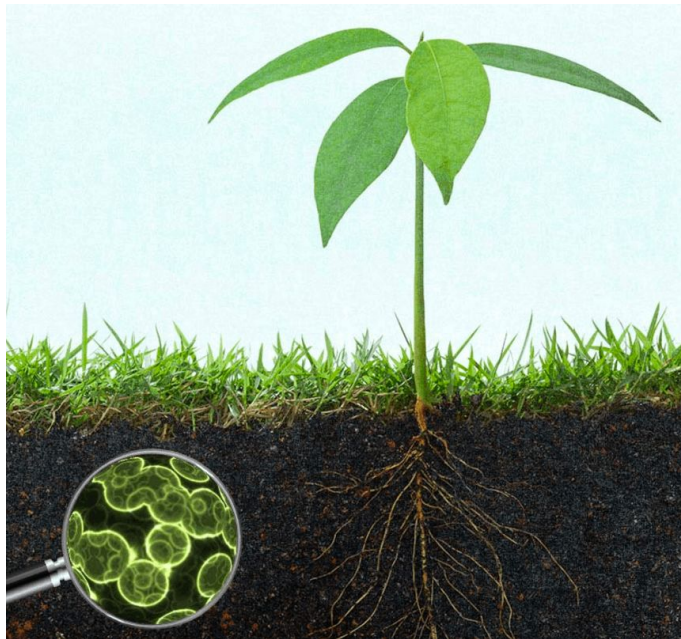


ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет»
Биолого-почвенный факультет

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОТЫ



Стрекаловская Елена
Иннокентьевна, к.б.
н., доцент кафедры
микробиологии

Иркутск, 2019

Метод прямого микроскопирования почвы по Виноградскому

- Среди методов количественного анализа наиболее объективным является метод прямого микроскопирования почвы, принцип которого был предложен С. Н. Виноградским.
- При этом способе готовят почвенную суспензию и в определенном объеме ее с помощью микроскопа подсчитывают общее число микроорганизмов. Последующим пересчетом можно установить, сколько микроорганизмов приходится на 1 г исследуемой почвы. С. Н. Виноградский готовил препараты на предметном стекле и просматривал их под оптическим микроскопом. В поле зрения можно было видеть палочковидные бактерии, мелкие и крупные кокки, иногда обрывки мицелия грибов и актиномицетов и другие микроорганизмы

- При окрашивании акридиновым оранжевым красный тон приобретают мертвые клетки, зеленый – живые. Для окраски мицелия и установления его длины при прямом микроскопировании пользуются диацетатом флуоресцеина. Иногда прямую микроскопию применяют для микробиологического анализа срезов почвы, помещенных в метилметакрилат, фильтратов почвенных суспензий (на фильтрах Зейца), окрашенных метиленовым синим или другими красителями.



Метод обрастания стекол по Холодному

- На ровной поверхности почвы делают ножом разрез, глубина которого зависит от исследуемого горизонта. Отмытые и обезжиренные стекла плотно прижимают к вертикальной стенке разреза и засыпают почвой. В пахотном слое стекла помещают на 3 - 5 см ниже поверхности. Сверху разрез засыпают почвой и место, где заложены стекла, отмечают этикеткой. Стекла выдерживают в почве в зависимости от задачи исследования от недели до нескольких месяцев.
- После истечения времени экспозиции убирают почву с тыльной стороны стекол, "откидывают" их от стенки и вынимают. Тыльную сторону вытирают сухой тряпкой, а опытную поверхность стекол высушивают на воздухе и фиксируют. После фиксации стекло погружают в воду опытной поверхностью вниз, не доводя его до дна. При этом крупные частицы почвы, отмокая, падают на дно, а фиксированные микроорганизмы и мелкие частицы остаются на стекле. После промывки препарат погружают в раствор карболового эритрозина на срок от 30 мин до 24 ч.
- Окрашенные препараты исследуют под микроскопом с иммерсионной системой. При микроскопировании отмечают характер микрофлоры, плотность обрастания стекол и доминирующие формы. Отдельные ассоциации микроорганизмов можно запечатлеть, используя микрофотосъемку.

Метод капилляров по Перфильеву и Габе

- Для изучения группового состава микроорганизмов почв ими сконструирован капиллярный прибор - педоскоп, который может быть использован и для работы с грунтами. Педоскоп представляет собой набор капиллярных ячеек с 5-6 прямоугольными каналами. Ячейки закладывают в пазы широкого стеклянного держателя и заполняют полужидкой агаризованной средой, содержащей в качестве органического субстрата гумусовые вещества (фульвокислоты). Это создает для микроорганизмов условия, близкие к почвенным. Педоскоп выдерживают в почве 1,5-2 месяца, затем просматривают его под микроскопом. С помощью этого метода удастся выявить характерные для почвы микробные ассоциации.
- Подсчитав число микроорганизмов в капилляре, можно затем сделать пересчет на 1 г почвы.

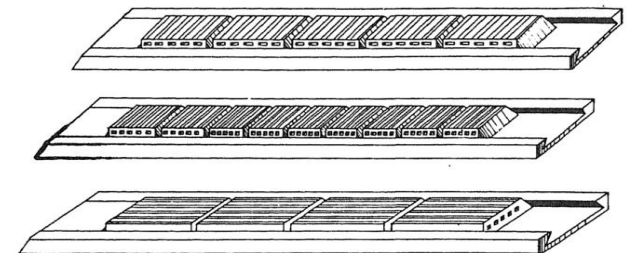


Рис. 53. Педоскоп с различными типами капиллярных ячеек (по Б. В. Перфильеву и Д. Р. Габе).

Метод люминесцентно-микроскопического наблюдения микроорганизмов в почвенных монолитах по Звягинцеву

- Приготавливают цилиндрическую формочку размером 1x1 см из нержавеющей стали, пластмассы или стекла, имеющую острые края. Вдавливают формочку в почву исследуемого горизонта и осторожно вынимают ее так, чтобы над краями формочки возвышался слой почвы. Острой бритвой срезают почву, чтобы верхняя грань монолита была на уровне краев формочки. На поверхность почвы капают раствор акридина оранжевого и накрывают ее очень тонким покровным стеклом (0,10-0,12 мм). Через 10-20 мин исследуют в люминесцентном микроскопе с иммерсионным объективом (90X) в отраженном свете. Основные трудности метода заключаются в подборе подходящей концентрации красителя; для каждой почвы она подбирается опытным путем.

Электронно-микроскопические исследования почвенных микроорганизмов

- Д. И. Никитин и его сотрудники использовали для прямого подсчета микроорганизмов почвы электронный микроскоп. С его помощью наряду с обычными микроорганизмами можно обнаружить множество мельчайших форм микроскопических существ, которые не были известны до сих пор.
- Подготовка препаратов для электронной микроскопии: Подложка препаратов для микроскопов просвечивающего типа должна быть очень тонкой (10-15 мкм) и проницаемой для электронов. Такие пленки изготавливают из коллодия, формвара, угля и кварца и помещают на металлические сетки. Диаметр предметных сеток равен 2-3 мм. На пленки наносят суспензию микроорганизмов и после испарения воды препарат просматривают. Часто препарат подвергают дополнительной обработке - оттенению металлом (золотом, платиной, палладием, хромом или ураном). Напыление металлом производят под вакуумом. Такая дополнительная обработка повышает контрастность изображения. При микроскопировании почвенной суспензии ее очищают от растворимых веществ путем диализа.

Методы изучения биологической активности почв

- Биологическую активность почв определяют с помощью микробиологических и биохимических методов.
- К микробиологическим методам относят прямые методы, позволяющие определять численность микроорганизмов разных систематических групп, а также аппликационные методы, по сути, являющиеся косвенными методами оценки микробиологической активности почв.
- В группу биохимических методов определения биологической активности почв включают методы по определению ферментативной активности и методы определения дыхания почв.

Аппликационные методы

- Среди этой группы методов определения микробиологических свойств почв выделяют методы, позволяющие анализировать ее в лабораторных условиях (лабораторные методы) и в естественном состоянии (полевые методы).
- **Определение целлюлолитической активности почв (полевой метод)**
- Принцип метода: Данный метод основан на определении интенсивности разложения куска ткани (лен), помещенного в почву на определенный промежуток времени. Количество ткани, разложившееся за время опыта, используется как показатель целлюлолитической активности почвы.
- Ход анализа: Для анализа следует взять кусочек льняной неотбеленной ткани размером 30x50 мм, высушить его при 105 °С, выдержать 2 часа при комнатной температуре и взвесить на аналитических весах. Ткань поместить в пакет из инертного материала (нейлон) с отверстиями около 1 мм. При изучении лесной подстилки пакет поместить горизонтально на ее поверхности и покрыть слоем той же подстилки. При изучении почвы пакет с тканью уложить в слой 0-5 см под углом 15° с помощью штыковой лопаты.

- После завершения опыта пакет с тканью извлечь из почвы, осторожно очистить от проросших корешков. Ткань высушить при 105°C и выдержать 2 часа при комнатной температуре. После этого ткань взвесить. Потеря в массе (в %) служит показателем микробиологической активности почвы.
- Срок проведения эксперимента может варьировать в зависимости от цели исследования. При изучении естественных экосистем образец ткани закладывается в сентябре-октябре и извлекается через год (два, три). В агроэкосистемах несколько образцов одновременно закладываются сразу после весенних обработок почвы и последовательно извлекаются с интервалом в один, два или три месяца. Повторность опыта 3-5-кратная.
- Для агроэкосистем Д.С. Звягинцевым предложена следующая шкала интенсивности разрушения клетчатки – целлюлолитической активности в полевых условиях (ЦАП), в % за вегетационный сезон: очень слабая <10; слабая – 10-30; средняя – 30-50; сильная – 50-80; очень сильная >80.

Определение активности разложения целлюлозы (лабораторный метод)

- Принцип метода: В лабораторных условиях активность разложения целлюлозы в почве определяют модифицированным методом Кристенсена. Метод основан на учете интенсивности разложения целлюлозы (фильтровальная бумага) в чашках Петри при оптимальных для развития микроорганизмов температуре и влажности. По разнице в массе (в %) фильтровальной бумаги до и после инкубации образца судят об интенсивности целлюлолитической активности почвы в лабораторных условиях (ЦАЛ).

- **Ход работы:** Опыт ставится в пятикратной повторности. На дно стерильной чашки Петри поместить предварительно взвешенный на аналитических весах с погрешностью 0,001 г стерильный диск фильтровальной бумаги (выдержанный в сушильном шкафу при 1050 С в течение 2 часов) диаметром 7 см. Бумажный фильтр прикрыть сеткой из капроновой ткани, на которую поместить 25-40 г почвы, увлажненной до 60% от полной влагоемкости. Чашки взвесить, поместить в термостат и инкубировать при температуре 27° С. Ежедневно чашки следует взвешивать и доводить до исходной массы водой, равномерно распределяя ее по поверхности чашки. Через 10, 20 и 30 дней провести наблюдения за развитием целлюлозоразлагающих бактерий на фильтровальной бумаге со дна чашки.
- Учет разложившейся целлюлозы провести спустя 30 дней.

- Для этого почву высыпать из чашки, отделить капроновую ткань, остатки фильтровальной бумаги счистить со дна чашки, высушить при температуре 105°C и взвесить. Оценить степень разложения целлюлозы по разности между исходным и конечным весом фильтровальной бумаги, выраженным в мг на чашку или в % от исходной массы.



Методы определения дыхания почвы

- Почвенный воздух имеет большое значение для почвенных процессов и роста растений. Он участвует в химических и биохимических процессах, протекающих в почве, оказывает влияние на окислительно– восстановительные условия в почве, ее реакцию и растворимость химических компонентов. Почвенный воздух важен для углеродного питания растений (более половины углекислого газа, идущего на формирование урожая сельскохозяйственных культур, потребляется растениями из почвы). Его состава изменяется во времени и по профилю почвы, зависит от внесения органических и минеральных удобрений, вида растений, биологической деятельности почвы, гидротермических условий и т. д.
- Решающая роль в продуцировании принадлежит биологическим факторам. Газовый режим почвы складывается из следующих показателей: содержание воздуха в почве, его состава, аэрации и интенсивности выделения газов. Определения проводят каждые 15 дней или приурочивают к фазам развития растений. Одновременно ведут наблюдения за давлением и температурой воздуха и почвы.

Все методы определения дыхания почвы можно разделить на 3 группы:

1. Методы обогащения CO_2 в изолирующем устройстве (колоколе): определяются начальная и конечная концентрация углекислого газа в воздухе изолятора, установленного на поверхности почвы.
2. Методы проветривания: ток воздуха протягивается через изолятор (колокол, цилиндр), поставленный на поверхность почвы и углекислый газ непрерывно поглощается.
3. Методы адсорбции: под изолятор над почвой помещается сосуд со щелочью, которая непрерывно адсорбируется углекислым газом.

- Упрощенные методы определения интенсивности дыхания почвы основаны на учете количественных изменений углекислого газа в окружающем воздухе с помощью широкогорлых конических колб. Метод «колб» имеет недостаток, т.к. дыхание почвы происходит в замкнутом пространстве, внутри колбы уменьшается парциальное давление кислорода и нарушается газообмен. А.Ш. Галстян предложил для устранения этого недостатка соединить колбу, где происходит дыхание почвы, с наружным воздухом с помощью трубки с натроновой известью.
- **Ход анализа.** 10 г свежей почвы в марлевом мешочке подвешивают за крючок в пробке (при анализе влажной почвы используют металлические корзинки). В плоскодонную колбу на 250 см^3 наливают 25 мл 0,025 М раствора гидрата окси бария. Колбу закрывают пробкой с мешочком и помещают в термостат с температурой 280-300°C на 24 часа. Одновременно с опытными колбами ставят контрольные с гидратом окиси бария, но без почвы для учета углекислого газа воздуха в колбе.

- Колбы периодически встряхивают для разрушения образовавшейся пленки карбоната бария. После экспозиции избыток гидрата окиси бария оттитровывают 0,05 М раствором HCl по фенолфталеину. По разнице между данными титрования контрольной и опытной почвы определяют количество выделившегося углекислого газа. Интенсивность продуцирования выражают в миллиграммах углекислого газа, выделившегося за сутки на 100 г почвы. Адсорбционный метод определения углекислого газа, выделившегося из почвы, позволяет вести наблюдения непосредственно в поле сразу на нескольких вариантах опыта. Эти методы были предложены Штатновым, Миной и Карпачевским. Недостаток применяющихся вариантов метода Штатнова и Миной в том, что они не учитывают двух факторов, влияющих на результат определения. При отсутствии перемешивания жидкости в поглотителе сорбция CO₂ щелочью быстро затухает.

- Поглощение CO_2 зависит от площади поглотителя, т.к. расчет в адсорбционном методе Штатнова ведется на изолированную площадь, но чем меньше площадь поглотителя, тем меньше получается интенсивность выделения углекислого газа.
- В.Н. Мина рекомендовал брать поглотитель с площадью близкой изолированной поверхности почвы. Однако расчет выделения CO_2 из почвы показал, что поглощение зависит не от площади изоляции, а только от площади поглотителя.
- Л.О. Карпачевский предложил использовать только площадь поглотителя и определение проводить непосредственно в поле.

Определение потенциальной активности азотфиксации

- Отвешивают на весах 4 навески по 5 г почвы, освобожденной от корней и просеянной через сито в 1 мм. Навески помещают во флакон из пенициллина, прибавляют по 2% глюкозы (от массы сухой почвы) и увлажняют стерильной водой до влажности 60% полной влагоемкости. Почву перемешивают стеклянной палочкой до однородной массы, закрывают флакон ватной пробкой и помещают в термостат с температурой 28°C. Через сутки инкубации в термостате закрывают флаконы резиновыми пробками и вводят в 3 флакона по 0,5 мл ацетилен (один флакон остается контрольным), после чего вновь помещают их в термостат на 1 ч. Через час из каждого флакона отбирают газовую пробу – 0,5 мл и вводят ее в газовый хроматограф медицинским шприцем. Колонка газового хроматографа обеспечивает разделение газов метана, пропана, этилена, ацетилен.

- Расчет величины активности азотфиксации проводят исходя из того, что соотношение между количеством образованного этилена и соответствующим количеством азота составляет 3:1, т.е. результат, полученный для этилена, делят на 3 и получают величину активности фиксации азота.
- После окончания измерений резиновые пробки вновь заменяют на ватные, флаконы ставят в термостат на сутки. Определение повторяют до тех пор, пока в двух параллельных пробах количество этилена не будет отличаться более чем на 5%.
- Потенциальную активность азотфиксации выражают в миллиграммах фиксированного азота на килограмм почвы за один час (мг/кг/ч).

Благодарю за внимание

