют и в надосадочной жидкости определяют органические вещества методом бихроматного окисления. Для этого 1,6 мл прозрачной вытяжки смешивают с 2,4 мл серно-хромовой смеси (готовят, растворяя 23,3 г $K_2Cr_2O_7$ в 400 мл воды, затем приливают 2 л конц. серной кислоты). Пробирки помещают в термостат при 140°C на 20 мин, охлаждают и спектрофотометрируют при 590 нм. В качестве стандартов используют растворы глюкозы в концентрационном диапазоне 100-500 мг / С / л. Параллельно ставят контрольное определение с почвой без высушивания. Количество микробной массы рассчитывают по формуле

$$X = (C - C_0) / 0,3,$$

где X – углерод микробной массы (мкг/г почвы); C и C_0 – количество водорастворимых соединений в почве после высушивания и в свежем образце соответственно; 0,3 – пересчетный коэффициент, равный доле солюбилизованных после регидратации клеточных компонентов.

В работах используются только свежие образцы почв, в воздушно-сухих образцах биомасса микроорганизмов резко снижается.

Физиологический метод определения суммарной биомассы

Физиологический метод определения суммарной биомассы почвенных микроорганизмов впервые был предложен Андерсенем и Домшем в 1978 г. Метод основан на измерении скорости дыхания популяции (в образце почвы) после обогащения почвы дополнительным источником углерода (глюкозой). При температуре инкубации почвы +22 / -0,5 °C максимальная скорость дыхания (1 мл CO_2 в ч) соответствует 40мг углерода биомассы. Метод дает воспроизводимые результаты при определении интенсивности дыхания в интервале 1-3 ч после внесения глюкозы. В широком наборе исследуемых почв (органический углерод от 0,78 до

39,2% и рН от 3,8 до 7,1). Содержание микробного углерода варьируется от 15 до 240 мг / 100 г.

Ход работы

Почву просеивают, в пенициллиновые флаконы помещают по 2 г свежей почвы, туда вносят по 0,1 мл глюкозо-минеральной смеси (конечное количество вносимой глюкозы: 10 мг на 1 г почвы), увлажняют при необходимости до 60% от полной влагоемкости и инкубируют при 25 °С. Следует отметить, что глюкозо-минеральную смесь вносят без перемешивания почвы, поскольку последняя операция может вызвать избыточное выделение CO_2 . При использовании газового хроматографа интенсивность дыхания измеряют следующим образом: сразу после внесения субстрата пенициллиновые пузырьки закрывают резиновой пробкой и завинчивают металлическим держателем, отбирают шприцем пробу воздуха объемом 1 мл и проводят газохроматографическое определение CO_2 (C_1). Через 0,5-1 ч проводят повторный отбор пробы воздуха и второе определение CO_2 (C_2). Расчет ИД осуществляется по формуле

$$v = \left[\frac{C_2 V_\phi}{V_\phi - V_{\text{пр}}} - C_1 \right] V_\phi / m / t,$$

где v – ИД почвы (мкг $\text{CO}_2 - \text{C} / \text{ч} / \text{г}$ почвы); C_1 и C_2 – концентрация CO_2 (мкг $\text{C} / \text{см}^3$); V_ϕ – объем воздушной фазы флакона (см^3); $V_{\text{пр}}$ – анализируемый объем воздуха; m – масса почвы (г); t – время инкубации (ч). Газовый хроматограф калибруют, используя газовые смеси с известной концентрацией CO_2 .

При необходимости сравнения большого количества образцов в массовых анализах более целесообразно оценивать лишь начальную максимальную скорость выделения CO_2 описанным выше способом.

ЧАСТЬ 3.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВ

Почвы характеризуются не только составом и численностью разных групп биоты, но и их суммарной активностью, а также активностью биохимических процессов, обусловленных наличием в почве определенного запаса (пула) ферментов, выделенных прижизненно в результате жизнедеятельности растений и микроорганизмов, а также аккумулярованных почвой после разрушения клеток. Все эти понятия включаются в общее понятие **биологической активности почв**.

Биологическая активность почв характеризует масштабы и направление процессов превращения веществ и энергии в природных экосистемах суши, интенсивности переработки органических остатков и разрушения минералов. Именно биохимические процессы, лежащие в основе почвообразования, обуславливают плодородие почв. Показатели биологической активности используют для оценки плодородия почв, мониторинговых исследований состояния почв в связи с их агрохимической оценкой, степенью эродированности, загрязнения пестицидами, тяжелыми металлами. В качестве показателей биологической активности почв чаще используют интегральные показатели, определяющие биологическую активность почв.

1. Интегральные показатели – численность доминирующих групп микроорганизмов, их биомасса, интенсивность дыхания почв.

2. Активность ферментов или показатели численности микроорганизмов, участвующих в углеродном и азотном циклах (целлюлазная, амилазная, протеолитическая).

3. Ферментативная активность почв (оксидазы, дегидрогеназы).

4. Активность микробных экзометаболитов (свободные аминокислоты и токсичность почв).

Выбор показателей биологической активности почв определяется целью его использования. Наиболее широкой областью применения данного показателя являются мониторинговые исследования состояния почв. В комплексе мониторинговых показателей (физических, физико-химических) кратко- и долгосрочных изменений состояния почв важную роль играют показатели ранней диагностики. Это прежде всего интегральные показатели, такие как численность микроорганизмов, их биомасса, интенсивность дыхания почв. Мониторинг состояния почв при загрязнении проводится по следующей схеме, включающей в себя необходимые и специфические показатели. Последние подбираются в зависимости от зональных свойств почв, типа экосистемы и других особенностей исследуемой территории (табл. 1).

**Комплексная система показателей мониторинга
состояния почв при загрязнении**

Свойства почв, параметры	Необходимые показатели	Специфические показатели
Степень загрязнения	Общее содержание загрязняющих веществ. Коэффициент накопления	—
Физико-химические	рН. Гидролитическая кислотность, мг-экв / 100 г. Окислительно-восстановительный потенциал	Титруемая щелочность, мг / экв / 100 г. Содержание карбонатов (бикарбонатов). Содержание окислительно-восстановительных форм отдельных элементов
Общие	Сумма поглощенных оснований, мг/экв/100 г. Микроагрегаты и механический состав. Удельная электропроводимость	Емкость катионного обмена, мг/экв/100 г. Степень засоления, %. Сухой остаток. Степень эродированности
Миграционные	Транслокация в растения. Испарение в атмосферу. Миграция по профилю почв	—
Буферность к загрязнению	Устойчивость гумуса. Устойчивость ППК (почвенно-поглощающего комплекса). Устойчивость кислотно-основных свойств. Устойчивость ферментативной активности	Обобщенные показатели реакции почвы на загрязнение
Агрохимические	Содержание гумуса, %. Содержание N, P, K, %	Групповой состав гумуса. Содержание водорастворимых органических веществ, мг/экв/100 г
Биологические (токсические)	Активность дегидрогеназ, мкл H ₂ /г/сутки. Интенсивность дыхания, CO ₂ , мкл/г/час. Фитотоксичность	Активность ферментов углеродного цикла. Влажность завядания. Содержание токсичных форм элементов

В целях экологической экспертизы почв могут использоваться вышеуказанные методы, но преимущество имеют экспресс-методы, дающие результат в течение 2-3 ч, не требующие дорогостоящей аппаратуры и высококвалифицированных специалистов – метод определения биологической активности почв по Т.В. Аристовской, вошедший в практику оценки почв относительно недавно, с 90-х гг. прошлого века.

Определение биологической активности почв (по Аристовской)

О биологической активности почв судят по скорости разложения в почве мочевины. Этот процесс сопровождается высвобождением аммиака. По степени зацелачивания влажных полосок индикаторной бумаги и изменению ее цвета судят об уровне биологической активности почвы.

Ход работы

В 3 чашки Петри диаметром 9 см вносят по 45-50 г почвы, увлажненной до пастообразного состояния. Количество мочевины, вносимое в почву, зависит от типа почв (для дерново-подзолистых – 0,5-1 г на 100 г почвы, для степных – 1-2 г мочевины на 100 г почвы).

Содержимое чашек тщательно перемешивают и равномерно размещают по дну. К внутренней поверхности крышки прикрепляют по влажной полоске фильтровальной бумаги, пропитанной универсальным индикатором с рН 6,5. Во избежание быстрого высыхания чашки помещают во влажную камеру (экзикатор с водой). Просматривают чашки через каждые полчаса, отмечают время, потребовавшееся для повышения рН индикаторной бумаги до 7; 7,5; 8; 8,5 ед.

Почва с высокой биологической активностью обнаруживает сдвиг рН 1-1,5 ед. за 1,5 ч или 1 ч после начала опыта.

При малых количествах мочевины скорость реакции снижается, при больших – ухудшается сходимость результатов параллельных округлений (без заметного возрастания реакции).

Таблица 2
Оценка биологической активности почвы по Аристовской

Биологическая активность	Сдвиг рН на 1-1,5 ед. (в часах)
Низкая	> 4
Средняя	< 3
Высокая	< 1,5

Для урбаноземов и окультуренных почв Самарской области оптимальная доза мочевины – 1-1,5 г на 100 г почвы.

Определение интенсивности дыхания почв методом титрования

Интенсивность дыхания почв является интегральным показателем биологической активности почв и используется как показатель биомониторинга почв.

Ход работы

Из массы воздушно-сухой почвы, просеянной через сито 2 мм, делают навески по 18 г в чашку Петри. Почву увлажняют дистиллированной водой и оставляют на 2 суток.

Актуальную дыхательную активность почвы определяют по количеству CO_2 , выделяемого в течение 1 ч. Учет выделения CO_2 проводят в герметично закрытых резиновыми пробками эйленмейеровских колбах на 250 мл. Навеска почвы в 4 г подвешивается на марлевом мешочке на крючок, закрепленный в пробке. В колбу наливают 10 мл 0,1 н. раствора NaOH (KOH) и плотно закрывают ее. В качестве контроля берется колба с раствором NaOH (KOH) без почвы. Через 1 ч проводят титрование щелочи раствором HCl 0,01 н. в присутствии фенолфталеина. Определение величины показателя интенсивности дыхания почвы проводят по формуле

$$X = (A - B) \cdot 0,22 / P - t,$$

где X – интенсивность дыхания почвы; A – количество HCl , затраченное на титрование в контроле; B – количество HCl , затраченное на титрование в опыте; 0,22 – количество CO_2 , эквивалентное 1 мл 0,01 н. HCl ; P – вес пробы; t – продолжительность опыта (час).

Для определения потенциальной интенсивности дыхания сравнивали интенсивность дыхания почв увлажненных и обработанных глюкозой в концентрации 50 мг / 10 г почвы после двухдневной инкубации почвенных образцов в чашках Петри. Определение интенсивности дыхания вели по вышеописанной методике. По разнице интенсивности дыхания увлажненной почвы и обработанной раствором глюкозы судили об уровне потенциальной активности почв. Потенциальная дыхательная активность позволяет более наглядно оценить разницу в биологической активности сравниваемых почвенных образцов.

Определение целлюлозоразрушающей активности микроорганизмов (лабораторный метод)

В лабораторных условиях скорость разложения целлюлозы в почве определяют модифицированным методом Кристенсена.

Ход работы

На дно стерильной чашки Петри помещают стерильный диск фильтровальной бумаги диаметром 7 см (определенного веса). Бумажные фильтры покрывают сеткой из капроновой или стеклянной ткани, на которую помещают 25-40 г почвы, увлажненной до 60% от полной влагоемкости. Чашки помещают во влажную камеру и инкубируют при температуре 27°C. Опыт ставится в пятикратной повторности. Через 10-20-30 дней наблюдают за развитием целлюлозоразрушающих бактерий на фильтровальной бумаге со дна чашки. Учет разложившейся целлюлозы проводят спустя 30 дней. Для этого почву высыпают из чашки; осторожно отделяют капроновую ткань; остатки фильтровальной бумаги счищают со дна чашки, высушивают до воздушно-сухого состояния и взвешивают. О степени разложения целлюлозы судят по разности между исходным и конечным весом фильтровальной бумаги и выражают ее в мг на чашку или в % от исходной массы.

В случае необходимости проведения более длительных исследований анализируется комплекс целлюлозоразлагающих микроорганизмов, развивающихся на фильтровальной бумаге. Для этого описывают характер разложения и пигментации целлюлозы. Дается общая характеристика развития бактерий, грибов и актиномицетов на бумаге. Отбираются пробы для микроскопического анализа. Проводится микробиологический анализ путем высева пробы фильтровальной бумаги на соответствующие питательные среды.

При определении потенциальной способности почвы к разложению клетчатки используют описанную выше методику, но при помещении на дно чашки взвешенной фильтровальной бумаги ее предварительно смачивают 3 мл раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Раствор должен содержать 4 мг / мл этой соли.

Предпочтительно для сравнения одновременно ставить варианты со смачиванием фильтров водой (3 мл).

Определение целлюлозоразрушающей активности почв (полевой метод)

Хлопчатобумажную ткань натягивают на стекла размером 10x25 или 10x50 см (можно использовать другие размеры пластинок) и обшивают их сеткой из капрона или стеклоткани. Вместо стекол можно использовать полиэтиленовую пленку, на одну сторону которой пришивают ткань.

Ход работы

Лопатой делают разрез в почве. Вертикальную стенку выравнивают почвенным ножом и прижимают к ней пластинку (или пленку) с тканью, отделив ее от почвы капроновой тканью. Присыпают почву к противоположной стенке и слегка уплотняют ее. Спустя 1, 2, 3 месяца стекла извлекают из почвы, осторожно снимают крупные комки, просушивают на

воздухе. После этого остатки почвы очищают щеточкой, осторожно снимают капроновую сетку. Делают описание характера разложения ткани по профилю (в случае необходимости фотографируют) и взвешивают ее остатки.

При желании охарактеризовать интенсивность процесса разложения целлюлозы по каждому из горизонтов в отдельности полотно разрезают на соответствующие части и взвешивают их отдельно. Такую же площадь вырезают из контрольного полотна. Количество разложившейся ткани соотносят с контролем. Скорость разложения выражают в процентах от исходного (контрольного) веса ткани. В опыте используют не менее 5 повторностей.

Определение протеолитической активности почв (по Мишустину, Никитиной, Вострову)

Содержание в почве доступного азота связано с деятельностью протеолитических ферментов, которые вызывают гидролитический распад белков и полипептидов. Определение суммарной протеолитической активности почвы основано на применении необработанных фотоматериалов, содержащих слой желатины.

Этот метод позволяет проследить за интенсивностью разложения протеина в условиях почвы.

Ход работы

Полоски непроявленной фотопленки или фотобумаги размером 5x20 см взвешивают на аналитических весах, помещают вертикально в разрез почвы, плотно прижимая почву к фотоматериалу. Через 7-10 дней материал осторожно извлекают из почвы, промывают, высушивают при комнатной температуре, затем снова взвешивают. По разности в весе до и после экспозиции в почве судят о протеолитической активности последней, которую выражают в миллиграммах разложившейся желатины (протеин) на 100 см² фотоматериала или в процентах от исходного веса.

Определение амилитической активности почвы (по Щербаковой)

Методы определения амилитической активности почвы основываются на количественном учете редуцирующих сахаров (мальтозы и глюкозы), образующихся при расщеплении крахмала в почве.

Реактивы: фосфатный буфер (рН 5,6), 1%-ный крахмал (растворимый), толуол, раствор 3-5-динитросалициловой кислоты, стандартные растворы мальтозы в концентрации от 0,02 до 2 мг в 1 мл для построения калибровочной кривой.

Ход работы

Навеску почвы 5 г помещают в колбу на 50 мл, добавляют 10 мл 1 %-ного раствора крахмала, столько же фосфатного буфера, несколько капель толуола, тщательно перемешивают и ставят в термостат на 24 ч при 30 или 37°C. После инкубации смесь фильтруют и определяют редуцирующие сахара с динитросалициловой кислотой. Для этого в пробирку берут 1 мл фильтрата, приливают 2 мл динитросалициловой кислоты и нагревают в кипящей водяной бане в течение 5 мин. Затем смесь в пробирке охлаждают под струей водопроводной воды, конечный объем доводят дистиллированной водой до 10 мл, перемешивают и колориметрируют при зеленом светофильтре. Контролем служит фильтрат, полученный сразу после добавления в почву всех компонентов, в том числе и крахмала (без термостатирования).

Количество мальтозы находят по калибровочной кривой. Амилолитическую активность выражают в миллиграммах мальтозы на 1 г почвы за 24 ч. Для этого количество мальтозы, определенное в 1 мл фильтрата, умножают на весь объем суспензии и полученный результат делят на навеску почвы, т.е. на 5.

Определение протеолитической активности почв (по Гофману и Тейхеру)

Протеолитические ферменты катализируют гидролитическое расщепление белков и пептидов до аминокислот. Учет общего количества аминокислот, образующихся при расщеплении белковых субстратов, положен в основу определения протеолитической активности почвы. Определение аминокислот проводят колориметрически. В качестве субстратов применяют желатину, казеин, альбумин и т.д.

Этот метод основан на определении аминокислот с помощью азотнокислой меди.

Реактивы: 2%-ный раствор желатины (растворяют при слабом нагревании), толуол, CaCO_3 , раствор меди (1 г $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) растворяют в 70 мл воды в мерной колбе на 100 мл, добавляют 25 г уксуснокислого натрия — $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, тщательно перемешивают и доливают до метки водой, через 3 дня фильтруют).

Стандартный раствор глицина: 26,8 г глицина растворяют в дистиллированной воде и доливают до 100 мл (1 мл содержит 50 г аминного азота). Для построения стандартной кривой берут от 0 до 20 мл раствора глицина в мерные пробирки (или колбочки-пикнометры), доводят дистиллированной водой до 20 мл, приливают 2 мл медного раствора и колориметрируют. Экстинкция ФЭКа и соответствующие концентрации глицина используются для составления кривой.

Ход работы

10 г почвы и 0,5 г мела помещают в мерную колбу на 100 мл, добавляют 1,5 толуола и через 15 мин приливают 20 мл 2%-ного раствора желатины, тщательно перемешивают и ставят в термостат при 37°C на 20 ч. По истечении времени в колбу до метки (т.е. до 100 мл) приливают воду, нагретую до 38°C, перемешивают и фильтруют через плотный фильтр. Контролем служит почва, в которую вместо раствора желатины вносят 20 мл воды.

Для определения аминокислот берут 10 мл фильтрата, вносят в колбу на 50 мл, приливают 10 мл воды и 2 мл раствора меди, появляется нежно-голубое окрашивание. Интенсивность окраски измеряют на колориметре с красным светофильтром против воды. Количество аминокислот находят по калибровочной кривой, построенной по глицину. При окончательных расчетах нужно учитывать весь объем содержимого исходной колбы (100 мл), навеску почвы (10 г) и разведение перед колориметрированием (в 2 раза).

Протеолитическую активность выражают в миллиграммах аминного азота на 100 г почвы за 20 ч.

Определение свободных аминокислот в почве (по Мишустину и Петровой)

Накопление в почве свободных аминокислот происходит в результате жизнедеятельности микроорганизмов. Поэтому суммарное количество аминокислот может служить достоверным показателем интенсивности микробиологических процессов.

Метод основан на применении хроматографических проявителей для выявления аминокислот на льняном полотне после экспонирования его в почве.

Ход работы

Стеклопластиковые пластинки размером 10x35 см, предварительно вымытые в хромпике, обтягивают льняной тканью или батистом и вставляют вертикально в почву на 7-10-20 дней (всю работу проводят в резиновых перчатках). По истечении срока стекла вынимают из почвы, ткань снимают, из нее вырезают полоску, прилегающую к почве, высушивают, снимают щеткой почву. После этого полоску опрыскивают 0,5%-ным раствором нингидрина в ацетоне и высушивают при комнатной температуре в течение 24 ч. На полотне появляются пятна аминокислот.

Для выявления белка высушенную ткань опрыскивают водным раствором бромфенолового синего (0,1 г индикатора в 250 мл дистиллированной воды). В результате ткань окрашивается в синий цвет.

Затем ее погружают в 0,2%-ный раствор уксусной кислоты. После высушивания фон будет светлым, а белковые пятна – темно-голубыми.

Для количественного определения аминокислот из проявленной нингидрином ткани вырезают кусочки весом 1 г, измельчают, помещают в колбу и заливают 25 мл 75%-ного этанола, содержащего 0,005% медного купороса, для экстракции аминокислот. Экстракт фильтруют, измеряют объем и фотоколориметрируют на ФЭКе при зеленом светофильтре. Суммарное количество аминокислот находят по калибровочной кривой, которую строят по чистому лейцину. Содержание аминокислот выражают в миллиграммах лейцина на 1 г льняной ткани. Метод достаточно точен, отражает тонкие изменения почвенных условий и численность микроорганизмов. Микробиологический анализ участков ткани с интенсивной окраской нингидрином (следовательно, и с наибольшим количеством аминокислот) выявляет максимальную численность микроорганизмов, в то время как слабоокрашенные участки отличаются меньшим их содержанием.

ЧАСТЬ 4.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Различные почвенные микроорганизмы в силу своих физиолого-биохимических особенностей имеют различную трофическую базу. Большинство из них активно потребляют простые углеводы, органические кислоты, спирты. Гораздо меньше микроорганизмов, «предпочитающих» полимерные углеводы: крахмал, целлюлозу. Еще меньшее количество видов специализируется на хитине, лигнине (в основном это грибы, актиномицеты и некоторые бактерии). Большинство микроорганизмов потребляют аммонийный и нитратный азот. Особая группа – азотфиксаторы, способные утилизировать молекулярный азот.

Изучение целлюлозоразрушающей активности микроорганизмов (в аэробных условиях)

Процесс аэробного разложения целлюлозы происходит в условиях достаточного, но не избыточного увлажнения. Существенным для этого энергетически емкого процесса является достаток макроэлементов – азота, фосфора, калия и кальция. В аэробных условиях целлюлозу гидролизуют в основном представители порядка Мухобacterales подпорядка Soranginae семейства Sorangiagaceae, а также представители порядка Cytophagales семейства Cytophagaceae (рода Cytophaga, Sporocytophaga). Для накопления целлюлозных бактерий предложено несколько селективных избирательных сред.

Среда Гетчинсона (г / л): K_2HPO_4 – 1,0; $CaCl_2$ – 0,1; $MgSO_4$ – 0,3; $NaCl$ – 0,1; $FeCl_3$ – 0,01; NaN_3 – 2,5; вода дистиллированная; pH 7,2-7,3.

Среда Виноградского (г / л): KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4$ – 0,5; $NaCl$ – 0,5; $FeSO_4$ – 0,01; $MnSO_4$ – 0,01; KNO_3 – 4,0; $CaCO_3$ – 20,0; вода дистиллированная. Добавлением 10%-ного раствора H_2PO_3 pH среды доводится до 7,2.

Ход работы

50 мл одной из этих сред наливают в колбу Эйленмейера на 250 мл, на дно колбы опускают складчатый бумажный фильтр, направленный конусом вверх, и стерилизуют при 1 атм. Содержимое колбы засевают комочком почвы. Через 4-5 суток при 28° можно наблюдать за изменением бумаги. Аэробные бактерии на уровне жидкости образуют налет желтого или оранжевого цвета. Когда бактерии хорошо разовьются, они нарушат целостность бумаги – фильтр постепенно будет оседать, и на нем образуется слизь. Если подобный опыт проводить не в колбе, а в пробирке со

средой и опущенной в нее полоской фильтровальной бумаги, то картина разложения получится более полной.

При использовании кремнекислых пластинок на них помещают стерильные кружки фильтровальной бумаги и заливают 3-5 мл одной из приведенных выше сред. Затем на бумагу наносят исследуемую почву в виде 25-30 комочков. Вокруг комочков почвы на поверхности фильтровальной бумаги развиваются колонии целлюлозо-разрушающих бактерий, которые спустя 5-7 суток образуют окрашенные зоны. Рост различных целлюлозоразрушающих бактерий проявляется по-разному. Миксобактерии дают влажные слизистые зоны, сравнительно медленно распространяющиеся по поверхности фильтровальной бумаги. Такого же характера зоны, только окрашенные в оранжевый цвет, наблюдаются у спороцитифаг. Культуры же рода *Cellvibrio* образуют менее влажные зоны, которые отличаются от других тем, что размеры их быстро увеличиваются, а бактерии разлагают бумагу на отдельные волокна. Наряду с микроскопическими наблюдениями бактерий остатки неразложившейся фильтровальной бумаги переносят на воронку с бумажным фильтром, масса которого заранее известна. Сюда же смывают горячей водой из чашки всю слизь и отдельные волокна бумаги, находящиеся на поверхности геля. Затем осадок на фильтре промывают горячим 1%-ным раствором соды, а потом соляной кислотой. Кислоту смывают горячей дистиллированной водой. После высушивания определяют массу оставшейся клетчатки. Зная исходную массу и массу в конце опыта, по разности вычисляют процент разложившейся клетчатки.

Определение целлюлозоразрушающей активности почв методом почвенных пластинок (по Кристенсену)

Ход работы

Почву, обогащенную соединениями калия и азота (2 мл 1,5%-ного раствора KNO_3 на 50 г почвы) и увлажненную до полной влагоемкости, помещают толстым слоем в чашки Петри. На поверхность почвы кладут стерильную фильтровальную бумагу или обеззолненный фильтр и хорошо приглаживают, чтобы бумага плотно прилегала к почве и была достаточно увлажнена. Чашки с пластинками инкубируют во влажной камере в течение нескольких недель. На поверхности бумаги появляются пигментные зоны и неокрашенные пятна, свидетельствующие о разрушении клетчатки.

Обнаружение и количественный учет целлюлозоразлагающих бактерий на твердых питательных средах (в аэробных условиях)

Для этой работы используют среду Виноградского следующего состава (г / л): K_2HPO_4 – 1,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0; $MgSO_4$ – 0,5; NaCl – 0,5; агар – 20,0; вода водопроводная.

Ход работы

Среду разливают в чашки Петри и дают ей остыть. После этого в чашку вносят почвенную суспензию в разведении 1:10-1:1000 (в зависимости от количества микроорганизмов) и равномерно распределяют ее шпателем по поверхности агара. Затем на поверхность агара кладут стерильный обеззоленный фильтр и прижимают его к агаровой пластинке. Чтобы избежать высыхания, чашки выдерживают во влажной камере в термостате при 28° в течение 1-2 недель. За этот срок на бумаге вырастают отдельные колонии плесневых грибов, актиномицетов и бактерий, и можно подсчитать, сколько микроорганизмов – разрушителей целлюлозы содержится в 1 г почвы.

Численность целлюлозоразрушающих бактерий можно определить также на агаризованной среде Гетчинсона с целлюлозой (1%). В качестве источника углерода используют целлюлозный порошок, измельченную на терке фильтровальную бумагу, микрокристаллическую целлюлозу, обойный клей КМЦ. Обойный клей следует размочить в холодной воде (2-3 часа), добавить к минеральной основе и стерилизовать среду при 1 атм. Целлюлозный агар можно применять для выделения, количественного учета и очистки целлюлозоразрушающих микроорганизмов. На таком агаре растут многие организмы, а наличие целлюлолитической активности удобно определять по прозрачным зонам вокруг колоний. Недостаток метода состоит в том, что культуры быстрорастущих микроорганизмов могут вытеснять виды, развивающиеся медленно.

Изучение целлюлозоразрушающей активности микроорганизмов (в анаэробных условиях)

В условиях ограниченного доступа воздуха целлюлозу разлагают в основном представители рода *Clostridium*. Для выделения анаэробных бактерий, разлагающих целлюлозу, используют среду Омелянского (г / л): K_2HPO_4 – 1; $MgSO_4$ – 1; NaCl – 1; $(NH_4)_2SO_4$ – 2; $NaNO_3$ – 2; фильтровальная бумага – 30; вода дистиллированная; среду Имшенецкого (г / л): NH_4HPO_4 – 1,0; KH_2PO_4 – 0,5; $MgSO_4$ – 0,4; NaCl – 0,1; $MnSO_4, FeSO_4$ – 1 капля 1%-ного раствора, пептон – 5,0, $CaCO_3$ – 2,0 г; фильтровальная бумага – 15,0; pH 7,0-7,4. Для накопительных и чистых культур: МПБ – 500 мл; $CaCO_3$ – 2 г; фильтровальная бумага – 15 г; водопроводная вода – 500 мл.

Ход работы

Жидкие питательные среды разливают высоким слоем в высокие пробирки. Фильтровальную бумагу нарезают полосками и опускают на дно пробирки. Засевают комочками почвы и инкубируют в термостате при температуре 30-35° (обнаружение мезофилов) и 60° (поиск термофилов).

Количественный учет анаэробных целлюлозоразлагающих бактерий проводят методом предельных разведений. Посев осуществляют в несколько параллельных пробирок (не менее 5), которые инкубируют в термостате, просматривают на 5-7-е сутки, отмечая помутнение. Результаты учета обрабатывают по таблице Мак-Креди. Полученные данные следует рассматривать как приблизительные, поскольку бактерии адсорбированы на волокнах клетчатки, где происходит их развитие, и из-за этого не распределяются равномерно в ноде при приготовлении разведений.

Активное разложение целлюлозы осуществляется также в строго анаэробных условиях в рубце жвачных животных представителями родов *Ruminococcus*, *Selenomonas*, *Bacteroides* и некоторых других. Их выявляют на среде Бентли с соавторами (г / 100 мл): целлюлоза – 1,0; мочевины – 0,168; глюкоза – 0,1; Na_2HPO_4 – 0,113; NaH_2PO_4 – 0,109; KCl – 0,043; MgCO_3 – 0,04; CaCl_2 – 0,004; Na_2SO_4 – 0,015; Na_2CO_3 – 0,1; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,044; парааминобензойная кислота – 500 мкг; биотин – 20 мкг. Мочевину в растворе стерилизуют через бактериальный фильтр. Глюкозу и биотин в растворе стерилизуют при 0,5 атм. Остальные компоненты – при 1 атм. Значение pH среды доводят до 6,7-6,9 насыщенным стерильным раствором карбоната натрия.

Определение амилалитической активности почв

Крахмал составляет незначительную часть растительных тканей, если не считать семян (где его содержится до 70% от сухой массы) и некоторых клубней. Он расщепляется в почве с большой скоростью в аэробных и анаэробных условиях. Микроорганизмы, гидролизующие крахмал, относятся к различным систематическим группам. Это грибы, актиномицеты, представители рода *Bacillus*, *Derxia*, миксомицеты и некоторые другие.

Ход работы

Для выделения и учета микроорганизмов, гидролизующих крахмал, производят посев из почвенной суспензии на 2%-ный крахмало-аммиачный агар в чашках Петри. Разведение подбирается так, чтобы на чашке было 50-70 колоний бактерий. Если чашки залить раствором Льюголя, то среда окрасится в синий цвет. Зоны вокруг колоний бактерий, гидролизующих крахмал, либо окрасятся в красно-бурый цвет – гидролиз дошел до стадии декстринов, либо останутся бесцветными – гидролиз

прошел до стадии образования сахара. Используемые среды для выявления амилолитической активности не должны содержать легкоусвояемых сахаров, так как они ингибируют использование крахмала. Наличие в почве бактерий, способных к разложению крахмала, можно установить, используя метод почвенных комочков. Разложив комочки на агар с крахмалом и проведя качественную реакцию, можно обнаружить бактерии, разлагающие крахмал в почве.

Многие виды целлюлозоразлагающих бактерий, например некоторые миксобактерии и вибрионы, хорошо развиваются не только на целлюлозе, но и на крахмале. Для их учета разведения почвенной суспензии высевают на чашки Петри с питательной средой Гетчинсона, в которую вместо целлюлозы в качестве источника углерода вводят 2% крахмала.

Среда Гетчинсона (г/л): $K_2HPO_4 - 1,0$; $FeCl \cdot 6H_2O - 0,01$; $CaCl_2 \cdot 6H_2O - 0,1$; $NaNO_3 - 2,5$; $MgSO_4 \cdot 7H_2O - 0,3$; $KaCl - 0,1$; крахмал - 20; дистиллированная вода - 1,0 л pH 7,2 - 7,3.

Изучение азотофиксирующих микроорганизмов.

Выделение и учет азотобактера (метод почвенных комочков)

Азотобактер широко распространен в почвах, содержащих легкодоступное органическое вещество и имеющих нейтральную или слабощелочную реакцию среды. Морфология клеток и колоний азотобактера позволяет различать его среди других почвенных микроорганизмов.

В молодой культуре клетки имеют вид крупных (3х6 мкм) одиночных или сцепленных попарно подвижных палочек с округлыми концами. С возрастом палочки постепенно укорачиваются и превращаются в крупные (до 4 мкм в диаметре) кокки, напоминающие (в случае парного сцепления) восьмерки. При этом клетки покрываются толстой слизистой капсулой, теряют подвижность, начинают активно пигментировать.

На плотных средах колонии азотобактера растут в виде бесцветных густослизистых выпуклых капель, которые по мере старения приобретают бурый, темно-коричневый или черный цвет. Такая окраска колоний характерна для более распространенного в почве вида *Az. chroococcum*. Другой вид, также часто встречающийся в почве, *Az. vinelandii*, образует на плотных средах колонии желто-зеленого флуоресцирующего цвета, причем пигмент выделяется в среду, чего не наблюдается у *Az. chroococcum*.

Азотобактер хорошо растет на безазотистых питательных средах. Источником азота для него служит молекулярный азот, но он может также потреблять азот нитратов, солей аммония, аминокислот. Углерод и энергию этот микроорганизм получает из углеводов, спиртов, органических кислот

и их солей. Азотобактер требователен к наличию в среде фосфора, кальция и железа, а также микроэлементов – молибдена и бора.

Азотобактер – строгий аэроб. Для обнаружения и количественного учета азотобактера применяют безазотистые питательные среды Эшби и Федорова, а также почвенные пластинки.

Ход работы

Среда разливается в чашки Петри и после застывания на поверхность агара раскладываются правильными рядами увлажненные комочки почвы величиной с просыное зернышко (метод Виноградского), чашки ставят в термостат при 28-30°C на 6-8 суток. Через 3-4 дня вокруг комочков появляются густослизистые непрозрачные бесцветные колонии, со временем они становятся светло-коричневыми или темно-бурыми и отличаются от колоний других бактерий.

По окончании срока культивирования подсчитывают все комочки, которые принимаются за 100%, затем подсчитывают комочки с ростом азотобактера (комочки обрастания). Процентное содержание азотобактера рассчитывают по пропорции:

a – 100

b – X

$$X = (a / b) \cdot 100,$$

где a – общее количество комочков почвы; b – число комочков с ростом азотобактера.

Оптимальной средой для роста азотобактера является синтетическая среда Федорова, включающая, кроме основных солей, набор микроэлементов.

Изучение денитрифицирующей активности почв

Учет денитрификаторов проводят методом предельных разведений на среде Гильтая с бромтимоловым синим.

Среда Гильтая: (г / л)

Раствор 1

KNO₃ – 2

Аспарагин – 1,0

Дистиллированная

вода – 250 мл

Раствор 2

Лимоннокислый Na или K – 2,5

MgSO₄, KH₂PO₄ – 2

CaCl₂ – 0,2

FeCl₃ – следы

Вода – 500 мл

Ход работы

Оба раствора сливают, объем доводят водой до 1 л, добавляют индикатор (бромтимоловый синий) до появления зеленого цвета среды, устанавливают рН 7,0, разливают высоким столбиком в пробирки (по 12-15 мл) и стерилизуют при 0,5 атм.

Пробирки со средой Гильята засевают разведениями почвы 1:10 – 1:10 по 1 мл и ставят в термостат при 30°C на 5-7 суток. О развитии денитрификаторов судят по изменению окрашивания среды (зеленый цвет переходит в синий при восстановлении нитратов) и по обильному газообразованию. Морфологию изучают микроскопированием.

Содержание микроорганизмов этой группы можно определять и высевом на агаризованную среду Гильята (агар – 1,5%). В этом случае среду берут без аспарагина для учета бактерий, осуществляющих прямую денитрификацию.

Для этого посев производят методом заливки (см. выше). 1 мл почвенной суспензии заливают толстым (до 7 мм) слоем охлажденной до 40°C среды. Чашки помещают в термостат. О развитии денитрифицирующих бактерий судят по образованию в толще агара пузырьков газа и появлению нитритов вокруг колоний. Последние выявляются качественными реакциями, а также изменением цвета среды (зеленого в синий).

Микроскопическое исследование колоний с характерными зонами (синяя окраска, наличие нитритов в агаре) показывает, какие микроорганизмы являются возбудителями денитрификации. Чаще всего это факультативно анаэробные бактерии рода *Pseudomonas* (*Ps. denitrificans*, *Ps. fluorescens*, *Ps. Aeruginosa*).

Определение аммонифицирующей активности почв

Показателем аммонифицирующей активности почвенной микрофлоры является образование аммиачного азота при разложении внесенного в почву дополнительного источника органического азота – мочевины, пептона. Энергию процесса аммонификации определяют по разности в содержании аммиачного азота в исходной почве и после инкубации ее в термостате при внесении соответствующей органики. Пептон вносят в количестве 1%, а мочевины – 1-2% по массе.

Реактивы:

1. Безаммиачная вода: дистиллированную воду освобождают от MH_3 . Для этого к ней добавляют Na_2CO_3 до слабощелочной реакции по фенолфталеину и выпаривают примерно на 1/4 объема.

2. 0,05 н. раствор соляной кислоты: готовый фиксаж соляной кислоты разбавляют в 1 л безаммиачной дистиллированной воды, затем разводят его в 1 л дистиллированной воды.

3. Осаждающая смесь: 50 г щелочи и 50 г соды растворяют в 600 мл дистиллированной воды и упаривают до 500 мл.

4. 50%-ный раствор сегнетовой соли: 50 г виннокислого калия-натрия ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 100 мл безаммиачной дистиллированной воды и проверяют на содержание аммиака. При обнаружении аммиака прибавляют KOH или NaOH до щелочной реакции. После этого раствор упаривают до 200 мл, охлаждают и разбавляют безаммиачной водой до первоначального объема.

5. Образцовый раствор: 0,7405 г хлористого аммония растворяют в 1 л дезаммиачной дистиллированной воды (в мерной колбе на 1 л).

6. Рабочий раствор готовится из образцового: 10 мл образцового раствора разбавляют водой до 500 мл (в мерной колбе). В 1 мл рабочего раствора содержится 0,0047 мг NH_4 или 0,0039 мг N_2 .

Ход работы

Инкубация

25 г просеянной через сито почвы помещают в стерильные колбы на 250 мл, увлажняют до 60% полной влагоемкости, включая то количество воды, в котором будут растворены пептон или мочевины. Затем колбу закрывают ватными пробками и помещают на 10 суток в термостат при 28-30°C. По истечении срока проводят определение аммиачного азота в почве с реактивом Несслера (по Аринушкиной).

Ход определения

К 25 г почвы, инкубированной в термостате, приливают 230 мл 0,05 н. раствора HCl , приготовленного на безаммиачной воде, встряхивают в течение 30 мин и фильтруют. Первые 3-5 мл фильтрата сливают, затем берут 100 мл фильтрата в колбочку Эйленмейера, осаждают его 2 мл осаждающей смеси, взбалтывают и заливают 1-2 каплями толуола. На следующий день берут 5-10 мл прозрачного раствора (в зависимости от содержания аммиака), не взбалтывая осадок, вливают в мерную колбу на 100 мл, приливают безаммиачную воду до 80-90 мл, затем по 2 мл сегнетовой соли и реактива Несслера и доводят до метки безаммиачной водой. Колбочку закрывают чистой пробкой, содержимое перемешивают, переворачивая колбу 5-6 раз, и через 2-3 мин колориметрируют.

Настройка ФЭКа и колориметрирование ведется против раствора холостого опыта: к 100 мл безаммиачной воды добавляется 2 мл сегнетовой соли и 4 мл реактива Несслера.

Одновременно готовят шкалу образцового раствора: берут 10, 20 и 25 мл образцового раствора в мерные колбы на 100 мл, приливают безаммиачную воду (до 80-90 мл), перемешивают и добавляют 4 мл раствора Несслера, доводят водой объем до метки (100 мл), перемешивают и колориметрируют. Для каждой концентрации образцового раствора

снимают показания ФЭКа, экстинкцию исследуемого раствора сравнивают с близкой по значению образцового раствора и содержание аммиачного азота рассчитывают по формуле:

$$A = (100 \cdot 0,776abv) / (h_1v_1c),$$

где A – количество аммиачного азота, мг/100 г сухой почвы; a – содержание NH_4 в 1 мл рабочего раствора, мг (см. ниже); b – количество образцового раствора, взятого для определения, мл (10, 20, 25); h и h_1 – экстинкции соответственно образцового и опытного растворов; v – объем всего опытного раствора, мл; v_1 – объем пробы опытного раствора, взятого для анализа, мл (5 или 10); c – количество сухой почвы, взятой для определения, г; 100 – коэффициент для пересчета на 100 г почвы; 0,776 – коэффициент для пересчета NH_4 на N_2 .

ЧАСТЬ 5.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ПОЧВ И НАЛИЧИЯ АНТИБИОТИКОВ В ПОЧВЕ

Фитотоксичность – суммарный показатель уровня токсичности почв по отношению к растительным биотестам. Токсичность почв определяется, в основном, токсичными выделениями микроорганизмов, а также изменением физико-химических параметров почвенной среды под влиянием различного рода антропогенных воздействий. Микроорганизмы-токсикообразователи используют экзотоксины в конкурентной борьбе за субстрат и для авторегуляции численности популяций. В почвах слабозагрязненных и почвах природных экосистем фитотоксичность – достаточно устойчивый показатель, поскольку он отражает естественный уровень экзометаболической регуляции численности и качественного состава активной микрофлоры, характерный для конкретной почвы. Фитотоксичность почв на исследуемых полигонах Самарской области с низким уровнем загрязнения почв составляла 10-21% (биотест пшеницы) и варьировала на каждом из исследуемых объектов в течение вегетационного периода в пределах 1-2%. В наиболее загрязненных районах Самарской области, в городе Чапаевске, данный показатель возрастал до 40%. Показатель фитотоксичности падает до нуля в ранневесенний и позднесенний период, когда температура почвы становится ниже 10 градусов, даже в загрязненных почвах. В теплый период года при недостатке субстрата и при усилении действия пресса неблагоприятных факторов (за пределами привычных их колебаний), прежде всего загрязнения почв, уровень токсичности почв растет. Увеличение фитотоксичности почв происходит вследствие перестройки микробного комплекса почв под влиянием неблагоприятных внешних воздействий в сторону увеличения численности и активности микроорганизмов-токсикообразователей, чаще всего, относящихся к грибам и актиномицетам. Для оценки токсичности используются свежесобранные образцы почв. В лабораторных опытах сухую почву предварительно увлажняют до 60-80% полной влагоемкости и выдерживают в течение 2-3 дней при комнатной температуре.

Определение фитотоксичности почвы при помощи растительных биотестов (по А. М. Гродзинскому)

В качестве биотестов используют либо однодневные проростки пшеницы (в этом случае токсичность почв оценивают по dL длины корешка проростков), либо семена крестоцветных (токсичность определяют по % всхожести семян) в ходе суточной инкубации на тестируемых почвах. Данный метод широко используется для оценки уровня загрязнения почв.

Ход работы

Навеску почвы 50 г (средняя проба) помещают в ступку, увлажняя водой приблизительно до 75% полной влагоемкости, что соответствует пастообразному состоянию почвы, и хорошо растирают ее пестиком. Затем суспензию переносят в чашку Петри диаметром 7 (9) см. При встряхивании чашки на поверхности почвы должно образовываться легкое водяное зеркало, на которое накладывают фильтр, точно соответствующий диаметру чашки. В качестве биотестов используют однодневные проростки пшеницы или сухие семена крестоцветных, которые раскладывают на фильтр в количестве 50 шт. В случае исследования фитотоксичности почвозаменителей (перлита, гравия и др.) проростки тест-растений выкладывают непосредственно на поверхность увлажненного субстрата, не покрытую фильтром. Опытные чашки помещают в общую кювету, в которую для увлажнения налито немного воды, накрывают ее стеклом и ставят на сутки в термостат при 26°C либо накрывают крышкой. Контрольные семена проращивают на увлажненном песке или на фильтрах, увлажненных водой. Через сутки измеряют длину корней в опыте и контроле. Токсичность выражается в процентах ингибирования развития проростков тест-растений. При проращивании растений на поверхности высокотоксичной почвы часто наблюдается «петлеобразный» рост корней, отторжение их от почвы, хотя вначале они заглублялись нормально. Почва считается слабо токсичной, если развитие проростков подавляется на 10%, среднетоксичной – 20%, сильнотоксичной – 30% от контрольного варианта.

Использование азотобактера как тест-организма для оценки токсичности почвы

Ход работы

Агаризованную среду Эшби (или Федорова) разливают в стерильные чашки Петри; после застывания ее покрывают стеклянными пластинками (кружками) целлофана, который тщательно расправляют на поверхности агара металлическим шпателем (целлофан готовят заранее: нарезают кружки, соответствующие размерам чашки Петри, помещают в чашку, смачивают водой и стерилизуют в автоклаве), на поверхность целлофана накладывают 4 комочка исследуемой почвы, увлажненной до пастообразного состояния, чашки закрывают и выдерживают в течение суток в термостате. За это время токсические вещества диффундируют через целлофан из почвы в агар, а микроорганизмы не проникают. Затем целлофан с почвой снимают с агара и засевают на него суточную культуру азотобактера (вид хроококкум). При наличии токсических веществ в

почве на газоне азотобактера в местах наложения комочков образуются стерильные зоны.

В качестве микробных тестов можно использовать и другие микроорганизмы, выбирая при этом соответствующие питательные среды.

Среда Эшби (г / 100 мл): маннит – 20; K_2HPO_4 – 0,2; $MgSO_4$ – 0,2; $NaCl$ – 0,2; K_2SO_4 – 0,1; $CaCO_3$ – 5,0; вода водопроводная. Среду стерилизуют при 1 атм.

Изучение активности антибиотиков методом цилиндриков

Ход работы

В расплавленный и охлажденный до 45°C МПА (или другой питательный агар) вносят суспензию тест-культуры суточного роста (например *E. coli*) из расчета 10 млн клеток на 1 мл агара, перемешивают и разливают в стерильные чашки Петри. После застывания агара на его поверхности расставляют 6 стерильных цилиндриков из стекла или нержавеющей стали, слегка вдавливая их в агар. Затем микропипеткой в 3 цилиндрика вносят стандартный раствор антибиотика (для сравнения), содержащий 1 ед. / мл, в остальные – испытуемый раствор, т.е. культуральную жидкость. Чашки термостатируют при соответствующей температуре и через сутки измеряют диаметры зон отсутствия роста микроорганизма. Активность антибиотика в культуральной жидкости рассчитывают по калибровочной кривой, построенной по стандартному раствору антибиотика. Концентрация антибиотика в стандартном и исследуемом растворах не должна быть высокой, потому что только для слабых концентраций диаметр зон отсутствия роста тест-культуры пропорционален логарифму концентрации антибиотика. Исходная концентрация стрептомицина для построения калибровочной кривой составляет 20 мкг/мл (20 ед./мл). Из этого раствора готовят серию разведений до концентрации 0,5 ед./мл и методом цилиндриков определяют активность каждой из них. Показателем этой активности служит величина зон отсутствия роста тест-культуры. На основании полученных данных строят калибровочную кривую. На оси ординат откладывают концентрацию антибиотика (в мкг/мл или ед./мл), а на оси абсцисс – диаметр зон отсутствия роста (в мм). Для каждого антибиотика и тест-организма строится своя калибровочная кривая.

Определение наличия антибиотиков в почве

Ход работы

2 навески воздушно-сухой почвы помещают в две фарфоровые ступки. К одной добавляют 0,5 мл чистого антибиотика известной концентрации, к другой – 0,5 мл стерильной воды. Почву перемешивают до равномерной пастообразной консистенции. Вслед за этим в чашки Петри с МПА засевают наиболее чувствительные к взятому антибиотику тест-культуры. Затем из каждой навески на свежезасеянные газоны тест-культур раскладывают по 30 комочков почвы. Посевы помещают в термостат при температуре 37°C. Через сутки вокруг комочков, искусственно обогащенных антибиотиком, образуются четкие, одинаковые по размерам стерильные зоны. Наличие таких же зон у комочков почвы, смоченной стерильной водой, свидетельствует о содержании в почве антибиотика. Размеры стерильных зон могут служить количественным показателем активности антибиотика.

В качестве тест объектов используют культуры *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*

Антибиотики для каждого штамма подбирают экспериментально. В частности, используют пенициллин, стрептомицин, лолмиксин и другие.

Определение токсинов в чистой культуре микроорганизмов

Культуры исследуемых микроорганизмов засевают в жидкую питательную среду соответствующего состава (бактерии – в МПБ, грибы – в среду Чапека, актиномицеты – в крахмало-аммиачную среду). Посевы помещают в термостат на 2 (бактерии) – 10 (грибы и актиномицеты) суток, после чего определяют токсичность культуральной жидкости. Отделяют ее от микробной массы фильтрованием и центрифугированием. Фильтрат разливают по 10 мл в стаканы или бюксы и в каждом из них замачивают по 20 крупных или 30-50 мелких семян растений в течение 24 ч. Контролем служат семена, замоченные в воде и стерильной питательной среде. В опыте желательно использовать мелкие семена, содержащие небольшой запас питательных веществ, например салат, клевер, горчицу, вику. После замачивания семена раскладывают на увлажненную фильтровальную бумагу в чашки Петри и проращивают в течение 5-7 суток (при ежедневном увлажнении водой). По истечении указанного срока подсчитывают число проросших и непроросших семян и измеряют длину проростков и корней. О токсичности культур судят по ростовым эффектам. Токсичными считают культуры, подавляющие прорастание семян, развитие корней и проростков не менее чем на 30% по сравнению с контролем. Степень токсичности культуральной жидкости определяют методом серийных разведений.

ЧАСТЬ 6.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВ

Ферментативную активность почвы принято рассматривать как совокупность процессов, катализируемых внеклеточными ферментами (иммобилизованными на почвенных частицах и стабилизированных в почвенном растворе) и собственно внутриклеточными ферментами почвенной биоты. В почве накапливается определенный «пул» ферментов, качественный и количественный состав которых характерен для данного типа почв, однако интенсивность ферментативных процессов зависит от конкретных условий: наличия и концентрации субстрата, температуры, влажности, pH и др. Ферментативная активность почв – один из показателей потенциальной биологической активности почв, характеризующий потенциальную способность системы сохранять гомеостаз. Оценивая биологическую активность почв, необходимо определять активность нескольких ферментов, относящихся к различным классам, и пользоваться оценочными шкалами, приведенными ниже (табл. 1). Наиболее хорошо изучены в почве ферменты классов оксидоредуктаз и гидролаз, для них, в основном, и разработаны методы определения.

Таблица 1

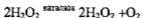
Шкала для оценки обогащенности почв некоторыми ферментами
(Звягинцев, 1987)

Степень обогащенности почв	Каталаза, O_2 см ³ /г за 1 мин	Дегидрогеназы, мг ТФФ на 10 г за 14 ч	Инвертаза, мг глюкозы на 1 мг за 24 ч	Уреаза, мг NH ₃ на 10 г за 24 ч	Фосфатаза, мг P ₂ O ₅ на 10 г за 1 ч
Очень бедная	<1	<1	<5	<3	<0,5
Бедная	1-3	1-3	5-15	3-10	0,5-1,5
Средняя обогащенность	3-10	3-10	15-50	10-30	1,5-5,0
Богатая	10-30	10-30	50-150	30-100	5-15
Очень богатая	>30	>30	>150	>100	>15

* Расчет на 1 г почвы.

Определение каталазной активности почв

Одним из характерных показателей биологической активности почвы является активность каталазы. Каталаза разлагает ядовитую для клеток перекись водорода, образующуюся в процессе дыхания живых организмов и в результате различных биохимических реакций окисления органических веществ, на воду и молекулярный кислород:



Каталазная активность характерна для всех живых организмов, в том числе микроорганизмов. Каталаза широко распространена также в почвах. Активность каталазы определяют или газометрическим методом, основанным на измерении скорости разложения перекиси водорода при ее взаимодействии с почвой, по объему выделившегося кислорода, или по количеству неразложившейся перекиси, которое учитывают путем перманганатометрического титрования колориметрическим способом с образованием окрашенных комплексов. Газометрический метод как быстрый, точный, не требующий сложной аппаратуры, наиболее широко применяется в практике.

Реактивы: 30%-ный раствор H_2O_2 , CaCO_3 .

Ход анализа

Навеску просеянной почвы 1 г вносят в толстостенную колбу или склянку емкостью 100 мл, добавляют 0,5 г CaCO_3 . Затем осторожно на дно ставят с помощью пинцета маленький стаканчик с 1,7 мл 10%-ного раствора перекиси водорода. Навеску почвы смачивают 4 мл дистиллированной воды. Колбу или склянку плотно закрывают каучуковой пробкой, имеющей трубку, соединенной толстостенным каучуком через тройник, снабженный зажимом или краном, с бюреткой. Последняя сообщается с грушей. Бюретка и груша заполнены водой. Уровень воды в бюретке и груше уравнивают и последнюю закрепляют на определенной высоте. Затем закрывают кран, тем самым устранив сообщение прибора с внешней средой. Нужно следить, чтобы уровень воды в бюретке оставался неподвижным, что свидетельствует о достижении температурного равновесия между температурой прибора и комнаты.

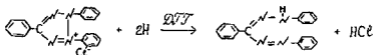
Начало опыта отмечают секундомером в тот момент, когда сосудик с перекисью водорода опрокидывают и вслед за этим встряхивают содержимое колбы. Взбалтывание смеси следует продолжать все время опыта, не касаясь непосредственно колбы руками. Выделяющийся кислород вытесняет из бюретки воду, уровень которой отмечают. Контролем служит стерилизованная сухим жаром (180 °C) почва. Количество выделившегося молекулярного кислорода учитывают в течение 1 мин при температуре 18-20 °C. Периодические отсчеты через 0,5, 1 и 2 мин выделившегося

кислорода позволяют вести наблюдения и за кинетикой процесса. Активность каталазы выражают в мл кислорода, выделившегося на 1 г почвы. Ошибка определения – до 5 %.

Определение дегидрогеназной активности почв

Дегидрогеназы – это большая группа дыхательных ферментов, катализирующая реакции отщепления водорода от органических субстратов и перенос его на соответствующие акцепторы. В почве дегидрированию подвергаются углеводы, спирты, аминокислоты, органические кислоты и другие органические соединения.

Методы определения дегидрогеназной активности основаны на учете количества индикаторов (например солей тетразолия), восстановленных за счет дегидрирования окисляемых субстратов. В целом реакция восстановления ТТХ (тетразолия хлористого) выглядит так:



Реактивы: 1%-ный раствор ТТХ; 0,1 М раствор глюкозы; фосфатный буфер (рН 7,2); толуол; ледяная уксусная кислота; стандартный раствор формазана в толуоле для построения калибровочной кривой (0,1 мг / мл).

Фосфатный буфер: 28,0 мл 0,2 М раствора однозамещенного фосфата натрия (27,8 г NaH_2PO_4 в 1000 мл H_2O) сливают с 72,0 мл 0,2 М раствора двузамещенного фосфата натрия (53,65 г $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл H_2O). Затем объем раствора доводят до 200 мл дистиллированной водой.

Ход работы

1 г почвы вносят в большую пробирку, приливают 2 мл фосфатного буфера, 1 мл 0,1 М раствора глюкозы (или другого окисляемого субстрата) и 1 мл 1%-ного раствора ТТХ. Смесь встряхивают и ставят в термостат при 30°C на 2-24 ч (в зависимости от активности почвы). Контролем служит почва, стерилизованная сухим жаром (180°C, 1 ч). После термостатирования в пробирки приливают 5 мл ледяной уксусной кислоты для прекращения реакции и растворения формазана. Затем формазан экстрагируют из реакционной смеси 5 мл толуола. Для этого смесь энергично встряхивают, дают отстояться и окрашенный верхний слой (формазан в толуоле) колориметрируют с зеленым светофильтром (против контроля). Количество формазана находят по калибровочной кривой, построенной по чистому формазану. Дегидрогеназную актив-

ность выражают в миллиграммах формазана на 1 г почвы за определенное время или в микрограммах H^+ . Для этого количество формазана умножают на 6,709, так как на образование 1 мг ТФФ из ТТХ затрачивается 6,709 мкг водорода.

Определение уреазной активности почвы

Уреаза (карбамид-аминогидролаза) катализирует гидролиз мочевины на аммиак и углекислый газ. Этот фермент образуют многие почвенные бактерии, получившие название уробактерий.

Реактивы: 10%-ный раствор мочевины, фосфатный буфер (рН 6,7), 1 Н КСl (7,5 г на 100 мл воды), раствор сегнетовой соли (50 г калия-натрия виннокислого растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 100 мл), реактив Несслера.

Ход работы

5 г почвы помещают в колбу на 50 мл, приливают 10 мл фосфатного буфера (рН 6,7), 0,5 мл толуола и через 15 мин 10 мл 10%-ного раствора мочевины. Колбу плотно закрывают пробкой, содержимое перемешивают и ставят в термостат при 37°C на сутки. После инкубации почвы содержимое колбы доводят до 50 мл 1 Н раствором КСl и тщательно взбалтывают в течение 10 мин для вытеснения из почвы поглощаемого аммиака. После этого суспензию фильтруют через плотный фильтр, 1-2 мл фильтрата (в зависимости от содержания аммиака) переносят в мерную колбу на 50 мл, разбавляют водой до 35-40 мл, затем последовательно приливают по 2 мл раствора сегнетовой соли реактива Несслера и колориметрируют при синем светофильтре. Контролем служит почва, стерилизованная сухим жаром (180°C, 1 ч). Содержание аммиака рассчитывают по калибровочной кривой, построенной по сернокиислому аммоний. Активность уреазы выражают в миллиграммах аммиака на 1 г почвы за 24 ч.

Определение полифенолоксидазной активности почвы

Полифенолоксидаза в отличие от пероксидазы катализирует окисление полифенолов в хиноны кислородом воздуха. В соответствующих условиях хиноны конденсируются с аминокислотами и пептидами, образуя первичные молекулы гумниевой кислоты.

Метод Галстяна основан на учете количества пурпурогаллина, образующегося в результате окисления внесенного в почву пирогаллола кислородом воздуха.

Активность полифенолоксидазы определяют тем же методом, что и активность пероксидазы, за исключением того, что перекись водорода в реакционную смесь не добавляют. Активность полифенолоксидазы выражают в миллиграммах пурпуругаллина на 100 г почвы за 30 мин.

Определение пероксидазной активности почвы

Пероксидаза катализирует окисление различных органических веществ – фенолов, аминов, некоторых гетероциклических соединений – кислородом перекиси водорода или органических перекисей. Роль пероксидазы состоит в активировании кислорода перекисей за счет образования с ними комплексных соединений. Методы определения пероксидазной активности почвы основаны на учете количества продуктов окисления полифенолов, используемых в качестве субстратов.

Реактивы: 1%-ный раствор пирогаллола; 0,3%-ный раствор перекиси водорода; серный эфир; 0,5 Н соляная кислота.

Стандартный раствор бихромата калия: 0,75 г $K_2Cr_2O_7$ растворяют в 1 л 0,5 Н HCl (эта концентрация соответствует 5 мг пурпуругаллина в 50 мл эфира). Из стандартного раствора делают ряд последовательных разведений, колориметрируют и на основании экстинкции ФЭКа строят калибровочную кривую.

Ход работы

1 г почвы помещают в колбу на 50 мл с притертой пробкой, вносят 10 мл 1%-ного раствора пирогаллола и 2 мл 0,5%-ного раствора перекиси водорода, перемешивают и ставят в термостат при 30°C на 30 мин. После инкубации приливают серный эфир (для экстракции образовавшегося пурпуругаллина), многократно встряхивают, затем эфирный слой сливают в колбу на 50 мл, а в исходную колбу опять вносят небольшое количество эфира. Экстракцию ведут до полного извлечения пурпуругаллина, сливая все эфирные вытяжки вместе. Весь объем экстракта доводят до 50 мл эфиром. После тщательного перемешивания эфирный раствор колориметрируют с зеленым светофильтром (длина волны 430 им) в кюветках шириной 5 мм. Контролем служит почва без субстрата (т.е. без пирогаллола), в которую перед инкубацией вносят 12 мл воды. Для проверки чистоты пирогаллола ставят второй контроль – реактивы без почвы. Колориметрирование ведут против второго контроля. Количество пурпуругаллина находят по калибровочной кривой, составленной по бихромату калия или по эфирному раствору кристаллического пурпуругаллина (5 мг препарата в 50 мл эфира). Активность пероксидазы выражают в миллиграммах пурпуругаллина на 100 г почвы за 30 мин.

Определение целлюлазной активности почвы

В почву с растительными остатками поступает значительное количество целлюлозы. Почвенные микроорганизмы, особенно грибы, обладают активной целлюлазой, расщепляющей клетчатку.

Фермент гидролизует р-1,4-связи в целлюлозе, при этом целлюлоза сначала распадается на дисахарид целлобиозу, а затем под действием целлобиозы – на глюкозу.

Для определения целлюлазной активности почвы используют различные способы учета продуктов ферментативной активности: определение остаточного количества не расщепленной в почве целлюлозы (см. апликационные методы), определение количества образующегося углекислого газа или потребленного при распаде клетчатки в почве кислорода, по количеству образующихся редуцирующих сахаров и т. д. Колориметрический метод определения глюкозы, образующейся при гидролизе целлюлозы в почве, является наиболее распространенным.

Реактивы: 1%-ная карбоксиметицеллюлоза (КМЦ); толуол; ацетатный буфер pH 5,5; алюмокалиевые квасцы; реактив антрона – 0,2%-ный раствор антрона в 95%-ном H_2SO_4 (по объему) (к 5 мл воды прибавляют 100 мл концентрированной H_2SO_4 и после охлаждения вносят 200 мг антрона и оставляют на 4 ч на льду. Используют только свежеприготовленный реактив); стандартный раствор глюкозы для составления калибровочной кривой (к 2,5 мл раствора глюкозы (в концентрациях от 10 до 200 мкг в 1 мл) добавляют 5 мл антрона и колориметрируют).

Ход работы

10 г почвы помещают в колбу емкостью 50 мл, добавляют 1,5 мл толуола, затем 5 мл ацетатного буфера (pH 5,5) и 5 мл 1%-ного раствора КМЦ. Реакционную смесь тщательно перемешивают, колбу закрывают пробкой и ставят в термостат при 36°C на 48-72 ч. В контроле вместо субстрата добавляют 5 мл воды, вторым контролем являются реактивы без почвы. После инкубации колбу на водяной бане нагревают до 100 °С. Затем добавляют 0,3 г алюмокалиевых квасцов для осаждения КМЦ. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр в мерные колбы емкостью 50 мл и объем фильтрата доводят до метки дистиллированной водой. 2 мл фильтрата переносят в термостойкие пробирки (40-50 мл) и добавляют 4 мл антронового реактива, выдерживают 30 мин и колориметрируют против первого контроля с синим (551 нм) светофильтром в кюветах шириной 10 мм. Калибровочную кривую составляют по глюкозе. Целлюлазную активность выражают в миллиграммах глюкозы на 10 г почвы.

Определение скорости деструкции полисахаридов по эмиссии углекислого газа

Ряд растворимых полисахаридов, таких как ксилан, пектин, ламинан, пуллулан и нерастворимых (целлюлоза, хитин) плохо определяются в почвах биохимическими методами. Для того чтобы проследить разложение этих полисахаридов, необходимо использовать интегральные характеристики: концентрацию сахаров, изменение концентрации белка или интенсивность дыхания. Последний метод позволяет оценить не только интенсивность процесса, но и получить расчет баланса по углероду, а также рассчитать кинетические характеристики процесса – константу Михаэлиса-Ментен и удельную скорость. Для того чтобы подготовить такой эксперимент, нужно учитывать состояние объекта (почвенного образца) и его физико-химические характеристики. Так, для суходольных и луговых почв нужно использовать готовые растворы или суспензии полисахаридов. Эти растворы вносят в почвенные образцы капельным методом. Если речь идет о пойменных или заболоченных почвах, для которых характерно переувлажнение, то полисахариды можно вносить в твердом виде. Подбор концентраций проводят в зависимости от целей исследования. Как правило, полисахариды вносят до конечной концентрации от 500 до 2000 мг на кг почвенного образца или на 1 л жидкой суспензии.

Реактивы: растворы полисахаридов.

Ход работы

В сывороточные флаконы объемом 500 мл вносят почвенный образец, при необходимости увлажняют дистиллированной водой или минеральной средой. Флакон плотно закрывают силиконовой пробкой и выдерживают в течение суток при комнатной температуре. На следующие сутки измеряют концентрацию CO_2 с помощью инфракрасного спектрометра Infracalyt, DX2100 или их аналогов. Для этого из флакона шприцем объемом 1-2 мл отбирают газовую фазу и закалывают в пробоприемник прибора. Величину пика пробы сравнивают с величиной пика стандартного газа и рассчитывают концентрацию CO_2 в 1 мл газовой смеси. Затем пересчитывают это количество на 1 г почвы или 1 мл жидкой фазы. Для оценки скорости разложения субстрата оценку концентрации в закрытом флаконе проводят не реже 1 раза в сутки. Отложенная на графике кривая концентрации CO_2 позволяет рассчитать скорость разложения полимеров. Для этого используют функцию «НАКЛОН» в стандартном пакете Excel.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПОЧВАХ

Современный арсенал молекулярно-биологических методов позволяет существенно расширить область детектируемых в почвах микроорганизмов. Во многих случаях они являются единственным инструментом для учета трудно культивируемых или некультивируемых форм бактерий и архей. Здесь будут рассмотрены методические основы двух основных методов молекулярного анализа: прямой микроскопический метод и метод клонирования.

Учет численности микроорганизмов с использованием флуоресцентного микроскопа используется давно и имеет ряд преимуществ перед чашечным методом и методом предельных разведений. Он обеспечивает высокую степень точности и воспроизводимости получаемых данных. Учет общей численности микроорганизмов с использованием красителей акридинового оранжевого и калькофлуора белого уже обсуждался ранее в этом пособии. Необходимо отметить, что при использовании акридинового оранжевого не всегда удается отличить активно растущие клетки популяции, светящиеся красным цветом, от минеральных и органических частиц. Использование калькофлуора также имеет ограничения, так как данный флуорохром является специфичным для гликозидных связей, характерных не только для хитина, но и для целлюлозы. В последнее время чаще используют два других красителя – DTAF и DAPI. Первый связывается специфично только с ДНК и светится зеленым цветом, а второй может адсорбироваться и на органических частицах, но все же довольно специфичен для любой ДНК, и светится голубым цветом, что является удобным для исследования природных образцов.

Принцип прямого учета клеток с использованием метода гибридизации с флуоресцентно мечеными зондами имеет принципиальное отличие от простого окрашивания красителями нуклеиновых кислот. Принцип гибридизации заключается в подборе комплементарного определенному участку рибосомальной РНК олигонуклеотида, специфичного по последовательности нуклеотидов для данного таксона. То есть при использовании этого метода микробиолог получает в руки инструмент, позволяющий проводить исследование численности различных по таксономическому рангу групп микроорганизмов – от домена до вида. Данный метод не ограничивается использованием только в природных образцах. Он представляет собой исключительно удобный инструмент для скрининга популяций в накопительных культурах, анализе смешанных колоний на чашках, помогает при первичной идентификации микроорганизмов до уровня крупной таксономической группы. Особенно ценным является

использование метода гибридизации с флуоресцентно мечеными зондами для исследования биопленок, в которых представлены и особым образом упорядочены представители различных таксономических групп. Примерами могут быть биопленки на стеклах обрастания, на поверхности корней растений и имитационные (модельные) биопленки, получаемые на специальных подложках. Таким образом, метод FISH удобен для исследований популяционной экологии почвенных и водных организмов.

В настоящее время существует несколько модификаций этого метода: CARD-FISH, MAR-FISH и целый ряд других, призванных увеличить избирательность или величину сигнала флуоресценции, а также оценить на уровне единичных клеток параметры их физиологической активности.

Принципиально иной подход для оценки микробного разнообразия и филогенетического положения компонентов микробных сообществ почв предлагает метод клонирования. Его особенность – возможность оценки филогенетической структуры сообществ микроорганизмов минуя стадии выделения и традиционной идентификации.

Работа проводится с тотальной ДНК всех микроорганизмов, присутствующих в образце почвы. На основе анализа гена рРНК всех или большинства микроорганизмов проводят построение филогенетических деревьев и получают условно количественные данные о составе сообщества (рис. 1). Почему условно количественные? Потому что в процессе клонирования получают некоторое количество клонов (50-500), часть из которых относится к одной и той же филогенетической группе микроорганизмов, но к разным ее ветвям (порядкам, классам и т.д.). Учитывая, что прямой корреляции между вкладом той или иной группы в сообщество и количеством однотипных клонов нет, такие статистические данные следует признать условно достоверными. Тем не менее этот метод широко применяется для исследования всех природных образцов. В ходе работ по молекулярной диагностике микробных сообществ метод клонирования может иметь приоритетный характер, так как на основе библиотек клонов могут создаваться специфические для конкретных групп микроорганизмов олигонуклеотидные зонды. Преимуществом такого способа оценки филогенетического разнообразия микроорганизмов является возможность исследования таких форм, которые не могут быть изолированы в виде чистых культур. В силу целого ряда причин некоторые бактерии не вырастают на лабораторных средах при высеве их из природных образцов. Или их культивирование требует особых условий. Наличие ориентиров в виде уже имеющихся последовательностей гена рРНК помогает создать олигонуклеотидные зонды, используемые для прямого учета и выделения этих микроорганизмов из природных образцов и накопительных культур.

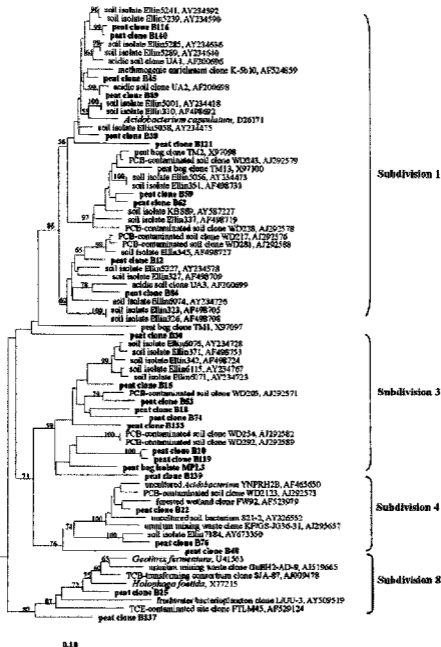


Рис. 1. Пример библиотеки клонов представителей бактерий филогенетической группы Acidobacteria

Клонирование может быть полезно и часто используется для характеристики потенциального функционального разнообразия микроорганизмов. Это достигается анализом последовательностей функциональных генов, кодирующих ферменты. Таким способом можно оценить наличие и характеристики геном нитратредуктазы, нитрогеназы, метилмонооксигеназы, различных глюкозидаз и т.д.

Метод гибридизации с флуоресцентно мечеными олигонуклеотидными зондами (FISH – fluorescent in situ hybridization)

Суть этого метода заключается в прямом микроскопическом учете целевых популяций конкретных групп микроорганизмов. Этот метод по форме напоминает метод сывороточной флуоресценции, однако обладает многократно большей специфичностью. Основой такой специфичности выступает стабильность гена 16S рРНК малой субъединицы рибосомы прокариот и 18S рРНК субъединицы рибосомы эукариот.

На этом участке есть консервативные последовательности нуклеотидов и последовательности, которые в ходе эволюции чаще других подвержены перестройкам. Поэтому, применяя сравнительный анализ последовательности гена рибосомальной РНК, можно построить филогенетическую систему для классификации прокариотных и эукариотных микроорганизмов.

Для того, чтобы идентифицировать в почвах или других средах микроорганизмы посредством метода FISH, нужно присоединить к рибосомальной рРНК комплементарный фрагмент, состоящий из определенной последовательности нуклеотидов (олигонуклеотид) и несущий на одном из концов молекулу флуорохрома. В качестве таких флуорохромоов могут выступать флуоресцеинизотиоцианат, Су3, Су5 и другие красители.

В процессе гибридизации олигонуклеотид прочно прикрепляется к комплементарному фрагменту рРНК клеток только одной, конкретной популяции, а оставшиеся, неприкрепившиеся молекулы олигонуклеотида, проникшие в клетки других групп микроорганизмов, вымываются из клеток специальной процедурой промывки. При просмотре препаратов в ультрафиолете флуорохромная часть молекулы олигонуклеотида начинает светиться. Используя световые фильтры можно подсчитывать клетки одной конкретной популяции бактерий или других микроорганизмов (грибов и архей).

Следует отметить необходимость внимательного выбора флуорохрома. Цвет флуорохрома должен быть контрастным по отношению к фону. Если частицы почвы светятся красным, то предпочтительно выбрать желтый, оранжевый или зеленый флуорохром.

Этап 1. Подготовка и фиксация образцов

Подготовке образцов следует уделить особое внимание. Большое количество минеральных частиц или фрагментов органики могут затруднять подсчет клеток из-за автофлуоресценции.

Ход работы

Навеску почвы или торфа заливают стерильной дистиллированной водой или соответствующим физиологическим раствором, а затем обрабатывают на гомогенизаторе в течение 5-20 мин в зависимости от содержания органической фракции (чем ее больше, тем дольше обработка). Из полученной суспензии отбирают от 500 до 2000 мкл образца, переносят в эппендорф и осаждают с использованием центрифуги при 8000 оборотов в течение 5-10 мин.

Вариант 1. Супернатант отбрасывают, а осадок ресуспендируют в 1,5 мл 4%-ного раствора параформальдегида в PBS буфере (NaCl – 8,0 г; KCl – 0,2 г; Na₂HPO₄ – 1,44 г; NaH₂PO₄ – 0,2 г; H₂O – 1 л; pH 7,0). Оставляют суспензию на 1,5 для фиксации. Периодически суспензию аккуратно перемешивают. После фиксации ее осаждают центрифугированием в течение 3 мин при 7000 об. Супернатант отбрасывают, а осадок заливают 1,5 мл PBS буфера, ресуспендируют и снова осаждают. Процедуру промывки повторяют дважды. Затем осадок заливают 50%-ным раствором этанола (100%-ный этанол: PBS буфер, 1:1), ресуспендируют и оставляют в морозильной камере при -20 °C.

Вариант 2. Супернатант отбрасывают, а осадок ресуспендируют в 50%-ном растворе этанола в фосфатном буфере (PBS). Оставляют в морозильной камере на -20 °C.

Этап 2. Гибридизация с флуоресцентно мечеными олигонуклеотидными зондами и счет клеток

Ход работы

От 1 до 5 мкл суспензии фиксированного образца наносят на предметные стекла для гибридизации с окошками, разделенными тефлоновым покрытием. Нанесенные на стекла, фиксированные препараты клеток или торфяных экстрактов обрабатывают раствором лизоцима (1 мг в 1 мл 0,05 M EDTA и 0,1 M TRIS HCl, 1:1, pH 8,0) для увеличения проницаемости клеточных стенок бактерий один час при 37 °C. После обработки лизоцимом препараты аккуратно промывают стерильной дистиллированной водой и подсушивают на воздухе. Полученные препараты выдерживают в течение 12-24 ч и затем обрабатывают стекла последовательно погружением в серии растворов этанола (50%, 80% и 100%, в каждом по 3 мин). Для гибридизации используют набор рРНК-специфичных олигонуклеотидных зондов, разработанных ранее для детекции представителей доменов Bacteria и Archaea, а также отдельных филогенетических групп в пределах

Bacteria (табл. 1). Синтез зондов, меченных флуоресцентным красителем СуЗ, осуществляется, в частности, компанией «Синтол» (Москва, Россия). Гибридизацию препаратов с флуоресцентно мечеными зондами проводят в соответствии с методикой Stahl и Amann (1995) при температуре 46 °С. Условия гибридизации, использованные для различных зондов, концентрация формамида в гибридизационном буфере и концентрация NaCl в буфере для промывки приведены в табл. 1. По завершении процедуры гибридизации, препараты докрашивают 1 мкМ раствором универсального, ДНК-специфичного флуоресцентного красителя – ДАФИ (DAPI) (4',6'-диамидино-2-фенилиндол) – в течение 5-7 мин, промывают дистиллированной водой и высушивают.

Препараты анализируют с использованием эпифлуоресцентного микроскопа Zeiss AxioPlan 2 (Йена, Германия) со светофильтрами Zeiss 20 для СуЗ-меченых зондов и Zeiss 02 для окраски ДАФИ. Численность целевых популяций микроорганизмов в образцах определяют путем учета количества гибридизованных с зондами клеток в 25-100 полях зрения микроскопа, с последующим расчетом численности соответствующих популяций на 1 г почвы.

Применяемые для гибридизации рРНК-специфичные олигонуклеотидные зонды

Зонд	Целевая группа организмов	Целевой участок 16S рРНК	Нуклеотидная последовательность зонда (5'-3')	Формамид, % ^a	NaCl, mM ^b
EUB338 I	Bacteria	338-355	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	20	225
EUB338 II	Bacteria (Planctomycetales)	338-355	GCA GCC ACC CGT AGG TGT		
EUB338 III	Bacteria (Verrucomicrobiales)	338-355	GCT GCC ACC CGT AGG TGT		
ARCH915	Archaea	915-934	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	30	112
ARC344		344-363	TCC CGC CTG CTG CAC CCC GT		
ALF1b	Alphaproteobacteria	19-35	CGT TCG YTC TGA GCC AG ^b	20	225
ALP968		968-986	GGT AAG GTT CTG CGC GTT		
BET42a	Betaproteobacteria	1027-1043 ^f	GCC TTC OCA CTT CGT TT	35	80
GAM42a	Gammaproteobacteria	1027-1043 ^f	GCC TTC OCA CAT CGT TT	35	80
SRB385Db	Deltaproteobacteria	385-402	CGG CGT TGC TGC GTC AGG	20	225
CF319a	Cyanophaga-Flavobacterium	319-336	TGG TCC GTG TCT CAG TAC	35	80
CFB560		560-575	WCC CTT TAA ACC CAR T	30	112
PLA46	Planctomycetes	46-63	GAC TTG CAT GCC TAA TCC	30	112
PLA886		886-906	GCC TTG CGA CCA TAC TCC C	30	112
HGC69a	Actinobacteria	1901-1918 ^f	TAT AGT TAC CAC CGC CGT ^a	25	159
LGC354A,	Firmicutes	354-371	TGG GAA GAT TCC CTA CTG C,	35	80
LGC354B,			CGG GAA GAT TCC CTA CTG C,		
LGC354C ^e			CCG GAA GAT TCC CTA CTG C		
HoAc1402	Acidobacteria	1402-1420	CTT TCG TGA TGT GAC GGG ^h	10	450
Ver138	Verrucomicrobia	138-155	CGA GCT ATT CCC CTC TTG	10	450
Ver1455		1455-1472	CCA TCC ATA CCT TCG GCA		

^a концентрация формамида в тибрилизационном буфере; ^b концентрация NaCl в буфере для промывки; ^c Y = C или T, W = A или T, R = A или G; ^d целевая молекула – 23S рРНК; ^e зонд используется с сочетанием с немеченым олигонуклеотидом 5' TATAGTTACGGCCCGCT-3'; ^f эквимольная смесь трех меченых олигонуклеотидов; ^g зонд используется в сочетании с немеченым олигонуклеотидом 5'-CTTTCGTGACGTGACGGG-3'.

Метод клонирования

(создание и анализ библиотеки клонов почвенных бактерий)

Данный метод основан на том, что тотальная ДНК, выделенная из почвенного образца, может быть амплифицирована с помощью специфических праймеров. Учитывая, что тотальная ДНК содержит набор генов рРНК от таксономически различных микроорганизмов, применяя универсальные праймеры, можно добиться амплификации этого гена из разных организмов. Последующая вставка ПЦР-продукта в геном *E. coli* позволяет провести выделение плазмиды и секвенирование последовательности гена рРНК такого количества клонов, которые необходимы для получения соответствующих данных.

Методика выделения тотальной ДНК из почвы

Работа с материалом для последующего анализа нуклеиновых кислот требует особой тщательности, осторожности и аккуратности. Все работы связанные с выделением ДНК, амплификацией и очисткой, необходимо проводить в резиновых перчатках, а работы, связанные с окрашиванием бромистым этидием – в нитриловых перчатках. Следует помнить, что все вещества, растворяющие или окрашивающие ДНК и РНК, являются ядами!

1. В микропробирку на 1,5 мл (лучше с закручивающейся пробкой), содержащую 1,5 г подготовленного песка (просеять на сите с размером отверстий 0,25 мм, затем просеять на сите с размером отверстий 0,1 мм; отобранную фракцию с размером частиц 0,10-0,25 мм отмыть дистиллированной водой, а затем концентрированной HCl; прокалить отмытый песок в муфельной печи при 650°C, 2 часа), поместить 300 мг почвы. Затем добавить по 225 мкл каждого из растворов:

- 100 mM NaH_2PO_4 (pH 8);
- 100 mM NaCl, 500 mM Трис-HCl (pH 8), 10 % (вес/объем) SDS;
- смесь хлороформ – изоамиловый спирт (24:1).

2. Микропробирку поместить в гомогенизатор (встряхиватель) на 2 мин при 3300 (2800) ударов/мин.

3. Центрифугировать микропробирку 10 сек. при 10000 g. Затем перенести супернатант в другую микропробирку на 1,5 мл.

4. Проколоть дно микропробирки с песком накаленной иглой. Вставить проколотую микропробирку в пустую микропробирку без крышки. Поместить обе микропробирки в пробирку на 15 мл для центрифуги, как показано на рис. 1.



Рис. 1.

5. Центрифугировать систему из пробирок 15 мин при 1400 g. Раствор, который стек при центрифугировании в нижнюю микропробирку, объединить с ранее отобраным (см. пункт 3).

6. Полученный раствор центрифугировать 10 мин при 12000 g. Затем отобрать супернатант в чистую микропробирку. Добавить равный объем смеси хлороформ – изоамиловый спирт (24:1), встряхивать до образования эмульсии, разделить эмульсию центрифугированием 1 мин при 12000 g. Отобрать супернатант в чистую микропробирку.

7. К полученному раствору добавить равный объем охлажденного на льду изопропанола, перемешать. Оставить на 30-60 мин (или на ночь) при -20°C .

8. Центрифугировать 10 мин при 12000 g. Удалить супернатант и оставить микропробирку в перевернутом положении на листе фильтровальной бумаги, чтобы стекла оставшаяся жидкость.

9. Промыть осадок 70%-ным этанолом: заполнить пробирку на 2/3, недолго встряхивать. Центрифугировать 10 мин при 12000 g. Очень осторожно слить супернатант, перевернуть микропробирку и высушить на фильтровальной бумаге.

10. Растворить осадок ДНК в 60 мкл буфера TE. Хорошо ополоснуть стенки. Хранить препарат при -20°C .

Примечание: для доочистки полученного препарата ДНК можно использовать гель-фильтрацию на сефадексе G-200 или G-150. За основу для вышеизложенной методики взята статья D. N. Miller, J. E. Bryant, E. L. Madsen and W. C. Ghiorse. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. Appl. Environ. Microbiol. 65:4715-4724.

Полученный образец тотальной ДНК используют в качестве матрицы при ПЦР-амплификации генов 16S рРНК представителей домена Bacteria или 18S для представителей домена Eukaryota. В реакции используют прямой праймер 9F в комбинации с универсальным для бактерий обратным праймером Univ1390R. ПЦР проводят на термоциклере, например PE

GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, США). Температурный профиль ПЦР-реакции должен быть следующим: денатурация 94 °С 2 мин – 1 цикл; 1 мин – 1 цикл, отжиг праймеров 55 °С 1 мин и элонгация 72°С 1,1 мин – 35 циклов; и 72 °С 7 мин – 1 цикл. Проверку продуктов ПЦР осуществляют путем их электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией продуктов реакции с помощью УФ-трансиллюминатора. В качестве маркера длины фрагментов ДНК используют 1 kb DNA Ladder (Promega).

Получение библиотеки клонов генов 16S рРНК бактерий

Клонирование полученных ампликонов генов 16S рРНК проводят с использованием набора для клонирования pGEM-T Easy vector (Promega) или подобных. Скрининг рекомбинантных клонов осуществляют BlueScreen методом, путем отбора клонов, образующих белые колонии на среде с X-галактозой (рис. 2). Дополнительную проверку отобранных клонов на наличие клонированного фрагмента определенной длины (около 1350 пар оснований) проводят путем прямой амплификации этих фрагментов-вставок с использованием вектор-специфичных праймеров (рис. 3).

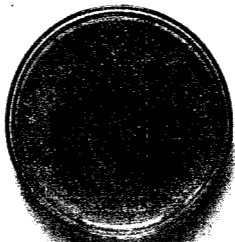


Рис. 2. Чашка Петри с клонами. Среда LB-агар с X-галактозой

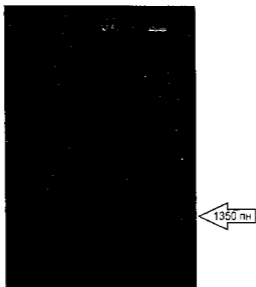


Рис. 3. Электрофорез ПЦР-продуктов в 1,5% агарозном геле

Выделение плазмидной ДНК, очистка, секвенирование

Полученные клоны выращивают в течение 24 часов на жидкой среде LB (NaCl – 10 мг/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, триптон – 5 г/л) для получения достаточного количества биомассы, клетки осаждают центрифугированием и выделяют из них плазмидную ДНК с использованием набора Wizard®Plus Minipreps DNA Purification System (Promega). Концентрацию ДНК в полученных препаратах определяют на спектрофотометре при длине волны 260 нм. Определение нуклеотидных последовательностей (около 1350 пар оснований) клонированных фрагментов генов 16S рРНК проводят с использованием праймеров M13F и M13R на секвенаторе.

Анализ полученных последовательностей 16S гена проводят с использованием программ BLAST, ARB, а также пользуются базой данных RDP.

РЕКОМЕНДУЕМЫЙ БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Нетрусов А.И., Бонч-Осмоловская В.М., Горленко В.М. Экология микроорганизмов. М.: Академия, 2004. 272 с.
2. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. М.: Изд-во МГУ, 2005. 446 с.
3. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во МГУ, 1989. 205 с.
4. Добровольский Г.В., Никитин Е.Г. Экологические функции почв. М.: Колос, 1986. 222 с.
5. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. М.: Изд-во МГУ, 1987. 243 с.
6. Штина Э.А., Голлербах М.М. Экология почвенных водорослей. М.: Наука, 1976. 194 с.
7. Гиляров М.С., Криволицкий Д.А. Жизнь в почве. М.: Молодая гвардия, 1985. 168 с.
8. Кожевин П.А. Микробные популяции в природе. М.: Изд-во МГУ, 1991. 180 с.
9. Сэги И. Методы почвенной микробиологии. М.: Колос, 1993. 270 с.
10. Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н., Лысак Л.В. Методы выделения и идентификации почвенных бактерий. М.: Изд-во МГУ, 1989. 68 с.
11. Альбертс Б., Брей Д. Молекулярная биология клетки. Т.1. М.: Мир, 1990. 223 с.
12. Treusch A., Schleper Ch. The microbial soil flora: novel approaches for accessing the phylogenetic and physiological diversity of prokaryotes. In "The Prokaryotes": 17.1. 2000.
13. Протоколы и методы молекулярной биологии //URL: <http://www.molbiol.ru>
14. Заварзин Г.А. Природоведческая микробиология. М.: Наука, 2004.
15. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. М.: Изд-во МГУ, 2004.