

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
ПОЧВЕННЫХ
МИКРОМИЦЕТОВ ПРИ
ОЦЕНКЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ
ЭФФЕКТОВ ЗАГРЯЗНЕНИЯ
СРЕДЫ**

учебное пособие

С.Р.ХАБИРОВА, Э.А. ШУРАЛЕВ, М.Н. МУКМИНОВ

Казань – 2022

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ
Кафедра прикладной экологии

С.Р. ХАБИРОВА, Э.А. ШУРАЛЕВ, М.Н. МУКМИНОВ

**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЧВЕННЫХ
МИКРОМИЦЕТОВ ПРИ ОЦЕНКЕ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ЗАГРЯЗНЕНИЯ
СРЕДЫ**
(учебное пособие)

Казань – 2022

УДК 574:579.64:579.26:582.288.4:57.083.1
ББК 20.1

*Принято на заседании учебно-методической комиссии Института экологии и
природопользования
Протокол № 2 от 16 февраля 2022 года*

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор кафедры
эпизоотологии и паразитологии КГАВМ **М.А. Ефимова**;
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник центральной
научно-исследовательской лаборатории КГМА – филиала ФГБОУ ДПО
РМАНПО Минздрава России **А.Р. Валеева**

Хабирова С.Р.

**Методы исследования почвенных микромицетов при оценке
биологических эффектов загрязнения среды: учебное пособие / С.Р.
Хабирова, Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов. – Казань: Казан. ун-т, 2022. –
128 с.**

Микробное сообщество почвы является одним из параметров, который при неблагоприятных условиях может оказать негативную нагрузку на экосистему. Материалы, представленные в данном учебном пособии, представляют собой основные теоретические знания о микологии и практические лабораторные методы выделения, культивирования почвенных микромицетов. В учебном пособии приведен обширный список питательных сред, используемых при работе с плесневыми микромицетами и основные методы определения их антибиотической активности.

Учебное пособие предназначено для студентов бакалавриата и магистратуры, обучающихся по направлению «Экология и природопользование», а также для аспирантов, обучающихся по специальности «Экология» (биологические науки), для ознакомления с широким спектром методов исследования почвенных микромицетов.

©Хабирова С.Р., Шуралев Э.А., Мукминов М.Н., 2022
© Казанский университет, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	6
Глава 1. Микология, как наука.....	9
1.1 История развития микологии, как науки	9
1.2 Этапы развития микологии	9
Вопросы для самоконтроля	15
Глава 2. Почва, как основное местообитание почвенных микромицетов и методы их выделения посредством почвы	16
2.1 Общие сведения о строении почв.....	16
2.2 Отбор пробы почвы для микробиологического анализа.....	17
2.3 Метод прямого выделения микромицетов, предложенный Х. Конном	20
2.4 Метод почвенных камер	21
2.5 Метод выделения микромицетов из почвенной пыли на стекле	22
2.6 Метод выделения почвенных микромицетов на стерневых отрезках.....	23
Вопросы для самоконтроля	24
Глава 3. Методы выделения чистых культур и изучения почвенных микромицетов в лабораторных условиях	25
3.1 Общие сведения о методах выделения микромицетов из почвы.....	25
3.2 Метод разведений.....	27
3.3 Метод выращивания микромицетов на мембранном фильтре.....	31
3.4 Метод почвенных пластинок	32
3.5 Метод выделения микромицетов из мицелия	33
3.6 Метод определения численности микромицетов в почве.....	33
3.7 Методы ингибирования роста и развития бактерий при совместном их культивировании с микромицетами	39
3.8 Метод стекол обрастания	40
3.9 Метод стеклянных иммерсионных трубок	44
3.10 Метод стекол-ловушек Ля-туш.....	45
3.11 Метод стекол-ловушек Сьюэлла	45
3.12 Метод выделения микромицета из одной споры	46

3.13 Метод Линднера	47
3.14 Метод Линднера-Надсона	48
Вопросы для самоконтроля:	48
Глава 4. Классификация питательных сред, используемых для культивирования почвенных микромицетов	50
4.1 Питательные среды и их характеристика	50
4.2 Стерилизация питательных сред	52
4.3 Методы культивирования почвенных микромицетов.....	53
4.4 Рецепты наиболее применяемых питательных сред для культивирования почвенных микромицетов	57
4.5 Количественный учет микромицетов, способных разлагать клетчатку (по методу О. И. Пушкинской).....	78
4.6 Среда Пидопличко для микромицетов, разрушающих целлюлозу	78
4.7 Среда Камышко для микромицетов	79
4.8 Культивирование микромицетов на предметных стеклах (по методу Н. М. Пидопличко)	79
4.9 Среда для выделения и изучения почвенных хищных микромицетов.....	80
Вопросы для самоконтроля	81
Глава 5. Описание некоторых почвенных микромицетов	82
5.1 Почвенные токсинообразующие микромицеты р. <i>Fusarium</i> , их изучение и методы культивирования.....	82
5.2 Основные морфологические и культуральные признаки видов р. <i>Fusarium</i>	86
5.3 Микробиологическая методика определения вида р. <i>Fusarium</i>	88
5.4 Среда для культивирования микромицетов р. <i>Fusarium</i>	89
5.5 Почвенные хитридиевые микромицеты и методы их культивирования... 92	
5.6 Почвенные микромицеты р. <i>Chaetomium</i> и методы их культивирования. 99	
5.7 Пор. <i>Sphaeropsidales</i> и методы их культивирования.....	102
5.8 Пор. <i>Mucorales</i> и методы их культивирования	102
5.9 Методы микроскопического исследования почвенных микромицетов..	105

5.10	Методика выделения и изучения микромицетов обитающих в ризосферной, прикорневой и корневой зонах растений	112
5.11	Методика Самцевича	117
	Вопросы для самоконтроля	118
Глава 6.	Окраска и фиксация препаратов	119
6.1	Окраска препаратов живых почвенных микромицетов	119
6.2	Окраска препаратов фиксированных почвенных микромицетов	119
Глава 7.	Выявление антибиотической активности у почвенных микромицетов	122
7.1	Метод агаровых блоков	122
7.2	Метод штриха	123
7.3	Метод штриха М. А. Литвинова	123
	Вопросы для самоконтроля	124
	Список рекомендованной литературы	125

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день помимо традиционных методов ведения сельского хозяйства активно развивается экологическое земледелие, основой которого является создание экологически сбалансированной агроэкосистемы. Одним из способов обеспечения устойчивости таких искусственно созданных экосистем является обеспечение минимального отрицательного влияния на агроэкосистему различных факторов биологического, химического и физического происхождения, обязательным контролем за их состоянием в системе агроэкологического мониторинга. Микробное сообщество почвы является одним из параметров, который при неблагоприятных условиях может оказать негативную нагрузку на экосистему. Нарушения его состава и структуры проявляются раньше, чем изменения физико-химических свойств почвы, при более низком содержании поллютантов, чем ПДК.¹ Поэтому микрофлора является важным элементом почвенных изменений, и это делает целесообразным включение ее в систему агроэкологического мониторинга. Одним из основных компонентов биоты, имеющим непосредственное отношение к процессам почвообразования, круговорота веществ в экосистемах, влияния на здоровье человека и животных, являются почвенные микромицеты. Это обусловлено и положительными, и отрицательными моментами, например, такими как: во-первых, с почвой связано большое количество фитопатогенов; во-вторых, микромицеты с сапротрофным типом питания участвуют в деструкции послеуборочных остатков; в-третьих, некоторые микромицеты-антагонисты обеспечивают антифитопатогенный потенциал, в-четвертых плесневые микромицеты помимо своего непосредственного влияния на растения, так же выделяют такие вторичные метаболиты, как микотоксины, которые в последствии попадают в организм животных и человека, оказывая токсическое,

¹ Колесникова, И.Я. Экологическая роль почвенных микромицетов в изменении биохимических показателей плодородия / И.Я. Колесникова, А.М. Труфанов // Вестник АПК Верхнеповолжья / ФГБОУ ВО Ярославская ГСХА. Ярославль, 2017. – С.19– 26.

канцерогенное влияние. Во избежание нанесения ущерба здоровью людей содержание микотоксинов в продуктах питания должно быть максимально низким. Микотоксины не только являются источником риска для здоровья человека и животных, но и негативно воздействуют на ситуацию с продовольственной безопасностью и питанием, поскольку ограничивают доступ людей к здоровой пище. ВОЗ настоятельно рекомендует национальным органам власти вести мониторинг содержания микотоксинов в продовольственной продукции, реализуемой на их рынке, и принимать меры для максимального сокращения уровня контаминации микотоксинами и соблюдения международных рекомендаций по предельно допустимым значениям, условиям хранения и законодательству.²

В связи с этим, для студентов (аспирантов) данное учебное пособие будет необходимым инструментом в научно-исследовательской деятельности, связанной с изучением почвенных токсинообразующих микромицетов. Учебное пособие содержит основные аспекты для выполнения исследований связанных с токсинообразующими плесневыми микромицетами. Изучение методов выделения, культивирования, определения численности, выявление антибиотической активности у почвенных микромицетов, а также подавления бактерий при совместном их росте позволит студенту (аспиранту) расширить кругозор знаний в области микробиологической микологии, усовершенствовать навыки лабораторной работы с почвенными микроорганизмами.

Эти знания необходимы для изучения токсинообразующих микромицетов в фундаментальной науке и прикладной, например, для разработки фунгицидов, биоцидных препаратов, открытия новых видов, углубленного изучения свойств уже известных.

В процессе работы с методическим материалом предоставляется возможность получить полное представление о такой науке, как микология и о разнообразных методах изучения токсинообразующих микромицетов. В

² <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>

предложенных разделах представлены исторические этапы развития микологии, как науки; знания об объектах данной науки, основном местообитании их; о методах лабораторной работы с ними; описание некоторых наиболее изученных родов для полного представления, что необходимо знать о том или ином микромицете.

Ознакомление с широким спектром методов исследования в области почвенных микромицетов позволит обучающимся подойти к изучению своего вопроса с разных сторон и получить наиболее достоверную информацию о том или ином объекте своей научной работы.

Учебное пособие создано на базе Института экологии и природопользования Казанского (Приволжского) федерального университета, предназначено для основных образовательных программ высшего образования бакалавриата и магистратуры по направлению «Экология и природопользование» и аспирантуры по направлению «Экология» (биологические науки).

ГЛАВА 1. МИКОЛОГИЯ, КАК НАУКА

1.1 История развития микологии, как науки

На Земле существует от 100 до 250 тысяч, а по некоторым оценкам до 1,5 миллионов видов грибов. Шведский ботаник и миколог Э. М. Фриз (1794–1878) полагал, что грибы - самая многочисленная группа растительных организмов. Еще со времен Аристотеля (IV в. до н.э.), Теофраста (III в. до н. э.), Диоскорида (I в.) известны некоторые съедобные (шампиньоны, трюфели) и ядовитые грибы. В свое время Плиний-младший (I в.) обратил внимание на обилие трутовиков на стволах деревьев и причислил эти организмы к грибам. Именно он впервые предпринял попытки классифицировать грибы. Он делил все грибы на съедобные и ядовитые. В Риме среди съедобных ценился цезарский гриб. Римляне были хорошо осведомлены о ядовитых свойствах грибов и умело использовали их для устранения неудобных. Предположительно, ядовитые грибы стали причиной смерти римского императора Клавдия, французского короля Карла VI, папы римского Клементя VII. Грибам поклонялись племена ацтеков, о чем говорят находки каменных статуэток грибов. Наскальные изображения людей грибов также свидетельствуют о поклонении им народов, населявших Сибирь. Однако сведений об истинной природе грибов, их биологии не было. Возникновение грибов после дождей связывали с ударами молнии. Появление грибов на листьях растений объясняли влиянием росы или продуктов выделения растений.

1.2 Этапы развития микологии

В истории становления микологии как науки выделяют несколько этапов. Первый этап, пришел к своему концу в середине 19 века, за его период был накоплен материал, который включал в себя описание новых видов грибов и попытки их классификации. Первые научные данные о грибах относятся ко второй половине 16 века, так как именно в этот период натуралист К. Клузиус

(1526–1609) используя собственные сборы и материалы других исследователей, составил первую систематическую сводку о грибах. Особое значение имеет его коллекция акварельных рисунков грибов, в количестве 221 рисунок, под названием Кодекс Клузиуса (хранится в библиотеке Лейденского университета, в Голландии).

Первым специалистом в области микологии считают итальянского ученого П. Микели. Совершенствуя оптические приборы, он сделал открытие в 1729 г., согласно которому грибы образуются в процессе прорастания мельчайших крупинок, названных позднее спорами. В результате грибы были причислены к царству растений. К. Линней (1707–1778) также внес свой вклад и в развитие микологии. Согласно его воззрениям вначале грибы были отнесены к царству животных, так как он обнаружил некоторое их сходство с полипами. Впоследствии он определил их в класс своей знаменитой системы, куда также были включены водоросли. Попытка Линнея систематизировать организмы способствовала возникновению новой науки о грибах – микологии. Большая работа по обобщению данных о грибах была проделана Х. Линком (1767–1850). Впоследствии, опираясь на накопленный материал по грибам, голландский исследователь Х. Г. Пирсон (1755–1836) и шведский ученый Э. М. Фриз (1794–1878) предприняли попытку систематизировать грибы. Эти ученые стали основоположниками систематики грибов, являясь представителями различных течений. Так, Пирсон стремился к формированию естественной группировки грибов, следуя воззрениям Ламарка. Фриз большое значение придавал анатомическим методам исследований, вслед за Линнеем придерживаясь создания искусственной системы. Э. Фриз предложил выделить грибы в самостоятельное царство. Эта идея в то время не нашла широкого распространения и была поддержана впоследствии лишь некоторыми учеными: Конардом (Conard, 1939), Б. М. Козо-Полянским (1947) и др. Многие виды и роды, установленные этими учеными, сохранились до сих пор в микологической номенклатуре. В первой половине XIX в. активно ведутся исследования с целью выявления микобиоты различных регионов, параллельно изучаются филогения

грибов, их строение, цитология. Большое значение приобретают исследования паразитических грибов. Этот период знаменуется деятельностью таких ученых, как А. И. Корда (1809–1849), Г. Л. Рабенгорст (1806–1881), И. М. Барклей (1803–1889), М. К. Кук (1825–1914). Грибы России изучались сначала путешественниками. Даже у Линнея есть публикации (1737, 1792) о нахождении в России 155 видов грибов. Первые значительные микологические работы относятся к 1750 г и связаны с деятельностью С. П. Крашенинникова (1713–1755). Им был составлен список, включающий 430 видов грибов, собранных в окрестностях Петербурга. К 1836 г. Н. А. Вейнман (1782–1868) описал 1123 вида грибов России. Этому знаменитому ученому по заслугам считают первым русским микологом. Второй этап характеризуется подъемом в развитии микологии (со второй половины до конца XIX в.). Изучаются онтогенез и филогенез у грибов, исследуются циклы развития, особенно паразитических видов. В это время закладываются научные основы фитопатологии – науки о болезнях растений. Взоры микологов устремляются на исследование не только макроскопических, но и микроскопических грибов. Этот период связан с работами выдающихся учёных – братьев Тюлан во Франции, А. де Бари (1831–1888) в Германии. Так, Л. Тюлан (1815–1885) установил, что явление плеоморфизма характерно для всех групп грибов. Плеоморфизм – наличие различных последовательных спораношений в сложном жизненном цикле грибов. Это открытие является одним из самых крупных в микологии. До этого многие стадии спораношения одного и того же вида принимали за разные виды. А. де Бари является основоположником экспериментальной микологии и по праву считается отцом микологии. Он был автором первой филогенетической классификации грибов, основанной на признании их происхождения от водорослей. Ботанический институт в Страсбурге становится центром микологических исследований. Огромной заслугой А. де Бари явилось создание большой школы микологов и фитопатологов, среди которых было много русских ученых. Изучение видового разнообразия грибов в этот период не потеряло актуальности, исследования проводятся в различных уголках земного шара. Накопленный материал был

обобщен П. Саккардо (1845–1920), который описал все известные к этому времени виды грибов земного шара. В 25 томах были представлены сведения о 74 323 видах. Большая роль в развитии микологии принадлежит О. Брефельду (1839–1925), разработавшему методы получения чистых культур грибов. В России Л. С. Ценковский (1822–1887) заложил основы изучения морфологии и циклов развития грибов и миксомицетов, его работы по этим вопросам считаются классическими. По отзывам современников, Л. С. Ценковский постепенно открывал перед наукой замечательный мир микроорганизмов. Он создал научные школы ботаников и бактериологов. Интересы М. С. Воронина (1838–1903), ученика де Бари, касались различных сторон микологии, его многочисленные работы связаны с изучением сложных явлений в жизни грибов. Он занимался исследованием капустной килы, ржавчины подсолнечника, биологии микоризных грибов. Появление большинства его работ вызвано практическими потребностями сельского хозяйства. М. С. Воронина по праву считают отцом русской микологии и основателем русской фитопатологии. Третий этап в развитии микологии характеризуется развитием физиологии и биохимии грибов (конец XIX – середина XX в.). На грибы обращают внимание не только микологи, но и физиологи растений, изучавшие у них различные физиологические процессы (дыхание, брожение, метаболизм). Многие исследования носят экологический характер, так как в ходе их выяснялось влияние факторов среды на онтогенез грибов (Г. Клебс и др.). С развитием техники появляется возможность изучения клетки грибов, её химического состава. С этой целью П. Данжаром, Р. Гернером, П. Клауссенем, применялся цитологический метод. Большое внимание уделяется исследованию биологических особенностей патогенных грибов, возбудителей болезней у растений, животных и человека. В России в этот период развиваются практически все известные направления микологии. Систематик и морфолог Н. В. Сорокин (1846–1909) известен своими работами в области изучения паразитических грибов растений и животных. Возникшие благодаря ему научные направления в области микробиологии развивались в опытах Ф. М.

Каменского (1851–1912), впервые описавшего мицелий гриба на корнях растений (микориза); Ф. М. Породько (1877–1948), получившего за работу по изучению изменения бродильной активности дрожжей в зависимости от усиленного питания пептоном, степень кандидата наук по окончании университета; И. Л. Сербинова (1872–1925), автора учебника «Общая микробиология» (1916), который изучал бактериальные болезни растений, строение и биологию хитридиевых грибов, описал новые виды фитопатогенных бактерий и грибов. Выдающийся ученый А. А. Ячевский (1863–1932) исследовал видовое разнообразие грибов, а также ржавчинные и мучнисторосяные грибы, бактериальные и вирусные болезни растений. Основные его труды посвящены систематике и филогении грибов. Он является автором первого на русском языке определителя грибов (1897). Известна большая организаторская деятельность А. А. Ячевского. В 1902 г. в Петербурге им создана Центральная ботаническая станция, в 1907 г. – Бюро по микологии и фитопатологии при Министерстве сельского хозяйства, отдел микологии и фитопатологии (впоследствии лаборатория микологии им. А. А. Ячевского) при Институте опытной агрохимии. Под руководством А. А. Ячевского регулярно издавался сборник «Материалы по микологии и фитопатологии». Являясь профессором высших учебных заведений в Петербурге, он был известен своей активной просветительской деятельностью. В. А. Траншель (1868–1941) занимался в основном изучением биологии ржавчинных грибов, которые были собраны им лично или 8 входили в многочисленные коллекции. Он предложил метод исследования разных хозяинов ржавчинных грибов, ныне используемый во всём мире. Л. И. Курсанов (1877–1954) исследовал морфологию и цитологию грибов, главным образом ржавчинных, взаимоотношения паразитных грибов и растений-хозяев. Им был внедрен цитологический метод в микологию. Его учебник «Микология» до настоящего времени популярен среди микологов. Н. А. Наумов (1888–1959), ученик А. А. Ячевского, продолжил исследование микобиоты различных регионов, в особенности Европейской части СССР, Средней Азии, Алтая, Дальнего Востока. Основные его работы посвящены систематике мукоровых

грибов, им описано около 200 новых видов. Известны исследования учёного по фитопатологии, посвящённые явлениям и проблемам паразитизма, иммунитета, фузариоза и ржавчины хлебных злаков, килы капусты. Много времени Н. А. Наумов уделял педагогической работе как профессор Ленинградских высших учебных заведений. Им были написаны многие учебники и учебные пособия, переведенные на разные языки. Известнейший русский миколог А. С. Бондарцев (1877–1968) проводил микологические и фитопатологические исследования в различных районах СССР, опубликовал руководство «Грибные болезни культурных растений и меры борьбы с ними», долгое время бывшее единственным учебником по фитопатологии. Широко известен его капитальный труд «Трутовые грибы европейской части СССР и Кавказа». В XX в. микологические исследования во всех указанных направлениях осуществляются плеядой ученых и научными коллективами всех отделений Российской Академии наук и высших учебных заведений. Статьи по микологии публикуются главным образом в журналах «Микология и фитопатология» (с 1967 г.) и «Новости систематики низших растений» (с 1964 г.). Во второй половине XX в. благодаря работам Р. Уиттейкера (1969) и А. Л. Тахтаджяна (1970) грибы рассматриваются в ранге царства во всех современных системах. В этот период начинает складываться новый, четвертый, этап в развитии микологии, связанный с изучением генетики грибов. Именно потребности человеческого общества стимулировали развитие нового направления микологии: грибы, продуцирующие разнообразные биологически активные вещества – ферменты, антибиотики, фитогормоны, становятся популярны как объекты биотехнологии. Американские ученые, лауреаты Нобелевской премии Д. Бидл (1903–1989) и Э. Тейтем (1909–1975), открыв биохимические мутанты у сумчатого гриба *Neurospora crassa*, заложили основы биохимической генетики. Развитие этого направления шло от решения вопросов прикладного характера, связанных с селекцией грибов, используемых в биотехнологии, до выяснения вопросов теоретической микологии. В частности, поднимаются проблемы систематики грибов, филогении, изучения вида в онтогенезе и на популяционном уровне, его

экологических особенностей. В последнее время становится популярной молекулярная систематика, или геносистематика, в основе которой лежит сравнение ДНК исследуемых организмов, что позволяет сопоставлять генотипы, а не фенотипы. На основе генного анализа в настоящее время пересмотру подвергаются все системы живых организмов, в том числе грибов.³

Вопросы для самоконтроля

1. Сколько этапов выделяют в истории становления микологии, как науки?
2. Кого считают первым специалистом в области микологии?
3. Какой вклад внес К. Линней в развитие микологии?
4. Кто первый предложил выделить грибы в самостоятельное царство?
5. В какой этап развития микологии изучается онтогенез и филогенез грибов?
6. Кто разработал метод получения чистой культуры грибов?
7. Чем характеризуется третий этап развития микологии?
8. Кем был внедрен цитологический метод в микологию?
9. Плеоморфизм что это?
10. Какие исследования становятся популярными в микологии?

³ Переведенцева, Л.Г. Микология: Грибы и грибоподобные организмы: Учебное пособие / Л.Г. Переведенцева. – Перм. гос. ун-т. – Пермь, 2009. – С.4 – 9.

ГЛАВА 2. ПОЧВА, КАК ОСНОВНОЕ МЕСТООБИТАНИЕ ПОЧВЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ И МЕТОДЫ ИХ ВЫДЕЛЕНИЯ ПОСРЕДСТВОМ ПОЧВЫ

2.1 Общие сведения о строении почв

Микологический анализ почвы начинается с морфологического описания местообитания объектов исследования. Для этого необходимо произвести описание почвенного разреза, закладываемого в естественной среде, например в поле. С этой целью в поле выкапывают почвенную яму глубиной не менее 1 м. Изучение морфологических особенностей почвы начинают с выделения почвенных горизонтов и дают им название по условиям образования (генезису). Весь почвенный разрез прежде всего подразделяют на почву и подпочву. Почву делят на два основных горизонта, обозначаемых А и В; подпочву называют горизонтом С. Горизонт А является верхней частью почвы. В нем почвообразовательный процесс развивается наиболее полно, происходит накопление органических веществ и вынос различных водорастворимых минеральных неорганических веществ в глубину. Если горизонт А неоднороден по свойствам (выявляются различия в цвете, механическом составе, структуре и т. д.), его обычно еще подразделяют на А₁, А₂, А₃. Органические остатки, скапливающиеся над минеральной частью почвы, например в лесу в виде лесной подстилки, принято обозначать А₀. Поверхностный горизонт А в случае его распашки выделяют как А_{исх}. Горизонтом В называют нижнюю часть почвы, куда вымываются из верхнего горизонта различные вещества (горизонт иллювия).

2.2 Отбор пробы почвы для микробиологического анализа

Для того, чтобы определить видовой состав почвенной микрофлоры необходимо выделить исследуемые объекты из почвы и произвести культивирование их на искусственно созданных питательных средах. Точное определение количественного и качественного состава почвенной биоты практически невозможно, но при выполнении ряда методов для выделения микромицетов возможно приближенно выяснить истинный их состав в исследуемых образцах. Почвенные горизонты имеют не последнее значение в распределении в нем микромицетов. Первое что необходимо сделать это выделить наш объект из почвы в чистые культуры.

При отборе пробы почвы для микологического анализа необходимо соблюдать определенные требования асептики, например, в пробу почвы можно легко занести споры микроскопических грибов из воздуха, лабораторной посуды и инструментов, с одежды, рук исследователя и т. д. Стоит помнить, что флора почвенных микроорганизмов очень богата и разнообразна по своему видовому составу, поэтому не всегда наибольшее число этих грибов обитает в самом верхнем слое почвы. Под влиянием температуры, света, сухости и других причин здесь их может быть меньше, чем в нижележащем слое. Поэтому при исследовании состава и степени заселенности почвы микромицетами следует пробы брать по профилю почвы с разных глубин: 0—2, 2—5, 5—10, 10—20, 20—30, 30—50 и иногда 50—70 см. Из более глубоких слоев почвы имеет смысл исследовать те, которые расположены вблизи корневой системы растений, или же по ходу отдельных корней, так как глубоко в почве, свободной от корней, микромицеты обнаруживаются редко. Лучше всего почвенные пробы брать из специально заложённой почвенной ямы. В этом случае необходимо отметить на почвенном профиле все основные генетические горизонты и дать им соответствующую почвенную характеристику. Эти сведения помогут правильно выбрать для исследования те горизонты, которые представляют наибольший интерес для микологического анализа.

Почвенный разрез может быть глубоким, до 3 м. Нет необходимости исследовать глубоко лежащие материнские породы, главное зафиксировать свое внимание на верхних горизонтах почвы в пределах 0—50 см. Перед взятием почвенных образцов в полевых условиях необходимо заранее заготовить специальную сумочку с нужными инструментами и материалами. В сумочке должны находиться саперная металлическая лопатка, большой нож, три столовые алюминиевые ложки со специально отточенными краями, шпатель, скальпель, стамеска, металлическая сантиметровая линейка, пинцет, пата, бутылочка с денатуратом и бумажные стерильные пакеты (делаются большей частью из бумаги «Крафт» или пергаментной бумаги). Кроме того, необходимо иметь при себе почвенный бур на случай, если не будет специальной почвенной ямы. Назначение каждого предмета в сумке следующее: саперная лопатка — для откапывания небольшой ямы; нож — для выравнивания стенки почвенной ямы; три столовые ложки — для взятия пробы (двумя ложками последовательно снимается внешний слой, который откидывается в сторону, ибо он может быть загрязнен посторонней микрофлорой, а третьей вычерпывается почва, примерно 250—300 г, и вносится в один из стерильных пакетов); шпатель и пинцет — для раскрытия конвертов и для других необходимых манипуляций; металлическая линейка — для измерения глубины почвенного слоя. Все предметы перед каждым употреблением тщательно протирают стерильной марлей и обжигают над пламенем зажженного кусочка ваты, смоченной денатурированным спиртом. Причем вату, смоченную спиртом, нужно вложить в пустую консервную банку и затем поджечь, иначе при сильном ветре будет трудно поддерживать нормальное пламя, необходимое для тщательной стерилизации инструментов. При взятии пробы, помимо записей в полевом дневнике, пишут простым карандашом подробную этикетку, а также делают все важные пометки на конверт (дата отбора пробы, место, глубина горизонта почвы). Целесообразно взять пробы почв из одного горизонта в 3—5 конвертов из разных мест. После взятия пробы использованные металлические предметы тут же на месте тщательно очищают от прилипших к ним частиц почвы и затем вновь

стерилизуют (фламбируют) на огне. При взятии пробы необходимо быть весьма осторожным и не занести в нее частицы почвы из других горизонтов. Рекомендуется брать пробы почвы по профилю почвенной ямы снизу вверх (по ломаном линии). Средний почвенный образец составляется смешиванием трех-пяти индивидуальных проб весом по 100—200 г. При необходимости охарактеризовать микрофлору почвы участка площадью в 1 га Н. А. Красильников рекомендует выбрать на нем несколько стометровок, например 5, и на каждой из них взять по 5 образцов. Каждый образец составляют из 3 смешанных проб. В случае, если участок менее 100 м², берут 3 образца по диагонали. Каждый образец составляют из 3 проб и анализируют отдельно.

Как упоминалось ранее микроорганизмы, расположены в почве неравномерно, в виде макро- и микроочагов, и поэтому следует анализировать как можно большее число почвенных образцов. При изучении пахотных почв образцы надо брать на всю глубину пахотного слоя, удаляя лишь самый верхний слой почвы, который обычно загрязнен посторонней микрофлорой. Собранные образцы почвы в пакетах в летнее время года просушивают на воздухе в тени, причем лучше где-нибудь на сквозняке, в течение нескольких часов. Если влажность почв была значительной, то их следует сушить в термостате или сушильном шкафу при 30° С. При медленном высыхании влажных образцов почвы в полевом дневнике записывают следующее: 1) дату отбора почвенной пробы; 2) место взятия пробы; 3) краткое описание рельефа и растительности участка; 4) характер почвы и описание почвенного профиля; 5) агрономические мероприятия на участке (внесение удобрений, фунгицидов и т. д.); 6) глубину горизонта взятия пробы.

Может произойти сильное изменение видового состава микроскопической грибной флоры. Одновременно необходимо брать почву в специальные металлические закрывающиеся стаканчики для учета влажности. Первый засев почвы для проращивания микроскопических грибов на искусственных питательных средах необходимо осуществить не позднее первых 2–3 суток после взятия пробы; его лучше всего производить и полевой лаборатории,

организованной вблизи места взятия почвенных образцов. Повторные засевы на различные среды можно провести через неделю и позже. В исключительных случаях допускается хранение образцов почвы в воздушно-сухом состоянии в течение нескольких месяцев. Однако следует иметь в виду, что за это время возможна гибель части почвенных грибов. Почву перед засевом следует измельчить молоточком в пакетах, если бумага плотная, или в стерильной ступке. Хранить сухие образцы почвы рекомендуется в прохладном, но не сыром месте. Сухую почву в пергаментных пакетах, заложенных в полотняные мешочки, можно хранить сравнительно недолгое время. Для лучшего и более длительного сохранения в почве жизнеспособности микромицетов необходимо образцы почвы содержать в условиях доступа к ним свободного воздуха. В этом отношении удобны конверты из бумаги «Крафт», так как внутри их создается и поддерживается та степень небольшой аэрации, которая обеспечивает нормальное существование и сохранение жизнеспособности микромицетных зародышей, содержащихся в почве.

2.3 Метод прямого выделения микромицетов, предложенный Х. Конном

Помимо изучения культур микромицетов, выделенных из почв и выращиваемых на искусственных питательных средах, большое значение имеет непосредственное исследование природных форм этих организмов, обитающих в почве. Это позволяет наблюдать под микроскопом распределение различных групп почвенных микромицетов в их естественной среде. Исследуемые объекты в почве могут пребывать в виде спор и в состоянии вегетативного мицелия. Для их обнаружения, находящихся в почве в форме развивающегося активного мицелия, используют нижеописываемые методы исследования. Наиболее ранним способом обнаружения мицелия в почве является способ, предложенный Х. Конном (маленький комочек почвы помещают на предметное стекло и смешивают с 2—3 каплями воды, а затем окрашивают каплей метиленовой сини

или раствором Лёффлера¹ и накрывают покровным стеклом). Препарат просматривают под большим увеличением микроскопа. В этом окрашенном препарате удастся обнаружить наличие грибных гиф мицелия. Методы прямого изучения почвенных микроорганизмов в дальнейшем разрабатывались главным образом Н. Г. Холодным. Для наблюдения микромицетов в живом состоянии в почве исследователи рекомендуют пользоваться двумя методами: почвенных камер и проращивания их из почвенной пыли на чистом стекле.

2.4 Метод почвенных камер

На поверхности предметного стекла с помощью почвенного пресса — готовится из подлежащей исследованию почвы квадратная пластинка (18x18 мм) с совершенно гладкой верхней поверхностью, на которую накладывают покровное стекло. Почвенная пластинка имеет толщину до 22 мм, посередине ее находится цилиндрическая полость, не содержащая почвы, с диаметром около 4 мм. Таким образом, между поверхностями предметного и покровного стекл создается небольшая камера, наполненная воздухом и ограниченная по бокам слоем почвы. Здесь грибы легко наблюдать под микроскопом при самых сильных увеличениях в живом состоянии и к тому же довольно продолжительное время, в течение которого совершаются различные стадии их роста и размножения. Если у микромицетов образуются спороношения, то можно произвести и их идентификацию, хотя бы в пределах рода. В том случае, когда края покровного стекла больше размера почвенной пластинки, микромицеты могут расти не только внутри камеры, но и за ее пределами.

¹*Прим. Применяется насыщенный водный раствор метиленовой сини (1 г метиленовой сини и 70—100 мл дистиллированной воды) или раствор Лёффлера [100 мл дистиллированной воды. 2 капли 10%-го раствора КОН. 30 мл насыщенного (7—10%-го) раствора метиленовой сини].*

2.5 Метод выделения микромицетов из почвенной пыли на стекле

Взятые образцы почв доводят до воздушно-сухого состояния при комнатной температуре, а затем хранят в конвертах из плотной бумаги. Для изготовления препаратов берут предметные стекла с углублением (лункой) в средней части и покровные стекла размером 18x18 мм. Те и другие должны быть чисто вымыты и простерилизованы в пламени горелки. Почвенную пыль наносят на покровное стекло, как только оно остынет. Для этого используют трубочки диаметром около 5 мм и длиной 3—4 см. Один из концов каждой такой трубочки закрыт медной сеткой с очень мелкими отверстиями, не пропускающими крупных почвенных частиц. Сетку укрепляют с помощью медной проволоки. Перед употреблением трубочку также нагревают, а затем из нее через открытый конец вносят небольшое количество измельченной сухой почвы. Держа трубочку над центральной частью покровного стекла, осторожно вытряхивают из нее через сетку распыленную почву в таком количестве, чтобы при рассмотрении под микроскопом между отдельными почвенными частицами оставались достаточно большие промежутки. Пылью покрывают только центральную часть стекла, 6—7 мм в поперечнике. Вся остальная поверхность его должна оставаться совершенно чистой. Частички почвы² обычно хорошо прилипают к сухому стеклу, но для лучшего их укрепления можно перед посевом почвы подержать покровное стекло секунду-другую над поверхностью горячей воды для некоторого его увлажнения. Плохо приставшие частицы почвы следует удалить, повернув стекло и слегка постукав пальцем. После этого покровное стекло кладут на предметное запыленной стороной книзу и закрепляют.

Чтобы получить влажную камеру раньше, чем покровное стекло будет положено на предметное, рекомендуется внести в углубление предметного

²*Прим. К почве перед опытом обычно прибавляют 1%-й раствор лимонной кислоты для того, чтобы задержать развитие бактерий.*

стекла маленькую каплю дистиллированной воды величиной немного более макового зерна. Таким образом, увлажнение почвенных частиц происходит за счет конденсации пара, образующегося из капли воды. Для закрепления покровного стекла на предметном необходимо капиллярное пространство между ними заполнить стерильной водой; лишь небольшой участок камеры оставляют свободным для поступления в нее воздуха. Готовые препараты помещают во влажную камеру и в термостат при 23—25°C.

Через день-два препараты почвенной пыли начинают прорастать, т. е. около почвенных крупинок начинают появляться разнообразные микроорганизмы. Через 5—6 дней на препаратах обычно можно уже наблюдать густое население из бактерий, микромицетов, актиномицетов и протозоа. Степень развития микроорганизмов и качественный их состав на препаратах почвенной пыли в значительной степени зависят от влажности камеры. Если капля воды, помещенная в углубление (лунку) покровного стекла, очень маленькая и быстро испаряется, то около почвенных частиц развиваются почти исключительно грибы и актиномицеты. При сильном увлажнении почвы обычно обильно развиваются бактерии.

2.6 Метод выделения почвенных микромицетов на стерневых отрезках

Для выделения различных микромицетов из почвы, при котором их культивирование проводилось бы в условиях, приближенных к естественным, в качестве питательных сред используют для посева почвы растительные остатки сельскохозяйственной культуры, выращиваемой в поле, как например измельченные розетки клевера, стебли льна и ржаную стерню. Наилучшие результаты показали посевы почвы на стерневые отрезки, которые были использованы в качестве стандартной среды для почвенных анализов. Отрезки стерни одинакового размера закладывали в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу, стерилизовали и затем на них производили посев

измельченной почвы определенного объема. При посеве на стерневые отрезки наблюдается последовательность в появлении видов грибов. Первыми появлялись представители порядка *Mucorales*, затем пленки мукоровых постепенно исчезали, и на стерневых отрезках развивались белые, впоследствии зеленеющие пуговики шаровидных колоний *Trichoderma*, затем черные точечнообразные коростинки *Acremoniella*. Последним из представителей гифомицетов появляется *Stachybotrys alternans*. Этот гриб вытесняет других представителей микрофлоры и заселяет стерневые отрезки и фильтровальную бумагу плотным сажистым налетом. Через месяц и более после посева на стерневых отрезках выявлялись сумчатые грибы, главным образом родов *Sorilaria* и *Chaetomium*, и некоторые представители сферопсидных. Преимуществом этого метода по сравнению с посевами на агаризованные питательные среды является его простота и быстрота, отсутствие чрезмерно пышного развития быстрорастущих почвенных космополитов, таких как мукоровые и виды родов *Penicillium* и *Trichoderma*.

Вопросы для самоконтроля

- 1) С чего начинают изучение почвенных горизонтов?
- 2) На какие горизонты делят почву?
- 3) Опишите методику взятия почвенной пробы.
- 4) Что записывают в полевой дневник?
- 5) Имеет ли смысл исследовать пробы почв из более глубоких слоев?
- 6) Опишите способ, предложенный Х. Конном.
- 7) Что представляет собой метод почвенных камер?
- 8) Какой основной плюс метода почвенных камер?
- 9) Опишите метод выращивания микромицетов и других микроорганизмов из почвенной пыли на чистом стекле.
- 10) Что перед выполнением метода выращивания из почвенной пыли на чистом стекле добавляют к почве и зачем?

ГЛАВА 3. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР И ИЗУЧЕНИЯ ПОЧВЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

3.1 Общие сведения о методах выделения микромицетов из почвы

Почвенные микромицеты можно исследовать непосредственно в почве, как было описано ранее или после выделения их из почвы (при росте на искусственных питательных средах). И в том, и в другом случае необходимо наиболее полно выявить и идентифицировать весь видовой состав, обитающий в почве. Существующие методы исследования почвенных микромицетов можно подразделить на две основные группы. К первой группе относятся методы, основанные на выделении микромицетов из почвы путем посева мелких частичек почвы или водно-почвенных суспензии (болтушек), приготовленных из смеси почвы и воды, на питательные микробиологические среды для выращивания грибных культур из различных грибных зародышей, находящихся в почве. Ко второй группе относятся методы, основанные на исследовании микромицетов в условиях их естественного существования в почве. В ранних микологических работах для выделения микромицетов из почвы пользовались главным образом следующими двумя способами:

1. Приготовлением почвенной суспензии в стерильной водопроводной воде с последующим высевом на агаризованную питательную среду в чашки Петри. Впервые этот метод применен Удемансом и Кенингом (Oudemans et Koning, 1902).

2. Непосредственным посевом небольших комочков исследуемого образца почвы на агаризованные питательные среды в чашке Петри. Впервые этот метод применил Хагем (Hagem, 1908).

Положительная сторона методов первой группы заключается в том, что они позволяют выделить микромицеты в культуры, выращиваемые на различных искусственных питательных средах, которые в дальнейшем возможно идентифицировать до вида. Отрицательная сторона указанной группы методов

выражается в их ограниченной способности к выделению всех форм исследуемых объектов, обитающих в почве. Почвенные плесневые микромицеты, выращиваемые в лабораторных средах, развиваются в условиях, весьма несхожих со средой их существования в природе. Значительная часть их не способна развиваться на лабораторных средах, и поэтому они остаются вне поля зрения исследователя. При их выделении рекомендуется одновременно пользоваться указанными выше двумя основными методами первой группы. При пользовании способом «сухого», или «непосредственного» посева на поверхность питательной агаровой пластинки и чашки Петри засеивается мелкая измельченная почва в количестве 10—15 мг с кончика скальпеля путем его встряхивания, по возможности равномерно. В другие чашки почву можно разложить по агаровой пластинке пинцетом отдельными небольшими комочками. В среднем засев почвы производится в 6—8 чашках Петри. При пользовании способом разливки предварительно изготовленная водная почвенная суспензия высевается на поверхность агаровой питательной среды или вносится в ее толщу. При этом взятая почва подвергается намачиванию в стерильной воде в течение 30 мин. с последующим тщательным встряхиванием в течение 20 мин. Количество воды во много раз больше навески. При помощи методов второй группы удается фиксировать природные группировки почвенных грибов, выявить и исследовать почти все формы грибов, обитающих в почве. Полное сохранение биоценоза всех микробных организмов, обитающих в почве, и в том числе микромицетов, является наиболее положительной стороной этой группы методов исследований. При применении методов второй группы возможность выделения грибов в чистые культуры очень ограничена. Существенный недостаток этих методов состоит в том, что при их применении не представляется возможным произвести точную видовую идентификацию грибов, обнаруженных в почве. Ниже проводится детальное описание способов первой группы методов.

3.2 Метод разведений

При микологических анализах почвы следует брать не менее 3—4 образцов и каждый из них высевать на 3–5 повторных чашек Петри для каждой из сред. Посев почвы производят в виде водно-почвенных суспензий в разведениях 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000 и т. д. в зависимости от типа, состояния, влажности почвы и т. п. Наиболее точный подсчет получается, если на чашке с агаром развивается от 30 до 50 колоний грибов. При более разреженном или, наоборот, более густом посеве почвы при подсчете на 1 г абсолютно сухой почвы результаты окажутся сравнительно менее точными. Обычно первую исходную водно-почвенную суспензию делают из расчета 10 г почвы на 90 мл воды. Предварительно перед посевом почвы на агаровые питательные среды рекомендуется взятую навеску почвы в 10 г поместить в стерильную фарфоровую чашку или ступку и тщательно растереть. Перед посевом изготавливают для каждого образца по две стерильные колбочки (Эрленмейера) емкостью 250 мл. Одна содержит 90 мл воды, другая остается пустой. Почва перед растиранием в ступке увлажняется водой из первой колбы и после растирания переносится во вторую. Колбу с водно-почвенной суспензией встряхивают в течение 5 мин., затем суспензии дают отстояться в течение 30 сек., чтобы осели на дно крупные минеральные частицы, которые могут в дальнейшем затруднить поступление суспензии в пипетки. После этого готовят различные разведения водно-почвенной суспензии для посева на питательный агар. После взбалтывания водно-почвенной суспензии и последующего отстаивания в течение 30 сек., из колбы стерильной пипеткой переносят 1 мл суспензии в пробирку с 9 мл стерильной воды. Суспензию в этой пробирке с помощью новой стерильной пипетки тщательно перемешивают, трижды вбирая и выпуская из нее взвесь, и 1 мл данной суспензии переносят в следующую (вторую) пробирку, содержащую также 9 мл стерильной воды. И, наконец, из последних разведений производят посев водно-почвенной суспензии на питательный агар. На поверхность агара обычно наносят одну каплю водно-почвенной суспензии; с

помощью стеклянного стерильного шпателя ее распределяют по всей поверхности агаровой пластинки в чашке Петри. Таким образом, для каждого нового разведения необходимо брать отдельную чистую стерильную пипетку. Предварительно необходимо измерить размер капель пипеток и отобрать пипетки с одинаковой величиной капли. На каждый посев необходимо также употреблять по одному стерильному шпателю. Обычно водно-почвенные суспензии из различных разведений, большей частью из разведения 1 : 10000, в количестве 0. 1 или 0. 2 мл наносят на поверхность немного подсушенного питательного агара каждой чашки Петри. Для учета и выделения грибов рекомендуется делать посев водно-почвенной суспензии не на поверхность застывшего агара, а вносить почвенную суспензию в количестве 0. 5 (до 1. 0) мл непосредственно в растопленную толщу неостывшего, но не очень горячего агара, имеющего температуру около 40—45°С и разлитого по 25—30 мл в чашки Петри. При разливке агара необходимо стремиться к тому, чтобы на крышке агара не конденсировалась вода. После внесения суспензии путем легкого покачивания чашки Петри добиваются равномерного распределения водно-почвенной суспензии по всему слою растопленного агара. Следует заметить, что такой способ исключает возможность разрушения мицелия микромицета на отдельные маленькие участки (обрывки), которое может иметь место при растирании эмульсии на твердом агаре с помощью шпателя. Развитие колоний микромицетов в толще агаровой пластинки в чашке Петри происходит постепенно, что облегчает их выделение в отдельные культуры. Засеянные чашки Петри помещают в термостат при температуре 23—25°С не менее чем на 10—15 суток; через каждые 5 суток рекомендуется просматривать колонии исследуемого объекта и производить их учет. Следует подсчитывать как общее количество колоний, так и количество каждого типа колоний с отливкой их в пробирки на косяки с питательной агаризованной средой.

Для посева на каждый почвенный образец необходимо подготовить следующее:

- 1) колбу (Эрленмейера) объемом 250 мл с 90 мл стерильной водопроводной воды;
- 2) такого же объема стерильную пустую колбу на случай, если посев производят с предварительным растиранием почвенной суспензии;
- 3) стерильную фарфоровую трубку для растирания почвы;
- 4) пробирки с 9 мл стерильной водопроводной воды; обычно заготавливают от 3 до 5 пробирок с водой на каждый посев;
- 5) стерильные мерные пипетки 1—2 мл; количество пробирок и пипеток определяется тем, какое разведение необходимо приготовить для посева исследуемой почвы; пипетки надо отобрать обязательно одинакового размера;
- 6) стерильные шпатели;
- 7) стерильные чашки Петри;
- 8) стерильные питательные среды.

Описанный выше метод «разведения» пригоден главным образом для учета почвенных микромицетов и бактерий. Вообще количественный учет микромицетов в почве менее совершенен, чем учет бактерий, однако он все же осуществляется этим методом с последующим посевом на агаровые среды. Но надо иметь в виду, что учет микромицетов по методу «разведения» охватывает не только различные споры (конидии), хламидоспоры и другие генеративные образования, но и отдельные части многоклеточных спор, обрывки (фрагменты) гиф, различные структурные фрагменты вегетативного мицелия, мицелиальные шнуры и т. п., способные в соответствующих условиях дать начало развитию новых грибниц и формированию колоний почвенных объектов исследования. Ко всем грибным зачаткам, или зародышам, независимо от их морфологической структуры иногда применяют термин «диаспора». Таким образом, количественный учет микромицетов по методу «разведений» почвенной суспензии и последующего посева на твердые питательные среды позволяет судить об общем числе грибных зародышей — диаспор в весовой единице почвы, т. е. составить относительное представление о степени заселенности исследуемого образца почвы микромицетами. Подсчитав количество

образовавшихся колоний на всех повторных чашках Петри, определяют среднее количество колоний на одной чашке и затем осуществляют пересчет па 1 г сухой или абсолютно сухой почвы по формуле:

$$a = \frac{б \times в \times г}{д}$$

где а — количество микромицетных зародышей (диаспор) в 1 г сухой почвы; б — среднее количество колоний на чашке; в — разведение, из которого сделан посев; г — количество капель в 1 мл суспензии; д — вес почвы, взятой для анализа. ⁴ Следовательно, существующие методы позволяют характеризовать численность микромицетов в почве не количеством колоний на искусственных питательных средах, а количеством обнаруженных видов. Имеются сведения, что характер распределения микромицетных спор менее однороден (равномерен), чем бактерий. Например, в смежных почвенных образцах, взятых на расстоянии не более 1 м друг от друга, можно обнаружить соотношение микромицетов, как 1:2. Поэтому для таких количественных анализов необходимо тщательно готовить среднюю почвенную пробу из 3—4 образцов при большом количестве повторностей. Если в почве явно преобладают какие-либо быстрорастущие микромицетов, как например виды р. *Penicillium*, то следует прибегать к более высоким разведениям почвы в водных суспензиях и производить высев на различные питательные среды, и в особенности на «голодные» среды, содержащие незначительное количество питательных веществ. На средах, богатых питательными веществами, как например на агаризованном неохмельненном пивном сусле (сусле-агаре), картофельном агаре и Чапек-агаре, обычно пышно развиваются быстрорастущие плесневые почвенные микромицеты из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* и других, являющиеся в некотором смысле космополитами. На «голодных» средах все формы микромицетов развиваются сравнительно медленно и скудно, поэтому не наблюдается картины, при которой одни виды микромицетов «забивают»

⁴ Звягинцев, Д.Г. Изучение почвы как компонента биогеоценоза. Программы и методы биогеоценологических исследований. М: Наука. 1966. 102 с.

другие; каждый вид развивается в виде небольшой колонии, отчетливо отграниченной от других растущих колоний. Рекомендуется водные почвенные суспензии высевать на следующие среды: сусло-агар, Чапек-агар (среды, богатые питательными веществами) и на агар с почвенной вытяжкой, водный агар и на агар с разведенным в 8—10 раз суслон (среды, бедные питательными веществами). На «голодные» среды лучше непосредственно высевать почву в виде мелких частичек. На агаре с почвенной вытяжкой или на водном агаре большинство микромицетов развивается медленно, размеры их колоний очень невелики, иногда не превышают 2—3 мм в диаметре. Даже микромицеты, начинающие сразу энергично развиваться на этих «голодных» средах, все же не захватывают всей площади поверхности агаровой пластинки в чашке Петри. Значительная часть площади агара остается не заросшей ими. Через 10—14 суток (иногда более) после посева почвы на агар постепенно появляются мелкоточечные колонии особенно медленно произрастающих микромицетов. Они развиваются на свободных участках агара. При выращивании микромицетов на агаре с почвенной вытяжкой и других «голодных» средах удается выделить наибольшее разнообразие видов грибов. Как правило, на почвенном и водном агарах колонии грибов хорошо отделены друг от друга, что благоприятствует их выделению в чистые культуры. Надо иметь в виду, что при посеве почвенных суспензий или почвенного мелкозема на питательные микробиологические среды необходимо принять меры для предупреждения развития почвенных бактерий.

3.3 Метод выращивания микромицетов на мембранном фильтре

Существует метод производить посев водно-почвенной суспензии на мембранный фильтр. Для этого берут почву, просеянную через сито, и помещают в термостат при 23°C на 24 часа. Из просушенной почвы и стерильной воды приготавливают суспензию определенного разведения. 100 мл суспензии с помощью электрического вакуума пропускают через молекулярный

мембранный фильтр, который после фильтрации суспензии помещают на питательную агаровую среду. Рекомендуется брать среду, пригодную для роста микромицетов с низким значением $pH = 4.0 - 3.8$.

3.4 Метод почвенных пластинок

Метод почвенных пластинок представляет собой следующее: на дно чашки Петри необходимо нанести тонким слоем размельченную почву в смеси со стерильным песком и сверху заливать ее расплавленным питательным агаром. В качестве среды рекомендуется использовать подкисленный Чапек-Докс-агар с 0.5%-м дрожжевым автолизатом. Подкисляют среду до $pH = 4.0$. При осторожном встряхивании и вращении чашки Петри находящаяся в ней смесь почвы и песка равномерно распределяется по всей толще расплавленного агара. Если почва сухая и уплотненная или с большим содержанием глины, то лучше ее смешать с несколькими каплями стерильной воды. В одну чашку Петри обычно вносят от 0.005 до 0.15 г почвы. Данный метод по сравнению с методом «разведений» водно-почвенной суспензии позволяет выявить большее разнообразие микромицетов, находящихся в почве. Метод почвенных пластинок лишен недостатков метода прямого посева (инокуляции), при котором вокруг комочков почвы образуется водная пленочка, способствующая росту бактерий даже на кислых агаровых средах. Однако данный метод все же имеет существенный недостаток, который заключается в том, что при исследовании почв, значительно заселенных микромицетами, колонии их будут возникать и развиваться на питательных средах как из гиф мицелия, так и из спор, находящихся в почве, при этом быстрорастущие виды микромицетов обычно «забивают» медленно растущие.

3.5 Метод выделения микромицетов из мицелия

Так же существует еще один метод, предназначенный для выделения микромицетов, находящихся в почве в виде мицелия. Метод состоит в следующем: в стакан насыпают 1. 0—1. 5 г почвы и сильной струей воды наполняют его. Затем образовавшейся водно-почвенной суспензии дают осесть в течение 4—5 мин., воду сливают и суспензию вновь промывают, повторяя это несколько раз, пока она не станет совсем прозрачной. Осевшие частицы почвы распределяют в малом количестве воды, переносят в чашки Петри и обследуют через микроскоп. Обнаруженные отдельные гифы очищают от частиц почвы, помещают в чистые стерильные чашки и заливают расплавленным питательным агаром, который равномерно распределяют по всей чашке. Чашки ставят в термостат при температуре 20—23°C. Через 2—3 суток производят первый просмотр и подсчет выросших на агаре колоний микромицетов. Следующие просмотры производят на 5—8—10-е сутки. Подсчет количества колоний микромицетов ведут с нижней стороны чашки Петри; маркером в виде 30 отдельных точек отмечают учтенные колонии. Из сформировавшихся колоний делают отсева на свежие косяки агара. Этим методом удастся выделять микромицеты, которые не изолировались другими методами.

3.6 Метод определения численности микромицетов в почве

По некоторым литературным данным можно сделать вывод, что метод прямого посева почвенных комочков на питательные агаризованные среды в отличие от метода посева водных почвенных суспензий лучше способствует выявлению видов микромицетов, находящихся в почве в виде активного мицелия. Посев почвы в этом случае производят на подкисленный агар (до pH = 3.8—1.16); при меньшей степени кислотности вокруг комочков почвы будут энергично и обильно развиваться различные бактерии. Следует иметь в виду, что небольшая часть почвенных микромицетов культивируется плохо или совсем не

культивируется при низком значении рН; оптимальные условия для их развития — щелочная или нейтральная среда. В этих случаях питательную среду нельзя искусственно подкислять, в нее вводят специальные ингибиторы и, в частности, различные антибиотики для предотвращения развития сопутствующих бактерий. Для исследования почвенной микрофлоры можно с известным успехом пользоваться методом проращивания мелкозема на агаризованной воде, предложенным Д. М. Новогрудским. Вместо искусственных питательных сред, избыточно снабженных азотом и органическими соединениями, используются бедные питательные субстраты. Основной средой, применяемой при этом методе, является агаризованная вода, т. е. водопроводная вода с агар-агаром (вода, содержащая 1. 5—2. 0% агар-агара). На поверхность ее непосредственно высевают почвенный мелкозем. Водно-почвенные суспензии при их изготовлении смещают и глубоко изменяют группировки микробов, характерные для данной почвы, ее состояние в момент анализа. Вследствие малого количества питательных веществ развивающиеся микромицеты образуют преимущественно микроскопические формы роста вокруг почвенных частиц и на их поверхности. Взятый образец почвы доводят до воздушно-сухого состояния, после чего его растирают в ступке деревянным или каучуковым пестиком и просеивают через мелкое сито с отверстиями 0, 25 мм. Просеянный образец почвы Д. М. Новогрудский называет мелкоземом. В весовой стаканчик отвешивают 50 мг мелкозема, который тотчас же переводят в стерильную посевную вороночку, закупоренную ватной пробкой. Вороночка представляет собой стеклянную трубочку длиной 10 см и шириной 0. 8—1. 0 см, нижний конец которой сужен и снабжен краном. Подобные вороночки можно изготовить из бюреток, срезав нижнюю часть их на расстоянии 8—10 см выше крана. Таких вороночек полезно иметь несколько. После каждого употребления их промывают и стерилизуют. Субстратом для посева служит агаризованная вода. 15—20 г агар-агара расплавляют на водяной бане в 1 л водопроводной воды и разливают в маленькие колбочки по 20—25 мл, которые стерилизуют в автоклаве при давлении в 1, 5 атм. в течение 40 мин. Стерильную агаризованную воду

разливают в чашки Петри. Посев мелкозема производят следующим образом. При их применении часть микроорганизмов подвергается десорбции, а другая, значительно большая, остается на частичках почвы и поэтому ускользает от общего учета; многократное взбалтывание суспензии разбивает и расчленяет грибные гифы на множество отдельностей. Непосредственный высев почвенного мелкозема на агаризованную воду устраняет вышеуказанные недостатки, в частности явление адсорбции микроорганизмов частичками почвы. При непосредственном высеве почвенного мелкозема на агаризованные пластинки почвенные грибы развиваются за счет примесей питательных элементов, которые могут содержаться в агар-агаре, а также в самих частичках почвы. Держа посевную вороночку в горизонтальном положении, открывают ее кран, затем приподнимают крышку чашки Петри и равномерными движениями покачивают вороночку над поверхностью агаризованной воды. Вороночку с мелкоземом держат при этом слегка наклонно, благодаря чему частички почвы высыпаются медленно и постепенно. При правильном посеве частички почвы равномерно распределяются на агаризованной пластинке, не образуя кучек. Равномерного высева мелкозема легко достигнуть, если последний находится в воздушно-сухом состоянии, а стенки посевной вороночки — сухие. Так как мелкозем не высыпается свободно через узко оттянутый конец вороночки, а собирается в нем и даже закупоривает его, при покачивании посевной вороночки необходимо слегка ударять по ней. По окончании высева необходимо убедиться, что вся навеска распределена по поверхности агаровой пластинки. Почва частично может застрять в узком проходе воронки или в отверстии ее крана. В таком случае воронку опрокидывают концом вверх и легким постукиванием переводят застрявшие частицы в широкую часть воронки. Отсюда их высевают так, как уже было описано. Посев мелкозема можно производить более упрощенным способом, используя металлическое ситечко с диаметром 0,25 мм. Ситечко стерилизуют над пламенем спиртовки, затем его помещают в стерильную чашку Петри и дают полностью остыть. В ситечко насыпают немного сухой, предварительно растертой в фарфоровой ступке почвы и

взвешивают. Посев производят так, чтобы частички почвы были равномерно распределены по всей поверхности агаровой пластинки. После посева ситечко с оставшейся почвой снова взвешивают и по разности веса определяют количество почвы, засеянной на агар. На каждую чашку Петри высевают обычно 50—100 мг почвы. Навеску почвы менее указанного веса брать не рекомендуется, так как при пересчете это может привести к значительным погрешностям. Чашки Петри помещают в термостат при температуре 18—22°C. Вокруг почвенных частиц после попадания на поверхность агара образуются своеобразные пленки из микроорганизмов. Вследствие небольшого количества питательных веществ развивающиеся микромицеты образуют преимущественно микроскопические формы роста вокруг почвенных частиц на поверхности. Изучение организмов, которые развились, ведут под микроскопом, используя объективы 10х, 20х и 40х. Открытую чашку Петри помещают на столик микроскопа. Сначала рассматривают почвенные частицы и микроорганизмы при малом увеличении. При общем осмотре различают основные группы микроорганизмов. Затем переходят к более подробному рассмотрению отдельных частичек почвы при среднем увеличении микроскопа. Обращают внимание на строение гиф, конидиеносцев и конидий, однако использование всей агаровой пластинки для микроскопических наблюдений связано с рядом неудобств (опасность загрязнения и высыхания пластинки, невозможность фиксирования всех ее участков, неудобство рассмотрения пластинки в проходящем свете). Указанные затруднения устраняются, когда для наблюдения вырезают из агаровой пластинки с помощью стеклянной трубки или пробочного сверла отдельные небольшие кружочки. Для фиксации агаровых кружочков их обрабатывают смесью Меркеля, состоящей из равных частей 1:1 25%-й хромовой кислоты и 25%-й хлористой платины. Несколько капель этой смеси наносят на поверхность агарового кружочка и через 15—30 мин. промывают водой. Для окрашивания фиксированные агаровые кружочки погружают на 30—60 мин. в разведенный раствор карбол-эритрозина (к 5%-му раствору карболовой кислоты добавляют 1 г эритрозина; перед окраской 1 мл исходного раствора краски разбавляют 100 мл

воды). Для количественных учетов наиболее удобна навеска в 50 мг почвенного мелкозема. Количественный учет микромицетов производят начиная с 1—2 суток после посева. Каждый количественный учет производят на пяти агаровых кружочках диаметром 1 см. Один кружок вырезают в центре пластинки, а четыре — по двум взаимно перпендикулярным диаметрам. Агаровые кружочки после перенесения на предметные стекла разрезают лезвием безопасной бритвы пополам, а затем каждую половинку еще на две доли параллельно первой линии разреза. В итоге весь агаровый кружочек оказывается разрезанным на четыре доли. При помощи того же лезвия каждую дольку разделяют на три полоски. Каждая полоска умещается в поле зрения при малом увеличении, что позволяет систематически просматривать одну полоску за другой, а в пределах каждой из них — исследовать каждую почвенную частицу и отмечать, какие микромицеты развиваются в ее сфере. Полученное непосредственным подсчетом на пяти агаровых кружках число почвенных частиц, засеянных данным организмом, пересчитывают на 1 г почвы. Недостаток этого метода в отношении количественного учета микроорганизмов заключается в том, что обрастание частиц почвы может обуславливаться не одной клеткой, а большим количеством клеток, которые находились на частицах в адсорбированном состоянии. Наблюдения за развивающимися на частичках почвы микромицетами в условиях агаризованной воды показывают, что они: 1) большей частью не различаются невооруженным глазом или различаются в виде небольших микроскопических колоний; 2) обладают упрощенной структурой и нередко состоят только из одной или немногих гиф, стерильных или образующих конидиальное плодоношение; 3) размеры как вегетативных, так и репродуктивных элементов гриба, как правило, редуцированы, т. е. толщина гиф, длина конидиеносцев, размеры и число конидий всегда меньше, чем у тех же форм на обычных питательных средах. Зная количество микроорганизмов на 5 кружках, можно определить количество их в 1 г почвы (x) по формуле:

$$X = \frac{A \times C}{5B \times D}$$

где А — количество колоний на 5 кружках агара; В — площадь кружка (в см); С — площадь агаровой пластинки в чашке Петри (в см); D — навеска почвы (в г). Метод высева почвенного мелкозема на агаризованную воду выявляет не только больше микромицетов, чем метод «разведения», но и большее их видовое разнообразие. Отмечено, что этим способом удавалось обнаруживать в почве грибы, редко выделяемые (*Acrothecium*, *Hyalopus*, *Helminthosporium* и *Dictyostelium*). Недостаток этого метода в том, что при его применении все же учитываются главным образом быстрорастущие виды микромицетов, возможно находящиеся в почве в активном состоянии. На основании нашего опыта все подобные методы могут быть использованы и для выделения медленно растущих микромицетов. Чем меньше по величине комочек почвы, посеянный на «голодный» агар, тем хуже развиваются быстрорастущие виды. Так, например, при посеве водной почвенной суспензии с очень мелкими комочками на «голодный» агар обычно наряду с быстрорастущими видами постепенно развиваются и медленно растущие виды микромицетов. Если же почвенные комочки очень крупные, до 1 мм и более, на «голодном» агаре развиваются главным образом быстрорастущие виды микромицетов. При пользовании методом «проращивания мелкозема» на поверхности агара вокруг крупных и средних почвенных комочков часто образуются пленки, толщина которых зависит от их величины. При тщательном изучении этих пленок под микроскопом можно в течение 1—2 суток видеть развитие гиф мицелия микромицетов, главным образом из быстрорастущих видов; через сутки—двое, т. е. на 3—5-й день происходит массовое развитие бактерий и на 10—12-е сутки — актиномицетов. С помощью этого метода удастся выявить ряд форм микромицетов, плохо или совсем не развивающихся на обычных искусственных средах, богатых питательными веществами. Преимущество метода, в том, что микроорганизмы развиваются вблизи почвенных комочков как в естественных условиях. С его помощью возможно получить ценные сведения о морфологических особенностях почвенных микроорганизмов. Метод Д. М.

Новогрудского также частично можно рассматривать и как метод непосредственного изучения микромицетов в почве.

3.7 Методы ингибирования роста и развития бактерий при совместном их культивировании с микромицетами

При выделении микромицетов из почвы необходимо надежно подавить развитие различных бактерий, сопутствующих их росту. Обычно это достигается установлением кислой среды ($\text{pH} = 3.8\text{—}3.6$), на которую производят высев исследуемой почвы, или добавлением борной кислоты (H_3BO_3) из расчета 3 г на 1 л среды. К избытку борной кислоты весьма чувствительны как бактерии, так и актиномицеты. Однако последнее средство менее надежно, чем первое, при котором бактерии, как правило, не развиваются. Для подкисления среды употребляют лимонную ($\text{C}_6\text{O}_7\text{H}_8$), молочную ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$), фосфорную (H_3PO_4), серную (H_2SO_4) или соляную (HCl) кислоты. В среднем на 1 л агаровой среды добавляют 15–20 мл 0.1н. раствора серной, соляной и фосфорной кислот. Молочную кислоту обычно применяют концентрированную в количестве 4 мл на 1 л среды. Кислоты следует прибавлять в простерилизованные среды. Если их вводить в агаровые среды до стерилизации, то последние после их стерилизации вместе с кислотами не будут уплотняться. Прибавление кислот к агаровым средам после стерилизации (до $\text{pH} = 3.8\text{—}3.6$) не оказывает отрицательного влияния на их способность уплотняться при остывании и превращаться в твердое состояние. В качестве ингибиторов роста бактерий применяют ряд химических веществ, губительно действующих на них. А. Рихтер и А. Вернер использовали роданистый натрий (NaCNS), прибавляя его к агаровой среде в количестве 0.25—0.4 моля на 1 л. Бактерии под влиянием роданистого натрия гибнут. Микромицеты же обладают устойчивостью к воздействию роданитов и поэтому развиваются на искусственных средах в присутствии их. Не изменяет реакцию среды применение в качестве ингибитора бактерий красителя «бенгальский розовый» и ряда антибиотиков. Краситель

«бенгальский розовый» употребляется в концентрации 70 мг/л среды (т. е. в концентрации 1: 15 000 до 1:30 000), а антибиотики в следующих концентрациях: стрептомицин-сульфат - 40—50 мг/л среды, или 30—40 активных единиц на 1 мл среды; натрий-пенициллин — 40 активных единиц на 1 мл среды; тетрациклин, окситетрациклин, хлор- тетрациклин — 2—5 мг на 1 л; неомицин, полимиксин, бацитрацин — 50 мг/л среды. К применению антибиотиков и красителя «бенгальский розовый» следует прибегать в том случае, когда из почвы необходимо выделить микромицеты, которые нормально развиваются на среде с нейтральной ($pH = 7.0$) или щелочной ($pH = 7.2—7.8$) реакцией и не могут развиваться на кислых средах, и в особенности на средах с $pH = 4.0—3.8$ или 3.6. При высеве почвы на кислые среды не удастся выделить все виды микромицетов, в том числе те из них, которые не в состоянии развиваться на столь сильно кислых средах. При внесении антибиотиков в питательные среды, используемые под высевы почвы, последние можно не подкислять. В этом случае питательные среды могут быть или нейтральными, со значением $pH = 7.0$, или слабокислыми, с $pH = 6.8—6.5$. Абсолютное большинство почвенных микромицетов хорошо развивается на нейтральных или слабокислых средах. Было предложено применять краситель «бенгальский розовый» (70 мг/л среды) в сочетании со стрептомицином (30 мг/л среды). Добавление антибиотиков производится асептически. Их обычно вносят после окончания стерилизации и последующего охлаждения питательной агаровой среды до $45^{\circ}C$ или жидкой среды до $25—30^{\circ}C$.

3.8 Метод стекол обрастания

Широко распространенным способом изучения микробов в почве является метод стекол обрастания Н. Г. Холодного и его модификации, предложенные разными авторами. Особенность данного метода заключается в том, что в почву вносят чистые предметные стекла, поверхность которых вскоре покрывается почвенными коллоидами, на которых почвенные микроорганизмы развиваются

в условиях, близких к естественным. Предметные стекла перед закладкой в почву тщательно очищают и обезжиривают, выдерживая их в концентрированной серной кислоте, и затем отмывают в 1%-м растворе соды и в дистиллированной воде. На поверхности почвы делают вертикальный разрез ножом и в него вставляют предметное стекло. Стекло сверху засыпают той же почвой и около него ставят какую-нибудь вежу. При необходимости установки стекол в различные почвенные горизонты пользуются специальными разрезами (ямами). Стекла вставляют начиная с нижнего горизонта по направлению к верхнему. В исследуемом горизонте вначале готовят соответствующую нишу, которую выкапывают параллельно поверхности почвы, глубиной в 6—10 см. Стамеской сверху стекло немного прижимают нижней поверхностью к почве. К нижней стороне стекла нельзя прикасаться никакими предметами, так как она будет в дальнейшем подвергнута микроскопическому исследованию. Необходимо по возможности сохранить естественное сложение почвы. В каждом горизонте всегда ставится несколько стекол. После установки стекол ниша закапывается ранее вынутой из нее почвой. Установленные в почве стекла экспонируются от нескольких дней до месяца, иногда немного более. Продолжительность пребывания стекол в почве зависит от ряда конкретных условий, и прежде всего от температуры и влажности почвы. В теплую влажную погоду иногда достаточно 2—3 суток; в холодную и засушливую погоду обрастание стекол происходит медленно, и поэтому время нахождения их в почве увеличивается во много раз, примерно до нескольких недель и даже месяца. Обычно стекла вынимают из почвы через каждые 3—5 суток с тем, чтобы иметь возможность наблюдать за изменениями, происходящими в сообществе почвенных микроорганизмов. По истечении срока экспозиции стекла извлекают так, чтобы не повредить биоценоз микроорганизмов на их нижней стороне. Нельзя допускать скользящего движения стекла по почве, так как при этом развившиеся на стекле различные микроорганизмы могут механически счищаться с его поверхности. Перед тем как вынуть стекло из ниши, необходимо удалить почву с его верхней стороны, т. е. с той стороны,

которая не будет подвергаться микроскопированию; почву удобно счищать ножом. Затем, быстро подняв стекло, его вынимают из почвенной ниши. После очистки почвы ножом верхнюю сторону стекла еще дополнительно обтирают ватой. Нижнюю сторону стекла вначале подсушивают на воздухе, а затем осторожно фиксируют на пламени спиртовки, чтобы убить микроорганизмы и одновременно укрепить их связь со стеклом. Фиксацию также можно осуществлять в парах осмия. После фиксации удаляют приставшие к стеклу крупные частицы почвы, которые могут мешать микроскопированию препарата. Для этого стекло нижней стороной (т. е. мазком) вниз опускают в стакан с водой на 1—2 мин. При этом от поверхности предметного стекла отделяются крупные частицы почвы. Вынув стекло из воды, его дополнительно промывают под струей водопроводной воды из-под крана для удаления мелких частиц почвы, которые безусловно мешали бы микроскопированию. Наконец, препарат ополаскивают дистиллированной водой. После промывания его окрашивают карболовым эритрозином (1%-й раствор эритрозина в 5%-й карболовой кислоте) в течение 30 мин., иногда и более в зависимости от качества красителя. Стекла, залитые красителем, помещают в кристаллизатор, закрытый крышкой или стеклом, или в иные влажные камеры, так как во время окраски стекла не должны высыхать. Препарат после окраски подсушивают и микроскопируют. Изучение препарата лучше осуществлять с использованием масляной иммерсии. На стеклах обрастания при их микроскопировании представляется возможным, в относительной степени, дифференцировать плесневые грибы, актиномицеты, бактерии и микроскопические почвенные водоросли. Метод Н. Г. Холодного позволяет наблюдать всю почвенную микрофлору в ее естественном состоянии. Он как бы «фотографирует» или производит «отпечаток» микрофлоры и почвы, и в этом состоит основное его преимущество по сравнению с другими методами. Однако этот метод имеет и существенные недостатки, которые заключаются прежде всего в том, что поверхность стекла, прижатого к почве, вызывает местное скопление влаги, что может явиться причиной усиленного размножения бактерий в данном месте, а также избирательного прохождения гиф. Кроме

этого, на основании только визуальной картины, наблюдаемой под микроскопом, невозможно полностью идентифицировать и выделить непосредственно в чистую культуру различные формы микроорганизмов. Метод стекол обрастания не позволяет получить достаточно достоверных количественных показателей численности микробного населения исследуемого образца почвы.

Различные варианты метода стекол обрастания

Л. П. Крючкова покрывала питательным агаром стекла обрастания после извлечения их из почвы. Часть микроорганизмов, развившихся на стекле, потом прорастала на питательный агар, покрывший стекло. Другие ученые покрывали питательным агаром стекла перед установкой их в почву. Торнтон предложил метод экранизированных погруженных стекол. Сущность его состоит в том, что через отверстия в стекле-экране проникают только формы микромицетов, находящихся в почве в состоянии активного мицелия. Для этого готовят специальную прямоугольную стеклянную камеру размером 10х4 см. Сверху ее покрывают стеклом-экраном толщиной в 1 мм с 10 отверстиями диаметром по 5 мм. На дно камеры помещают предметное стекло, которое плотно прилегает к ее стенкам. Камеру вместе со стеклом-экраном и предметным стеклом предварительно стерилизуют. После стерилизации на стекло наливают 8 мл растопленного стерильного водного агара, отверстия в стекле-экране закрывают стерильными покровными стеклами. Доставленную в поле камеру освобождают от покровных стекол и помещают в почву. Через 7—10 суток камеру извлекают из почвы; стекло с агаром, находящееся внутри нее, вынимают и просматривают под лупой и микроскопом. Из обнаруженных колонии выделяют культуры микромицетов в пробирки со скошенным агаром. Так же предметные стекла обрастания, извлеченные из почвы, помещали нижней стороной, где фиксировались микроорганизмы, на агар Чапека с добавлением 2%-го дрожжевого экстракта и затем просматривали под микроскопом. Другие

исследователи помещали в почву стекла со слоем агаризованной питательной среды, уложенные в стерильные целлофановые пакетики с отверстиями. Это предохраняет питательную среду от грубых механических повреждений при извлечении стекол из почвы.

3.9 Метод стеклянных иммерсионных трубок

Были предложены для выделения из почвы плесневых микромицетов использовать специальные трубочки, подобные пробиркам, но имеющие в нижней своей части несколько маленьких отверстий по 0.5 мм в диаметре, наполненные почти наполовину питательным агаром. Автор предложил четыре типа трубочек:

1-й тип. Трубочка длиной 15 см и шириной 2 см с 9 отверстиями, расположенными на спирали; края отверстия должны быть вровень со стенками трубочки.

2-й тип. Трубочка такого же размера с 6 наружными отверстиями, которые ведут к конусообразным внутренним капиллярам длиной 2 мм.

3-й тип. Трубочка вставлена и наружную трубку большего диаметра.

4-й тип. Трубочка длиной 10 см и шириной 2.5 см; конец трубочки конусовидно-луковичный, имеющий 3—4 отверстия, расположенных на одном уровне.

Общие указания к применению иммерсионных трубок

Трубочки перед употреблением вначале стерилизуют, а затем почти наполовину заполняют растопленным стерильным питательным агаром, охлажденным до 50° С. Трубочки, наполненные питательной средой, помещают в другие стерильные трубки (контейнеры) большего размера и в таком виде доставляют в поле. Там иммерсионные трубочки вынимают из контейнеров и вставляют в почву на нужную глубину сроком от 7 до 14 суток. По истечении срока трубочки быстро вынимают из почвы и помещают в новые стерильные

контейнеры, которые доставляют в лабораторию. Содержимое трубочек извлекают стерильной иглой и вносят в стерильную чашку Петри. Колонии, образовавшиеся на агаре против отверстий капилляров, отсевают в пробирки со свежей питательной средой. Данный метод рассчитан на то, что через капилляры в стенках трубочек проникает только активно растущий мицелий почвенных микромицетов.

3.10 Метод стекол-ловушек Ля-туш

Данный метод, предложенный Ля-Туш (La Touche, 1948), принципиально сходен с методом стеклянных иммерсионных трубок Честерса, но несколько упрощен. При этом методе используют два стерильных предметных стекла с луночками для висячих капель. Стекла-ловушки по Ля-Туша и по Сьюэллу стекла заполняют питательным агаром и затем оба стекла соединяют так, чтобы одна лунка располагалась прямо над другой. Стекла плотно прижимают друг к другу и закрепляют скрепками. В таком виде их вставляют в почву и выдерживают в ней определенное время, примерно от двух до трех недель. После этого стекла извлекают из почвы и просматривают под микроскопом. Активно растущий мицелий проникает между стеклами и достигает агара. Автор отмечает, что под микроскопом легко проследить строение мицелия и репродуктивных органов грибов, развивающихся в почве, и выделить их в чистую культуру; бактерии обычно не развиваются. Однако при использовании данного метода в основном выделяются быстрорастущие микромицеты.

3.11 Метод стекол-ловушек Сьюэлла

Этот метод, предложенный Сьюэллом (Sewell, 1956), так же, как и предыдущий, рассчитан на выделение активно растущих объектов в почве, т.е. микромицетов, способных развивать там вегетативный мицелий. Неглубокую стеклянную камеру размером с предметное стекло разделяют на две неравные

части. Камеру стерилизуют и при помощи пипетки на ее дно наносят расплавленный питательный агар. Затем сверху ее прикрывают стерильным предметным стеклом, которое скрепками прочно соединяют с камерой. Камеру, за исключением малой ее части, не залитой агаром, вместе со стеклом в вертикальном положении зарывают в почву. Щель в почве делают заранее стамеской. Камеру для защиты от влаги сверху прикрывают оцинкованным щитком. Гифы микроскопических грибов обычно проникают между стеклом и камерой. По истечении срока камеру извлекают из почвы, агар, находящийся внутри камеры, делят на ряд полосок и подвергают тщательному микроскопированию, при этом удается выделить ряд грибных культур.

3.12 Метод выделения микромицета из одной споры

Для получения культуры микромицета из одной споры, т. е. «моноспоровой культуры», следует заранее приготовить несколько (2—3) пробирок с прозрачной желатиновой средой (лучше всего сусло-желатин), ряд (8—10) пробирок со стерильной водопроводной водой и несколько (4—5) стерильных чашек Петри. Получение чистой «моноспоровой культуры» микромицета возможно лишь при наличии достаточного количества спор на субстрате, пораженном им, или искусственно выращенной культуре микроскопического гриба, ранее изолированной обычными микробиологическими методами из какого-либо объекта, заселенного ими. Из этих источников живого микромицетного материала извлекают небольшое количество спор, вносят их в пробирку, содержащую стерильную воду в определенном объеме, и взбалтывают до получения равномерной водной суспензии (взвеси) спор. Несколько капель данной водной суспензии стерильной петельной иглой наносят на предметное стекло. Под микроскопом просматривают и подсчитывают количество спор, обнаруженных во всех каплях суспензии, и выводят среднее арифметическое число спор для каждой капли. Предположим, что в пяти каплях взвеси было обнаружено десять спор

микробиота, таким образом, в среднем на каждую каплю приходится по две споры. В этом случае необходимо добавить еще один объем стерильной воды, равный ранее содержащемуся в пробирке. После добавления воды в пробирку в каждой извлеченной из нее капле должно будет содержаться в среднем не по две, а по одной споре. Из новой водной взвеси спор петлевой иглой наносят несколько отдельных капель на нижнюю поверхность верхней крышки чашки Петри. Капли располагают на достаточно большом расстоянии друг от друга, но не слишком близко к краю. Затем их просматривают под большим увеличением микроскопа и отмечают маркером те отдельные капли, которые содержат лишь одну спору. К этой отмеченной капле воды с одной спорой микробиота петлевой иглой осторожно добавляют немного расплавленного стерильного питательного желатина (сусло- желатина) для подкармливания развивающегося микробиота. На дно чашки Петри обязательно наливают немного воды для поддержания достаточной влажности внутри нее. Спустя несколько часов следует под микроскопом вести постоянное наблюдение за процессом прорастания споры и последующего развития из нее мицелия микробиота. После формирования небольшой (точечной) колонии ее снимают иглой с поверхности крышки чашки Петри и переносят в пробирку с питательным агаром для дальнейшего развития.

3.13 Метод Линднера

Этот метод основывается на приготовлении разбавленной суспензии культуры в жидкой среде и получении ряда маленьких капелек этой смеси на стерильном покровном стекле. Практически это осуществляется следующим образом: на стерильное покровное стекло наносят стерильным чертежным пером ряд мелких капель из последовательных разведений грибов в жидком сусле. Затем его перевертывают и помещают над лункой стерильного предметного стекла; края покровного стекла смазывают вазелином. При просмотре под микроскопом отмечают капли, содержащие по одной споре. При повторном

просмотре через 12—24 часа отмечают капли, в которых развивалась только одна колония. Содержимое такой капли переносят в пробирку со стерильной питательной средой.

3.14 Метод Линднера-Надсона

Покровное стекло фламбируют (стерилизуют) над пламенем спиртовой горелки, после чего его края обводят специальной мастикой (смесь равных частей парафина и вазелина). На центральную часть стекла наносят плоскую довольно широкую каплю прозрачной среды, содержащей 10% желатин (например, сусло-желатин) или 0, 5% агара. В эту расплавленную каплю вносят платиновой иглой суспензию исследуемого гриба с таким расчетом, чтобы в капле содержалось всего несколько спор (4—5), расположенных изолированно друг от друга на сравнительно отдаленном расстоянии. Затем покровное стекло помещают каплей вниз над лункой предметного стекла и рассматривают препарат под микроскопом, вначале под малым увеличением. При этом увеличении находят ориентиры на препарате и вычерчивают карту их расположения на бумаге. При большом увеличении отмечают отдельные споры или клетки гриба возле ориентиров, нанося их также на карту. Так фиксируют около 5—10 спор в препарате. Последующие наблюдения осуществляют через каждые 10—12 час. Когда отмеченные споры или клетки разрастаются в колонии, хорошо видимые при малом увеличении микроскопа, их снимают с агара и производят обычное выделение чистой культуры пересевом в пробирки с питательной средой.

Вопросы для самоконтроля:

- 1) Опишите метод разведений.
- 2) О чем метод выращивания микромицетов на мембранном фильтре?
- 3) Метод почвенных пластинок.

- 4) Опишите метод выделения микромицетов из мицелия, которые находятся в почве?
- 5) Метод определения численности микромицетов в почве посредством высева почвенного мелкозема на агаризованную воду.
- 6) Опишите метод выделения различных групп почвенных грибов на стерневых отрезках.
- 7) Основные моменты метода подавления бактерий при совместном их росте с микромицетами на искусственных питательных средах.
- 8) Метод стекловосрастания.
- 9) В чем отличие метода Линднера и Линднера-Надсона.
- 10) Опишите методику получения культуры микромицетов из одной споры.

ГЛАВА 4. КЛАССИФИКАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПОЧВЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ

4.1 Питательные среды и их характеристика

Питательные среды делятся на две группы: 1) среды неопределенного состава и 2) среды определенного состава (синтетические). Синтетические среды, имеющие постоянный химический состав, представляют ценность для получения сравнимых данных. Кроме того, питательные среды можно подразделить на: 1) природные и 2) искусственные. К последним относят не только синтетические среды, приготовленные из различных химических соединений, но и среды, изготовленные из различных растений в виде вытяжек, настоев и т.п. По своему составу питательные среды могут быть минеральными и органическими. Для нормального развития микромицетов необходимо, чтобы питательная среда содержала все основные элементы (азот, углерод, натрий, серу, магний и т. д.) и чтобы они были в таких химических соединениях, которые усваивались бы микромицетами. Основу питания почвенных микромицетов составляют углерод и азот. Источниками азота могут служить органические и неорганические соединения — пептон, азотнокислый натрий или калий и др.; источниками углерода — только органические соединения. Из них наиболее распространенными являются углеводы. На чисто минеральных средах микромицетов не развиваются, так как они не могут усваивать углерод из минеральных соединений. Поэтому в любой среде, предназначенной для культивирования микромицетов, должно быть органическое вещество, содержащее углерод. Из минеральных соединений для питания микромицетов необходимы в более или менее значительных дозах натрий, калий, фосфор, сера, магний и др. Кроме того, они подчас нуждаются в дополнительных факторах питания, состоящих из так называемых ростовых веществ и микроэлементов в очень незначительных долях. Для своего развития некоторые микроскопические

грибы также нуждаются в витаминах, которые влияют на их строение, размножение, процессы обмена и другие свойства. Питательных сред для выращивания микромицетов предложено очень много, поэтому придется остановиться только на наиболее употребительных, при применении которых удастся добиться наилучшего развития исследуемых грибов. Совершенно очевидно, что абсолютно универсальной искусственной питательной среды, пригодной для культивирования всех систематических групп грибов, нет. Разнообразие питательной среды также необходимо для выявления различных стадий развития исследуемого объекта. Большинство микроскопических грибов довольно хорошо развивается на многих искусственных микробиологических средах, но имеется значительная их часть, которые отличаются довольно строгой приуроченностью к средам с определенным составом.

Следует заметить, что непригодность той или иной питательной среды для выращивания определенного вида микромицета в условиях чистой культуры легко обнаружить из-за отсутствия его роста. В этом случае обычно производят замену использованной среды другой, имеющей иной состав питательных веществ. Значительно сложнее выбрать питательные среды для высева почвы с целью выявления всего сообщества микромицетов, ее населяющих. Невозможно выявить все видовое разнообразие плесневых микроскопических грибов при высева почвы на одну из известных в настоящее время нескольких десятков питательных микробиологических сред. Универсальной питательной среды для выращивания всех систематических групп микромицетов нет, так как каждая из них предъявляет свои требования к условиям питания. Развитие одних систематических групп может стимулироваться данной средой, других же, наоборот, подавляться. Разные питательные среды обладают различными селективными свойствами к определенным микромицетам. Однако это не отвергает те обязательные условия, которым должны отвечать все питательные среды: они должны быть достаточно питательными, иметь подходящую для роста гриба кислотность (рН), быть абсолютно стерильными и свежеприготовленными. Питательные среды бывают разной консистенции —

жидкие и плотные. Плотные среды изготавливаются путем добавления к жидкому питательному раствору агара в количестве 1. 5—2. 0% или желатина в количестве 15–20%. Агаровые среды употребляют для первоначального выделения и выращивания почвенных грибов при посеве почвы. Желатиновые среды пригодны для изоляции культур гриба из одной споры. В таком случае желатину необходимо профильтровать или еще лучше подвергнуть осветлению, после чего она становится прозрачной, что весьма облегчает микроскопическое рассмотрение препаратов. Для осветления желатиновой среды берут один куриный белок (из расчета на 1 л среды), взбивают его до появления небольшой пены и смешивают с теплой (не горячей!) средой. Полученную смесь вновь подогревают, доводя до кипения, и интенсивно кипятят в течение 15 мин., после чего фильтруют сначала через марлю для удаления крупных сгустков белка, а затем через бумажный фильтр при помощи горячей воронки или в нагретом автоклаве.

4.2 Стерилизация питательных сред

Наиболее надежна стерилизация сред в автоклаве. Она может осуществляться при разных давлениях пара, т. е. при высоких температурах. Следует иметь в виду, что растительные субстраты — картофель, морковь, рис и др., а также ряд веществ — сахара, аммиачные соли, желатин и др., используемые для приготовления питательных сред, подвергаются значительному изменению под воздействием высоких температур, особенно в присутствии кислот. Все эти среды стерилизуют методом дробной стерилизации текучим паром в кипятильнике Коха или в автоклаве при открытом кране (без добавочного давления) в течение одного часа три раза через каждые сутки. При необходимости срочного изготовления сред, содержащих сахара, их можно стерилизовать в автоклаве при повышенном давлении, но не более 0. 5 атм. по показанию манометра (112° С) в течение 30 мин.; картофель, морковь и

некоторые другие естественные субстраты можно стерилизовать при 1 атм. (121°C) в пределах 20 мин.

4.3 Методы культивирования почвенных микромицетов

Для изучения культуральных, морфологических и физиологических особенностей почвенных микроскопических грибов необходимо выращивать их на искусственных питательных средах. Культивирование в лабораторной обстановке позволяет наблюдать за всем циклом онтогенетического развития этих организмов. Кроме того, искусственное выращивание грибов обеспечивает возможность длительного их сохранения в живом состоянии. Известно, что почвенные микромицеты из порядков *Mucorales* и *Moniliales* по усвоению питательных ингредиентов относятся к миксотрофам, для которых источником углерода могут являться лишь органические вещества, содержащие углеродистые соединения. Другие химические элементы, в частности азот, кислород, сероводород, натрий, калий, фосфор и др., усваиваются этими грибами как из органических, так и неорганических соединений. В настоящее время методы выращивания чистых культур почвенных микроскопических грибов достаточно разработаны. Почвенные микроскопические грибы из порядков *Mucorales* и *Moniliales* в отличие от всех других групп можно изучать лишь в том случае, если можно организовать наблюдение за ними в культуре при росте их на искусственных питательных средах. Наилучшими источниками углерода для этих грибов являются различные сахара, в первую очередь глюкоза, мальтоза и сахароза, слабее усваиваются не инвертированные сахара и, в частности, молочный сахар. Многие виды также используют крахмал, спирты, органические кислоты, декстрины и клетчатку. Однако надо иметь в виду, что богатая, но калорийности среда иногда не может обеспечить определенному виду микромицета достаточного углеродного питания из-за отсутствия у него соответствующего фермента, способного расщепить сложное органическое соединение, являющееся единственным источником углерода. Клетчатку как

источник углерода могут использовать лишь формы, обладающие ферментом целлюлазой. Почвенные микроскопические грибы нуждаются в азоте и минеральных элементах. В качестве источника азота они в одинаковой степени хорошо усваивают как органические (белки, аминокислоты и т. д.), так и неорганические соединения (аммиачные соли и соли азотной кислоты). Возможно также усвоение некоторыми формами почвенных грибов свободного азота атмосферы. Для развития микромицетов необходимо присутствие в питательной среде Na, K, S, P и других элементов, используемых в форме различных солей в водных растворах. Кроме того, им необходимы некоторые металлы, например Zn, Fe, Cu и др., усваиваемые в виде микроэлементов, особенно при выращивании их на синтетических минеральных средах. Перечисленные химические элементы в определенных соединениях обуславливают жизненно необходимые их функции. Так, например, сера является активатором различных обменных реакций, фосфор входит в состав гексозофосфорных эфиров — промежуточных продуктов дыхания и брожения, калий принимает участие в синтезе белков и углеводов, входящих в состав ткани микромицета, железо играет роль катализатора в процессе дыхания, цинк стимулирует рост, магний участвует в распаде сахаров, и т. д. Следует отметить, что в продуктах животного и растительного происхождения находится достаточное количество разнообразных микроэлементов, поэтому при приготовлении таких сред, как сахарный мясо-пептонный бульон, растительные отвары и т. п., можно не добавлять специального набора солей, содержащих микроэлементы. Известное количество микроэлементов, вполне достаточное для нормального роста микромицетов, содержится также и в водопроводной воде. Некоторые почвенные микроскопические грибы слабо развиваются на синтетических средах, составленных из чистых химических реактивов, или совсем лишены этой способности, и для стимуляции их роста необходимо внести в среду так называемые ростовые вещества. Для этого следует к изготовленному синтетическому питательному раствору добавить немного дрожжевой пудры, вытяжки из семян гороха или листьев березы, пивного сусла и т. п. Сапрофитные

почвенные микромицеты развиваются на твердых средах более активно, нежели на жидких. Однако такие питательные субстраты, как например опилки, отруби, рис, горох и др., необходимо готовить рыхлыми, так как уплотнение среды замедляет рост и спороношение этих микромицетов. Почвенные микромицеты пышно растут при условии достаточной аэрации. Развитие микромицетов лучше происходит в более или менее крупных колбах и крупных пробирках. Также большое значение для роста почвенных микромицетов имеет степень активной кислотности (рН) среды. В кислой среде микромицеты в большинстве своем развиваются лучше, чем в щелочной. Наиболее подходящим является рН = 4.5—5.5. Однако почвенные микроскопические грибы в зависимости от стадии своего развития по-разному относятся к степени активной кислотности (рН) среды.

Для успешного культивирования разных видов микромицетов на искусственных питательных средах необходимо подыскивать для них наиболее оптимальные условия рН. Для культивирования микромицетов имеет значение и освещенность помещения. В темной комнате (термостатной) наблюдается задержка спорообразования и интенсивное развитие стерильного мицелия. Прямые солнечные лучи также отрицательно влияют на рост микромицетов. Как показали наблюдения, микроскопические грибы лучше всего развиваются при дневном отраженном свете. Поверхность колоний микромицетов в этом случае обильно покрывается конидиями, а развитие воздушного стерильного мицелия заметно замедляется. Рекомендуется как культивировать, так и сохранять почвенные микромицеты в компактных условиях в специальных стеклянных шкафах с вытяжными трубами и при дневном свете, исходящем из окон, расположенных не на солнечной стороне дома. Для накопления, выделения и изучения почвенных микроскопических грибов используют различные микробиологические питательные среды. Выбор питательной среды следует производить с учетом эколого-физиологических особенностей изучаемых групп почвенных микроскопических грибов. Так, например, если из исследуемой почвы выделяется очень большое число быстрорастущих мукоровых микромицетов, резко подавляющих развитие других почвенных

микроскопических грибов, то в этом случае прибегают к посеву почвы на синтетическую среду Чапека с сахарозой. Как известно, сахароза слабо усваивается мукоровыми микромицетами, поэтому рост их на среде замедляется, что позволяет нормально развиваться другим группам грибов. Большинство питательных сред для культивирования почвенных микромицетов должно иметь кислую реакцию. Кислая реакция среды для почвенных микроскопических грибов необходима по двум основным причинам: 1) кислые среды затрудняют или совсем лишают возможности развиваться почвенным бактериям; 2) кислые среды благоприятны для роста многих видов (хотя не для всех) почвенных микромицетов. Питательные среды, применяемые для выделения грибов из почвы, должны иметь $pH = 4.0—3.8$; питательные среды, предназначенные для морфолого-культурального изучения развивающихся на них грибов, должны иметь в среднем $pH = 5.5—6.0$. Если требуется подкисление питательной среды ниже $pH = 4.0$, то нужно иметь в виду, что агар такой кислой среды после стерилизации в автоклаве под давлением не застывает. Поэтому водные растворы фосфорной (H_3PO_4), соляной (HCl) или серной (H_2SO_4) кислот, обычно употребляемые для подкисления питательных сред, предварительно стерилизуют, а затем вносят в агаровую среду, еще не остывшую после стерилизации. Кислоты должны быть слабой концентрации, примерно 1:10—1:15 н. раствора. На 1 л агаровой среды в среднем добавляют 15—20 мл 0.1 н. раствора кислоты.

4.4 Рецепты наиболее применяемых питательных сред для культивирования почвенных микромицетов

Среда Чапека и Чапека—Докса

	Среда Чапека	Среда Чапека— Докса
Сахароза	20.0	30.0
Натрий азотнокислый (NaNO ₃)	2.0	3.0
Калий фосфорнокислый однозамещенный или двухзамещенный' (KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄)	1.0	0.1
Магний сернокислый (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.5	0.5
Калий хлористый (KCl)	0.5	0.5
Железо сернокислое (закисное) (FeSO ₄)	0.01	0.01
Агар	15-20	
Вода дистиллированная	1000 мл	

Прим. Для грибов большей частью рекомендуют пользоваться однозамещенным фосфорнокислым калием (KH₂PO₄).

Среда Райстрика

(для улучшения спорообразования почвенных грибов)

Глицерин	7.0
Фруктоза	5.0
Мальтоза	5.0
Сахароза	5.0
Пептон	10.0
NaCl	4.0
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0.05

KH_2PO_4	0.06
FeSO_4	3 мл (0.1%)
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	1 мл (0.1%)
Агар	15-20
Вода дистиллированная	1000 мл

Среда Ролэна в различных вариантах

I вариант

Сахароза	70.0
Винная кислота	4.0
NH_4NO_3	4.0
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.6
K_2CO_3	0.6
MgCO_3	0.6
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.25
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.07
FeSO_4	0.07
K_5SiO_4	0.07
Вода дистиллированная	1000 мл

II вариант

Сахароза	50.0
NH_4NO_3	3.0
KH_2PO_4	1.0
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1.0
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.02
Вода дистиллированная	1000 мл

Прим. Агар-агар — вещество полисахаридного характера, не содержащее азота. Температура плавления 2%-го геля (студня) около 90°C, застывание

происходит при 40—50° С. При высокой кислотности (рН <3.8—3.6) и многократном нагревании при высокой температуре желирующие свойства агаровых сред снижаются, т. е. агар после расплавления не уплотняется.

III вариант

Сахароза	30.0
NH ₄ NO ₃	2.5
KH ₂ P0 ₄	1.0
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1.0
FeSO ₄	0.01
Вода дистиллированная	1000 мл

IV вариант

Сахароза	50.0
NH ₄ NO ₃	3.0
NH ₄ H ₂ P0 ₄	1.0
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1.0
FeSO ₄	0.5
Вода дистиллированная	1000 мл

V вариант

Сахароза	50.0-70.0
NH ₄ NO ₃	3.0
KH ₂ P0 ₄	1.0
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1.0
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0.01
Вода дистиллированная	1000 мл

Среда Конна с аспарагинатом натрия

Аспарагинат натрия	1.0
--------------------	-----

Сахароза или глюкоза	10.0
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0.2
NaH_2PO_4	1.5
KCl	0.1
$CaCl_2$	0.1
Fe Cl_3	Следы
Вода дистиллированная	1000 мл

Минеральные среды с органическим азотом

I вариант

Сахароза	50.0-70.0
Пептон	10.0
KH_2PO_4	3.0
$MgSO_4 \times 7H_2O$	1.0
Вода дистиллированная	1000 мл

II вариант

Глюкоза (декстроза)	20.0-30.0
Пептон	2.0
KH_2PO_4	1.0
$MgSO_4$	0.5
Вода дистиллированная	1000 мл

III вариант

Среда Ваксмана

Глюкоза (декстроза)	10.0
Пептон	5.0
KH_2PO_4	1.0
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0.5

Вода дистиллированная

1000 мл

Стерилизовать в автоклаве при 120°C (0.5 атм. по показанию манометра) в течение 30 мин. или при 1.0 атм. — 20 мин.

Прим. Соли растворяют в горячей воде и фильтруют через бумажный фильтр. Затем в указанные смеси добавляют 0.1 и водные растворы H_2SO_4 или H_3PO_4 до получения $pH = 3.8-3.6$. Чтобы достичь данной кислотности, к смеси обычно добавляют от 13 до 15 мл из указанных кислот на 1 л. После этого смесь стерилизуют в автоклаве. При изготовлении из этих смесей твердых агаровых сред их сначала стерилизуют в автоклаве, а затем добавляют кислоту. В случае добавления кислоты в агаровую среду до стерилизации агар подвергнется глубокому изменению и потеряет свойство уплотняться при охлаждении.

Белково-глюкозная среда

Глюкоза (декстроза)	10.0
Белок (в порошке)	0.1
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0.2
KH_2PO_4	0.5
Агар	20.0
Вода дистиллированная	1000 мл

Солодовое сусло и сусловый агар (сусло –агар)

Неохмеленное пивное сусло (16—17° по ареометру Баллинга) разбавить водопроводной водой в соотношении 1:1 до 7—8° Баллинга и разлить в колбы и пробирки. Стерилизовать в автоклаве при 0.5 атм. (по показанию манометра) в течение 30 мин. Если стерилизовать при более высоких температурах, сахар карамелизуется.

Приготовление сусла в лаборатории

В эмалированную посуду наливают 1 л водопроводной воды и нагревают до 50°C, затем всыпают при помешивании 250 г высушенного и размолотого солоды (проросших семян ячменя).

Прим. Для приготовления сусло-агара следует к неохмеленному пивному суслу добавить 2—2.5% сухого агара и расплавить его при подогревании, затем фильтровать через марлю, сложенную в несколько слоев, или вату; отфильтрованную жидкость разлить по пробиркам и колбам и стерилизовать в автоклаве при 0.5 атм. (показания по манометру) в течение 30 мин. или при 1 атм. в течение 20 мин. рН среды для выделения грибов из почвы в пределах 3.8—4.0; для культивирования — рН=5.0—5.5. Неохмеленное пивное сусло содержит 12% сахаров, преимущественно мальтозу и частично глюкозу, декстрозу, азотистые вещества, зольные элементы, различные ростовые вещества и витамины, в основном группы В. Для приготовления среды от сусла отфильтровывают осадок белковых веществ и определяют в ней содержание сахара ареометром Баллинга, градусы которого примерно соответствуют содержанию сахара в процентах.

Смесь подогревают до 57°C и поддерживают эту температуру в течение 1 часа, затем постепенно поднимают температуру до 63°C и поддерживают ее на этом уровне до исчезновения реакции на крахмал (синее окрашивание с иодом). Готовое сусло процеживают, потом фильтруют через бумажный фильтр. Приготовленное таким образом сусло содержит обычно 10—12% сахара. Его разбавляют водой до содержания сахара в 6—8%. Стерилизуют пивное сусло в автоклаве при 115°C в течение 20 мин. После стерилизации устанавливают рН.

Мальц-пептоно-желатиновая среда

I вариант

Желатин	100.0
Мальц-экстракт	20.0

Пептон	10.0
Вода дистиллированная	1000 мл

Указанная желатиновая среда употребляется при изоляции микромицетов методом выращивания из одной споры. Готовят желатиновую среду следующим образом. Растворяют в теплой воде пептон и мальц-экстракт, затем прибавляют желатин, подогревают до 60° С, смесь распускают, мешая ее стеклянной палочкой, потом берут белок куриного яйца (из расчета одно яйцо на 500 мл среды), растворяют его в небольшом количестве той же несколько остуженной жидкости, обе жидкости сливают вместе и кипятят в течение часа. Затем следует фильтрация через бумажный фильтр в воронке или посредством горячего фильтра, если комнатная температура низка. Изготовленную смесь разливают по пробиркам и стерилизуют текучим паром в течение одного часа два дня подряд.

Прим. Готовое сусло можно получить на пивоваренном заводе.

В теплое время года количество желатина увеличивают до 20%.

Достоинство желатиновых сред — их прозрачность, хорошая прилипаемость к стеклу, что позволяет наблюдать в висячей капле развитие гриба от одной споры до формирования колонии.

II вариант

Желатин	120.0
Мальц-экстракт	24.0
Пептон	10.0
Лимонная кислота	0.5
Вода дистиллированная	1000 мл

Прим. Мальц-экстракт можно заменить пивным суслом, которое берется в количестве 25. 0 мл, что повлечет соответствующее уменьшение количества воды. Очень хорошая среда для многих почвенных грибов.

Виноградный желатин

Изюм	25.0
Желатин	10.0
Вода дистиллированная	100 мл

25 г изюма кипятят в 100 мл воды, выделяют сок, фильтруют, объем восстанавливают и добавляют 10 г желатина. Растворяют при температуре не выше 60° С, кипятят в течение 15—20 мин., фильтруют, разливают в пробирки и стерилизуют текучим паром в течение 1 часа 2 дня подряд.

Картофельный желатин

Картофель (очищенный)	100.0
Желатин	10.0
Вода дистиллированная	150 мл

Картофель нарезают на маленькие кусочки, опускают в 150 мл воды и варят в течение 1. 5 часа, затем фильтруют. Объем восстанавливают, добавляют желатин и стерилизуют в автоклаве текучим паром в течение 1 часа. Затем фильтруют, разливают по пробиркам и стерилизуют текучим паром в течение 1 часа 2 дня подряд.

Мясопептонный бульон с глюкозой

500 г свежего, без жира и сухожилий мяса, мелко изрубленного или измельченного в мясорубке, заливают 1 л воды, нагретой до 50°С и выдерживают в течение 1 часа при этой же температуре или в течение 12 час при 10— 15°С. Затем настой процеживают через холст или марлю и кипятят в течение 30 мин. К полученной (0.5 л) мясной воде (объем жидкости после кипения восстанавливают, прибавляя водопроводную воду) добавляют 2. 5 г поваренной соли, 5 г пептона и 10 г глюкозы (или сахарозы) и в горячем состоянии

фильтруют через бумажный фильтр. Затем устанавливают нужную реакцию среды (рН), разливают по пробиркам и стерилизуют в автоклаве при 120° С в течение 20 мин.

Картофельный агар

200 г очищенного нарезанного ломтиками картофеля варят в течение 30 мин. в 1 л водопроводной воды, после чего фильтруют через марлю. К фильтрату добавляют воду до восстановления прежнего объема жидкости, затем вносят 1.5—2% агара. Фильтрат с агаром помещают в кипящую водяную баню до расплавления агара, затем разливают по пробиркам и стерилизуют в автоклаве при 120°С (1 атм. по показанию манометра) в течение 30 мин

Картофельный агар с глюкозой (декстрозой)

I вариант

Картофель (очищенный)	200.0
Глюкоза (декстроза)	20.0
Агар	15.0-20.0
Вода дистиллированная	1000 мл

Стерилизовать в автоклаве при 120°С в течение 30 мин.

II вариант

Картофельный отвар	300 мл
Глюкоза (декстроза)	20.0
Агар	15.0
Вода дистиллированная	1000 мл

Картофельным отваром готовят кипячением 300 г картофеля в 1 л воды в течение 20 мин, затем полученный объем жидкости доводят до 1 л.

Среда Вольтье (аспарагиновая)

Аспарагин	10.0
KH_2PO_4	0.5
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.25
Сахар по выбору	30.0-40.0
Вода дистиллированная	1000 мл

Дрожжевой экстракт

40 г прессованных или 10 г сухих дрожжей заливают 100 мл водопроводной воды и кипятят в течение 45 мин., затем оставляют в течение 12 час. в холодильнике. Отстоявшуюся жидкость (экстракт) декантируют и фильтруют через свечи Шамберлена. Перед посевом микромицета стерильно вносят 5—10 мл экстракта в колбы, содержащие по 100 мл жидкой среды.

Дрожжевая вода

I. Применение в качестве стимулятора роста грибов

80 г свежих прессованных дрожжей кипятят 20—30 мин. в 1 л водопроводной воды, затем дают отстояться на холоде. Верхний прозрачный слой сливают и отфильтровывают через бумажный фильтр. К фильтрату прибавляют водопроводной воды до восстановления прежнего объема, устанавливают нужный pH и затем разливают в колбочки. Стерилизуют в автоклаве при 0.5 атм. (по показанию манометра) в течение 25 мин. Прессованные дрожжи можно заменить высушенными в количестве 20 г на 1 л.

Прим. Жидкость вносить стерильно, по 5—10 мл в колбы, содержащие по 100 мл питательной среды.

II. Применение в качестве питательной среды для микромицетов

Прессованные дрожжи промывают и разводят в 5–6 раз водой, нагревают до 55° С и ставят в темноту при температуре 28—30° С на одни сутки. Затем

среду стерилизуют в автоклаве при 0.5 атм. (по показанию манометра) в течение 25 мин. и снова оставляют на сутки. Через сутки сливают прозрачный слой с осадка дрожжевых клеток. К дрожжевой воде добавляют 2% сахара, 0.5% NaCl и 0.1% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$.

Дрожжевой автолизат (по Скородумовой)

500 г прессованных дрожжей смешивают с 500 мл воды и в банке с притертой пробкой ставят в термостат при температуре 45°C на 2—3 суток или при 55—58° С на 1 сутки. Затем смесь фильтруют, остаток на фильтре промывают 1 л воды; общий фильтрат доводят водой до 2 л и стерилизуют при 110° С в течение 30 мин.

Среды из семян растений и отрубей

Семена моют и высушивают, затем заливают водой или еще лучше раствором питательных солей:

NaNO_3	3.0
KH_2PO_4	1.0
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
Вода дистиллированная	1000 мл

Для хорошего роста микроскопических грибов среду следует приготовить рыхлую, а не в виде крутой каши. К зернам приливают солевые растворы в соотношении:

на 1 объем риса	2.5—3.0 объема раствора
на 1 объем ржи	2.0 объема раствора
на 1 объем кукурузы	1.5 объема раствора
на 1 объем отрубей	2.0 объема раствора

Лучше стерилизовать без давления текучим паром в кипятильнике Коха в течение 30—45 мин. 3 дня подряд, для достижения гарантированной стерилизации — в автоклаве при 1 атм. (120° С) в течение 30 мин.

Отвары из семян бобовых растений

Семена бобовых (белой фасоли, гороха, бобов) варят 1 час в 4—5-кратном количестве воды. Слитую вытяжку доводят водой до прежнего объема, устанавливают нужный рН, прибавляют сахара до 1 % и KH_2PO_4 — до 0.05–0.1%. Стерилизуют в автоклаве при 120°С в течение 20 мин.

Среда из проросшего гороха

Горох проращивают в течение 6—10 дней, измельчают на мясорубке и добавляют к нему пятикратное количество 0.5%-го раствора NaCl и 0.2% KOH . После настаивания в течение 4 час. вытяжку сливают, устанавливают рН, стерилизуют при 120° С в течение 30 мин., фильтруют, снова устанавливают рН и стерилизуют вторично.

Среда из экстракта пшеничных отрубей

Сухие пшеничные отруби замешивают водопроводной водой, предварительно нагретой до 40° С в соотношении 1:10. На 1 л воды добавляют 3 г NaNO_3 . После размешивания температуру доводят до 62—65° С и при помешивании производят экстракцию в течение 3 час. Затем взвесь фильтруют через двойной слой марли и тщательно отжимают. Полученный фильтрат стерилизуют в автоклаве при 1 ат. м. (120°) в течение 20 мин; рН = 5.5–6.0.

Овсяный агар

30 г овсяной муки или 125 г овсянки варят в 1 л воды в течение 30 мин., фильтруют через марлю, восстанавливают прежний объем жидкости и добавляют 2–2.5%-й раствор агара. Стерилизуют в автоклаве при 0.5 атм. (110° С) в течение 30 мин.

Среда из овса

К 1 части (по объему) овса добавляют 2 части воды. Смесь стерилизуют текучим паром в течение 30 мин, потом давление доводят до 2 атм. и стерилизацию прекращают. Стерилизацию проводят 2 раза через сутки.

Прим. Эта среда употребляется для культивирования микромицетов перед внесением их в почву.

Среда из стеблей донника

Стебли очищают, вымачивают в течение 2 час. в воде, затем 2 дня подряд стерилизуют по 1 часу текучим паром (в каждую пробирку вносят кусочек стебля с добавлением воды от 1 до 1.5 мл).

Среды из экстрактов овощей и плодов

100 г свежей или 50 г сухой измельченной массы заливают 1 л водопроводной воды и кипятят в течение 30 мин. Фильтруют через вату, отделяют от экстракта и устанавливают необходимый рН, вторично фильтруют через бумагу и стерилизуют при 120° С в течение 30 мин. Для уплотнения прибавляют 1.5—2.0% агара.

Среды из стерилизованного картофеля, моркови и других овощей

Картофель очищают щеткой под сильной струей воды для удаления земли, срезают шелуху и удаляют «глазки» и поврежденные места, тщательно моют под краном и нарезают на ряд ломтиков цилиндрической формы. Можно вырезать продолговатые или клинообразные ломтики по формату пробирки. Пробирки желательно брать большого размера с перехватом внизу, на котором ломтик картофеля задерживается; нижняя часть пробирки служит для стока воды, выделяемой при стерилизации. Стерилизацию осуществляют при добавлении воды. Можно пользоваться и обыкновенными пробирками, бросив на дно обломок стеклянной трубки, служащий опорой для картофеля. Стерилизацию проводят текучим паром по 1 часу 2 дня подряд. Иногда картофель при этом режиме стерилизации все же прорастает стойкой споровой палочкой (картофельной бациллой). Для достижения абсолютно надежного результата стерилизацию следует проводить в автоклаве при 120° С в течение 25 мин.

Навозная агаризованная среда

Свежий конский помет (из расчета 100 г на 1 л воды) сначала настаивают, затем кипятят и фильтруют через обычный фильтр. Восстановив первоначальный объем жидкости, устанавливают нужный рН, добавляют 2—2,5% агара и стерилизуют в автоклаве при 120° С в течение 25 мин.

Почвенная агаризованная среда

I вариант

400—500 г плодородной почвы настаивают в течение суток на 1 л воды, затем тщательно взбалтывают, кипятят в течение 30 мин. и фильтруют¹. Вытяжку смешивают с тальком и после отстаивания вновь фильтруют через двойной бумажный фильтр. К вытяжке добавляют 0,5 г $\text{KН}_2\text{PO}_4$, устанавливают

нужный рН и восстанавливают прежний объем жидкости. Стерилизуют при 120°C в течение 40 мин.

II вариант

Почвенную вытяжку для этой среды готовят путем обработки навески почвы слабой соляной кислотой с выпариванием до полного испарения жидкости, после чего осадок обрабатывают слабым раствором аммиака и вновь подвергают выпариванию. Из полученного осадка готовят вытяжку. Из 3 кг почвы получается 4 л вытяжки, которую перед применением фильтруют. Добавляют 2% агара.

Прим. Берут воздушно-сухую почву, освобожденную от растительных остатков, измельченную в ступке и просеянную через сито, Агар обычно добавляется в количестве 1. 5—2. 0%.

III вариант

Воздушно-сухую измельченную почву помещают в колбу и заливают дистиллированной водой в соотношении от 1:5 до 1:9. В полученную суспензию вносят 1. 5—2. 0% агара, стерилизуют в автоклаве при 120° в течение 1 часа.

Прим. Иногда прибегают к повторной стерилизации через 1–2 суток.

Среда с почвенным экстрактом

а) агаризованный почвенный экстракт

Почвенный экстракт	200 мл
Глюкоза (декстроза)	10.0
KH ₂ P04	0.5
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0.2
Агар	20.0
Вода дистиллированная	800 мл

б) желатинизированный почвенный экстракт

Почвенный экстракт	100 мл
Глюкоза (декстроза)	1.0
Желатин	120.0
Вода дистиллированная	900 мл

в) почвенный экстракт по Локхиду

Почвенный экстракт	1000мл
K ₂ HP04	0.2
Агар	15.0

Стерилизовать при 120° С в течение 20—25 мин. После стерилизации устанавливают рН.

Прим. Почвенный экстракт готовят из окультуренной почвы. Просеянную через 3-миллиметровое сито почву смешивают с равным весовым количеством дистиллированной воды. Смесь автоклавируют при 120°С в течение 1 часа. Горячую суспензию фильтруют через бумажный фильтр.

Почвенная вытяжка из садовой почвы (Разумовская и др., 1960)

1 кг садовой почвы заливают 1 л водопроводной воды и помещают в автоклав на 30 мин. при давлении 2 атм., после чего дают отстояться. Жидкость сливают и фильтруют через двойной фильтр. Фильтрат нейтрализуют содой до рН = 7. 0—7. 2. К 100 мл почвенной вытяжки добавляют 900 мл дистиллированной воды и 15 г агара. Кипятят, разливают в пробирки или колбы и стерилизуют в автоклаве при 120° С в течение 30 мин.

Почвенный экстракт по Пошону

Используют плодородную почву с $\text{pH} = 7.0$ или близким к ней. Навеску почвы смешивают с равным количеством водопроводной воды и оставляют на 24 часа при комнатной температуре. На следующий день прогревают в автоклаве при 130°C , декантируют и фильтруют в горячем виде через бумагу, проверяют pH , стерилизуют. Приготовленную почвенную вытяжку сохраняют в стерильном виде в колбах. Для получения плотной среды прибавляют 1.5% агара.

Среда для культивирования микромицетов, разрушающих целлюлозу

Фильтровальную бумагу (лучше обеззоленные фильтры) нарезают длинными узкими полосками шириной в 1 см и длиной до 10 см и опускают в обычные пробирки. Затем вливают в пробирки по 2—3 мл минеральной жидкой среды Гетчинсона и Клейтона или упрощенной среды Ролэна, но без источника углерода (т. е. без сахара). Полоска фильтровальной бумаги окажется погруженной в жидкость примерно на 2—3 см, большая же ее часть останется на воздухе, но будет увлажненной. Пробирки затыкают ватными пробками и подвергают стерилизации в автоклаве при $115\text{—}120^\circ \text{C}$ в течение 25—30 мин. Посев целлюлозоразрушающих микромицетов надо производить на не погруженную влажную часть фильтровальной бумаги. Для изолирования целлюлозоразрушающих микромицетов применяют посевы маленьких комочков исследуемой почвы на следующие агаровые среды.

Среда Гетчинсона и Клейтона ($\text{pH} = 7.6$)

K_2HPO_4	1.0
CaCl_2	0.1
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.3
NaCl	0.1

FeCl ₃	0.01
NaNO ₃	2.5
Агар	15.0
Вода дистиллированная	1000 мл

Вторая среда аналогична предыдущей, но с заменой K₂HPO₄ соответствующим количеством KH₂PO₄; pH = 6. 1.

Кислая среда Частухина, видоизмененная Захаровым (pH = 4. 5–5. 0)

(NH ₄) ₂ S04	0. 75
KH ₂ PO4	0.5
MgS0 ₄ ×7H ₂ 0	0.25
FeS0 ₄	следы
MnS0 ₄	следы
Агар	4.0
Вода дистиллированная	200 мл

Прим. На этой среде четко дифференцируется видовой состав грибов.

На поверхность застывшего агара накладывают стерильный обеззоленный фильтр или фильтровальную бумагу. Фильтровальную бумагу следует предварительно прокипятить в дистиллированной воде и затем проверить на йодную реакцию. Она должна дать отрицательную йодную реакцию, т. е. показать отсутствие у нее примеси крахмала. Обычно для выращивания почвенных целлюлозоразрушающих микромицетов на указанных выше агаровых средах берут навеску исследуемой почвы в 0. 1 г, которую раскладывают на 50 комочков. Затем чашку Петри с агаровой пластинкой после посева почвы помещают в термостат при 25—27° С или лучше во влажную камеру при той же температуре. Вместо использования комочков для выделения и даже количественного учета целлюлозоразрушающих микроскопических грибов рекомендуется применять метод посева разведений почвенных болтушек,

предложенный О. И. Пушкинской. По данному методу, из приготовленного разведения почвенной болтушки производится посев на поверхность агара, пропитанного минеральными растворами. Почвенная болтушка посредством шпателя равномерно распределяется по всей агаровой пластинке чашки Петри, после чего сверху на агар накладывается стерильный обеззоленный фильтр или кружок фильтровальной бумаги. В настоящее время для выращивания микроскопических грибов, разрушающих целлюлозу, широко используются гелевые (кремнекислые) пластинки или «голодный» агар. На поверхность пластинок кремнекислого геля или «голодного» агара накладывают бумажные обеззоленные фильтры и увлажняют их следующими минеральными растворами Частухина.

Раствор № 1 (физиологически кислый)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.5
KH_2PO_4	1.0
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
FeSO_4	следы
MnSO_4	следы
Вода дистиллированная	200 мл

Раствор № 2 (физиологически щелочной)

KNO_3	3.0
KH_2PO_4	1.0
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
NaCl	0.5
FeSO_4	следы
MnSO_4	следы
Вода дистиллированная	200 мл

Растворы стерилизовать в автоклаве при 120° С в течении 30 мин. На поверхность увлажненных (пропитанных) фильтров производят посев почвы или комочками, или в виде почвенной суспензии. Чашки Петри помещают во влажную камеру (относительная влажность 60%) при температуре 25—27°С.

Методика приготовления гелевых пластинок.

1. Концентрированную соляную кислоту с уд. весом 1.19 разбавляют водопроводной водой до уд. веса 1.10 по ареометру.

2. Жидкое стекло — кремнекислый натрий (Na_2SiO_3) — разбавляют до уд. веса 1.06—1.07 по ареометру.

3. К 0.5 л соляной кислоты (уд. вес 1.10) при постоянном помешивании добавляют 0.5 л жидкого стекла.

4. Смесь разливают в чашки Петри по 12—15 мл и оставляют их открытыми на 20—24 часа, пока не образуется гель.

5. Открытые чашки с гелем помещают в бачок, который ставят в раковину; на водопроводный кран надевают резиновую трубку, опускают ее на дно бачка и промывают чашки Петри проточной водой. Через 2—3 суток чашки ополаскивают несколько раз дистиллированной водой и проверяют полноту промывания, пользуясь пробой на хлор (AgNO_3 в присутствии HNO_3).

6. Гелевые пластинки многократно промывают горячей водой и стерилизуют ультрафиолетовыми лучами (открытые гелевые пластинки в чашках Петри помещают на расстоянии 20 см от источника ультрафиолетового света и облучают в течение 30 мин.

7. Перед посевом поверхность кремневой пластинки пропитывают стерильном питательном средой.

«Голодные» среды»

Для выявления наибольшего видового и родового разнообразия микроскопических грибов рекомендуется вместо искусственных питательных сред, избыточно снабженных азотом, органическими соединениями и другими веществами, использовать среды, содержащие очень малое или ничтожное количество питательных ингредиентов. На этих средах микроскопические грибы сначала развиваются нормально, но вскоре их развитие довольно резко замедляется, при этом не наблюдается их скопления в очень крупные колонии. На «голодных» средах обычно развиваются значительно более разнообразные грибы, чем на «богатых».

¹*Прим. Нельзя кислоту добавлять к жидкому стеклу.*

Основой «голодной» средой является агаризованная вода, т. е. водопроводная вода с агаром.

а) Водный агар («голодный»)

Агар	15.0 – 20.0
Вода дистиллированная	1000 мл

Стерилизовать при 120° С в течение 25 мин.

б) Агар с разбавленным суслом

Неохмеленное пивное сусло (16—17°С по Баллингу) разбавляют водой в соотношении 1: 9.

Агар	10.0 – 15.0
Разбавленное сусло	1000 мл

Стерилизовать при 110°С в течение 30 мин.

4.5 Количественный учет микромицетов, способных разлагать клетчатку (по методу О. И. Пушкинской)

В стерильные чашки Петри разливают питательный агар, рекомендованный Виноградским, содержащий 1 л водопроводной воды, 1 г K_2HPO_4 , 1 г $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 г $MgSO_4$, 0.5 г $NaCl$, 20 г агара. После застывания агар подсушивают при 65—70°C в сушильном шкафу в течение 10—15 мин. Затем в середину чашки вносят 0.05 мл тщательно размешанной почвенной суспензии, которую шпателем равномерно распределяют по всей поверхности агара (почвенную суспензию готовят в разведении 1 : 10, 1:100 или 1:1000). Далее кружки фильтровальной бумаги или обеззоленные фильтры, простерилизованные в автоклаве, накладывают на поверхность агара и шпателем притирают так, чтобы они плотно прилегали к ней. Чашки хранят во влажной камере при 25—26°C в течение 1—2 недель, после чего производится учет микроорганизмов. При таком посеве вырастают изолированные колонии микромицетов, бактерий и актиномицетов, которые легко подсчитать. Преимущество этого метода в том, что учитываются истинные разрушители клетчатки, микроорганизмы, развивающиеся исключительно за счет самой клетчатки, а не за счет продуктов гидролиза клетчатки другими микроорганизмами, как при посеве комочками почвы.

4.6 Среда Пидопличко для микромицетов, разрушающих целлюлозу

Чистую фильтровальную бумагу (лучше обеззоленные фильтры) нарезают полосками, складывают и сжимают так, чтобы получились продольные складки, затем кладут в пробирки. После этого добавляют в пробирки 2—3 мл жидкой среды Чапека или среды Ролэна, но без источника углерода, т. е. только минеральную часть этих сред. Наливают среду с таким расчетом, чтобы полоски бумаги были погружены в нее своим основанием. Стерилизуют при 115°C в течение 30 мин. Высев микромицета производят на влажную бумагу.

4.7 Среда Камышко для микромицетов

Исследуемую почву увлажнить и рассыпать по дну чашки Петри, сверху на нее раскидать стерилизованный кроличий помет. Чашку поместить во влажную камеру. Через 10—15 суток на помете образуются перитеции.

4.8 Культивирование микромицетов на предметных стеклах (по методу Н. М. Пидопличко)

При изучении морфологии микроскопических грибов возникает необходимость производить наблюдения во время их роста и развития непосредственно под микроскопом. Для этого рекомендуется культивировать микромицеты на предметных стеклах. Одну поверхность чистого предметного стекла прокаливают над пламенем спиртовой горелки. Эту и последующие операции проводят в боксе, по возможности соблюдая там стерильность воздуха. Затем на прокаленную сторону стекла наносят снизу стерильной платиновой петлей небольшой кусочек расплавленной агаровой среды. После этого на прикрепленный таким образом кусочек агаровой среды стерильной платиновой петлей или иглой наносят мицелий или споры исследуемого микромицета. После посева берут чистое покровное стекло, прокаливают его над пламенем, дают ему несколько остыть и затем прикладывают к предметному стеклу, прижимая кусочек агара вместе с находящимися на нем спорами микроскопических грибов. Покровное стекло осторожно придавливают до тех пор, пока агаровая среда расплющится до тонкого слоя, причем покровное стекло должно лечь на предметное таким образом, чтобы одной стороной оно вплотную прикасалось к предметному стеклу и было расположено под углом 10—15° к нему. Для уменьшения возможности загрязнения культуры иногда бывает целесообразно залить расплавленным парафином три смежные стороны покровного стекла с предметным, кроме одной стороны его, наиболее отстающей от поверхности предметного стекла. Препарат помещают во влажную камеру с таким расчетом,

чтобы наиболее открытая сторона была направлена вниз, т. е. чтобы угол, образуемый покровным и предметным стеклами, был направлен вверх. Выращивание микромицета ведут при нужной температуре, наблюдения под микроскопом проводят и любое время, но многократно. Этот метод «живых препаратов» часто применялся Н. М. Пидопличко и В. И. Билай при изучении ими р. *Cladosporium*. Они для диагностики видов р. *Cladosporium* применяли среду Чапека с большим количеством сахарозы (28—70%). Кроме того, они употребляли для этих грибов танин и сливочное масло как единственные источники углеродного питания.

4.9 Среды для выделения и изучения почвенных хищных микромицетов

Среда Дарлингтона

Берут 20 г кукурузной муки на 1 л воды; после подогрева до 70°C в течение часа жидкости дают отстояться, сливают прозрачный слой и в случае надобности фильтруют через стеклянную вату. На 1 л полученного прозрачного раствора добавляют 20—40 г агара и автоклавируют под давлением в течение 20 мин. Агар разливают по чашкам Петри.

Прим. По Дарлингтону, указанная среда пригодна для выделения почти всех хищных грибов. На поверхность указанного питательного агара наносят небольшие комочки почвы или кусочки растительных остатков.

«Голодный» агар (по Сопрунову)

В чашку Петри тонким слоем наливают стерильный агар, приготовленный из расчета 4—5 г агара на 100 г водопроводной воды, с добавлением лимонной кислоты до установления рН в пределах 6. 0—6. 5.

Прим. После внесения 5—6 кусочков почвы величиной со спичечную головку чашки Петри вначале выдерживают в термостате при 10—15°C в течение 4 суток, а затем переносят в термостат с температурой 25—30°C.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Какие группы питательных сред выделяют, чем они отличаются?
- 2) Существует ли универсальная среда для выделения и культивирования микромицетов?
- 3) Стерилизация питательных сред.
- 4) Опишите методы культивирования почвенных микромицетов.
- 5) На каких питательных средах культивируют почвенные микромицеты?
- 6) «Голодные среды», что это?
- 7) Опишите количественный учет микроскопических грибов, способных разлагать клетчатку по методу О. И. Пушкинской.
- 8) Опишите методику приготовления гелевых пластинок, и для чего они нужны?
- 9) Культивирование микромицетов на предметных стеклах по методу Н. М. Пидопличко.
- 10) Какие среды для выделения и изучения почвенных хищных микромицетов существуют?

ГЛАВА 5. ОПИСАНИЕ НЕКОТОРЫХ ПОЧВЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ

5.1 Почвенные токсинообразующие микромицеты р. *Fusarium*, их изучение и методы культивирования

Микроскопические грибы р. *Fusarium* широко распространены в природе на различных растительных субстратах и в почве. Количество микромицетов грибов этого рода, выделенных из различных почв и почв ризосфер (корневых систем) культурных и диких растений, по отношению к общему числу обнаруженных почвенных микроскопических грибов может достигать 10—20%. Большинство микромицетов рода *Fusarium*, обитающих в почве, выращивается на искусственных питательных средах, развиваясь на них в форме несовершенных стадий, т. е. в виде конидиального спороношения. Развитие совершенных (главным образом сумчатых) стадий у этих грибов известно лишь для небольшого числа видов. Главными видовыми признаками микромицетов этого рода являются отдельные элементы в морфологии макроконидий, образующихся в спородохиях и пионнотах.

В 1935 году немецкие микологи Г. В. Волленвебер и О. А. Рейнкинг систематизировали существующие виды и опубликовали первую таксономическую систему в монографии «Die Fusarien», которая является основой и для большинства современных классификаций. Они объединили близкородственные виды в секции на основании следующих признаков: наличие / отсутствие микроконидий и их форма; наличие / отсутствие хламидоспор и их расположение; форма макроконидий; форма базальной клетки. Секции были подразделены на виды, разновидности и формы по следующим признакам: цвет стромы; наличие / отсутствие склероциев; количество септ в макроконидиях; длина и ширина макроконидий. Основным недостатком этой системы является использование высоко изменчивых морфологических структур в качестве ключевых таксономических признаков без учета мутаций; некоторые виды были выделены на основе изучения 1–2 изолятов.

Значительный вклад в систематику и классификацию *p. Fusarium* сделала отечественный миколог Александра Ивановна Райлло. Тщательное изучение степени и характера изменчивости отдельных отличительных признаков, принятых для разграничения видов и разновидностей в систематике Волленвебера и Рейнкинга (Wollenweber u. Reinking, 1935), позволило А. И. Райлло сделать следующие основные выводы. Длина макроконидий не может являться, как правило, существенным признаком вида. Размеры макроконидий в целом могут быть использованы в качестве видовых признаков, но с учетом степени их изменчивости, выявленной при развитии гриба как в природных, так и в экспериментальных условиях. Преобладающее число перегородок в макроконидиях у моноспоровых культур может служить для характеристики вида в пределах секции, но более всего является признаком подвида или разновидности. Изогнутость конидий (с учетом степени ее изменчивости) служит признаком подвида в пределах секции и отдельных разновидностей. Характер пигментации культуры служит признаком форм в пределах вида. Тип спороношения используется для характеристики отдельных культур. Форма верхней клетки макроконидий — ведущий признак для отдельных видов в пределах секций. Таким образом, и данной системе культуральные признаки используются для выделения форм или штаммов культур, а элементы морфологии макроконидий, т. е. форма их верхней клетки, изогнутость и преобладающее число перегородок используются, соответственно, для характеристики подвида и разновидности.

В итоге в 1939 году была разработана первая классификация на русском языке, опубликованная в монографии «Грибы рода *Fusarium*». Она представляла модификацию системы Волленвебера и Рейнкинга (17 секций, 14 подсекций, 55 видов, 10 подвидов, 51 разновидность и 61 форма) и опиралась на морфологические особенности макроконидий (форма и длина апикальной клетки, степень изогнутости и ширина, количество септ). Несомненным достоинством исследований А. И. Райлло было изучение моноспоровых культур

и выявление их постоянных признаков (форма апикальной клетки, изогнутость конидии, число септ).

Классификация микромицетов рода *Fusarium* более 200 лет является объектом исследования, так как на основании имеющихся данных ученые пытаются выявить и систематизировать реально существующие виды. За прошедшие годы опубликовано несколько таксономических систем, в которых число видов значительно варьировало. В настоящее время, согласно международному Кодексу ботанической номенклатуры, род *Fusarium* принадлежит к отделу *Ascomycota*, классу *Ascomycetes*, отделу *Hypocreales*; его телеоморфы по большей части классифицируют в род *Gibberella* и для небольшого числа представителей в рода *Albonectria* и *Haematonectria*.

В. И. Билай (1955) опубликовала монографию р. *Fusarium*, в которой приведены результаты экспериментального изучения изменчивости основных видовых признаков значительного количества культур. В. И. Билай отрицает ведущее значение морфологии верхней клетки макроконидий для разграничения видов в пределах отдельных секций. Основными признаками для разграничения видов р. *Fusarium* является, по ее мнению, морфология макро- и микроконидий. Культуральные свойства используются для выделения как отдельных видов, так и отдельных форм в пределах вида. Физиологические признаки в зависимости от их значения в биологии вида учитываются для характеристики как отдельных видов, так и отдельных форм внутри вида. Изменения, сделанные В. И. Билай в систематике р. *Fusarium*, привели к значительному сокращению в нем общего количества видов.

В 1977 году В. И. Билай опубликовала вторую таксономическую систему на русском языке в монографии «Фузарии», в которой род *Fusarium* разделялся на 9 секций, 31 вид и 25 разновидностей, описанных у 13 видов. Основные отличия классификации – это объединение секций *Liseola* и *Elegans*; *Gibbosum* и *Discolor*. Автор уделила внимание морфологии моноспоровых культур, влиянию абиотических факторов и условий культивирования на вариабельность морфологических признаков. Таксономическая система В. И. Билай

распространена в России и странах СНГ и до настоящего времени, однако в других странах мира не применяется.

Одной из современных работ по таксономии рода *Fusarium* является атлас «*Fusarium laboratory manual*», опубликованный в 2006 году американскими исследователями Дж. Лесли и Б. А. Саммерел. Видовая концепция включает 71 вид, учитывая традиционные морфологические и современные молекулярно-биологические признаки с кратким описанием биологических и филогенетических характеристик видов. В 2008 г. Н. П. Шипилова и В. Г. Иващенко представили работу на русском языке «Систематика и диагностика грибов рода *Fusarium* на зерновых культурах», которая облегчает идентификацию широко распространенных видов и соответствует современной номенклатуре. Основанием для уточнения видового состава послужило отсутствие в таксономической системе В. И. Билай, используемой в России и в настоящее время, некоторых видов, несовпадение видовых названий, принадлежность видов к секциям, наличие секций по сравнению с другими таксономическими системами. В работе освещены теоретические аспекты и методы выделения микромицетов рода *Fusarium*; представлены морфолого-культуральные особенности 18 наиболее часто встречающихся видов и синоптический ключ для их определения. Таким образом, в настоящее время отсутствует универсальный принцип классификации рода *Fusarium*, что существенно осложняет практическую идентификацию и приводит к наличию существенных противоречий. Основная трудность диагностики заключается в том, что все существующие таксономические системы основаны на описании высоко изменчивых морфологических структур, при этом значительная вариабельность морфологии не имеет четко выраженных критериев, которые возможно использовать в практических целях. Наличие серповидно-веретеновидных макроконидий уже не является основополагающим критерием для отнесения микромицета к роду *Fusarium*, поскольку аналогичные структуры

формируют представители родов *Acremonium*, *Cylindrocarpon*, *Gliocladium* и *Microdochium*.⁵

5.2 Основные морфологические и культуральные признаки видов р. *Fusarium*

Виды р. *Fusarium* обладают двумя типами конидий: макроконидиями и микроконидиями. Микроконидии образуются обычно в воздушной грибнице на простых или разветвленных конидиеносцах, иногда на коротких отростках или выступах гиф, собраны в цепочки или ложные головки, большей частью одноклеточные, реже с 1 и очень редко с 2—3 перегородками; по форме чаще овальные, яйцевидные, эллипсоидные, реже шаровидные, грушевидные, веретеновидные. Макроконидии образуются в воздушной грибнице на простых или разветвленных конидиеносцах, сгруппированных (скупенных) в спородохиях, пионнотах или псевдопионнотах. Макроконидии большей частью с 3—5, реже 6—9 перегородками; по форме преобладают веретеновидные, веретеновидно-серповидные, серповидные, реже веретеновидно-ланцетовидные, клиновидные, суженные к обоим концам; у основания с четко или слабо выраженной ножкой (в виде сосочка) или совсем без нее; с верхушечной клеткой, часто имеющей характерную форму; в массе макроконидии светлоокрашенные (беловатые, розовые, оранжевые, реже желтые, пурпуровые, синие, зеленовато-синие). По характеру изогнутости макроконидии бывают: 1) эллиптически изогнутые — конидии незначительно и равномерно изогнуты на обоих концах; 2) параболически изогнутые — конидии изогнуты главным образом в верхней части; 3) гиперболически изогнутые — конидии значительно и равномерно изогнуты на обоих концах в виде полумесяца; 4) угревидно изогнутые — конидии дорсовентральные (изогнутость

⁵ Литовка, Ю.А. Эколого-биологические особенности и биоконтроль грибов рода *Fusarium*, распространенных в наземных экосистемах средней Сибири [Текст] : дис. ... док. биол. наук : 03.02.08 / Литовка Юлия Александровна. – К., 2018. – 497 с.

вогнутой стороны меньше, чем выпуклой). Характер изогнутости, размер, количество перегородок, форма верхней клетки, наличие ножки у основания и другие признаки морфологии макроконидий имеют большое значение для видовой систематики р. *Fusarium*. конидиеносцев, образующих макроконидии; под слоем конидиеносцев у их основания имеется плотное плектенхиматическое сплетение гиф мицелия или даже строма паренхиматического или псевдопарепхиатического строения; окрашены обычно в лососевый, оранжевый, синий или фиолетовый цвета.

Прим. Спородохии представляют собой своеобразные подушечки, состоящие из скопления коротких простых или разветвленных макроконидий, образуемые в спородохиях, отличаются от макроконидии, возникающих у этих же культур в воздушном мицелии.

Пионноты отличаются от спородохий тем, что образуют слизистый слой, состоящий из слизи и массы макроконидий; конидиеносцы отходят более или менее сплошным слоем от субстратного мицелия; у основания пионнот имеется лишь рыхлое сплетение гиф, какой-либо стромы не имеется; окрашены в такие же цвета, как и спородохии. Пионноты бывают поверхностные и погруженные: первые развиваются на воздушной грибнице и представлены или в виде слизи, покрывающей сплошь весь субстрат, или в форме мелких бугорков; вторые погружены в субстрат, без слизи, имеют вид окрашенных блестящих полированных поверхностей. Псевдопионноты имеют вид бугорков; расположены на воздушной грибнице над самым питательным субстратом или погружены в него; окрашены в оранжевый и лососевый цвета или бесцветны. Верхушечная клетка макроконидии бывает по форме слегка суженная, тупая, отчасти загнутая; слегка суженная, тупая, но прямая; слегка и внезапно суженная, сравнительно короткая; слегка суженная, но усеченная и немного удлиненная; постепенно и равномерно суженная, заметно удлиненная (коническая); сильно и резко суженная, очень удлиненная; сильно и резко суженная, нитевидно и значительно удлиненная; очень сильно суженная, значительно удлиненная и загнутая на конце. Размеры (длина и ширина)

макроконидии и количество поперечных перегородок в них используются для разграничения видов лишь с учетом амплитуды их изменчивости. Макроконидии обычно с 3—5, реже с 6—10 поперечными перегородками. Хламидоспоры также являются органами вегетативного размножения грибов р. *Fusarium*. Они образуются на грибнице и конидиях; могут быть конечными (терминальными) и промежуточными (интеркалярными); в гифах встречаются по одной, по две, цепочками или даже в виде узелков (клубочков); по форме — круглые или овальные, с гладкой или покрытой зубчиками утолщенной оболочкой; часто бесцветные, реже окрашенные в коричневые цвета. Склероции возникают у многих видов в культуре на рисе или картофеле, на агаровых средах развиваются плохо; по форме бывают круглые, иногда типа *Stilbum*, внутри без полости, одиночные или собранные группами, мелкие, размером до 1 мм, или крупные, размером до 5—12 мм; по окраске очень варьируют в зависимости от питательного субстрата, на котором выращивается гриб: на ломтиках картофеля или рисе от белых, желтых, коричневых до пурпуровых или темно-синих. Мицелий на агаровых средах обычно белый, беловато-желтый, розовый, пурпуровый, фиолетовый, часто образует заметные шнуры из параллельно растущих гиф.

5.3 Микробиологическая методика определения вида р. *Fusarium*

Культуры микромицета пересевают на картофельный и кислый картофельный агары для получения молодых генераций, из которых затем следует выделить моноспоровые культуры. Одновременно делают высев культуры на рис. Контрольный просмотр для установления образования спороношения на агарах производят на 15-е сутки после посева. Вид, подвид и разновидность определяют только по форме макроконидий, образованных в спородохиях и пионнотах в культурах, выращенных на картофельных агарах. Конидии, образованные в воздушном мицелии, не характеризуют вид. Признаки, выявленные при изучении культур, имеют различное диагностическое значение.

Форма верхней клетки макроконидии будет главным признаком вида (*species*); длина верхней клетки, изогнутость и число перегородок в макроконидии — признаком подвида (*subspecies*); специализация (биологический критерий) — большей частью признаком разновидности (*varieties*); пигмент культуры на рисе — признаком формы (*forma*).

5.4 Среды для культивирования микромицетов *p. Fusarium*

Картофельный агар (по Щербакову)

Картофель очищенный	200.0
Агар	20.0
Вода дистиллированная	1000 мл

200 г очищенного картофеля натирают на терке, заливают 500 мл воды и ставят на ночь в холодное место. Отстоявшуюся жидкость сливают, объем восстанавливают до 1000 мл, после чего ставят в автоклав на 1 час, стерилизуют текущим паром, пропускают через бумажный фильтр и прибавляют 20 г агара. Затем стерилизуют 1 час текущим паром.

Картофельный агар с глюкозой

Картофель очищенный	200.0
Глюкоза	100.0
Агар	20.0
Вода дистиллированная	1000 мл

Картофель нарезают ломтиками и заливают водой, стерилизуют 40 мин. текущим паром, сливают и добавляют 20 г агара и обрабатывают 1 час текущим паром, потом вносят 100 г глюкозы, разливают в пробирки и стерилизуют при 0.5 атм. (по показанию манометра) в течение 40 мин.

Картофельный агар (обычный)

Картофель, нарезанный ломтиками	200. 0
Вода дистиллированная	1000 мл

Помещают в текучий пар на 40 мин., после чего жидкость отфильтровывают и доводят ее объем до 1000 мл. Добавляют 20 г агара и стерилизуют в автоклаве при 110° С в течение 40 мин.

Кислый картофельный агар

К картофельному агару добавляют стерильный 50%-й водный раствор лимонной кислоты из расчета 1—2 капли на 10 мл среды (т. е. на одну пробирку с агаром).

Прим. Прибавлять кислоту в агар следует после его стерилизации, но, когда агар еще расплавлен. Эта среда используется главным образом при выделении фузариев из материала, сильно загрязненного бактериями.

Для изучения пигмента грибов *p. Fusarium*, имеющего важное значение для их видовой систематики, следует культуры выращивать на рисе.

Среда из риса

1 часть (объема) риса смешать с 2 частями воды. Стерилизацию производить в 2 приема: в первый день в течение 1 часа в текучем паре и на второй день в течение 30 мин. в автоклаве при 120° С.

Прим. Для описания цвета пигмента рекомендуется пользоваться цветными таблицами Риджвея.

Ломтики картофеля

Нарезают небольшие ломтики картофеля, помещают их в пробирки и стерилизуют, как рис. Эта среда применяется для культивирования фузариев секции *Martiella*, не дающих спороношения на других средах. Культуры, не образующие конидии на картофельном или кислом картофельном агаре, необходимо высевать на другие микробиологические питательные среды и подвергать действию разных температур или снова выделять из них моноспоровые культуры. Получив спороношение культуры на какой-либо среде, из нее следует сделать посев на картофельные среды. Определять виды *r. Fusarium* можно только на принятых вышеуказанных стандартных средах. Все моноспоровые культуры, не давшие спороношения в короткие сроки, следует хранить в термостате в течение 3—4 месяцев и периодически через каждые 15 суток исследовать, отмечая появление спорообразования. Если возникает спороношение, то надо произвести измерение конидии на этих средах. Измерение конидий производят на 15-е сутки роста культуры на картофельных средах (агарах). Если же спороношение не появилось к этому сроку, то последующий просмотр культуры и измерение конидий осуществляют снова через 15 суток, т. е. на 30-е, а затем на 45-е сутки и т. д. после посева культуры. Описание пигмента производят на 30-е сутки роста культуры на рисе. Описывается окраска первичной грибницы, окраска зерен риса, каймы вокруг зерен, появление вторичной грибницы, окраска ее, образование склероций и т. д. При изучении пигмента нужно обратить внимание на появление вторичной грибницы. Вторичная грибница на 30-е сутки иногда покрывает уже 2/3 культуры или даже всю ее, маскируя при этом пигментацию первичной грибницы. Запах культуры отмечать обязательно только при условии ее выращивания на рисе.

5.5 Почвенные хитридиевые микромицеты и методы их культивирования

Изучению почвенных хитридиевых микромицетов до сих пор уделяют недостаточное внимание. Часть хитридиевых ведет в почве сапрофитный образ жизни, встречаясь в изобилии на разлагающихся растительных и животных остатках. Так, например, известный вид *Rhizophlyctis rosea* принимает непосредственное участие в разложении клетчатки. Наряду с целлюлозофильными почвенными хитридиевыми микромицетами имеются каратинофильные, развивающиеся на таких субстратах, как волос, перья, рог. Получение накопительных культур *Rh. rosea*, по данным Д. М. Новогрудского, хорошо удается на агаровых пластинках минеральной питательной среды Гетчинсона с кружком фильтровальной бумаги. Хороших результатов добиваются также и на пластинках кремневого гелия, пропитанных той же средой и покрытых фильтровальной бумагой. Посев исследуемой почвы производят комочками. При 25° С на свету через 70 суток при наличии *Rh. rosea* вокруг комочков возникают ярко-розовые зоны, причем бумага быстро разрыхляется. Стеньер пользовался синтетической средой: водопроводная вода — 1000 мл, фосфорнокислый калий двузамещенный 1. 0 г, сернокислый аммоний 1.0 г, сернокислый магний 0. 1 г, хлористый натрий 0. 1 г, хлористый кальций 0. 1г, хлористое железо 0. 02г, глюкоза 5. 0 г. Он рекомендует освобождаться от сопутствующих бактерий следующим образом. Куски фильтровальной бумаги с культурой *Rh. rosea* помещают на дно пробирки, содержащей 10—15 мл стерильной водопроводной воды. Через некоторое время под микроскопом можно наблюдать появление многочисленных зооспор. Так как зооспоры двигаются быстрее сопутствующих бактерий и так как они весьма аэробны, они раньше накапливаются в верхних слоях жидкости. В этот момент берут с поверхности каплю жидкости, высевают ее штрихами на минеральную глюкозо-агаровую пластинку указанной выше среды Стеньера. Спустя 24 часа (при 28°С) отмечают места, где изолированно расположены молодые зооспорангии

ризофликтиса. После этого пластинки инкубируют еще в продолжение 12—36 час. до освобождения зооспор из зооспорангиев. К последним под микроскопом прикасаются иглой и переносят их на свежие пластинки среды Стеньера. Однако получение чистых культур по этому методу не всегда удается. Д. М. Новогрудский и З. Ф. Теплякова проводили посев из накопительной культуры в пробирки, содержащие минеральный раствор Гетчинсона и Клейтона и полоски фильтровальной бумаги, к которому асептически добавляли 2000 единиц чистого пенициллина. После двух последовательных пересевов через пробирки с пенициллином *Rh. rosea* был полностью освобожден от сопутствующих бактерий. Кроме указанных методов для выделения хитридиевых микромицетов из почвы применяют так называемые приманки, в частности прокипяченные и расщепленные на две половинки семена конопли, вареные листья кукурузы, пшеницы, риса и других злаков, фильтровальную бумагу, целлофан, мертвых насекомых (плодовые мухи, мошки, комары), яйца и личинки муравьев, пыльцевые зерна сосны и других растений. Листья растений лучше обесцвечивать кипячением в 95° С в спирте на водяной бане, так как при этом облегчается изучение развившихся в них хитридиевых микромицетов. Однако обесцвеченные листья как питательный субстрат для этих микромицетов менее благоприятны, чем листья, содержащие хлорофилл. На чашку Петри насыпают одну или две столовые ложки почвы и заливают стерильной водой, предварительно обработанной животным углем (*Charcoal water*)¹. Одну из вышеперечисленных приманок погружают в эту воду и через 2—3 дня исследуют ее. Если грибы не будут найдены, то следует добавить свежей приманки.

¹*Charcoal water* изготавливают следующим образом: 1 л дистиллированной воды тщательно смешать с 1 чайной ложкой животного угля и через час отфильтровать, затем автоклавировать при 115°С в течение 30 мин.

Лишь после того, как на приманке будут выявлены хитридиевые грибы, можно перейти к выделению их в чистые культуры.

Коуч предлагает шесть способов получения чистых культур, а именно:

- 1) путем изоляции одного спорангия гриба в воде;
- 2) путем изоляции одного спорангия гриба на агаре;
- 3) путем изоляции спор из одного спорангия на предметном стекле;
- 4) путем изоляции одной споры в капиллярную пипетку;
- 5) путем изоляции одной споры на агаре;
- 6) путем изоляции одного или нескольких кусочков гиф мицелия на агаре.

Первый способ состоит в том, что на стерильную чашку Петри наносят две стерильные капли воды на расстоянии 1 см друг от друга. В одну из капель помещают кусочек листа растения, пораженного грибом. Затем под биноклем (40–100 X) тонкой иглой из этого листа извлекают маленькую его частичку с одним спорангием. Эту частичку переносят в другую каплю и под микроскопом убеждаются в наличии только одного спорангия. После того как будет выделен один спорангий, его переносят на стерильный кусочек листа, который в свою очередь помещают в новую стерильную чашку Петри в каплю стерильной воды, предварительно обработанной животным углем. В этой чашке создают условия влажной камеры посредством нанесения ряда капель стерильной дистиллированной воды на дно и крышку чашки. Этот способ употребляется главным образом при исследовании грибов, образующих крупные спорангии.

Чаще употребляется второй способ, особенно при изучении грибов, имеющих спорангии малой величины, когда на пораженном субстрате выявляется несколько видов грибов. В этом случае извлеченным из листа спорангием делают штрих по поверхности агара; после того как при микроскопическом просмотре удастся выделить на агаре один спорангий, вырезают кружочек агара вместе со спорангием и помещают в другую стерильную чашку Петри в каплю воды, обработанной углем, со свежим стерильным кусочком листа. В дальнейшем Коуч несколько изменил этот способ, извлекая споры из выделенного спорангия с последующим их переносом на свежий лист. Если у хитридиевого гриба ризоидальная система сложного строения и много видов на одном субстрате.

Коуч предлагает пользоваться следующим, третьим, методом. Одиночный созревший спорангий помещают на стерильное предметное стекло с каплей стерильной воды и ведут микроскопическое наблюдение до выхода из него спор. Появившиеся споры втягивают в капиллярную пипетку, затем споры из нее выдувают в другую стерильную каплю воды, помещенную на стерильный лист. В чашке Петри, куда помещают каплю с листом и со спорами, создаются условия влажной камеры.

Четвертый способ основывается на том, что в тонкую капиллярную пипетку втягивают немного спор, которые затем смешивают с каплями воды до тех пор, пока в одной из капель не окажется одна спора. Эту каплю поды с одной спорой наносят на стерильный лист с водой, обработанной животным углем. Вышеуказанные способы все же не оберегают культуры гриба от сопутствующих бактерий. Следующий, пятый, способ основан на том, что споры, способные прорасти на агаре, высевают штриховым посевом на одну из вышеуказанных сред. Споры при этом посеве часто изолируются поодиночке, и тогда можно вырезать кружочек агара с одной спорой и помещать в отдельную чашку Петри. При этом методе основная трудность заключается в том, чтобы штриховым посевом максимально рассеять споры по поверхности агара. Через 12—24 часа они обычно прорастают, что можно наблюдать под микроскопом. У некоторых полицентрических хитридиевых грибов, как например у *Cladochytrium replicatum*, споры прорастают на агаре, образуя отчетливый мицелии. Из него вырезают один или два кусочка и вместе с кусочком агара помещают в чашку Петри с влажными условиями для получения культуры. Этот шестой метод не применим к моноцентрическим видам.

Обычно для выделения хитридиевых грибов используют следующие среды:

- 1) простой 3%-й водный агар (агар предварительно тщательно промывается водой);
- 2) агар № 12 (Leitner) (2% агара и 0.004% пептона);
- 3) агар № 13 (Foust) (2% агара, 0.15% мальтозы и 0.004% пептона);

4) кукурузный агар, 2—4 ложки кукурузной муки на 1 л воды слегка нагревают на водяной бане при температуре 60°С в течение 1 часа. Жидкость отфильтровывают, добавляют воды до 1 л и 2% агара. Для выделения из почвы хитридиевых грибов Гертнер (Gaertner, 1954) брал навеску почвы в 1. 5 г, рассыпал по чашке Петри и заливал стерилизованной ключевой водой. На 1 чашку Петри он помещал в качестве приманки 2 мг стерилизованной пыльцы *Pinus montana* или 4 половинки конопляного семени, или две муравьиные личинки и др. Пыльцу, конопляное семя; солому, муравьиные личинки стерилизовали в сушильном шкафу при 103° С. Комнатную муху, волосы свиньи или рогатого скота автоклавировали при 120°С. Чашки с приманками ставили в термостат при 22°С на 5—15 суток в темное помещение; в течение этого времени приманки периодически просматривали под микроскопом. Гардер и Убелмессер предлагали брать несколько больше почвы на одну чашку Петри, которую заливали стерильной водой, употребляя те же приманки, включая еще целлофан и пыльцу разных видов *Pinus*. Приманки должны свободно плавать по поверхности воды. Рейнболд использовал в основном те же приманки, но на одну чашку Петри он рассыпал 2 мг пыльцы *Pinus montana* или 5 муравьиных коконов (*Formica rufa*), или обрезки высохшей соломы, шелковые нити, корни злаковых растений, кустарников, земляных орехов, пыльцу растений различных семейств (*Gramineae, Compositae, Malvaceae*). Он рекомендует на 1 г исследуемой почвы брать до 50 мл водопроводной воды так, чтобы приманки свободно плавали по ее поверхности. Приманки вылавливались петлей. Чашки выдерживались в темноте и в термостате при +20° С. Ниже предлагается ряд сред для культивирования хитридиевых грибов.

I среда (Whiffen)

NH ₄ NO ₃	0. 5
Солевой раствор	500мл
Декстроза	2. 5

Агар	3.0
------	-----

Для получения рН =7. 2 добавляется 0. 2 н. NaOH

II среда (Ajello)

NH ₄ NO ₃	0. 5
KH ₂ PO ₄	1.5
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0.5
Декстроза	10.0
Тиамин	0.0002
Агар	15.0
Солевой раствор	500мл
Вода дистиллированная	1000 мл

Для получения рН =5. 5 добавляется 0. 2 н. NaOH

Солевой раствор

K ₂ HPO ₄	0. 3
KH ₂ PO ₄	0.2
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
CaCl ₂ ×3H ₂ O	0.1
Fe Cl ₂ ×4H ₂ O	0.01
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0.001
Вода дистиллированная	1000 мл

Солевой раствор

H ₃ BO ₃	0. 0057
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0.0186
FeNH ₄ (SO ₄) ₂ ×12H ₂ O	0.173
MnSO ₄ ×4H ₂ O	0.0081

ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0.079
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ×4H ₂ O	0.0036
Ca ₂ (SO ₄) ₃	0.0068
Вода дистиллированная	100 мл

III среда (Haskins a. Weston)

KNO ₃	2.0
Или NH ₄ NO ₃	8.0
Глюкоза	0.0186
Целлобиоза	0.173
Агар	0.0081
Солевой раствор	500 мл

Для получения pH =7. 2 добавляется 0. 2 н. NaOH

Солевой раствор

K ₂ HPO ₄	0.3
KH ₂ PO ₄	0.2
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
CaCl ₂ ×3H ₂ O	0.1
FeCl ₃	0.01
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0.001
Вода дистиллированная	1000 мл

IV среда (Stanier)

(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0
Глюкоза	5.0
K ₂ HPO ₄	1.0
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0.2

NaCl	0.1
CaCl ₂ ×3H ₂ O	0.1
FeCl ₂	0.02
Агар	15.0
Вода водопроводная	1000 мл
Целлюлоза фильтровальная бумага pH=7.0 - 7.2	

V среда (Emerson)

Дрожжевой экстракт	4 мл
Растворимый крахмал	15.0
KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0.5
Агар	20.0
Вода дистиллированная	1000 мл
Целлюлоза фильтровальная бумага pH=7.0 - 7.2	

Прим. Крахмал можно 10 г пептона и 10 г глюкозы.

5.6 Почвенные микромицеты р. *Chaetomium* и методы их культивирования

В почве довольно широко распространены различные виды р. *Chaetomium* (пор. *Sphaeriales*), примерно 17 видов. Эти организмы на обычных питательных средах обнаруживаются довольно редко, но, как правило, выделяются на средах с целлюлозой, древесиной и на растительных остатках. Перитеции р. *Chaetomium* поверхностные, свободно образующиеся, без стромы, расположенные на рыхлом мицелиальном сплетении, обычно с коротким слабо заметным устьищем, шаровидные, яйцевидные или эллиптические; оболочка перитеция перепончатая, разрывающаяся, непрозрачная, паренхиматического строения. Сумки большей частью с длинной ножкой, широкобулавовидные, булавовидно

цилиндрические, реже цилиндрические, легко расплывающиеся в воде; парафизы отсутствуют. Иногда на концах щетинок, покрывающих перитеции, образуются бесцветные конидии. Аскоспоры одноклеточные, эллиптические, лимоновидные или округлые, всегда темноокрашенные в зрелом возрасте. Сапрофиты.

Среды для культивирования р. Chaetomium

Культивирование микромицетов р. *Chaetomium* рекомендуется производить на следующих средах. Бумага, древесина (фанера) и растительные остатки являются обычными субстратами для культивирования р. *Chaetomium*.

Раствор Гетчинсона

K_2HPO_4	1.0
KCl	0.1
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0.3
NaCl	0.1
$FeCl_3$	0.01
$NaNO_3$	2.5
Вода дистиллированная	1000 мл
pH = 7.5	

Раствор Леониана

KH_2PO_4	1.2
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0.6
Пептон	0.6
Мальтоза	6.25
Пивное сусло	6.5 мл
Вода дистиллированная	1000 мл

pH = 6.7

Раствор Киоппа

Ca(NO ₃) ₂	1.0
K ₂ HPO ₄	0.25
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0.25
FeCl ₃	следы
Вода дистиллированная	1000 мл

pH = 5.7

Раствор Чуди

Глюкоза	1.0
Крахмал	0.25
Пивное сусло	0.25
Вода дистиллированная	1000 мл

pH = 5.1

Посев микромицета производят обычно в пробирки. В пробирки наливают по 3 мл воды и питательных растворов и в них опускают стебли *Melilotus*, полоски древесины (фанеры) в воду и фильтровальную бумагу (в этом случае свернутую в виде трубочек, закрепленных ниткой) и растворы. Стебли *Melilotus* — 8 см дл. и одинакового диаметра, полоски древесины (фанеры) и бумаги — 8 см дл. и 0.5 см в диам. Температура обычно 18—20° С. Агаровую среду разливают в пробирки также по 3—4 мл и скашивают так, чтобы находившаяся там полоска бумаги полностью покрывалась ею. Наблюдение за ростом культуры ведется до полного подсыхания среды. Образование новых перитециев на питательной среде происходит все время, пока имеются благоприятные условия для их развития. Поэтому в культуре выявляются перитеции разного возраста. Можно также выращивать грибы из почвы и колбах Эрленмейера. 10—15 мл из указанных сред наливают и колбу Эрленмейера объемом 50 мл, на дно

колбы опускают складчатый бумажный фильтр, направленный конусом вверх. Содержимое колбы засевают комочками почвы или водно-почвенной суспензией на фильтровальную бумагу.

5.7 Пор. *Sphaeropsidales* и методы их культивирования

Несовершенные грибы пор. *Sphaeropsidales* представлены небольшим числом, главным образом родами *Phoma*, *Macrophomina*, *Sphaeronaema*, *Coniothyrium*, *Chaetomella* и др. На обычных питательных средах эти организмы выделяются из почвы редко; что касается р. *Chaetomella*, то они легко изолируются из почвы при посеве почвенных комочков на кружках фильтровальной бумаги, наложенных поверх агаровых пластинок с минерально-азотной средой следующего состава:

K_2HPO_4	0.1
KCl	0.1
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0.3
NaCl	0.1
$NaNO_3$	2.5
Агар	15.0
Вода водопроводная	1000 мл

5.8 Пор. *Mucorales* и методы их культивирования

Мукоровые являются типичными плесневыми микромицетами, ведущими сапрофитический образ жизни и в значительной степени обитающими в почве. Мицелий у мукоровых обычно хорошо развит, несептированный, дихотомически разветвленный, распространяющийся как внутри субстрата (погруженный), так и на его поверхности (воздушный). При росте в жидкой питательной среде, содержащей сахар, мицелий в погруженном состоянии

делится поперечными перегородками на округлые или цилиндрические клетки, которые вначале соединяются в цепочки, затем распадаются и почкуются, образуя так называемые мукоровые дрожжи. Воздушный мицелий у некоторых представителей этого порядка развивается в виде особых столонов, состоящих из утолщенных маловетвящихся гиф с дугообразным ростом и образующих в местах соприкосновения с субстратом пучки корнеобразных ризоидов, проникающих в питательную среду и извлекающих из нее питательные вещества для роста гриба. Большинство видов мукоровых образует хламидоспоры, расположенные внутри гиф мицелия (интеркалярные, или промежуточные) или на их концах (терминальные, или верхушечные). Нередко также обнаруживается другой вид хламидоспор, так называемые стилоспоры, образующиеся на специальных коротких гифах (ножках). У мукоровых имеется бесполое и половое размножение.

Среды для культивирования мукоровых микромицетов

Подбор сред для культивирования пор. *Mucorales* производится с учетом того, для какой группы они предназначаются. Наиболее пригодной средой для сапрофитных и факультативных паразитов пор. *Mucorales* является среда Кука.

Среда Кука

К ₂ НРО ₄	0.25
Глюкоза	20.0
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0.25
Пептон	10.0
Агар	15.0
Вода дистиллированная	1000 мл

Прим. Многие мукоровые плохо усваивают сложные сахара и лучше развиваются при наличии глюкозы. При использовании среды Чапека в ней заменяют сахарозу глюкозой.

Для изоляции микромицетов пор. *Mucorales* рекомендуется использовать агаровую среду Кука кислой реакции (рН = 4. 2—4. 5). Для учета мукоровых грибов следует брать среды с желатиной и пептоном. При исследовании морфологии мицелия гриба лучше пользоваться желатиной с мальц-экстрактом и пептоном. При изучении строения и окраски колоний, расположения и строения спорангии рекомендуется использовать и качестве питательных сред рис и картофель, но для видов грибов родов *Zygorhynchus*, *Chaetocladium* и отчасти *Thamnidium* лучше всего употреблять желатиновые или агаровые среды. Что касается видов *p. Pilobolus*, то их хорошо определять и изучать на стерилизованном конском помете или на среде с навозной вытяжкой. Последняя среда благоприятна и для роста других родов мукоровых грибов. Изготавливается навозная вытяжка следующим образом. Берется свежий конский помет в количестве 100 г и размешивается в 1 л водопроводной воды. Смесь кипятится или настаивается, после чего вначале фильтруется через марлю, а затем через обычный фильтр. Иногда после фильтрации через марлю производят осаждение мути яичным белком. Полученную жидкость подкисляют и стерилизуют в автоклаве под давлением при 115—120° С.

Среда из риса

Отмытый и высушенный рис насыпается мерочкой в пробирки или колбы и добавляется в 2—3 раза больше водопроводной воды. Среда стерилизуется предпочтительно без давления или под давлением при температуре не выше 110°С.

5.9 Методы микроскопического исследования почвенных микромицетов

Чтобы определить род и вид почвенного микромицета, необходимо провести детальное микроскопическое изучение морфолого-культуральных признаков его строения в процессе роста и в особенности в период формирования органов репродуктивного размножения. Как известно, строение конидиального аппарата у видов грибов пор. *Moniliales* (*Hyphomycetales*) имеет основное значение для их систематики. Высокая дифференцированность конидиеносца и его ветвей у этих грибов значительно затрудняет их микроскопическое исследование. Следует учесть, что конидиеносцы весьма хрупки и легко повреждаются при изготовлении препаратов для микроскопирования. Наиболее обычный и широко применяемый метод исследования микроскопических препаратов — это так называемый метод «раздавленной» капли, при котором небольшую каплю водопроводной воды наносят на предметное стекло, затем на кончике препаровальной иглы вносят в нее небольшое количество материала, взятого из культуры микромицет; препарат сверху прикрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом. Этот метод, несмотря на его широкое применение в микологических исследованиях, все же не позволяет подробно рассмотреть все детали строения конидиеносного аппарата. Как правило, в этих препаратах наблюдаются в огромном количестве конидиальные споры, мелкие обрывки конидиеносцев и мицелия, заполняющие подчас все поле зрения микроскопа. Личин, изредка, случайно, на этом фоне удается заметить единичные конидиеносцы. Для распознавания почвенного микроскопического гриба исследования одного или двух конидиеносцев в препарате крайне недостаточно, ибо полученные при этом данные весьма скудны, чтобы изучаемый штамм гриба можно было с уверенностью отнести к тому или иному роду и виду. Различные индивидуальные отклонения в пределах одного или двух случайно сохранных в препарате конидиеносцев могут быть такими, что из-за них очень легко

ошибочно отнести исследуемую форму микромицета к чуждому ей виду, а иногда даже и роду. А. Флеминг и Дж. Смит, изучавшие виды р. *Penicillium*, разработали специальную методику для их микроскопического исследования. Им был предложен своеобразный способ изготовления препаратов: небольшой кусочек стерилизованной топкой вязкой пленки, верхняя поверхность которой инокулировалась в отдельных точках исследуемым видом микромицета, помещался в чашку Петри на питательный агар. Жидкая часть питательного агара легко проникала в пленку и обеспечивала на поверхности ее нормальное развитие микромицета. После образования колонии микромицета на пленке последняя снималась с агара и укладывалась на предметное стекло для микроскопирования. Авторы рекомендуют согнуть пленку посередине выросшей колонии, так как на линии сгиба, торчащие отдельные конидиеносцы будут отчетливо выделяться из общей массы колонии. Другие исследователи предлагали для микроскопирования кистевидной плесени пользоваться предметными стеклами с нанесенным на одну из поверхностей тонким слоем питательного агара, который предварительно инокулировался микромицетом. Колонии по мере разрастания на стеклах подвергались детальному микроскопированию. Совершенно иной способ предложил А. Т. Генрици. Он использовал для этого предметное стекло с углублением, которое наполовину заполнял расплавленным питательным агаром. Застывший в углублении (луночке) агар в одной точке инокулировался микромицетом, а затем углубление сверху закрывалось покровным стеклом. Микромицет разрастался в пространстве между слоем агара и нижней поверхностью покровного стекла и подвергался микроскопированию как при малом, так и при большом увеличении. Для изучения сапрофитных микромицетов также пользуются двумя методами их выращивания: под покровным стеклом и в кольцах Ван-Тигема, имеющих диаметр 10—12 мм внутри и 7 мм высоты. В первом случае на стерильное покровное стекло наносится капля расплавленной агаризованной питательной среды (например, Чапек-агар), в нее вносятся иглой споры или мицелий исследуемого гриба. Покровное стекло прикрепляется к предметному

по углам кусочками расплавленного парафина с таким расчетом, чтобы между стеклами оставалось расстояние 1–1.5 мм. Во втором случае на предметном стекле при помощи расплавленного парафина укрепляются кольца Ван-Тигема, сверху на них накладываются покровные стекла, на нижней стороне которых нанесены капли агара. Иглой в капли агара вносятся споры микромицета. Покровные стекла прикрепляются к кольцам вазелином. Второй метод менее удобен, чем первый, так как рост микромицета идет в основном в глубь кольца, в результате чего трудно рассмотреть под микроскопом все детали строения конидиеносного аппарата. Во избежание быстрого подсыхания агара препараты помещают во влажную камеру. Метод «живых препаратов» был применен Н. М. Пидопличко и В. И. Билай при изучении спорообразования у грибов рода *Cladosporium*. Они рекомендуют прокалить одну из поверхностей чистого предметного стекла над пламенем спиртовой горелки и положить его в горизонтальном положении прокаленной стороной вниз на какую-либо подставку так, чтобы стекло опиралось на нее лишь краями. Затем на прокаленную сторону стекла наносят снизу стерильной платиновой петлей небольшую массу расплавленной питательной агаровой среды. На прикрепленную к стеклу агаровую среду вносят мицелий и споры гриба. Затем снизу прижимают стерильное покровное стекло к предметному, расплющивая при этом агар в тонкий слой. Покровное стекло должно лежать на предметном так, чтобы одной стороной оно вплотную прикасалось к предметному стеклу и было расположено по отношению к нему под углом 10—15°. Для уменьшения возможности загрязнения культуры иногда целесообразно залить три смежные стороны покровного стекла расплавленным парафином, кроме его четвертой стороны, наиболее удаленной от поверхности предметного стекла. Во избежание подсыхания среды препарат ставят во влажную камеру с таким расчетом, чтобы наиболее открытая сторона культуры была направлена вниз, а вершина угла, образуемая покровным и предметным стеклами, — вверх. Выращивание микромицета на предметном стекле производится в термостате или при комнатной температуре. Наблюдения под микроскопом можно проводить

многократно, но в периоды между наблюдениями препарат нужно хранить во влажной камере. В своем пособии по определению микромицетов из рода *Aspergillus u Penicillium* Л. И. Курсанов предложил методику микроскопического исследования этих плесеней, которое он разделяет на два основных этапа. На первом этапе выросшие и достигшие обильного конидиального спорообразования колонии плесневых микромицетов подвергаются микроскопированию на месте роста в открытых чашках Петри (колонии изучаются при средних увеличениях в 200—300 раз; при таком увеличении удается рассмотреть общее сложение кисточек, расположение конидиеносцев, наличие воздушного мицелия и т. д.). Второй этап заключается в изготовлении обычных препаратов на предметных стеклах. Автор отмечает, что при изготовлении препаратов нужно по возможности не нарушать расположения частей колонии, для чего следует снять с агара целую молодую колонию микромицета, небольшую по величине (какая иногда бывает в результате самосева), поместить в каплю воды и накрыть покровным стеклом. В иных случаях рекомендуется вырезать радиальные ломтики из взрослой крупной колонии плесени и рассматривать их сбоку. Изготовленные таким способом препараты исследуются при сильных увеличениях. Изучаются детали строения и характер ветвления конидиеносцев, форма, размеры и структура спор и т. д. При экспериментальных исследованиях по изучению морфологии микромицетов из родов *Penicillium u Aspergillus* М. А. Литвинов и Н. Н. Стрыгин пришли к выводу, что ни один из изложенных способов микроскопирования микромицетов не достигает своей цели без соответствующей обработки исследуемого материала. Авторами был предложен следующий метод микроскопического исследования грибов. В чашку Петри очень тонким слоем разливается расплавленный агар (Чапек-агар, сусло-агар и т. п.), так что после застывания агара на чашке заметна лишь тонкая агаровая пленка. На поверхность застывшего агара в различные места препаративной иглой вносят споры микромицета. Культуру в чашке Петри на несколько суток помещают в термостат при температуре 24—26° С. Если замечается подсыхание тонкого слоя

агара, то в чашку кладут небольшой кусочек стерильной фильтровальной бумаги, смоченной стерильной дистиллированной водой. Обычно на 3—4-е сутки колония микромицета хорошо разрастается с достаточным образованием конидиального спороношения. С этого момента следует приступить к исследованию колонии гриба. Чашку Петри раскрывают и нижнюю крышку со слоем агара исследуют под микроскопом. Вначале колонию рассматривают при малом увеличении безо всякой обработки. При этом увеличении удастся выяснить расположение конидиеносцев: одиночных или сближенных в пучки, места их отхождения от субстратного или воздушного мицелия, характер расположения конидий — в виде расходящихся цепочек или склеенных в колонку. Культуральные признаки гриба изучаются на колониях, выросших на обычном слое питательного агара. При изучении строения конидиеносного аппарата недостаточно исследовать его только при малом увеличении. Необходимо изготовить препараты, пригодные для микроскопирования при больших увеличениях. Для этого рекомендуется использовать те же колонии грибов, которые ранее рассматривались при малом увеличении. Колонии перед исследованием при увеличениях в 400—600 раз необходимо предварительно обработать 70°С спиртом. При таком разведении спирт меньше деформирует объект по сравнению с более концентрированным и в то же время вполне достаточно, чтобы в колонию после обработки легко проникала вода. Последняя не обладает достаточно низким поверхностным натяжением, чтобы самостоятельно вытеснить воздух из капиллярных пространств, образованных густым сплетением конидиеносцев и мицелия, прикрытых сверху плотным слоем конидий. Только спирт способен проникнуть через эту корку из конидий в узкие межмицелиальные пространства. Кроме 70° спирта, можно было бы использовать абсолютный спирт, почти не вызывающий заметной деформации объекта, но последующее применение воды или водного раствора уксуса, которого нельзя избежать при дальнейшей обработке колоний, приведет к серьезным и непоправимым изменениям в конидиальном аппарате гриба. Употребление 95°С спирта наиболее опасно, так как может вызвать глубокую

деформацию объекта. Учитывая это, следует применять 70° спирт (этиловый), как наименее изменяющий исследуемые формы микромицета. Использование спирта должно быть очень кратковременным. Рекомендуется вслед за спиртом сейчас же нанести несколько капель крепкой уксусной кислоты, которая в таких условиях прекрасно проникает в глубь колонии. Как известно, уксусная кислота почти не деформирует объект, однако применение ее без предварительной обработки колонии спиртом часто не приводит к нужным результатам: она значительно хуже, чем спирт, проникает в глубь колонии микромицета, в особенности если последняя на агаре обильно разрослась. Уксусная кислота, употребляемая в чистом виде, без предварительной обработки колоний микромицета спиртом, не освобождает спороносящие веточки конидиеносного аппарата микромицета от масс конидий, облипающих его со всех сторон. Спирт, очищая спороносящий конидиеносец от излишних спор, делает его доступным для микроскопического исследования.

Уксусная кислота препятствует полному отпадению цепочек конидий, которое происходит при продолжительном действии спирта. Кроме того, употребление уксусной кислоты вслед за спиртом основано на необходимости предупредить наступление тех изменений в исследуемом объекте, которые возникают в случае употребления воды непосредственно после спирта. При последовательном применении спирта и уксусной кислоты удастся получить наилучшие результаты. В то время как спирт содействует сжиганию гиф и резкому отпадению конидий, уксусная кислота, наоборот, ведет к некоторому разбуханию конидиеносцев и прикреплению конидий к фиалидам или другим спороносящим веточкам. Обработанная таким способом колония промывается слабой струей водопроводной воды. Лучше всего для этой цели употреблять промывалку, обычно используемую при окраске микроскопических препаратов. Промывание удаляет ранее опавшие под действием спирта конидии. После этого на колонию вновь наносят 2—3 капли воды или слабого раствора уксусной кислоты. В таком виде колония, покрытая сверху стеклышком, исследуется под большим увеличением. В результате вышеуказанной обработки колонии гриба

удается наблюдать в каждом поле зрения микроскопа многочисленные свободные ненарушенные конидиеносцы с целыми кисточками, с их ветвями, метулами, фиалидами, стеригмами и цепочками конидий. Некоторые исследователи рекомендуют рассматривать препараты, изготовленные из живых культур микромицетов, в молочной кислоте или в смеси ее с другими веществами (лактофенол Аммана, хлор-лактофенол и т. п.). Использование для этих целей молочной кислоты все же не дало удовлетворительных результатов. Молочная кислота весьма пригодна для изучения сухого гербарного материала. Насколько хороша молочная кислота и ее смеси при обработке плотных и малопрозрачных гербарных объектов, настолько она не пригодна при исследовании живых культур. Если же возникает необходимость изготовить постоянные препараты, то в этом случае следует применять смеси типа лактофенола Аммана. Для изготовления демонстрационных препаратов рекомендуется применять окраску микромицетов.

Лучше всего использовать 0.1—0.2%-й водный раствор генцианвиолета. Колония, промытая водой и обработанная слабым раствором уксусной кислоты, окрашивается 2—3 каплями этой краски. В препаратах наблюдается хорошо окрашенные конидиеносцы микромицетов. Для прижизненной (витальной) окраски микромицетов может быть применен ряд основных красок (генцианвиолет, метиленблау, сафранин, нейтральрот, метилвиолет) и кислых красок (эритрозин, оранже-д и др.), однако концентрация их в растворе в этом случае должна быть в среднем от 1 : 1000 до 1 : 10 000 и иногда, как исключение, 1:500. Дальнейшее повышение концентрации краски может повести к гибели гриба, особенно в тех случаях, когда вместо водных растворов красок в качестве их растворителей употребляют молочную кислоту, спирт-глицерин и другие органические соединения.

Быстро распадающиеся цепочки спор у пор. *Moniliales* и быстро растворяющиеся оболочки спорангиев у пор. *Mucorales* затрудняют их микроскопическое исследование. Этим недостатков в значительной степени лишены препараты, в которых вместо воды применяется смесь из спирта,

глицерина и воды, взятых в равных объемах. В этой смеси цепочки спор распадаются медленнее, чем в воде, и изготовленные с этой смесью препараты могут храниться в течение нескольких недель.

5.10 Методика выделения и изучения микромицетов обитающих в ризосферной, прикорневой и корневой зонах растений

Многочисленные наблюдения показали, что естественные синузии бактерий, актиномицетов и микроскопических грибов в почве корневой сферы растений резко отличаются от таковых во внекорневой почве. Количественные различия почвенных микроскопических грибов в корневой сфере и вне ее обычно усиливаются по мере углубления корневой системы растения в нижележащие почвенные горизонты и выявляются главным образом в изменении соотношения числа родов грибов. Большинство проведенных исследований, касающихся расселения микроорганизмов и в том числе микромицетов в корневой почве растений, показало, что наибольшее скопление их наблюдается в тонком слое почвы, непосредственно примыкающем к поверхности корней. В слое почвы, расположенном несколько далее от поверхности корней, на расстоянии примерно до 1 см, количество микроорганизмов меньше, чем в слое почвы, непосредственно облегающем корни. При анализе микомикрофлоры корневой системы растений необходимо иметь в виду, что вокруг корней имеется несколько зон, различающихся по количеству и качеству населяющих их микроскопических грибов. Различаются три зоны расположения микроорганизмов в корневой системе растений: 1) корневая — микроорганизмы этой зоны обитают непосредственно на поверхности и внутри тканей корней (так называемая корневая микофлора); 2) прикорневая — микроорганизмы этой зоны заселяют тонкий слой почвы в 1—2 мм, плотно примыкающий к поверхности корней (так называемая почвенная прикорневая микофлора); 3) ризосферная — микроорганизмы этой зоны развиваются в слое почвы, расположенном за предыдущим слоем почвы на

расстоянии до 1 см от поверхности корней (так называемая почвенная ризосферная микофлора). Для анализа микомикрофлоры корневой системы того или иного растения следует выбрать 4—5 экземпляров растений, типичных для исследуемого участка. Их выкапывают в виде небольших монолитов площадью 10—15 X 10—15 см на глубину 25—30 см. Выкопанные растения упаковывают в стерильные мешочки, сделанные из плотной бумаги «Крафт» или лучше из пергаментной бумаги, и обвязывают шпагатом. Можно упаковать только корневую систему, уложенную в мешочек, оставляя снаружи надземную часть растения. Растения помещают в специальный ящик или плотную сумку и возможно быстрее доставляют в лабораторию, организованную в полевом стационаре или где-либо поблизости в населенном пункте. Растения следует подвергать анализу в тот же день или в крайнем случае оставить их до следующего дня, тщательно предохранив от сильного высыхания.

Для выделения микромицетов почвенно-ризосферной микофлоры (3-я зона) обычно пользуются двумя методами. При первом методе грибы изолируются из слоя почвы, опавшей при тщательном встряхивании пучка мелких корней, предварительно освобожденных от прилипших к ним крупных уплотненных комочков почвы; при втором методе грибы выделяют из почвы, смытой стерильной водой с поверхности мелких корней. Во втором случае с корней смывается как ризосферный слой, так и частично прикорневой слой почвы, поэтому состав микроскопических грибов будет смешанный, т. е. ризосферио-прикорневой. По нашему мнению, для выделения ризосферной грибной флоры следует пользоваться первым методом. Опавшая с мелких корней при их встряхивании почва представляет собой основной фонд почвы для анализа ризосферной микофлоры 3-й зоны. Если внимательно под лупой рассмотреть корни после их встряхивания, то можно легко убедиться, что остается достаточно заметный тонкий слой почвы, крепко прилипший к корням и обычно непадающий при их встряхивании. Он представляет собой основной фонд почвы для выделения микромицетов прикорневой (2-й) зоны. Для отделения этого слоя почвы необходимо корни тщательно помыть стерильной

водой. Однако трудно провести резкое разграничение между ризосферным и прикорневым слоями. Поэтому почва первого смыва с корней будет состоять из почвы прикорневого слоя и частично из почвы остаточно-ризосферной. Учитывая это обстоятельство, мы предлагаем рассматривать микофлору, выделенную из почвы первого смыва корней, как своеобразную ризосферно-прикорневую группировку грибов. Микромицеты, выделенные из почв всех последующих смывов корней, составляют исключительно микофлору 2-й зоны корневой системы, т. е. прикорневую микофлору. Последовательные смывы корней рекомендуется проводить 10—12 раз, иногда более. Таким образом, для микологического анализа прикорневой зоны растения используется почва, примыкающая тонким слоем непосредственно к корням и отделяемая от них только путем смыва водой, а для анализа ризосферной зоны — почва, расположенная от поверхности корней в пределах до 1 см и легко отделяемая от корней путем обычного встряхивания. Для выделения микроскопических грибов из почв ризосферной и прикорневой зон растений необходимо корни растений осторожно извлечь из почвенных монолитов. Обнаженные корневые ответвления, предварительно освобожденные от приставших к ним крупных уплотненных комочков почвы, но с прилипшей к их поверхности почвой в виде мелких частичек, отрезают стерильными ножницами или отрывают пинцетом. Корневые отрезки затем тщательно встряхивают для отделения от них слоя ризосферной помпы. Из этой опавшей с корней почвы берут две равные навески. Одну часть первой навески почвы непосредственно высевают на питательные среды, а из другой части готовят водные почвенные суспензии разных разведений, которые затем также высевают на жидкие и твердые питательные среды для культивирования микроскопических грибов. Вторую навеску ризосферной почвы доводят до постоянного сухого состояния и из расчета на 1 г абсолютно сухой почвы производят количественный расчет микроскопических грибов, выросших на искусственных питательных средах. Для определения веса прикорневой почвы, смытой с поверхности корней, поступают следующим образом. Почвенный водный смыв с поверхности корней, взятый в определенном

объеме, фильтруется через заранее высушенный до постоянного веса и точно взвешенный фильтр. Разница в весе между первоначально высушенным фильтром и вторично высушенным фильтром после фильтрации через него смыва будет указывать на пес сухой почвы, осевшей на фильтр. По отношению к весу абсолютно сухой почвы, смытой с корней, проводится подсчет колоний грибов, выросших при посеве водных смывов на сусло-агар, Чапек-агар или водный агар. Для анализа корневой микофлоры (1-я зона корневой системы) доставленные в лабораторию почвенные монолиты с растениями ставят в таз с обычной кипяченой водой на 30—60 мин. После размягчения почвы корни осторожно извлекают из всей массы, затем освобождают от приставших к ним заметных крупных частичек почвы и отрезают стерильными ножницами (прокаленными на спиртовке и остуженными). Отрезанные корни помещают в колбочку, содержащую 100 мл стерилизованной водопроводной воды. Корни тщательно промывают и вновь извлекают из колбы для дальнейшей очистки от мелких комочков почвы и всех посторонних механических примесей (мертвых растительных остатков, посторонних корней и т. д.). Затем корни повторно до 4—5 раз и более обмывают стерильной водой. После того как с корней стечет вода, их разрезают ножницами на небольшие отрезки 3—4 см длины. Для анализа можно брать все корни, за исключением стержневого, который не подвергается исследованию. Корневые отрезки просушиваются между 2 листами стерильной фильтровальной бумаги, взвешиваются и быстро, в течение 20—30 сек, растираются в стерильной фарфоровой ступке со стерильным кварцевым песком. Обычно из нарезанных корней берут навеску в 1 г (для бобовых растений лучше брать навеску в 5 г). Растертые корни переносят в колбу со 100 мл стерилизованной водопроводной воды, предварительно отливая несколько кубиков воды для обмывания пестика и ступки после освобождения от растертых корней. Воду после обмывания пестика и ступки сливают обратно в колбу, затем эту колбу встряхивают в течение 5—7 мин. После 30-секундного отстаивания из нее берут пипеткой жидкость, которую после соответствующего разведения высевают на жидкие питательные микробиологические среды по 6 пробирок на

каждую взятую среду (три разведения по две пробирки на каждое) и на твердые питательные среды по 4 чашки Петри (два разведения в двухкратной повторности). Обычно для посева на твердые среды берут жидкость третьего и четвертого разведений. Для определения сухого веса корней, взятых для анализа, делают вторую навеску корней, отмытых от почвы, которую высушивают до постоянного веса. Для контроля необходимо подвергнуть микологическому анализу почву, взятую вблизи изучаемого растения, но вне его корней. Часто бывает трудно получить действительно контрольную, лишенную корней пробу почвы. Даже при самом тщательном выборе места для контроля в почвенных образцах могут быть мельчайшие корешки. Следовательно, контроль является в известной мере условным. Однако брать контрольную пробу почвы вдали от исследуемого растения нельзя, так как возможно, что этот образец почвы по своим физико-химическим особенностям будет резко отличаться от почвы корневой системы растения. Почву для микологического анализа рекомендуется брать в поверхностных слоях (от 5 до 20 см), т. е. в зоне наибольшего распространения микроорганизмов. В отдельных случаях, в зависимости от характера развития корневой системы растения, можно брать почву и на глубине 20—35 см. При исследовании микроскопических грибов корневой системы растения вначале учитывается общее количество грибов, т. е. количество всех выросших форм грибных колоний при высеве почвенной болтушки на различные искусственные питательные среды. Затем производится учет родов грибов. Наконец, исследуется видовой состав грибов. Прослеживаются изменения, наступающие в составе ризосферных, прикорневых и корневых сообществ микроскопических грибов в зависимости от фазы развития изучаемого растения. Тщательное изучение видového состава грибов необходимо для выяснения специфичности ризосферной и прикорневой почвенной микомикрофлоры различных ранений, которая выражается в первую очередь в количественном превосходстве одного или нескольких родов и групп видов грибов, не встречающихся в таких количествах и соотношениях в контрольной внекорневой почве, и в выявлении доминантных видов в данной

синузии. Кроме того, важно установить влияние исследуемого растения на формирование качественного состава ризосферной и прикорневой мнкомикрофлоры, а также проследить изменения комплексов ризосферной и прикорневой микрофлоры изучаемого растения в условиях обитания его в различных естественных растительных ассоциациях. При изучении микроскопических грибов различных почв в первую очередь следует отметить приуроченность отдельных видов или групп видов грибов к различным географическим и климатическим зонам, характеризовать микрофлору почв, занятых естественной растительностью, в зависимости от типа почвы, состава растительного ценоза, сезона года и т. д. Исследователю необходимо фиксировать факты географической и экологической изменчивости в пределах вида. Следует также проследить образование местных географических вариантов и экотипов грибов, особенно тех форм, которые по характеру и степени изменений выходят за пределы обычной видовой изменчивости.

5.11 Методика Самцевича

Образцы ризосферы и корешков отбираются на глубине 4—10 см в 5—8 местах у одних и тех же деревьев три раза в год. Корешки берутся только всасывающие, неопробковевшие. Образцы общим весом около 1 кг собираются в широкогорлые стерилизованные склянки. В лаборатории после тщательного просмотра для анализа отбираются только наиболее характерные для ризосферы в почвы (контроля) образцы весом около 10 г каждый. Навеску всасывающих корешков вместе с приставшими к ним комочками и мелкими частицами почвы вносят в колбочку г 100 мл стерилизованной водопроводной воды, тщательно взбалтывают 5 мин. и после 30-секундного отстаивания из полученной ризосферной болтушки делают соответствующие разведения, а затем высевают их на элективные питательные среды. Отмытые корешки тщательно выбирают из болтушки, ополаскивают стерильной водой, удаляют влагу стерильной фильтровальной бумагой и взвешивают. По разнице и весе почвы ризосферы с

корешками до отмывания и в весе корешков после отмывания узнают вес почвы ризосферы, взятый для анализа. Взвешенные отмытые корешки стерильно переносят в колбочку с 100 мл стерильной воды, куда для лучшего отмывания микроорганизмов добавляют 10 г стерильного кварцевого песка. Отмывание и посев производятся так же, как и при анализе ризосферы. Образцы контрольной почвы (вне ризосферы) берутся из середины комочков, в которых совершенно отсутствуют корешки.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Кто внес значительный вклад в систематизацию и классификацию микромицетов и какой?
- 2) Основные морфологические и культуральные признаки микромицетов р. *Fusarium*.
- 3) Какие среды используют для культивирования микромицетов рода *Fusarium*?
- 4) Почвенные хитридиевые микромицеты что это и как их культивировать?
- 5) Какие 6 способов получения чистой культуры указаны в этой главе?
- 6) Почвенные несовершенные грибы пор. *Sphaeropsidales* и методы их культивирования.
- 7) Опишите ключевые моменты в методах микроскопического изучения микромицетов.
- 8) Как происходит выделение и изучение микромицетов, обитающих в ризосферной, прикорневой и корневой зонах растений.
- 9) Методика Самцевича.
- 10) Из чего берутся образцы контрольной пробы в методике Самцевича?

ГЛАВА 6. ОКРАСКА И ФИКСАЦИЯ ПРЕПАРАТОВ

6.1 Окраска препаратов живых почвенных микромицетов

При микроскопическом исследовании микромицетов, особенно форм, не имеющих темной окраски мицелия и спор, весьма желательно окрашивать их соответствующими красками. При приготовлении окрашенных препаратов можно произвести витальную окраску без нарушения жизнеспособности исследуемых грибов. Для этой цели может быть применен ряд красок: из основных — генцианвиолет, метиленблау, сафранин, нейтральрот, метилвиолет и др.; из кислых красок — эритрозин, оранж-д и др. Концентрация краски не должна превышать 0.001–0.005%.

Прим. Для растворения красок, кроме воды, для воднорастворимых красок может применяться, например, молочная кислота, спирт, глицерин (для метиленблау) и другие растворители, хотя окраска в этих случаях уже не будет витальной.

6.2 Окраска препаратов фиксированных почвенных микромицетов

Фиксация препарата преследует цели: а) убить организм, б) обеспечить его надежное прилипание к предметному стеклу, в) сделать мазок из тканей гриба более восприимчивым к окраске. Для фиксации используют физические и химические средства. При применении физических средств обычно высушенный на воздухе препарат несколько раз проводится над пламенем спиртовки. Однако для детального микроскопического рассмотрения строения грибной клетки фиксация препарата путем нагревания не годится, и для этого применяют химические средства. При применении химических средств препарат обычно обрабатывают следующими веществами: 1) этиловым спиртом (90°С) в течение 5—20 мин. ; 2) смесью этилового спирта и эфира в равных объемах (жидкость Никифорова) до испарения; 3) метиловым спиртом в течение 5 мин.

(погружением препарата в спирт); 4) спиртформолом (смесь этилового спирта — 95 мл и формалина — 5 мл) в течение 5—10 мин. ; 5) жидкостью Карнуа (смесь этилового спирта — 60 мл, хлороформа — 30 мл, ледяной уксусной кислоты — 10 мл) в течение 15 мин. ; 6) парами осмиевой кислоты. Фиксация этой кислотой достигается очень быстро и производится следующим образом. В чашку Петри помещают часовое стеклышко со стеклянной ватой. На вату наливают небольшое количество 1—2%-го раствора осмиевой кислоты; сверху на часовое стеклышко накладывают предметное стекло влажным мазком вниз н чашку Петри закрывают. Через 1—2 мин препарат вынимают и высушивают. Фиксированный препарат покрывают раствором какого-либо красителя. Для получения более чистых препаратов краситель наливается на фильтровальную бумагу, покрывающую поверхность препарата. Для лучшего окрашивания рекомендуется при нанесении красителя препарат слегка подогреть до легкого выделения пара. Краситель держится на стекле до 2—3 мин. (метиленовая синь не более 0. 5 мин.), после этого его сливают, а мазок промывают легкой струей воды и высушивают (можно подсушить посредством фильтровальной бумаги). После указанной процедуры препарат исследуется под малым и большим увеличениями.

Метилловый фиолетовый (метилвиолет)

Краситель легко растворяется в воде и спирте. Применяется в виде следующих растворов: 1) 10 мл насыщенного спиртового раствора краски в 100 мл воды, насыщенной анилином (4 мл анилина + 96 мл воды); 2) 10 мл насыщенного спиртового раствора краски в 20 мл дистиллированной воды и добавляется 2. 5 мл уксусной кислоты.

Генциановый фиолетовый (генцианвиолет)

Неочищенный препарат метилового фиолетового, употребляется в тех же растворах.

Метиленовая синь (метиленблау)

1) Насыщенный спиртовым раствор: к 100 мл 96°С спирта прибавляется 3 г порошка метиленовой сини. Оставляется на несколько суток (несколько раз встряхивать), затем раствор отфильтровывается. При употреблении разводится от 5 до 10 раз. Раствор стойкий.

2) Насыщенный водный раствор: 2 г краски растворяется в 100 мл воды, оставляется на двое суток (встряхивать изредка). На дне бутылки должен остаться избыток нерастворенной краски. Раствор не стойкий.

3) Щелочная метиленовая синь (Лёффлера): к 100 мл дистиллированной воды прибавляется 30 мл насыщенного спиртового раствора краски и 1 мл 1%-го раствора едкого калия. Раствор стойкий.

Фуксин

Фуксин — основной насыщенный спиртовый раствор: 1) 10 г сухого красителя в 100 мл 96°С спирта. 2) Водно-спиртовый раствор фуксина: 10—20 мл насыщенного спиртового раствора в 100 мл воды.

Сафронин

2 г сафронина высыпают в стеклянную воронку па бумажный фильтр и залипают 100 мл кипящей дистиллированной воды.

ГЛАВА 7. ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ У ПОЧВЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ

7.1 Метод агаровых блоков

Поверхность питательной агаровой пластинки в чашке Петри засеивается сплошным «газоном» культурой микромицета, испытываемого в качестве антагониста. После того как микромицет хорошо разовьется (обычно это наступает на 7—8-е сутки роста микромицета), стерильным пробочным сверлом (диам. 20—22 мм) вырезают агаровые блоки. Далее с помощью стерильного скальпеля их вынимают из сверла и переносят по одному в центр других стерильных чашек Петри, в каждую из которых затем наливают питательный агар, пригодный для развития тест-организмов. Заливку чашек Петри агаром, предназначенным для тест-организмов, производят так, чтобы блок агара с испытываемой грибной культурой возвышался на 1—1.5 мм над поверхностью агара. В течение 2—3 суток агар в чашках Петри не засеивается тест-организмом. Этот срок необходим для того, чтобы антибиотическое вещество, продуцируемое грибной культурой, успело продиффундировать в агар, прежде чем на нем разрастется тест-организм. По истечении этого срока на питательный агар по радиусам от самого края блока в сторону края чашки Петри производят посев тест-организма. После посева чашки Петри инкубируют в термостате при температуре, благоприятной для роста тест-организма. По зонам отсутствия роста тест-организма на агаровой пластинке можно судить об антибиотической эффективности исследуемой культуры гриба. Агаровые блоки с микромицетной культурой также можно перенести непосредственно на поверхность другой агаровой пластинки, предварительно засеянной тест-организмом. После инкубации в термостате (время инкубации зависит от развития тест-организма) вокруг агаровых блоков образуется зона отсутствия роста тест-организма.

7.2 Метод штриха

На питательный агар в чашки Петри высевается в виде штриха испытуемый как антагонист почвенный микроскопический гриб. К выросшей культуре этого гриба подсевают перпендикулярно или в виде окружности тест-организмы. Чашки Петри инкубируют в термостате при температуре, благоприятной для роста тест-организма. При наличии антибиотических свойств у гриба тест-организмы, чувствительные к данному антагонисту, не будут развиваться на некотором расстоянии от штриха роста гриба-антагониста. Наибольшее действие гриба-антагониста проявится на том тест-организме, развитие которого начинается далее всего от штриха роста микромицета.

7.3 Метод штриха М. А. Литвинова

Чашку Петри разделяют перегородкой на две части. В одну половину наливают 8—10 мл питательного агара (сусла-агара или Чапек-агара), пригодного для развития почвенного микроскопического гриба, испытуемого в качестве антагониста. Культуру микромицета вносят перед заливкой агара или после заливки в чашки Петри. Чашки помещают в термостат при температуре 25—27°C, обычно являющейся оптимальной для роста многих почвенных грибов (температуру выбирают в зависимости от вида гриба), на 7—8 суток. После того как гриб разовьется достаточно хорошо, перегородку удаляют и вторую половину чашки Петри заполняют агаром, пригодным для развития тест-организма. Чашку оставляют на 18—20 час, с тем чтобы антибиотическое вещество, синтезируемое грибом-антагонистом, из одной половины пластинки агара проникло в другую половину. Только после этого срока питательный агар второй половины чашки Петри засеивается тест-организмом. Затем чашку инкубируют в термостате при температуре, пригодной для роста тест-организма. По образовавшейся зоне отсутствия роста тест-организма судят об антибиотических свойствах испытуемого гриба. Для определения

антибиотической активности микромицетов Н. С. Егоров предложил упрощенную модификацию метода М. А. Литвинова, но ее можно использовать так же для определения антибиотической активности. Усовершенствование состоит в том, что опыт ставится без применения стеклянной перегородки. При этой методике в чашку сразу вливается питательный агар в количестве 20 мл, благоприятный для развития гриба-антагониста. Через определенный срок роста гриба, обычно на 7—8-е сутки, половину агаровой пластинки с выросшим на ней грибом удаляют. Свободную часть чашки заливают 10 мл агаровой среды, оптимальной для развития тест-организма. Чашку оставляют на 18—20 час, после чего вторую половину засевают тест-организмом. Через сутки устанавливают антибиотическую активность испытуемого почвенного гриба ⁶.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Какие красители используют при окраске препаратов?
- 2) Какая цель при фиксации препарата?
- 3) Какие средства используют для фиксации препарата?
- 4) Опишите метод фиксации препарата.
- 5) Что рекомендуется сделать для лучшего окрашивания препарата?
- 6) Какие методы определения антибиотической активности микромицетов описаны?
- 7) В чем заключается метод агаровых блоков?
- 8) Опишите метод Штриха.
- 9) Какая упрощенная схема метода Штриха существует, и кто ее предложил?

⁶ Литвинов, А.М. Методы изучения почвенных микроскопических грибов: Учебное пособие / А.М. Литвинов. – Ленинград: Изд-во «Наука», 1969. – 123 с.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Адамжанова, Ж.А. Микология: учебное пособие для студентов лесохозяйственных специальностей / Ж.А. Адамжанова. — Павлодар: Кереку, 2009. – 105 с.
- Ашихмина, Т.Я. Микроорганизмы как агенты биомониторинга и биоремедиации загрязненных почв / Т.Я. Ашихмина, Л.И. Домрачева, Л.В. Кондакова, и др. – Киров: Вятский государственный университет, 2018. – 254 с.
- Белошапкина, О.О. Основы классификации фитопатогенных грибов и псевдогрибов: методические указания / О.О. Белошапкина, С.И. Чебаненко. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 2008. – 20 с.
- Благовещенская, Е.Ю. Фитопатогенные микромицеты: Учебный определитель / Е. Ю. Благовещенская. – М.: ЛЕНАНД, 2015. – 240 с.
- Заводовский, П.Г. Методы изучения грибов Пособие для студентов эколого-биологического факультета / П.Г. Заводовский. — Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2014. — 20 с.
- Карамова, Н.С. Методы исследования и оценки биоповреждений, вызываемых микроорганизмами: учебно-методическое пособие / Н.С. Карамова, Г.В. Надеева, Т.В. Багаева. – Казанский университет, 2014. – 36 с.
- Клёнова, Н.А. Лабораторный практикум по микробиологии: учебное пособие / Н.А. Клёнова. - Самара: Изд-во «Самарский университет», 2012. – 102 с.
- Кузнецова, Е.А. Микробиология: учебно-методическое пособие / Е.А. Кузнецова. – Орел: ОрелГТУ, 2004. – 188 с.
- Леонтьев, Д.В. Медицинская микология с основами микотоксикологии / Д.В. Леонтьев, А.Г. Сербин. – Харьков: Национальный фармацевтический университет, 2010. — 142 с.
- Марфенина, О.Е. Антропогенная экология почвенных грибов / О.Е. Марфенина. – Москва: Медицина для всех, 2005. — 196 с.

- Мельников, В.Л. Методы изучения морфологии микроорганизмов: учеб. пособие / В.Л. Мельников, Н.Н. Митрофанова, Л.В. Мельников. – Пенза: Изд-во ПГУ, 2014. – 68 с.
- Переведенцева, Л.Г. Микология: Грибы и грибоподобные организмы: Учебное пособие / Л.Г. Переведенцева. – Пермь: Перм. гос. ун-т., 2009. – 199 с.
- Переведенцева, Л.Г. Определитель грибов (агарикоидные базидиомицеты): учебное пособие / Л.Г. Переведенцева. — Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2015. — 119 с.
- Поликсенова, В.Д. Методические указания к занятиям спецпрактикума по разделу «Микология. Методы экспериментального изучения микроскопических грибов» для студентов 4 курса дневного отделения специальности «G 31 01 01 – Биология» / Авт.-сост., А.К. Храмцов, С.Г. Пискун. – Мн.: БГУ, 2004. – 36 с.
- Сербин, А.Г. Основы медицинской микологии: учебное пособие для студентов фармацевтических ВУЗов / А.Г. Сербин, Д.В. Леонтьев, В.В. Россихин. – Харьков: 2009. – 104 с.
- Силаева, Т.Б. Ботаника. Раздел Грибы [Электронный ресурс]: учеб.-метод. пособие / Т. Б. Силаева. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2018. – 145с.
- Собченко, В.А. Альгология и микология: Грибы и грибоподобные организмы: практическое пособие для студ. спец. 1–31 01 01–02 – «Биология (научно-педагогическая деятельность)» / В.А. Собченко, О.М. Храченкова, Ю.М. Бачура и др.; Министерство образования РБ, Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины. – Гомель: ГГУ им. Ф. Скорины, 2009. – 100с.
- Сокирко, В.П. Фитопатогенные грибы (морфология и систематика): учеб. пособие / В. П. Сокирко, В. С. Горьковенко, М. И. Зазимко. – Краснодар: КубГАУ, 2014–178 с.
- Терехова, В.А. Микромицеты в экологической оценке водных объектов и наземных экосистем / В.А. Терехова. – М.: Наука, 2007. - 215 с.

- Храмцов А.К. Микология: методические указания к спецкурсу по разделу Экология грибов и грибоподобных организмов / А.К. Храмцов, А.И. Стефанович. – Минск: БГУ, 2011. – 45 с.
- ГОСТ 17.4.3.04-85 Охрана природы. Почвы. Общие требования к контролю и охране от загрязнения
- ГОСТ Р 57068-2016 Биологические средства защиты леса. Энтомопатогены и биофунгициды. Определение эффективности применения
- ГОСТ Р 58433-2019 Биологические средства защиты леса. Оценка эффективности применения бактериальных препаратов
-
- ГОСТ Р 58595–2019 Почвы. Отбор проб
- ГОСТ Р 56157-2014 Почва. Методики (методы) анализа состава и свойств проб почв. Общие требования к разработке
- ГОСТ Р ИСО 22030-2009 Качество почвы. Биологические методы. Хроническая фитотоксичность в отношении высших растений
- ГОСТ Р ИСО 23909-2013 Качество почвы. Подготовка лабораторных проб из больших проб

ДЛЯ ЗАМЕТОК