

<http://yadyra.ru>

**ФГОУ ВПО Российский Государственный Аграрный  
Университет - МСХА им. К.А.Тимирязева**

Кафедра микробиологии

Курсовая работа

на тему:

**«Распространение актиномицет  
в почвах разных типов»**

Выполнила:

ст. 201 группы  
факультета ПАЭ

Шумилин А. О.

Научный руководитель:

Доц. Волобуева О. Г.

Москва, 2009

## Оглавление

Оглавление.....	2
Аннотация.....	3
Введение.....	4
Теоретическая часть.....	5
Общая характеристика актиномицет.....	5
Нитрификация.....	12
Денитрификация.....	14
Азотфиксация.....	15
Практическая часть.....	17
Объект исследований.....	17
Определение влажности.....	19
Метод учёта численности.....	19
Результаты опыта. Учет численности микроорганизмов.....	21
Заключение.....	27
Библиографический список.....	30

## **Аннотация**

В данной работе изучается распространение различных микроорганизмов в разных почвах. Основной целью работы является выявление в почвах актиномицет – переходной формы между бактериями и грибами. Изучаются процессы превращения азота в почве микроорганизмами. В работе изучено несколько видов почвы. По результатам практической работы и литературным данным были сделаны соответствующие выводы о распространении различных микроорганизмов в почвах разных типов.

## **Введение**

Мир микроорганизмов в природе весьма разнообразен. Значительное их число представлено бактериями. Микроорганизмы широко распространены в природе. Широкое распространение микроорганизмов свидетельствует об их огромной роли в природе. При их участии происходит разложение различных органических веществ в почвах и водоемах, они обуславливают круговорот веществ и энергии в природе, от их деятельности зависит плодородие почв.

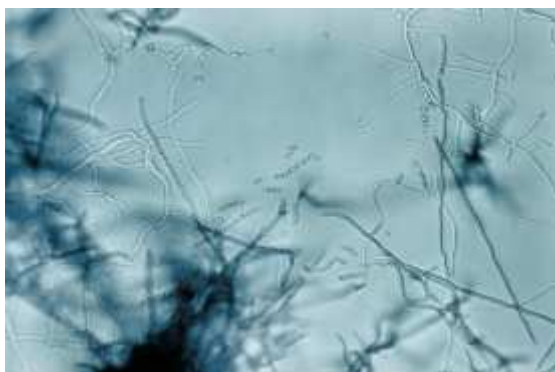
Большинству растений недоступен газообразный азот, в огромном количестве находящийся в воздухе, а из разнообразных азотных соединений, встречающихся в почве, они могут усваивать только минеральные. Поэтому столь важен вопрос о превращениях соединений азота в почве под воздействием микроорганизмов. Превращения азота и содержащих этот элемент соединений в почве довольно сложны, но в них можно выделить основные направления, определяющие круговорот азота в природе: атмосферная азотфиксация азота → аммонификация белков и аминокислот → нитрификация → денитрификация → атмосферный азот.

Некоторую часть атмосферного азота связывают свободноживущие или находящиеся в симбиозе с растениями микроорганизмы. Данный процесс обогащает азотом и почву, и растения. Органические азотсодержащие соединения в тканях растений и животных, попадая в почву, подвергаются минерализации до аммонийных соединений. Часть растительных остатков трансформируется в темно-окрашенное, содержащее азот вещество, — гумус. Аммонийная форма азота подвергается в почве окислению нитрифицирующими бактериями с образованием солей азотной кислоты. При определенных условиях нитраты могут восстанавливаться до молекулярного азота и улетучиваются из почвы. Значительное количество азотсодержащих соединений микроорганизмы ассимилируют, а азот в органических формах практически недоступен растениям.

## Теоретическая часть

### Общая характеристика актиномицет

Актиномицеты (устаревшее название лучистые грибки) — бактерии,

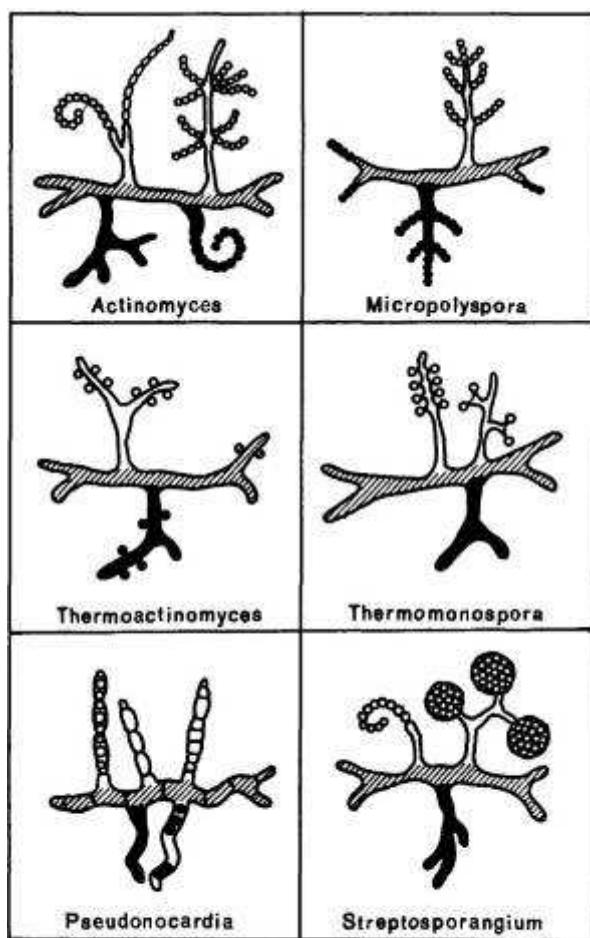





имеющие способность к формированию на некоторых стадиях развития ветвящегося мицелия (некоторые исследователи, подчёркивая бактериальную природу актиномицетов, называют их аналог грибного мицелия тонкими нитями) диаметром 0,4-1,5 мкм,

которая проявляется у них в оптимальных для существования условиях. Имеют грамположительный тип клеточной стенки. Они обладают способностью развиваться при высоких температурах (50—60 °С), независимо от температурного минимума их роста. Среди них встречаются актиномицеты, способные расти при 60—70 °С. Лучистые грибки, развивающиеся при обычных температурах (25—30 °С), не растут при температуре 50 °С и выше.

Количественный учет термофильных актиномицетов в почвах и компостах был проведен В. Ваксманом с сотрудниками в 1939 г. Термофильные актиномицеты были обнаружены во всех почвах и во все сезоны года. Особенно много их в почвах, удобренных навозом (в среднем 200 000 на 1 г в весенних и летних пробах). Зимой термофильные актиномицеты составляли 10—15% от всей термофильной микрофлоры; весной и летом 70—90%. Количество термофильных лучистых грибков не зависит от географической закономерности, а определяется экологическими факторами, в частности типом почвы и степенью ее окультуренности. В пределах одного семейства и рода (например, *Micromonospora*) могут быть как термофильные, так и мезофильные культуры; несмотря на довольно стойкий признак термофильности, видимо, нецелесообразно ориентироваться на него при

характеристике родов или более крупных таксономических единиц. В почве обнаруживаются представители почти всех родов актиномицетов.



-  Субстратный мицелий в глубине агара
-  Субстратный мицелий на поверхности агара
-  Воздушный мицелий

Актиномицеты обычно составляют четверть бактерий, вырастающих на традиционных средах при посевах их разведённых почвенных суспензий и 5-15% прокариотной биомассы, определяемой с помощью люминисцентной микроскопии. Их экологическая роль заключается чаще всего в разложении сложных устойчивых субстратов; предположительно они участвуют в синтезе и разложении гумусовых веществ. Могут выступать симбионтами беспозвоночных и высших растений.

Большинство известных термофильных лучистых грибов

быстро гидролизуют крахмал, свертывают и пептонизируют молоко, разжижают желатин и т. д., что свидетельствует о высокой ферментативной активности и может быть использовано в практике. Однако эти культуральные свойства лабильны и поэтому, с точки зрения многих исследователей, не могут быть основными критериями при определении вида. Другие культуральные свойства, такие, как восстановление нитратов, образование сероводорода, в большей степени отражают физиологические особенности микроорганизма, более стабильны и, следовательно, играют существенную роль при идентификации вообще и термофильных актиномицетов в частности. Для выделения термофильных актиномицетов

разными авторами использовались разные методики. Выделение этих микроорганизмов хорошо удается на крахмальном агаре, крахмально-аммиачно-сульфатном агаре, а также мясо-пептонном агаре (МПА). Лучшим для этой цели оказался крахмально-аммиачно-сульфатный агар, на котором наблюдается слабый рост более требовательных к среде термофильных бактерий и, наоборот, хороший рост термофильных актиномицетов. Наиболее подходящая температура для выделения 55—60 °С. Термофильные актиномицеты обладают большой скоростью роста. Их жизненный цикл проходит гораздо быстрее, чем у мезофильных штаммов. Термофильные актиномицеты образуют разветвленный мицелий из гиф, диаметр которых от 0,2 до 1 мкм. На твердых средах они растут в виде плоских колоний, достигающих 3—4 см в диаметре, а иногда и до 6—8 см, часто покрытых налетом, состоящим из воздушных гиф со спорами. Термофильные актиномицеты образуют воздушный и субстратный мицелии. Гифы воздушного мицелия без спор термофильных лучистых грибков, как правило, белоснежно-белого цвета. Воздушный мицелий со спорами или сохраняет белый цвет, или приобретает темно-серый оттенок. Серо-зеленые, голубые и желтые штаммы встречаются реже. У некоторых термофильных актиномицетов в процессе развития изменяется цвет колоний на агаре от белоснежно-белого до желтого, грязно-зеленоватого, коричневого, красноватого и даже черного. Многие представители термофильных лучистых грибков образуют растворимый пигмент, который проникает в среду и окрашивает ее в яркие цвета.

Изучение тонкого строения спор ряда актиномицетов позволило исследователям сделать вывод, что некоторые термофильные актиномицеты образуют споры, близкие по строению к спорам бактерий родов *Bacillus* и *Clostridium*. Обмен веществ у термофильных микроорганизмов происходит более интенсивно, чем у мезофильных. Об этом свидетельствуют экспериментальные данные о более высокой ферментативной активности

термофилов и о повышенном количественном содержании в клетках термофильных микроорганизмов некоторых ферментов. По числу спор актиномицеты делят на моно- (например, *Saccaromonospora*, *Micromonospora*) олиго- (*Actinomadura*) и полиспоровые (*Streptomyces*), выделяя особо те, которые образуют спорангии. Спорообразование преимущественно экзогенное (*Thermoactinomyces* образует настоящие эндоспоры, однако в настоящее время этот род на основании хемотаксономических и генетических признаков, несмотря на выраженную мицелиальную стадию склонны относить к бациллам), реже псевдоэндогенное (*Planomonospora*, *Dactylosporangium*).

У *Streptomyces* и спорулирующих *Actinomyces* споры образуются в два этапа:

Апикальный участок воздушной гифы отделяется септой, нуклеоид вытягивается.

Почти одновременно клетка делится септами на участки, нуклеоид делится в тех же местах, клеточная стенка становится в 2 раза толще, споры округляются и их стенка становится в 7 раз толще стенки гифы. У олигоспоровых септы закладываются базипитально. У монспоровых могут образовываться по механизму почкования. Прорастание происходит в следующие стадии:

Инактивная спора гидрофобна, термоустойчива, не проявляет дыхательной активности

Смачивающаяся активированная спора проявляет активность ферментов, начинается дыхание

Спора набухает, начинается синтез РНК

Выход 1-3 (реже 4) ростовых трубок, начинается синтез ДНК. Эта стадия необратима, остальные три – обратимы.



При изучении цитохромов в клетках мезофильных и термофильных представителей различных родов актиномицетов было обнаружено, что у некоторых термофильных актиномицетов (*Thermoactinomyces* sp., *Actinobifida dichotomica*, *Mycropolyspora* sp.) оказалось больше цитохромов типов с и а; очевидно, некоторые участки цепи переноса электронов (в частности, цитохромная система) термофильных штаммов могут значительно отличаться от таковых у мезофильных форм. Нередки случаи, когда термофильные актиномицеты способны образовывать в больших количествах экзоферменты, действующие на различные субстраты, что может быть использовано в практике. Однако образование подобных экзоферментов не является свойством, специфическим для термофилов. С целью выяснения биохимических особенностей термофильных актиномицетов многие исследователи изучали состав нуклеотидов ДНК как термофильных, так и мезофильных видов. Результаты исследований дают возможность полагать, что термофильные актиномицеты содержат сравнительно меньше ГЦ (гуанин + цитозин) в составе ДНК, чем мезофильные штаммы. Этот вопрос требует дальнейших исследований. В биомассе актиномицетов, выросших при высокой температуре (55—57 °С), содержится в 2 раза больше свободных нуклеотидов; количество нуклеиновых кислот, наоборот, падает. Свободные нуклеотиды, видимо, играют более значительную роль в интенсификации обмена веществ у термофилов по сравнению с мезофильными микроорганизмами.

Дифференциация мицелия – процесс усложнения в процессе развития колонии актиномицета. Прежде всего она проявляется в делении на первичный (субстратный) и вторичный (воздушный) мицелий. Воздушный толще, он гидрофобен, содержит больше ДНК и ферментов, на поверхности его клеток имеются различные структуры (палочковидные, фибриллы).

Мицелий с редкими перегородками, практически ценоцитный у спорообразующих, с частыми перегородками (септами) у форм, для которых

мицелий распадается и близких к ним. Вегетативные клетки большинства форм делятся поперечными перегородками, *Geodermatophilus* и *Dermatophilus* – во взаимно перпендикулярных направлениях, некоторые актиномицеты содержат клетки с септами, проходящими в совершенно разных направлениях (спорангии *Micromonospora*, везикулы *Frankia*). Ветвление происходит по механизму почкования. Образование септы начинается с впячивания цитоплазматической мембраны и образования мезосомы, в которой синтезируется вещество септы.

В процессе старения цитоплазма клеток приобретает неравномерную электронную плотность, в ней перестают различаться рибосомы, граница нуклеоида расплывается, клеточная стенка становится тонкой и рыхлой, образуется микрокапсула. При автолизисе в цитоплазме образуются обширные светлые участки, нуклеоид распадается, в клеточной стенке образуются отверстия, клетка заполняется мембранными структурами, разрушающимися последними.

Актиномицеты доминируют на поздних стадиях микробной сукцессии, когда создаются условия для использования труднодоступных субстратов. Активация актиномицетной микрофлоры происходит при внесении в почву крахмала, хитина, нефтепродуктов и т.д.. В то же время из-за медленного роста актиномицеты не способны конкурировать с немителиальными бактериями за легкодоступные вещества. Возможно, что вторичные метаболиты (в особенности, меланоидные пигменты) играют какую-то роль в образовании гумуса.

Ценозообразующую роль актиномицеты играют в местах первичного почвообразования, находясь в этих условиях в ассоциации с водорослью. Эти ассоциации в лабораторных условиях формировали лишайникоподобный таллом (актинолишайник).

Актиномицеты (рода *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*, *Actinomadura*) являются постоянными обитателями кишечника дождевых червей, термитов и многих других беспозвоночных. Разрушая целлюлозу и другие биополимеры, они являются их симбионтами. Представители рода *Frankia* способны к азотфиксации и образованию клубеньков у небобовых растений (облепиха, ольха и др.). Есть патогенные формы, вызывающие актиномикоз. Большинство актиномицетов – аэробы, факультативные анаэробы присутствуют лишь среди актиномицетов с непродолжительной мицелиальной стадией. Здесь усматривается некоторая параллель с грибами, среди которых лишь немиецелиальные дрожжи также способны жить в анаэробных условиях. Предполагается что менее эффективный анаэробный тип метаболизма успешен при большей относительной поверхности клеток, которая достигается фрагментацией мицелия.

Количество выведенных микроорганизмов находится в тесной зависимости от влажности почвы  $a_w$ . Считается что актиномицеты более устойчивы к высушиванию чем немиецелиальные бактерии, благодаря чему они доминируют в пустынных почвах. Лабораторное хранение почвенных образцов в условиях, не способствующих вегетативному росту прокариот увеличивает относительное содержание актиномицетов, учитываемое методом посева. Особенно долго способны сохраняться при высушивании склероции, образуемые родом *Chainia*. Показано что при  $a_w=0,50$  некоторые споры прорастают (р. *Streptomyces*, *Micromonospora*), однако образовавшийся мицелий не ветвится. При  $a_w=0,86$  прорастают споры практически всех актиномицетов, у некоторых мицелий ветвится, образуются микроколонии, оптимум достигается при  $a_w=0,95$ .

Чаще всего актиномицеты нейтрофилы, однако некоторые роды ацидофильны или алкалофильны. Характерным свойством актиномицетов является ацидотолерантность, благодаря чему их доля в микробном

комплексе лесных почв относительно высока. Отмечено что на кислой среде продлевается вегетативная стадия, на щелочной, напротив, ускоряется спорообразование.

### **Нитрификация**

Нитрификация — микробиологический процесс окисления аммиака до азотистой кислоты или её самой далее до азотной кислоты, что связано либо с получением энергии (хемосинтез, автотрофная нитрификация), либо с защитой от активных форм кислорода, образующихся при разложении пероксида водорода (гетеротрофная нитрификация).

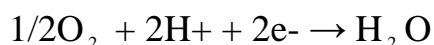
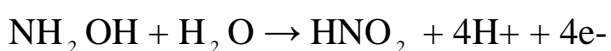
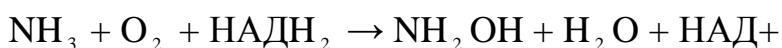
Протекает в аэробных условиях в почве а также природных водах. Часто может вызывать появление в них нитратов в токсичном количестве, а поскольку нитраты — наиболее активно мигрирующее в растворе соединение азота — происходит их вынос из почвы в расположенные ниже по склону водоемы, что влечет за собой уменьшение коэффициента использования азотных удобрений и эвтрофикацию данных водоемов.

#### *Автотрофная нитрификация*

Нитрификация проходит в две стадии, которые осуществляются разными микроорганизмами.

#### Окисление аммиака до нитрит-аниона

Первая стадия — окисление аммиака до нитрит-аниона, которое осуществляют нитрозные бактерии родов *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* и *Nitrosospira* (ранее выделялись также рода *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio*, но сейчас их представители включены в *Nitrosospira* ) по следующему механизму:

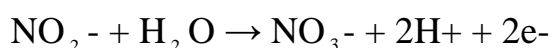


Предполагается, что на первом этапе субстратом является именно аммиак, а не аммоний, поэтому процесс не идёт в кислой среде. Ферментом для первой реакции служит аммиакмонооксигеназа, фермент с очень низкой субстратной специфичностью, окисляющая также метан, оксид углерода, циклогексан, фенол, бензиловый спирт, однако со скоростью на порядки ниже. Гидроксиламин ингибирует работу фермента. В бесклеточных экстрактах восстановителем может служить НАД(Ф)·Н, однако в клетке его роль, скорее всего, выполняет один из компонентов дыхательной цепи.

Следующую реакцию осуществляет гидроксиламинооксидоредуктаза, расположенная в периплазме. Окислителем в них служит цитохром с, с него электрон передаётся на убихинон и далее в дыхательную цепь, на цитохромоксидоредуктазу и, в конечном итоге, на кислород. При этом запасается энергия в виде трансмембранного протонного потенциала.

Окисление нитрит-аниона до нитрат-аниона

Вторая стадия — окисление аниона азотистой кислоты до аниона азотной, производимое нитратными бактериями (почвенный род *Nitrobacter* и водные *Nitrospira*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*). Процесс протекает в одну реакцию:



катализируемую нитрит:нитрат-оксидоредуктазой, локализованной в ЦПМ. Далее электроны передаются на цитохромы дыхательной цепи, в которой единственным пунктом транслокации протонов является цитохромоксидаза. Образование НАД(Ф)·Н для фиксации углекислого газа также происходит путём обратного переноса электронов.

### *Организмы*

Нитрозных и нитритных бактерий ранее выделяли в семейство *Nitrobacteraceae*, сейчас с развитием геносистематики их рода разнесены по разным подклассам протеобактерий. Оптимальная для их развития

температура 25—30 °С и рН 7,5—8,0. В кислой среде процесс не идет. Все эти бактерии — грамтрицательные хемолитоавтотрофы, использующие энергию окисления соединений азота для синтеза органических веществ из углекислого газа. Некоторые из них способны переключаться на хемоорганогетеротрофный метаболизм, однако ни одного хемолитогетеротрофа среди данных организмов найдено не было. Морфологически эти группы разнообразны, в большинстве своем мелкие, подвижные, с полярным или перитрихальным жгутикованием. Окисление они проводят на цитоплазматической мембране.

### **Денитрификация**

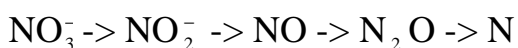
Денитрификация (диссимиляционная денитрификация) — сумма микробиологических процессов восстановления нитратов до нитритов и далее до газообразных оксидов и молекулярного азота. В результате их азот возвращается в атмосферу и становится недоступным большинству организмов. Осуществляется только прокариотами (причём как бактериям, так и археями) в анаэробных условиях и связана с получением ими энергии. Особо выделяют ассимиляционную денитрификацию, приводящую к синтезу азотсодержащих клеточных компонентов и свойственную всем растениям, многим грибам и прокариотам, способным расти на средах с нитратами, однако не сопровождающуюся получением энергии этими организмами.

### **Биохимия процесса**

Диссимиляционная денитрификация представляет собой процесс анаэробного дыхания, то есть использования нитратов и продуктов их частичного восстановления вместо кислорода для окисления веществ (у разных микроорганизмов как органических, так и минеральных) в ходе метаболизма с выделением энергии. Поэтому денитрификация — процесс анаэробный и подавляется молекулярным кислородом при  $E_h$  более +300 мВ.

Энергетическая эффективность процесса при восстановлении нитратов до молекулярного азота составляет около 70 % от аэробного дыхания с использованием кислорода.

Процесс протекает постадийно:



Катализируют реакции нитратредуктаза, NO-образующая нитритредуктаза, редуктаза окиси азота и редуктаза закиси (гемиоксида) азота соответственно.

Проводить процесс полностью и получать энергию имеют возможность лишь прокариоты, причем все они факультативные анаэробы, при наличии кислорода переключающиеся на обычное дыхание. Многие денитрификаторы вместе с тем обладают способностью к азотфиксации (например, *Azospirillum lipoferum*). Часть бактерий имеет лишь часть ферментов и проводит усечённую денитрификацию.

### **Азотфиксация**

Азотфиксация — фиксация молекулярного атмосферного азота, diazotrophia. Процесс восстановления молекулы азота и включения её в состав своей биомассы прокариотными микроорганизмами. Важнейший источник азота в биологическом круговороте. В наземных экосистемах азотфиксаторы локализуются в основном в почве.

### *Биохимия*

Атомы в молекуле азота связаны прочной тройной ковалентной связью, из-за чего он практически не вступает в реакции окисления-восстановления в нормальных условиях без применения катализаторов и не может

использоваться растениями и животными. Микроорганизмы для восстановления азота используют целую серию ферментов (ферредоксин, гидрогеназа), важнейшим из которых является нитрогеназа. За её синтез ответственны так называемые *nif*-гены, широко распространенные у прокариот (в том числе археобактерий), но не встречающиеся у эукариот. Процесс азотфиксации достаточно энергоёмкий, для ассимиляции 1 молекулы азота требуется не менее 12 молекул АТФ, то есть для использования 1 мг азота анаэробным микроорганизмом требуется около 500 мг сахарозы.

Нитрогеназа блокируется молекулярным кислородом, поэтому азотфиксация в основном анаэробный процесс. Однако ряд аэробных бактерий выработал механизмы защиты нитрогеназы от блокирования:

Механизм повышенного уровня дыхания. *Azotobacter chroococcum* при азотфиксации окисляет часть органического вещества, не запасая выделившейся энергии, а только лишь удаляя этим кислород.

Механизм локализации азотфиксации в гетероцистах характерен для цианобактерий, способных к фотосинтезу с выделением кислорода и создающих для защиты от него нитрогеназы особые, лишенные хлорофилла клетки. Некоторые цианобактерии, не образующие гетероцисты, также способны к азотфиксации. Нитчатая цианобактерия *Plectonema boryanum* фиксирует азот в микроаэробных условиях (1.5% содержания кислорода в темноте и 0.5% кислорода на свету), нитчатые цианобактерии *Symploca* и *Lyngbya majuscula*, а также одноклеточные цианобактерии родов *Gloeothese* и *Cyanothese* способны к азотфиксации при отсутствии освещения.

Механизм симбиотической защиты характерен для клубеньковых бактерий.



## **Практическая часть**

Задачей практической части данной работы является проведение полного микробиологического анализа почвы, в состав которого входят:

1. Качественная и количественная оценка микроорганизмов на мясо-пептоном агаре (МПА).
2. Качественная и количественная оценка микроорганизмов на сусло - агаре (СА).
3. Качественная и количественная оценка микроорганизмов на среде Гетчинсона .
4. Качественная и количественная оценка микроорганизмов на среде Эшби.
5. Определение относительной населённости почвы аэробными целлюлозоразрушающими микроорганизмами;
6. Определение биологической активности почвы.

### **Объект исследований**

Для исследований было взято 2 вида почв: дерново-подзолистая и чернозем выщелоченный.

Дерново-подзолистые почвы имеют кислую реакцию по всему профилю, высокую (20-70%) ненасыщенность основаниями. Отличаются невысоким содержанием гумуса (0,5-2,5%) и небольшим гумусовым слоем (10-20 см), в связи с этим - невысоким естественным плодородием и, как правило, кислой реакцией ( $pH=4-5$ ), а в составе гумуса преобладают фульвокислоты. Верхние горизонты дерново-подзолистых почв обеднены полуторными окислами и обогащены кремнеземом. В большинстве случаев они переувлажнены.

Нуждаются в дренажных и других осушительных работах, увеличении гумусового горизонта, а также регулярном известковании и внесении повышенных доз органических удобрений или землевании. В этом типе почв обменные основания представлены главным образом кальцием и меньше – магнием. Они бедны валовыми запасами и подвижными формами фосфора и азота.

Чернозем выщелоченный. В отличие от оподзоленных черноземов не имеют кремнеземистой присыпки в гумусовом слое. Горизонт А темно-серой или черной окраски, с отчетливо выраженной зернистой или зернисто-комковатой структурой, рыхлого сложения. Мощность его колеблется от 35 до 4050 см. Нижняя граница горизонта  $B_1$  залегает в среднем на глубине 7-80 см, но иногда может проходить и ниже (90-100 см). Характерная морфологическая особенность выщелоченных черноземов – наличие под горизонтом  $B_1$  выщелоченного от карбонатов горизонта  $B_2$ . Этот горизонт имеет ясно выраженную буроватую окраску, гумусовые затеки и примазки, ореховато-призматическую или призматическую структуру. Переход в следующий горизонт – ВС или С – обычно отчетливый, и граница выделяется по скоплению карбонатов в виде известковой плесени, прожилок.

Основные роды – обычные, слабо дифференцированные, бескарбонатные, глубинноглеевые, слитые. На виды разделяются, помимо степени гумусированности и мощности гумусового слоя, также и по степени выщелоченности (слабо-, средне- и сильновыщелоченные). Распределение выщелоченных черноземов по конкретной территории связано с условиями рельефа и механическим составом пород. Черноземы сильновыщелоченные обычно приурочены к различного рода пониженным участкам рельефа и механическим составом пород. Чем легче механический состав черноземов, тем сильнее они выщелочены.

### **Определение влажности.**

Влажность почвы необходимо определить, так как полученные данные микробиологического анализа должны быть пересчитаны на 1 г воздушно-сухой почвы. Для этого взвешивается пустой бюкс, затем бюкс с произвольным количеством почвы. После сушки в сушильном шкафу при 105° и достижения постоянной массы, определяют содержание воздушно-сухой почвы в 1 г сырой.

$$A\% = \frac{b - c}{c - a}$$

где,

a - масса пустого бюкса

b - масса бюкса с сырой почвой

c - масса бюкса с сухой почвой

$$a = 23,6$$

$$b = 25,5$$

$$c = 25,2$$

$$A(\%) = ((25,5 - 25,2) / (25,2 - 23,6)) \times 100 \% = 18,7\%$$

### **Метод учёта численности**

При определении численности бактерий сначала готовят суспензии, навеску почвы переносят в колбу ёмкостью 250 мл, содержащую 90 мл стерильной водопроводной воды, интенсивно сбалтывают вращательным движением в течение 10 минут и дают отстояться грубым частицам почвы.

Затем методом разведения готовят суспензии, содержащие разное количество почвы. С этой целью из предыдущего разведения стерильной пипеткой переносят по 1 мл суспензии в последующую пробирку, содержащую также 9 мл стерильной водопроводной воды. В первой пробирке 1 мл суспензии, приготовленной по этому методу, соответствует разведению  $10^{-1}$ . Последующие составляют  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  и т.д.

Из полученных разведений проводят посев на жидкие и плотные среды. Суспензии почвы на плотные питательные среды высеваем поверхностно. Для этого агаризованные питательные среды подсушивают. На поверхность агаровой пластины стерильной градуированной пипеткой наносят 0,05 мл почвенной суспензии из соответствующего разведения, затем стеклянным шпателем Дригальского растирают каплю; при этом открытую чашку держат в вертикальном положении около пламени горелки. Для проведения общего микробиологического анализа необходимо сделать посев микроорганизмов на плотные среды – мясопептонный агар (МПА), на котором учитывается количество сапротрофных микроорганизмов, использующих органические формы азота, и сусло-агар (СА), для обнаружения азотобактера используется метод обрастания комочков почвы. Все засеянные чашки Петри и пробирки ставят в термостат с температурой  $28^{\circ}$  –  $30^{\circ}$  на определённый срок инкубации, затем вынимают и учитывают результаты.

Плотные питательные среды:

1. МПА (мясо-пептонный агар) – учитывается численность сапрофитных микроорганизмов, использующих в качестве источника питания органические формы азота.
2. СА (сусло-агар) – выявляется численность микроорганизмов, усваивающих минеральные формы азота и грибов.

3. Среда Гетчинсона – применяется для учета денитрофицирующих бактерий.
4. Среда Эшби – выявление азотфиксирующих аэробных микроорганизмов путем раскладывания комочков почвы

**Результаты опыта. Учет численности микроорганизмов  
Учет количества микроорганизмов на плотных средах**

После инкубации (4 дня) чашки Петри с засеянными средами вынимают из термостата, подсчитывают число колоний.

При подсчёте колоний на плотных питательных средах (МПА и СА) чашки Петри, не открывая, просматривают в проходящем свете и с внешней стороны доньшка чашки колонии отмечают чернилами или тушью.

При глубинном посеве число микроорганизмов в 1 г абсолютно сухой почвы (X) подсчитывают следующим образом: число клеток в 1 г сырой почвы делят на количество абсолютно сухой почвы, содержащейся в 1 г сырой почвы. Для нахождения числа клеток в 1 г сырой почвы надо число колоний умножить на степень разведения.

*Учёт на МПА.*

Качественную и количественную оценку состава микроорганизмов на МПА проводят визуально на 4-5 день после посева. После подсчета количества всех колоний на чашке их группируют по культуральным признакам: характеру роста на агаре, цвету, краю, форме, размеру (приблизительный) и консистенции колонии – для качественного анализа сапротрофной микрофлоры на МПА.

Образец	Разведение	Количество колоний в чашке	Число КОЕ/г почвы
Дерново-подзолистая	$10^{-4}$	104	1279213

Учет микроорганизмов КОЕ в 1г абсолютно сухой почвы:

$$104 \cdot 10^4 / 0.813 = 1279213$$

Общее количество микроорганизмов КОЕ, в 1г сырой почвы:

$$104 \cdot 10^4 = 1040000$$

Количество доминирующих форм:  $76 \cdot 10^4 = 760000$

Численность доминирующей формы от общей численности

$$1040000 - 100\%$$

$$760000 - x$$

$$x = 73,07 \%$$

Исследуемая доминирующая группа микроорганизмов:

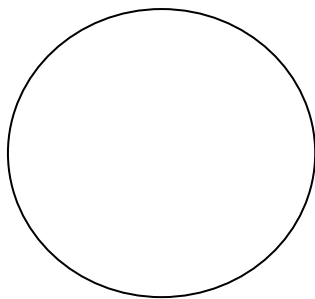
*Bacillus* sp.

Культуральные признаки:

- Форма колоний – округлая.
- Размер – 2 мм.
- Цвет – белый.
- Поверхность – гладкая.
- Край – ровный.
- Структура – однородная.
- Консистенция – маслянистая.
- Блеск – матовый.

Морфологические признаки:

- Форма клетки – палочковидная.
- Характер расположения – одиночные.
- Способность к спорообразованию – да.



Bacillus sp.

X 1600

Учёт на СА.

Образец	Разведение	Количество колоний в чашке	Число КОЕ/г сухой почвы
Дерново- подзолистая	$10^{-3}$	15	18518

Учет микроорганизмов КОЕ в 1г абсолютно сухой почвы:

$$15 * 10^3 / 0,81 = 18518$$

Общее количество микроорганизмов КОЕ, в 1г сырой почвы:

$$15 * 10^3 = 15000$$

Количество доминирующих форм:  $9 * 10^3 = 9000$

Численность доминирующей формы от общей численности :

$$15000 - 100\%$$

$$9000 - x$$

$$x = 60\%$$

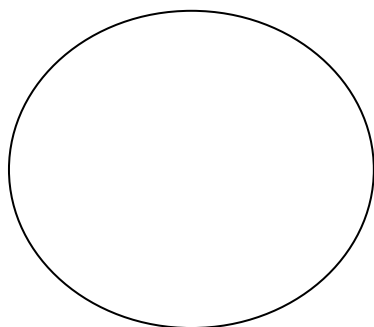
Исследуемая доминирующая группа микроорганизмов: *Penicillium* sp.

Культуральные признаки:

- Форма колоний – круглая с неровными краями
- Размер – 4-7 мм
- Цвет – серо-зеленый.
- Поверхность – шероховатая.
- Край – неровный
- Структура – неоднородная
- Консистенция – рыхлая
- Блеск – мучнистый

Морфологические признаки:

- Форма клетки – цепочки конидий.
- Характер расположения – цепочка.
- Способность к спорообразованию – да.



*Penicillium* sp.

x1600



## **Учет численности отдельных групп микроорганизмов методом обрастания комочков**

Используется для определения относительной оценки плотности заселения аэробными целлюлозоразрушающими микроорганизмами и нитрифицирующими бактериями учитываемых групп в почве.

### **Учет микроорганизмов на среде Эшби**

Содержание колоний азотобактера в среде Эшби определяют на 3-5 сутки инкубации по бело-серым слизистым колониям, которые постепенно приобретают темно-бурый.

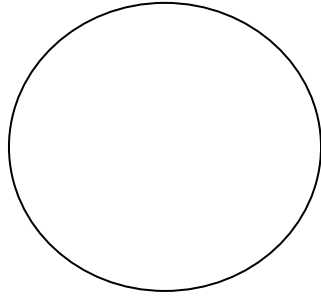
Образец почвы	Количество комочков в чашке	Количество комочков с налётом	% комочков с налётом общего числа
Дерново-подзолистая	25	25	100

Культуральные признаки:

- Форма колоний – округлая.
- Размер – 4-6 мм
- Цвет – бурый.
- Поверхность – гладкая.
- Край – ровный.
- Структура – однородная.
- Консистенция – слизистая.
- Блеск – жирный

Морфологические признаки:

- Форма клетки – палочковидная.
- Способность к спорообразованию – нет.



Azotobacter cyroococum.

x1600

### Учет микроорганизмов на среде Гетчинсона

Среда имеет следующий состав:

$\text{NaNO}_3$  – 2,5;  $\text{FeCl}_3$  – 0,01;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{NaCl}$  – 0,1;  $\text{CaCl}_2$  – 0,1; pH среды доводят до 7,2 добавлением 20% - го раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Данным раствором смачивают фильтровальную бумагу в чашках Петри.

Учет микроорганизмов ведут на восьмые сутки инкубации

Образец почвы	№ опыта	Комочков в чашке	Комочков с налетом	% комочков с налетом от общего числа
Дерново-подзолистая	1	25	16	64
Дерново подзолистая	2	25	22	88

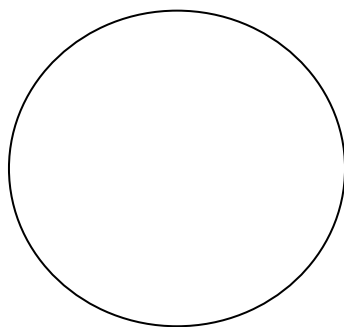
Культуральные признаки:

- Форма колоний – округлая.

- Размер – 4-6 мм.
- Цвет – бурый.
- Поверхность – гладкая.
- Край – ровный.
- Структура – однородная.
- Консистенция –слизистая.
- Блеск – матовый.

Морфологические признаки:

- Форма клетки – палочковидные.
- Способность к спорообразованию – не способны.



*Pseudomonas fluorescens*

x1600

## **Заключение**

При исследовании образцов дерново-подзолистой почвы было обнаружено большое количество актиномицет разных типов по отношению к грибам и другим микроорганизмам. Наличие актиномицет говорит о повышенной кислотности почвы и наличии в почве тяжелых металлов.

*Actinomyces* sp найденные в почве говорят о наличие в почве большого количества минерального азота, так как актиномицеты данного рода поглощают минеральные формы азота. Это свидетельствует о большом количестве опада, поступающего в почву и разлагаемого актиномицетами и прочими бактериями. Большинство родов актиномицет содержится в гумусовых слоях почвы, а также в дерновом горизонте, и чуть меньшим содержанием в горизонте минеральном.

В почве также были найдены микроорганизмы рода *Bacillus*, что говорит о небольшом загрязнении почвы тяжелыми металлами. Достаточный рост анаэробных азотфиксирующих бактерий говорит о хорошем состоянии минеральных удобрений в почве, о их высоком содержании в ней. В тоже время почва обеднена подвижным азотом поэтому на МПА развилось большое количество *Bacillus sp.*, использующих в качестве источника азота его органические соединения.

Наличие в почве различных форм грибов (*Mucor* и *Penicillium rubrum*) в больших количествах может трактоваться двояко: с одной стороны они сильно подкисляют почву, с другой с их помощью в почве разлагается мочевины, белки, мочевая кислота и др. Большая их часть способна усваивать аммонийный азот. Муконовые грибы могут образовывать микоризу. С их помощью уменьшается вымывание азотистых веществ, так как они могут закреплять их в мицелии. Из этого можно сделать вывод, что

почва не достаточно обогащена гумусом, который является показателем плодородия почв. Но все же почва, в некоторой степени богата минеральными формами азота, о чём говорит большое содержание *Actinomyces sp.* на всех почвенных горизонтах, в опаде. В почве данного типа было обнаружено предположительно 4 вида актиномицет: *Streptomyces sp.*, *Micromonospora sp.*, *Actinomadura sp.* и *Streptosporangium sp.* Также в большом количестве были обнаружены Олигоспоровые актиномицеты. Содержание актиномицет в подзолистых почвах и черноземах примерно одинаковое, может варьироваться от характера почвы.

По данным обсуждения результатов курсовой работы было выяснено, что актиномицеты были обнаружены во всех видах почв примерно в одинаковых количествах. Предположительно численность актиномицет в дерново-подзолистой почве не сильно отличается от численности оных в черноземе. По данным исследования, проведенного Захаровой О. С. (Автореферат «Актиномицеты рода *Actinomadura* в почвах разных типов) Разные виды

актиномицет имеют различное распространение в различных горизонтах почвы. К примеру актиномицеты рода *Streptomyces* наиболее распространены в моховой подстилке, в зоне корней, но слабее распространены в минеральной зоне, чем актиномицеты рода *Micromonospora*.

## **Библиографический список**

1. Ананьева Н.Д. Микробиологические аспекты самоочищения и устойчивости почв /отв. ред. Д.Г.Звягинцев. Наука .2003.
2. Бабьева И.П. Зенова Г.М. Биология почв. Учебник – М. Изд-во МГУ 1989.
3. Методы почвенной микробиологии и биохимии. МГУ.
4. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов и др.; под редакцией А.И. Нетрусова- М Изд-во « Академия».2005.
5. Теппер Е.З. Шильникова В.К. Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии – М : Агропромиздат.,1987
6. Умаров М.М. Ассоциативная азотофиксация – М .Изд-во МГУ 1986.
7. Экология микроорганизмов / А.И. Нетрусов и др.; под редакцией А.И. Нетрусова- М Изд-во « Академия».2004.
8. Актиномицеты рода *Actinomadura* в почвах разных типов / О. С. Захарова, Автореферат.