Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова»
Кафедра земледелие, мелиорация и агрохимия

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

к лабораторным занятиям

по дисциплине

«МИКРООРГАНИЗМЫ И ПЛОДОРОДИЕ ПОЧВ»

для студентов

направление подготовки 35.03.04 «Агрономия»

Саратов 2016

Введение

Почвенные микроорганизмы принимали деятельное участие в трансформации внесенных в почву минеральных и органических удобрений, разложении пожнивно-корневых остатков и соломы, а также в превращении органического вещества самой почвы - гумуса.

Путем биологической фиксации азота атмосферы микроорганизмы вносят определенный вклад в решение проблемы азотного баланса в земледелии. Кроме того, значительная доля азота поступает в почву в результате симбиотической азотфиксации при участии клубеньковых бактерий.

Микроорганизмы и выделяемые ими ферменты играют ведущую роль в разрушении различных пестицидов, вносимых в почву.

Из этого неполного перечня становится очевидной та огромная роль, которую играют почвенные микроорганизмы в земледелии. Поэтому изучение и знание их видового состава, численности, условий для активной жизнедеятельности позволяют специалистам сельского хозяйства принимать правильные, научно обоснованные решения при размещении культур в севообороте, выборе способов обработки почвы, составлении системы удобрений, осуществлении различных мелиоративных мероприятий и выборе технологий возделывания отдельных сельскохозяйственных культур.

В настоящем методическом указании приводятся наиболее распространенные и хорошо апробированные методы определения численности микроорганизмов, их активности и видового состава. Показаны также способы определения некоторых почвенных ферментов, которые играют важную роль в почвообразовательном процессе. По этим методикам возможно определение микроорганизмов и ферментов, как на лабораторных занятиях, так и в полевых условиях.

Здесь же помещены некоторые материалы, предназначенные для самостоятельного изучения студентами в целях повышения их общеобразовательного кругозора.

1. Техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории

1. Не входить в лабораторию в пальто, головном уборе, не вносить посторонние вещи.
2. Приступать к лабораторным занятиям только после разрешения преподавателя или дежурного лаборанта.
3. Строго соблюдать правила обращения с химическими реактивами и красителями. Работу с ними производить только в резиновых перчатках и фартуках.
4. С большой осторожностью пользоваться смесью спирта с эфиром. Не переносить ее на столы с горелками и не оставлять вблизи открытого огня или рядом с нагревательными приборами.
5. Некоторые микроорганизмы, особенно споры грибов, могут вызвать аллергические реакции, поэтому нельзя допускать их распыления: не оставлять открытыми чашки Петри, пробирки, колбы с культурами микроорганизмов.
6. Перед тем как набирать ртом с помощью пипетки суспензии микроорганизмов или реактивы, убедиться в том, что пипетка закрыта с тупого конца ватой.
7. В лаборатории поддерживать порядок и чистоту. По окончании занятий тщательно вымыть лабораторную посуду. Протереть и зачехлить используемые приборы полиэтиленовым чехлом, привести в порядок рабочее место, вымыть руки с мылом.
8. Помнить о том, что студенты несут ответственность за используемые ими микроскопы, другое лабораторное оборудование и чистоту рабочего места.
9. Перед уходом из лаборатории дежурному проверять, выключены ли газ, вода, электроприборы.

2. Питательные среды. Приготовление и стерилизация.

Одной из основных задач микробиологии является выявление численности микроорганизмов **(КОЕ** — колониеобразующих единиц) в том или ином субстрате. Однако универсальной среды, на которой бы выявлялись все существующие в данном субстрате микроорганизмы, нет. Немецкий ученый *Р. Кох* предложил относительно универсальную среду на основе мясного бульона, на которой хорошо развиваются микроорганизмы, использующие органические азотсодержащие соединения.

Позднее С. *Н. Виноградским* в практику микробиологии были введены ***элективные,*** или ***избирательные,*** среды, предназначенные для определенных групп микроорганизмов. Они составлены в расчете на предельно строгие условия, при которых должен развиваться только избранный микроорганизм и никакой другой. Основной принцип элективных сред — учет избирательных потребностей микроорганизма в специфических условиях развития. Зная физиологические особенности соответствующей группы микроорганизмов, можно подобрать не только химический состав среды, но и такие условия культивирования (активную кислотность среды, условия аэрации, температуру и др.), при которых создается лабораторная имитация экологической ниши естественных условий обитания. Элективные среды позволяют осуществлять биологические процессы в лаборатории и на производстве без предварительной стерилизации среды. Примером элективных сред могут служить среды для выделения азотфиксаторов, нитрификаторов. Эти среды применяют главным образом для выделения микроорганизмов из мест их природного обитания и получения их накопительных культур.

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

Оптимальные среды предложил *А. А. Имшенецкий* для целлюлозоразрушающих микроорганизмов, *В. С. Буткевич* - для продуцента лимон-

ной кислоты *Aspergillus niger*. Основной принцип оптимальных сред заключается в создании наиболее благоприятных условий для избранных микроорганизмов внесением в среду различных стимулирующих рост добавок (витаминов, ростовых веществ, микроэлементов).

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

Естественными обычно называют среды, которые состоят из продуктов животного или растительного происхождения, имеющих сложный неопределенный химический состав. Это — различные части растений, животные ткани, солод, дрожжи, навоз, почва, вода морей, озер и минеральных источников. На естественных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, так как в них есть все компоненты, необходимые для роста. Однако среды с неопределенным составом малопригодны для изучения физиологии обмена веществ микроорганизмов. Естественные среды используют главным образом для поддержания культур микроорганизмов, накопления их биомассы и диагностических целей.

Синтетические — это такие среды, в состав которых входят в точно указанных концентрациях только известные химически чистые соединения. Синтетические среды бывают простыми и достаточно сложными по составу. Их широко используют для исследований, связанных с изучением обмена веществ микроорганизмов.

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

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

Агар — это растительный коллоид, получаемый из некоторых морских водорослей. В его состав входят главным образом полисахариды, а также ничтожное количество азотистых веществ.

Желатина — кислый азотсодержащий продукт, добываемый при выварке костей, хрящей, сухожилий, чешуи рыб. Температура плавления желатины (22 — 25° С) ниже температуры инкубации большинства микроорганизмов (30 — 37° С).

Плотными питательными средами служат также *гелееые пластины,* введенные в микробиологическую практику С. Н. Виноградским.

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

Приготовление питательных сред

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

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

Мясо-пептонный агар (МПА). К 1 л МПБ добавляют 15-20 г агара. Среду нагревают до растворения агара (температура его плавления — 100°С, затвердевания — 40° С, устанавливают слабощелочную реакцию среды 20%-ным раствором Na_2CO3 и через воронку разливают в пробирки (прибли-

зительно по 10 мл агара столбиком для последующего разлива по чашкам Петри и по 5 мл для получения скошенного агара - косяков).

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

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

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

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

Методы стерилизации

Стерилизация, или обеспложивание (от лат. *sterilis* — бесплодный), — это полное уничтожение клеток микроорганизмов в питательных средах, посуде и пр. Известно несколько методов стерилизации. Чаще всего применяют стерилизацию нагреванием.

Фламбироеание, или прокаливание. Прокаливать можно непосредствен-

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

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

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

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

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

Обработку насыщенным паром проводят в герметически закрывающемся толстостенном котле — **автоклаве.** На массивной крышке или сбоку котла находятся кран для выхода пара, манометр и предохранительный клапан. Манометр показывает, на сколько давление пара внутри котла выше нормального. Для предотвращения взрыва при превышении предельного давления срабатывает предохранительный клапан, давая выход пару.

Показателю манометра в физических атмосферах соответствует определенная температура.

Давление, атм	*Темпере*
0,5	115
1,0	120

1,5	127
2,0	133

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

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

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

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

Материалы и оборудование

МПБ, агар, лакмус красный, бромтимолблау, фарфоровые пластинки с лунками или чашки, стеклянные палочки, 20%-ный раствор №2СОз, пробирки в штативах (для разливки агара), воронки, вата, чашки Петри, пипетки Мора на 1 мл, бумага для обертывания чашек и пипеток, колбы емкостью 250

мл, суровые нитки.

3. Обнаружение и количественный учет микроорганизмов в почвах

3.1. Микроорганизмы - аммонификаторы

Вводные пояснения. *Аммонификация* — это превращение органических форм азота в аммиачный азот. Ее вызывают различные микроорганизмы (бактерии, актиномицеты и грибы). Микроорганизмы, осуществляющие аммонификацию белковых веществ, выделяют в окружающую среду протеолитические ферменты (протеазы и пептидазы), под действием которых белки гидролизуются до аминокислот. В свою очередь, аминокислоты, поступая в клетку, дезаминируются с образованием аммиака (NH3), органических кислот и других продуктов. В белках C:N = 3,5 : 1. При разложении белков в анаэробных условиях выделяются также H_2S, меркаптаны, скатол и индол, имеющие неприятный запах. В аэробных условиях конечными продуктами являются NH_3, CO2, H_2O, сульфаты.

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

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

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

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

Чаще других на препарате встречаются подвижные клетки *Proteus vulgaris* (от греч. *Proteys* — в древнегреческой мифологии морское божество, способное менять свой облик; от лат. *vulgarts*— обыкновенный, простой) преобладающие на первых стадиях распада белков. Это неспорообразующие, неодинаковой длины палочки. Кроме того, на препарате много спорообразующих клеток *Bacillus mycoides* и *Clostridium* putrificus).

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

Качественные реакции на продукты гнилостного распада белка. Выделяющийся в атмосферу NH3 окрашивает подвешенную полоску красной лакмусовой бумаги в синий цвет.

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

Сероводород обнаруживают с помощью подвешенной полоски фильтровальной бумаги, смоченной ацетатом свинца [РЬ(СНзСОО)2]. Бумага чернеет под действием сероводорода. Если она покрывается серебристым налетом, значит, наряду с H_2S выделяются еще и меркаптаны (например, метилмеркаптан CH_3SH).

Для выявления **индола** пользуются реакцией Сальковского: к 10 мл субстрата добавляют 1 мл 0,2%-ного раствора KNO2 и несколько капель концентрированной серной кислоты. При взаимодействии этих веществ с ин-

долом получается красно-фиолетовое окрашивание.

Материалы и оборудование

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

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

Реактив Несслера готовят следующим образом: 20 г KI растворяют в 50 мл воды и *к* раствору добавляют до насыщения (около 32 г) небольшими порциями Hgl_2. После этого приливают 460 мл воды и вносят 134 г **КОН.** Отстоявшуюся жидкость сливают в темную склянку.

3.1.2. Аммонификация мочевины

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

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

$$CO(NH_2)_2 + 2H_2O = 2NH_3 + CO_2 + H2O$$

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

Для наблюдения за процессом аммонификации мочевины можно использовать питательную среду следующего состава (г/л дистиллированной воды): тартрат К или Na (виннокислые, можно соли яблочной кислоты) — 5,0; мочевина — 50,0; K_2HP0_4 — 0,5; $MgSO_4^x$ $7H_2O$ — 0,2.

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

Через 3 — 5сут культуру подвергают анализу. Устанавливают выделе-

ние аммиака по посинению красной лакмусовой бумажки, а накопление его — капельной реакцией с реактивом Несслера. К капле культуральной жидкости на фарфоровой пластинке добавляют каплю этого реактива. Образуется буроватый осадок.

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

Материалы и оборудование

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

3.2. Микроорганизмы - нитрификаторы

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

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

3.2.1. Выявление нитрифицирующих бактерий на плотных средах

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

Промытые и прокипяченные пластины кремнекислого геля (в чашках Петри) пропитывают 3 — 5 мл среды Виноградского. Минеральная основа среды имеет следующий состав (г/200 мл дистиллированной воды): $(NH4)_2SO4$ - 2,0; K_2HPO4— 1,0; MgSO4 — 0,5; NaCl — 0,4; $FeSO4x7H_20$ - -

0,4; $MgCO_3$ или CaCOз — 5,0. Источник азота (NHz^SC^ — 2 г. Лучшие результаты получают при замене (NH4))SO4 на фосфорно-аммонийно-магниевую соль — NH_4MgPO4 x MgCCb; кроме того, важно растереть $CaCO_3$ перед приготовлением среды пестиком в стерильной ступке.

Питательную среду в чашках упаривают при 40 — 50°С до образования белой блестящей эмалевой поверхности, возникающей за счет равномерного распределения слоя MgCC>3 или CaCOз- Слой любого из этих веществ служит индикатором процесса нитрификации, так как в тех местах на геле, где развиваются нитрифицирующие бактерии, появляются зоны растворения карбонатов, в которых эти микроорганизмы и обнаруживаются.

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

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

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

Степень обрастания комочков почвы определяют следующим образом. Общее число комочков почвы, разложенных на чашке, принимают за 100%. Затем подсчитывают число комочков почвы, давших зоны растворения мела, и устанавливают, какой процент они составляют от общего числа комочков почвы. Полученная величина не дает представления об абсолютном количестве нитрифицирующих бактерий в почве. Однако если со-

поставить степени обрастания ими комочков разных почв, то этот показатель позволит судить о том, в какой почве содержится больше нитрифицирующих бактерий.

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

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

Для знакомства с возбудителями первой фазы нитрификации из зон растворения мела берут иглой немного материала и готовят окрашенный препарат. При его микроскопировании можно обнаружить овальные клетки, похожие на ноль, — *Nitrosomonas* и *Nitrosospira*. Первые встречаются в старопахотных почвах, вторые — в целинных.

Вторая *фаза* нитрификации. Бактерии, вызывающие вторую фазу нитрификации (аммиак —» нитриты), можно наблюдать на чашках с культурой первой фазы при более длительном их выдерживании в термостате. После исчезновения аммиака образовавшийся нитрит может окисляться до нитрата. В этом легко убедиться по исчезновению в среде нитрита и появлению нитрата. Для этого вырезают чистым ланцетом два кусочка геля, помещают их в фарфоровые лунки и об исчезновении нитрита судят по отрицатель-

ной реакции с реактивом Грисса или цинк- иод-крахмалом в кислой среде. С другим кусочком геля проводят пробу на нитрат с дифениламином в растворе концентрированной серной кислоты. В присутствии азотной кислоты гель приобретает темно-синий цвет (реакцию на нитрат с дифениламином делают только в отсутствие нитрита).

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

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

Материалы и оборудование

Гелевые пластины, пропитанные соответствующей питательной средой, свежая почва,, часовые стекла, палочки с оттянутым концом и трафарет, необходимые жидкие среды, колбы Эрленмейера, почва, алюминиевые ложки, реактив Несслера и цинк-иод-крахмал, 20%-ный раствор H2SO4 (или реактив Грисса). Микроскопы и все необходимое для приготовления препаратов и микроскопирования, фарфоровые пластинки с лунками, дифениламин, растворенный в концентрированной серной кислоте.

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

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

3.3. Методы измерения интенсивности «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 состав изменяется во времени и по профилю почвы, зависит от внесения органических и минеральных удобрений, вида растений, биологической деятельности почвы, гидротермических условий и т. д.

В результате биологических процессов в почве поглощается кислород и выделяется углекислый газ, который идет на образование безазотистых органических веществ — углеводов:

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O + 674\ \text{ккал} \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2$$

Выделение углекислого газа из почвы в атмосферу в процессе диффузии зависит от продуцирования CO_2 почвой, ее физических и химических свойств, гидротермических условий. Решающая роль в продуцировании углекислого газа почвой принадлежит биологическим факторам, поэтому выделение CO_2 из почвы может характеризовать интенсивность биологических процессов в ней.

Газовый режим почвы складывается из следующих показателей: содержания воздуха в почве, его состава, аэрации и интенсивности выделения газов (CO_2, N_2O, NO_2, NH_3). 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 и др.): определяются начальная и конечная концентрации CO_2 в воздухе изолятора, установленного на поверхности почвы (Макаров, 1957).

2. Методы проветривания: ток воздуха протягивается через изоля-

тор (колокол, цилиндр), поставленный на поверхность почвы, и углекислый газ непрерывно поглощается.

3. Методы абсорбции: под изолятор над почвой помещается сосуд со щелочью, которая непрерывно адсорбирует CO_2 (Штатнов, 1952).

Упрощенные методы определения интенсивности дыхания ночвы основаны на учете количественных изменений углекислого газа в окружающем воздухе с помощью широкогорлых конических колб (Маштаков и др., 1954; Макаров и др., 1957).

3.3.1. Определение интенсивности выделения углекислого газа из почвы (метод А.Ш. Галстяна)

Метод основан на определении интенсивности дыхания почвы по учету количественных изменений углекислого газа в атмосфере почвы с помощью широкогорлых конических колб.

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 $см^3$ 0,025 М раствора гидрата окиси бария. Колбу закрывают пробкой с мешочком и помещают в термостат при температуре 28 — 30°С на 24 ч.

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 HCI 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. Реактивы

1. 0,05 М раствор $Ba(OH)_2$ 8НзО: 15,8 г гидрата окиси бария растворяют в 1 $дм^3$ дистиллированной воды.

2. 0,05 М HC1: 4,1 $см^3$ HC1 (Д = 1,19) растворяют в 1 дм' дистиллированной воды.

3. Фенолфталеин — 1% спиртовый раствор.

3.3.2. Определение содержания выделившегося по Л.О. Карпачевскому

Этот метод позволяет определить углекислый газ, выделившийся из почвы непосредственно в полевых условиях.

Ход анализа

Стеклянные стаканчики на 50 см диаметром 4 — 6 см (измерить микрометром для последующего расчета площади поверхности жидкости). Приливают пипеткой 2 $см^3$ 0,1 М раствора КОН. Стаканчики ставят на поверхность почвы опытного участка, секундомером отмечают время начала опыта.

Через 20 мин раствор в стаканчиках оттитровывают из микробюретки 0,05 М H_2SO_4 по фенолфталеину.

Расчет углекислого газа (в кг/га) производят по формуле

$$CO\text{-}\frac{Га —6) - М - 0{,}22 - 0^8 - 60}{С \cdot 10^3 \cdot 20}$$

где а — количество H2SO4, пошедшее на титрование контроля (2 $см^3$ щелочи), $см^3$; б — количество кислоты, пошедшее на титрование опытного образца, $см^3$; М — молярность кислоты; С — площадь поглотителя, $см^3$; 0,22 — количество СО, эквивалентное 1 см 0,01 М кислоты; 20 — время экспозиции, мин; 60 — для пересчета на 1 час; 10 — множитель для пересчета площади на 1 га; 10^3 — множитель для пересчета в кг.

Реактивы

1. 0,1 М КОН: 5,6 г едкого калия растворяют в дистиллированной воде, доливают до 1 дм .

2. 0,1 H2SO4. 2,8 см H2SO4 (d 1,84) вливают в 500 см дистиллированной воды, доливают до 1 $дм^3$, перемешивают.

3. 1% раствор фенолфталеина в спирте.

3.4. Аппликационные методы

Аппликационные методы разработаны и рекомендованы для определения биологической активности почв в зависимости от применения минераль-

ных и органических удобрений, известкования, способов обработки почвы, севооборотов и других факторов.

В почву с растительными остатками поступает значительное количество целлюлозы, и почвенные микроорганизмы (грибы) расщепляют ее.

3.4.1. Определение интенсивности разложения целлюлозы

Ход анализа

Стерильную неотбеленную тонкую льняную ткань пришивают к полимерной пленке (ширина отрезка пленки 10 см). Длина зависит от исследуемого горизонта: для пахотного — 20 — 25 см. Пленку стерилизуют спиртом, а ткань проглаживают утюгом. К вертикальной стенке свежего почвенного разреза на глубину 25 — 30 см плотно прижимают полотно, придавливают почвой, разрез засыпают. Верхний край ткани должен быть погружен в почву на 3 — 5 см. Повторность опыта 3 — 5-кратная.

Через месяц (через 2 — 3 мес.) полотно осторожно извлекают, отмывают от почвы и продуктов разложения, подсушивают и взвешивают. Для определения динамики процесса одновременно закапывают несколько полотен, которые извлекают последовательно через определенные интервалы времени. По убыли в весе судят об интенсивности процесса разрушения клетчатки.

Начальный вес ткани узнают путем определения среднего веса 25 см ткани или начального веса ткани, закладываемой в почву. Если необходимо иметь информацию о разложении целлюлозы в каждом горизонте, ткань разрезают на куски в соответствии с почвенными горизонтами.

Д.Г. Звягинцевым (1980) предложена следующая шкала оценки биологической активности почв по интенсивности разрушения клетчатки (% разложившегося полотна за вегетационный сезон): очень слабая < 10, слабая 10 — 30, средняя 30 — 50, сильная 50 — 80, очень сильная > 80.

3.4.2. Определение протеолитической активности почвы с помощью фотопленки

Пленку нарезают кусочками по 13 - 14 см и помещают в почву, прижав

эмульсией к гладкой поверхности среза. Длительность экспозиции зависит от влажности, температуры почвы, цели исследования. Извлечение фотопленки требует большой осторожности. После извлечения и высушивания подсчитывают число пятен разложения на желатине.

Уреаза катализирует гидролиз мочевины. Конечными продуктами гидролиза являются аммиак и углекислый газ:

$$CO(NH_2)_2 - 2\ NH_3 + CO_2 + H_2O$$

Мочевина попадает в почву в составе растительных остатков, навоза и как азотное удобрение. Она образуется и в самой почве в качестве продукта превращения азотистых органических соединений — белков и нуклеиновых кислот.

Ход анализа

В колбу Эрленмейера на 50 см берут 5 г почвы, добавляют 10 см фосфатного буфера (pH 6,7), 10 см 10%-го раствора мочевины. Колбу закрывают ватной или корковой пробкой, встряхивают и ставят в термостат при температуре 37°С на 24 ч.

После инкубации содержимое колбы фильтруют в мерную колбу (объем колбы выбирают в зависимости от содержания аммония). Сначала на фильтр переносят только жидкость, затем в колбу добавляют 15 см 1М раствора КС1, 5 мин встряхивают на ротаторе для вытеснения из почвы поглощенного аммония и продолжают фильтрование, объем фильтрата доводят до метки.

Далее количественное определение аммония, образовавшегося под действием мочевины можно проводить несколькими методами.

Колориметрический метод учета аммония с реактивом Несслера.

Из мерной колбы отбирают пробу 1 — 5 — 10 см фильтрата (в зависимости от содержания аммиака) в мерную колбу на 50 см , добавляют примерно 30 см дистиллированной воды, перемешивают. Добавляют 2см 50%-го раствора калия-натрия виннокислого, перемешивают. Прибавляют 2см Реактива Несслера, перемешивают, доводят водой до метки,

перемешивают.

Колориметрируют на фотоэлектроколориметре в кюветах шириной 10— 20 мм с синим светофильтром (длина волны 400 нм).

Примечание: если раствор опалесцирует, прибавляют еще 2 см сегнетовой соли.

Разведение окрашенных растворов не допускается, поэтому если оптическая плотность раствора выше, чем предусмотрено калибровочным графиком, окрашивание повторяют, уменьшив аликвоту испытуемого раствора.

Количество аммония рассчитывают по предварительно составленному калибровочному графику.

Активность уреазы (X) выражают в миллиграммах N — NH_4 на 10 г почвы за сутки:

$$X = \frac{a - p - 100}{H}$$

|где *а* — количество N— NH4 по графику, мг, *н* — навеска воздушно-сухой почвы, г; *р* — разведение; *100* — пересчет на 100 г почвы.

4.1. *а*- и р - Амилазы

Ферменты амилазы осуществляют гидролиз крахмала, который входит в состав органических остатков, попадающих в почву, с образованием декстринов и мальтозы.

В природе встречаются два типа амилаз: а -амилаза гидролизует а - 1,4-глюкановые связи в полисахаридах (крахмале, гликогене и родственных поли-и олигосахаридах, содержащих три или более остатков d- глюкозы, соединенных **а** -1,4-связями); р - амилаза гидролизует (3 - 1,4- глюкановые связи в полисахаридах (крахмале, гликогене и родственных поли- и олигосахаридах), последовательно отщепляя остатки мальтозы и образуя путем инверсии р -мальтозу.

В почвах преобладает р - амилаза. Методы определения активности амилазы почвы основаны на количественном учете редуцируюших Сахаров

по Бертрану. В молекуле амилазы остатки глюкозы связаны р - глюкозидными связями между 1-ми 4-м углеродными атомами и образуют длинную цепочку.

Ход анализа

Навеску почвы 5 г помещают в коническую колбу на 100 см^3. Приливают 10 см^3 2% раствора крахмального клейстера, затем 15 см^3 ацетатного буфера (pH 5,9) и 0,5 см^3 толуола. Колбу закрывают корковой пробкой, взбалтывают на ротаторе 3 мин и ставят в термостат при температуре 37°С на 24 ч. Затем содержимое колбы фильтруют в мерную колбу на 100 см^3. После 3 — 4-кратного промывания почвы водой на Фильтре раствор доливают водой до метки. Редуцирующие сахара определяют по Бертрану или колориметрически.

Количество мальтозы, соответствующее количеству закиси меди, находят по таблице.

Активность амилазы (Х) выражают в миллиграммах мальтозы, образовавшейся за сутки на 10 г почвы: $X = \frac{a \cdot p \cdot 10}{н}$

где *а* — количество мальтозы в объеме раствора, взятом для анализа, находят по таблице, мг; *р* — разведение; *н* — навеска почвы, г; *10*— пересчет на 10 г почвы.

4.2. Каталаза

Катализирует реакцию разложения перекиси водорода на воду и молекулярный кислород. Перекись водорода образуется в процессе дыхания живых организмов и в результате различных биохимических реакций окисления органического вещества. Роль каталазы в живом организме и, по-видимому, в почве заключается в том, что она разрушает ядовитую для организмов перекись водорода.

Ход анализа

2 г почвы помещают в колбу, добавляют 40 мл дистиллированной воды, 10 мл 0,3% перекиси водорода. Встряхивают на качалке 20 минут. Добавляют 5 мл 3н серной кислоты. Фильтруют. Затем 25 мл фильтрата тит-

руют 0,1н марганцевокислым калием до слабо-розовой окраски.

Определение начальной концентрации.

10 мл H_2O2 смешивают с водой и 5 мл 3н серной кислотой. 25 мл титруют марганцевокислым калием. Каталазная активность = А — Б

А - количество марганцевокислого калия израсходованного на титрование исходной перекиси, Б - количество марганцевокислого калия израсходованного на титрование почвенного фильтрата.

Активность выражается в мл 0,1 марганцевокислого калия на 1 г сухой почвы за 20 минут.

4.3. Пероксидаза и полифенолоксидаза

Пероксидаза осуществляет окисление органических веществ почв (фенолов, аминов, некоторых гетероциклических соединений) за счет перекиси водорода и других органических перекисей, образующихся в почве в результате жизнедеятельности микроорганизмов. Эти ферменты имеют важное значение в процессе образования гумуса.

Полифенолоксидаза участвует в превращении органических соединений ароматического ряда в компоненты гумуса. Она катализирует окисление фенолов до хинонов в присутствии кислорода воздуха. Хиноны в соответствующих условиях при конденсации с аминокислотами и пептидами образуют первичные молекулы гуминовой кислоты.

Ход анализа

1г почвы заливают 10 мл свежеприготовленного 1% раствора гидрохинона. Добавляют 1 мл 0,5% раствора перекиси водорода, перемешивают, ставят в термостат на 30 минут при 30°. Контроль - смесь раствора гидрохинона и перекиси водорода без почвы. После инкубации добавляют по 10 мл этилового спирта. Перемешивают, фильтруют. Колориметрируют при 440 нм. Активность полифенолоксидазы проводят также, только не добавляют перекиси водорода.

5. Экологические функции почвенных микроорганизмов (для самостоятельного изучения)

Экологические аспекты почвенной биологии включают проблемы взаимодействия между живой частью экосистемы и средой обитания между отдельными популяциями биотического сообщества. С экологических позиций почва является средой жизни, местообитанием почвенных микроорганизмов. Поэтому жизнедеятельность микроорганизмов не только напрямую зависит от таких свойств почвы как влажность, аэрация, реакция почвенного раствора, температура, наличие доступных форм элементов питания, но и микроорганизмы существенно влияют на формирование многих свойств почвы, которые представляют несомненный практический интерес для земледельца.

Прежде всего, следует отметить, что микроорганизмы разлагают соединения *углерода,* содержащиеся в растительном опаде, плазме отмерших микроорганизмов и в останках почвообитающих животных. Они участвуют в разложении крахмала, пектина растительной ткани, следствием чего является ее размягчение и распад на отдельные клетки. Почвенные микроорганизмы осуществляют также разложение целлюлозы, синтез и минерализацию гумусовых веществ, одним из главных компонентов которых является углерод.

При непосредственном участии микроорганизмов в почве происходят превращения соединений *азота.* Почвенные микроорганизмы осуществляют фиксацию молекулярного азота из воздуха и переводят его в сложные органические соединения. После их разложения этот азот становится доступным для питания растений. В симбиозе с бобовыми культурами в почве развиваются клубеньковые бактерии, которые в зависимости от условий их жизнедеятельности могут дополнительно накапливать от 30 до 250 кг/га азота в год. Микроорганизмам принадлежит ведущая роль в процессах аммонификации, нитрификации и денитрификации соединений азота.

Микроорганизмам принадлежит ведущая роль в превращениях в почве соединений *фосфора, серы, железа, марганца, алюминия и микроэлементов.* Микроорганизмы способны растворять фосфаты железа и алюминия, а так-

же соли фитиновой кислоты (фитаты наиболее распространенные органофосфаты почв). Большое влияние фосфорное питание растений оказывают микоризные грибы - симбионты корневых систем.

Сера в почвах претерпевает разнообразные биологические и химические превращения, переходя из неорганических соединений в органические и обратно. При разложении растительных и животных остатков микроорганизмами освобождаются серосодержащие аминокислоты, тиоспирты, тиофенолы, тиоэфиры и др.

Железо входит в состав живых клеток всех растений и животных, содержится в молекулах ферментов и участвует в кислородном обмене. Микроорганизмы участвуют в превращениях железа прямо (окисление) и косвенно (путем создания определенного окислительно-восстановительного потенциала и pH среды).

Соли марганца обладают высокой подвижностью (и, соответственно, доступностью растениям) только в кислых почвах. В сухих степях в условиях нейтральной или слабощелочной среды соли марганца становятся доступными для растений после их окисления бактериями, грибами и диатомовыми водорослями.

Алюминий в земной коре занимает третье место после кислорода и кремния, а среди металлов - первое. Его соединения подвижны в кислых почвах и малоподвижны в слабощелочной и нейтральной средах. В процессах мобилизации алюминия участвуют агрессивные продукты микробного синтеза, а также гумусовые кислоты. Образующиеся алюмоорганические соединения широко распространены в почвах.

Почвенные микроорганизмы участвуют в превращениях всех без исключения элементов, которые имеются в земной коре. В жизнедеятельности микроорганизмов важное место принадлежит микроэлементам. Так, молибден входит в состав ферментов азотного цикла - нитрогеназы и нитратредуктазы, медь - в состав ферментов оксидаз, кобальт - в витамин *B n.* Бор влияет на азотфиксацию клубеньковых бактерий, азотбактерий, цианобак-

терий и стимулирует развитие многих грибов. Разложение соединений мышьяка, попавшего в почву в составе пестицидов, происходит только благодаря деятельной почвенных грибов и бактерий.

6. Биологическая диагностика и индикация почв (для самостоятельного изучения)

Физические и химические свойства основных типов почв имеют устоявшиеся, консервативные константы, которые в основном если и подвержены каким-либо изменениям, то незначительным. К ним относят: мощность гумусового горизонта, количество и состав гумуса, валовые формы химических элементов, физические константы. Биология почв оперирует показателями, которые имеют динамические (изменяющиеся) свойства и они служат индикаторами современного режима жизни почв. Поэтому использование биологических методов биодиагностики и индикации необходимо для общей характеристики состояния почвы и оценки ее плодородия. Они включают ботанические, зоологические, биохимические и микробиологические показатели.

Ботанические методы индикации и диагностики почв основаны на описании характера растительности. По растениям-индикаторам можно установить тип почвы, степень ее гидроморфизма, развитие процессов заболачивания и соленакопления, степень обогащенности почвы питательными элементами, ее кислотность, щелочность, глубину оттаивания мерзлотных почв, уровень грунтовых вод и т.п.

Зоологическая индикация построена на индивидуальных потребностях отдельных видов насекомых во влаге, тепле и аэрации. По ареалу их распространения судят об основных свойствах почв и единстве почвообразовательного процесса. Например, все зональные типы почв четко различаются по численности, биомассе, продуктивности, характеру вертикального распределения панцирных клещей.

Микробиологическая и биохимическая диагностика почв является наиболее сложной. Микроорганизмы - очень чуткие индикаторы, резко ре-

агирующие на различные изменения во внешней среде. Отсюда и высокая динамичность микробиологических показателей. Почвы характеризуются не только составом и численностью различных групп биоты, но и их суммарной активностью, а также активностью биохимических процессов, обусловленного наличием в почве определенного запаса ферментов, выделенных прижизненно в результате деятельности растений и микроорганизмов.

Для оценки биологической активности почв в целях ее диагностики используются следующие ее показатели:

1. *Численность и биомасса живых организмов в почвах.* Так называемые прямые методы учета бактерий, актиномицетов и грибов предполагает их отделение от почвы, последующее окрашивание и подсчет под микроскопом.

В качестве характеристики интенсивности продукционного процесса почвенных микроорганизмов определяют также суммарное количество синтезированной биомассы за тот или иной срок. Биомасса грибов в почвенной толще превышает бактериальную во всех типах зональных почв. Но особенно заметно преобладание грибной биомассы в лесных почвах.

2. *Определение «дыхания» почвы по поглощению кислорода или выделению углекислого газа.* Эти методы являются наиболее общими, поскольку они позволяют судить о биологической активности почв по исходным или конечным продуктам жизнедеятельности почвенной биоты.

3. *Учет активности азотфиксации.* Позволяет судить не обо всей почвенной биоте, а только об отдельных группах микроорганизмов, участвующих в связывании атмосферного азота.

4. *Аппликационные методы (методы льняных тканей, фотопленки, целлюлозы, растительных остатков).* Позволяют судить об активности целлюлозоразрушающих микроорганизмов в той или иной почве и в разных агроценозах.

5. *Активность отдельных ферментов в почвах.* При этих определениях устанавливают не количественное содержание ферментов в почве, а их

потенциальную активность. Наиболее часто в почве определяют активность ферментов из групп гидролаз (инвертаза, фосфатаза, уреаза, протеаза, амилаза) и оксидоредуктаз (каталаза, полифенолоксидаза).

Показатели биологической активности почв используются для *индикации* гомогенизатора или терки из нержавеющей стали, обеспечивающих получение однородной массы.

При анализе зерна необходимо соблюдать все требования, предъявляемые для подготовки к анализу образцов злаков. Воздушно-сухие образцы должны быть измельчены.

Подготовка к анализу

Тщательно отобранные семена по 215 штук помещают в стеклянные стаканчики. Количество стаканчиков с семенами должно соответствовать числу анализируемых образцов. Предварительно семена отбираются и должна быть определена их всхожесть, которая должна составлять 90 — 95%. Должна быть подготовлена водопроводная вода (прокипеть 10 — 15 мин). После кипения закрыть ватной пробкой и дать остыть.

Ход анализа

Пробу сырого почвенного материала 100 г взвешивают с погрешностью 0,1, пересыпают в колбу 250 $см^3$ и приливают 100 $см^3$ водопроводной воды. Взбалтывают в течение 2,5 ч.

Полученную суспензию отфильтровывают и из нее мерной пипеткой отбирают 4 $см^3$ раствора, которым заливают, подготовленные в стаканчиках семена.

Пробу сырого гомогенизированного растительного материала отжимают в марле или белой синтетической ткани и мерной пипеткой отбирают аликвоту 4 $см^3$, которой заливают, помещенные в стаканчик семена.

Пробу сухого размолотого растительного материала заливают водой в отношении 2:1, встряхивают в течение 2,5 ч. После чего центрифугируют 30 мин при температуре 0°С при 6 тыс./об./мин и из полученной жидкости отбирают 4 $см^3$, которыми заливают семена биотеста. Через сутки (24 ч) семена раскладываются из стаканчика на чашки Петри. Семена из одного стакан-

чика точно в количестве 50 штук раскладывают на одну чашку Петри. Таким образом, достигается четырехкратная повторность, необходимая для оценки достоверности результатов. Необходимо семена, которые оказались повреждены, оставлять в стаканчике, для этого при замачивании закладывали дополнительное количество семян (15 штук).

Чашки Петри должны быть подготовлены следующим образом: на дно каждой чашки укладывается три бумажных фильтра, соответствующих размерам дна чашки, которые смачиваются 5 $см^3$ водопроводной воды (после кипячения и охлаждения). Поверхность фильтров тщательно выравнивается.

Когда все семена будут перенесены на чашки Петри и равномерно распределены на фильтрах по 50 штук в каждой в 4-кратной повторности для каждого опыта, их необходимо поместить в биотермостат при температуре 25°С на 48 ч.

Через двое суток на третьи (72 ч) замеряют мерной линейкой общую длину проростков на каждой чашке Петри и учитывают количество не-проросших семян на каждой чашке.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологические основы плодородия почвы (под. ред. гл. корр. ВАСХНИЛ д.б.н. О.А. Берестецкого). М., Колос, 1984. - 287 с.

2. Карягина Л.А. Микробиологические основы повышения плодородия почв. Минск, Наука и техника, 1983. с. 79-100.

3. Ковриго В.П., Кауричев И.С., Бурлакова Л.М. Почвоведение с основами геологии. М., Колос, 2000. - 416 с.

4. Кравков СП. Биохимия и агрохимия почвенных процессов. Л., Наука, 1978.-291 с.

5. Минеев В.Г., Ремпе Е.Х. Агрохимия, биология и экология почвы. М., Росагропромиздат, 1990. - 206 с.

6. Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. Микробиология. М., Колос, 1988. - 194 с.

7. Щербакова Т.А. Почвенные ферменты, их выделение, свойства и связь с компонентами почвы. // Почвоведение, 1980, № 5, с. 102-113.