

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД

В. И. РОМАНЕНКО
С. И. КУЗНЕЦОВ

ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРЕСНЫХ ВОДОЕМОВ

ЛАБОРАТОРНОЕ
РУКОВОДСТВО



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
ЛЕНИНГРАДСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
Ленинград • 1974

УДК 576.8 (28) : 577.4 (022)

Экология микроорганизмов пресных водоемов. В. И. Романенко, Кузнецов С. И. Лабораторное руководство. 1974. Изд-во «Наука», Ленингр. отд., Л. 1—194.

Книга посвящена изучению водных микроорганизмов — одному из важнейших звеньев в цепи экологических взаимоотношений в водоемах. Приводится рецептура питательных сред, описание методов культивирования, выделения в чистую культуру и количественного учета водных бактерий. Приводятся также способы применения радиоактивных изотопов для определения интенсивности процессов, связанных с круговоротом углерода и серы в водоемах. Илл. — 42, табл. — 13, библи. — 163 назв.

ОТВЕТСТВЕННЫЙ РЕДАКТОР

доктор биол. наук А. А. Стрелков

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Н. В. Буторин (*главный редактор*), Б. А. Вайнштейн,
М. М. Камшилов, Ф. Д. Мордухай-Болтовской,
А. Г. Поддубный, В. И. Романенко,
Б. К. Штегман, В. А. Экзерцев

.

Р $\frac{21008-1085}{042(01)-74}$ 952-74

© Издательство «Наука», 1974

ПРЕДИСЛОВИЕ

В экологии водных микроорганизмов назрели две ключевые проблемы: более глубокое исследование самой водной микрофлоры (выяснение ее видового состава, распределения в зависимости от физико-химических условий окружающей среды) и изучение интенсивности отдельных процессов круговорота вещества в водоеме.

В настоящее время описано много новых семейств, родов и видов отдельных водных микроорганизмов, которые ранее оставались не только не исследованными, но даже и не замеченными. Их изучению способствовало применение электронной микроскопии, фазово-контрастного устройства и других новых оптических методов и приемов. Большую роль для выяснения особенностей экологии отдельных форм сыграло глубокое изучение их физиологии, конструктивного и энергетического обмена.

За последние годы уточнены старые и введены новые методы изотопного анализа, позволяющие определять быстроту отдельных процессов круговорота вещества. Методы эти дали возможность вскрыть и характер отдельных взаимоотношений между разными группами микроорганизмов, определить их экологическую нишу в водоеме.

В основу настоящего руководства положена изданная нами в 1963 г. книга «Микробиологическое изучение внутренних водоемов». За 10 лет в области водной микробиологии проведен ряд принципиально важных исследований, разработано много новых методов. Все это учтено в настоящем издании. Некоторые рецепты устаревших или мало используемых питательных сред исключены, заменены новыми или дополнены лучшими. Введены методы определения гетеротрофной ассимиляции углекислоты,

которые дали возможность разобраться в интенсивности процессов продукции биомассы бактерий и в скорости их размножения, а также методы изготовления препаратов для электронной микроскопии и др.

Настоящее руководство отличается от широко распространенных практических руководств по микробиологии тем, что здесь основное внимание уделено водной микрофлоре. Общие разделы микробиологической техники, встречающиеся во всех руководствах, исключены или даются в виде прописей в сокращенном виде. Главное внимание уделено новейшим методам исследований, взятым из оригинальных работ, которые в той или иной мере нами опробованы.

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

1. ТИПЫ ОБМЕНА МИКРООРГАНИЗМОВ

В настоящее время уделяется большое внимание изучению механизмов обмена различных микроорганизмов. Разработаны схемы, из которых видно, что энергетический и конструктивный обмены не связаны одним механизмом, а в какой-то мере происходят независимо один от другого (Кузнецов, 1970). Некоторые организмы (например, бактерии, окисляющие водород) способны переходить от автотрофного способа питания к гетеротрофному. Все это говорит о том, что термины, используемые для характеристики обмена, не следует переносить на микроорганизмы. На микробиологическом симпозиуме общества общих микробиологов в Лондоне в 1954 г. принята номенклатура (табл. 1) отдельных типов обмена микроорганизмов в зависимости от использования источников энергии, восстановителей и способности употребления органических веществ в конструктивном и энергетическом обмене (Fry, Peel, 1954; Заварзин, 1964, 1972).

Начиная с работ Пастера и Коха, предлагалось много твердых, жидких и полужидких питательных сред для выделения и культивирования различных микроорганизмов. Само собой разумеется, что состав этих сред зависит от тех питательных веществ, в которых нуждается изучаемая группа микроорганизмов. Поскольку группы микроорганизмов отличаются друг от друга в потребности питательных веществ для своего развития, то и состав питательных сред может резко различаться. Некоторые питательные среды пригодны для развития большого количества разнообразных микроорганизмов и употребляются для учета сапрофитных видов в воде и почве, другие предназначены для развития какой-нибудь одной специфической группы организмов. Такие среды называются селективными, или избирательными, и состав их согласуется со специфическими физиологическими особенностями и типом обмена данной группы организмов.

Каждая питательная среда должна содержать источник энергии и углерода, связанный азот и различные минеральные эле-

Классификация типов обмена микроорганизмов

Тип обмена	Тип организмов	Донатор водорода	Источник энергии	Источник углерода	Организмы
Хемолитоавтотрофия	Автотрофы	Минеральные вещества	Реакция окисления неорганических веществ	CO ₂	<i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrosomonas</i> , <i>Thiobacillus</i> (<i>Hydrogenomonas</i>) *
Фотолитоавтотрофия	Фотоавтотрофы	То же	Свет	CO ₂	Зеленые растения, фотосинтезирующие серобактерии
Хемолитогетеротрофия	Гетеротрофы	Органические вещества или водород	Окисление органических веществ или водород	Органические вещества и CO ₂	<i>Desulfotribrio</i> , <i>Hydrogenomonas</i>
Хемоорганолитотрофия	Автотрофы	Органические вещества	Окисление органических веществ	CO ₂	<i>Pseudomonas azotatilis</i>
Фотоорганолитотрофия	Фотогетеротрофы	То же	Свет	Органические вещества	<i>Athiorhodaceae</i>
Хемоорганолитогетеротрофия	Гетеротрофы	*	Реакция окисления органических веществ	То же	Большинство бактерий

* В зависимости от среды данные бактерии могут развиваться то как хемолитоавтотрофы, то как хемоорганолитогетеротрофы.

менты (P, K, S, Ca, Mg, Fe и др.), необходимые организму для синтеза его биомассы. По своей потребности в питательных веществах микроорганизмы резко отличаются друг от друга. Некоторые для своего развития используют только весьма специфические питательные вещества, в то время как другие — весьма различные источники энергии углерода, азота и минеральных веществ.

Необходимо также помнить, что весовое количество основных питательных солей в средах во многих случаях произвольно. В этом отношении фон солей при необходимости может быть изменен, неизменными должны оставаться лишь те основные вещества и методы выращивания, которые исходят из физиологических потребностей данного организма, — источники углерода, энергии и условия культивирования. Некоторые организмы используют в качестве источника азота только органические соединения, другие — нитраты и аммиачные соли. Ряд организмов усваивает и газообразный азот атмосферы. Различаются и пределы активной реакции питательной среды, в которой могут развиваться отдельные микроорганизмы. Сильное влияние на их развитие оказывает осмотическое давление, обусловливаемое концентрацией солей в питательной среде, на которую нужно обращать большое внимание. Часто для культивирования микроорганизмов необходимо иметь твердые питательные среды. С этой целью используются как неорганические, так и органические гели. Наиболее распространены из них агар-агар, желатина, яичный альбумин, кремневый гель и т. п. Основываясь на вышеизложенном, следует правильно подбирать питательные среды, рецептура которых в смысле концентрации питательных солей, буферности, исключения и замены одних питательных веществ другими может быть изменена в зависимости от цели исследования.

2. УКАЗАНИЯ ПО ПРИГОТОВЛЕНИЮ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Из большого количества составов питательных сред, предложенных для различных микроорганизмов, в настоящем руководстве приводятся только основные, многократно проверенные различными исследователями и нами.

pH питательных сред. В большинстве случаев реакция питательной среды для бактерий должна быть нейтральной, т. е. $pH=7.0$. Хотя некоторые из микроорганизмов растут в сильно кислой среде, большинство развивается при нейтральной и слабощелочной реакции. В ряде случаев одни виды бактерий можно отделить от других, изменяя реакцию питательной среды до такой величины, когда некоторые виды уже не могут развиваться. Грибы, как правило, развиваются в более кислой среде, чем бактерии. Это свойство часто используется для того, чтобы раз-

делить эти две группы организмов. При подкислении питательной среды до $\text{pH}=4$ развитие бактерий практически прекращается, в то время как большинство грибов развивается нормально.

Чтобы установить реакцию питательной среды, поступают следующим образом. В пробирку вносят 2 мл питательной среды, 8 мл дистиллированной воды и 4—5 капель бромтимолблау или другого индикатора. Далее из бюретки по каплям вносят 0.1 н. или 0.05 н. раствор едкого натрия или соляной кислоты до тех пор, пока окраска раствора будет совпадать с окраской нужного стандартного раствора. Затем делают пересчет на весь объем питательной среды и добавляют необходимое количество нормального раствора едкого натра, так чтобы реакция соответствовала требуемой величине pH . После стерилизации pH сред, как правило, изменяется и доведение его до требуемой величины необходимо производить стерильными 0.1 н. растворами соляной кислоты или едкого натрия, или концентрированными растворами этих же веществ, внося их маленькими каплями и определяя реакцию на pH -метре, либо с помощью индикаторов на матовом стекле. Концентрированные растворы удобно использовать при доведении pH в средах большого объема.

Некоторые среды содержат фосфатный буфер и pH их после стерилизации не изменяется. Так как при стерилизации среды чаще всего подщелачиваются в результате разрушения карбонатов, то pH жидких сред с небольшим содержанием карбонатов и буферных солей можно подвести до нейтральной величины, поместив их на несколько часов или на сутки в герметический шкаф в атмосферу углекислоты. Для этого в менаурку насыпают несколько граммов двууглекислой соды, приливают несколько миллилитров разведенной серной кислоты и ставят в шкаф со средами. При этом углекислота проникает через ватные пробки и нейтрализует катионы. Этим способом удобно пользоваться при нейтрализации среды в пробирках.

Фильтрование. При фильтровании питательных сред обычно употребляется ватный фильтр. В горлышко стеклянной воронки вставляют спиральку из железной проволоки или сложенную в несколько слоев марлю. Поверх кладут 2—3 слоя гигроскопической ваты. Далее берут тонкий слой ваты несколько большего диаметра, чем воронка, и помещают его сверху. Промывают вату на воронке кипящей водой. Питательную среду по стеклянной палочке осторожно наливают на середину фильтра. Если фильтрат остается мутным, то его фильтруют через тот же фильтр повторно.

Твердые питательные среды. Для приготовления твердых питательных сред употребляют агар-агар, желатину или кремневый гель. Специфические особенности этих веществ представлены ниже.

	Агар-агар	Желатина	Кремневый гель
Происхождение . .	Растительное	Животное	Минеральное
Химическая природа	Углеводы	Протеины	Кремневая кислота
Реакция	Слабокислая	Кислая	Кислая
Температура плавления, °С . .	96	25	—
Температура застывания в той же концентрации, °С	40	25	—
Действие трипсина	Не действует	Разжижает	Не действует
Конденсационная вода	Образуется	Нет	Нет
Употребляемая концентрация, %	1.5—2.5	10—20	5—6

Агар-агар готовится путем выщелачивания горячей водой некоторых морских водорослей. Он представляет собой полисахарид, в основном состоящий из галактанов и пентозанов и небольшого количества протеинов и минеральных веществ.

Приготовление выщелоченного агара. 1 кг агара помещают в эмалированную или стеклянную посуду, заливают дистиллированной водой и оставляют на трое суток в термостате при 30°. Затем сосуд покрывают марлей, сливают воду и еще несколько раз промывают дистиллированной водой или двое суток проточной водопроводной водой, после чего воду сливают и агар тонким слоем просушивают на воздухе. Обработанный таким образом агар-агар становится беднее как солями кальция и магния, так и растворимыми органическими веществами. Установлено, что в процессе приготовления некоторых питательных сред на таком агаре при стерилизации осадок не выпадает и среда остается прозрачной.

Приготовление кремневого геля. Наиболее быстрое застывание кремневого геля происходит, если после смешивания растворов силиката и соляной кислоты реакция смеси получается близкой к нейтральной. В связи с этим кремневый гель готовят следующим образом. Берут 25%-й раствор кремнекислого калия, натрия или растворимого стекла и доводят удельный вес раствора до 1.06 или лучше до 1;15 мл этого раствора помещают в чашку Петри, добавляют каплю фенолфталеина и из градуированной пипетки вносят 5%-й раствор соляной кислоты до исчезновения окраски. Затем кислоту разводят дистиллированной водой так, чтобы точно 5 мл раствора силиката (или растворимого стекла) нейтрализовалось 5 мл кислоты. Далее в большую колбу вносят определенный объем кислоты и добавляют туда эквивалентный объем силиката. Раствор тщательно перемешивают и тотчас же разливают по 20—50 мл в чашки Петри, которые оставляют застыть на горизонтальной поверхности.

Гель застывает в несколько минут. После этого чашки помещают в большой сосуд с проточной водой и промывают до исчезновения хлоридов или до тех пор, пока гель в чашках будет иметь $pH=7$ — на это необходимо около суток. Затем чашки вынимают и помещают в сосуд с кипящей дистиллированной водой. Там они остаются некоторое время. После того как они хорошо промылись, гель в чашках слегка подсушивают и пропитывают питательной средой. Чашки с гелем необходимо завернуть в бумагу и стерилизовать в Коховском стерилизаторе текучим паром или в автоклаве при 110° .

3. СТЕРИЛИЗАЦИЯ

Стерилизация паром. Как общее правило рекомендуется питательные среды стерилизовать в автоклаве. Необходимо помнить, что продолжительность стерилизации зависит от того, насколько хорошо и быстро прогревается среда в сосудах.

Таблица 2

Зависимость температуры от давления при отсчете по манометру

Температура, °C	Давление по манометру	
	фунты на 1 кв. дюйм	атм. или кг/см ²
100	0	0
105	—	0.2
112	7.5	0.5
121	15.0	1.0
128	22.5	1.5
135	30.0	2.0

Примечание. Атмосферное давление принято за ноль.

Быстрота нагревания зависит от величины сосуда, исходной температуры, вязкости среды и от того, свободно ли проходит пар к стенкам сосудов и полностью ли удален воздух из автоклава.

Для того чтобы достигнуть наилучших результатов, следует помещать питательную среду в небольшие сосуды и располагать их так, чтобы пар свободно проходил между ними. Как видно из табл. 2, температура зависит от величины давления пара, время стерилизации — от характера питательной среды.

Агаровые среды лучше стерилизовать при давлении по манометру в 0.75 атм. 30 мин. или при давлении 1 атм. — 20 мин. Желатиновые среды стерилизуют текучим паром три дня подряд, каждый день по 30 мин., или в автоклаве при 0.5 атм. — 30 мин. Особенно трудно простерилизовать почву. Ее стерилизуют в пробирках по 5—10 г один раз при 1 атм. 2 часа или два дня подряд по часу при той же температуре. Текучим паром те же порции почвы нужно стерилизовать 7 дней подряд по 1 часу.

При кислой реакции многие вещества, входящие в состав питательной среды, могут подвергнуться гидролизу. Чем ниже pH питательной среды, тем сильнее происходит гидролиз.

При этом после стерилизации перестают застывать не только среды с желатиной, но и с агар-агаром. Так, для получения твердой питательной среды при $pH=4.0$ в нее следует добавлять более 3% агар-агара или подкислять после стерилизации. Если среда щелочная, то при стерилизации из раствора выпадают соли железа. Чтобы этого избежать, необходимо соли железа добавлять в очень небольшом количестве или стерилизовать отдельно и добавлять в питательную среду после стерилизации.

Рекомендуется питательные среды заражать по возможности вскоре после стерилизации. Особенно это относится к анаэробным культурам, так как старые среды насыщаются воздухом и становятся неблагоприятными для развития этих организмов.

Стерилизация в автоклаве производится обычно в течение 20 мин. при 120° . Все материалы и предметы, которые при такой температуре не портятся, стерилизуются в автоклаве. Сюда относятся такие питательные среды, как бульон, агаризированные среды, картофель, молоко, различные жидкости (вода, физиологический раствор), посуда, резиновые предметы (пробки, трубки), металлические инструменты, асбестовые фильтры и т. п.

Поставив предметы в котел и закрыв герметически крышку, оставляем открытой в ней трубку, выводящую пар, и начинаем нагревать котел. Вода через некоторое время начинает кипеть, пар вытесняет воздух из котла через свободное отверстие. Когда весь воздух вытеснен паром, закрываем выходное отверстие. Чтобы узнать, весь ли воздух вытеснен (так как стерилизующая способность одного пара выше, чем смеси пара с воздухом), следует пропускать выходящую струю пара и воздуха через холодную воду. Пока в котле есть воздух, струя с сильным треском проходит через воду, один пар не дает такого звука.

Как только выход пара прекращен, манометр начинает показывать увеличение давления, которое доводят до определенной величины (например, до 1 атм.). Затем уменьшают нагревание прибора настолько, чтобы давление оставалось на одном уровне, и сохраняют его в течение определенного времени (20 мин. при 120°). После этого прекращают нагревание, давление постепенно падает и, когда оно дойдет по манометру до 0, открывают кран, выводящий пар. Как только пар выпущен, отвинчивают крышку и вынимают предметы. Если не дожидаться падения давления, а раньше этого открыть крышку, то пробки в сосудах с жидкими средами смачиваются и даже могут быть выброшены. Все предметы в автоклавах помещают в особое ведро или на подставки во внутреннем котле.

С т е р и л и з а ц и я с у х и м ж а р о м. Если нагреть воздух до 150° , то при такой температуре за 2 часа убиваются все микроорганизмы. При повышении температуры для стерилизации требуется меньше времени: например, при 170° достаточно 20 мин., при 200° — 5 мин. Такой способ стерилизации применяется для

сухой посуды, ваты, бумаги, а также для металлических предметов, боящихся ржавчины, например стальных игл. Хотя температура выше 170° быстро убивает микробы, но при этом вата и бумага сгорают и продукты их сухой перегонки портят стеклянную посуду. В связи с этим наиболее употребительной температурой при стерилизации сухим жаром служит 150° в течение 2 час., 160° — 1 часа, 170° в течение 20 мин. Для такой стерилизации употребляется сушильный шкаф, или печь Пастера — металлический шкаф, имеющий двойные стенки, обшитые асбестом. Необходимая температура измеряется термометром, вставленным в отверстие в стенке прибора.

Холодная стерилизация. Жидкие питательные среды можно стерилизовать фильтрованием через свечи Шамберлена, асбестовые или стеклянные фильтры марки Schott G=5. Наиболее распространено фильтрование через специальные диски из смеси асбеста и клетчатки.

Асбестовый фильтр помещают в воронку Зейтца, которая на резиновой пробке вставляется в колбу Бунаэна для отсасывания. В собранном виде аппарат для фильтрования проверяется на герметичность, заворачивается в бумагу и стерилизуется 20 мин. в автоклаве при 120° .

Перед холодной стерилизацией жидкость освобождается от осадка фильтрованием через бумажный фильтр или иным способом. Фильтрование жидкости через асбестовый фильтр должно происходить достаточно быстро, однако разрежение воздуха в колбе Бунаэна не должно превышать 35—45 см рт. ст.

4. МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОБОВ

Культивирование аэробных микроорганизмов позволительно проводить обычным способом в жидких средах, помещая их в термостат, и на твердых средах. При этом, чтобы избежать подсыхания агара, чашки Петри обычно на подставке помещают в эксикатор, на дно которого налит 3—5%-й раствор сернокислой меди, что предохраняет от заражения плесневыми грибами.

Культивирование анаэробных микроорганизмов основано на следующих приемах: 1) посев производится обычным способом в жидкие или твердые питательные среды, и культуры ставятся в эксикатор, из которого удаляется кислород, входящий в состав воздуха, или воздух выкачивается и атмосфера заменяется инертным газом; 2) культивирование производится в пробирках, стеклянных трубочках или чашках Петри на агаризированной питательной среде. При этом питательная среда, зараженная глубинным посевом, вносится в эти сосуды так, чтобы внутри агара не оставалось пузырьков воздуха. Ниже мы приводим описание методов создания анаэробноза.

1. В обычный эксикатор с хорошо притертой крышкой вносят размельченные на терке картофель или морковь, или другие овощи. В случае с картофелем для поглощения кислорода достаточно 50 г на расчет на 1 л воздуха. После этого в эксикатор помещают пробирки или чашки Петри и тщательно закрывают крышкой. Растительная ткань быстро поглощает кислород и выделяет углекислый газ, создавая таким образом благоприятные условия для развития анаэробных бактерий. В качестве индикатора анаэробности можно употреблять стерильное молоко с небольшой добавкой метиленовой синей. При отсутствии кислорода воздуха метиленовая синяя обесцвечивается.

2. На каждые 100 мл воздуха берут 1 г пирогаллола и 10 мл 10%-го раствора едкого натра или едкого калия. Чтобы создать анаэробные условия в эксикаторе, нужно на дно положить пирогаллол, откачать воздух и после этого опрокинуть стаканчик с едкой щелочью.



Рис. 1. Культивирование анаэробных бактерий в перевернутых чашках Петри.

1 — промежуток между крышкой и дном чашки, залитый стерильным парафином; 2 — питательный агар.

3. Культивирование и количественный учет факультативных анаэробов можно проводить непосредственно в чашках Петри, не пользуясь эксикатором. С этой целью стерилизуют чашки Петри, вкладывая доньшко в перевернутую крышку. После стерилизации твердую питательную среду заражают бактериями, выливают в перевернутую крышку чашки Петри и покрывают доньшком, так чтобы под ним не осталось пузырьков воздуха (рис. 1). Просвет между стенками крышки и доньшка заливают стерильным расплавленным парафином. Культивирование микроорганизмов происходит в обычных условиях в термостате или при комнатной температуре.

4. Культивирование анаэробов в стеклянных трубочках описано на стр. 81.

5. Изучение развития анаэробных бактерий и продуктов их метаболизма на жидких средах удобно производить в склянках объемом 150—200 мл. Среда стерилизуется в колбах, после подведения pH заражают исследуемой культурой и разливают в склянки, которые закрывают стерильными резиновыми пробками с двумя отверстиями, в которые вставлены стеклянные трубки: одна доходит до дна склянки, другая — до края пробки. Выходящие наружу концы трубок сгибают горизонтально под углом, на них надевают отрезки вакуумных трубок, которые сжимают зажимами, а отверстия затыкают стерильными стеклянными палочками. Анаэробизм создается в результате биохимических процессов потребления кислорода после заражения. Отбор проб для анализа производится путем вытеснения среды азотом, при этом концы трубок обтирают спиртом, а стеклянную палочку заменяют стерильной стеклянной трубкой с ватным тампоном. Азот берут из газометра, в растроб которого в вытесняющую газ воду добавляют порошок гидросульфита и раствор крепкой щелочи. Сюда же в качестве индикатора анаэробности добавляют индигокармин, синий цвет которого в отсутствие кислорода изменяется на желтый.

РЕЦЕПТУРА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ¹

1. СРЕДЫ ДЛЯ САПРОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ

Среда № 1. Мясо-пептонный бульон (МПБ).

Мясной экстракт	3.0 г
Пептон	5.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Кипятят до тех пор, пока мясной экстракт и пептон растворятся. Доводят реакцию до $pH=6.6-7.0$, используя в качестве индикатора бромтимоловый синий.

Среда № 2. Мясо-пептонный агар (МПА).

Состав питательной среды тот же, что № 1, но добавляют на 1 л среды 20 г агар-агара. Равноценен ему выпускаемый промышленностью сухой питательный агар (СПА).

Среда № 3. Мясо-пептонная желатина (МПЖ).

Желатина	100.0—150.0 г
Мясной экстракт	3.0 г
Пептон	5.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

В соответствующий сосуд отмеряют 1000 мл МПБ (среда № 1), добавляют 10—15% желатины и оставляют ее набухать 5—10 мин. Нагревают в водяной бане, пока все не растворится. Доводят реакцию питательной среды до $pH=6.6-7.0$, как это указано при приготовлении питательных сред. Желатина имеет кислую реакцию и обладает большой буферностью, поэтому на ее нейтрализацию идет больше едкого натра, чем для нейтрализации бульона или агара. Желатину можно фильтровать через бумажный или через ватный фильтр.

¹ Рецептура большинства питательных сред приводится по прописям, взятым из лабораторного руководства по общей микробиологии Фреда и Ваксмана (Fred, Waksman, 1928). В том случае, когда прописи питательной среды взяты из других источников, даются ссылки на оригинальные работы.

Среда № 4. Среда Горбенко (1961) для учета гетеротрофных бактерий.

Сухой питательный агар (СПА)	5 г
Агар-агар	13.5 г
Озерная вода	1000 мл

СПА состоит из триптического гидролизата рыбной муки. Разбавление СПА в 10 раз при учете гетеротрофных бактерий на чашках Петри способствует росту более олигокарбофильных бактерий, число колоний при этом увеличивается примерно от 2 до 10 раз по сравнению с обычно применяемым СПА. При этом выявляется большее разнообразие видового состава микроорганизмов.

Среда № 5. Почвенный агар.

Глюкоза	1.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.5 г
Почвенный экстракт	100.0 мл
Водопроводная вода	900.0 мл
Агар-агар	15 г

Почвенный экстракт готовят, нагревая в автоклаве 30 мин. 1 кг садовой почвы в 1000 мл водопроводной воды. Добавляют небольшое количество карбоната кальция и все вместе фильтруют через двойной фильтр из фильтровальной бумаги. Если фильтрат будет мутный, то его повторно фильтруют через тот же фильтр (не заменяя фильтр новым).

Растворяют агар в 900 мл воды и нагревают текучим паром в аппарате Коха не меньше 1 часа. Добавляют 100 мл почвенного экстракта. Глюкозу добавляют перед тем, как разливать агар по пробиркам. Реакцию доводят до $pH=6.8$.

Среда № 6. Среда для дифференцировки видов спорообразующих бактерий (по: Мишустин, Перцовская, 1954).

МПА (см. среду № 2)	500 мл
Сусловый агар (см. среду № 18)	500 мл

Сусловый агар готовят на неохмеленном сусле 7° Баллинга и смешивают в горячем состоянии с равным объемом растопленного МПА. Реакцию среды доводят до $pH=7.1-7.2$. Среду разливают небольшими порциями и стерилизуют. На этой среде колонии отдельных видов спорообразующих бактерий имеют характерный вид.

Среда № 7. Среда Стровинского (по: Beltra, 1956) для *Pseudomonas*.

Сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5 г
Фосфорнокислый натрий однозамещенный ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)	1.0 г

Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.5 г
Азотнокислый аммоний (NH_4NO_3)	2.5 г
Хлористый кальций ($CaCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.05 г
Сернокислое железо ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.05 г
Лактоза	20.0 г
Тимоловый синий или о-крезол фталены	0.05 г
Микроэлементы	Следы
Агар-агар	20.0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Реакцию питательной среды устанавливают до $pH=7.2$.

Многие виды *Pseudomonas* способны усваивать лактозу и растут алективно на этой среде. Вокруг колоний этих организмов образуются синие зоны вследствие перехода индикатора в щелочную форму.

2. СРЕДЫ ДЛЯ СТЕБЕЛЬКОВЫХ, ПОЧКУЮЩИХСЯ И ПОЛЗАЮЩИХ БАКТЕРИЙ

С р е д а № 8. Среда для *Caulobacter* (по: Poindexter, 1964).

Сернокислый аммоний $[(NH_4)_2SO_4]$	1.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	1.0 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	1.0 г
Сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.4 г
Хлористый натрий ($NaCl$)	0.02 г
Сернокислое железо ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.02 г
Сернокислый марганец ($MnSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.02 г
Глюкоза	5.0 г
Дистиллированная вода	1000 мл
Дрожжевой автолизат (см. среду № 15)	2 мл на 100 мл среды

Н. Б. Заварзина (1961) с успехом культивировала *Caulobacter vibrioides* на среде Пратта для водорослей (среда № 26) с добавкой 0.5% глюкозы и 2 мл дрожжевого автолизата на 100 мл среды.

С р е д а № 9. Среда Беляева (по: Красильников, Беляев, 1967) для *Caulobacter*.

Пептон	1 г
Дрожжевой автолизат (см. среду № 15)	1 мл
Сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2 мл
Агар-агар	15 г
Водопроводная вода	1000 мл

С р е д а № 10. Среда Мевнуса (по: Заварзин, 1960) для культивирования *Hyphomicrobium vulgare*.

Азотнокислый натрий ($NaNO_3$)	1.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	1.0 г

Хлористый натрий (NaCl)	0.5 г
Сервокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5 г
Водопроводная вода	1000 мл

В колбу Эрленмайера на 100 мл наливают 20 мл среды и после стерилизации добавляют несколько капель метанола или после заражения колбы помещают в эксикатор, куда ставят открытую пробирку с метанолом. Через 3—5 дней инкубации при 28° на поверхности жидкости появляется пленочка *Huphomicrobium*.

Среда № 11. Среда Хирша (Hirsch, Conti, 1964) для почкующих бактерий *Huphomicrobium* (№ 337).

Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	1.36 г
Фосфорнокислый натрий двухзамещенный ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)	2.13 г
Серпокислый аммоний ($(NH_4)_2SO_4$)	0.50 г
Сервокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.20 г
Хлористый кальций ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	10.0 мг
Сервокислое железо ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	5.0 мг
Сервокислый марганец ($MnSO_4 \cdot 5H_2O$)	2.50 мг
Молибденовокислый натрий ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	2.50 мг
Дистиллированная вода	1000 мл

Культуру помещают в сосуд, где создается атмосфера паров метанола, для чего в эксикатор ставят открытый стаканчик с метанолом или непосредственно в питательную среду добавляют 4 г/л метанола. Реакцию среды доводят до pH=7.

В качестве источника азота вместо сервокислого аммония можно использовать азотнокислый натрий, солянокислый метиламин или мочевины в концентрации 100 мМ, или 10 мл человеческой мочи на 1 л среды.

Среда № 12. Среда Сталей (Staley, 1968) для культивирования *Ancalomicrobium* и *Prosthecomicrobium*.

Сервокислый аммоний $[(NH_4)_2SO_4]$	0.25 г
Глюкоза	0.25 г
Дрожжевой экстракт (готовый препарат)	0.1—0.25 мл
Раствор витаминов	10 мл
Дистиллированная вода	1000 мл

Раствор витаминов по Сталю.

Биотин	2 мг
Фолиевая кислота	2 мг
Пиродоксин—HCl	10 мг
Рибофлавин	5 мг
Тиамин—HCl	5 мг
Никотинамид	5 мг
Пантотеновокислый кальций	5 мг
Кобаламин (B_{12})	0.1 мг
л-аминобензойная кислота	5 мг
Дистиллированная вода	1000 мл

Среда № 13. Питательная среда Левина (Lewin, Lounsbury, 1969) для пресноводных культур ползающих бактерий.

Сервокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.1 г
Азотнокислый калий (KNO_3)	0.1 г
Хлористый кальций ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.1 г
Na-глицерофосфат	0.1 г
Раствор микроэлементов	1 мл
Трис-буфер	1.0 г
Тиамина	1.0 мг
Кобаламин (B_{12})	1.0 мкг
Козаминовая кислота (Дифко)	1.0 г
Глюкозу добавляют асептически в виде стерильного раствора	1.0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Раствор доводят до pH=7.5. По необходимости добавляют 10 г агар-агара.

Раствор микроэлементов по Левину. Растворимые соли В, Fe и Mn берут по 5 мг, растворимые соли Co, Cu, Mo и Zn — по 0.1 мг из расчета на элемент растворяют в 10 мл воды. Таким образом, конечная концентрация первых трех элементов в среде будет по 0.5 мг/л, вторых — по 0.01 мг/л.

На указанной среде культуры остаются жизнедеятельными по крайней мере 2—3 недели. Для поддержания культур необходимо делать пересевы на свежую среду каждые 2 недели.

Среда № 14. Среда Норена (Noren, 1955) для миксобактерий.

Гидролизат казеина	2.5 г
Аспарагин	2.5 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	2.0 г
Хлористый натрий ($NaCl$)	1.0 г
Сервокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.1 г
Хлористый кальций ($CaCl_2$)	0.01 г
Сервокислое железо ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.003 г

Среда № 15. Дрожжевой автолизат (по: Омелянский, 1923б).

Для приготовления дрожжевого автолизата к 2 кг прессованных дрожжей добавляют 2 л водопроводной воды, прокипяченной и остуженной до 60°, смешивают в гомогенную массу и нагревают на водяной бане до 49—50°. Далее среду ставят в термостат при 50° на 72 часа, после чего нагревают 30 мин. в автоклаве при 105° и фильтруют. Прозрачный фильтрат содержит 0.9% азота. Затем осадок разводят в 1200 мл воды и снова фильтруют. Обе жидкости сливают вместе. При этом содержание общего азота равняется 0.6—0.8%. Жидкость нейтрализуют до pH=6.8, разливают по небольшим колбочкам и стерилизуют 15 мин. при 115°.

Приготовление дрожжевой воды см. среду № 45.

3. СРЕДЫ ДЛЯ *BACTERIUM COLI*

Среда № 16. Фуксин-сульфитный агар Эндо.

Мясной экстракт	5.0 г
Пептон	10.0 г
Хлористый натрий (NaCl)	5.0 г
Лактоза	5.0 г
Сернистокислый натрий безводный (Na_2SO_3)	5.0 г
Основной фуксин	0.4 г
Агар-агар	20.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Реакцию агара перед добавлением сульфита доводят до $\text{pH}=7.5$. Среду готовят следующим образом. МПА разливают перед стерилизацией в колбы по 100 мл. Накануне анализа готовят 10%-й раствор основного фуксина в 90%-м этиловом спирте (например, 1 г краски и 10 мл спирта). Раствор перед употреблением отфильтровывают. Непосредственно перед приготовлением среды в стерильную пробирку вносят 0.5 мл фильтрованного 10%-го раствора фуксина, к которому прибавляют из пипетки 10%-й водный раствор сернистокислого натрия (сульфит натрия) или 20%-й раствор той же семиводной кристаллической соли до получения ярко-зеленого окрашивания. Затем 0.5 г лактозы растворяют в 2—3 мл стерильной воды и прогревают в кипящей водяной бане примерно 5 мин. На 100 мл предварительно расплавленного МПА ($\text{pH}=7.4\text{--}7.6$) добавляют сначала раствор лактозы и все количество фуксина с сульфитом натрия, тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри. Готовый фуксин-сульфитный агар по застыванию в чашке должен иметь кремовую окраску. Сульфитную среду следует готовить по мере надобности (на текущий день или на 1—2 дня вперед), так как она не выдерживает длительного хранения. Остаток неиспользованной готовой среды можно сохранить в течение 2 дней в прохладном темном помещении. Следует иметь в виду, что при учете кишечной палочки на мембранных фильтрах эта среда дает лучшие результаты при уменьшении содержания агара до 1—1.5% (Разумов, 1947).

Среда № 17. Среда Эйсмана (по: Разумов, 1947).

Глюкоза	10 г
Пептон	10 г
Хлористый натрий (NaCl)	5 г
Водопроводная вода	1000 мл

При нагревании растворяют в воде соль и пептон, доводят до кипения, отфильтровывают, добавляют глюкозу, устанавливают pH в пределах 7.3—7.6, разливают в пробирки с поплавками (рис. 18, Б) и стерилизуют дробно текучим паром.

4. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ДРОЖЖЕЙ, ГРИБОВ И АКТИНОМИЦЕТОВ

Среда № 18. Сусло (по: Омелянский, 1923а).

Солод (только размолотый)	250.0 г
или солодовый экстракт	15.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Солод нагревают при 55° 1 час или более и проверяют полноту осахаривания крахмала. Отжимают раствор солода ручным прессом и через 2—3 часа фильтруют и доводят объем до 1 л. Для получения солодового агара добавляют 1.5% агар-агара.

Способ приготовления суслы заключается в следующем. 1 л водопроводной воды нагревают до 48—50° и понемногу всыпают в нее 100—250 г солодовой ячменной муки при непрерывном помешивании, чтобы избежать образования комков. Температура жидкости поддерживается в пределах 45° в течение получаса для образования возможно большего количества диастазы (амилазы). В следующие полчаса температуру поднимают до 55—58° и поддерживают на этом уровне, не превышая, в течение часа и более (чтобы не разрушить амилазу) до тех пор, пока взятая проба жидкости после остывания перестанет давать посинение с иодом, т. е. до полного осахаривания крахмала. Получается сильно мутная окрашенная жидкость, в которой при отстаивании образуется обильный осадок. Жидкость декантируют или пропускают через сито с отверстиями в 1 мм, отцеживают через ткань и разливают в заранее стерилизованные колбы или пробирки, стараясь не запачкать их горлышко, ибо ватные пробки прилипают к стеклу. Иногда к этой среде прибавляют мел для нейтрализации кислот, образующихся при разложении сахара микробами. Стерилизовать можно нагреванием в автоклаве при 110° в течение 15—20 мин., хотя предпочтительнее это делать повторным нагреванием в текучепаровом аппарате Коха: первые 3 дня по полчаса (в промежутках среду оставляют на холоду), а на 4-й день за несколько часов до очередной стерилизации выдерживать среду при 35—40°. На 5-й день жидкость не подвергают стерилизации, а сохраняют при 25—30°. Последняя стерилизация производится на 6-й день в течение 1 часа.

Среда № 19. Среда Голэна для плесневых грибов.

Фосфорнокислый аммоний двузамещенный [(NH ₄) ₂ HPO ₄]	0.6 г
Сернокислый аммоний [(NH ₄) ₂ SO ₄]	0.25 г
Углекислый калий (K ₂ CO ₃)	0.6 г
Углекислый магний (MgCO ₃)	0.4 г
Азотнокислый аммоний (NH ₄ NO ₃)	4.0 г
Сернокислый цинк (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	0.07 г
Сернокислое железо (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	0.07 г
Кремнекислый калий (K ₂ SiO ₃)	0.07 г
Витная кислота	4.0
Сахароза	70.0
Дистиллированная вода	1500 мл

Среда приводится из-за ее большого значения в связи с изучением физиологии минерального питания плесневых грибов. Она дает возможность легко исключать отдельные элементы, заменяя их другими солями.

Среда № 20. Среда Фреда и Ваксмана (Fred, Waksman, 1928) для плесневых грибов.

Азотнокислый аммоний (NH_4NO_3)	3.0 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	1.0 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.0 г
Сернокислое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Следы
Сахароза	50.0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Среда № 21. Среда Чапека для плесневых грибов.

Азотнокислый натрий (NaNO_3)	2.00 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	1.00 г
Хлористый калий (KCl)	0.50 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.50 г
Сернокислое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01 г
Сахароза	30.00 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Для приготовления агаризованной среды добавляют 15 г агар-агара на 1000 мл раствора, растворяют и фильтруют. Реакцию среды можно не устанавливать.

Среда № 22. Картофельный агар для актиномицетов.

Картофель	200 г
Водопроводная вода	1000 мл

Клубни картофеля моют, чистят, режут мелкими дольками, помещают в холодную воду и варят 30 мин. Жидкость фильтруют через вату с марлей, добавляют агар-агар и нагревают до тех пор, пока агар растворится; pH раствора доводят до 7.0. Стерилизуют 1 час при 120°.

Среда № 23. Сахарный агар Ваксмана с нитратами для актиномицетов.

Азотнокислый натрий (NaNO_3)	2.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	1.0 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Хлористый калий (KCl)	0.5 г
Сернокислое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01 г
Сахароза	30.0 г
Агар-агар	15.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Реакцию среды доводят приблизительно до pH=7.0.

Среда № 24. Крахмало-аммиачный агар для актиномицетов.

Растворимый крахмал	10.0 г
Сернистый аммоний $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	2.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	1.0 г
Сернистый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.0 г
Хлористый натрий (NaCl)	1.0 г
Углекислый кальций (CaCO_3)	3.0 г
Агар-агар	15.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Разбалтывают растворимый крахмал в небольшом количестве холодной воды и вливают в кипящую воду прежде, чем добавлять соли.

5. МИНЕРАЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ВОДОРΟΣЛЕЙ

Среда № 25. Среда Успенского (1925).

Азотнокислый кальций $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	0.1 г
Азотнокислый калий (KNO_3)	0.025 г
Сернистый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.025 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	0.025 г
Углекислый калий (K_2CO_3)	0.035 г
Хлорное железо ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.002—0.01 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Активная реакция среды доводится до $\text{pH}=7.0-7.6$.

Среда № 26. Среда Пратта (по: Заварзина, 1961).

Азотнокислый калий (KNO_3)	0.1 г
Сернистый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.01 г
Хлорное железо ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.001 г
Водопроводная вода	1000 мл

Среда № 27. Голодный агар (по: Разумов, 1962).

Вода из исследуемого водоема	1000 мл
Выщелоченный агар	15 г

Для создания более питательной среды смешивают 4 части голодного агара с 1 частью агаризованной среды Успенского (№ 25) и добавляют сахар, уксуснокислый кальций или аспарагин из расчета не более 25 мг/л. На голодном агаре хорошо культивируются бактерии-олигокарбофилы, не развивающиеся при высокой концентрации органических веществ в питательной среде.

6. СРЕДЫ ДЛЯ БАКТЕРИЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В КРУГОВОРОТЕ АЗОТА

Среды для уробактерий

С р е д а № 28. Среда Зенгена.

Мочевина $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$	30.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.5 г
Лимоннокислый кальций $[\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	10.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Реакцию среды устанавливают около $\text{pH}=7.0$.

С р е д а № 29. Среда Лениса.

Мочевина $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$	50.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.5 г
Почвенный экстракт (см. среду № 5)	100 мл
Водопроводная вода	900 мл

С р е д а № 30. Твердая среда.

Мочевина $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$	20.0 г
Желатина	150.0 г
Мясной бульон	1000 мл

Реакцию среды устанавливают около $\text{pH}=7.5$.

Желатина может быть заменена 15.0 г агар-агара.¹

Среды для нитрификаторов

С р е д а № 31. Жидкая среда Виноградского (по: Рубан, 1961).

Сервокислый аммоний $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	2.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	1.0 г
Хлористый натрий (NaCl)	2.0 г
Сервокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Сервокислое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01 г
Углекислый магний (MgCO_3) или углекислый кальций (CaCO_3)	Избыток
Дистиллированная вода	1000 мл

Чтобы предохранить потерю аммонийных солей, рекомендуется углекислые соли стерилизовать отдельно. После остывания среды углекислый магний или углекислый кальций добавляют отдельно в каждую колбу.

С р е д а № 32. Среда с аммонийно-магnezиальным фосфатом.

Аммонийно-магnezиальный фосфат (NH_4MgPO_4)	1.0 г
--	-------

Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.5 г
Сернистое железо ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	Следы
Водопроводная вода	1000 мл

На этой среде развитие нитрозомонас идет очень хорошо.

Среда № 33. Кремневые пластинки.

Приготавливают пластинки вышеописанным методом (стр. 9). На каждую пластинку добавляют 2.5 мл раствора *а*, 1 мл *б*, 1 каплю раствора *в* и несколько капель суспензии *г*, так чтобы кремневый гель был молочный. Круговым движением чашки растворы перемешивают, и открытую чашку Петри оставляют в термостате при 60° до тех пор, пока жидкость выпарится.

Раствор *а*:

Сернистый аммоний $[(NH_4)_2SO_4]$	1.5 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	0.5 г
Сернистый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.25 г
Дистиллированная вода	100 мл

Раствор *б*:

Сернистое железо ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	1.0 г
Дистиллированная вода	100 мл

Раствор *в*:

Насыщенный раствор хлористого натрия
($NaCl$).

Раствор *г*:

Углекислый кальций (тонко измельченный) ($CaCO_3$)	3.0
Дистиллированная вода	100 мл

Растворы *а*, *в*, *г* стерилизуют отдельно в колбах, а раствор *б* — в ампулах, предварительно откачав воздух. Раствор $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ можно заменить $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 9H_2O$ и тогда его можно стерилизовать, не откачивая воздух.

Среда № 34. Среда Ватсона и Менделя (Watson, Mandel, 1971) для нитрозомонас.

Сернистый аммоний $[(NH_4)_2SO_4]$	1.7 г
Хлористый кальций ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	20 мг
Сернистый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	200 мг
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	15 мг
Железо (в виде хелата)	1 мг
Молибденовокислый натрий ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	10 мкг
Хлористый марганец ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	200 мкг
Хлористый кобальт ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	2 мкг
Сернистый цинк ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	100 мкг
Сернистая медь ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	20 мкг
Дистиллированная вода	1000 мл

После стерилизации устанавливают $pH=7.5$. При подкислении по мере развития нитрозомонас pH доводят снова до 7.5 путем внесения 0.3 М раствора K_2CO_3 .

Среда № 35. Среда Виноградского для нитробактера.

Азотистокислый натрий ($NaNO_2$)	1.0 г
Углекислый натрий (Na_2CO_3)	1.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.5 г
Хлористый натрий ($NaCl$)	0.5 г
Сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.3 г
Сернокислое железо ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.4 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Среда № 36. Среда Ватсона и Менделя (Watson, Mandel, 1971) для нитробактера.

Азотистокислый натрий ($NaNO_2$)	690 мг
Хлористый кальций ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	5 мг
Сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	100 мг
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	3.4 мг
Хелат железа	1 мг
Молибденовокислый натрий ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	25 мг
Хлористый марганец ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 мкг
Сернокислый цинк ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	25 мкг
Хлористый кобальт ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.6 мкг
Сернокислая медь ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	5 мкг
Дистиллированная вода	1000 мл

После стерилизации pH среды доводят до 7.5. Концентрацию нитритов повышают путем добавления азотистокислого натрия.

Среды для денитрифицирующих бактерий

Среда № 37. Среда Гильтая (по: Омелянский, 1923а).

а. Азотнокислый калий (KNO_3)	1.0 г
Аспарагин ($C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$)	1.0 г
Дистиллированная вода	250 мл
б. Лимонная кислота	5.0 г
или лимоннокислый кальций	8.5 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	1.0 г
Сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1.0 г
Хлористый кальций ($CaCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.2 г
Хлористое железо ($FeCl_3 \cdot 4H_2O$)	Следы
Дистиллированная вода	250 мл

В случае употребления лимонной кислоты ее нейтрализуют 10%-м раствором КОН в присутствии фенолфталейна как индикатора. Растворы «а» и «б» смешивают и общий объем доводят до 1000 мл. Наличие процесса денитрификации устанавливают по положительной реакции с реактивом Гриса и по выделению пузырей газа.

Для получения твердой среды добавляют 1.5% агар-агара. Среду можно употреблять и без аспарагина. Как это указывается в оригинальной прописи Гильтая (Giltay, Aberson, 1892), аспарагин служит для более отчетливого определения косвенной денитрификации, когда восстановление нитратов идет только до нитрита. В присутствии аспарагина в этих условиях возможно выделение свободного азота за счет химического взаимодействия аммиачного азота аспарагина с азотистой кислотой.

Для количественного учета депитрифицирующих бактерий следует брать среду Гильтая без аспарагина, добавлять к ней 1.5% агар-агара и нейтрализовать до $\text{pH}=7.0-7.2$. Испытуемый материал из ряда последовательных десятикратных разведений вносится в стерильные пробирки и заливается данной средой до резиновой пробки. Пробирки хорошо сразу же поставить в стакан с холодной водой для быстрого застывания агара. (О развитах бактерий судят по образованию в столбике агара пузырьков азота.

Среда № 38. Среда Ван Итерсона.

Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.5 г
Азотнокислый калий (KNO_3)	2.5 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Полоски фильтровальной бумаги	20.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Реакцию среды устанавливают до $\text{pH}=7.2-7.4$.

Среда № 39. Нитратный агар.

МПА (среда № 2)	1000 мл
Азотнокислый калий (KNO_3)	2.5 г

Азотнокислый калий до стерилизации добавляется в расплавленный МПА.

Среды для азотфиксирующих бактерий

Среда № 40. Среда Омелянского и Северовой (по: Омелянский, 1923б) для азотобактера.

Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	1.0 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Углекислый кальций (CaCO_3)	5.0 г
Декстрин	20.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Для получения твердой среды добавляют 1.5% агар-агара. На этой среде азотобактер хорошо образует бурый пигмент.

Среда № 41. Среда Эшби для азотобактера.

Маннит	20.0
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.2 г
Сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2 г
Хлористый натрий ($NaCl$)	0.2 г
Сернокислый калий (K_2SO_4)	0.1 г
Углекислый кальций ($CaCO_3$)	5.0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

При замене маннита сахарозой рост идет значительно лучше, хотя среда менее элективна. Кислотность среды до добавления углекислого кальция устанавливается до 7.0—7.5. Для получения твердой среды добавляют 1.5% агар-агара.

Среда № 42. Среда Федорова (1957) для азотобактера.

Инвертный сахар	20.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.3 г
Фосфорнокислый кальций ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$)	0.2 г
Сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.3 г
Сернокислый калий (K_2SO_4)	0.2 г
Хлористый натрий ($NaCl$)	0.5 г
Хлорное железо ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	0.1—0.01 г
Углекислый кальций ($CaCO_3$)	5.0 г
Смесь микроэлементов	1.0 мл
Дистиллированная вода	1000 мл

Используется смесь микроэлементов следующего состава.

Борная кислота (H_3BO_3)	5.0 г
Молибденовокислый аммоний $[(NH_4)_2MoO_4 \cdot 2H_2O]$	5.0 г
Иодистый калий (KI)	0.5 г
Бромистый натрий ($NaBr$)	0.5 г
Сернокислый цинк ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2 г
Сернокислый алюминий $[Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O]$	0.3 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Среда № 43. Среда Деркса (Derx, 1950) для рода *Beijerinckia*.

Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	0.8 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.2 г
Сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5 г
Хлорное железо ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	0.1 г
Молибденовокислый натрий ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.05 г
Сахароза	20 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Раствор доводят до pH=6.6.

Среда № 44. Бобовый отвар для клубеньковых бактерий.

Сухие бобы	250.0 г
Водопроводная вода	500.0 мл

Заливают бобы холодной водой и оставляют набухать в течение 2—3 час. Затем добавляют воды до 2500 мл и нагревают текучим паром 2 часа. Фильтруют и доводят общий объем до 2500 мл. Добавляют 1% сахарозы и 0.5% мела. Эта среда содержит около 40 мг азота в 100 см³ среды.

Среда № 45. Агар для выделения азотфиксирующих бактерий.

Магнит	10.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.5 г
Сервокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2 г
Хлористый натрий ($NaCl$)	0.1 г
Углекислый кальций ($CaCO_3$)	3.0 г
Дрожжевая вода (реакция pH = 6.8)	100 мл
Агар-агар	15.0 г
Дистиллированная вода	900 мл

Если среда используется для выделения клубеньковых бактерий, то на 1 л среды добавляют 10 мл 0.25%-го раствора конго рот. Для приготовления дрожжевой воды берут 400 г прессованных дрожжей, взбалтывают 3—4 часа, стерилизуют в высоком слое жидкости и оставляют отстаиваться неделю. Дрожжи оседают на дно, а над ними остается прозрачная жидкость. Раствор сливают сифовом и доводят реакцию до pH=6.6—6.8. Дрожжевая вода содержит около 50 мг азота в 100 мл и минимум растворимых углеводов.

Среда № 46. Среда Виноградского для *Clostridium pasteurianum*.

Фосфорнокислый калий двузамещенный. (K_2HPO_4)	1.0 г
Сервокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5 г
Хлористый натрий ($NaCl$)	Следы
Сервокислое железо ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	Следы
Сервокислый марганец ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	Следы
Глюкоза	20.0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Перед стерилизацией в каждую колбу или пробирку вносят мел из расчета 4 г на 100 мл питательной среды. Стерилизуют 30—40 мин. при 110°.

Среда № 47. Среда Бредемана (по: Омелянский, 19236).

Глюкоза	10.0
Пептон	12.0 г
Хлористый натрий ($NaCl$)	2.0 г
Агар-агар	16.0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Автор употреблял эту среду для выделения чистой культуры *Clostridium pasteurianum*.

7. СРЕДЫ ДЛЯ БАКТЕРИЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В КРУГОВОРОТЕ СЕРЫ

Среды для гнилостных бактерий

Среда № 48. Среда Бейеринка (по: Омелянский, 1923а) для гнилостных бактерий, образующих сероводород.

МПА	1000 мл
Уксуснокислый свинец $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$	1.0 г

К слегка щелочному МПА прибавляют столько тонко растертого углекислого свинца, чтобы получилась равномерно белая непрозрачная среда. Посевной материал вносят внутрь перевернутой крышки стерильной чашки Петри, заливают средой, перемешивают и, чтобы создать анаэробные условия, покрывают доньшком чашки Петри, так чтобы между слоем агара и доньшком перевернутой чашки Петри не осталось пузырьков воздуха. При росте колоний, выделяющих сероводород, вокруг них замечается побурение или почернение за счет образования сернистого свинца.

Рост бактерий происходит лучше, если углекислый свинец заменен окисью висмута.

Среда № 49. Среда Морриса для гнилостных бактерий, образующих сероводород.

МПА	1000 мл
Уксуснокислый свинец $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$	1.0 г

Среда № 50. Среда Вильсона-Блера (по: Мюллер, 1933) для гнилостных анаэробов.

Мясной экстракт	3.0 г
Пептон	5.0 г
Глюкоза	10.0 г
Агар-агар	30.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

К 100 мл стерильного агара ($\text{pH}=7.4-7.6$) вышеприведенного состава, нагретого до 80° , добавляют 10 мл 20%-го раствора сернистокислого натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), 1 мл 8%-го раствора хлорного железа ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) и 0.6 мл 10%-го раствора NaOH . Эти растворы готовят на стерильной воде. Разводят агар равным количеством посевного материала.

Среды для сульфатредуцирующих бактерий

Среда № 51. Среда Старки (Starkey, 1938).

Хлористый аммоний (NH_4Cl)	1.0 г
Сернинокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.5 г
Сернинокислый натрий (Na_2SO_4)	1.0 г

Молочнокислый натрий	3.5 г
Хлористый кальций ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г
Соль Мора $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$	0.5 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Соль Мора стерилизуют и добавляют перед посевом. pH среды доводят до нейтральной величины.

Среда № 52. Среда Баарса (Baars, 1930).

Хлористый аммоний (NH_4Cl)	1.0 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	0.5 г
Сернокислый кальций ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.0 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.0 г
Соль Мора $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$	0.5 г
Молочнокислый натрий	3.5 г
Водопроводная вода	1000 мл

Соль Мора стерилизуют отдельно в сухом виде в маленькой пробирке под резиновой пробкой и добавляют перед посевом. pH среды доводят до 7.0—7.4. При культивировании *Desulfovibrio aestuarii* в указанную среду добавляют 3% NaCl.

Среда № 53. Среда Сорокина (1952) для водородной сульфатредукции.

Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	1.0 г
Фосфорнокислый натрий двузамещенный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.3 г
Двууглекислый натрий (NaHCO_3)	1.0 г
Сернокислый аммоний $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	3.0 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.5 г
Сернокислый кальций ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Среду стерилизуют 20 мин. при 110° . pH перед посевом доводят до 7.0.

Перед заражением в среду добавляют соль Мора из расчета 1.0 г/л и $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ — 30 мг/л. Растворы соли Мора и сернистого натрия предварительно разливают в перетянутые пробирки, откачивают из них воздух и перепаяивают в узком месте на пламени горелки. Запаянные ампулы стерилизуют в автоклаве или аппарате Коха. 100 мл среды наливают в склянку объемом 500 мл, вносят 1—2 мл посевного материала и закрывают резиновой пробкой с отводной трубкой. После этого воздух откачивают масляным насосом до 40 мм рт. ст., склянку наполняют водородом, откачку и наполнение повторяют 3 раза и закрывают герметически.

Среда № 54. Твердая среда Кравцова и Сорокина (1959) для учета в илах *Desulfovibrio desulfuricans*.

Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.5 г
Фосфорнокислый натрий однозамещенный ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.3 г

Сернистый натрий (Na_2SO_4)	0.5 г
Сернистый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г
Сернистый аммоний $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	0.2 г
Соль Мора $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$	1.0 г
Молочнокислый кальций	2.0 г
Водопроводная вода	50 мл
Дистиллированная вода	1000 мл
Агар-агар	8 г

Соль Мора стерилизуют отдельно в пробирке под резиновой пробкой и вносят в среду перед посевом, после чего по каплям вносят 1%-й стерильный раствор $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ в 1%-м углекислом натрии до слабого потемнения среды. pH доводят до 7.2.

С р е д а № 55. Среда Постгейта «В» (Postgate, 1966), наиболее благоприятная для выделения сульфатвосстанавливающих бактерий.

Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	0.5 г
Хлористый натрий (NaCl)	1.0 г
Сернистый кальций ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.0 г
Сернистый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.0 г
Лактат натрия	3.5 г
Дрожжевой экстракт	1.0 г
Аскорбиновая кислота	1.0 г
Тиогликолевая кислота	1.0 г
Сернокислое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Водопроводная вода	1000 мл

Аскорбиновую кислоту добавляют перед самым посевом в виде 5%-го раствора аскорбиновокислого натрия, который отдельно стерилизуется в ампулах с выкаченным воздухом. Тиогликолевую кислоту также добавляют перед посевом в виде 5%-го раствора тиогликолата натрия, который стерилизуют отдельно в ампулах.

Сернокислое железо растворяют в 1%-й соляной кислоте и добавляют в основную среду перед посевом. Реакцию среды доводят до $\text{pH} = 7.5$, нейтрализуя 5%-м раствором соляной кислоты или углекислого натрия.

С р е д а № 56. Среда Постгейта «С», наиболее благоприятная для максимального роста сульфатредуцирующих бактерий.

Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	0.5 г
Хлористый аммоний (NH_4Cl)	1.0 г
Сернистый натрий (Na_2SO_4)	4.5 г
Хлористый кальций ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.06 г
Сернистый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.06 г
Лактат натрия	6.0 г
Дрожжевой экстракт	1.0 г
Сернокислое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г
Лимоннокислый натрий ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (добавляется для прозрачности среды)	0.3 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Сернокислородное железо прибавляют в виде раствора в 1%-й HCl. В качестве восстановителя добавляют 1 мМ $\text{H}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ или 1 г аскорбиновоокислого натрия плюс 0.5 мл 1%-го раствора $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ в 1%-й двууглекислой соде. Среда должна быть прозрачной. Она может мутиться после автоклавирования, но просветляется при охлаждении. Для галофильных форм по мере надобности вносят хлористый натрий.

Среды для окрашенных и бесцветных серобактерий

Среда № 57. Среда Пфеннига (Pfennig, 1965) для фотосинтезирующих серобактерий.

Рецепт приводится для 3 л среды и состоит из 4 растворов. Раствор 1:

Дистиллированная вода	2500 мл
Хлористый кальций ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.3 г
Хлористый натрий (NaCl) добавляют в зависимости от места обитания бактерий, для морских форм	105.0 г

500 мл этого раствора стерилизуют в колбе Эрленмейера объемом 2000 мл и разливают по склянкам. По 80 мл вносят в склянки на 125 мл и по 40 мл в склянки на 65 мл. Для культивирования используют склянки с завинчивающимися тефлоновыми колпачками. После автоклавирования склянки охлаждают до комнатной температуры и плотно завинчивают.

Раствор 2:

Дистиллированная вода	67 мл
Раствор микроэлементов по Пфеннигу	30 мл
Раствор витамина B_{12} (2 мг в 100 мл воды)	3 мл
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	1.0 г
Хлористый аммоний (NH_4Cl)	1.0 г
Хлористый магний ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1.0 г
Хлористый калий (KCl)	1.0 г

Раствор 3:

Дистиллированная вода	900 мл
Двууглекислый натрий (NaHCO_3)	4.5 г

Раствор 3 насыщается углекислотой путем пропускания ее через раствор пузырьками, пока pH раствора будет равно 6.2. Затем растворы 2 и 3 смешивают и немедленно стерилизуют путем фильтрования через фильтр Зейтца, который предварительно промывают 200 мл дистиллированной воды.

После стерилизации смесь растворов 2 и 3 вносят асептически в склянки, содержащие стерильный раствор 1, по 40 и 20 мл соответственно величине склянок.

Раствор 4:

Дистиллированная вода	200 мл
Сульфид натрия ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	3.0 г
Углекислый натрий (Na_2CO_3)	2.0 г

Раствор вливают в колбу и стерилизуют. Затем в стерильных условиях при помешивании туда добавляют по каплям 1.5 мл автоклавированного 2 М раствора серной кислоты. Далее этот раствор по 6 и 3 мл соответственно вносят в склянки со средой и доливают средой 1, так чтобы под пробкой остался небольшой пузырек воздуха. Для *Chlorokiorhiaceae* pH доводят до 6.8, для *Thiorhodaceae* — до 7.2 продуванием углекислоты или добавлением 2 М серной кислоты в асептических условиях.

Раствор микроэлементов по Пфеннигу.

Дистиллированная вода	1000 мл
Этилендиаминтетрауксусная кислота	
Трилон Б (растворяется в первую очередь)	1.5 г
Измененный раствор микроэлементов Хогланд	
Сернокислое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	200 мг
Сернокислый цинк ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	100 мг
Хлористый марганец ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	20 мг

Модифицированный раствор микроэлементов по Хогланду (по: Collins, 1969).

Хлористый алюминий (AlCl_3)	1 г
Иодистый калий (KI)	0.5 г
Бромистый калий (KBr)	0.5 г
Хлористый литий (LiCl)	0.5 г
Хлористый марганец ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	7 г
Борная кислота (H_3BO_3)	11 г
Хлористый цинк (ZnCl_2)	1 г
Хлористая медь (CuCl_2)	1 г
Хлористый никель (NiCl_2)	1 г
Хлористый кобальт (CoCl_2)	1 г
Хлористое олово ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Хлористый барий (BaCl_2)	0.5 г
Молибденовокислый натрий ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Ванадиевокислый натрий ($\text{NaVO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г

Каждую соль растворяют отдельно в дистиллированной воде. Перед смешиванием реакцию каждого раствора устанавливают ниже pH=7.0. Общий объем всех растворов доводят до 3.6 л. Конечная реакция pH всего раствора должна быть около 3—4. Перед употреблением раствор должен быть тщательно перемешан.

Среда № 58. Среда ван Нила для пурпурных серобактерий.

Хлористый аммоний (NH_4Cl)	1.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.5 г
Хлористый магний ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.2 г
Двууглекислый натрий (NaHCO_3)	1.0 г
Сернистый натрий ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	1.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Реакцию среды устанавливают до $pH=7.6$. Сернистый натрий вносят после стерилизации. Питательную среду разливают в склянки из белого стекла и после заражения доливают до пробки, так чтобы под пробкой не осталось пузырьков воздуха. Культивирование пурпурных и зеленых серобактерий производят на свету.

Среда № 59. Среда Постгейта (Postgate, 1959) для окрашенных серобактерий.

Основная среда:

Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	1.0 г
Хлористый аммоний (NH_4Cl)	1.0 г
Хлористый магний ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.5 г
Хлористый натрий ($NaCl$)	10.0 г
Микроэлементы	1.0 мл
Водопроводная вода	1000 мл

После стерилизации на 1 л основной среды добавляют 1 мл следующего раствора микроэлементов:

Железо (в виде $FeCl_2 \cdot 6H_2O$)	1.5 г
Бор (H_3BO_3)	0.1 г
Цинк ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01 г
Кобальт [$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$]	0.05 г
Медь ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.005 г
Марганец ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0.005 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Дальнейшие добавки (приготавливают крепкие растворы нижеприводимых солей, стерилизуют холодным фильтрованием и добавляют перед самым употреблением, исходя из расчета на 1 л основной среды): 1) двууглекислый натрий ($NaHCO_3$) — 2 г/л основной среды для культивирования всех видов пурпурных серобактерий; 2) сернистый натрий ($Na_2S \cdot 9H_2O$) — 1 г/л для *Chlorobium limicola*, 0.2 г/л для *Chromatium*, *Thiopedia* и *Chlorobium thiosulphatophilum*; 3) тиосульфат ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) — 1 г/л для *Chlorobium thiosulphatophilum*, *Chromatium* и *Thiopedia*; 4) яблочнокислый натрий — 1 г/л для *Chromatium* и *Thiopedia*.

Реакцию среды устанавливают фосфорной кислотой: $pH=7.0-7.2$ для различных видов *Chlorobium*, $pH=8.0-8.4$ для *Chromatium* и *Thiopedia*.

Среда № 60. Среда Буртона и Морита (Burton, Morita, 1964) для бесцветных серобактерий — *Beggiatoa*.

Дрожжевой экстракт (Дифко)	2.0 г
Хлористый кальций ($CaCl_2$)	0.1 г
Уксуснокислый натрий (CH_3COONa)	0.5 г
Водопроводная вода	1000 мл

В случае выделения культуры добавляют 2% агара. После стерилизации в среду вносят каталазу в концентрации десять единиц сигма на 1 мл (одна единица сигма разрушает 1 мкМ перекиси водорода в 1 мин. при pH=7 и 20°). Введение соли хлористого кальция замедляет лизис клеток *Beggiatoa*. При добавлении сульфидов в 48-часовую культуру внутри клеток отлагались капельки серы.

Среды для тионовых бактерий

Среда № 61. Среда Лиске (Lieske, 1912) для *Thiobacillus denitrificans*.

Тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5.0 г
Азотнокислый калий (KNO_3)	5.0 г
Двууглекислый натрий (NaHCO_3)	1.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.2 г
Хлористый магний ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г
Хлористый кальций ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Следы
Хлорное железо ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Следы
Дистиллированная вода	1000 мл

Среда № 62. Среда Баалсруда (K. Baalsrud, K. S. Baalsrud, 1954) для *Thiobacillus denitrificans*.

Тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5.0 г
Азотнокислый калий (KNO_3)	2.0 г
Хлористый аммоний (NH_4Cl)	0.5 г
Двууглекислый натрий (NaHCO_3)	1.0 г
Хлористый магний ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	2.0 г
Сернистокислое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	10.0 мг
Дистиллированная вода	1000 мл

Реакцию среды устанавливают до pH=7.0. Соли железа, фосфаты и бикарбонаты стерилизуют по отдельности.

Среда № 63. Среда Бейеринка для *Thiobacillus thioparus*.

Тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5.0 г
Хлористый аммоний (NH_4Cl)	0.1 г
Двууглекислый натрий (NaHCO_3)	1.0 г
Фосфорнокислый натрий двузамещенный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.2 г
Хлористый магний ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г
Сернистокислое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Следы
Водопроводная вода	1000 мл

Тиосульфат и бикарбонат натрия стерилизуют отдельно, растворив в небольшом количестве воды, и добавляют в стерильный раствор остальных солей после охлаждения. Следы солей железа также необходимо добавлять после стерилизации общего раствора. Начальную кислотность среды устанавливают до pH=9.2—9.4.

Среда № 64. Среда Старки (Starkey, 1934) для *Thiobacillus thioparus*.

Тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	1.0 г
Сернистый аммоний $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	0.1 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	2.0 г
Хлористый кальций (CaCl_2)	0.1 г
Сернистый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г
Сернистое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.02 г
Сернистый марганец ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.02 г
Водопроводная вода	1000 мл

Кислотность среды устанавливают до $\text{pH}=7.8$. Соду и тиосульфат стерилизуют отдельно.

Среда № 65. Среда Натансона для галофильных тионовых бактерий.

Тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5.0 г
Хлористый натрий (NaCl)	30.0 г
Хлористый магний ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	2.5 г
Азотнокислый кальций $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	1.0 г
Фосфорнокислый натрий двузамещенный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Углекислый магний (MgCO_3)	0.5 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Среда № 66. Тиосульфатный агар Бейеринка.

Тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.1 г
Двууглекислый натрий (NaHCO_3)	0.2 г
Хлористый аммоний (NH_4Cl)	0.1 г
Агар-агар	20.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Для культивирования *Thiobacillus thioparus* желательно добавлять избыток мела (CaCO_3).

Среда № 67. Среда Ваксмана для *Thiobacillus thiooxidans*

	<i>A</i>	<i>B</i>
Сернистый аммоний $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	0.2 г	2.0 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	3.0 г	—
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	—	1.0 г
Сернистый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г	0.5 г
Хлористый кальций ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.25 г	—
Хлористый калий (KCl)	—	0.5 г
Сернистое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Следы	0.01 г
Фосфорнокислый кальций $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	—	2.5 г
Сера порошком (S^0)	10.0 г	10.0 г
Дистиллированная вода	1000 мл	1000 мл

Реакцию питательного раствора доводят до $\text{pH}=4.0$. Навески серы помещают в колбы или пробирки (где культивируется *Th. thiooxidans*) вносят жидкую питательную среду и стерилизуют текучим паром при 100° 3 дня подряд по 30 мин. Еще лучше развитие идет, если серу заменить серным молоком, которое готовится следующим образом: 2 весовые части серного цвета нагревают с 13 частями воды и 1 частью гидрата окиси кальция до перехода серы в раствор. Сильно разведенный раствор пентасернистого кальция осаждают разведенной соляной кислотой. Через 12 час. взвешенная сера осаждается в виде бело-желтоватого осадка, который отфильтровывают, промывают и сушат в эксикаторе над хлористым кальцием. Эту серу в различных пропорциях прибавляют к питательным средам. Для получения твердой среды в жидкую среду А вносят 5 г тиосульфата вместо серы и 20 г агар-агара.

Среда № 68. Среда Крюифа (de Kruyff, Walt, Schwartz, 1957) для *Thiobacillus thiocyanoxidans*.

Роданистый калий (KCNS)	0.2 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	3.0 г
Сернистокислый аммоний $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	0.2 г
Сернистокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Хлорное железо ($\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.02 г
Хлористый кальций ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.3 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Реакцию среды устанавливают до $\text{pH}=4.8$. Стерилизуют 15 мин. при 110° .

Среда № 69. Тиосульфатная среда Эмото (Emoto, 1933).

Тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5.0 г
Хлористый аммоний (NH_4Cl)	0.1 г
Фосфорнокислый кальций ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	5.0 г
Хлористый магний ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	3.0 г
Агар-агар	20.0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Стерилизуют 15 мин. при 110° . При культивировании *Thiobacillus thiooxidans* после стерилизации реакцию среды доводят до $\text{pH}=4.0$.

Среда № 70. Среда Лондон (London, 1963) для *Thiobacillus intermedius*.

Тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	10 г
Хлористый аммоний (NH_4Cl)	1.0 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	1.0 г
Хлористый магний ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Дрожжевой экстракт (готовый препарат)	5 г
Водопроводная вода	1000 мл

Реакцию среды доводят до pH=6.8. Так как pH среды при развитии бактерий резко снижается, то по мере подкисления ее следует нейтрализовать путем добавления 10%-го раствора углекислого натрия. Для получения твердой среды добавляют 1.5% агара.

Среда № 71. Среда Риттенберга (London, Rittenberg, 1967) для *Thiobacillus perometabolis*.

Тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), тетра- тионат натрия ($\text{Na}_4\text{S}_4\text{O}_6$) или сера (S^0)	0.5—1.0 г
Хлористый аммоний (NH_4Cl)	1.0 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	1.0 г
Хлористый магний ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Раствор микроэлементов Пфеннига (см. среду № 57)	20 мл
Дрожжевой экстракт (Дифко) или гидроли- зованный казеин	0.5—5.0 г
Простые органические соединения (окисис- лоты и спирты)	2.0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Органические соединения в виде концентрированных раство-
ров стерилизуются фильтрацией и добавляются в среду по мере
надобности. Для получения твердой среды добавляют 15 г агара.

Среда № 72. Среда Траутвейна (Trautwein, 1921) для *Thiobacillus trautweinii*.

Тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5 г
Азотнокислый калий (KNO_3)	5 г
Двууглекислый натрий (NaHCO_3)	1 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.2 г
Хлористый магний ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г
Хлористый кальций ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Следы
Хлорное железо ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Следы
Дистиллированная вода	1000 мл

Твердая среда готовится добавлением 2% агара.

Среда № 73. Среда Старки (Starkey, 1934) для *Thiobacillus novellis*.

Тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	10.0 г
Сервокислый аммоний ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	0.1 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	2.0 г
Сервокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г
Хлористый кальций ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г
Сервокислый марганец ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.02 г
Хлорное железо ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.02 г
Водопроводная вода	1000 мл

Кислотность среды устанавливают до pH=8—9. Сульфат
аммония и тиосульфат стерилизуют отдельно.

Среда № 74. Среда Тейлора и Хоаре (Taylor, Hoare, 1969) для *Thiobacillus A2*.

Тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5.0 г
Фосфорнокислый натрий двузамещенный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	7.9 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	1.5 г
Хлористый аммоний (NH_4Cl)	0.3 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г
Раствор микроэлементов	5.0 мл
Красный фенол	2 мг
Дистиллированная вода	1000 мл

Раствор микроэлементов по Ифеннигу:

Трилон Б (этилендиаминтетрауксусная кислота)	1.5 г
Измененный раствор Хогланда (см. среду № 57)	6 мл
Сернокислое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.200 г
Сернокислый цинк ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.100 г
Хлористый марганец ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.020 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Растворы $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и микроэлементов стерилизуют отдельно.

Для автотрофного роста добавляют тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) в количестве 0.5—1.0% и pH среды доводят до 8.5 стерильным 10%-м раствором двууглекислого натрия. Элементарную серу стерилизуют отдельно текучим паром и вносят на поверхность жидкой среды. Для гетеротрофного роста добавляют органические соединения в виде стерильных растворов в количестве от 5 до 100 мМ, а концентрацию хлористого аммония увеличивают до 0.6 г/л.

Твердые среды готовят добавлением 1.5% выщелоченного агара.

Для анаэробного роста к основной среде добавляют 2 г/л азотнокислого калия и 2 г/л двууглекислого натрия.

Культуры поддерживают на косяках агаризованной среды с тиосульфатом натрия при pH=8.5 и пересевают 1 раз в месяц.

Среда № 75. Среда Сильвермана и Лундгрена (Silverman, Lundgren, 1959) K9 для *Thiobacillus ferrooxidans*.

Раствор 1: в 700 мл дистиллированной воды растворяют

Хлористый калий (KCl)	0.1 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.5 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Азотнокислый кальций ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$)	0.01 г

и стерилизуют 20 мин. при 1 атм.

Раствор 2: в 300 мл дистиллированной воды растворяют

Соль Мора $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$	63 г
---	------

добавляют 1 мл 10 н. серной кислоты и стерилизуют 20 мин. при 0.5 атм.

Перед употреблением оба раствора смешивают и pH доводят до 3.5.

Среда № 76. Среда Летена (Leathen, McIntyre, Braley, 1951) для *Thiobacillus ferrooxidans*.

Сернокислый аммоний $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	0.15 г
Хлористый калий (KCl)	0.05 г
Сернокислый магний $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.5 г
Азотнокислый кальций $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	0.01 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	0.1 г

После стерилизации к среде добавляют 10 мл 10%-го раствора $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, подкисленного до $\text{pH}=3.5$ и простерилизованного отдельно. Раствор железа лучше стерилизовать нагреванием в водяной бане в ампулах, из которых удален воздух. Для выделения чистой культуры *Th. ferrooxidans* к среде Летена добавляют 2% выщелоченного агар-агара. Реакцию среды до $\text{pH}=4.0$ в этом случае устанавливают после стерилизации и добавления раствора сернокислого железа.

8. СРЕДЫ ДЛЯ ЖЕЛЕЗОБАКТЕРИЙ

Среда № 77. Среда Лиске (по: Заварзин, 1972).

Сернокислый аммоний $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	1.5 г
Хлористый калий (KCl)	0.05 г
Сернокислый магний $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.05 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.05 г
Азотнокислый кальций $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	0.01 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Питательная среда стерилизуется в небольших колбочках, куда ее наливают слоем около 2 см. После стерилизации среду оставляют стоять на воздухе несколько дней для обогащения кислородом и углекислотой. Затем в каждую колбу добавляют приблизительно 0.05 г стерильной железной проволоки и среду заражают посевным материалом.

Развитие автотрофных железобактерий происходит хорошо, если среду налить высоким слоем в пробирки, а на дно вместо железной проволоки внести свежесаживаемое сернистое железо.

Среда № 78. Среда Вольфа (Kucera, Wolfe, 1957).

Хлористый аммоний (NH_4Cl)	1.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.5 г
Сернокислый магний $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.2 г
Хлористый кальций $(\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$	0.1 г
Сернистое железо (FeS)	В избытке
Дистиллированная вода	1000 мл

Железо добавляют в виде сернистого железа, которое разбалтывают в расплавленном 1.5%-м растворе агар-агара и вносят на дно пробирки. После того как агар застынет, стерильную жидкую среду наливают высоким слоем (5—7 см) поверх агар-агара и через нее пропускают ток углекислоты. Активную реакцию среды доводят до $\text{pH}=6-7$.

Осадок сернистого железа получают путем осаждения сернокислого железа сульфидом натрия в эквимольных растворах. Пробирки поверх ватной пробки затыкают корковой пробкой.

Железобактерии, в частности *Gallionella*, развиваются в виде налета на стенке пробирки там, где для них создается оптимальная концентрация закисного железа и кислорода.

Среда № 79. Среда для *Metallogenium symbioticum* (по: Заварзин, 1961).

Уксуснокислый марганец $[\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$	0.1 г
Агар-агар выщелоченный	15.0 г
Среда № 77 без железа	1000 мл

Берут жидкую среду Лиске для железобактерий (№ 77) или дистиллированную воду и вместо солей железа добавляют марганец в виде уксуснокислого марганца.

Среда № 80. Среда Дубининой (1970) для *Metallogenium*.

Гидролизированный крахмал	1 г
Нормальная лошадиная сыворотка	1 мл
ДНК	10 мкг
Свежеосажденный углекислый марганец (MnCO_3)	Избыток
Дистиллированная вода	1000 мл

Среда № 81. Среда Тайлера (Tyler, Marshall, 1967) для почкующихся бактерий, окисляющих марганец.

Дрожжевой экстракт	0.05 г
Сернокислый марганец $(\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$	0.02 г
Дистиллированная вода	1000 мл

На этой же среде при приготовлении ее на естественной воде без добавки солей марганца хорошо растут олигокарбофильные бактерии.

Для получения твердой среды добавляют 2.0% агар-агара Дифко.

Среды для гетеротрофных бактерий, отлагающих железо в слизистой оболочке

Среда № 82. Среда Разумова (1961) для *Cladothrix*.

Азотнокислый калий (KNO_3)	1.0 г
Хлористый кальций $(\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$	0.02 г
Сернокислый магний $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.02 г

Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.02 г
Хлорное железо ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	Следы
Сахароза	2.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Среда № 83. Среда Разумова (1961) для *Sphaerotilus*.
Та же, что среда № 82, но азот вносят в виде аспарагина или пептона — 1 г/л.

Среда № 84. Среда Калиненко (1946) для гетеротрофных железобактерий.

Лимоннокислое железо	1.0 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	0.05 г
Пептон	5.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Для получения твердой среды добавляют 1.5% агар-агара.

Среда № 85. Среда Бромфильда (Bromfield, 1954) «А» для бактерий, восстанавливающих окислы железа или марганца.

Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	0.5 г
Сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2 г
Сернокислый аммоний [$(NH_4)_2SO_4$]	1.0 г
Углекислый кальций ($CaCO_3$)	5.0 г
Сахароза	5.0 г
Дрожжевой экстракт (готовый препарат)	5.0 мл
Гидрат окиси железа или марганца	10 г
Дистиллированная вода	1000 мл

9. СРЕДЫ ДЛЯ БАКТЕРИЙ, ОКИСЛЯЮЩИХ ВОДОРОД ИЛИ УГЛЕВОДОРОДЫ

Среда № 86. Среда Коэна и Барриса (Cohen, Burris, 1955) для водородоокисляющих бактерий.

Диууглекислый натрий ($NaHCO_3$)	1.0 г
Хлористый аммоний (NH_4Cl)	1.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.5 г
Сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.1 г
Хлористый натрий ($NaCl$)	0.1 г
Хлористый кальций ($CaCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.1 г
Соль Мора [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$]	8 мг
Смесь микроэлементов:	
Борная кислота (H_3BO_3)	228 мг
Хлористый кобальт ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	80 мг
Сернокислая медь ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	8 мг
Хлористый марганец ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	8 мг
Сернокислый цинк ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	176 мг
Молибденовокислый натрий ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	50 мг
Дистиллированная вода	1000 мл

Газовая смесь состоит из 6 объемов водорода, 2 объемов кислорода и 1 объема углекислоты, pH среды устанавливают до 6.8—7.0.

Среда № 87. Среда Шатца и Бовелла (Schatz, Bovell, 1952) для водородоокисляющих бактерий.

Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	1.0 г
Азотнокислый аммоний (NH_4NO_3)	1.0 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 г
Сернокислое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01 г
Хлористый кальций ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.01 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Реакцию среды устанавливают до $\text{pH}=6.8-7.2$. Для приготовления твердой среды добавляют 1.5% отмытого агар-агара.

Для автотрофного роста бактерий в основную среду вводят 0.05% углекислого натрия. Раствор углекислого натрия автоклавируют отдельно, насыщают его углекислотой и прибавляют к основной среде перед заражением. Инкубацию проводят в атмосфере, состоящей из 10% углекислоты, 30% воздуха и 60% водорода.

Среда № 88. Среда Шлегеля (Schlegel et al., 1961) для водородных бактерий.

Фосфорнокислый натрий двузамещенный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	9 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	1.5 г
Хлористый аммоний (NH_4Cl)	1.0 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 г
Лимоннокислая железо-аммонийная соль	1.2 мг
Хлористый кальций (CaCl_2)	20 мг
Раствор Хогланда (см. среду № 57)	2 мл
Двууглекислый натрий (NaHCO_3)	0.5 г
Дистиллированная вода	1000 мл

pH среды доводят до 6.8—7.0. Бикарбонат натрия (NaHCO_3) стерилизуют отдельно. При гетеротрофном культивировании бактерий вместо бикарбоната добавляют 2 г солей глутаминовой кислоты.

Газовой смесью из 75% водорода, 15% кислорода и 10% углекислоты заполняют газометр, который подсоединяется к культуральной колбе. Для получения максимального урожая обычно применяют круглую плоскодонную колбу, наполненную не выше половины минеральной средой. В нее помещают магнитную мешалку. При перемешивании газы захватываются воронкой, доходящей до магнита, и разбрасываются им в виде пузырьков.

При культивировании литогетеротрофных штаммов Жилина (1970) рекомендует добавлять в среду 0.1% дрожжевого экстракта.

Среда № 89. Среда Мюнца (Münz, 1915) для метаноксилящих бактерий.

Хлористый аммоний (NH_4Cl)	1.0 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	0.5 г
Фосфорнокислый калий двухзамещенный (K_2HPO_4)	0.5 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Водопроводная вода	1000 мл

Культивирование производят в атмосфере $2/3$ воздуха и $1/3$ метана.

Среда № 90. Среда Таусона (1929) для бактерий, окисляющих жидкие и твердые углеводороды.

Азотнокислый кальций [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$]	1.0 г
Азотнокислый калий (KNO_3)	0.25 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	0.25 г
Фосфорнокислый калий двухзамещенный (K_2HPO_4)	0.25 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.25 г
Сернокислое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.005 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Кислотность среды устанавливают около $\text{pH}=6.6$. Можно заменять азотнокислый кальций и азотнокислый калий на сернокислый аммоний (1 г/л) и $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.25 г/л). Жидкие углеводороды добавляют в среду в небольших количествах, твердые в простерилизованном и измельченном виде наносят на поверхность питательной среды.

Среда № 91. Среда Фостера и Дэвиса (Foster, Davis, 1966) для бактерий, облигатно развивающихся на метане.

Азотнокислый натрий (NaNO_3)	2.0 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 г
Хлористый калий (KCl)	0.04 г
Хлористый кальций ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.015 г
Фосфорнокислый натрий двухзамещенный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.21 г
Фосфорнокислый натрий однозамещенный (NaH_2PO_4)	0.09 г
Сернокислое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.0 мг
Сернокислая медь ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5 мкг
Борная кислота (H_3BO_3)	10 мкг
Сернокислый марганец ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	10 мкг
Сернокислый цинк ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	70 мкг
Оксид молибдена (MoO_3)	10 мкг
Дистиллированная вода	1000 мл

Для получения твердой среды добавляют 2% выщелоченного агар-агара. Культуры ставят в эксикатор, из которого частично откачивают воздух и заполняют метаном до нормального давления.

Среда № 92. Среда Романенко (1959) для получения радиоавтографов водородокисляющих и метанокисляющих бактерий.

Фосфорнокислый натрий однозамещенный ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.3 г
Азотнокислый калий (KNO_3)	0.1 г
Серниокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.05 г
Двууглекислый натрий (NaHCO_3)	0.05 г
Агар-агар выпелоченный	15 г
Вода озерная или водопроводная	50 мл
Дистиллированная вода	950 мл

Реакцию среды устанавливают до $\text{pH}=7.2-7.5$. Среду разливают в чашки Петри, в которые перед этим вносят по 1 мл радиоактивного раствора бикарбоната $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ с удельной активностью около 0.1 мкКи. Содержимое чашек тщательно перемешивают. Культивирование бактерий производят на мембранных фильтрах, которые раскладывают на поверхность агара. Инкубирование производят при температуре $28-30^\circ$ в эксикаторах в атмосфере $1/3$ метана и $2/3$ воздуха.

10. СРЕДЫ ДЛЯ ЦЕЛЛЮЛОЗОРАЗРУШАЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Среда № 93. Среда Гетчинсона для аэробных бактерий.

Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	1.0 г
Хлористый кальций ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г
Серниокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.3 г
Хлорное железо ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.01 г
Азотнокислый натрий (NaNO_3)	2.5 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Реакцию среды устанавливают до $\text{pH}=7.2-7.3$. Питательная среда до стерилизации наливается до $1/3$ пробирки. В каждую пробирку опускается полоска фильтровальной бумаги, так чтобы она наполовину высывалась из раствора.

Среда № 94. Среда Омелянского для анаэробных бактерий.

Фосфорнокислый аммоний двузамещенный [$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$]	1.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	1.0 г
Серниокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Углекислый кальций (CaCO_3)	2.0 г
Хлористый натрий (NaCl)	Следы
Дистиллированная вода	1000 мл

Фильтровальная бумага растирается в ступке с небольшим количеством воды и вносится до стерилизации в виде кашицы в каждую пробирку. После заражения среда доливается до горлышка и затыкается резиновой пробкой. Развитие наступает быстрее, если в среду добавить 1% агар-агара и 20 мг/л сернистого натрия ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$).

11. СРЕДЫ ДЛЯ БАКТЕРИЙ, ОБРАЗУЮЩИХ МЕТАН

Среда № 95. Среда Жилиной (1973) для культивирования метаносарцины.

Хлористый аммоний (NH_4Cl)	0.33 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	0.33 г
Хлористый кальций (CaCl_2)	0.33 г
Хлористый калий (KCl)	0.33 г
Хлористый магний (MgCl_2)	0.33 г
Двууглекислый натрий (NaHCO_3)	1.5 г
Микроэлементы по Пфеннигу (см. среду № 57)	1 мл
Метанол (CH_3OH)	10 г
Дистиллированная вода	1000 мл
В случае необходимости агар-агар Дифко	20 г

В качестве восстановителя добавляют 0.05% сульфида натрия. Начальный $\text{pH}=7.0-7.5$ устанавливают, продувая раствор углекислотой. Накопительную культуру на этой среде поддерживают неограниченно долго. Метаносарцина — строгий анаэроб и быстро гибнет на воздухе. Вследствие этого пересевы культуры нужно делать большим количеством посевного материала и соблюдать анаэробные условия.

Среда № 96. Среда Романенко (1966а).

Хлористый аммоний (NH_4Cl)	0.2 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	1.0 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	2.0 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01 г
Двууглекислый натрий (NaHCO_3)	0.5 г
Этиловый спирт или уксуснокислый натрий	10.0 г
Агар-агар выщелоченный	0.75—1%
Водопроводная вода	1000 мл

1%-й сернистый натрий ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) в растворе 0.5%-го углекислого натрия стерилизуют отдельно, и в каждую пробирку добавляют по одной капле на 10 мл среды. Реакцию среды устанавливают до $\text{pH}=7.0$.

Среда № 97. Среда Баркера (Barker, 1956).

Хлористый аммоний (NH_4Cl)	0.75 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.4 г
Хлористый магний ($\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г
Углекислый кальций (CaCO_3)	20.0 г
Этиловый	20.0 мл
или пропиловый, или бутиловый спирты	10.0 мл
Водопроводная вода	1000 мл

На каждые 100 мл этой среды добавляется перед заражением 3 мл раствора 1%-го сернистого натра ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) в 5%-м

растворе углекислого натрия (Na_2CO_3), затем нейтрализуется соляной кислотой до реакции $\text{pH}=7.0$.

Среда № 98. Для *Methanobacterium Omelianskii*.

Используется жидкая минеральная среда Баркера № 97 без добавки органического вещества. После заражения помещается в атмосферу, состоящую из 4 объемов водорода и 1 объема газообразной углекислоты. Развитие бактерий отмечается по образованию вакуума и появлению метана.

12. СРЕДЫ ДЛЯ БАКТЕРИЙ, ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ ПЕРХЛОРАТЫ

Среда № 99. Среда Романенко и Кузнецова (Романенко и др., 1973) для выделения *Vibrio dechloraticans*, разрушающих в анаэробных условиях перхлораты.

Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.1 г
Хлористый аммоний (NH_4Cl)	0.05 г
Сернистый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01 г
Хлористый натрий (NaCl)	0.02 г
Перхлорат аммония (NH_4ClO_4)	0.25 г
Микроэлементы по Хогланду (№ 57)	1 мл
Витамин B_{12}	20 мкг
Уксуснокислый натрий (CH_3COONa)	0.10 г
Водопроводная вода	1000 мл

Микроэлементы, перхлорат, витамин и ацетат стерилизуют отдельно и добавляют в среду перед посевом. После стерилизации в среде выпадает осадок, который перед посевом растворяют соляной кислотой при $\text{pH}=4-5$. После этого pH среды доводят раствором гидроокиси натрия до $7-7.3$. Среду после заражения испытуемым материалом разливают в склянки (стр. 13) и ставят в термостат при 28° . Чистую культуру выделяют из обогащенной путем ряда последовательных разведений и выращивания на жидкой питательной среде. На МПА культура не растет. Чистая культура интенсивно развивается на этой же среде, количество ацетата в которой уменьшается до 0.05 г, после чего добавляют $1.5-2.5$ мл этилового спирта на 1 л среды.

13. СРЕДЫ ДЛЯ ОЛИГОКАРБОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Среда № 100. Среда Романенко (1973) для олигокарбофильных водных бактерий.

Вода из реки или озера с перманганатной окисляемостью $4-15$ мг $\text{O}/\text{л}$ доводится до кипения и фильтруется через асбестовый фильтр Зейтца для полного удаления бактериальных клеток. Фильтр предварительно промывается кипящей дистиллированной

водой. Вся посуда в опыте промывается хромовой смесью, приготовленной на концентрированной серной кислоте, и споласкивается профильтрованной безбактериальной водой.

Вода, не содержащая бактериальных клеток, разливается в колбочки по 50—100 мл или в пробирки по 5—10 мл и стерилизуется. После стерилизации склянки со средой на несколько часов помещают в эксикатор или герметический шкаф в атмосферу углекислоты для подведения рН к нейтральной величине. Атмосферу углекислоты можно создать, поместив в шкаф стакан с порошком карбоната натрия, в который приливают несколько миллилитров серной кислоты.

В колбах среда заражается 2—5 каплями воды из водоема или 1 мл соответствующего разведения. Пробы инкубируются при 26°. О развитии бактерий судят путем прямого подсчета на мембранных фильтрах.

На данной среде в пробирках методом предельных десятикратных разведений, так же как на МПБ, можно учитывать численность бактерий в водоемах. После инкубирования в термостате при температуре 26—28° в течение 5—7 дней содержимое пробирок профильтровывается через мембранный фильтр № 3, и после окраски эритрозином под микроскопом находят разведение, в котором развивались бактерии. Контролем служит среда из незасеянных пробирок.

Среда пригодна для учета численности живых бактерий в воде и иловых отложениях. На этой среде делается ряд последовательных десятикратных разведений испытуемой пробы воды в пробирках. Необходимо сделать 7—8 разведений. После этого пробы инкубируются в термостате в течение 5—7 дней. Затем они профильтровываются через мембранные фильтры № 2 или № 3, бактерии красятся эритрозином и под масляной иммерсией находится крайнее разведение, в котором происходило развитие бактерий. 2—3 пробирки не засеиваются и используются в качестве контроля.

Среда с успехом может быть использована при проверке чистоты культур бактерий и водорослей, которые с трудом поддаются очистке от бактериальных клеток. Для этого испытуемая культура засеивается на данную среду и после 5—7 дней в среде просматриваются формы бактерий и количество клеток, а также делается посев из данной пробирки на среду № 4.

Довольно часто на этой среде развиваются редкие формы бактерий.¹

¹ За время подготовки рукописи появились новые материалы, которые мы считаем необходимым опубликовать (см. стр. 189).

ПРИЖИЗНЕННОЕ ИЗУЧЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ И МЕТОДЫ ОКРАШКИ БАКТЕРИЙ

1. ПРИЖИЗНЕННОЕ ИЗУЧЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

При изучении микроорганизмов под оптическим микроскопом чрезвычайно большое значение имеет хорошее освещение препарата. Как правило, при больших увеличениях, в частности при пользовании масляной иммерсионной системой, следует применять искусственное освещение. При изучении живых неокрашенных объектов можно рекомендовать одновременно применение фазово-контрастного устройства.

Чрезвычайно важно при применении осветителей добиваться оптимального освещения препарата. В большинстве случаев изучению подвергаются окрашенные препараты, но при определении подвижности микробов, а зачастую при массовом просмотре культур для выделения спорообразующих микроорганизмов можно с успехом пользоваться неокрашенными препаратами. Наконец, при изучении микробного пейзажа илового профиля по Перфильеву, просмотр бактерий в целоскопических капиллярах производится исключительно в живом состоянии. Подсушивание нарушает картину распределения микроорганизмов в капиллярах.

Установка освещения объекта по Келлеру при работе с оптическим микроскопом

При подсчете количества бактерий прямым методом под микроскопом следует пользоваться искусственным освещением. Из отечественных систем осветителей для этой цели пригодны ОИ-7 и ОИ-9.

Осветитель представляет собой фонарь с электролампочкой и двухлинзовым коллектором с ирисовой диафрагмой. Фонарь крепится на стойке и устанавливается с помощью соединительной планки перед микроскопом на определенном расстоянии (рис. 2).

Для установки правильного освещения: 1) микроскоп и осветитель соединяют планкой; 2) на столик микроскопа помещают препарат; 3) осветитель через трансформатор (1) включают в сеть и устанавливают так, чтобы пучок света падал на середину плоского зеркала микроскопа; 4) диафрагму осветителя (2) суживают и патрон с лампочкой (3) передвигают в корпусе осветителя таким образом, чтобы нить накаливания резко изображалась

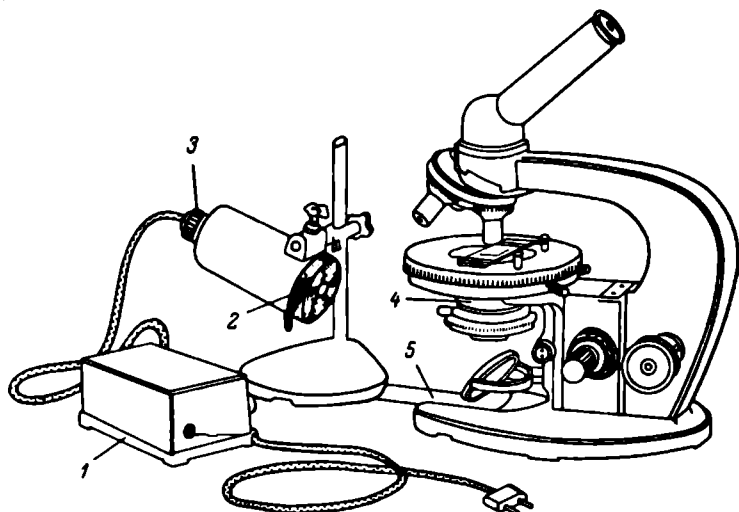


Рис. 2. Установка освещения препаратов в микроскопе по Келлеру.

1 — трансформатор; 2 — присовая диафрагма осветителя; 3 — патрон с лампочкой в корпусе осветителя; 4 — конденсор микроскопа; 5 — соединительная планка.

на клочке белой бумаги, который кладут на зеркало микроскопа; бумагу удаляют и поворотом зеркала пучок света направляют в тубус микроскопа; 5) поворотом макро- и микровинта препарат фокусируют; 6) диафрагму конденсора микроскопа (4) открывают, а диафрагму осветителя (2) суживают; 7) опуская и поднимая конденсор микроскопа (4), добиваются, чтобы край диафрагмы осветителя был резко виден в поле зрения микроскопа; 8) поворотом зеркала изображение открытого отверстия диафрагмы приводят в центр поля зрения; 9) диафрагму осветителя (2) раскрывают так, чтобы осветилось только видимое поле зрения.

Таким образом пучок света будет сфокусирован в плоскости препарата и освещение его будет оптимальным.

Метод фазовых контрастов для исследования живых объектов

Этот метод позволяет получать контрастное изображение при наблюдении под микроскопом неокрашенных неконтрастных объектов. При этом темные и светлые места изображения соответствуют различной толщине или оптической плотности в препарате.

Основная часть контрастно-фазового устройства — специальные ахроматические фазовые объективы, имеющие на одной из внутренних поверхностей линза фазовое кольцо определенных размеров и револьверный диск с кольцевыми диафрагмами, которые устанавливаются перед конденсатором (рис. 3).

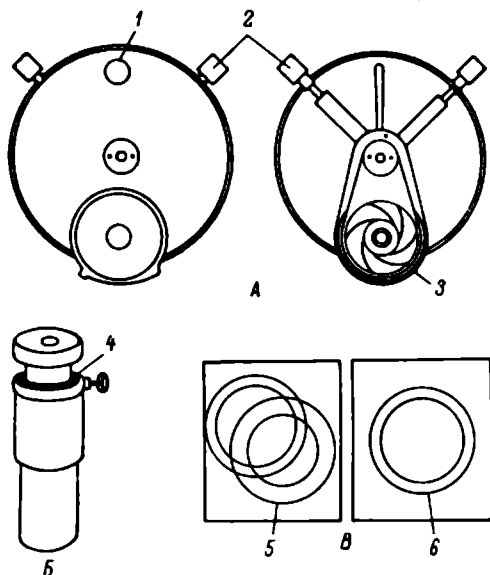


Рис. 3. Фазово-контрастное устройство.

А — фазово-контрастный конденсор: 1 — окно кожуха конденсора, 2 — центрировочные винты конденсора, 3 — ирисовая диафрагма конденсора. Б — вспомогательный микроскоп: 4 — окуляр вспомогательного микроскопа. В — фазовое кольцо объектива и светлое кольцо диафрагмы вспомогательного микроскопа: 5 — неправильное совмещение светлого и темного колец, 6 — правильное совмещение светлого и темного колец.

Фазовые объективы употребляются с обычными окулярами Гюйгенса. При выключении кольцевых диафрагм фазовые объективы могут употребляться как обычные, однако при этом качество изображения получается хуже вследствие наличия фазовой пластинки.

При работе с фазово-контрастным устройством: 1) выбранные окуляр и фазово-контрастные объективы вставляют в тубус микроскопа; 2) нормальный конденсатор микроскопа вынимают и в освободившееся гнездо вставляют фазово-контрастный конденсор, револьвер которого ставится на «0»; 3) микроскопический препарат помещают на столик микроскопа и фокусируют; 4) устанавливают правильное освещение по Келлеру, пользуясь осветителем ОИ-7 или ОИ-9: диафрагма осветителя должна быть видна в плоскости препарата, затем центрирована и открыта в соответствии с полем

зрения окуляра; 5) полностью открывают ирисовую диафрагму конденсора (рис. 3, А, 3); 6) вынимают из тубуса окуляр Гюйгенса и вместо него вставляют вспомогательный микроскоп (рис. 3, В), прилагаемый к фазово-контрастному устройству. Окуляр вспомогательного микроскопа (рис. 3, В, 4) перемещают, так чтобы было резко видно фазовое кольцо объектива. При этом нельзя трогать ни грубую, ни тонкую подачу тубуса микроскопа; 7) вращением револьвера конденсора включают диафрагму, соответствующую включенному объективу. При этом в окне кожуха конденсора (рис. 3, А, 1) должна появиться цифра, соответствующая увеличению объектива; 8) вращая центрировочные винты конденсора (рис. 3, А, 2), совмещают видимые во вспомогательный микроскоп светлое кольцо с темным кольцом (рис. 3, В, 6); 9) снова заменяют вспомогательный микроскоп окуляром Гюйгенса.

Для получения большего эффекта рекомендуется пользоваться светофильтрами, входящими в комплекс фазового контраста.

При смене объектива или препарата следует проверять центрировку кольцевой диафрагмы конденсора с фазовым кольцом объектива.

Возможные неполадки: 1) поле зрения освещено неравномерно, появляются темные пятна, что зависит от неправильной установки освещения по Келлеру; 2) после включения кольцевой диафрагмы поле зрения становится темным; это зависит от того, что закрыта ирисовая диафрагма; 3) если получается недостаточный контраст, то необходимо проверить центрировку фазово-контрастного устройства с помощью вспомогательного микроскопа.

Изучение живых микроорганизмов в висячей капле

Небольшую каплю изучаемой жидкости помещают в центр покровного стекла, края которого смазаны вазелином. Стеклышко поворачивают каплей вниз и помещают на предметное стекло с лункой, так чтобы капелька приходилась над лункой и не касалась стекла.

Просматривают каплю сначала при слабом, а затем и при сильном увеличении. Чтобы лучше видеть, сужают диафрагму осветителя микроскопа. Этот метод хорошо использовать для определения общей морфологии и подвижности организмов.

Ш-образная камера Пешкова

Этот тип камеры для прижизненного наблюдения над микроорганизмами позволяет применять оптические системы, имеющие рабочую численную апертуру выше 1. Изготовление камеры производится следующим образом. Предметное стекло не толще 0.5 мм фламбируют и устанавливают по уровню строго горизонтально. На поверхность стекла наливают слой стерильного расплавленного прозрачного агара толщиной не более 0.2 мм (рис. 4, а).

Среде дают застыть, а затем в стерильном ланцетом делают шесть разрезов в виде буквы Ш. После этого из получившихся канавок выталкивают ненужные полоски агара (рис. 4, б). В результате получается Ш-образный слой среды, для посева на которую используют лишь среднюю полосу, граничащую справа и слева с воздушными канавками.

Посев производят, нанося микробы тем или иным способом на среднюю полосу. Засеянную камеру покрывают стерильным тонким покровным стеклом, так чтобы оно плотно прилегало к слою агара. Слой агара, выступающий за пределы покровного стекла,



Рис. 4. Ш-образная камера по Пешкову. Объяснение в тексте.

1 — слой парафина, закрепляющий покровное стекло на поверхности агара; 2 — место засева агаризированной питательной среды; 3 — воздушные канавки; 4 — надрезы в слое питательного агара.

обрезают и покровное стекло по краям герметически закупоривают расплавленным парафином (рис. 4, в).

Наличие двух канавок с воздухом гарантирует нормальное развитие аэробных бактерий, герметичность камеры предохраняет препарат от подсыхания, а применение агаризированных сред исключает броуновское движение бактерий и создает оптимальные условия для фотосъемки.

Изучение микрофлоры поверхностного слоя ила в микробном пейзаже

Исследования Б. В. Перфильева и Д. Р. Габе (1961) показали большое разнообразие микроорганизмов в поверхностном слое ила. Наиболее четкую картину микробных пейзажей указанные авторы получили в микрообрастаниях стеклянных поверхностей в период формирования вторичного микроразнообразия. Именно в это время у иловых микроорганизмов, погребенных при перемешивании ила и оказавшихся в неблагоприятных условиях, образуются подвижные клетки, перемещающиеся в горизонты ила с оптимальным физико-химическим режимом. Там эти клетки прикрепляются и начинают размножаться, образуя характерный для данного ила микробный пейзаж.

Чтобы эти картины перенести под микроскоп без нарушения, авторы использовали прибор, названный ими капиллярным пелоскопом. Основу прибора (рис. 5, А) составляет набор из 4—5 капиллярных ячеек длиной в 1—2 см. В каждой капиллярной ячейке 5 прямоугольных капилляров с просветом 40×200 мкм.

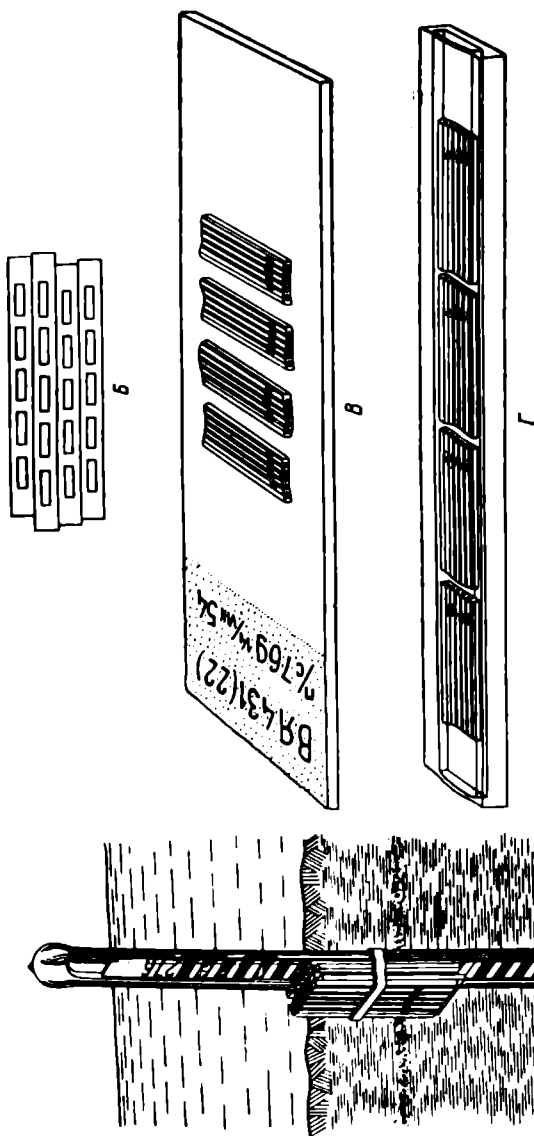


Рис. 5. Капиллярный пелоскоп.

А — капиллярный пелоскоп в сосуде с илом (развитие в каналах капиллярных ячеек микрообращающий соответствует их микроскопическому распределению в иле); Б — набор капиллярных ячеек в поперечном сечении; В — капиллярные ячейки на предельном стекле; Г — капиллярные ячейки в защитном капилляре с фиксирующей жидкостью (по: Перфильев и Габе, 1961).

Капилляры эти прикрепляются тонким резиновым кольцом из нипельной резины к стеклянной палочке и помещаются в стакан, куда был помещен перемешанный поверхностный ил из водоема.

Иловый раствор проликает в капилляры, его физико-химические свойства распределяются аналогично тому, как это имеет место в иловых капиллярах. Вместе с иловым раствором по соответствующим микрозонам распределяются и микроорганизмы. После извлечения капилляров из ила характер и распределение микроорганизмов можно хорошо контролировать под микроскопом.

Изучение микробного пейзажа ила складывается из следующих операций.

1. Образец ила и придонной воды отбирают в стеклянный стакан и тщательно перемешивают. После отстаивания ил должен занимать примерно $\frac{3}{4}$ общего объема.

2. Пачку из 4—5 капиллярных ячеек прикрепляют каучуковым кольцом из нипельной резины к стеклянной палочке или специальному держателю с вмонтированной в него лентой (рис. 5, А) из миллиметровой бумаги.

3. Капиллярные ячейки погружаются вертикально в ил с таким расчетом, чтобы они пересекли горизонт, в котором формируются главные микрозоны превращения вторичного диагенетического профиля.

При введении пелоскопов в ил нельзя оставлять в капиллярных ячейках воздух, так как он препятствует засасыванию илового раствора. Поэтому пелоскоп следует опускать в сосуд с илом постепенно. В один сосуд одновременно помещают несколько пелоскопов.

4. Сроки пребывания пелоскопических капилляров в иле, необходимые для получения достаточно четких микробных пейзажей, зависят от скорости формирования физико-химических свойств вторичного диагенетического профиля и от быстроты развития соответствующей микрофлоры. Пределы колебания от 2—3 дней до нескольких месяцев. Срок экспозиции капилляров устанавливается опытным путем.

5. Пелоскоп, вынутый из ила, осторожно обмывают снаружи водой из промывалки, пачку ячеек снимают с держателя и извлекают из каучукового кольца. Каждую капиллярную ячейку обтирают снаружи чистой тряпочкой и укладывают на предметное стекло верхними концами в одну сторону. Ячейки на стекле нужно располагать принятым раз навсегда определенным образом (рис. 5, В, Б).

6. После извлечения из ила пелоскопические капилляры необходимо немедленно микроскопировать или микрофотографировать, иначе сложившиеся в капиллярах микробные пейзажи сильно видоизменяются, при этом бактериальные микроколонии распадаются на отдельные клетки. Весьма типичные микрорельефы из закономерно расположенных микроорганизмов меняются до неузнаваемости. Хорошо сохраняются от высыхания пелоскопические капилляры в футлярных капиллярах значительно большего размера, допускающие при микроскопировании применение сильных систем. Футлярные капилляры (рис. 5, Г) представляют собой отрезки плоского капилляра с тонкой кровлей и одним широким щелевым капалом, форма и размеры просвета которого близки к габаритам пелоскопических ячеек.

7. При изготовлении фиксированных препаратов футлярный капилляр заполняют слабым раствором формалина и погружают в него пелоскопические капилляры.

8. При отсутствии пелоскопических капилляров близкие картины можно получать, применяя щелевой пелоскоп (рис. 6). Он представляет собой пару прямоугольных стеклянных пластин, соединенных между собой каучуко-

выми колечками. Между ними имеется узкая щель, образовавшаяся благодаря двум тонким стеклинным прокладкам у верхнего и нижнего концов.

Прокладки можно делать из осколков или тонких отрезанных полосок покровного стекла. Одна из стеклинных пластин должна быть тонкой, примерно 0.16—0.17 мм. Вторая опорная стеклинная пластинка щелевого пелоскопа имеет длину 70—80 и ширину 15—17 мм. В случае плотных грунтов толщина пластинки 1.0—1.3 мм. Тонкая пластинка должна быть по ширине несколько уже толстой. Для скрепления пластин следует брать тонкостенную трубку из каучука, нарезанную в виде колец.

При отсутствии специальных стекол щелевой пелоскоп можно с успехом имитировать из разрезанных или целых предметных и покровных стекол.

9. При микроскопировании щелевой пелоскоп помещают на предметное стекло тонкой пластинкой кверху, что позволяет рассматривать микробиоценозы, развившиеся в его щелевом пространстве, при любых увеличениях микроскопа. Вода из щели пелоскопа при этом испаряется настолько медленно, что микробиоценоз можно сфотографировать и без существенных изменений вернуть в сосуд с илом для последующих периодических наблюдений.

10. Чтобы сделать постоянный препарат микробного пейзажа из прочно прикрепляющихся форм, пелоскоп подсушивают, пластины разнимают и тем или иным способом делают постоянный препарат.

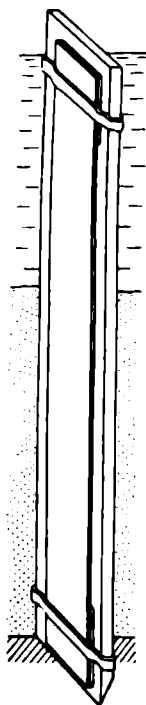


Рис. 6. Щелевой пелоскоп, состоящий из широкой стеклинной ленты и опорной стеклинной пластинки, соединенных каучуковыми кольцами (по: Перфильев и Габе, 1961).

2. ГЛАВНЕЙШИЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ БАКТЕРИЙ

Окраска бактерий на фиксированных препаратах

Общую структуру бактерий и других микроорганизмов лучше рассматривать на окрашенных препаратах. Процесс окраски заключается в том, что суспензию бактерий располагают на чистом стекле, подсушивают на воздухе, фиксируют мазок, проводя его 2—3 раза через пламя спиртовки, и окрашивают одним из способов, описанных ниже. После окраски мазок промывают проточной водой, высушивают и смотрят под микроскопом. Чтобы приготовить постоянный препарат, на сухой мазок наносится небольшая капелька канадского бальзама и покрывается покровным стеклом, которое необходимо прижать, чтобы

не осталось пузырьков воздуха и был удален избыток бальзама. Стекло оставляют в теплом месте для быстрого высушивания растворителя бальзама.

Из красок наиболее часто используются метиленовая синяя, кристаллиовиолет, фуксин и эритрозин. Растворы этих красок необходимо иметь под руками. За исключением эритрозина, основные растворы этих красок представляют насыщенные растворы на 95-градусном этиловом спирте. Перед употреблением небольшое количество краски фильтруют и разводят, как указывается в прописи.

Метиленовая синяя красит быстро, но слабее, чем фуксин. При нагревании краски легче проникают в бактериальную клетку и окраска бывает более интенсивной. Окраску мазка производят 1—3 мин., время от времени нагревая препарат до появления слабых паров.

Метиленовая синяя по Леффлеру.

Насыщенный спиртовой раствор метиленовой синей	30.0 мл
Раствор едкого калия (KOH) в дистиллированной воде 1 : 10000	100.0 мл

Карболовый фуксин по Цилю.

Насыщенный спиртовой раствор основного фуксина	10.0 мл
Карболовая кислота, 5%-й водный раствор	100.0 мл

Перед окраской бактерий растворы разводят в 10 раз дистиллированной водой.

Окраска эритрозином с докраской фуксином.

1. Эритрозин	3.0 г
Карболовая вода (5%-й водный раствор фенола)	100.0 мл
2. Фуксин по Цилю	1 капля
Дистиллированная вода	10.0 мл

Мазок бактерий на предметном стекле после фиксации окрашивается эритрозином в течение 3 мин. при слабом подогревании. Краска сливается и препарат дополнительно окрашивается сильно разведенным раствором фуксина 3 мин. при слабом нагревании.

О к р а с к а п о Г р а м у.

1. Кристаллиовиолет:	
Насыщенный спиртовой раствор кристаллиовиолета или генцианвиолета	10.0 мл
Щавелевокислый аммоний, 1%-й водный раствор	40.0 мл
2. Люголевский раствор:	
Йод (I ₂)	1.0 г
Йодистый калий (KI)	2.0 г
Дистиллированная вода	300.0 мл

3. Сафранин:

Насыщенный спиртовый раствор сафранина	10.0 мл
Дистиллированная вода	100.0 мл

Некоторые бактерии после окраски кристаллвиолетом или генцианвиолетом и обработки йодом легко обесцвечиваются спиртом, и то время как другие сохраняют свою окраску. Метод заключается в следующем. Делают тонкий мазок культуры на чистом предметном стекле, сушат на воздухе и фиксируют на пламени. Окрашивают 1 мин. кристаллвиолетом и 1 мин. обрабатывают раствором иода. Обесцвечивают окрашенный препарат 30 сек. 95%-м спиртом и промывают водой. Дополнительно окрашивают 10 сек. сафранином. Промывают и сушат. Если бактерии грамположительны, то они видны под микроскопом окрашенными в лиловый цвет. Если они грамотрицательны, то в спирту обесцвечиваются и окрашиваются сафранином в красный цвет.

Дифференциальная окраска по Пешкову для отличия живых и мертвых бактерий

Бактериальный мазок фиксируется в течение 20 мин. на предметном стекле фиксатором Корнуа следующего состава:

Спирт 95%-й	60.0 мл
Ледяная уксусная кислота	30.0 мл
Хлороформ	10.0 мл

Затем подсушивается 1 час на воздухе и окрашивается 24 часа при температуре 20° раствором Гимза, который служит для окраски мазков крови.

Азур II	1 : 1000
Эозин BA	1 : 1000

Краска сливается, мазок промывается нейтральной дистиллированной водой и на поверхность мазка наливается капля раствора лихт-грюн:

Лихт-грюн	0.25 г
Дистиллированная вода	100.0 мл
Уксусная кислота	1.0 мл

Одновременно наносится капля 70%-й уксусной кислоты. Окраска длится от 20 сек. до 1 мин. Живые клетки окрашиваются в синий цвет, а мертвые, потерявшие ядерное вещество, — в зеленый.

Выявление живых и мертвых бактерий путем окраски флюорохромами

Для выявления в мазке мертвых бактерий М. Н. Мейсель, Г. А. Медведева и В. М. Александрова (1961) рекомендуют производить окраску бактерий примулином или тиазоловым желтым или бриллиант-ди-аниловым зеленым в разведении 1 : 100 000.

На предметное стекло наносят несколько капель красителя, туда же добавляют бактериальную суспензию и покрывают покровным стеклом. Лишнюю воду снимают фильтровальной бумагой. Покровное стекло по краям обмазывают вазелином, чтобы предохранить препарат от высыхания. Через 5—10 мин. препарат просматривают в люминесцентном микроскопе.

При флюорохромировании этими красителями живые бактерии почти не светятся, а мертвые ярко люминесцируют. Одно и то же поле зрения сначала просматривают при люминесцентном освещении и учитывают мертвые клетки, а затем в том же поле зрения при фазовом контрасте подсчитывают общее количество бактерий.

Окраска спор по методу Ожешки

Мазок из культуры, содержащей вегетативные клетки и споры, делают на предметном стекле, подсушивают на воздухе, не фиксируя, заливают 5%-м раствором соляной кислоты и нагревают 2 мин. до появления паров.

Затем препарат промывают водой. Мазок покрывают слоем фильтровальной бумаги и заливают карболовым фуксином Циля. Окраска производится 5 мин. при легком подогревании препарата, до появления паров. При испарении краску подливают. Препарат не должен подсыхать.

После этого препарат промывают водой и 2 мин. обесцвечивают 1%-м раствором серной кислоты. Время обесцвечивания может колебаться, и его находят опытным путем.

Препарат еще раз промывают водой и докрашивают в течение 10—15 мин. раствором метиленовой синей 1 : 40. Препарат промывают водой и высушивают.

При правильной окраске бактериальные клетки должны быть синими, а споры — красными.

Окраска спор по методу Шеффер—Фультон

Препарат-мазок предварительно просматривается под микроскопом. Необходимо, чтобы были вегетативные палочки и споры. Мазок высушивается на воздухе и фиксируется спиртом.

После фиксации красят 5%-м водным раствором малахитового зеленого 60 сек., время от времени нагревая до появления слабых паров (3—5 раз). После этого краску смывают током воды. Мазок осторожно просушивают фильтровальной бумагой, дополнительно 30 сек. окрашивают 0.5%-м раствором сафранина, вновь промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой. Созревшие споры окрашиваются в зеленый цвет, вегетативные клетки — в розовый.

Окраска жгутиков по методу Трибондо—Фишет

Окраска жгутиков требует тщательной подготовки культуры и аккуратности в работе. Жгутики легко обламываются при легком взбалтывании культуры или если ее возраст превышает 15 час.

При подготовке препарата, осторожно прикасаясь пастеровской пипеткой с запаянным концом к молодой агаровой культуре, берут небольшое количество бактерий и опускают пипетку в пробирку с 2 мл стерильной воды. Не взбалтывать, бактерии самостоятельно переходят в воду.

На чистое покрывное стекло капают одну каплю бактериальной взвеси, наклоняют стекло и дают ей стечь, а избыток влаги снимают фильтровальной бумагой. Препарат сушат при 30—40°, предохраняя от пыли, и фиксируют 96%-м спиртом.

Для подготовки протравы и краски смешивают 2 объема 12%-го водного раствора алюминиевых квасцов с 1 объемом 10%-го водного раствора танина, нагревают 30 мин. при 120°. При этом образуется комплексное соединение, чрезвычайно активно осаждающееся на жгутиках. Смесь фильтруют в горячем виде, а затем повторно на холоду.

Готовят основной 20%-й раствор кристаллвиолета на абсолютном спирту, который перед употреблением разводят абсолютным спиртом — $\frac{1}{200}$, $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{50}$.

При окраске в небольшой фарфоровой чашечке смешивают 5 мл протравы и 0.5 мл краски и нагревают до кипения. Каплю капают на препарат, окрашивают его 20—30 сек. и хорошо ополаскивают, чтобы смыть пленку, образующуюся на поверхности протравы и оседающую на препарат. Препарат сушат и просматривают с масляной иммерсией.

Концентрация краски в этой операции подбирается опытным путем и зависит от характера культуры.

Клетки бактерий окрашиваются в темно-лиловый цвет, а жгутики красятся слабее (Lambin, German, 1961).

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ

Определение наличия оксидазы

Стеклянной палочкой или иглой извлекают колонию бактерий и помещают на кусочек фильтровальной бумаги площадью в 6 см², смоченной в чашке Петри 2—3 каплями 1%-го водного раствора солянокислого тетрафенил-*п*-фенилендиамина. При наличии оксидазы уже через 5—10 сек. бактериальная масса принимает темно-красный оттенок (Aaronson, 1970).

Определение наличия цитохромоксидазной активности

2—5 мл питательной среды 12—18-часовой культуры бактерий помещают в чистую пробирку и добавляют 0.3 мл 1%-го водного раствора щавелевокислого *п*-аминодиметиланилина и 0.2 мл 1%-го спиртового раствора α -нафтола. Появление синего окрашивания при сильном взбалтывании указывает на присутствие цитохромоксидазы.

Определение у микроорганизмов дыхательной системы, содержащей цитохромы

Растворяют 1 г солянокислого бензидина в 20 мл ледяной уксусной кислоты, добавляют 30 мл воды, раствор осторожно подогревают и охлаждают. Сохранность раствора — месяц. Биомассу бактерий помещают на дно пробирки и вносят туда по 0.5 мл свежеприготовленные вышеуказанный раствор бензидина и 5%-й раствор перекиси водорода, который готовят из 30%-го пергидроля.

Появление сине-зеленой окраски указывает на наличие цитохромной системы.

Определение дегидрогеназной активности.

Дегидрогеназы встречаются только у живых микроорганизмов, поэтому определение дегидрогеназной активности в субстрате может служить мерой активности биологических процессов. Поскольку для определения дегидрогеназ не существует единой методики, то Ленард и др. (Lenard, Ross a. de Plooy, 1962, *Hydrobiol.*, 20 : 223 — 240; Malicky, 1973, *Arch. Hydrobiol.*, 72 : 525 — 532) предложили проводить анализ в стандартных условиях. К 10 г свежееотобранного ила добавляют 100 мл CaCO_3 , 5 мл 3-го водного раствора 2, 3, 5-трифенил тетразолиум хлорида и инкубируют 19 часов при 25°. При этом дегидрогеназа восстанавливает трифенилтетразолиум хлорид до красного формазана. Краску экстрагируют 50 мл этилового спирта, раствор фильтруют и его экстинцию определяют в спектрофотометре Бекмана в 1-сантиметровой кварцевой кювете при длине волны 546 нм. Отсчет умножают на 1000 и это служит мерой определения величины дегидрогеназной активности ила в условных единицах.

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР НЕКОТОРЫХ ВИДОВ БАКТЕРИЙ

1. ЛАБОРАТОРНЫЕ ПРАВИЛА

Прежде чем разливать питательный агар в чашки Петри или делать пересев культур, необходимо протереть стол спиртом, воздух над столом опрыскать также спиртом из пульверизатора. При наличии посевного бокса на 15—20 мин. включить бактерицидную лампу. Руки перед посевом желательно протереть спиртом.

Пересев культур. Пробирки следует держать по возможности горизонтально. Избегать открывать культуры на ветру. Если нет специальных указаний, то инкубацию культур вести при 28°.

Уход за аппаратурой. После взвешивания следует разновесы убирать на место, не оставлять на весах сора или солей. Твердые материалы (ил, почва, агар-агар, вата, фильтровальная бумага) должны выкидываться в пустой ящик, а не в раковину.

В конце дня все реактивы и посуду убирать на место. Проверить чистоту оптической системы микроскопа. Все аппараты должны быть убраны в свои ящики, а газовые горелки выключены.

Ниже приводятся некоторые правила техники безопасности, так как в настоящем руководстве значительное внимание уделяется методам исследования с помощью радиоактивных изотопов.

Правила техники безопасности при работе с индикаторными дозами радиоактивных изотопов C^{14} и S^{36}

Радиоактивные азоты C^{14} и S^{36} испускают из ядра слабый поток электронов — β -излучение. При использовании радиоактивности порядка 0.1—1.0 мкС работать безопасно, если соблюдать следующие условия (см. также: Инструкция, 1963):

1. Растворы радиоактивных изотопов не должны попадать в рот и на слизистую оболочку глаз. Изотопы поэтому нельзя насасывать в пипетки ртом. Необходимо пользоваться для этой цели шприцем, шприцем с пипеткой или грушей с пипеткой и другими приспособлениями.

2. Манипуляции с изотопами следует производить на эмалированном кювете или металлической подставке, чтобы капли не попадали на стол и окружающие предметы. С летучими мечеными веществами необходимо работать под тягой или на открытом воздухе.

3. После проведения экспериментов рабочее место промывать водой (кювета, стол) при использовании меченых карбонатов предметы протирать 1%-м раствором соляной кислоты, руки вымыть 1%-м раствором той же кислоты и мылом. Помещение проветрить. Халаты стирать чаще обычного. Рабочее место периодически проверять на отсутствие радиоактивного загрязнения с помощью переносного счетчика.

4. Индикаторные дозы отходов следует сбрасывать в канализацию (согласно инструкции по работе с изотопами) после значительного разбавления водой. Твердые отходы надо сжигать в поле или под тягой. При работе с серой (S^{35}) опасность загрязнения со временем уменьшается, так как период полураспада ее равен 3 месяцам.

5. Рабочие растворы изотопов следует хранить в металлическом ящике или сейфе в стеклянной посуде с притертыми или резиновыми пробками. Особо чистые растворы изотопов лучше хранить в ампулах после дробной стерилизации на водяной бане.

2. МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

Выделение чистых культур в ряде случаев представляет значительные затруднения, особенно когда основному виду сопутствуют другие виды бактерий. Опыт показал, что наилучшие результаты дает излагаемый ниже метод, предложенный Хуттоном и Зобеллом (Hutton, Zobell, 1949).

Общие положения

1. Испытуемый материал высевают на жидкую элективную среду и получают культуру накопления данного вида бактерий.

2. Из культуры накопления бактерий делают ряд последовательных разведений и производят высев на агаризованную элективную питательную среду. В случае, если искомым вид бактерий хорошо растет на твердой питательной среде, высев можно делать из ряда последовательных разведений испытуемого материала непосредственно на твердую питательную среду, минуя операцию № 1.

3. Из посевов на твердую питательную среду выбирается такой, когда на чашке Петри будет около 30—50 колоний искомого вида бактерий. Из 50—100 колоний данного вида делают отсевы в пробирки с косым агаром, приготовленным на элективной питательной среде.

4. После соответствующей инкубации посевов через 1—2 недели все посевы на косой агар контролируют на чистоту. Сначала производят визуальный контроль на отсутствие посторонних видов по штриху на агаре. Грязные культуры отбраковывают. Затем из оставшихся штрихов делают микроскопические препараты, окрашивают эритрозином с докраской фуксином и вновь отбраковывают культуры, содержащие загрязнения, обнаруживаемые путем микроскопического контроля.

5. Чистые культуры высевают на жидкую элективную питательную среду и отбраковывают те культуры, которые не дали роста.

6. Чистые культуры, давшие рост на жидкой элективной среде, высевают на МПА и другие среды для проверки их на чистоту.

7. Вновь производят отбраковку культур, давших рост на тех средах, где они не должны расти. Если данный вид способен расти на МПА, то колонии на чашке все должны быть однородны.

Такой прием последовательной отбраковки грязных культур из первоначального массового посева гораздо быстрее приводит к положительному результату, чем многократный последовательный пересев из одной колонии с твердой среды (из чашек Петри) на косую агаризованную среду в пробирках и вновь пересев на чашки Петри и т. д.

В качестве критерия чистоты культуры служат следующие показатели: морфологическое однообразие культуры под микроскопом, за исключением полиморфных бактерий, однообразие колоний на твердой питательной среде. Для многих сапрофитных бактерий зачастую этого и достаточно. В ряде же случаев необходимо проверять отсутствие роста на специфических селективных питательных средах: для грибов, нитрификаторов, олигокарбофилов и других бактерий, которые могут загрязнять культуру.

Длительное сохранение культур бактерий на жидкой среде

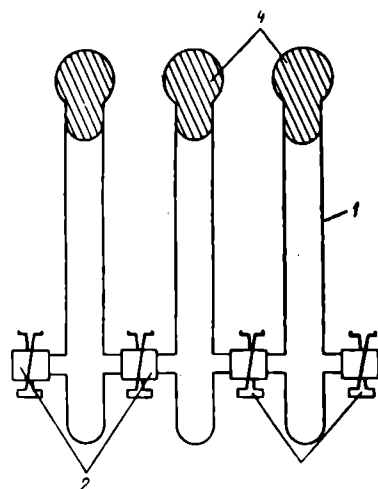


Рис. 7. Система пробирок для длительного культивирования микробов на жидкой среде с автоматическим пересевом.

1 — пробирка с двумя отрезками; 2 — соединяющие вакуумные трубки; 3 — зажимы; 4 — ватные пробки.

Некоторые бактерии плохо растут на твердых средах и для поддержания их в чистой культуре приходится пользоваться жидкими средами и делать частые пересевы. Длительное время поддерживать такие культуры без обычных пересевов можно, используя ряд соединяющихся пробирок (Романенко, 1970а).

В пробирку на $\frac{1}{3}$ ее длины от дна впаивают 2 отводных трубки (рис. 7) и 10—12 пробирок соединяют между собой короткими отрезками вакуумных каучуковых трубок с диаметром внутреннего отверстия в 1 мм и внешним 8 мм. Пробирки заполняют питательной средой на $\frac{2}{3}$ объема, закрывают тугими ватными пробками и стерилизуют в автоклаве. Для более длительного сохранения культур после стерилизации в пробирки можно добавить среду до пробки. У первой пробирки каучуковые трубки с двух сторон зажимают зажимами Гофмана, а среду засевают культурой бактерий. Через 10—20 дней зажим с одной стороны первой пробирки снимают и переносят на противоположную сторону второй про-

бирки. Таким путем бактерии проникают из первой пробирки во вторую и начинают здесь развиваться. Через 10—20 дней процедуру повторяют. При хранении культур заражения среды посторонней микрофлорой не происходит. Таким образом, в лабораторных условиях можно поддерживать чистую культуру несколько месяцев, переставляя зажим на каучуковую трубку следующей пробирки.

3. ВЫДЕЛЕНИЕ СТЕБЕЛЬКОВЫХ И ПОЧКУЮЩИХСЯ БАКТЕРИЙ

В пресных и соленых водоемах обнаружено большое разнообразие бактерий необычного вида и цикла развития. Возможно, наиболее интересными из этих форм можно считать те, которые

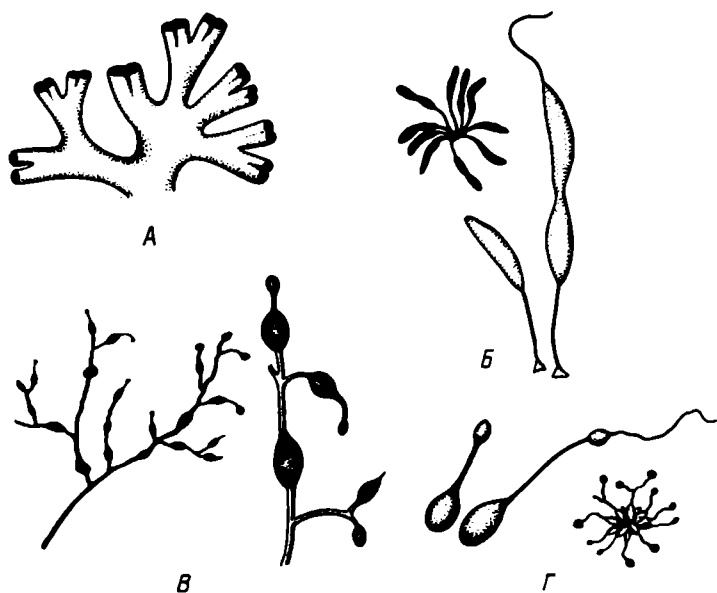


Рис. 8. Стебельковые и почкующиеся бактерии.

А — *Nevskia*; Б — *Caulobacter*; В — *Rhodomicrobium*;
Г — *Hyphomicrobium*.

имеют клеточные придатки (отростки клеточной стенки), содержащие цитоплазму. Сюда относятся разные виды, клетки которых имеют форму палочек или вибрионов и снабжены придатками, оканчивающимися стебельком, расположенным полярно у *Cau-*

lobacter или субполярно у *Asticcaulis*. Цикл развития каулобактера отличается от цикла развития типичных бактерий — образуются две морфологически разные клетки. Одна из дочерних клеток имеет стебелек, в то время как вторая образует жгутик и становится швермером. После отделения швермера от стебелевой клетки он обретает способность к делению только после образования стебелька, которым он прикрепляется к субстрату.

Hyphomicrobium (гифомикробы) и его фотосинтезирующий двойник *Rhodomicrobium* (рис. 8) тоже имеют клеточные придатки. Эти организмы имеют форму от палочкообразной до грушеобразной с отростками, оканчивающимися гифой, которая отходит только от полярной части клетки. Цикл развития более сложный, чем у каулобактера. Размножение начинается образованием почки непосредственно на материнской клетке или на конце гифы, которая может ветвиться. Почки имеют жгутики и нормально отделяются от материнской клетки или гифы.

Pedomicrobium отличается от *Hyphomicrobium* тем, что гифы у него могут отходить от различных частей клеток, а не только полярно. К этой же группе бактерий принадлежит род *Planctomyces*. Грушеобразные или сферические клетки имеют придаток, отходящий от одного полюса, а почка образуется на противоположном полюсе. Обычно клетки представляют собой гроздь, образующуюся на полюсе, противоположном придатку. Генричи и Джонсон (Henrici, Johnson, 1935) назвали этот род *Blastocaulis*(=*Pasteuria*).

Выделение культур стебельковых бактерий

Получение культуры накопления *Caluobacter*. Естественную воду отбирают асептически и 100 мл вносят в колбу Эрленмейера на 250 мл. Для получения культуры накопления *Caluobacter* в нее добавляют пептон до конечной концентрации 0.01%, т. е. 10 мг на 100 мл воды. Инкубацию проводят в лаборатории при комнатной температуре.

Получение культуры накопления *Alpacomicrobium* и *Prosthesomicrobium*. Для получения культур накопления бактерий, обладающих выростами, естественную воду или осадок после центрифугирования вносят в количестве 1 мл в питательную среду № 12 или производят их концентрирование на хроматографической колонке.

Некоторые штаммы выделяют путем пропускания отдельных порций культуры накопления через колонку, заполненную стеклянными бусами. Стеклянную хроматографическую колонку (внутренний диаметр 1 см) заполняют на 5 см автоклавированными бусинками диаметром около 0.2 мм. Колонку промывают питательной средой и остужают до комнатной температуры. 1 мл культуры накопления вносят на поверхность бусинок, при этом снизу спускают 1 мл раствора, так чтобы верхний мениск жидкости

соответствовал поверхности бусинок. Затем постепенно в колонку вносят охлажденный стерильный раствор и собирают отдельные капельки раствора, вытекающие из колонки. Первую каплю жидкости вносят в жидкую питательную среду, какая была использована для получения накопительной культуры, вторую — в ту же агаризированную среду и выливают в чашку Петри. Эту процедуру с последующими каплями повторяют около 30 раз. Примерно через 3 недели производят микроскопический и макроскопический контроль жидкой среды. Если в ней обнаружено развитие искомого организма, то колонии бактерий, выросшие в чашках Петри на агаризированной среде, микроскопируют из соответствующего разведения.

П р и е м ы м и к р о с к о п и ч е с к о г о и с с л е д о в а н и я п о ч к у ю щ и х с я б а к т е р и й. Изучение развития почкующихся бактерий производят в Ш-образной камере Пешкова на среде Сталей (№ 12), содержащей 0.025% сернокислого аммония, 0.025% глюкозы и 0.01—0.025% дрожжевого экстракта, или на среде Тайлера (№ 81). Другой способ заключается в том, что образцы пресной воды отбирают асептически и исследуют под электронным микроскопом. Взвешенные частички в каждом образце воды осаждают путем центрифугирования при 13 000 оборотов в течение 20 мин. Супернатантную фракцию декантируют и осадок вновь разбалтывают в меньшем объеме воды, так чтобы его концентрация была в 50—100 раз больше, чем в исходной воде. Каплю этой суспензии наносят на медную сетку в 200 меш, покрытую формваровой пленкой, и через 1 мин. избыток воды удаляют фильтровальной бумагой. Затем на препарат наносят каплю 1%-й фосфорновольфрамовой кислоты при $\text{pH}=7.2$ и немедленно снимают фильтровальной бумагой. Эта же процедура применяется и при исследовании бактерий из чистой культуры (см. стр. 123—128).

Выделение культур почкующихся бактерий

П о л у ч е н и е к у л ь т у р ы н а к о п л е н и я. Чтобы воспрепятствовать развитию посторонней микрофлоры при получении накопительной культуры почкующихся бактерий, испытываемую воду предварительно инкубируют в лабораторных условиях, не внося в нее никаких органических веществ. При этом по прошествии от двух недель до нескольких месяцев на поверхности жидкости появляется легкая пленочка из почкующихся бактерий. Добавление в среду источников углерода, даже необходимых для роста этих бактерий в чистой культуре, часто приводит к снижению числа почкующихся бактерий при усиленном развитии других форм. Однако введение метанола в газовую атмосферу над испытываемой водой зачастую способствует и облегчает получение накопительной культуры. При получении этой

культуры используют питательные среды № 10 и 11, содержащие аммонийные соли или нитраты. pH устанавливают равным 7.2.

Выделение чистой культуры. В накопительную культуру на несколько дней помещают стерильные покровные стекла, что создает оптимальные условия для развития *Hyphomicrobium* и *Pedomicrobium*. После инкубации покровных стекол в культуре накопления *Hyphomicrobium* бактерии, осевшие на их поверхности, в ряде разведений переносят в минеральный агар (среда № 11) с добавкой или без добавки хлористого метиламина. Инкубацию чашек производят при 20 или 30°. На этой среде происходит хороший рост, и очистка культуры не представляет затруднений.

Этвуд и Хардер (Attwood, Harder, 1972) предлагают метод выделения культуры гифомикриум, основанный на том, что ряд видов способны развиваться в анаэробных условиях, используя нитраты в качестве акцептора электронов. К среде Хирша (№ 11) добавляют 0.5 мл раствора микроэлементов по Пфеннигу (среда № 57), 0.2% азотнокислого калия и 0.5% метанола. Реакцию среды доводят до pH=7.0 путем нейтрализации 0.1 н. раствором едкого натра. Для удаления кислорода через раствор пропускают пузырьками азот.

Если среда используется для получения культуры накопления, то ее не стерилизуют.

Для получения культуры накопления посевной материал в количестве 5 мл воды или 0.3 г ила помещают в склянки с притертыми пробками объемом 75—120 мл, заливают средой до пробки и следят, чтобы склянки были заполнены до пробки, добавляя ежедневно свежую питательную среду. Инкубация проводится в темноте при 30°. Ежедневно следят, не появилась ли муть и не образуется ли газ.

Дальнейшую очистку культуры проводят на той же среде, которую до добавления метанола стерилизуют 15 мин. при 120°. Для получения твердой среды добавляют 1.5% агара Дифко и культивируют в аэробных условиях. В этом случае нитраты из питательной среды исключают. Идентификацию организма и его принадлежность к гифомикробам определяют по морфологическим признакам.

Рост организма на жидкой среде определяется по появлению муты и газообразованию в результате денитрификации. Первое появление роста из естественных субстратов отмечалось авторами на 3—9-й день, а хороший рост — на 7—20-й.

4. ВЫДЕЛЕНИЕ ПОЛЗАЮЩИХ БАКТЕРИЙ — FLEXIBACTERIA

К флексибактериям относится группа обычных, но малоизученных бактерий. Их можно характеризовать по следующим признакам: это нити, способные к скользящим движениям, длинной от

5 мкм и более и толщиной от 0.5 до 1 мкм (рис. 9). Они способны скользить по твердому субстрату, их колонии обычно можно отличить на агаре по нитчатым выростам. Ползающие бактерии отличаются от истинных бактерий относительной гибкостью клеточ-

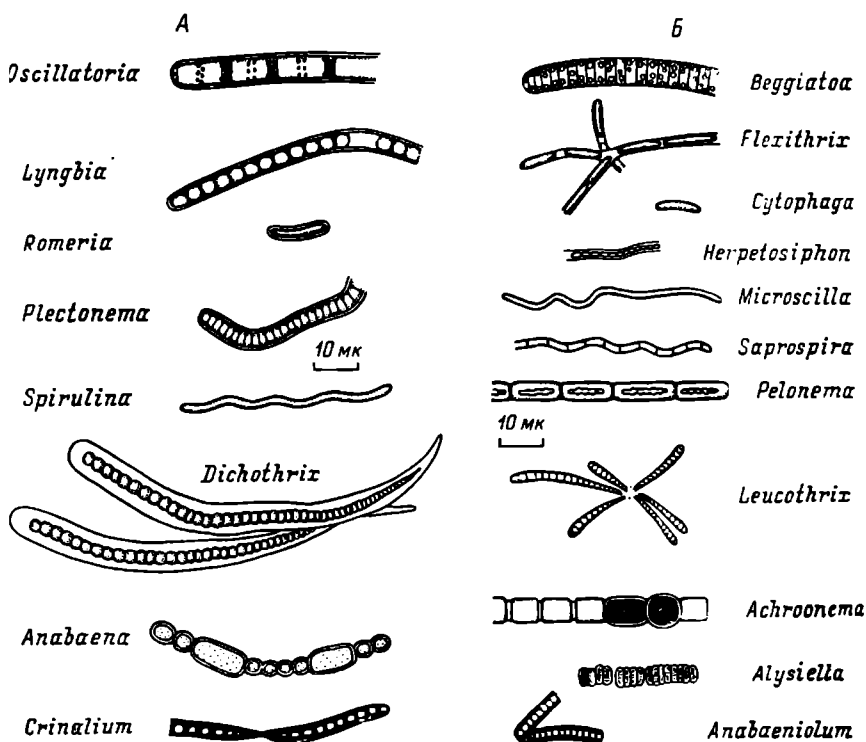


Рис. 9. Сопоставление гомологических рядов нитчатых синезеленых водорослей (А) и ползающих бактерий (Б).

ной оболочки, отсутствием жгутиков и эндоспор. Почти все они грамотрицательны. Флексибактерии отличаются от синезеленых водорослей отсутствием хлорофилла и фикобилиновых пигментов. Все штаммы флексибактерий гетеротрофны. Однако они не бесцветны. Все известные штаммы при массовом росте имеют красный, оранжевый или желтый оттенок в зависимости от наличия или отсутствия каротиноидов.

В свете новых сведений и пересмотра проблемы видов до более высоких таксономических единиц Левин предлагает следующую классификацию флексибактерий (Lewin, 1969).

КЛЮЧ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСНОВНЫХ РОДОВ ПОЛЗАЮЩИХ БАКТЕРИЙ (ПО: LEWIS, 1969)

- I. В пнях имеются включения серы:
 - 1) нити свободно плавающие *Beggiatoa*.
 - 2) нити прикрепленные *Thiothrix*.
- II. Включения серы отсутствуют:
 - 1) Нити заостренные, нижним концом прикреплены к субстрату. *Leucothrix*.
 - 2) нити неприкрепленные:
 - а) пигмент отсутствует, размножение путем разрыва нитей на многоклеточные отрезки, похожие на гормогонии *Vitreoscilla*.
 - аа) клетки имеют каратиноиды *Cytophagaceae*.
 - б) нити имеют влагалища.
 - в) нити имеют ложное ветвление *Flexithrix*.
 - вв) нити не ветвятся *Herpetosiphon*.
 - бб) влагалища отсутствуют, все клетки подвижны.
 - в) нити скручены в виде спиралей *Saprospira*.
 - вв) нити скручены только изредка.
 - г) гидролизуют клетчатку или агар.
 - д) микроцисты отсутствуют *Cytophaga*.
 - дд) образуют микроцисты *Sporocytophaga*.
 - гг) клетчатку и агар не гидролизуют.
 - е) длина клеток 20 мкм, морские организмы *Microscilla*.
 - ее) длина клеток варьирует, пресноводные организмы *Flexibacter*.

Метод выделения ползающих бактерий. Около 5 г образца почвы или ила помещают в пробирку с 5 мл стерильной воды и оставляют на 2—4 дня при комнатной температуре, а затем взбалтывают и засевают среду, содержащую 0.02% триптона и 1% агара. Чтобы задержать развитие амёб, миксомицетов и диатомовых водорослей добавляют 100 мг/л актидона.

Пластины просматривают через 3—4 дня и в дальнейшем в течение 2—3 недель каждые 2—3 дня. Отсев производят из края колоний, расплзающихся или проявляющих какие-либо признаки движения. Дальнейшие пересевы производят также из края колонии, до тех пор пока получают чистую культуру. Живые клетки из края колонии проверяют под микроскопом с использованием фазо-контрастного устройства при увеличении $\times 400$. Отбирают только культуры ползающих бактерий, все культуры бактерий со жгутиками отбраковывают.

К ползающим бактериям относится также порядок миксобактерий, характеризующийся рядом признаков, на которых основано выделение их культур. Большинство миксобактерий обладает большой литической способностью. У них обнаружены протеолитические и бактериолитические ферментные системы. Они способны лизировать клеточную стенку грибов и бактерий, а некоторые виды растворяют клетчатку и хитин. Миксобактерии способны ползать по субстрату, оставляя за собой слизистый тяж, в котором могут развиваться посторонние бактерии.

Получение культуры накопления. Вследствие литической способности миксобактерий культуры накопления можно получить, засевая чашки Петри с водным агаром культурой гриба, дрожжей или газоном бактерий. На поверхность развившихся бактерий или мицелия гриба раскладывают образцы ила или исследуемой воды. Развивающаяся культура накопления миксобактерий лизирует мицелий. По краям образующейся зоны просветления могут появиться плодовые тела, из которых производят высев для получения чистой культуры.

Другой метод основан на характерной особенности миксобактерий к ползанию по поверхности субстрата. Готовится среда Норена (№ 14) с добавкой 10% агара. На ее поверхности раскладывают посевной материал в виде комочков ила или концентрата бактерий из воды. Среда эта имеет настолько плотную и сухую поверхность, что большинство сопутствующих бактерий не способны следовать за миксобактериями, выползающими из посевных очагов.

Выделение чистой культуры. Производят посев на среду Норена (№ 14) или на картофельный агар (среда № 22), либо на ломтики картофеля. Выделение культуры производят из края колонии с выползающими клетками или спорами, осторожно извлеченными из плодовых тел.

5. ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕТЕРОТРОФНЫХ ВОДНЫХ СПИРИЛЛ — *SPIRILLUM VOLUTANS*

Получение культуры накопления было предложено Вильямсом и Риттенбергом (Williams, Rittenberg, 1957). В колбы Эрленмейера (объемом 100 мл) вносят 20 мл раствора, содержащего 2% молочнокислого кальция, 0.05% фосфорнокислого калия, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и доводят pH до 7.4. Затем вносят 20 мл поверхностной воды из сильно евтрофного водоема и частички отмершей подводной растительности. Параллельно ставят колбы с добавкой к указанному раствору 0.01% пептона и 0.001% дрожжевого экстракта.

Через 2—5 дней на поверхности жидкости образуется пленочка, пронизанная кристаллами углекислого кальция. Спириллы скапливаются непосредственно под пленкой. Проверку развития спирилл нужно делать каждый день, так как они после массового развития начинают быстро отмирать. При слишком большом содержании органических веществ спириллы развиваются плохо, и тогда при их появлении нужно сделать пересев в стерильную среду в тех же условиях, но не добавлять растительных остатков.

Выделение чистой культуры. Яннаш (Jannasch, 1965) рекомендует производить выделение чистой культуры,

когда в среде содержание спирилл составит 80—90% от общего количества бактерий. Высев делают на вышеуказанную среду, к которой добавляют 0.1% пептона, 0.01% дрожжевого экстракта, 0.05% аспаргина и 1.8% агара. Колонии спирилл развиваются медленно, на них оказывает отрицательное влияние близкое расположение колоний других бактерий.

Для накопления спирилл и их отделения от посторонних бактерий в культуре накопления перед высевом на твердую среду Яннаш предлагает использовать следующий прием. Стекло

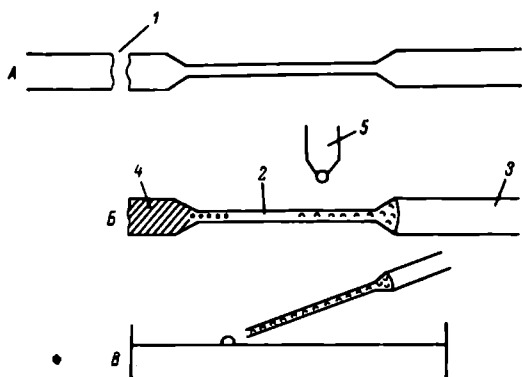


Рис. 10. Схема выделения крупных гетеротрофных спирилл.

А — форма капилляра, куда затягивается смешанная культура; 1 — место разлома трубки; Б — разделение культуры на основании аэротаксиса; 2 — место разлома капилляра, 3 — воздух, 4 — вазелиновое масло, 5 — контроль под микроскопом; В — посев из капилляра на питательный агар в чашку Петри.

трубочка диаметром около 5 мм перетягивается, так чтобы образовался капилляр между двумя толстыми частями длиной в 8 см (рис. 10) и внутренним просветом 0.2—0.09 мм. Толстая трубка с одной стороны от капилляра отрезается на расстоянии 0.5—1.0 см и этим концом опускается в культуру накопления. После того как жидкость затянется в капилляр, этот конец опускается в расплавленный стеарин, так чтобы между ним и жидкостью не осталось пузырьков воздуха. Тогда спириллы собираются у противоположного конца капилляра, где жидкость соприкасается с воздухом. Капилляр просматривают под микроскопом, и, когда здесь соберутся спириллы, капилляр обрезают и отсюда делают высев на твердую среду.

6. ВЫДЕЛЕНИЕ КУЛЬТУР ХИЩНЫХ БАКТЕРИЙ — *BDELLOVIBRIO*

5 г ила взбалтывают с 20 мл воды, болтушке дают отстояться или ее центрифугируют 5 мин. при 2000 оборотов в 1 мин.

Для отделения взвесей и мути отстоявшийся раствор фильтруют через мембранный фильтр № 6. *Bdellovibrio* проходят через поры фильтра.

Фильтрат повторно пропускают через мембранный фильтр № 3 или 4, так чтобы на фильтре осталось 2—3 мл раствора. При этом концентрация *Bdellovibrio* в жидкости на фильтре увеличивается.

1 мл смыва с мембранного фильтра смешивают с культурой бактерий, например *Pseudomonas*, вносят в питательный агар МПА и разливают в чашку Петри. После того как агар застынет, его сверху заливают 3 мл второго слоя агара.

После сплошного развития бактерий в слое агара появляются плесни сначала от бактериофага, а через несколько суток от развивающегося *Bdellovibrio*.

7. ВЫДЕЛЕНИЕ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В КРУГОВОРОТЕ АЗОТА

Выделение чистых культур аммонификаторов

Для выделения чистой культуры аммонификаторов производят высев испытуемого материала в чашки Петри с разведением на МПА. Чашки инкубируют при температуре около 20° в течение 10 дней. Из отдельных колоний производят отсев в пробирки на косой МПА. Производят проверку чистоты культуры, как было указано выше. Определение видового состава делают по определителю Красильникова или Берджа.

Фиксаторы свободного азота

В водоемах из свободноживущих фиксаторов азота наиболее широко встречаются различные виды *Azotobacter* и *Clostridium*.

По морфологии азотобактер приближается к одноклеточным синезеленым водорослям. Слизистая капсула его зачастую удерживает клетки парами и четверками. В определенных условиях азотобактер образует цисты. Все виды азотобактера подвижны, перетрихи, не имеют фотосинтезирующих пигментов и тем отличаются от подорослей (табл. 3).

Основные виды рода *Azotobacter*

Вид	Морфология клеток в 24-часовой культуре	Вид колонии при росте на агаре с глюкозой
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Овальные, длиной 2 мкм.	Большие, слизистые, от темно-коричневых до черных.
<i>A. agilis</i>	Круглые, до 3.5 мкм в диаметре, одиночные или парамп.	Очень маленькие, желтоватые, выделяют зеленый флюоресцирующий пигмент.
<i>A. vinelandii</i>	Небольшие, овальные, длиной 1.5 мкм, одиночные или парамп.	Большие, слизистые, светло-коричневые, в некоторых случаях выделяют флюоресцирующий пигмент.
<i>A. indicum</i>	Овальные, парные, на концах клеток имеются окрашивающиеся тельца.	Большие, слизистые, кремового цвета, по краям слегка коричневые.
<i>A. beijerinckii</i> (синоним <i>Beijerinckia</i>)	Длинные, шириной 2 мкм, образуют цепочки.	Большие слизистые, чаще бесцветные.

Наличие слизи вокруг клеток азотобактера представляет большие трудности для выделения чистой культуры, так как в слизистой капсуле развиваются посторонние микроорганизмы.

Выделение чистой культуры *Azotobacter*

Получение культуры накопления. Минеральную питательную среду Деркса (№ 43) разливают в колбы по 80 мл и стерилизуют. Отдельно готовят стерильные 10%-е растворы глюкозы, сахарозы или рамнозы и добавляют асептически в минеральную среду, так чтобы конечная концентрация их равнялась 1%. Крахмал добавляют без стерилизации. Среду заражают 20 мл воды или 1 г ила.

Преимущественное развитие *Az. vinelandii* происходит на среде с рамнозой, *Az. chroococcum* на среде с крахмалом, а *Beijerinckia* на среде с сахаром при pH=5.0—6.0. Пересев на свежую среду делают сразу после появления роста в исходной культуре.

Выделение и проверку чистотой культуры производят путем массового посева на косой агар Эшби из отдельных колоний и последующего контроля и отбраковки загрязненных штаммов, как это было указано выше.

Посторонние организмы, преимущественно радиобактер, начинают развиваться примерно через 2 недели. После этого срока необходимо делать вторичную проверку чистоты культуры.

Выделение Clostridium

Выделение чистой культуры *Clostridium pasteurianum* представляет значительные затруднения при окончательной ее очистке от спутников *Bacterium clostridium*. При освобождении от этого организма прекращался и рост *C. pasteurianum* (Емцев, 1959). В связи с этим Емцев, разрабатывая методику выделения чистой культуры, получил положительные результаты лишь на среде оптимальной для развития *C. pasteurianum*.

Получение культуры накопления. Безазотистую среду Виноградского (№ 46) засевают в колбах Эрленмейера 1 г почвы или другого исследуемого материала и инкубируют в термостате при 25—28°. После начала развития клостридиум, которое наступает через 10—15 дней и становится заметным по образованию газа, осадок из колбы пастеризуют 15 мин. при 80° и высевают в среду Виноградского (№ 46), в которую добавлена смесь микроэлементов по Федорову (см. среду № 42) и 0.1—0.2 мл дрожжевого автолизата (среда № 15) на 1 л среды и 0.2% агар-агара. Надежным способом, сохраняющим активность накопительных культур *C. pasteurianum* в течение длительного времени, служат пересевы пастеризованной при 80° в течение 15 мин. бактериальной взвеси не чаще одного раза в месяц на вышеуказанную среду.

Выделение чистой культуры. Осадок со дна колбочки из культуры накопления пастеризуют 15 мин. при 80° и из ряда разведений высевают в чашки Петри. Взвесь заливают остуженной до 40—45° агаризованной питательной средой. 1 кг тщательно очищенного и отмытого картофеля заливают 2 л воды и кипятят 10 мин. Жидкость декантируют, фильтруют и доводят объем до 2 л, вносят питательные соли среды Виноградского (№ 46), 0.5% пептона, 4 мл дрожжевого автолизата и 1.5% агара.

Чашки помещают в анаэроустат, который после трехкратной откачки воздуха заполняют газовой смесью из азота и углекислоты. Инкубируют в течение 2—4 суток при 24—25°. В случае отсутствия анаэроустата агар с различными разведениями накопительной культуры затягивают в стерильные стеклянные трубочки, оттянутые концы которых запаивают на горелке. Отдельные колонии, выросшие в больших разведениях, переносят в высокие пробирки с полужидкой питательной средой Виноградского (готовится на картофельном отваре с добавкой 0.2% агар-агара, 0.5% пептона и 2 мл дрожжевого автолизата на 1 л среды).

После хорошего развития культуры на 14—21-й день осадок с разведениями высевают в чашки Петри на вышеприведенную среду, выросшие колонии вновь высевают в пробирки на полужидкую среду.

Такое выделение из одной колонии Емцев (1959) рекомендует производить 3—5 раз. Выгоднее сразу сделать высеv большого количества колоний на полужидкую среду, и отбраковать грязные культуры, пользуясь визуальным наблюдением и контролем препаратов из культур под микроскопом.

Чистоту культур проверяют при каждом пересеве посевом 0.5—1.0 мл на МПА и МБП высоким столбиком, на МБП — низким столбиком, на МБП+0.2% агар-агара, на среды Вильсона—Блера (№ 50) и Старки (№ 51) для сульфатредуцирующих бактерий. Отсутствие роста других бактерий указывает на чистоту культур. Судить о чистоте полученной культуры можно только на основании результатов многократной проверки на мясо-пептонных средах.

Поддержание культуры следует вести путем пересевов один раз в месяц пастеризованного материала на вышеуказанную полужидкую среду.

Выделение культур нитрификаторов

Получение чистых культур *Nitrosomonas* представляет значительные трудности ввиду того, что трудно избавиться от их спутников, а сама чистая культура зачастую через несколько пересевов теряет свою активность. Различные авторы по-разному старались получить чистую культуру нитрозомонас и нитробактер.

Наиболее удачный способ выделения культуры *Nitrosomonas* предложен Е. Л. Рубан (1961), который может быть применен и для *Nitrobacter*, если для выделения культуры пользоваться средами № 31 и 35.

Получение культуры накопления. Жидкую питательную среду Виноградского (№ 31 или 32), разведенную в 10 раз, заражают исследуемой водой в объеме не менее 10 мл, иловыми отложениями или другим материалом, где предполагается наличие данного организма, и инкубируют при 20—25°. Развитие нитрифицирующих бактерий наблюдается через 2—3 недели и определяется по появлению нитратов и исчезновению аммиака. Питательная среда остается прозрачной, а нитрифицирующие бактерии преимущественно сосредоточены в осадке на кристаллах углекислого кальция или фосфорно-аммонийно-магнезиальной соли.

Выделение чистой культуры. Из нескольких первичных культур накопления производят ряд последовательных пересевов на среду № 31, разведенную в 10 раз, или на среду № 32. Из полученных культур отбирают те, где процесс нитрификации идет наиболее активно.

Выделение чистой культуры лучше всего делать капельным методом. Принцип этого метода заключается в том, что при незна-

чительном количестве клеток в жидкости следует наносить на покровное стекло такие мелкие капельки, что они будут содержать только одну клетку. Для этой цели удобнее всего применять микропипетку Комаровой (1949). При помощи микропипетки, если у нее отшлифовать конец, можно наносить капли меньше 0.01 мл.

Перед началом выделения культуры необходимо растворить осадок углекислого кальция, на котором находится в прикрепленном состоянии основная масса жизнедеятельных клеток *Nitrosomonas*.

Легче всего это сделать, пропуская 20 мин. ток углекислоты, предварительно пропущенной через стерильный раствор бикарбоната натрия. Из такого прозрачного раствора делают ряд разведений и подбирают такое, чтобы в микрокапле диаметром 0.2 мм, наносимой пипеткой Комаровой, находилась примерно одна бактерия.

При помощи стерильной микропипетки наносят капли на стерильные осколки покровных стекол, лежащие в стерильной чашке Петри. Далее осколки стерильным пинцетом переносят в колбы Эрленмейера со стерильной средой Виноградского. Опыт Е. Л. Рубан показал, что при заражении 250 колб в дальнейшем нитриты были обнаружены в 22 культурах, из них 18 культур содержали посторонние микроорганизмы и 4 культуры *Nitrosomonas* были чистыми.

Проверка чистоты культуры. После долговременных и многократных пересевов накопительных культур *Nitrosomonas* банальные формы загрязняющих микроорганизмов отсеиваются и в культурах устанавливается устойчивая ассоциация нитрофикаторов и олигокарбофилов обычно из родов *Mycobacterium*, *Pseudomonas* или *Sorangium*.

Некоторые виды этих организмов совсем не развиваются на мясо-пептонных средах.

Первоначально культуру следует подвергнуть тщательному микроскопическому контролю. Затем проверку чистоты культуры следует делать на следующих средах: МПА, МБП, картофельном агаре, картофельной крошке, жидком сусле, сусло-агаре с мелом и без мела, крахмало-аммиачном агаре, среде Гетчинсона для целлюлозоразлагающих бактерий, среде Каляненко с лимоннокислым кальцием и агаре Эшби (Рубан, 1955) и среде № 100.

Отсутствие роста на этих средах указывает на чистоту культуры *Nitrosomonas*. Культуры легко загрязняются, поэтому проверку чистоты следует делать периодически.

Хранение культур. Чистые культуры *Nitrosomonas* часто вскоре после выделения начинают терять свою активность, причем интенсивность процесса нитрификации в них снижается иногда в 10—15 раз по сравнению с накопительной культурой.

Многочисленные опыты по внесению в культуру микроэлементов, витаминов и т. п. показали, что коренного улучшения роста чистой культуры таким образом достигнуть не удается.

Для длительного сохранения чистых культур *Nitrosomonas* Е. Л. Рубан рекомендует хранить их на жидкой питательной среде № 31, разбавленной в 10 раз, делать пересевы большим количеством посевного материала не реже чем через 10 дней и в большом числе повторностей. При этом часть культур гибнет. Однако активность оставшихся культур постепенно возрастает и по скорости нитрификации не уступает накопительным. По-видимому, происходит приспособление некоторых культур к развитию в лабораторных условиях, возникают расы с высокой активностью. Выделение чистой культуры *Nitrobacter* производится так же, как и *Nitrosomonas*, но в качестве питательной среды используется среда № 35.

8. ВЫДЕЛЕНИЕ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В КРУГОВОРОТЕ СЕРЫ

Выделение сульфатредуцирующих бактерий

Постгейт и Кемпбелл (Postgate, Campbell, 1966) делят все сульфатредуцирующие бактерии на основании способности к спорообразованию на 2 рода: спорообразующие (*Desulfotomaculum*) — *D. nigrificans* (синоним *Clostridium nigrificans*), *D. orientis* (синоним *Desulfovibrio orientis*) и *D. ruminis* и не спорообразующие (*Desulfovibrio*) — *D. desulfuricans* (синоним рода по Бейеринку *Spirillum*, по Мигуле — *Microspira*, по Баарсу — *Vibrio*, по Старки — *Sporovibrio*) с вариантами *D. desulfuricans* var. *aestuarii* — галофильный вид, который возможно адаптировать к пресной воде, *D. desulfuricans* var. *azotovorans*, способный усваивать газообразный азот, *D. vulgaris*, *D. salexigenes* (синоним *Microspira aestuarii*) — облигатный галофил, развивающийся при содержании в среде 2.5—5% хлористого кальция, *D. gigas* — спирилла, *D. africanus* — длинная изогнутая палочка (лофотрих), может развиваться при значительном содержании соли в культуре.

Упрощенный ключ Постгейта и Кемпбелла для классификации сульфатредуцирующих бактерий приведен в табл. 4.

Получение культуры накопления. Для получения культуры накопления Постгейт (Postgate, 1965, 1966) рекомендует использовать питательную среду (среда Постгейта «В» № 55) с осадком, подобную среде Баарса, так как первое развитие этих бактерий обычно наблюдается в осадке. По мнению этого автора, среда должна сразу иметь низкий $O = V$ потенциал, который в самом начале создается добавлением восстановителя,

Систематика сульфатредуцирующих бактерий
(по: Postgate, Campbell, 1966)

Т а б л и ц а 4

Вид	Форма клетки	Жгуты	Спорообразование	Тип цитохрома	Десульфирование	Гуанин + цитозин в ДНК, %
Desulfotomaculum						
<i>nigrificans</i> . .	Палочка	Перитрих	+	В	—	44.7
<i>orientis</i>	Искривленная палочка	»	+	В	—	41.7
<i>ruminis</i>	Палочка	»	+	В	—	45.6
Desulfovibrio						
<i>desulfuricans</i> . .	Вибрион	Один полярный	—	C ₃	+	53.3
<i>vulgaris</i>	»	То же	—	C ₃	+	61.2
<i>saxezigenes</i> . . .	»	» »	—	C ₃	+	46.1
<i>africanus</i>	Изогнутая палочка	Лофотрих	—	C ₃	+	61.2
<i>gigas</i>	Спирилла	»	—	C ₃	+	60.2

Т а б л и ц а 4 (продолжение)

Вид	Рост					Галофилия	Устойчивость к хлориду, мг/л	Термофилия
	пируваты без SO ₄	холоди без SO ₄	малаты с SO ₄	фумараты с SO ₄	ацетаты с SO ₄			
Desulfotomaculum								
<i>nigrificans</i> . .	+	Нет данных	Нет данных	—	—	—	0.25	+
<i>orientis</i>	—	То же	То же	—	—	—	0.25	—
<i>ruminis</i>	+	» »	» »	+	—	—	1	—
Desulfovibrio								
<i>desulfuricans</i> . .	+	+	+	Нет данных	—	—	10—25	—
<i>vulgaris</i>	—	—	—	То же	—	—	2.5	—
<i>saxezigenes</i> . . .	—	—	+	» »	—	+	1000	—
<i>africanus</i>	—	—	+	» »	—	—	2.5	—
<i>gigas</i>	—	—	—	» »	—	+	2.5	—

например сульфида натрия в концентрации 1 мМ. Другим хорошим восстановителем служит смесь тиогликолата в концентрации 1 мМ и аскорбиновокислого натрия в той же концентрации. Оптимальное значение кислотности среды $pH=7.5$. Соленость среды создается близкой к той, которая имеется в природных условиях, откуда выделяют бактерий.

Культуры накопления лучше всего ставить в склянках на 30—60 мл со стеклянными пробками, которые смазываются перед автоклавированием силиконовой смазкой. Склянка наполняется средой, так чтобы после заражения под пробкой не оставалось пузырьков воздуха. Накопление в среде более 30 мг сероводорода показывает на наличие процесса сульфатредукции.

Для получения определенных видов сульфатредуцирующих бактерий Постгейт рекомендует следующие условия постановки культур накопления.

Desulfovibrio desulfuricans. Используется среда Баарса (№ 52) или Постгейта (№ 55), инкубация при 30°, О=В потенциал снижается путем добавления 1 мМ сульфида натрия. 60 мл питательной среды заражают 1 г или 1 мл пробы. Среду микроскопируют, когда она почернеет и помутнеет.

Desulfovibrio aestuarii. Эту разновидность выделяют на той же среде с добавкой 2.5% хлористого натрия.

Desulfotomaculum orientis. Эти бактерии относятся к спорообразующим мезофилам. Используют среду Баарса (№ 52) с добавлением тиогликолата до концентрации 1 мМ для снижения О=В потенциала, а посевной материал предварительно прогревают 10 мин. при 100°, чтобы избавиться от неспоровых видов. Спорообразующие виды растут медленнее неспоровых и нуждаются в факторах роста.

Desulfotomaculum nigrificans. Используется среда Баарса (№ 52) или Постгейта (№ 55) с добавкой сульфида натрия или тиогликолата до концентрации 1 мМ. Инкубируют культуры при 55°.

Desulfovibrio gigas. Избирательных условий для культуры накопления не описано. Поскольку организм более аэробный, то для получения культуры накопления также используют среду Баарса (№ 52), но для снижения О=В потенциала добавляют более слабый восстановитель в виде 5%-го аскорбиновокислого натрия до концентрации 0.01%. Соль эту стерилизуют отдельно в ампулах, из которых выкачан воздух.

Выделение чистой культуры. Приготавливают среду Постгейта (№ 55), в которую вносят следующие добавления (Postgate, 1965): 0.01% аскорбинового натрия, 0.01% тиогликолата натрия, 0.1% дрожжевого автолизата, 1.0% агар-агара.

Среда для выделения чистой культуры (достаточно 25 мл) используется свежая и только один раз. После автоклавирования

устанавливают $\text{pH} = 7.5$, среду распределяют примерно по 4 мл в 6 стерильных пробирок (15×1 см) и держат при 40° . Уровень агар в трубках должен быть одинаковым. Далее окунают запаивающую фламбированную на пламени пастеровскую пипетку в культуру накопления и опускают ее последовательно в пробирки от первой до шестой. Агару дают застыть или после тщательного перемешивания засасывают его из пробирок в стерильные стеклянные трубки диаметром 3—5 мм. После затвердевания агара концы трубок запаивают или замазывают менделеевской замазкой. Затем культуру инкубируют при 30° или при 55° на воздухе в зависимости от того, какой вид бактерий необходимо выделить. Через 4 или 5 дней в одной—двух пробирках можно обнаружить четкие черные колонии. Это и будут колонии сульфатредуцирующих бактерий, на остальные не следует обращать внимания. Пробирку или трубку, в которой образовались 3—4 черных колоний, в соответствующем месте разбивают и тонкой пастеровской пипеткой отбирают 2—3 колонии. Каждую колонию растирают в капле воды и микроскопируют. Если колония окажется чистой, то ею заражают питательную среду со сниженным потенциалом и после развития проверяют чистоту культуры. Чтобы избавиться от спутников, делают ряд последовательных пересевов, когда в трубке вырастает одна-две колонии сульфатвосстанавливающих бактерий. Дополнительное очищение производят путем пересевов на среду Постгейта (№ 55) с различными добавками хлористого натрия. Многие штаммы сульфатредуцирующих бактерий приспособлены к широкому диапазону соленостей (от 0.5 до 6%), а спутники этим свойством не обладают. Для освобождения от аэробных спутников следует брать среду сильно восстановленную, где восстановителем служат аскорбиновокислый натрий с тиогликолатом или аскорбат натрия с сульфидом натрия.

Большие трудности возникают, когда в культуре накопления одновременно присутствуют два разных вида сульфатредуцирующих бактерий. В этом случае, как было указано выше, необходимо варьировать в питательной среде соленость, температуру инкубации и прогрев посевного материала.

Проверка чистоты культуры. Чтобы проверить культуру на отсутствие аэробов производят посев на глюкозопептонную среду в аэробных условиях. Для проверки на отсутствие анаэробов поступают следующим образом. Делают посев на среду, содержащую 0.4% пептона, 1% глюкозы, 0.2% сервокислого натрия, 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5% агар-агара и добавляют 0.05% стерильного $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Доводят pH до 7.0—7.6. Среду разливают по пробиркам, охлаждают до 40° и делают в ряде пробирок разведения, погружая последовательно фламбированную на пламени запаивающую пастеровскую пипетку из одной пробирки в другую, и дают застыть. Эта среда хороша при выявлении заражения культурами пастерофильных анаэробов. Появление раз-

рывов агара или колоний светлых либо коричневых, но не черных, указывает на наличие постороннего заражения.

15 лет тому назад получение чистой культуры сульфатредуцирующих бактерий представляло большие затруднения. Использование питательных сред, в которых сразу (до посева) снижается $O=В$ потенциал, облегчило процедуру получения чистых культур.

Отсутствие роста на вышеприведенных средах указывает на чистоту культуры сульфатредуцирующих бактерий.

Выделение тионовых бактерий

Тионовые бактерии представляют собой небольшие, грам-отрицательные палочки, зачастую подвижные за счет одного полярного жгутика. Они получают энергию за счет окисления восстановленных соединений серы (в основном молекулярной) или тиосульфатов. Окисление сульфидов и тиосульфатов у большинства видов происходит через молекулярную среду до сульфатов, а у некоторых — только до тетратионатов. Одни виды растут в щелочных, а другие — в кислых условиях. Тионовые бактерии — микроаэрофилы, но некоторые способны развиваться в анаэробных условиях в присутствии нитратов. Более подробное описание тионовых бактерий приводят Каравайко, Кузнецов и Голомзик (1972).

КЛЮЧ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДОВ РОДА *THIOBACILLUS*

1. Тиосульфат окисляет с увеличением кислотности среды.
 - А. Тетратионат в качестве промежуточного продукта не образует.
 1. Строгий автотроф.
 - а. Аэроб.
 - б. Соли закисного железа не окисляет.
 - в. Тиоционат не окисляет *Th. thioparus*.
 - вв. Тиоционат окисляет *Th. thiocyanoxidans*.
 - бб. Соли закисного железа окисляет *Th. ferrooxidans*.
 - аа. Факультативный анаэроб, без кислорода растет в присутствии нитратов, используя аммиачные соли *Th. denitrificans* (Baalsrud).
 - ааа. Строгий анаэроб, растет в присутствии нитратов *Th. denitrificans* (Lieske).
 2. Факультативный автотроф.
 - а. Аэроб.
 - б. Свободную серу не окисляет *Th. novellus*.
 - бб. Окисляет свободную серу до сульфатов *Th. coproliticus*, *Th. intermedius*, *Th. perometabolis*.
 - ббб. В анаэробных условиях с KNO_3 развивается как гетеротроф на органических средах *Thiobacillus* A 2.
 - аа. Факультативный анаэроб, растет в присутствии нитратов *Th. denitrificans* (Beijerinck).
 - Б. Тетратионаты, как промежуточный продукт, образует.

1. Подкисляет среду до $\text{pH}=3.0$ *Th. neapolitanus*.
2. Подкисляет среду до $\text{pH}=1$ или ниже.
 - а. Нитраты усваивает *Th. concretivorius*.
 - аа. Нитраты не усваивает *Th. thiooxidans*.
- II. Тиосульфаты окисляет с подщелачиванием среды. *Th. trautweinii*.

Выделение *Thiobacillus thioparus*

Получение культуры накопления. Накопительную культуру *Th. thioparus* получают путем заражения среды Бейеринка для тионовых бактерий (№ 63) при $\text{pH}=8.5-9$ небольшим количеством ила или воды из меромиктических олиготрофных озер с наличием сероводорода в хемолимнионе. При наличии тионовых бактерий в посевном материале среда мутнеет через 2—4 дня, и на ее поверхности появляется пленка молекулярной серы, которая образуется при окислении тиосульфата.

Выделение чистой культуры. Из обогащенной культуры, полученной путем нескольких последовательных пересевов пленки в свежие порции стерильной среды, производят высев с разведениями на агаризованную среду того же состава. Через 3—5 дней на агаровых пластинках появляются мелкие колонии (1—1.5 мм в диаметре), белые от отложившейся серы. Из выросших на твердой среде колоний делают массовый отсев (в количестве 80—100 шт.) в пробирки со скошенным агаром. В каждую пробирку вносят 2—3 мл стерильной жидкой питательной среды этого же состава, после того как в пробирках будет наблюдаться рост по штриху. Появление пленки серы на поверхности жидкости в пробирках указывает на хороший рост *Th. thioparus*. Содержимое этих пробирок переносят стерильной пипеткой в колбы с жидкой средой и сразу же производят проверку на чистоту культуры путем высева на МПА и картофельный агар, так как именно на этих средах хорошо растут сопутствующие микроорганизмы.

Этот способ дает возможность сразу отбраковать грязные культуры и выбрать активные штаммы.

Проверка чистоты культуры. При окончательной проверке на чистоту производят высев на МПА, МПБ, СПБ с глюкозой, сусло с мелом, сусло-агар, на картофельный агар, картофельную крошку, ломтики картофеля, на среды Виноградского для нитрификаторов (№ 31 или 35), среду Ваксмана для *Th. thiooxidans* (№ 67), Бейеринка (№ 63) без гипосульфата, но с добавкой 1% различных органических соединений, таких как глюкоза, лактат кальция, щавелевокислый, уксуснокислый или муравьинокислый натрий. В случае чистой культуры *Th. thioparus* рост на этих средах отсутствует. При высева 100 колоний с агаровых пластинок на скошенный агар по вышеуказанному методу удается сразу получить 2—3 активные чистые куль-

туры *Th. thioparus*. Чистую культуру следует поддерживать на жидкой питательной среде, причем нужно делать пересевы не позднее, как через 7—10 дней 1 мл инокулята. При таких условиях культивирования *Th. thioparus* не теряет своей активности.

Выделение *Thiobacillus thiooxidans*

Получение культуры накопления. Жидкую питательную среду Ваксмана с серой (№ 67, А) заражают образцами воды или ила из кислых озер, или другим субстратом, где предполагается наличие данного организма, и инкубируют при 25—28°. Через 7—10 дней в среде появляется легкая муть, а микроскопический контроль показывает наличие бактерий.

Из первичной культуры накопления, которая, кроме *Th. thiooxidans*, часто содержит значительное количество плесневых грибов, производят 2—3 последовательных пересева для получения обогащенной культуры.

Выделение чистой культуры. Из молодой культуры накопления, по возможности чистой от плесневых грибов, делают посев на подкисленную твердую среду Ваксмана с гипосульфитом (№ 67). По прошествии 5—10 дней на поверхности агаровых пластинок образуются очень мелкие колонии *Th. thiooxidans*.

Для получения чистой культуры из колоний, выросших на твердой среде, производят массовый посев в 50—100 пробирок на жидкую среду Ваксмана с серой (№ 67). Начало развития определяют по снижению реакции среды до $\text{pH} = 1.0\text{--}2.0$, по легкому помутнению среды и микроскопически по наличию бактерий.

Одновременно отбраковывают загрязненные культуры путем высева на МПА, картофельный агар и сусло-агар, так как именно на этих средах хорошо растут сопутствующие микроорганизмы.

Проверка чистоты культуры. Окончательную проверку чистоты культуры производят путем микроскопического контроля и высева на МПА, МПБ, МПБ с глюкозой, сусло с мелом, сусло-агар, на картофельную крошку, ломтики картофеля, среду Виноградского для нитрификаторов (№ 31), Бейеринка для *Th. thioparus*, (№ 63), Баалсруда для *Th. denitrificans* (№ 62) и Бейеринка без гипосульфита, но с добавкой 1% глюкозы или молочнокислого кальция, или натриевых солей щавелевой, уксусной или муравьиной кислот. Отсутствие роста на этих средах указывает на чистоту культуры.

Чистую культуру поддерживают на жидкой среде Ваксмана. Пересевы следует делать из культуры большим количеством посевного материала не реже чем через 2—3 недели.

Выделение *Thiobacillus ferrooxidans*

Получение культуры накопления. Культуру накопления *Th. ferrooxidans* получают путем заражения питательной среды Летена (№ 76) железистыми осадками или кислыми водами из угольных шахт, или из месторождений полиметаллических сульфидных руд. Начало развития определяют по появлению в питательной среде осадка гидрата окиси железа.

Из обогащенной культуры, полученной путем нескольких последовательных пресевов 1 мл жидкости вместе с осадком, производят высев с разведениями на агаризованную среду того же состава.

Для того чтобы предохранить агар-агар от гидролиза при стерилизации питательной среды, подкисленный раствор соли Мора стерилизуют отдельно и добавляют в агар перед внесением посевного материала. Активная реакция питательного агара также устанавливается после стерилизации среды.

Выделение чистой культуры. Через неделю на агаровых пластинках появляются очень мелкие колонии, видимые лишь под бинокулярным микроскопом и окруженные бурым железистым ореолом.

Из 80—100 колоний, выросших на твердой среде, делают массовый отсев в небольшие объемы (4—6 мл) жидкой питательной среды Летена (№ 76). Удобнее всего эти посевы выращивать в пенициллиновых баночках объемом в 10 мл. Появление желтого осадка и подкисление питательной среды указывают на начало развития.

Через неделю из тех склянок, где началось развитие, производят пересев большим объемом жидкости в колбы Эрленмейера с 50 мл среды Летена (№ 76) или Сильвермана (№ 75) и одновременно ведут проверку чистоты культуры микроскопически и посевом на МПА, сусло- и крахмало-аммиачный агар, так как культуры чаще всего бывают загрязнены плесневыми грибами.

Проверка чистоты культуры. После предварительной отбраковки производят окончательную проверку жидких культур, развившихся в колбах Эрленмейера, путем высева на МПА, МПБ, на среду Виноградского для нитрификаторов (№ 31), Эшби (№ 41), на картофельный агар, крахмало-аммиачный агар, картофельную крошку, сусло, сусло-агар, на среду Гетчинсона (№ 93) для аэробных клетчатку разрушающих бактерий, а также на среду Летена без соли Мора (№ 76), но с добавкой 1% глюкозы или солей органических кислот. По отсутствию роста на этих средах судят о чистоте культуры.

Методы культивирования серобактерий

Бесцветные серобактерии

Для бесцветных серобактерий практически селективных сред не существует, их почти никто не выделял в чистой культуре. Обычно культуры накопления получают методом, который был описан еще Виноградским. Теоретически селективной средой для них должна быть среда, находящаяся в микроаэрофильных условиях и содержащая свободную углекислоту и сероводород. На практике такие условия создать трудно, так как при нейтральной реакции углекислота вытесняет сероводород из раствора.

Различные виды этих бактерий очень чувствительны к изменениям оптимальных для них концентраций свободного сероводорода. Постгейт (Postgate, 1959) указывает, что хорошей иллюстрацией этого положения является поведение *Thiovulum*, который передвигается в тот слой жидкости, где концентрация сероводорода для него оптимальна.

**Общность строения синезеленых водорослей,
нефотосинтезирующих серобактерий
и гетеротрофных ползающих бактерий**

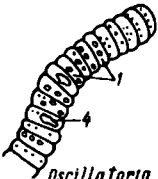
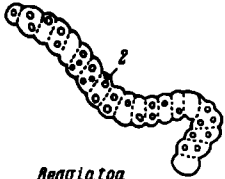

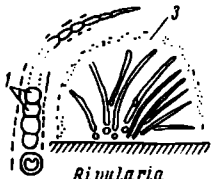
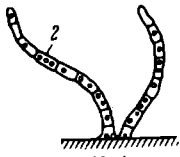
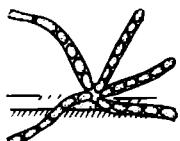
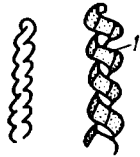



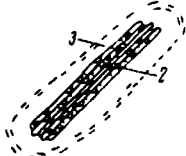
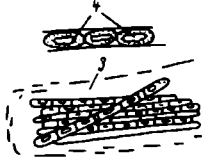
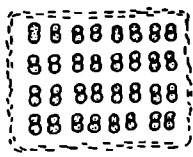
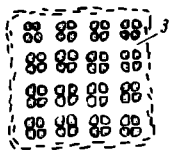
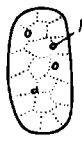
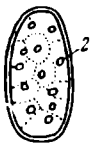
Общность плана строения и характера движения дают основание предполагать наличие связи между синезелеными водорослями и группой бесцветных серобактерий. Особенно бросается в глаза сходство между *Oscillatoria*, *Beggiatoa* и *Vitreoscilla*. Они передвигаются путем скольжения по твердой поверхности, трихомы у них одинаковой толщины, источником энергии у *Oscillatoria* служит фотосинтез, у *Beggiatoa* — хемосинтез (окисление восстановленных соединений серы), а *Vitreoscilla* питается готовыми органическими веществами.

Как видно из рис. 11, ряд подобных сходных организмов среди синезеленых водорослей, бесцветных серобактерий и гетеротрофных бактерий может быть продолжен вплоть до одноклеточных форм. В озерах *Beggiatoa* и *Thiothrix* встречаются в поверхностном слое ила (Collins, 1969) на больших глубинах, где содержание кислорода в придонном слое воды не превышает 0.15–0.3 мг O_2 /л.

Для получения культуры накопления образец ила первоначально необходимо промикроскопировать. Для этого каплю по-

Рис. 11. Сопоставление синезеленых водорослей и родственных нефотосинтезирующих бактерий.

I — фототрофные синезеленые водоросли; II — бесцветные серобактерии; III — бактерии, окисляющие органические соединения. А — клетки одинаковой толщины соединены в ползающие трихомы; Б — трихомы построены спирально; В — трихомы сиручены штопорообразно; Г — пачки трихом лежат в слизистом чехле; Д — коинковидные клетки объединены в таблички; Е — единичные клетки. 1 — актопласты; 2 — капли серы; 3 — слизь; 4 — газовые вавуоли.

	I	II	III
A	 <p><i>Oscillatoria</i></p>	 <p><i>Beggiatoa</i></p>	 <p><i>Vitreoscilla</i></p>
B	 <p><i>Rivularia</i></p>	 <p><i>Thiobacillus</i></p>	 <p><i>Leucothrix</i></p>
B	 <p><i>Spirulina</i></p>	 <p><i>Thiospirillum</i></p>	 <p><i>Saprospira</i></p>
F	 <p><i>Microcoleus</i></p>	 <p><i>Thioploca</i></p>	 <p><i>Peloploca</i></p>
A	 <p><i>Merismopedia</i></p>		 <p><i>Lamprospira</i></p>
E	 <p><i>Synechococcus</i></p>	 <p><i>Achromatium</i></p>	

верхностного ила при помощи пипетки помещают на предметное стекло, покрывают покровным и просматривают с объективом $\times 10$ или под фазово-контрастным устройством с объективом $\times 25$. *Beggiatoa* легко отличить по характерным морфологическим особенностям.

Существенное значение для успешного получения культуры накопления имеет слабое поступление в культуру сероводорода и небольшая концентрация кислорода в прилежащих слоях воды.

Для получения культуры накопления в цилиндр помещают из стратометра, не нарушая структуры, поверхностный слой ила и заливают его при помощи сифона придонной водой (Collins, 1969). Через поверхностный слой воды в цилиндр пропускают несколько пузырьков воздуха. Затем заполненный до верха цилиндр ставят при температуре $11-12^{\circ}$, которая соответствует температуре придонных слоев в озере.

Большинство организмов этой группы начинает развиваться в поверхностном слое ила и прилежащем к нему слое воды.

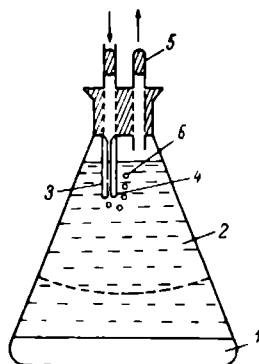


Рис. 12. Сосуд для стационарного культивирования *Thiovulum* sp.

1 — слой агара, содержащего сульфид; 2 — озерная вода; 3 — трубка для принудительной аэрации; 4 — капилляр; 5 — ватная пробка; 6 — пузырьки воздуха. Пунктирная линия — зона развития *Thiovulum* sp.

Медленная генерация сероводорода, поступление его из ила в цилиндре и слабая диффузия кислорода из поверхностных слоев воды создают благоприятные условия для развития *Beggiatoa*, *Thioploca*, *Thiothrix* и *Achromatium* (рис. 11). Таким образом удается поддерживать культуру накопления в течение 6—8 недель.

Как указывает Коллинс (Collins, 1969), следующая стадия — получение чистой культуры, гораздо труднее. Буртон и Морита (Burton, Morita, 1964) получали гетеротрофные штаммы *Beggiatoa* на средах с дрожжевым отваром и солями уксусной кислоты или пептоном.

Поскольку одним из обязательных условий для развития бесцветных серобактерий служит наличие различных градиентов сероводорода и кислорода, то для получения накопительных культур *Thiovulum*, *Thiospira*, *Achromatium* и *Beggiatoa* Ривьер (Rivier, 1963) предлагает следующую установку.

В стерильную колбу Эрленмейера объемом 500 мл наливают 250 мл агаризированной (2% агара) минеральной среды с добавкой 0.02% сероводорода в виде сульфида натрия и 0.01% углекислого натрия. Последние два инградента добавляют после самой стерилизации. После застывания агара колбу заполняют

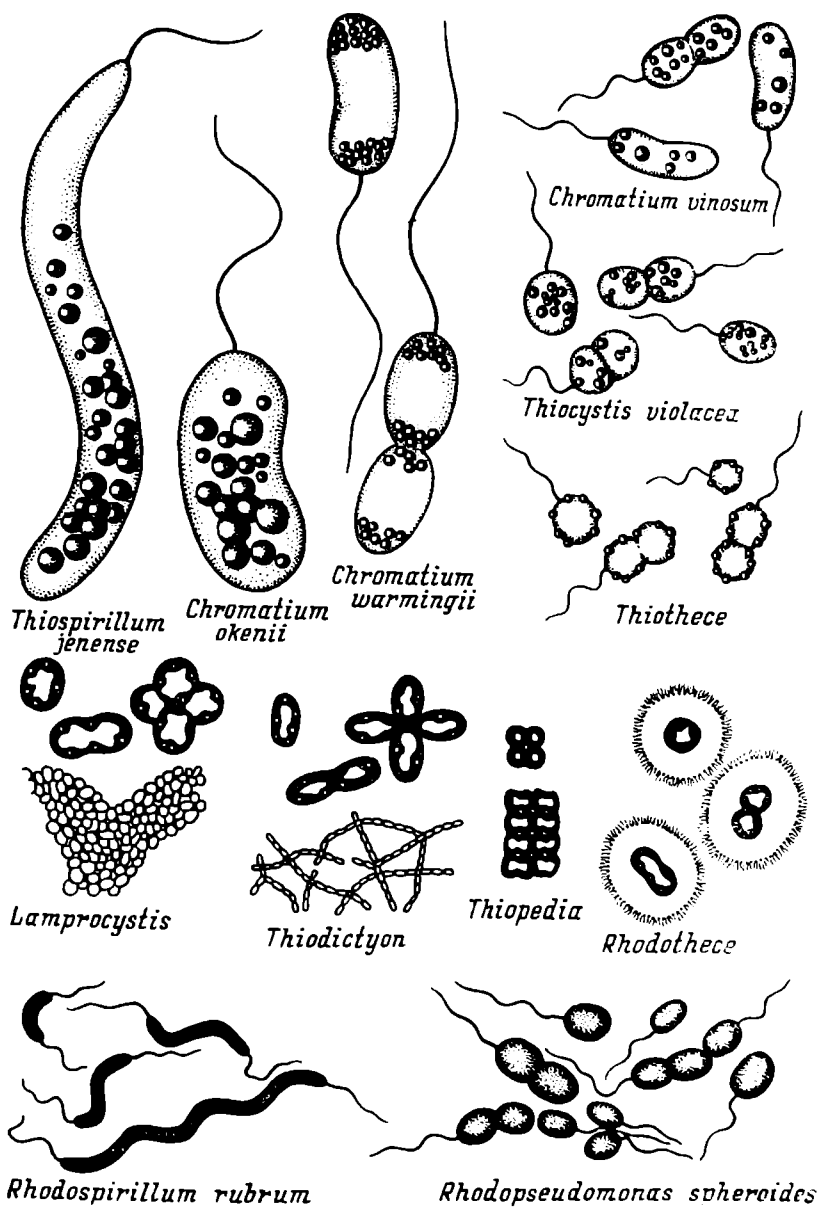


Рис. 13. Основные представители фотосинтезирующих пурпурных серных (*Thiorhodaceae*) и несерных (*Athiorhodaceae*) бактерий.

озерной водой почти до пробки из зоны соприкосновения сероводорода и кислорода и, если нужно, заражают образцом из поверхностного слоя ила. В верхнем слое вода аэрируется пропусканием мелких пузырьков воздуха через пастеровскую пилетку, укрепленную в резиновой пробке, вставленной в горло колбы.

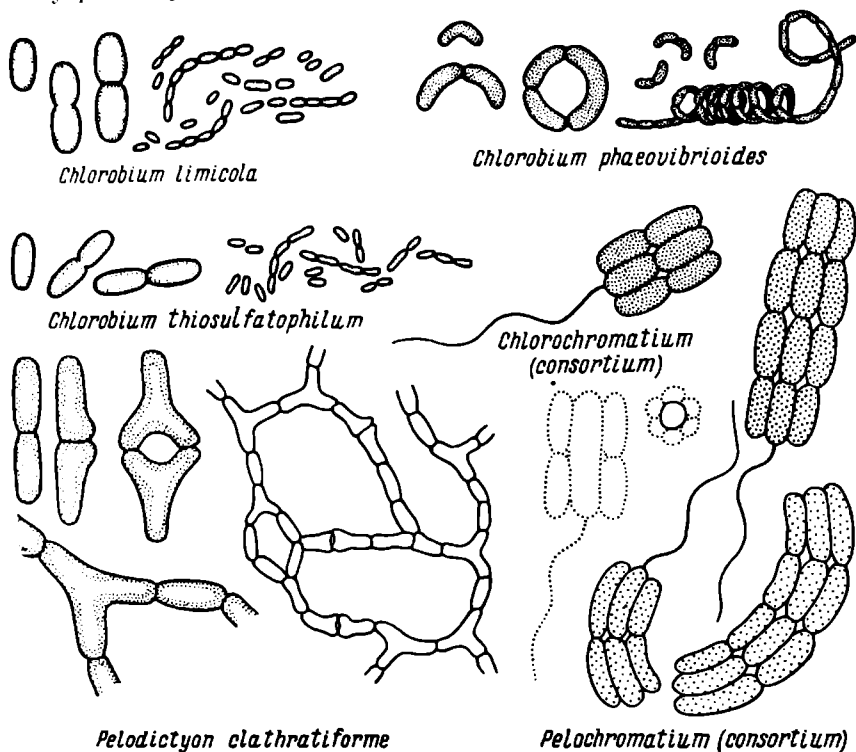


Рис. 14. Основные представители фотосинтезирующих зеленых и коричневых серобактерий (*Chlorobiaceae*).

Воздух выходит через вторую стеклянную трубочку в той же пробке. Таким образом в воде над слоем агаризированной среды создаются градиенты сероводорода и кислорода (рис. 12).

Колбу инкубируют при 10—15° и в верхней зоне создается постоянная аэрация воздухом, который пропускают через ватный фильтр. Развитие серобактерий происходит в зоне наиболее благоприятной аэрации для отдельных видов. Очистку культуры накопления производят путем пересева в подобную установку из зоны массового развития.

Фотосинтезирующие бактерии

Фотосинтезирующие бактерии обладают красными, коричневыми каротиноидами и зеленым пигментом, относящимся к бактериохлорофиллу *a*, *b*, *c* или *d*, отличными от хлорофилла зеленых растений. В качестве донаторов водорода при фотосинтезе они используют сероводород, или водород, или другие восстановленные соединения серы, или некоторые органические вещества. Все они могут размножаться в строго анаэробных условиях только на свету. Некоторые представители серных пурпурных бактерий могут развиваться в темноте в присутствии кислорода. В процессе фотосинтеза при использовании в качестве донаторов водорода восстановленных соединений серы эти виды выделяют молекулярную серу в виде глобул внутри или вне клетки.

Отдельные виды хорошо различаются по морфологическим признакам и характеру фотосинтезирующих пигментов (рис. 13 и 14).

КРАТКИЙ КЛЮЧ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕМЕЙСТВ И ОСНОВНЫХ РОДОВ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ СЕРОБАКТЕРИЙ

Клетки содержат бактериохлорофилл и способны к развитию в анаэробных условиях как фотолитотрофы или фотоорганотрофы.

I. Клетки содержат бактериохлорофилл *a* или *b* и различные каротиноиды, фотопигменты локализованы на различных типах мембранных систем, связанных с цитоплазматической мембраной *Rhodobacteriineae*.

A. Клетки способны использовать некоторые органические вещества как донаторы водорода при фотосинтезе

. *Rhodospirillaceae* (= *Athiorhodaceae*).

а. Клетки спиралевидные *Rhodospirillum*.

aa. Клетки палочковидные или сферические, нитей не образуют *Rhodopseudomonas*.

aaa. Клетки яйцевидные или яйцевидно-удлиненные, образуют гифы *Rhodomicrobium*.

B. Клетки способны использовать сульфиды как единственные донаторы электронов при фотосинтезе *Chromatiaceae* (= *Thiorhodaceae*).

1. Капельки серы появляются вне клетки. *Ectothiorhodospira*.

2. Капельки серы при росте на среде с сульфидом появляются внутри клетки.

а. Клетки не содержат газовых вакуолей.

б. Клетки подвижны за счет полярного жгутика.

в. Клетки ясно спиралевидные *Thiospirillum*.

vv. Клетки яйцевидные или палочковидные

. *Chromatium*.

vvv. Клетки сферические, часто диплококки

. *Thiocystis*.

vvvv. Клетки от сферических до яйцевидных сгруппированы в пакеты, как сарцины *Thiosarcina*.

бб. Клетки неподвижны, сферические, перед делением в виде диплококков, отдельные клетки часто окружены толстым слоем слизи *Thiocapsa*.

- aa. Клетки с газовыми вакуолями.
 - г. Клетки подвижны, имеют полярный жгутик, сферические, перед делением в виде диплококков *Lamprocystis*.
 - гг. Клетки неподвижны.
 - д. Клетки в виде палочек *Thiodictyon*.
 - дд. Клетки от сферических до яйцевидных соединены в правильные плоские пластинки *Thiopedia*.
 - ддд. Клетки сферические . . . *Aetobacter* . . . (= *Rhodotheca*).
 - II. Клетки содержат бактериохлорофилл с *a* и *d* как основные компоненты фотосинтезирующих пигментов, которые локализованы в хлоробиум-везикулах, прилегающих к цитоплазматической мембране. Не способны использовать органическое вещество *Chlorobiaceae*.
 - 1. Бактерии свободноживущие, не связаны близко с другими организмами.
 - а. Клетки не содержат газовых вакуолей, неподвижны.
 - б. Форма клеток от яйцевидных до палочкообразных или вибрионных *Chlorobium*.
 - в. Культуры зеленые.
 - г. Клетки в виде палочек . . . *Chlorobium limicola*.
 - гг. Клетки в виде вибрионов . . . *Ch. vibrioforme*.
 - ав. Культуры коричневые.
 - д. Клетки в виде палочек *Ch. phaeobacteroides*.
 - дд. Клетки в виде вибрионов *Ch. phaeovibrioides*.
 - бб. Форма клеток непостоянна, от сферической до звездообразной, покрыты выростами *Prosthecochloris aestuarii*.
 - aa. Клетки с газовыми вакуолями, неподвижны.
 - б. Форма клеток от палочковидных, часто изогнутых, до яйцевидных; могут быть соединены в характерные скопления *Pelodictyon*.
 - в. Культуры зеленые.
 - г. Колонии в виде сетки *P. clathratiforme*.
 - гг. Колонии плоские в виде агрегатов *P. luteolum* (= *P. aggregatum*).
 - ав. Культуры коричневые *P. phaeum*.
 - бб. Колонии плоские в виде агрегатов.
 - в. Форма клеток сферическая до яйцевидной, обычно образуют скопления из единичных или множественных цепочек *Clathrochloris sulfurica*.
 - вв. Форма клеток звездообразная *Ancalochloris perfratilis*.
2. Бактерии живут в консорциях с другими микроорганизмами.
 - а. Клетки симбионтов сидят непосредственно на подвижной центральной бесцветной бактерии
 - б. Симбионт *Chlorobium limicola*, от 8 до 16 клеток окружают центральную бактерию *Chlorochromatium aggregatum*.
 - бб. Симбионт *Pelodictyon luteolum*, от 7 до 40 клеток окружают центральную бактерию *Chlorochromatium glebulum*.
 - ббб. Симбионт *Chlorobium phaeobacteroides*, от 10 до 20 клеток окружают центральную бактерию *Pelochromatium roseum*.
 - бббб. Симбионты расположены в 2 слоя. Непосредственно на центральной бактерии сидят клетки *Chlorobium phaeo-*

bacteroides, а 2-й слой состоит из *Pelodictyon luteolum* *Pelochromatium roseo-viride*.
 аа. Центральная бактерия погружена в слизистую капсулу дли-
 ной до 50 мкм, на которой сидят небольшие яйцевидные клетки
 зеленых серобактерий *Cylindrogloea bacterifera*.

Определение абсорбционных спектров фотосинтезирующих бактерий

Обычно спектры абсорбции фотосинтезирующими пигментами живых бактерий определяют путем измерения их в спектрофото-
 метре, помещая суспензии бакте-
 рий в стеклянные или кварце-
 вые кюветы. Однако в этих усло-
 виях происходит рассеивание
 света бактериальными суспензия-
 ми или осаждение бактерий, либо
 роение подвижных форм, что мож-
 ет привести к значительным
 ошибкам.

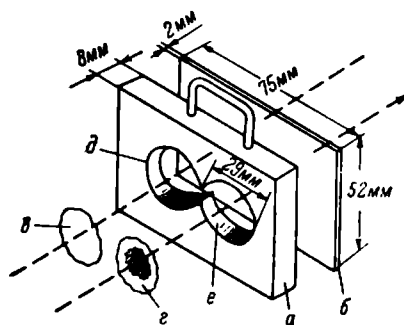


Рис. 15. Прозрачный держатель для
 монтирования фильтров в спектрофото-
 метре.

а — прозрачный блок с двумя ячейками и
 держателем; б — задняя оптически прозрач-
 ная пластинка, прикрепляемая к задней сто-
 роне блока «а»; в — контрольный пустой
 фильтр диаметром 25 мм; г — фильтр с об-
 разцом; д — ячейка для пустого фильтра;
 е — ячейка для опытного фильтра. Пунктир-
 ные линии — направление монохроматиче-
 ского света и фотодетектору.



Рис. 16. Абсорбционные спек-
 ты хлорофилла (1), бактерио-
 хлорофилла а (2), бактерио-
 хлорофилла б (3), бактериохло-
 рофилла с (4) и бактериохло-
 рофилла d (5).

По оси ординат — абсорбция света
 в относительных единицах; по оси
 абсцисс — длина волны света, нм.

Новая техника предложена Енчем (Trüper, Yentsch, 1967).
 Культуру бактерий или естественную воду из озера фильтруют
 через мембранный фильтр. Последний просушивают и просвет-
 ляют кедровым маслом. Затем просветленный фильтр с бакте-

риями вместе с контрольным просветленным фильтром монтируют в спектрофотометре на кюветах. В качестве контрольного служит фильтр, через который профильтрована вода из горизонтов, не содержащих фотосинтезирующие бактерии. Этот же фильтр используется в качестве контроля за поглощением света взвешенными частичками.

Спектры поглощения фотосинтезирующих бактерий снимают обычным способом и дают возможность определять пики поглощения в области видимого света. Однако таким способом невозможно определить поглощение света длиной больше 750 нм в связи с сильной абсорбцией света самим веществом мембранных фильтров в области инфракрасных лучей. В дальнейшем метод был видоизменен Трюпером и Енчем (Trüper, Yentsch, 1967) и приспособлен для измерения абсорбционного спектра в инфракрасной части спектра.

В зависимости от густоты (от 5 до 50 мл) бактериальную суспензию фильтруют через мелкопористый стеклянный фильтр G-5 диаметром в 25 мм. Влажный фильтр непосредственно монтируют в специальный держатель (рис. 15), который уже содержит увлажненный контрольный фильтр. Влажность фильтров достаточна для того, чтобы они прилипли обратной стороной к держателю, который помещают в спектрофотометр на место, где обычно ставят кюветы. Наблюдения ведут в инфракрасном спектрофотометре.

На рис. 16 приведены кривые абсорбционных спектров intactных клеток фототрофных бактерий.

Выделение фотосинтезирующих бактерий

Выделение культуры из природного материала. Для получения накопительных культур можно с успехом применять опыт культивирования окрашенных серобактерий путем совместного их выращивания с сульфатредуцирующими бактериями (Гинзбург-Карагичева, 1932; Штурм и Орлова, 1954).

Расплавленную агаризированную среду Старки (№ 51) или Баарса (№ 52) с уменьшенным до следов количеством соли Мора заражают активной культурой накопления сульфатредуцирующих бактерий и разливают до 2-3 высоты в стерильные пробирки. Культуры помещают в термостат при 30—35° и выдерживают до момента хорошего развития и обильного образования сероводорода. Далее эти же пробирки доверху заполняют озерной водой или расплавленной агаризированной (0.5% агара) средой Ван Нила (№ 58) без сульфида, хорошо встряхивают, чтобы мел распределился по всей среде, заражают испытуемым материалом или культурой фотосинтезирующих серобактерий. Затем пробирки закрывают корковыми пробками, охлаждают под струей холодной

воды и выставляют за окно, выходящее на север или северо-восток. Уже через 4—5 дней наблюдается развитие пурпурных или зеленых серобактерий. В случае жидкой среды пурпурные бактерии вначале развиваются в виде сплошной розовой пленки, которая в дальнейшем спускается в глубь между агаром и стеклом пробирки, а жидкая среда теряет свою окраску.

Получение культуры накопления (Trigger, 1970). Образцы естественной воды, ила или из культуры накопления, полученной вышеуказанным способом, вносят в склянки со средой Пфеннига (№ 57) и выдерживают на свету при 20—25°. Для избирательного накопления определенных видов следует пользоваться светом определенной длины волны. При обычном дневном свете сначала развиваются *Thiorhodaceae*, но через некоторое время их забирают *Chlorobiaceae*. Далее, благодаря устойчивости к сероводороду, в культуре вместе с фотосинтезирующими бактериями начинают развиваться диатомовые и сине-зеленые водоросли. Полностью прекратить развитие водорослей и зеленых фотосинтезирующих бактерий удается с помощью светофильтра, который пропускает лучи света с длиной волны больше 800 нм (фильтр № 530, Göttinger Farbfiler G mb H). Для получения культуры *Thiorhodaceae*, содержащих бактериохлорофилл *b*, необходимо использовать светофильтр с длиной волны больше 900 нм (фильтр № IR 533, Göttinger Farbfiler G mb H). Эти фильтры монтируют с одной стороны ящика, внутренней поверхности которого окрашена в черный цвет, а для охлаждения внутри поставлен змеевик, через который пропускается холодная вода. Для освещения снаружи перед светофильтром помещают лампу накаливания.

Выделение чистой культуры. 1.3 мл 2.4%-го агара с добавкой 0.1% хлористого кальция на дистиллированной воде вносят в длинную и узкую пробирку, закрывают ватной пробкой и стерилизуют в автоклаве. После стерилизации пробирки с расплавленным агаром помещают в водяную баню при 55°.

2. В склянку, содержащую 120 мл полной стерилизованной среды Пфеннига (№ 57) добавляют стерильный раствор аскорбинового натрия до концентрации 0.05% и нагревают в водяной бане до 38°.

3. Затем в каждую пробирку с агаром вносят по 6 мл вышеуказанной стерильной нагретой среды Пфеннига, хорошо перемешивают и хранят при 38° в водяной бане.

4. Первую пробирку заражают 1—3 каплями из культуры накопления фотосинтезирующих бактерий и немедленно тщательно перемешивают.

5. Из этой пробирки 0.5—1 мл вносят во вторую пробирку с агаризованной средой Пфеннига, перемешивают и эту процедуру повторяют до 8-го разведения.

6. Каждую пробирку после заражения последующей помещают в водяную баню с температурой 15—20°, чтобы быстрее застудить агар.

7. После застывания агара пробирку заливают расплавленной стерильной смесью (1 часть парафина и 3 части парафинового масла) слоем в 2.5 см. Пока застывает парафин пробирки помещают на 1 час в темноту, потом для лучшей изоляции от воздуха верхнюю часть пробирок нагревают повторно.

8. Культуры инкубируют при 20—25° на свету приблизительно в 500—1000 лк.

9. Как только начнется рост, берут пробирки, в которых не больше 20 колоний, разрезают алмазом на соответствующем уровне и одну из колоний фотосинтезирующих бактерий затягивают в пастеровскую пипетку, снабженную для удобства резиновой трубкой. Затем колонию бактерий разбалтывают в стерильной воде, и 3—4 раза повторяют всю операцию чистки.

10. Чистоту культуры проверяют микроскопически, посевом на МПА и на среду для сульфатредуцирующих бактерий. Отсутствие роста на этих средах и морфологическая однородность культуры служат критерием ее чистоты.

9. ВЫДЕЛЕНИЕ КУЛЬТУР МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ И ВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Большое значение в круговороте вещества в озерах и кислородном режиме играют метанооксиляющие бактерии. Упорядочили систематику этой группы бактерий Фостер и Дэвис (Foster, Davis, 1966). Проверив окисление метана у всех существующих видов этой группы бактерий, они выделили 5 видов, обладающих достоверными различиями. Для более четкого разграничения названий бактерий, окисляющих метан, от бактерий, образующих метан, они предлагают для метанооксиляющих бактерий приставку к названию организма «Methilo» вместо прежней «Methano», например, *Methanomonas* называть *Methilomonas*. Тогда упрощенная классификация метанооксиляющих бактерий может быть представлена в виде следующей таблицы (табл. 5).

Получение культуры накопления метанооксиляющих бактерий. Для получения культуры накопления питательную среду Мюнца (№ 89) или Фостера и Дэ-

Таблица 5

Упрощенная основа для классификации метанооксиляющих бактерий

Организм	Морфология	Подвижность и жгутики	Наличие капсулы или слизи	Цвет колонии	Наличие водно-растворимого пигмента	Наличие цист или спор
<i>Methylosinus</i>	Вибрионды	П Ж	+	Б Ж	Изменчивый (коричневый)	Споры
<i>Methylocystis</i>	Плеоморфные	—	+	Б	—	Липидные цисты
<i>Methilomonas</i>	Палочки, коккопалочки	П	Изменчиво	Б—Ж, Р, К	Изменчивый (зеленый)	Цисты
<i>Methylobacter</i>	То же	±П	»	Б—К	Изменчивый (желтый)	»
<i>Methylococcus</i>	Диплококки или цепочки	—	+	Б	—	»

Примечание. П Ж — пучок полярных жгутиков, П — полярный жгутик, Б—Ж от белого до желтого, Б — белый, Ж — желтый, Р — розовый, К — красный, Б—К — от белого до коричневого.

виса (№ 91) заражают испытуемой водой или болтушкой из поверхностного слоя ила. Среду разливают в пробирки и над ней создают атмосферу из $1/3$ метана и $2/3$ воздуха, как изложено ниже (стр. 98), или помещают в эксикатор, из которого откачивают воздух до 45 см рт. ст., и туда добавляют метан до выравнивания атмосферного давления. При отсутствии метана можно использовать естественный газ, выделяющийся из иловых отложений естественных водоемов. Для этого склянку заполняют водой, так чтобы в ней не осталось пузырьков воздуха, в перевернутом состоянии помещают в водоем, в горлышко вставляют воронку и укрепляют всю установку в водоеме над илом. При нарушении нормального состояния ила в литорали евтрофных водоемов начинает выделяться газ, который и улавливают в склянку. Обычно этот газ содержит до 70% метана и может быть использован для выделения культур метаноокисляющих бактерий.

Развитие метаноокисляющих бактерий отмечается по образованию пленки или по помутнению среды.

Выделение чистой культуры. Из культуры накопления делают ряд разведений, и из каждого заражают агаризованную среду Фостера и Дэвиса (№ 91), выливают в чашки Петри и помещают в эксикатор в атмосферу из $1/3$ метана и $2/3$ воздуха. Выросшие колонии отсеивают на косяки и вновь ставят в атмосферу метана с воздухом.

Проверку культуры проводят микроскопически на однородность культуры и отсутствие цист и простейших, которые часто развиваются в культурах метаноокисляющих бактерий. После отбраковки оставшиеся культуры вновь высевают на жидкую среду и проверяют наличие их роста в атмосфере метана и воздуха. Следующую проверку проводят высевом на МПА. У облигатных метаноокисляющих культур рост на МПА должен отсутствовать, а у факультативных колонии могут быть однородны и при высеве на жидкую среду Фостера в атмосфере метана и воздуха дают рост.

Выделение чистых культур можно производить на среде Фостера и Дэвиса (№ 91) с добавкой 1% метанола. Рост идет в аэробных условиях без добавки метана. Проверку чистоты культуры и принадлежность ее к метаноокисляющим бактериям необходимо проводить вышеописанным способом. Надо учесть, однако, что большинство метаноокисляющих бактерий может использовать метанол в качестве единственного источника органического вещества, но далеко не все бактерии, выросшие на метаноле, способны окислять метан.

Выделение культуры водородокисляющих бактерий. Если нитрифицирующие и некоторые серобактерии принадлежат к облигатным автотрофам, то водородокисляющие бактерии могут развиваться на некоторых органических веществах и относятся к факультативным автотрофам.

Они могут за счет гидрогеназ активировать молекулярный водород и делать его доступным в качестве источника энергии и восстановителя при усвоении молекулярной углекислоты.

Получение культуры накопления. Культуру накопления получают так же, как и для метанооксиляющих бактерий, но над питательной средой Коэна и Барриса (№ 86) создают атмосферу из гремучего газа: на 1 объем кислорода берут 2 объема водорода или на 1 объем водорода — 2.5 объема воздуха с добавкой 10% углекислоты.

Рост водородоксиляющих бактерий в жидкой среде отмечается по помутнению или образованию пленки.

Выделение чистой культуры. Из культуры накопления делают ряд последовательных разведений. Из каждого разведения производят посев на агаризированную среду Шатца и Бовелла (№ 87) в чашки Петри, которые помещают в эксикатор с газовой смесью водорода, кислорода и углекислоты. Из отдельных колоний делают массовый высев на косяки с той же средой и культивирование производят в эксикаторе в газовой смеси того же состава. Далее проводят пересев из косячков на жидкую среду в атмосфере гремучего газа и углекислоты и проверку чистоты культуры микроскопическим и культуральным методами.

10. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В АТМОСФЕРЕ ВОДОРОДА ИЛИ СМЕСИ ВОЗДУХА И УГЛЕВОДОРОДНЫХ ГАЗОВ

При выявлении в воде или илах бактерий, восстанавливающих сульфаты за счет молекулярного водорода, или бактерий, окисляющих кислородом воздуха водород или газообразные углеводороды, можно культуры ставить в пробирках со специальным газовым затвором. В этих случаях нет необходимости пользоваться эксикатором с газовой смесью.

Принцип метода заключается в том, что в обычную пробирку опускают перевернутую пробирку, которую заполняют водородом или соответствующей смесью газов, заражают испытуемым материалом и затыкают резиновой пробкой.

Процедура постановки опыта заключается в следующем.

1. В обычную пробирку до самого верха наливают минеральную питательную среду. Другую пробирку меньшего диаметра заполняют доверху той же питательной средой, и на поверхность жидкости кладут клочок тонкой бумаги. Пробирку переворачивают и погружают на 1—2 мм в широкую пробирку, после этого бумагу удаляют. Эту процедуру надо проделать таким образом, чтобы в перевернутую пробирку не попало пузырьков воздуха. В пробирку через капилляр или иглу от подкожного шприца вводят соответствующую газовую смесь.

2. Наполнение газом внутренней пробирки удобнее всего делать из небольшого газометра.

В склянку объемом в 150—200 мл вставляют резиновую пробку с двумя стеклянными трубками. Одна стеклянная трубка, как видно из рис. 17, доходит до дна склянки, а другая заканчивается на уровне с пробкой. На

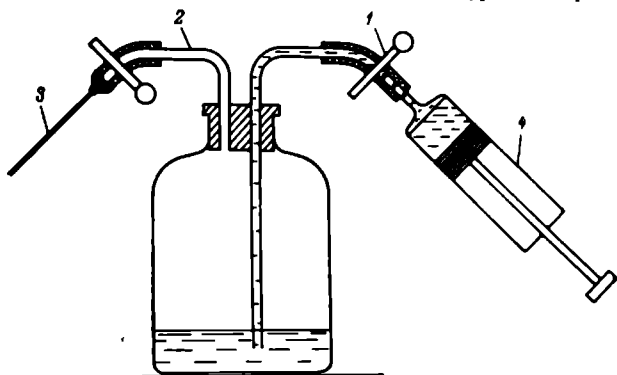


Рис. 17. Микрогазомер для наполнения пробирок газом.

1 — зажим Мора; 2 — стеклянная трубка; 3 — игла от подкожного шприца; 4 — подкожный шприц.

наружные их концы надевают каучуковые трубки с зажимами Мора. Склянку заполняют водой, так чтобы под пробкой не осталось пузырьков воздуха. Обе стеклянные трубки также наполняют водой. Затем открывают зажимы и через короткую стеклянную трубку наполняют склянку газовой смесью из газометра, при этом вытесняемая вода вытекает из склянки через трубку в микрогазомере. Газометр будет готов к употреблению, когда $\frac{4}{5}$ объема склянки заполнены газом и оба зажима закрыты.

Для введения газа из газометра в маленькую пробирку в каучуковую трубку вставляют иглу от подкожного шприца (3), а к другой трубке присоединяют наполненный водой шприц (4) объемом в 10 мл. Поршнем воду из шприца вводят в

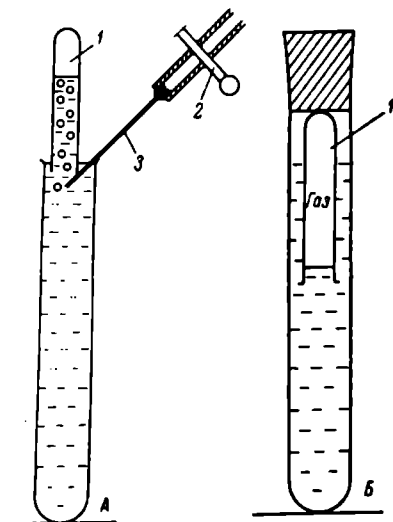


Рис. 18. Постановка микроопыта по культивированию бактерий в искусственной газовой атмосфере.

А — заполнение опрокинутой пробирки газом; Б — схема культивирования. 1 — опрокинутая пробирка; 2 — зажим микрогазомера; 3 — игла шприца.

склянку и зажим (1) на трубке закрывают, при этом газ в склянке оказывается под небольшим давлением. Иглу шприца подводят под открытый конец маленькой пробирки (как показано на рис. 18, А) и,

ослабляя зажим, мелкими пузырьками вводят газ в пробирку. При этом часть питательной среды переливается через край большой пробирки.

3. Большую пробирку затыкают резиновой пробкой, так чтобы под ней не оставалось пузырьков воздуха (рис. 18, Б). Пробку привязывают к пробирке и стерилизуют текучим паром.

4. При учете бактерий, окисляющих углеводороды, резиновую пробку открывают, асептически выливают вон 3—4 мл питательной среды, вносят 0.5—1 мл посевного материала и пробирку вновь закрывают резиновой пробкой.

5. При учете водородной редукции сульфатов посевной материал вносят в количестве 0.1—1 мл, но перед посевом в пробирку добавляют $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ из расчета 10 мг и $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1 г/л. Пробирку вновь затыкают, так чтобы под резиновой пробкой не осталось пузырьков воздуха.

При развитии бактерий, окисляющих углеводороды, жидкость в пробирках мутится, а на границе с газовой атмосферой в маленькой пробирке появляется бактериальная пленка.

Развитие сульфатредуцирующих бактерий отмечается по почернению питательной среды за счет образования сульфида железа и по резкому уменьшению объема водорода в маленькой пробирке после того, как вынимается резиновая пробка из большой пробирки.

11. ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ, ОКИСЛЯЮЩИХ ЗАКИСНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ЖЕЛЕЗА И МАРГАНЦА

К железобактериям относятся организмы из различных групп, объединенные на основании их экологии и способности откладывать окислы железа или марганца вокруг своих клеток или трихом. Сюда относятся истинные (одноклеточные), нитчатые и почкующиеся бактерии, а также организмы, принадлежащие к растительным микоплазмам. Последние в одной из стадий своего развития паразитируют на плесневых грибах или бактериях (Дубинина, 1970).

КЛЮЧ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РОДОВ МАРГАНЕЦ- И ЖЕЛЕЗОБАКТЕРИЙ

I. Одноклеточные бактерии.

1. Окислы металлов образуют бесформенные отложения.

а. Организмы относятся к сем. *Arthrobacteriaceae*, в цикле развития палочки распадаются на кокки *Siderocapsa*.

аа. Организмы относятся к сем. *Hyphomicrobiaceae*, гифы образуются с одной или более сторон клетки *Hyphomicrobium*.

2. Окислы железа откладываются в виде морфологически оформленных структур.

а. Подвижные организмы, железо откладывается в виде панциря *Ochrobium*.

аа. Окислы железа откладываются вокруг радиальных нитей розетковидной колонии *Blastocaulis*.

ааа. Радиусы микроколонии образованы удлиненными клетками спиральной структуры *Seliberia*.

- аааа. Клетки имеют прикрепительный диск, размножаются почкованием, колонии из нескольких клеток сидят на железистом комке *Blastobacter*(= *Pasteuria*).
- II. Нитчатые бактерии.
1. В трубчатом влагище отлагаются железо или марганец.
 - а. Клетки расположены в один ряд.
 - б. Нити никогда не прикрепляются к субстрату *Leptothrix ochraceae*.
 - бб. Нити способны прикрепляться к субстрату *Cladothrix*.
 - аа. У свободного конца нити клетки располагаются в несколько рядов *Crenothrix*.
 2. Во влагище откладываются окислы марганца. Оно гранулировано, имеет клиновидную форму *Leptothrix discophora*.
- III. Организмы не имеющие клеточной оболочки и относящиеся к микоплазмам.
1. Железо откладывается в виде тонких нитей или лент.
 - а. Ленты закручены *Gallionella*.
 - аа. Железистые нити сложены рыхло, на изгибах образуют характерные фигуры в виде лука *Toxothrix*.
 2. Отложение окислов железа в природной обстановке происходит вокруг клеток диаметром 0.2—0.5 мкм и присоединенных к ним нитчатых структур, но вне прямой связи с клетками. Развиваются в нейтральной среде в микроаэрофильных условиях *Siderococcus*.
 3. Микроколонии в виде «паучков», образованных радиально расходящимися нитями, покрыты окислами марганца *Metallogenium*.
 4. Окислы марганца покрывают мелкие кокки, соединенные нитями, которые находятся за пределами видимости оптического микроскопа *Caulococcus*.

Выделение *Metallogenium*

Получение культуры накопления. Жидкую питательную среду Заварзина (№ 79) заражают испытуемым материалом и инкубируют при комнатной температуре. Развитие *Metallogenium* совместно с грибом и окислением закисных солей марганца протекает в строго аэробных условиях. Сначала появляются мелкие округлые клетки, которые в течение нескольких часов прорастают в нити, покрываются окислами марганца и среда принимает коричневый оттенок.

Выделение чистой культуры. Молодую культуру *Metallogenium*, когда она находится еще в виде мелких клеток, фильтруют через мембранный фильтр № 3 для удаления плесневого гриба и грубых взвесей. Фильтрат повторно пропускают через асбестовый фильтр. Мелкие формы порядка 200 нм и меньше проходят через фильтр. Ультрафильтратом заражают среду Дубининой (№ 80). Через несколько дней среда мутится от развития *Metallogenium*. Наличие его проверяют на твердой среде с добавкой лошадиной сыворотки. Спустя несколько суток здесь вырастают очень мелкие нежные колонии. Колонии с твердой среды пересевают в пробирки с жидкой средой Дубининой (№ 80). Через 10 суток в отдельных пробирках среда приобретает желтый мутный оттенок, характерный для начала

прорастания свободноплавающих клеток *Metallogenium* в тонкие нити с одновременным осаждением MnO_2 на них. В дальнейшем появляется бурый хлопьевидный осадок MnO_2 , состоящий из «паучков» этой культуры.

Выделение *Gallionella*

Получение культуры накопления. Среду Вольфа (№ 78) разливают по пробиркам и заражают железистым осадком, в котором микроскопически обнаруживают нити *Gallionella*. Для успешного развития организма большое значение имеет предварительное продувание среды углекислотой, которое приводит к частичному разложению сульфида железа и снижению концентрации кислорода. Культура развивается в верхней трети пробирки в виде узкой зоны, которая постепенно опускается вниз.

Выделение нитчатых железобактерий

Получение культуры накопления *Lerthrix discophora*. Воду из водоема вместе с железистым осадком помещают в широкий стеклянный сосуд. На 2—3-й день на стенках сосуда появляются темно-коричневые колонии культуры. В этих условиях на поверхностной пленке воды образуются отложения марганца, принадлежащие дискам прикрепления *L. sideropus* или *Actinomyces* sp.; *L. ochraceae* в этих условиях не развивается (Заварзин, 1972).

Колонии *L. discophora* пересевают на жидкую среду Тайлера (№ 81). В пробирках с объемом среды в 3—4 мл ее рост становится заметным на 3-й день.

Проверку чистоты культуры проводят микроскопически и посевом на МПА, сусло-агар, среду Тайлера (№ 81) и другие среды.

Получение культуры накопления *Siderocapsa* и *Hypomicrobium*. Исследуемый материал из ряда последовательных разведений высевает поверхностно на твердую среду Тайлера (№ 81) в чашках Петри. Инкубацию производят при 28° или при комнатной температуре. Колонии, покрытые окислами марганца, микроскопируют и из них делают посев на ту же жидкую среду. Появление коричневой окраски от окислов марганца после нескольких дней инкубации указывает на наличие *Siderocapsa* или *Hypomicrobium*.

Дальнейшую очистку и разделение отдельных видов проводят на твердой среде Тайлера (№ 81), контролируя развитие в камере Пешкова (стр. 52).

Культивирование железобактерий в конвекционной проточной установке по Перфильеву

Культивирование железобактерий, относящихся к роду *Gallionella*, представляет значительные затруднения, так как развитие их происходит за счет окисления кислого углекислого железа при реакции питательной среды, близкой к нейтральной. В этих условиях закисное углекислое железо на воздухе быстро окисляется до окисного, и таким образом среда становится неблагоприятной для развития железобактерий.

Б. В. Перфильев (Перфильев и Габеев, 1961) предложил использовать для культивирования *Gallionella* конвекционную проточную установку. Принцип устройства этого прибора заключается в том, что основная масса питательного субстрата, содержащая закисное двууглекислое железо, находится в анаэробных условиях. Развитие же железобактерий происходит в небольшой микрокювете и только у самой поверхности воды, не проникая в бутыль питающей системы.

В опытах Б. В. Перфильева вода в бутыли, несмотря на содержание закисного железа до 25 мг/л, оставалась в течение нескольких недель прозрачной, т. е. закисное железо не окислялось. Очевидно, кислород, поступавший из воздуха в кювету, весь перехватывался пленкой из *Gallionella* и не проникал в сосуд питающей системы.

Конвекционная проточная установка представлена на рис. 19. Питающая система, заполняемая жидким субстратом, состоит из трех элементов: склянки с нижним тубусом емкостью в 1—2 л (8), небольшого шарикового холодильника (12), помещенного вертикально с отогнутой под прямым углом нижней трубкой, и вспомогательного сосуда (9) объемом в 0.5 л, расположенного вверх дном.

Развитие железобактерий происходит в щелевой стеклянной или пластмассовой проточной камере (2). Ширина стеклянной камеры 2—3 мм, длина 200 мм, высота 30—50 мм, ширина пластмассовой камеры может быть увеличена на 1 см, что облегчает ее конструкцию из органического стекла. Крышка камеры делается из органического стекла и имеет 2—3 отверстия диаметром 7—8 мм, дно камеры с двумя отверстиями (3), в которые через резиновую муфту вставляют выдвигающиеся стеклянные трубочки. Одну из них соединяют каучуком (13) через вертикальную стеклянную трубку с краном (5) и с тубулярной склянкой (8), заполненной субстратом. Вторая, отводящая, трубка проточной камеры через каучуковую трубку соединяется с верхним концом холодильника. Если установка находится при комнатной температуре, а через холодильник пропускать водопроводную воду низкой температуры, то субстрат, находящийся в трубке холодильника,

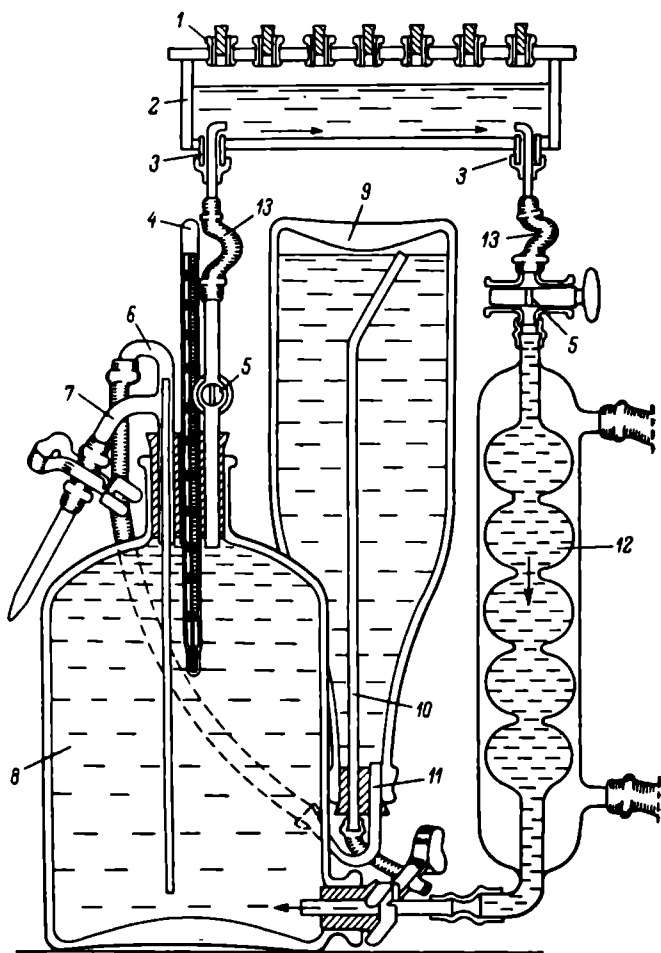


Рис. 19. Конвекционная проточная установка по Перфильеву.

1—3 — вертикально-щелевая проточная камера, связанная трубами (13) и кранами (5) с питающим сосудом (8) и холодильником (12), 4 — термометр, 6, 7 — тройник для взятия проб субстрата, 9—11 — бутылка с дополнительным субстратом.

охладившись, станет опускаться, вытесняя соответствующий объем субстрата из тубулярной склянки вверх, в камеру. В результате этого субстрат в проточной системе начнет циркулировать в направлении, указанном стрелками. Чем больше разность между температурой субстрата и водопроводной воды в холодильнике, тем быстрее наступает циркуляция раствора.

При многократном прохождении через проточную камеру всего объема субстрата, находящегося в питающей системе, его состав в результате деятельности микроорганизмов может сильно измениться.

Для учета изменений, происходящих в субстрате, время от времени необходимо отбирать пробы. С этой целью в пробку тубулярной склянки вставляют тройник с отогнутыми книзу отрогами (6, 7). Верхний из отрогов (6) соединен с вспомогательной бутылкой (9), заполненной запасным субстратом. Внутрь тройника вставляют на каучуковой муфте тонкую стеклянную трубку, для того чтобы поступающий запасной субстрат попал в нижнюю часть тубулярной склянки.

Когда нужно взять для анализа пробу из циркулирующего в установке субстрата, то открывают зажим на тройниковом отроге (7) и через нижнюю трубку (10) вспомогательной бутылки нагнетают стерильный воздух или азот, либо субстрат, пользуясь подкожным шприцем. Под давлением нагнетаемого газа жидкостью из вспомогательной бутылки через выводную трубку (11) перетекает по верхнему отрогу тройника (6) в основную тубулярную склянку и вытесняют через нижний отрог тройника (7) соответствующее количество измененного субстрата.

Благодаря узкой длинной трубке, вставленной в тройник на каучуковой муфточке, в этом устройстве не может смешиваться свежий субстрат, поступающий из бутылки, с отработанным субстратом, забираемым для анализа.

Если через холодильник пропускать теплую воду, то циркуляция раствора пойдет в обратном направлении, а температура в проточной камере будет выше комнатной.

В качестве питательного субстрата для развития *Gallionella* можно с успехом использовать свежую воду из железистых источников, в частности Полюстровского источника под Ленинградом или питательную среду Лиске (№ 77), с добавкой свежесажженного углекислого железа при насыщении углекислотой.

НЕКОТОРЫЕ СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ВОДЫ И ИЛА ОЗЕР И ВОДОХРАНИЛИЩ

Микробиологические исследования водоемов с целью изучения круговорота веществ необходимо вести в течение годового цикла, так как интенсивность микробиологических процессов связана со специфическими особенностями сезонов года. Наиболее сильно бывают выражены характерные особенности этих процессов для различных типов водоемов в период летней стагнации. Поэтому при сравнительном изучении ряда водоемов путем одноразовых исследований работы эти можно проводить в июле или августе в следующей последовательности.

1. Определение вертикального распределения температуры, кислорода, углекислоты, сероводорода, сульфатов, хлоридов, ионов кальция или жесткости воды, окисляемости, прозрачности и электропроводности.

2. Анализ величины первичной продукции и деструкции органического вещества в воде и иловых отложениях.

3. Анализ сапрофитов, общего количества бактерий и времени их генерации, выделение олигокарбофильных, почкующих, ползающих и других видов.

4. Определение величины гетеротрофной ассимиляции углекислоты и хемосинтеза в воде и поверхностных слоях ила.

5. Изучение распределения водород- и метанокисляющих бактерий.

6. Определение наличия процессов распада ила с образованием метана.

7. Если в воде много сульфатов или в глубинных слоях отмечается присутствие сероводорода, то необходимо изучение процессов, связанных с круговоротом серы: учет сульфатредуцирующих, тионовых и фотосинтезирующих бактерий и определение интенсивности процессов редукции сульфатов и окисления сероводорода путем применения радиоизотопа серы — S^{35} .

8. Учет нитрификационной способности воды, количества азотобактера в воде, поверхностном слое ила и в обрастаниях водной растительности, *Clostridium pasteurianum* и денитрификаторов в воде и поверхностном слое ила.

На основании полученных данных по ряду водоемов исследуемого района следует составить схему круговорота вещества и дать общую сравнительную характеристику водоемов.

9. Обобщение данных по морфометрии водоема.

1. БАТОМЕТР ДЛЯ ОТБОРА ПРОБ ВОДЫ НА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ С НЕБОЛЬШИХ ГЛУБИН

Пробы воды для бактериологического анализа, за исключением прямого счета, необходимо отбирать в стерильную посуду. Для глубин, не превышающих 10 м, удобнее всего использовать бу-

тылку Мейера, усовершенствованную А. В. Францевым и описанную С. И. Кузнецовым (1952) как «батометр Францева». В гнезде (рис. 20) утяжеленной рамы с помощью зажима (2) укрепляют стерильную бутылку (3) емкостью 0.25 или 0.5 л, закрытую резиновой пробкой, обертой спиртом. Через пробку проходит трос, на котором опускают прибор в воду. Металлическая оправа с послаблением привязана к этому же тросу. Складку опускают на нужную глубину и рывком за шнур вытягивают каучуковую пробку из горлышка бутылки, при этом вода с нужного горизонта поступает в складку. Так как бутылку поднимают открытой, верхний слой воды после поднятия батометра сливают за борт, закрывают бутылку стерильной ватной пробкой. Батометром трудно взять образец

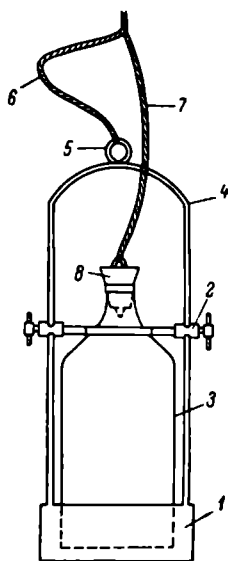


Рис. 20. Схема батометра для стерильного отбора поверхностных проб воды.

1 — гнездо утяжеленной рамы батометра; 2 — зажим для закрепления стерильного сосуда при отборе проб воды; 3 — стерильная бутылка емкостью 0.25—0.5 л; 4 — рама батометра; 5 — кольцо, к которому прикрепляется трос; 6 — трос для опускания бутылки; 7 — бечовка, на которой прикрепляется пробка (8) к тросу.

воды с глубин более 30 м, потому что высокое давление столба воды не дает возможности выдернуть пробку из горлышка складки.

При длительных экспедициях для работы с помощью батометра берут с собой стерильные бутылки, закрытые ватными пробками и простерилизованные сухим жаром. Посевы бактерий делают в экспедиционных условиях.

2. БАТОМЕТР ДЛЯ ОТБОРА ГЛУБОКОВОДНЫХ ПРОБ ПРИ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

Рабочая часть батометра Романенко и Младова (1969) представляет собой баллон (1) емкостью 100—200 мл с капиллярными отверстиями на концах (рис. 21). На концевые отростки надеты отрезки вакуумного каучука, в которые вставляют с одной стороны сменные капилляры (2) с внутренним отверстием 2—3 мм, а с противоположного конца — стеклянную палочку (6). Наличие сменных капилляров позволяет многократно использовать один и тот же баллон. Благодаря небольшой величине концевых отверстий резина соединительной трубки не засасывается в баллон

при высоком наружном давлении, когда прибор находится на большой глубине. После стерилизации баллон вставляют с помощью кольца (5) в раму, которая подвешена к тросу. При этом

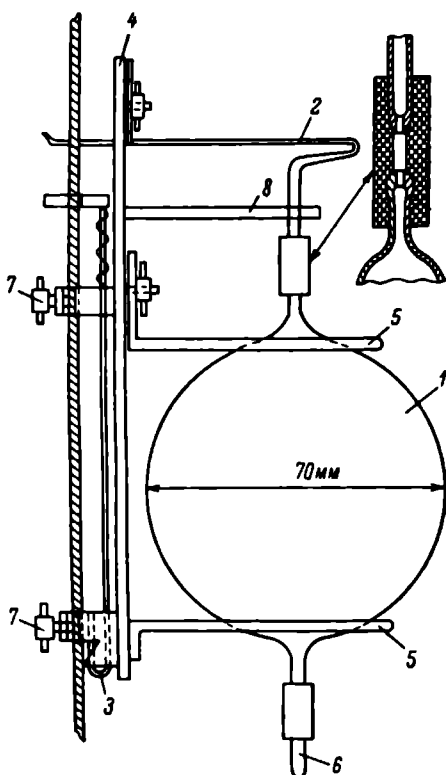


Рис. 21. Батометр для отбора проб воды с больших глубин.

1 — сосуд для отбора проб воды; 2 — капилляр, который обламывает посыльный груз; 3 — крючок для крепления посыльного груза; 4 — рама батометра; 5 — кольца, закрепляющие баллон на раме батометра; 6 — стеклянная палочка (пробка); 7 — приспособление для крепления рамы батометра на тросе; 8 — держатель капилляра.

конец верхнего капилляра (2) после удара посыльным грузом отламывается в месте перегиба в стороне от рамы и груза. Рама (Сорокин, 1962) имеет приспособление для сбрасывания следующего груза (3) и крепления к тросу (7). После отбора пробы воды баллон вынимают из рамы и из него удаляют верхний раз-

битый капилляр, а на его место вставляют стерильную трубочку с ватным тампоном.

Шарообразная форма баллона способствует тому, что он не лопаается даже на глубине 1200 м. При отборе проб нет необходимости создавать вакуум в баллоне. Уже на глубине 10 м при обламывании капилляра баллон наполняется водой за счет гидростатического давления более чем на половину объема. При подъеме прибора в верхней части баллона образуется небольшая воздушная пробка за счет выделения газа из воды при уменьшении давления, предохраняющая поступление воды из верхних горизонтов.

3. ОТБОР ПРОБ ИЛА

Пробы ила можно отбирать стратометром любой конструкции или дночерпателем Берджи. Из трубчатого стратометра (Романенко, 1965а) отбирают колонки ила длиной 10—20 см для посева. В трубке стратометра этой конструкции (рис. 22) имеется ряд отверстий (их завинчивают шурупами) диаметром 2—3 мм, через которые в монолит ила можно ввести платиновый электрод, впаянный в стеклянную трубочку, для измерения в колонке окислительно-восстановительного потенциала.

Стеклянную трубку диаметром около 10 мм и длиной 15—20 см с двумя ватными пробками стерилизуют сухим жаром, а резиновые пробки — отдельно в автоклаве. Кроме того, подбирают одну резиновую пробку соответствующего диаметра (со стеклянной трубочкой, на которую надевают каучуковую трубку длиной в 20—80 см.

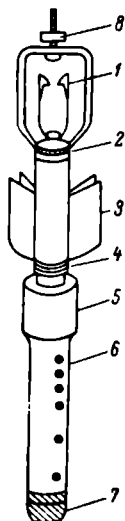


Рис. 22. Стратометр для отбора проб грунта и определения в нем окислительно-восстановительного потенциала.

1 — крючки для открывания и удерживания клапана в верхнем положении; 2 — клапан из микропористой резины; 3 — стабилизатор; 4 — резьба (место отделения плексигласовой трубки от стабилизатора); 5 — груз; 6 — плексигласовая трубка с отверстиями для электродов, завинчивающимися шурупами; 7 — наконечник из металла; 8 — выступ для закрепления крючков.

При отборе проб из стратометра трубку отделяют от стабилизатора, монолит ила в стратометрической трубке поршнем подвигают к ее верхнему концу. Из стерильной стеклянной трубочки ватные пробки удаляют, в верхний конец ее вставляют пробку с резиновой трубкой. Противоположный, открытый конец стеклянной трубки постепенно вводят в монолит ила, так чтобы по-

верхность его в трубке и монолите оставалась на одном уровне (рис. 23). Для этого ртом вытягивают воздух из верхней части стеклянной трубки, пользуясь каучуковой трубкой. Таким образом отбирают асептически образец исследуемого ила ненарушенной структуры. Затем трубку вынимают из монолита ила и затыкают с обеих сторон стерильными резиновыми пробками. В таком

виде образец ила может храниться несколько дней в холодильнике.

При отборе проб для анализа резиновые пробки из стеклянной трубки вынимают, а с нижней стороны в нее вводят поршневую пробку. Далее весь монолитик ила постепенно при помощи стеклянной палочки проталкивают к противоположному открытому концу трубки (рис. 24).



Рис. 23. Схема стерильного отбора образца ила из стратометра с ненарушенной структурой.

1 — стратометрическая трубка с монолитом ила; 2 — стеклянная трубка, куда асептически отбирается колонка ила; 3 — резиновая пробка со стеклянной трубкой; 4 — резиновая трубка.

При этом можно взять образец для анализа с любой глубины от поверхности ила.

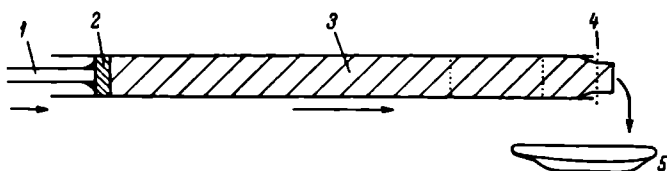


Рис. 24. Схема асептического отбора образца ила из стеклянной трубки.

1 — стеклянная палочка; 2 — поршневая пробка; 3 — монолит ила; 4 — нож; 5 — приспосабливание для ила.

4. ИЗГОТОВЛЕНИЕ ОКУЛЯРНОГО СЕТЧАТОГО МИКРОМЕТРА

При учете общего числа бактерий методом А. С. Разумова (1932) производят подсчет количества бактерий на определенной площади препарата. Для этого необходимо иметь окулярный

сетчатый микрометр, который помещают на диафрагму окуляра микроскопа. Дифрагму следует поставить так, чтобы при ввинченной верхней линзе деления сетчатого микрометра были четко видны.

Окулярный сетчатый микрометр можно изготовить кустарным способом, нанося алмазным или корундовым карандашом тонкие линии на стеклянных пластинках.

1. Стеклянные пластинки (14×14 мм) нарезают из фотопластинок, с которых отмыт желатиновый слой, или из предметных стекол.

2. При нанесении тончайших линий на стекле можно взять корундовую иглу, которая используется для проигрывания долгоиграющих пластинок. Иглу в держателе рекомендуется вставить в тонкую металлическую трубочку и закрепить.

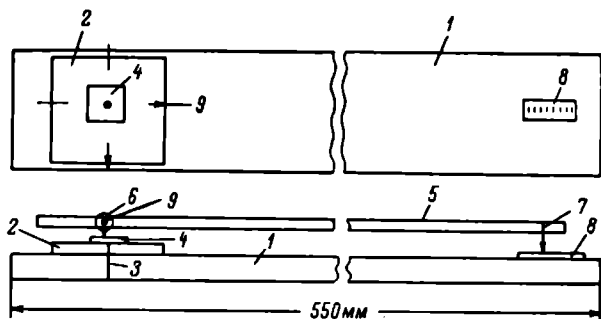


Рис. 25. Схема установки для изготовления окулярного сетчатого микрометра.

1 — доска, на которой монтируется установка; 2 — вращающаяся на оси дощечка; 3 — ось вращения (гвоздь); 4 — стеклянная пластинка, на которую наносятся деления; 5 — металлический рычаг; 6 — корундовая игла; 7 — стальная игла; 8 — металлическая миллиметровая линейка с делениями; 9 — шуруп для крепления корундовой иглы.

3. Нанесение тончайших штрихов на стеклянные пластинки производят на оптической доске (рис. 25). На одном конце доски (длиной 60 см, шириной 10 см) параллельно ее длине закрепляют металлическую измерительную линейку с делениями, на другом — острием вверх вбивают небольшой гвоздь или иглу, на которой вращается фанерная дощечка с наклеенной на нее миллиметровой бумагой. Ось проходит через центр дощечки.

4. Для нанесения делений на стеклянную пластинку используют пластмассовый или деревянный стержень длиной около 55 см, в который с одной стороны вставляют стальную грамфонную иглу, а с другой (в отверстие в стержне) — корундовую. Между стальной и корундовой иглами расстояние должно быть порядка 50 см.

Нанесение делений на стеклянную пластинку производят следующим образом. На центр вращающейся фанерной дощечки кусочком разогретого воска прикрепляют стеклянную пластинку, на которую хотят нанести деления. Затем стальную иглу рычага точно ставят на деление линейки, так чтобы корундовая игла

была на 2.5 мм дальше центра стеклянной пластинки, и напосят штрих на ее поверхности. Далее передвигают стальную иглу на 1 мм и вновь корундовой иглой делают второй штрих на стекле, который отстоит от первого точно на 1 мм. Эту процедуру повторяют 6 раз. Далее фанерную дощечку, не снимая с оси, поворачивают на 90° и всю операцию повторяют заново. При этом в центре стеклянной пластинки будет начерчена сетка (в 25 мм²), которая и может служить окулярным сетчатым микрометром.

Необходимо заметить, что нужно предварительно научиться наносить четкие линии на стекло. При неправильном повороте корундовой иглы или слишком сильном нажиме края линий начинают крошиться, и сеточка получается негодной для использования в качестве окулярного микрометра.

При легком нагревании сеточку снимают с фанерной дощечки, края ее подшлифовывают на корундовом брусочке и после промывки спиртом помещают в окуляр микроскопа.

5. МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ ПОДСЧЕТ БАКТЕРИЙ

Подсчет бактерий в воде

Прямой метод состоит в непосредственном наблюдении и количественном подсчете микроорганизмов в воде. Этим методом учитывается значительно больше микроорганизмов, чем методом подсчета колоний по Коху, так как он позволяет учесть и ту часть микрофлоры, которая не растет на стандартных средах или растет крайне медленно.

Величина расхождения результатов подсчета прямым методом и счетом колоний по Коху наибольшая для вод чистых или подвергшихся действию антисептиков, и наименьшая для вод, несущих органическое загрязнение.

Прямой метод учета бактерий в воде имеет несколько модификаций, которые были предложены Н. Г. Холодным (1929), С. И. Кузнецовым и Г. С. Карзинкиным (1930), Д. Р. Габе (1957), Б. В. Перфильевым (Перфильев, Габе, 1961) и др. Ниже мы приводим модификацию, разработанную А. С. Разумовым (1932, 1947, 1962).

1. Пробы воды отбирают батометром в нестерильную, но чисто вымытую посуду. В случае транспортировки проб их следует фиксировать формалином (0.5 мл на 100 мл воды), предварительно очищенным от бактерий путем фильтрования через мембранный фильтр № 3.

2. Взятую для анализа воду пропускают через мембранный фильтр № 1—3, помещенный в воронку Зейтца.

Мембранные фильтры предварительно кипятят в дистиллированной воде, которая сменяется несколько раз. Из приемного сосуда аппарата отсасывают воздух. Внесенную воду профильтровывают. После фильтрования фильтр сушат на воздухе, на краях его делают карандашом отметку с указанием номера или даты и профильтрованного объема воды.

3. Весь фильтр окрашивают карболовым эритрозином (5%-й эритрозин в 5%-й карболовой воде) в течение 3—4 час. или оставляют в краске на ночь. Окраску производят следующим образом. В чашку Петри помещают кружок фильтровальной бумаги и увлажняют его краской. На смоченную краской бумагу нижней стороной кладут фильтры с осевшими на них взвесями и закрывают крышкой.

По окончании окрашивания краску отмывают, перекладывая фильтры на листе фильтровальной бумаги, смоченной дистиллированной водой. Перекладывание фильтров с одного места на другое продолжают до тех пор, пока фильтр перестанет окрашивать влажную фильтровальную бумагу.

После отмывания фильтр высушивают. Площадь фильтра с взвесью должна быть розовой, а края почти бесцветными.

4. Для подсчета микроорганизмов готовят микроскопический препарат. С этой целью на предметное стекло наносят каплю канадского бальзама или иммерсионного масла. На каплю накладывают окрашенный мембранный фильтр, так чтобы бактериальная взвесь была сверху. Поверх мембранного фильтра наносят каплю бальзама или иммерсионного масла, покрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом с иммерсионным объективом (увел. $\times 90$) при окуляре с сетчатым микрометром (увел. $\times 10$).

5. Подсчет бактерий производят по формуле

$$x = \frac{e \cdot 10^6 \cdot \partial}{a \cdot ж \cdot z},$$

где x — количество бактерий в 1 мл воды; e — площадь фильтра, мм^2 ; 10^6 — переводной коэффициент (мм^2 в мкм^2); ∂ — сумма подсчитанных бактерий в полях зрения z ; a — площадь (в мкм^2) окулярного сетчатого микрометра при том же увеличении; $ж$ — объем профильтрованной воды, мл; z — число полей зрения, где подсчитывались бактерии на площади a .

При работе с одним и тем же микроскопом и фильтровальным аппаратом отношение $\frac{e \cdot 10^6}{a \cdot ж \cdot z}$ остается постоянным и может быть заменено одним коэффициентом K , использование которого упрощает вычисление.

Подсчет следует делать в 20 полях зрения на общей площади $20\,000 \text{ мкм}^2$ в разных местах фильтра. В сетке, изготовленной вышеописанным методом (стр. 110), имеющей 25 маленьких квадратов, если подсчет производят на каждом поле в 9 квадратах по диагонали, то соответственно учитывают и площадь окулярного микрометра. В каждом маленьком квадрате должно содержаться не менее 2—5 и не более 10—20 бактерий. Если бактерий мало, подсчет надо производить во всех 25 квадратах.

В случае больших чисел необходимо профильтровывать меньший объем воды или применять разведение водой, профильтрованной через мембранный фильтр. При получении меньших чисел надо просчитывать большее число полей зрения и фильтровать большие объемы исследуемой воды.

Ориентировочные объемы воды, которые следует профильтровывать при анализе воды различных водисточников, приведены в табл. 6.

Промышленные мембранные фильтры могут быть сильно загрязнены бактериями (Рукина, Бирюзова, 1952). Поэтому при массовых анализах следует брать контрольные фильтры, кипятить

их в воде, окрашивать и предварительно просматривать под микроскопом. Если фильтры загрязнены и нет возможности их заменить более чистыми, то нужно фильтровать такое количество воды, чтобы число бактерий на просчитываемой площади было раз в 10 больше, чем на контрольном фильтре (Кузнецов, 1952; Разумов, 1952).

Таблица 6

Объем воды для анализа общей численности бактерий, мл

Тип водонесточников	Фильтрующая площадь воронки Зейтца	
	диаметр 2,5 см	диаметр 1 см
Артезианские воды, ключи, родники	50—200	5—30
Чистые районы рек, озер и водохранилищ	10—20	1—3
Загрязненные водоемы	0.1—1	0.01—0.1

Характеристика мембранных фильтров по величине пор и номенклатуре, изготавливаемых в СССР фабрикой мембранных фильтров в г. Мытищах, Millipore filter Corporation в Бредфорде (США), фабрикой Sartorius-Membranfilter GmbH в Геттингене (ФРГ) и «Синпор» в ЧССР приведена в табл. 7.

Таблица 7

Диаметры пор мембранных фильтров различного производства

Фабрика мембранных фильтров СССР		Фабрика мембранных фильтров «Синпор», ЧССР		Sartorius-Membranfilter, ФРГ		Millipore S. A., Франция и США	
обозначения	диаметр пор, мк	тип фильтров Гуфс, обозначение «Синпор»	диаметр пор, мк	обозначения	диаметр пор, мк	обозначения	диаметр пор, мк
6	3—5	1	4±1	SM12500(-MFV)	10	SM	5.0
5	1.2	2	2.5±0.5	—	—	SS	3.0
4	0.9	3	1.5±0.4	SM13005 *	0.8	RA	1.2
3	0.7	4	0.85±0.15	SM11505(-CF)	0.7	SLHA	0.45
2	0.5	5	0.60±0.10	SM11508(-CF)	0.25	SLGS	0.22
1	0.35	6	0.40±0.06	SM11510(-CF)	0.15	AA	0.8
—	—	7	0.30±0.04	SM11530	0.03—0.02	DA	0.65
—	—	8	0.23±0.03	—	—	VC	0.10
—	—	9	0.17±0.03	—	—	VM	0.05
—	—	10	0.12±0.02	—	—	VF	0.01

* Черный фильтр используется при микроскопии в отраженном свете.

Подсчет бактерий в иловых отложениях

Микроскопический анализ численности бактерий в почвах впервые был предложен С. В. Виноградским (1952). В дальнейшем целый ряд авторов вносили в эту методику свои изменения. Наиболее полный учет бактерий в почвах может быть произведен методом Германова в описании А. Н. Наумовой (1933). Он с успехом применяется при учете бактерий в иловых озерных отложениях. В. И. и В. А. Романенко (1971) разработали приготовление препаратов методом микронавесок.

Метод Германова

1. Производят качественную реакцию налия в иловых отложениях карбонатов кальция. Около 1 г ила обрабатывают 5%-й соляной кислотой; вскипание ила указывает на наличие углекислых солей. В этом случае 1 г сырого ила помещают на плотный безазольный фильтр в стеклянной воронке и промывают 0.5%-м раствором соляной кислоты до тех пор, пока промывные воды перестанут давать осадок с 5%-м раствором щавелевокислого аммония.

Если ил от соляной кислоты не вскипает, то данная процедура опускается.

2. При наличии карбонатов кальция 1 г сырого ила кладут на безазольный фильтр с спней чертой в стеклянной воронке и промывают 2 н. раствором хлористого натрия. При этом кальций в поглощающем комплексе замещается натрием и склеивающие свойства комплекса ила разрушаются. Раствор хлористого натрия должен быть предварительно профильтрован через мембранный фильтр № 3, для того чтобы очистить его от бактериальных тел. Промывание ила ведется до тех пор пока промывные воды перестанут давать осадок со щавелевокислым аммонием. После этого фильтр протыкают и осадок ила смывают с фильтра 25 мл 0.0004 н. раствора едкого натрия в колбочку Эрленмейера объемом в 80 мл.

Если кальций в поглощающем комплексе ила отсутствует, то операцию промывания 2 н. раствором хлористого натрия исключают и навеску ила в 1 г сырого веса непосредственно вносят в колбу Эрленмайера и обрабатывают раствором 0.0004 н. едкого натрия, который предварительно также был очищен от бактерий.

3. Болтушку из 1 г ила в 25 мл раствора едкого натрия в колбочке Эрленмайера затыкают резиновой пробкой и взбалтывают 10 мин.

4. Далее болтушку ила разливают в 4 центрифужных пробирки и центрифугируют 3 мин. при 1000 об./мин. При этом минеральные и органические частицы ила осаждаются на дно пробирки, а бактерии, отмытые от форменных частичек ила, остаются в растворе. Экспериментальные исследования Германова показали, что при вышеуказанной концентрации раствора едкого натрия происходит наиболее полное отмывание бактерий от форменных частичек почвы. Раствор из центрифужных пробирок сливают с осадка в мерную колбочку на 100 мл.

5. Затем в центрифужные пробирки вновь наливают по 6—7 мл того же раствора едкого натрия. Осадок в каждой пробирке взбалтывают 3 мин. и снова центрифугируют. Раствор осадка сливают в ту же колбу. Процедуру повторяют 3—4 раза, а в последний раз и осадок из пробирок переносят в ту же мерную колбу и доводят водой объем до метки.

6. При изготовлении микроскопического препарата каплю, соответствующую 0.05 мл полученной болтушки, наносят на обезжиренное предметное стекло и туда же вносят каплю 0.05%-го раствора агар-агара, профиль-

траванного через мембранный фильтр № 3 для очистки от бактерий. Капли перемешивают и мазок распределяют на 6 см². Агар-агар служит для закрепления бактерий на стекле. Препарат подсушивают, фиксируют спиртом и окрашивают несколько часов 5%-м раствором эритрозина на 5%-й карболовой воде.

7. Подсчет бактерий производят при увел. $\times 900$, окуляре $\times 10$ и иммерсионном объективе $\times 90$ с окулярным сетчатым микрометром.

Количество бактерий рассчитывают по формуле

$$x = \frac{6 \cdot 10^6 \cdot b \cdot d}{a \cdot s \cdot e},$$

где x — количество бактерий в 1 г сырого ила; $6 \cdot 10^6$ — площадь мазка, мкм²; b — число капель в 100 мл болтушки; a — навеска ила (в г) для изготовления препарата; d — сумма подсчитанных бактерий в s полях зрения; e — площадь (в мкм²) окулярного сетчатого микрометра при том же увеличении; s — число полей зрения, где подсчитывались бактерии.

Изготовление микроскопического препарата возможно путем фильтрования бактериальной суспензии через мембранный фильтр № 2 или 3, как это показала Н. Б. Заварзина (1955).

С этой целью после изготовления бактериальной суспензии (см. стр. 115) мерную колбу с болтушкой ила взбалтывают и оставляют в покойном состоянии на 1—2 мин. Когда грубые частицы ила оседут, то из оставшегося раствора берут 0.5—3 мл суспензии и вносят в воронку Зейтца с мембранным фильтром № 3. Для более равномерного распределения бактерий на площади фильтра еще до начала фильтрования туда же приливают около 10 мл воды, лишенной бактерий путем предварительного фильтрования через мембранный фильтр. Жидкость полностью фильтруют через мембранный фильтр № 3 и препарат готовят так, как это принято при подсчете бактерий в воде.

На фильтре производят подсчет бактерий (увел. $\times 900$, окуляр $\times 10$ и объектив с масляной иммерсией $\times 90$). Площадь окулярного сетчатого микрометра определяют по объективному микрометру при данном увеличении.

Количество бактерий рассчитывают по формуле

$$x = \frac{e \cdot 10^6 \cdot s \cdot d}{a \cdot ж \cdot z},$$

где x — количество бактерий в 1 г сырого ила; e — площадь фильтра, мм²; 10^6 — переводной коэффициент (мм² в мкм²); s — объем мерной колбы, в которой приготавлилась болтушка ила, мл.; $ж$ — объем профильтрованной воды, мл.

Метод микронавесок

1 г нормально увлажненного (пастообразного) ила помещают в ступку и хорошо перемешивают пестиком. На предметных стеклах корундом очерчивают площадку в 6 см² и тщательно обезжиривают их: промывают в горячей воде с мылом или в растворе стирального порошка, обрабатывают хромовой смесью при нагревании и вновь дистиллированной водой и, наконец, серным эфиром. Перед приготовлением препарата очерченную площадку протирают сухим хозяйственным мылом, которое затем снимают фланелью. Стекло взвешивают на аналитических весах и на

очерченную площадку наносят 5—10 мг ила. При взвешивании ил покрывают маленьким колпачком, приготовленным из кончика пробирки. Другой способ взвешивания ила состоит в том, что в корковую пробку вставляют стеклянную палочку длиной 2—3 см. На стеклянную палочку набирают ил, маленькую пробирку длиной 2—3 см надевают на пробку и взвешивают на аналитических весах. Затем пробку со стеклянной палочкой вынимают, на предметное стекло наносят некоторое количество ила и пробирку с пробкой вновь взвешивают. По разности весов определяют навеску. В эту навеску вносят кашлю безбактериального 0.05%-го раствора агар-агара. Ил и агар тщательно перемешивают бактериологической петлей и равномерно распределяют по очерченной площадке. После высушивания препарат фиксируют в абсолютном спирте и окрашивают карболовым 5%-м раствором основного эритрозина в течение 15—20 мин. при слабом подогреве или сутки без подогрева, затем промывают дистиллированной водой, высушивают и просматривают при масляной иммерсии. Из одного образца готовят 3—5 параллельных препаратов. Приготовление препарата занимает несколько минут. В каждом препарате просчитывают 10—20 полей зрения.

Расчет количества бактерий производят по формуле

$$x = \frac{a \cdot S \cdot 1000}{S' \cdot y \cdot 10^9},$$

где x — количество бактерий в 1 г сырого ила (в млрд); a — количество бактерий на сосчитанной площади препарата; S — площадь (в мкм^2) стекла, на которую нанесен ил; 1000 — пересчет бактерий на 1 г ила; S' — площадь (в мкм^2) препарата, где подсчитывались бактерии в соответствии с окулярной сеткой; y — навеска ила на предметном стекле, мг; 10^9 — коэффициент для выражения численности бактерий, млрд.

Микроскопия в отраженном свете

Отечественные микроскопы МБИ-6 и МБИ-11 приспособлены для микроскопии в отраженном видимом свете как в светлом, так и в темном поле. Специфика метода заключается в том, что освещение объекта осуществляется сверху через специальный эпиобъектив. В лабере микроскопа МБИ-6 имеются четыре ахроматических эпиобъектива — 9×0.20 , 21×0.40 , 40×0.65 и 95×1.0 (масляная иммерсия). Применение объектива 95×1.0 дает возможность изучать мелкие формы микроорганизмов.

Метод рекомендуется для обнаружения и количественного учета некоторых специфических групп микроорганизмов в природных водах.

Для этого через мембранные фильтры № 2 или 3 профильтровывают озерную воду. Фильтры высушивают и разрезают на две равные части. Одну половину фильтра окрашивают эритрозином, другая остается неокрашенной. Обе половины фильтра просвет-

лиют канадским бальзамом (иммерсионным маслом) на предметном стекле и сверху покрывают покровным стеклом. На окрашенной половине фильтра подсчитывают общую численность микроорганизмов в проходящем или отраженном свете в темном поле, причем в последнем случае микроорганизмы видны более рельефно. Неокрашенную половину фильтра смотрят только в отраженном свете. При этом в светлом поле отчетливо видны мелкие фотосинтезирующие бактерии сем. *Chlorobiaceae*. Виды, имеющие зеленую окраску, светятся голубым светом и легко могут быть узнаны и подсчитаны. К таковым относятся *Chlorobium limicola*, *Pelodictyon clathratiforme*, *P. luteolum*, *Prosthecochloris aestuarii*, *Ancalochloris perfilievii*, консорциум *Chlorochromatium aggregatum* и *Ch. glebulum*.

Виды, имеющие коричневую окраску, светятся желтовато-зеленым цветом — *Chlorobium phaeobacteroides*, *Ch. phaeovibrioides*, *Pelodictyon phaeum* и консорциум *Pelochromatium roseum*. В отраженном свете в светлом поле в клетках отчетливо видны газовые вакуоли, как яркоблестящие включения.

Серные пурпурные бактерии не выявляются в светлом поле, но видны в темном поле и имеют розовую окраску. Включения серы хорошо видны и отражают белый свет.

Кроме фотосинтезирующих бактерий в отраженном свете в светлом поле видны простейшие, синезеленые водоросли, железобактерии, *Metallogenium* и водные бактерии с газовыми вакуолями: нитчатые родов *Peloploca* и *Pelonema*, одноклеточные *Rhe-nobacter vacuolatum*, *Microcycylus aquatica*, некоторые виды *Ancalomicrobium* и *Prosthecomicrobium*.

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ УДВОЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ БАКТЕРИЙ, ВРЕМЕНИ ГЕНЕРАЦИИ И ПРОДУКЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОМАССЫ

Определение количества бактерий методом прямого счета дает наиболее полное представление о численности бактерий лишь в данный момент и является результирующей величиной их размножения и выедания простейшими и зоопланктоном.

Чтобы составить себе представление о значении бактерий в трофологических взаимоотношениях в водоеме, необходимо знать быстроту их размножения и скорость выедания бактерий зоопланктоном.

Способ определения быстроты размножения бактерий или времени генерации был разработан применительно к чистым культурам бактерий и основывается на том, что бактерии размножаются в геометрической прогрессии. А. С. Разумов (1948) предложил этот метод для определения времени генерации сапрофитных бактерий, растущих на МПА, в водоемах. Этот же метод был

применен М. В. Ивановым (1955) для определения времени генерации общего количества бактерий в водоемах.

Последнее время стало очевидно, что в водоемах одни виды бактерий размножаются быстро, другие медленно, третьи совсем не размножаются. Поэтому в случае исследования водоемов правильное говорить о времени удвоения численности бактерий, а времени генерации придать другое значение.

Так как наблюдается большой разницей в буквенных обозначениях формул, мы приводим те обозначения, которых будем придерживаться в дальнейшем.

g — время генерации бактерий, часы; D — время удвоения численности бактерий, часы; t — время длительности опыта между двумя анализами по определению численности бактерий, часы; 2 — показатель размножения бактерий в геометрической прогрессии (иногда вместо 2 берут 1.8 — для внесения поправки на мертвые бактерии, количество которых считается равным 20%); b_0 — исходное количество бактерий или их биомасса в нефилтрованной воде, мг С/л; B_0 — численность или биомасса бактерий в нефилтрованной воде по истечении некоторого времени (в конце опыта), мг С/л; b_f — исходное количество бактерий или их биомасса в фильтрованной воде, мг С/л; B_f — численность или биомасса бактерий в фильтрованной воде по истечении некоторого времени (в конце опыта), мг (С/л); \bar{B}_0 — средняя геометрическая численность или биомасса бактерий $\bar{B}_0 = (b_0 \cdot B_0)^{1/2}$; K — коэффициент скорости изменения численности бактерий ($K = \ln \frac{2}{g}$ — в случае положительного прироста бактерий и $(-) K = \ln \frac{0.5}{g}$ — в случае отрицательного прироста; P_b — продукция численности бактерий или их биомассы, мг С/л; P_c — вес бактериальной биомассы, мкг С/л.

Определение времени удвоения общей численности бактерий

1. Пробу воды объемом около 0.5 л отбирают из водоема в чистую посуду.
2. Для удаления зоопланктона воду фильтруют в чистую склянку объемом 250 мл через прокипяченный, сложенный вдвое мельничный газ № 76, помещенный в воронку, обработанную кипящей водой.
3. В этой воде методом прямого счета на мембранных фильтрах определяют общую численность бактерий (стр. 112).
4. Склянку с профильтрованной водой помещают обратно в водоем или в аквариум на палубе судна, где и выдерживают некоторое время при температуре и освещении, близким к естественным, после чего анализ численности бактерий повторяют.
5. Выдерживание склянок должно быть равно времени, в течение которого достоверно улавливается разница между исходной и конечной численностью бактерий в пробе. Летом можно рекомендовать следующее время: для евтрофных водоемов 1—6 час., для мезотрофных — 6—18 час., для олиготрофных — 24—48 час. При низких температурах весной и осенью время выдерживания проб увеличивается в несколько раз.
6. Расчет времени удвоения численности бактерий и времени генерации производят по формуле

$$D = \frac{t \cdot \lg 2}{\lg B_f - \lg b_f}.$$

При определении скорости размножения сапрофитных бактерий посуда, фильтрация и отбор проб на посевы должны производиться асептически и в стерильную посуду. Расчет производят по той же формуле, но только вместо значений B и b подставляется соответственно количество колоний, выросших на твердой среде. В данном случае можно говорить о времени генерации сапрофитных бактерий, хотя термин «время генерации» сам по себе неудачен.

Определение продукции бактериальной биомассы

При определении продукции бактериальной биомассы пробу воды из водоема делят на две порции. Одну порцию фильтруют, и в ней определяют время удвоения численности бактерий (см. стр. 119), а другую хранят такое же время и при тех же условиях нефилтрованной. В ней также определяют исходное (b_0) и конечное (B_0) количество бактерий по прямому счету.

Расчет продукции бактерий (или их биомассы при переводе численности в биомассу) производят по формулам, предложенным А. П. Романовой и А. И. Зоновым (1964) или О. М. Кожовой (1964). Приводим упрощенный вариант этих формул (Гак, 1967)

$$P_b = \frac{\pm K (B_f - B_0)}{\frac{B_f}{b_0} - 1}.$$

Как указывает Г. Г. Винберг (1971), данной формулой можно пользоваться лишь в тех случаях, когда исходная численность бактерий в фильтрованной и нефилтрованной воде равны ($b_0 = b_f$). Данное равенство чаще всего не нарушается если, как описано выше, для фильтрации воды используется мельничным газ № 76.

В противном случае ($b_0 \neq b_f$) Г. Г. Винберг предлагает другую формулу.

$$P_b = K' \cdot \bar{B}_{00}$$

где

$$K' = \frac{0,693}{g} = \frac{\lg B_0 - \lg b_0}{0,4343 \cdot t} = \frac{\lg \frac{B_f}{b_f} - \lg \frac{B_0}{b_0}}{0,4343 \cdot t}$$

7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЪЕМА И ВЕСА БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОМАССЫ

Определение объема бактериальной массы. Объем бактериальной массы рассчитывают, исходя из общего количества бактерий и среднего объема бактериальных клеток.

$$V = N \cdot v,$$

где V — объем бактериальной массы, мкм^3 ; N — количество бактерий в 1 л воды; v — объем одной бактериальной клетки, мкм^3 .

Объем отдельных клеток рассчитывают на основании измерения под микроскопом с помощью окулярного линейчатого или винтового микрометра линейных размеров бактерий — длины и диаметра.

В тех случаях, когда в препаратах имеются разнообразные формы бактериальных клеток, необходимо производить определение размера и численности разных форм и отдельно для каждой из них делать расчет биомассы, а результаты суммировать.

Объем клеток рассчитывается, исходя из геометрической формы тел, — шара, цилиндра, эллипсоида.

При определении размера сырых бактериальных клеток расчеты выражаются в объеме сырой биомассы, при установлении размера сухих бактерий в результате должен получиться объем сухой биомассы. Эти величины считались идентичными, пока А. Г. Родина (1965) не указала на основании работ Найзи (Knausi, 1951) на то, что объем сухих бактерий значительно уменьшается по сравнению с сырыми.

Определение веса бактериальной массы. Вес бактериальной массы равен: $P_c = V \cdot d = N \cdot v \cdot d$, где P_c — вес, мг; V — объем бактериальной массы, мм³; d — удельный вес.

Для сырых бактериальных клеток удельный вес принимается за 1.06, и конечный результат выражается в миллиграммах сырой биомассы. Этой же формулой с удельным весом 1.06 необходимо пользоваться при определении веса мелких бактерий, преобладающих, как правило, в большинстве водоемов, и размеры которых находятся на границе разрешающей способности световых микроскопов (0.2 мкм) или близки к ней (0.3 мкм). Факт усыхания этих бактерий не установлен. Вероятно, при высыхании их размеры уменьшаются, но, с другой стороны, известно, что при окрашивании размеры клеток, наоборот, несколько увеличиваются. При использовании винтового микрометра с окуляром $\times 15$ контуры маленьких бактериальных клеток становятся нечеткими и измерение может привести скорее к завышению размера клеток.

Для крупных бактериальных клеток В. И. Романенко и Э. Г. Добрыниным (1972) определен удельный вес сухой биомассы, который оказался равным 1.6. Следовательно, у крупных бактериальных клеток объем можно рассчитать на основании измерения размеров сухих клеток, а вес определить по вышеприведенной формуле с использованием $d=1.6$. Результат будет выражен в миллиграммах сухой биомассы.

При расчетах сырой или, наоборот, сухой биомассы принимается, что сухой вес составляет 10—15% от сырого.

Необходимо помнить, что все приведенные выше расчеты носят несколько условный характер, в отдельных случаях возможны ошибки в 1.5—2 раза.

Биомассу бактерий можно выразить в углероде, исходя из формулы, предложенной В. И. Романенко (1964а).

$$P_c = \frac{N \cdot v \cdot 15 \cdot 10^{-6}}{2 \cdot 100},$$

где P_c — вес бактериальной биомассы, мкг С/л; N — количество бактерий в 1 л воды; 15 — процент сухого вещества от сырой биомассы; 10^{-6} — вес 1 мкм³ сырой биомассы бактерий (в мкг) при удельном весе равном 1; 2 — содержание углерода от сухой биомассы; 100 — сырая биомасса, %.

8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОМАССЫ РАДИОУГЛЕРОДНЫМ МЕТОДОМ

В пробе воды из водоема с помощью радиоактивного углерода C^{14} в составе $NaHC^{14}O_3$ определяется темновая ассимиляция CO_2 (стр. 148). Данная величина принимается за 6% от продукции бактериальной биомассы. Тогда продукция биомассы общего числа бактерий (P_c) определяется из соотношения

$$P_c = \frac{C_a \cdot 100}{6},$$

где C_a — темновая (гетеротрофная) ассимиляция CO_2 , мкг С/л за время опыта (Кузнецов и др., 1966).

9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ УДВОЕНИЯ БИОМАССЫ БАКТЕРИЙ И ВРЕМЕНИ ГЕНЕРАЦИИ ПО ГЕТЕРОТРОФНОЙ АССИМИЛЯЦИИ CO_2

Наряду с определением продукции бактериальной биомассы часто возникает необходимость определить скорость, с которой размножаются бактерии. По гетеротрофной ассимиляции CO_2 она может быть определена двумя способами.

Комбинированный метод

Сущность метода заключается в том, что исходная биомасса бактерий рассчитывается по их численности методом прямого счета по Разумову в нефилтрованной воде и среднему размеру клеток, определенному с помощью микрометра. Прирост биомассы подсчитывается по гетеротрофной ассимиляции CO_2 (стр. 148). Расчет времени удвоения бактерий может быть произведен по формуле

$$D = \frac{t \cdot \lg 2}{\lg (b_0 + P_c) - \lg b_0},$$

где D — время удвоения численности бактерий, часы; t — длительность опыта по определению прироста биомассы бактерий по гетеротрофной ассимиляции CO_2 , часы; b_0 — исходная биомасса бактерий в 1 л воды, мкг С/л; P_c — продукция бактериальной биомассы, мкг С/л за время t .

По времени удвоения ассимиляции CO_2

Этим методом (Романенко, 1969) хорошо учитывать скорость размножения водных бактерий в чистых культурах при развитии на белковых питательных средах. При анализе в воде озер и во-

дохранилищ с помощью этого метода определяется лишь скорость активно размножающихся бактериальных клеток. При длительной экспозиции проб воды с изотопом время удвоения численности бактерий приближается к времени удвоения, определяемому по прямому счету (Иванов, 1955).

Сущность данного способа состоит в том, что при инокуляции среды в нее одновременно вносят радиоактивный углерод C^{14} ($Na_2C^{14}O_3$). По мере развития культуры часть среды фильтруют через мембранный фильтр № 3, на котором затем определяют радиоактивность бактериальных клеток. Анализ необходимо сделать за два промежутка времени, для того чтобы знать некоторую исходную радиоактивность бактерий и радиоактивность по прошествии какого-то времени.

Для расчета скорости размножения в уже известную формулу вместо численности подставляется величина радиоактивности бактерий (в имп./мин.) или количество ассимилированного ими углерода CO_2 , мкг С.

$$D = \frac{t \cdot \lg 2}{\lg R - \lg r},$$

где D — время удвоения ассимиляции CO_2 , которое соответствует времени генерации бактерий — g , часы; t — время между двумя определениями радиоактивности бактерий, часы; r — радиоактивность бактерий при первом анализе, имп./мин.; R — радиоактивность бактерий по прошествии t часов после первого анализа, имп./мин.

10. МЕТОД ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКИХ СНИМКОВ БАКТЕРИЙ ИЗ ВОДЫ И ОЗЕРНОГО ИЛА

Методы световой микроскопии, в том числе фазово-контрастной и аноптральной, основаны на использовании видимой части спектра света с длиной волны около 550 мкм. Отсюда максимальная разрешающая способность, которая может быть получена при помощи светового микроскопа, не превышает 0.2 мкм. Иными словами, все объекты менее 0.2 мкм в световой микроскопии невидимы.

Электронная микроскопия основана на применении пучка электронных лучей с длиной волны около 0.005 мкм. Это увеличивает разрешающую способность микроскопических устройств до 2—5 Å. Применение электронной техники к изучению микрофлоры озер сразу показало наличие целого мира микроорганизмов, плохо различимых в световом микроскопе.

Для исследования биологических объектов под электронным микроскопом обычно используются увеличения в 10 000—50 000 раз. Если нужно, дальнейшее увеличение уже производится при фотоувеличении с электронных негативов.

Изготовление электронномикроскопических препаратов из воды

Пробы воды отбирают батометром и выливают в чисто вымытую посуду. Изготовление самого препарата для микроскопирования следует делать в тот же день.

Подготовка естественной воды для изготовления электронных препаратов имеет большое значение. Естественная вода часто бывает сильно загрязнена всякими посторонними частицами минерального и органического происхождения, создающими мутность. Поэтому из таких вод получаются препараты, негодные для просмотра под электронным микроскопом. Вследствие этого озерную воду сначала следует фильтровать через мембранный фильтр № 6 с порами в 7—10 мкм, затем 10 мл полученного фильтрата сгустить до 1 мл при пропускании через мембранный фильтр № 1 или 2 с порами в 0.1 мкм. Сконцентрировать микроорганизмы из воды можно также, центрифугируя воду в течение 30 мин. со скоростью 15 тыс. об./мин. Такие концентрированные суспензии бактерий из естественных вод уже можно использовать для изготовления препаратов.

Техника изготовления электронномикроскопических препаратов резко отличается от техники, применяемой в световой микроскопии. Это обуславливается тем, что подложка, на которую наносится исследуемый объект, должна быть прозрачной для пучка электронных лучей. Такие подложки обычно изготавливают из коллодия или формвара толщиной в 10—15 мкм и помещают на медные сеточки диаметром около 3 мм в зависимости от марки электронного микроскопа.

Изготовление препаратов состоит в следующем. На дно чашки Петри на предметное стекло помещают ряд медных сеточек, которые предварительно очищают кипячением в 10%-м растворе аммиака с последующим тщательным ополаскиванием водой. Можно очищать также сетки, погружая их на 1—2 мин. в концентрированную соляную кислоту и далее отмывать водой.

Для удобства спуска воды из чашки у ее дна впаивают отводную стеклянную трубочку (рис. 26). На нее надевают каучуковую трубку с моровским зажимом. Чашку заполняют дистиллированной водой, при всплывании сеточки пинцетом погружают обратно. На поверхность воды наносят пастеровской пипеткой каплю 1%-го раствора в амилцетате предварительно высушенного коллодия. Капля растекается и на поверхности воды образуется тончайшая пленочка из коллодия. Первую пленку удаляют пинцетом с целью очистки поверхностного слоя воды от бактерий, и на поверхность воды наносят вторую каплю коллодия. На эту пленочку точно над сетками, как показано на рис. 26, наносят капельки бактериальной суспензии и оставляют при 28° от 17 до 14 час. При этом происходит диализ, из капли через пленку

диффундируют в бидистиллированную воду все соли, мешающие получению хорошего электронномикроскопического изображения бактериальных организмов. Для фиксации микроорганизмов применяют формалин: полоску фильтровальной бумаги, смоченную формалином, накладывают на внутреннюю поверхность крышки чашки Петри, в которой проводится диализ. По окончании диализа зажим на боковом отростке открывают, дистиллированная вода из чашки вытекает, подложка из коллодия оседает на дно чашки, а капли на подложке попадают как раз на медные сеточки. В

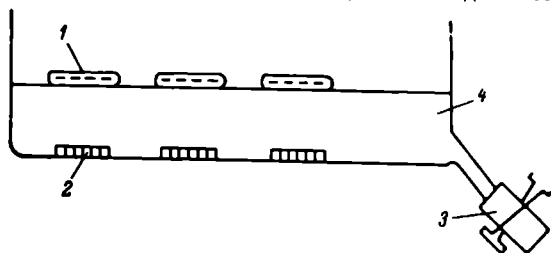


Рис. 26. Установка для диализа культуральной жидкости перед нанесением ее на сеточки для электронного микроскопа.

1 — капля жидкости в чашке Петри, нанесенная на коллодиевую пленку; 2 — медная сеточка для электронного микроскопа; 3 — винтовой зажим; 4 — дистиллированная вода.

случае, когда нет чашки с отростком, можно использовать обычную чашку Петри, а воду отсасывать пипеткой. После подсыхания капель сеточки вместе с осевшей на них подложкой осторожно вынимают из чашки Петри.

В случае присутствия в воде закисного железа, сероводорода или большого количества органического вещества, оседающих на пленке при окислении и создающих темный фон, лучше вести процесс изготовления препаратов в 2 стадиях.

1. Предварительно очищенные сеточки помещают на предметном стекле на дно обычной чашки Петри, заливают водой, на поверхность воды наносят капельку коллодия, через 10 мин. осторожно при помощи пипетки из чашки Петри отсасывают воду. Коллодиевая пленка чистая от бактерий оседает на сеточки, подсушивается, и сеточки с чистой подготовленной подложкой помещают в держатель. Для укрепления коллодиевой пленки ее целесообразно напылить углеродом.

2. Чашку Петри заполняют бидистиллированной водой, на нее наносят капельку раствора коллодия. Через 20—30 мин. на поверхность образовавшейся пленки наносят несколько капель бактериальной суспензии. Затем последняя подвергается диализу от 17 до 24 час.

После этого из каждой капли стерильной пастеровской пипеткой (после осторожного взмучивания диализованной капли) берут небольшие капельки и наносят на сетки с подложкой,

подготовленные вышеуказанным способом. При этом способе капельки подсыхают на готовых сеточках. В том и другом способе изготовления препарата есть свои преимущества.

Контрастирование препаратов. При незначительной толщине бактериальных объектов они могут быть слишком прозрачны для пучка электронов. Поэтому существует ряд методов осаждения тончайшего слоя металла на поверхности бактериального организма, которые позволяют сделать его более контрастным для пучка электронов. Остановимся на 2 принципиально разных методах оттенения препарата.

1. Метод напыления заключается в том, то препараты помещают под колпак, из-под которого выкачивается воздух до 10^{-8} мм рт. ст. Под колпа-

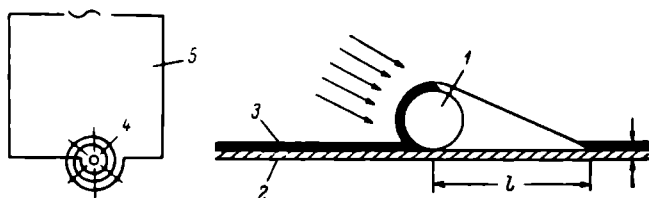


Рис. 27. Схема напыления металла на объект исследования под электронный микроскоп.

1 — объект; 2 — поддерживающая объект коллоидная пленка; 3 — оттеняющий напыленный слой металла; 4 — источник испарения металла; 5 — нить накала, разогревающая металл, l — длина тени объекта.

ком имеется вольфрамовая спиральная нить, которая нагревается до 1500° . Внутри спирали помещают испаряемый металл в виде порошка или гранул — хром, платина, золото и т. п. Нить нагревается электрическим током и при соответствующей температуре металл испаряется, атомы его разлетаются прямолинейно во все стороны. Если на их пути поместить на несколько секунд объект под углом в $15-20^{\circ}$, то на его поверхности осядет слой металла (рис. 27) разной толщины (Никитин и др., 1966).

На поверхность объекта, расположенного перпендикулярно к направлению полета частиц, осаждается наиболее толстый слой металла. В тех местах, где объект экранирует полет пучка частиц металла, образуются тени (Бирюзова и др., 1963). Вследствие того, что разные части объекта по-разному воспринимают пары металла, толщина его осаждения различна, а это в свою очередь повышает контрастность изображения.

2. Контрастирование препарата производят солями тяжелых металлов. Имеются негативный и позитивный способы контрастирования препаратов с помощью фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК). Негативный способ состоит в том, что на сеточку с подсохшей каплей воды наносят каплю 1%-го раствора ФВК при $pH=7.2$. Спустя 1—5 сек. каплю красителя удаляют фильтровальной бумажкой и сетку подсушивают. При таком способе контрастирования соли ФВК оседают на пленку, а выступающие на ней объекты остаются светлыми. Этим способом особенно удобно оттенять поверхностные структуры микроорганизмов.

Позитивный способ контрастирования заключается в том, что при $pH=3.4$ или 1.7 соли ФВК химически связываются с белковыми

структурами клетки, повышая их контрастность. При этом фон остается белым. Далее каплю 1%-го раствора ФВК при $pH=1.7$ наносят на 2—4 сек. на сетку с препаратом и затем быстро подсушивают, располагая ее пленкой вниз на фильтровальную бумагу. Фон остается в этом случае светлым, контрастными выглядят белковые структуры. Поскольку при $pH=1.7$ ФВК разрушает некоторые структуры клеток, можно использовать для позитивной окраски 1%-ю ФВК при $pH=7.2$, как при негативном способе окраски с той разницей, что спустя 5—10 сек. после нанесения ФВК сетки с пленкой дважды тщательно отмывают в дистиллированной воде в течение 4—5 сек.

В этом случае фон остается светлым, а ФВК контрастирует объекты. В качестве протравы можно употреблять уранилацетат, соли свинца, осмиевую кислоту и т. п. Контрастность бактериальных препаратов, обработанных таким образом, значительно повышается.

Изготовление препаратов из высоко концентрированных рассолов. Когда имеют дело с водой большой солености, при диализе суспензии бактерий, подготовленной для изготовления препарата, галофильные бактерии сильно деформируются или вообще лопаются. В этих случаях для приготовления препаратов пригоден метод «теплого крепления» бактерий к коллоидной пленке, разработанный С. Б. Стефановым (1962). Каплю исследуемой жидкости без какой-либо очистки вносят в маленькую кювету из алюминиевой фольги. На каплю кладут предметную сетку с пленкой подложкой вниз, так чтобы она плавала на поверхности испытуемой капли. Кювету с каплей переносят в сосуд с водой, нагретый до $50-55^{\circ}$ таким образом, чтобы кювета плавала на поверхности. Кювету с каплей жидкости, содержащей исследуемые бактерии, и плавающую на ней сетку с пленкой нагревают до указанной температуры. Однако нагревание пленки идет слабее, так как она одновременно охлаждается комнатным воздухом. При этом часть бактерий прикрепляется к коллоидной пленке на сетке. Через 2—4 мин. в зависимости от характера объекта исследования сетку снимают с капли и, не промывая, мокрой стороной кладут на стопку фильтровальных бумажек, которые мгновенно отсасывают всю жидкость с поверхности пленки. Исследуемые бактерии, прикрепившиеся к пленке, остаются на ее чистом фоне. Для контрастирования можно применять 1%-й раствор фосфорновольфрамовой кислоты с $pH=1.7$. Каплю этого раствора наносят на пленку сразу после снятия ее с тепловой ванны и через 1—2 сек. сетку кладут на фильтровальную бумажку вышеописанным способом.

Метод адсорбции на сетке. В основу изготовления бактериальных препаратов для электронного микроскопа из воды естественных водоемов авторы (Marshall et al., 1971) использовали свойство бактерий адсорбироваться на различных твердых субстратах. Для этого металлические сетки, покрытые формваровой пленкой, помещают на 1 час в воду, взятую в чистую посуду из водоема. По прошествии этого времени сеточки споласкивают дистиллированной водой, несколько минут фиксируют в 2.5%-м растворе формалина, вновь споласкивают и высушивают. Даль-

нейшее контрастирование препарата производят, как описано выше. Время выдерживания сеточек в воде для прикрепления бактерий можно варьировать.

Хирш и Панкрац (Hirsch, Pankratz, 1970; Hirsch, 1972) для изучения естественной микрофлоры использовали метод обрастания бактериями предметов при погружении их в водоем. С этой целью 4—5 предварительно очищенных медных или никелевых сеточек в 200 меш помещают в ряд на формваровую или коллодиевую пленку, находящуюся на поверхности дистиллированной воды в чашке Петри. Затем формваровую пленку вместе с сеточками опрокидывают на чистое предметное стекло, так чтобы сеточка находилась под пленкой. Край высушенной пленки прикрепляют к стеклу кусочками пластыря, и всю установку помещают в водоем на срок от 1 до 24 суток или в сосуд с испытуемой водой.

При извлечении стекол нужно обращать внимание, чтобы на них не попал нейстон с поверхностной пленки воды из водоема. Не касаясь формваровой пленки на сеточках, стекла быстро высушивают в вертикальном положении. Перед просмотром под электронным микроскопом препараты подвергаются напылению под углом 11—18°. Можно использовать и коллодиевые пленки.

Изготовление электронномикроскопических препаратов из ила

Подготовка суспензии ила для изготовления препарата состоит в следующем. Образец ила в отношении 1 : 10 смешивают с 0.0004 н. раствором едкого натра и перемешивают 10 мин. на магнитной мешалке. После 5-минутного отстаивания верхний слой жидкости используют для изготовления электронномикроскопических препаратов. Суспензию фильтруют через крупнопористый мембранный фильтр № 6, из фильтрата готовят препарат, как это было указано для воды. Для этого несколько капель суспензии наносят на коллоидную пленку, находящуюся на поверхности воды, налитой в чашку Петри. После 17—24-часового диализа воду из чашки удаляют и пленка вместе с каплями отдиализированной суспензии оседает на чистые предметные сетки, которые заранее были помещены на дно чашки. После подсушивания на воздухе сетки с препаратами обычно напыляют хромом или обрабатывают ФВК (см. стр. 126).

Микроскопирование

Просмотр под электронным микроскопом препаратов, изготовленных из воды или из ила, ведется в следующей последовательности: 1) располагают сеточки с нанесенным препаратом на объектодержатель, который устанавливают внутри микроскопа; 2) создают полный вакуум внутри микроскопа; 3) включают

электронные пушки; 4) производят фокусирование объекта; 5) просматривают препарат на флюоресцирующем экране и выбирают подходящие объекты для съемки; 6) подбирают соответствующее увеличение объекта; 7) делают фотосъемку.

11. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА РАДИОАВТОГРАФИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА АВТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

Количественный учет мезотрофных бактерий, например окисляющих водород и газообразные углеводороды, представляет затруднения. Применение метода разведений, по-видимому, дает заниженные результаты по той причине, что развитие данной группы бактерий в жидкой питательной среде начинается зачастую лишь при обильном заражении. Как правило, от одной клетки развитие не происходит. Метод учета на элективной агаризованной среде в чашках Петри в атмосфере смеси углеводородов с воздухом тоже малопригоден, так как в этих условиях, кроме метанооксиляющих бактерий, на поверхности агара вырастает ряд колоний олигокарбофилов, не способных окислять метан.

В связи с этим при исследовании воды и грунтов Рыбинского водохранилища В. И. Романенко (1959) разработана методика, основанная на применении метода радиоавтографии.

Метод основан на способности указанных видов бактерий к автотрофному росту. Развиваясь на минеральной среде с радиоактивным карбонатом натрия ($\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$), они образуют радиоактивные колонии, легко образующие радиоавтографы на фото-пленке.

1. 1—5 мл воды профильтровывают через предварительно прокипяченные мембранные фильтры № 3. Последние раскладывают в чашках Петри на среду Романенко (№ 92). Перед заполнением средой в чашки Петри вносят по 1 мл радиоактивного бикарбоната натрия ($\text{NaHC}^{14}\text{O}_3$) с удельной активностью 0.2—0.3 мкКи или 10^5 имп./мин. в 1 мл.

При учете автотрофных бактерий в иле или почве делают разведение ила 1 : 200 на стерильной воде. В фильтровальную воронку предварительно наливают несколько миллилитров стерильной воды для более равномерного распределения бактерий и вносят одну или несколько капель болтушки ила. Фильтры раскладывают в чашки Петри на соответствующие среды.

2. Чашки с фильтрами помещают в эксикаторы, наполненные на $\frac{1}{3}$ метаном и на $\frac{2}{3}$ воздухом. В случае количественного учета бактерий, окисляющих водород, эксикаторы, где инкубируются чашки Петри с фильтрами, наполняют смесью водорода с воздухом. При учете тионовых бактерий в среду добавляют тиосульфат (см. среду № 66).

Через 5—10 суток на фильтрах при 28—30° вырастают микроколонии размером от 0.1 до 1 мм. Метанооксиляющие или иные из вышеперечисленных групп бактерий в процессе роста усваивают из питательной среды меченую углекислоту и колонии этих бактерий становятся радиоактивными.

Можно вместо добавки в среду меченого карбоната колонии бактерий выращивать на фильтрах в эксикаторе в атмосфере радиоактивной углекислоты. Для этого чашки Петри с фильтрами помещают в эксикатор. В каждую чашку между крышкой и дном вставляют жгут из бумаги для

возможности обмена атмосферой внутри чашки и эксикатора. На дно эксикатора наливают 10 мл 0.1 н. серной кислоты, и туда же ставят стаканчик с меченым карбонатом натрия с активностью 5—10 мкКи. После того как в эксикаторе будет создана соответствующая атмосфера, резким движением опрокидывают стаканчик с меченым карбонатом.

3. Затем фильтры снимают со среды, высушивают на фильтровальной бумаге и обрабатывают 1%-й соляной кислотой для удаления радиоактивного карбоната, который мог попасть на фильтр из питательной среды. Обработку можно вести в чашках Петри, в которые наливают раствор кислоты, и фильтры осторожно, чтобы не смыть колонии бактерий, пинцетом раскладывают на поверхность жидкости. Далее фильтры таким же образом промывают от соляной кислоты в чашках с дистиллированной водой. Данную обработку следует производить под тягой. После этого фильтры вторично высушивают и приклеивают нижней стороной к полоске плотной бумаги шириной в 35 мм, соответствующей по ширине киноплёнке. На каждом фильтре ставят номер клеём, в который добавлено некоторое количество радиоактивного карбоната натрия.

В темноте к полоске бумаги с приклеенными фильтрами прикладывают эмульсионной стороной обыкновенную 35-миллиметровую фотоплёнку с чувствительностью 65—90 ед. госта. Чтобы фильтры с выросшими на них колониями плотно прилегали к эмульсионному слою киноплёнки, их (в вышеуказанном положении) туго наматывают на катушку от кассеты. Катушку при этом заворачивают в темную бумагу и в таком состоянии она остается в темноте в течение некоторого времени. В это время радиоактивные колонии бактерий воздействуют на фотоэмульсию.

При определении времени экспозиции опытных фильтров для данной концентрации изотопа, состава среды и чувствительности фотоплёнки необходимо определить срок, в течение которого контрольные фильтры с сапрофитными колониями начинают давать бледные отпечатки, а опытные фильтры — хорошо выраженные радиоавтографы. Контрольные фильтры (несколько штук) находятся в отдельном эксикаторе в таких же условиях, но из атмосферы или среды исключают источник энергии — водород, метан, тиосульфат и др. Обычно оптимальное время экспозиции равняется 4—7 суткам.

4. После определенного времени экспозиции плёнку вынимают, проявляют в контрастном проявителе, закрепляют в растворе гипосульфита, тщательно промывают, высушивают и отпечатки микроколоний подсчитывают под бинокуляром МБС-1. Пересчет производят в соответствии с количеством профильтрованной воды.

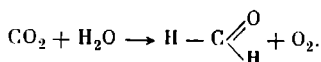
Сапрофиты или совсем не образуют отпечатков, или при более продолжительной экспозиции появляются слабые отпечатки. Хорошие отпечатки дают водородокисляющие и тионовые бактерии. При использовании электролитных питательных сред для получения радиоавтографов содержание карбонатов в них необходимо свести до минимума — 20—100 мг/л.

ПРОДУКЦИЯ И ДЕСТРУКЦИЯ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА В ВОДОЕМАХ

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКЦИИ И ДЕСТРУКЦИИ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА В ВОДОЕМАХ

Единственным первоисточником образования органического вещества в водоемах служит фотосинтетическая деятельность зеленых организмов, в частности планктонных водорослей.

На одну молекулу потребленной углекислоты выделяется одна молекула кислорода:



1 г освобожденного кислорода соответствует 0.93 г синтезированной глюкозы, при этом потребляется 3.5 ккал. солнечной энергии. Таким образом, по выделению свободного кислорода в процессе фотосинтеза мы можем судить о количестве образовавшегося органического вещества.

В связи с этим взаимозаменимое количество веществ и энергии, рассчитанное по вышеприведенному уравнению, может быть представлено следующими величинами (Винберг, 1960) (табл. 8).

Но в естественных условиях, когда на 1 молекулу углекислоты выделяется 1 молекула кислорода, ассимиляционный коэффициент $\left(\frac{\text{O}_2}{\text{CO}_2} = 1\right)$ наблюдается только при синтезе углеводов, а обратная величина — дыхательный коэффициент $\left(\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 1\right)$ — лишь при дыхании за счет углеводов. Наиболее вероятной величиной среднего ассимиляционного коэффициента (АК) в природных условиях следует считать 1.25, что соответствует дыхательному коэффициенту (ДК) 0.80.

Другой путь определения количества органического вещества, образовавшегося в процессе фотосинтеза, заключается в том, что в испытуемый объем воды вводят некоторое количество углекислоты, содержащей радиоактивный углерод C^{14} . Тогда в про-

Таблица 8

Соотношение между величинами O_2 , CO_2 и энергией в процессе фотосинтеза и деструкции при АК и ДК, равным 1

Исходные величины	O_2		CO_2		С, мг	Глюкоза, мг	Энергия, кал.
	мг	мл	мг	мл			
1 мг O_2	—	0.6997	1.375 **	0.6997 **	0.3750 **	0.9375	3.510
1 мл O_2	1.4292	—	1.9652 **	1.0000 **	0.5359 **	1.3399	5.017
1 мг CO_2	0.7273 *	0.5089	—	0.5089	0.2727	0.6818	2.553
1 мл CO_2	1.4292 *	1.0000 *	1.9652	—	0.5359	1.3399	5.017
1 мг С	2.6667 *	1.8660 *	3.6667	1.8660	—	2.5	9.361
1 кал.	0.2849	0.1992 *	0.3914	0.1992	0.1068	0.2671	4.186 дж

Примечание. Если ДК и АК не равны единице, то величину со значком * следует помножить на АК или разделить на ДК, а величину со значком ** — разделить на АК или помножить на ДК.

цессе фотосинтеза образуется радиоактивное органическое вещество, которое легко обнаруживается при помощи счетчика Гейгера—Мюллера.

Радиоизотопный метод более удобен и обладает высокой чувствительностью, что позволяет производить анализы в бедных водоемах и на таких глубинах, где величина первичной продукции органического вещества слишком мала и не учитывается кислородным методом, однако он не учитывает органических веществ, выделяющихся из клеток при фотосинтезе.

Определение продукции и деструкции органического вещества в водоемах методом Винберга

Г. Г. Винберг (1934—1939) предложил определять скорость образования и деструкции органического вещества по изменению содержания кислорода в замкнутом объеме воды, помещенном в условия, максимально приближающиеся к естественным.

Разница между содержанием кислорода в исходной воде в момент заполнения склянок и его содержанием по истечении суток в затемненной склянке соответствует потреблению кислорода на окисление органического вещества и составляет деструкцию.

Разница между содержанием кислорода в светлой и затемненной склянках после суточной экспозиции в озере показывает валовую величину фотосинтеза фитопланктона.

Установка со склянками в озере изображена на рис. 28.

Наибольшую ценность для сравнения степени трофии различных водоемов имеют данные, получаемые при установке склянок у самой поверхности, так как на других горизонтах

интенсивность фотосинтеза в первую очередь определяется количеством света, проникновение которого в воду водоемов неодинаково. Большую ценность представляют также данные по продукции под 1 м² водоема.

Оборудование. Слянки объемом 120—160 мл обязательно должны быть из белого стекла с притертыми пробками. Для определения величины деструкции можно пользоваться такими же слянками, но обязательно закрывать их в двойной слой черной клеенки.

Укреплять слянки в водоеме можно, подвешивая их к заблаговременно прикрепленным в нужных местах троса кольцам, а также с помощью заранее прикрепленных к слянкам проволочных крючков. Процедуру подвешивания слянок необходимо вести быстро и надежно.

Анализ растворенного в воде кислорода ведется методом Винклера (см. стр. 176). При указанном объеме слянок достаточно при фиксации кислорода добавлять по 0.5 мл целочного раствора нитристого калия и хлористого марганца. После осаждения осадка, растворения его кислотой и выделения иода удобно для титрования гипосульфитом брать не весь объем, а 50 или 100 мл раствора. При колебании объема слянок от 120 до 140 мл ошибка титрования из-за разности объемов не превышает 0.25%.

Работа на водоеме. Заранее следует подготовить установку для подвешивания светлых и темных слянок в водоеме. Слянки нужно надписать эмалевой краской. Группы по три слянки, предназначенные для заполнения из одного батометра, должны иметь один номер. В этой группе одна слянка служит для определения начального содержания кислорода, а две другие (светлая и темная) устанавливают в водоеме. Следует внимательно следить, чтобы при заполнении слянок водой под пробкой не оставалось пузырьков воздуха.

1. Воду из озера берут батометром Руттнера и из одного батометра заполняют три слянки — две светлые и одну темную. В одну из светлых слянок добавляют реактивы для фиксации кислорода. Светлую и темную слянки прикрепляют к тросу для погружения их в водоем, защищая от прямых солнечных лучей в момент постановки опыта.

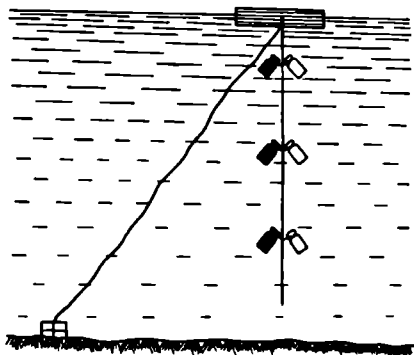


Рис. 28. Схема установки для определения фотосинтеза и деструкции органического вещества в водоемах.

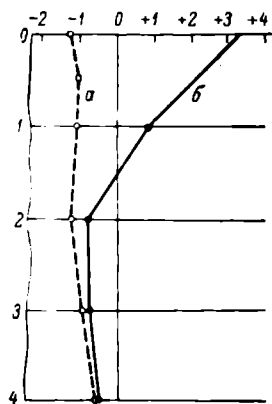
2. Первый батометр для заполнения склянок берется из поверхностного слоя воды. Далее отбор проб воды на станции производят по вертикали через 0.5 м с различных глубин, начиная от поверхности до глубины утроенной прозрачности воды по диску Секки, и помещают на ту же глубину, с которой была взята вода для анализа. Если прозрачность по диску более 3 м, то склянки можно ставить и через 1—2 м, а в зоне температурного скачка на более близком расстоянии. Инкубация склянок в водоеме продолжается сутки.

3. Тросик со склянками подвешивают к буйку (когда все склянки заполнены) и оставляют в водоеме на 24 часа. Хорошо ставить опыт с повторностью по две светлые и две темные склянки.

4. Через 24 часа установку вынимают и тотчас же во всех склянках фиксируется кислород.

При постановке опыта следует возможно точно вести регистрацию сведений: название водоема, местоположение установки, дата постановки и снятия опыта, условия погоды, температура и прозрачность воды.

Вычисление величины продукции и деструкции органического вещества в водоеме.



Предположим, что исходное содержание кислорода упало в темной склянке с 10.17 до 9.57 мг/л, а в светлой поднялось до 14.18 мг/л. Отсюда величина потребления кислорода на дыхание фитопланктона и бактерий, или деструкция, равна $10.17 - 9.57 = 0.6$ мг/л. Величина выделившегося кислорода в процессе фотосинтеза, или валовая продукция органического ве-

Рис. 29. Распределение интенсивности фотосинтеза и дыхания по глубинам.

а — данные затемненных склянок; *б* — незатемненных склянок. По оси ординат — глубина, м; по оси абсцисс — разность содержания кислорода за сутки до и после экспозиции склянок, мг/л (содержание кислорода в момент опускания склянок принято за нуль).

щества, равна $14.18 - 9.57 = 4.61$ мг/л. Следовательно, суточная, выраженная в кислороде чистая продукция органического вещества, т. е. то его количество, которое осталось в течение суток в поверхностном слое воды (Прод.—Дес.), равна 4.01 мг/л.

Подобным образом рассчитывается величина деструкции и продукции органического вещества для всех горизонтов (рис. 29). Расстояние между кривыми (*а* и *б*) соответствует суточной интенсивности фотосинтеза на данной глубине, а площадь, заключенная между ними, — общей сумме выделенного кислорода во всем столбе воды (валовая продукция органического вещества).

Площадь между кривыми может быть определена планиметром или путем взвешивания на аналитических весах.

Если содержание кислорода откладывается в г/м^3 , то продукция и деструкция органического вещества будет определяться по площади между кривыми в $\text{г(O}_2\text{)}$ на 1 м^3 площади водоема за сутки.

Чтобы перейти от кислорода на органическое вещество, нужно полученную величину умножить на 0.93, а при переходе на углерод — на 0.37 (табл. 8).

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗА ФИТОПЛАНКТОНА В ВОДЕ ПУТЕМ ПРИМЕНЕНИЯ РАДИОАКТИВНОГО УГЛЕРОДА

Сущность метода (St. Nielsen, 1952) заключается в том, что в пробу воды из водоема добавляют радиоактивный углерод C^{14} в составе $\text{NaHC}^{14}\text{O}_3$, и затем ее экспонируют в водоеме или на палубе судна при естественном освещении в течение суток. Водоросли фиксируют формалином и пробу профильтровывают через мембранный фильтр с диаметром пор около 1 мкм . Радиоактивность водорослей на фильтре определяют под торцовым счетчиком Гейгера, и по этой величине производят расчет интенсивности фотосинтеза в воде.

Для расчета продукции водорослей под 1 м^2 водоема необходимо определить три величины: интенсивность фотосинтеза в поверхностной пробе воды, распределение водорослей в трофогенном слое воды и изменение интенсивности фотосинтеза в толще воды в зависимости от проникновения в нее солнечной радиации.

Приводимая модификация метода для расчета продукции под 1 м^2 разработана Ю. И. Сорокиным (1959а) и модифицирована В. И. Романенко (1971а).

Приготовление рабочего раствора $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$

Фабричный препарат $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$ растворяют в 50 мл дистиллированной воды, подщелоченной до $\text{pH} = 8.5-9.0$. Полученный раствор освобождают от радиоактивных бактериальных тел и других взвешенных частиц путем фильтрования через прокипяченный мембранный фильтр № 2 или 3. Затем раствор этот разбавляют свежееотогнанной дистиллированной водой, в которую в качестве носителя было добавлено 10 мг л углекислого натрия, так чтобы рабочий раствор для олиготрофных озер в 1 см^3 имел под счетчиком радиоактивность $0.5 - 1.0 \cdot 10^6$ имп./мин., для мезотрофных — $0.3-0.5 \cdot 10^6$ и для евтрофных водоемов — $0.1-0.3 \cdot 10^6$ имп./мин.

После определения активности рабочий раствор разливают в ампулы по 5—10 мл и запаивают. Стерилизацию растворов производят, нагревая ампулы в водяной бане до 100°C 3 дня

подряд по 1 часу. В ампулах из невыщелачивающегося стекла препарат может храниться несколько лет. Параллельно с радиоактивностью изотопа определяют радиоактивность стандартного препарата. Последний можно изготовить из радиоактивных водорослей, профильтровав их через мембранный фильтр № 3, который после высушивания приклеивают клеем БФ-2 к предметному стеклу.

При изменении характеристики счетчика Гейгера или при замене его другим радиоактивность изотопа в ампулах можно вычислить по стандарту, не делая непосредственного анализа изотопа.

$$R_n = \frac{R_0 \cdot r_n}{r_0},$$

где R_n — радиоактивность изотопа, определяемая под новым счетчиком, имп./мин., R_0 — бывшая радиоактивность изотопа; r_n — радиоактивность стандартного препарата под новым счетчиком; r_0 — радиоактивность стандартного препарата под старым счетчиком.

Определение радиоактивности рабочих растворов

Рабочий раствор изотопа еще раз разбавляют подщелоченной дистиллированной водой в 100—200 раз в мерной колбе, так чтобы его активность под счетчиком равнялась 5—10 тыс. имп./мин. в 1 мл, что служит оптимумом для торцового счетчика с механическим регистратором импульсов. Анализ общей радиоактивности производят в лаборатории следующим образом.

В виде $\text{BaC}^{14}\text{O}_3$. В три толстостенные пробирки с резиновыми пробками, тщательно промытые хромовой смесью, наливают по 5 мл 0.1 н. раствора едкого натра. Затем в них добавляют по 1 мл 0.3%-го раствора углекислого натрия и анализируемой жидкости и по 1 мл 10%-го раствора хлористого бария. Пробирки тщательно закрывают резиновыми пробками и нагревают 10 мин. на водяной бане при 80°, после чего выпавший осадок углекислого бария отфильтровывают на мембранном фильтре № 3. Остатки осадка смывают со стенок пробирок и фильтровальной воронки теплым 5%-м раствором хлористого аммония и 0.1 н. едким натром.

Далее фильтры высушивают и взвешивают с точностью до 3-го знака. Радиоактивность осадка углекислого бария на фильтрах определяют сразу после высыхания, так как радиоактивные анионы карбоната бария обмениваются с углекислотой воздуха и со временем их радиоактивность уменьшается.

Чтобы избежать введения поправок, фильтрование осадка углекислого бария производят через воронку такого же диаметра,

как и для фильтрования радиоактивного фитопланктона, и фильтры с осадком BaCO_3 просчитывают под счетчиком в том же положении, что и фильтры с фитопланктоном. Величину счета за вычетом фона умножают на степень разведения раствора и вносят поправку на самопоглощение β -излучения осадком углекислого бария. Для этого по разности между конечным и начальным весом фильтра определяют количество BaCO_3 на фильтре и пересчитывают его количество, приходящееся на 1 см^2 осадка. Затем по табл. 9 находят поправочный коэффициент K и вычисляют R_0 — радиоактивность изотопа под счетчиком при нулевой толщине осадка углекислого бария.

Таблица 9

Поправочные коэффициенты на величину самопоглощения β -излучения в толще BaCO_3 (Романенко, 1971а)

BaCO_3 , мг/см ²	K	BaCO_3 , мг/см ²	K	BaCO_3 , мг/см ²	K
2.0	1.025	3.8	1.25	5.6	1.503
2.2	1.041	4.0	1.273	5.8	1.526
2.4	1.069	4.2	1.307	6.0	1.562
2.6	1.092	4.4	1.333	6.2	1.600
2.8	1.117	4.6	1.360	6.4	1.639
3.0	1.147	4.8	1.379	6.6	1.660
3.2	1.162	4.0	1.408	6.8	1.709
3.4	1.190	5.2	1.438	7.0	1.739
3.6	1.226	5.4	1.470		

$$R_0 = r \cdot K,$$

где r — радиоактивность полученного осадка $\text{BaC}^{14}\text{O}_3$, имп./мин.; K — поправочный коэффициент.

В виде жидких препаратов $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$. Радиоактивность рабочих растворов изотопа можно быстро определить при использовании плексиглазовой подложки (Романенко, 1966б). При работе со счетчиком Т-25, имеющим диаметр слюдяного окошка 25 мм, в плексиглазовой подложке делают углубление диаметром 19.1 мм, глубиной 3.4 мм, площадью 2.86 см^2 и объемом 1 см^3 (рис. 30).

Для определения радиоактивности 1 мл испытуемого раствора, содержащего $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$, разведенного 0.1 н. едким натром, вносят пипеткой Мора в углубление подложки, и его радиоактивность определяют под торцовым счетчиком. Полученную величину радиоактивности, выраженную в импульсах, умножают на коэффициент, близкий к 90, который единожды определяют для данных геометрических условий счета и габаритов углубления на подложке. Необходимо соблюдать, чтобы определение

активности раствора и организмов на мембранных фильтрах проводилось на одинаковом расстоянии от окошка торцового счетчика.

Для определения коэффициента пересчета от радиоактивности раствора, определяемой на подложке, к радиоактивности, определяемой обычным способом путем осаждения меченых карбонатов в виде BaCO_3 , поступают следующим образом.

Делают ряд разведений основного раствора $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$ на 0.1 н. едком натре. Во всей серии разведений определяют радиоактивность растворов как на подложке, так и после осаждения в виде $\text{BaC}^{14}\text{O}_3$. Радиоактивность осадков приводится по табл. 9 к их

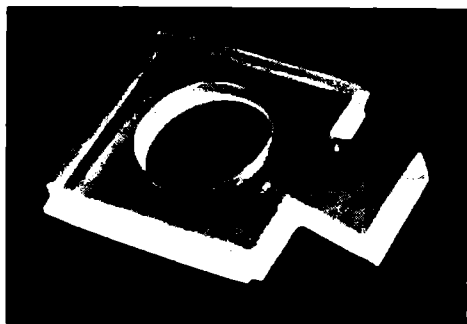


Рис. 30. Подложка для определения радиоактивности жидких растворов.

нулевой толщине. Умножая эту радиоактивность на разведение исходного раствора, получают его радиоактивность в имп./мин. на 1 мл (R_0). Перемножив радиоактивность раствора, определенную на подложке, на разведение получаем условную величину радиоактивности исходного раствора (R_1).

Для получения коэффициента, необходимого для перехода от радиоактивности, определенной на подложке, к радиоактивности, определяемой в виде бариевых осадков под торцовым счетчиком Гейгера, берут среднюю величину из определений радиоактивности по бариевым осадкам (R_0) и делят на среднюю величину из ряда определений жидкого препарата на подложке (R_1).

$$K = \frac{R_0}{R_1}, \text{ отсюда } R_0 = R_1 \cdot K.$$

Таким образом, для определения истинной радиоактивности раствора достаточно просчитать под счетчиком 1 мл жидкого щелочного раствора изотопы и умножить на коэффициент K .

Для каждой пересчетной установки вычисляют свой коэффициент, зависящий от геометрических условий счета.

Полевые исследования

Определение суточного фотосинтеза в поверхностной пробе воды изотопным методом

1. Пробы воды отбирают из поверхностного слоя батометром Рутнера. В четыре склянки из белого стекла (объемом 250 мл) вносят по 200 мл воды. В три из них пипеткой с шприцем вносят по 1 мл раствора радиоактивного карбоната натрия ($\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$) в 0.001 н. раствора едкого натра с удельной радиоактивностью около 1 мк Ки или $0.1-1 \times 10^6$ имп./мл, учитываемых под торцовым счетчиком, коэффициент которого около 7. Две из трех склянок инкубируют на свету, а третью помещают в темный мешок для определения темпловой фиксации углекислоты. Результаты этого контрольного опыта вычитают из данных основного. Летом достаточно одного контроля для всего водоема. Особое внимание нужно обращать на контроль при слабом развитии фитопланктона.

В четвертую склянку добавляют 2-3 капли фенолфталеина и воду подщелачивают до слабо-розовой окраски 0.1 н. раствором едкого натра, лишенным углекислоты. Эта проба воды служит для определения в ней общего количества углерода бикарбонатной и свободной углекислоты.

2. Две склянки с добавкой радиоактивного изотопа инкубируют в аквариуме на палубе экспедиционного судна в течение суток. Аквариум стоит на свету, а вода в нем периодически меняется, чтобы температура опыта соответствовала температуре водоема.

3. По окончании опыта фитопланктон в склянках фиксируют подщелоченным формалином, и по 50 мл воды из каждой склянки фильтруют в воронке Зейтца через мембранный фильтр № 5 с величиной пор около 1 мкм. Фильтры с осевшим планктоном подсушивают, нумеруют и сохраняют до возвращения в лабораторию.

4. В лаборатории фильтры в течение 5 мин. обрабатывают 0.5%-м раствором кислоты для удаления моченых карбонатов, для чего в плавлучем состоянии их помещают на поверхность жидкости в кювете, удаляют избыток кислоты с помощью фильтровальной бумаги, смоченной дистиллированной водой, и высушивают. Радиоактивность органического вещества (r), образовавшегося в процессе фотосинтеза фитопланктона, определяют под торцовым счетчиком Гейгера—Мюллера.

Определение зависимости фотосинтеза от светопропускаемости воды (нахождение поправочного коэффициента K_r)

1. Зависимость фотосинтеза от светопропускаемости определяют на станциях следующим путем. В ведро берут пробу воды с какого-либо среднего горизонта, например с 1 м. Одинаковые порции воды наливают в серию склянок из светлого стекла и в них добавляют по 1 мл раствора радиоактивного карбоната с удельной радиоактивностью $1-3$ мкКи или $0.2-1.0 \times 10^6$ имп./мл. под торцовым счетчиком. Затем склянки помещают на тресе в водоем на разные горизонты, начиная от поверхности и до горизонта нулевого фотосинтеза (утроенная прозрачность по Секки). В самом поверхностном слое водоемов с низкой прозрачностью воды (0.5-2 м) склянки прикрепляют на расстоянии 0.2 м на глубине от 0 до 0.5 м, а далее через 0.5-1 м (рис. 31).

Из-за высокой чувствительности изотопной методики этот опыт лучше всего ставить в следующей последовательности. Склянки с водой привязывают к тросу и помещают в черные мешочки. Затем во все склянки добавляют раствор изотопа и опускают в водоем, причем мешочки снимают с них перед погружением в воду.

Опыт ставить лучше на сутки или с 12 час. дня до ночи, или ночью до 12 час. следующего дня, с тем чтобы водоросли могли использовать все изменения освещенности водной толщи от дневного максимума до ночного минимума. В конце опыта склянки быстро вынимают из водоема, водоросли в них фиксируют и тут же отфильтровывают на мембранные фильтры.

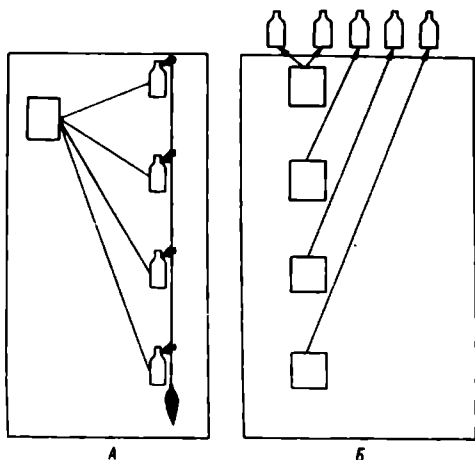


Рис. 31. Схема постановки опыта по определению величины продукции органического вещества в процессе фотосинтеза при помощи изотопного метода.

А — определение коэффициента (K_c) зависимости фотосинтеза от проникновения света; Б — определение коэффициента (K_n) зависимости фотосинтеза от распределения водорослей.

Очевидно, что при подобной постановке опытов величины фотосинтеза в склянках, инкубировавшихся на разных горизонтах, будут отражать зависимость фотосинтеза на этих горизонтах от освещенности водной толщи, так как единственным фактором, влияющим на фотосинтез, является здесь падение освещенности с глубиной. Все остальные факторы, влияющие так или иначе на фотосинтез, равнозначны во всех склянках. Поэтому величины фотосинтеза в склянках будут прямо пропорциональны радиоактивности соответствующих фильтров.

Отношение радиоактивности фильтров с разных глубин к радиоактивности поверхностного фильтра (K_c) показывает, какая часть поверхностного света достигала соответствующей глубины. Если умножить величину поверхностного фотосинтеза, определенную в опыте на палубе судна, на коэффициент (K_c), найденный для отдельных горизонтов, то мы получим величины фотосинтеза, которые наблюдались на этих горизонтах при равной насыщенности толщи воды фитопланктоном и биогенными элементами.

**Определение зависимости фотосинтеза в толще воды
от вертикального распределения фитопланктона
(нахождение поправочного коэффициента K_v)**

Как указывалось выше, для того чтобы рассчитать продуктивность фотосинтеза в толще воды, исходя из величины фотосинтеза в поверхностном слое воды, необходимо учесть, кроме фактора освещенности, еще и фактор вертикального распределения фитопланктона. Метод прямого количественного учета фитопланктона априори оказался бы неприменимым для анализа вертикального распределения фитопланктона. Это объясняется не только тем, что любой метод прямого учета фитопланктона весьма трудоемок и достаточно субъективен, а главным образом отсутствием пропорциональности между общей биомассой клеток, учитываемой прямым счетом, и их способностью к фотосинтезу, которые имеют место в связи с разным физиологическим состоянием клеток в различных условиях их функционирования, а также тем, что при прямом счете наряду с живыми клетками учитываются отмирающие и отмершие клетки фитопланктона.

Схема определения вертикального распределения фитопланктона в водоеме состоит в следующем. Пробы воды отбирают из ряда горизонтов от поверхности до глубины утроенной прозрачности по диску Секки. С каждого горизонта равное количество воды наливают в склянки светлого стекла, добавляют равные объемы раствора $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$ из расчета общей активности $0.4-1.5 \times 10^6$ имп./мин./л (в зависимости от количества фитопланктона в воде) (рис. 31, Б). Склянки инкубируют на палубе экспедиционного судна в аквариуме в условиях одинаковой освещенности в течение 1—2 час., после чего водоросли (в склянках) фиксируют. Радиоактивность фильтров в подобном опыте пропорциональна фотосинтезу в склянках.¹ Фактически данная величина может быть охарактеризована как потенциальная способность к фотосинтезу при постоянном освещении. Фотосинтез же в свою очередь зависит от исходного количества жизнедеятельного фитопланктона на соответствующих горизонтах, так как по условиям опыта именно жизнедеятельный фитопланктон определяет результат. С другой стороны, кратковременность опыта гарантирует от искажений исходной картины распределения фитопланктона, которые могут иметь место вследствие отмирания фитопланктона в склянках в длительном опыте. Величины фотосинтеза и, следовательно, величины радиоактивностей фильтров отражают в этих опытах не только

¹ В случае разного содержания карбонатов с углекислотой в пробах с разных горизонтов прямая пропорциональность между величинами фотосинтеза и радиоактивностью фильтров будет нарушена, и для ее восстановления необходимо определить содержание гидрокарбонатов на разных горизонтах и произвести расчет продукции по формуле (стр. 144).

влияние вертикального распределения фитопланктона на фотосинтез, но также и влияние конкретных факторов среды, ускоряющих или угнетающих этот процесс (рН, биогены и т. д.).

Очевидно, что отношение радиоактивности фильтров, полученных из проб с разных глубин, к радиоактивности фильтра из поверхностной пробы будет соответствовать степени влияния вертикального распределения фотосинтезирующего фитопланктона на продуктивность фотосинтеза в водной толще. Это отношение обозначается как поправочный коэффициент (K_v). При умножении величины поверхностного фотосинтеза на коэффициент K_v , найденный для отдельных горизонтов, мы получим величины фотосинтеза, которые наблюдались бы на соответствующих горизонтах в случае равномерной освещенности всех слоев водной толщи.

Определение общей радиоактивности воды после добавления меченой углекислоты

По количеству взятой для анализа воды и радиоактивности добавленного в склянку изотопа может быть рассчитана радиоактивность в склянках, но в некоторых случаях полезно проверить конечную радиоактивность изотопа в испытуемых пробах воды ввиду возможных потерь меченой углекислоты $C^{14}O_2$.

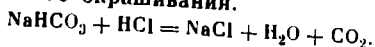
1. Для определения общей радиоактивности углерода карбонатов и свободной углекислоты (R) из склянок в конце опыта перед фильтрованием воды через мембранный фильтр отбирают пробу воды в пробирку. Радиоактивные бикарбонаты и свободную углекислоту фиксируют добавлением нескольких капель 10%-й щелочи. Пробирки плотно закрывают пробками и хранят в перевернутом состоянии до конца экспедиции.

2. Определение общей радиоактивности воды (R) из опытных склянок при установлении величины фотосинтеза производят так же, как это было описано при определении радиоактивности рабочего раствора (стр. 136). Из пробирки отбирают определенный объем воды и ее радиоактивность определяют в виде $BaC^{14}O_3$ после осаждения карбонатов хлористым барием.

Определение в воде общего количества свободной углекислоты и бикарбонатов

Определение общего содержания углерода карбоната с углекислотой ($C_{карб.}$) можно проводить двумя методами — прямым титрованием в воде и титрованием после отгонки в щелочь. Анализы по первому методу проводят на судне по следующей схеме. Пробу воды (100 мл) наливают в коническую колбу и подщелачивают 0.1 н. едким натром до слаборозовой окраски по фенолфталеину. Затем добавляют 1—2 капли соляной кислоты до первого исчезновения окраски. При этом все формы угольной кислоты переходят в бикарбонат. Далее бикарбонат оттитровывают 0.05 н. соляной кислотой в присутствии смешанного индикатора —

метиловый оранжевый с метиловым синим или метиловый красный до ярко розового окрашивания.



При титровании 1 экв. HCl соответствует 1 молекуле CO_2 или 1 молекуле С. При титровании 0.05 н. HCl 1 мл ее соответствует 2.2 мг CO_2 или 0.6 мг С.

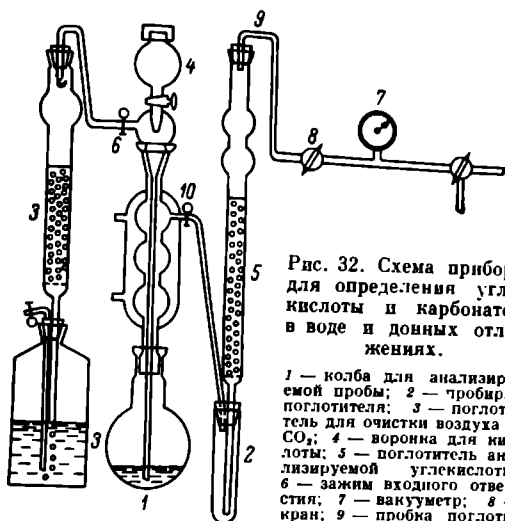


Рис. 32. Схема прибора для определения углекислоты и карбонатов в воде и донных отложениях.

1 — колба для анализируемой пробы; 2 — пробирка поглотителя; 3 — поглотитель для очистки воздуха от CO_2 ; 4 — воронка для кислоты; 5 — поглотитель анализируемой углекислоты; 6 — зажим входного отверстия; 7 — вакуумметр; 8 — кран; 9 — пробка поглотителя; 10 — зажим.

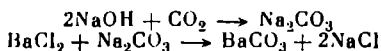
Таким образом, количество карбонатов в 1 л воды можно рассчитать по следующей формуле.

$$C_{\text{карб}} = \frac{a \cdot 0.6 \cdot 1000}{b}, \text{ мг С/л,}$$

где a — количество 0.05 н. HCl, мл; 0.6 — эквивалент углерода; 1000 — пересчет результатов титрования на 1 л воды; b — количество воды, взятой для титрования, мл.

Метод титрования углекислоты после отгонки ее в щелочь более точен при определении гидрокарбонатов в грязных водах (стр. 177). Анализы по этому методу проводят в лаборатории. Пробы воды фиксируют добавлением 1—2 мл 0.1 н. едкого калия. В специальном приборе (рис. 32) углекислоту вытесняют соляной кислотой из карбонатов и отгоняют током воздуха в 0.1 н. щелочь, после чего ее оттитровывают 0.05 н. соляной кислотой в присутствии хлористого бария. При отгонке углекислота связывается едким натром с образованием углекислого натрия. Последний в щелочной среде реагирует с хлористым барием с образова-

нием углекислого бария, который оседает на дно сосуда. Соответственно количеству связанной углекислоты в растворе снижается концентрация ионов OH^- .



Соляной кислотой титруют оставшийся едкий натрий. В данном случае 2 экв. NaOH или HCl соответствуют 1 молю CO_2 . Количество углерода углекислоты и карбонатов рассчитывают по разности объемов 0.05 н. соляной кислоты, пошедшей на титрование щелочи после холодной отгонки углекислоты и отгонки ее из воды.

$$C_{\text{карб}} = \frac{a \cdot 0.3 \cdot 1000}{b}, \text{ мг С в 1 л,}$$

где a — разность объемов в миллилитрах 0.05 н. HCl при титровании контрольного и опытного отгонов; 0.3 — эквивалент углерода при титровании в присутствии BaCl_2 ; b — количество воды, из которой отгонялась CO_2 , мл (см. стр. 178).

Расчет продукции органического вещества фитопланктоном в процессе фотосинтеза в пробе воды

Расчет продукции (Φ_n) производят по формуле Стимана Нильсена (St. Nielsen, 1952).

$$\Phi_n = \frac{r \cdot C_{\text{карб}}}{R \cdot t} \text{ мг С/л в сутки,}$$

где r — радиоактивность водорослей в пробе, имп./мин.; $C_{\text{карб}}$ — содержание углерода гидрокарбонатов, мг С/л; R — радиоактивность добавленного в пробу изотопа, имп./мин., t — время опыта, сутки.

Для контроля за поглощением радиоактивного углерода карбонатов в результате процессов, не связанных с фотосинтезом (темновая ассимиляция), параллельно ставят опыт в темной склянке, результаты которого вычитают из опыта на свету. При проведении съемки фотосинтеза фитопланктона в водоеме достаточно одного-двух контролей на период анализа.

Чувствительность определений фотосинтеза с помощью изотопной методики в среднем составляет величину порядка сотых долей миллиграмма углерода на 1 л. Поэтому с помощью C^{14} можно определять фотосинтез считанных клеток водорослей.

Расчет продукции органического вещества фитопланктоном в процессе фотосинтеза под 1 м² поверхности водоема

Для того чтобы найти общие поправочные коэффициенты, показывающие степень совместного влияния факторов освещенности и фактора вертикального распределения фитопланктона

на фотосинтез в водной толще, достаточно перемножить между собой коэффициенты K_e и K_r . Поправочные коэффициенты, получающиеся при перемножении коэффициентов K_e и K_r для каждого горизонта, обозначаются как суммарные коэффициенты K_r .

Эти коэффициенты показывают, как меняются величины фотосинтеза с глубиной на соответствующих горизонтах. Поэтому, умножая величину суточного фотосинтеза в поверхностной пробе (ψ_n) на коэффициенты K_r , можно рассчитать величины фотосинтеза для каждого горизонта, и по этим величинам построить общую поправочную кривую, учитывая влияние обоих факторов на фотосинтез (рис. 33).

Далее, найдя путем взвешивания отношение заштрихованной площади графика, ограниченной кривой 1, к общей площади графика до того горизонта, до которого производились измерения, вычисляют суммарный поправочный коэффициент K_ϕ , дающий возможность рассчитать фотосинтез во всей водной толще.

Расчет интенсивности фотосинтеза под 1 м^2 поверхности водоема производится по формуле

$$\Phi_v = \Phi_n \cdot K_\phi \cdot l,$$

где Φ_n — интенсивность фотосинтеза под 1 м^2 , г С в сутки; Φ_n — интенсивность фотосинтеза в поверхностной пробе воды, мг С/л в сутки; K_ϕ — суммарный поправочный коэффициент; l — глубина трофического слоя, м (расстояние до последней склянки при определении K_e).

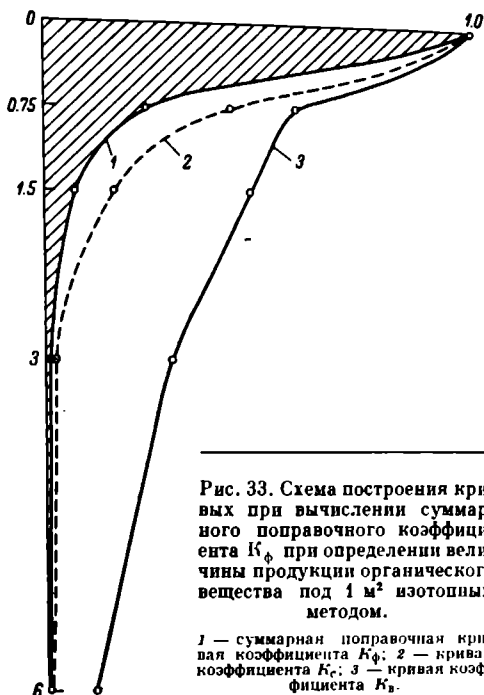


Рис. 33. Схема построения кривых при вычислении суммарного поправочного коэффициента K_ϕ при определении величины продукции органического вещества под 1 м^2 изотопным методом.

1 — суммарная поправочная кривая коэффициента K_ϕ ; 2 — кривая коэффициента K_e ; 3 — кривая коэффициента K_r .

3. ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА ФИТОПЛАНКТОНОМ В ВОДОЕМАХ С БОЛЬШОЙ АКВАТОРИЕЙ

Метод (Романенко, 1970б) применим для определения суточной продукции органического вещества в поверхностных или интегрированных по глубине пробах воды при массовых анализах на больших акваториях и для расчета величин продукции органического вещества под 1 м² водоема. Он основан на том, что отношение суточной величины фотосинтеза в пробе воды, экспонируемой при естественных условиях освещения и температуры непосредственно в водоеме или на палубе судна в аквариуме, к кратковременной величине фотосинтеза в пробе воды, выдерживаемой при стандартных условиях освещения в люминостате, есть величина постоянная для каждого дня в больших акваториях.

Поскольку изменение освещенности и температуры воды в озерах и водохранилищах в течение данных суток происходит одинаково, то для акваторий с близкой оптической характеристикой воды отношение продукции органического вещества под 1 м² к кратковременной величине фотосинтеза в поверхностной пробе или еще лучше к интегрированной по глубине пробе воды будет величиной постоянной. Определив вышеописанное отношение на одной из станций, можно произвести расчет продукции для других станций под 1 м² по величине продукции водорослей в кратковременном опыте.

Определение продукции органического вещества в кратковременных опытах

Для определения интенсивности фотосинтеза в течение одного дня на большом количестве станций отбирают в две склянки по 100 мл воды с горизонта 0.5 м от поверхности или из интегрированной пробы для всего трофогенного слоя. В последнем случае расчет интенсивности фотосинтеза под 1 м² водоема значительно упрощается.

Для получения интегрированной пробы воду берут через 0.5 или 1 м, начиная с поверхности и до глубины тройной прозрачности по диску Секки. Частоту отбора проб по горизонтам определяют прозрачностью воды. В водоемах с прозрачностью 1—2 м отбор проб производят через 0.5 м, с прозрачностью 2—5 м — через 1 м. При наличии резкого температурного скачка необходимо, чтобы одна из проб была взята в области скачка. По 1 л воды с каждого горизонта сливают в общую колбу, из которой после перемешивания берут на анализ интегрированную пробу.

1. 100 мл воды сразу помещают в склянку из белого стекла объемом около 250 мл и добавляют 1 мл радиоактивного карбоната с активностью $1 \cdot 10^6$ имп./мин. под счетчиком. Склянки ставят в люминостат, который может быть изготовлен в виде хорошо вентилируемого ящика с двумя лампами дневного света ЛДЦ-15. Лампы устанавливают в центре ящика одна над другой, а пробы экспонируют по обе стороны от ламп в течение 1 часа, после чего их фиксируют формалином и фильтруют через мембранный фильтр № 5.

2. В каждой пробе воды определяют содержание гидрокарбонатов вышеописанным способом.

3. Фильтры с водорослями после подсушивания складывают в чашку Петри, каждый новый слой фильтров покрывают фильтровальной бумагой. В лаборатории фильтры обрабатывают слабой соляной кислотой для удаления загрязнения радиоактивным карбонатом, и их активность определяют под счетчиком Гейгера.

4. Расчет продукции органического вещества в каждой пробе воды производят по формуле Стива Нильсена.

$$\Phi_{\text{час}} = \frac{r \cdot C_{\text{карб}}}{R}, \text{ мг С. л./час,}$$

где r — радиоактивность водорослей в пробе воды, имп./мин.; $C_{\text{карб}}$ — содержание гидрокарбонатов, мг С/л; R — радиоактивность добавленного в пробу изотопа, имп./мин.

Определение суточной продукции органического вещества в 1 л воды

Ежедневно на первой станции отбирают 4 пробы воды. В двух пробах определяют кратковременную величину фотосинтеза в люминостате (см. стр. 146), а в две другие вносят изотоп и экспонируют в аквариуме на палубе судна при температуре воды водоема и естественном освещении (см. стр. 139). Отношение суточной величины фотосинтеза к часовой величине на данной станции позволяет установить коэффициент

$$K_0 = \frac{\Phi_{\text{сут}}}{\Phi_{\text{час}}},$$

где K_0 — коэффициент; $\Phi_{\text{сут}}$ — суточная интенсивность фотосинтеза, мг С/л; $\Phi_{\text{час}}$ — часовая интенсивность фотосинтеза, мг С/л.

Если результаты часового фотосинтеза на каждой станции, взятой в этот день, умножить на коэффициент K_0 , то получим суточные величины фотосинтеза в 1 л воды для каждой станции. Кроме того, по величинам кратковременного фотосинтеза при постоянном освещении можно в какой-то мере судить о распределении фитопланктона по акватории водоема.

Определение суточной продукции органического вещества под 1 м² водосма

Для определения продукции органического вещества под 1 м² водоема необходимо иметь данные по влиянию освещенности и распределению фитопланктона в толще воды (см. стр. 139).

Расчет продукции производят вышеописанным способом (см. стр. 144). Имея большое количество данных по продукции органического вещества в поверхностных пробах воды, можно производить расчеты не по среднеарифметическим величинам, а по средневзвешенным.

Если имеются величины фотосинтеза в интегрированных пробах воды для трофогенного слоя, то определение продукции под 1 м² производят следующим образом. На одной из станций в водоеме определяют коэффициенты K_c (см. стр. 139). По этим коэффициентам строят график (см. стр. 145) (рис. 33) для случая, когда водоросли в толще воды распределены равномерно, т. е. коэффициент K_c на всех глубинах равен 1. Отношение заштрихованной части графика ко всему графику составляет коэффициент K_ϕ . Тогда расчет интенсивности фотосинтеза на всех станциях под 1 м² производят по формуле

$$\Phi_n = \Phi_n \cdot K_\phi \cdot l,$$

где Φ_n — интенсивность фотосинтеза под 1 м² в данном пункте, г С/сутки; Φ_n — интенсивность фотосинтеза в интегрированной пробе воды, мг С/л в сутки или $\Phi_{\text{зас}} \cdot K_0$; K_ϕ — коэффициент фотосинтеза для данной прозрачности воды (может быть пригоден для больших акваторий воды с близкими величинами прозрачности и для некоторого отрезка времени — (несколько дней); l — глубина, м, на которой фотосинтез сильно ослабевает из-за малого количества света (последняя склянка при определении K_0).

В последнее время нами установлено, что влияние ослабления света с глубиной на интенсивность фотосинтеза водорослей в подавляющем большинстве случаев выражается коэффициентом 0.7. В связи с этим возможно производить примерные расчеты интенсивности фотосинтеза под 1 м² водоема, исходя лишь из интенсивности фотосинтеза, определенного на палубе судна, в 1 л интегрированной пробы воды и прозрачности воды по диску Секки. Расчет может быть произведен по формуле

$$\Phi_n = \Phi_n \cdot 0.7 \cdot l,$$

где Φ_n — суточная величина интенсивности фотосинтеза под 1 м², г С; Φ_n — суточная величина фотосинтеза в интегрированной пробе воды от поверхности до тройной прозрачности воды по диску Секки, мг С/л; 0.7 — коэффициент, характеризующий влияние ослабления света с глубиной на фотосинтез; l — расстояние до тройной прозрачности воды по диску Секки, м.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА БАКТЕРИЙ В ВОДОЕМАХ ЗА СЧЕТ ПРОЦЕССОВ ТЕМНОВОЙ АССИМИЛЯЦИИ УГЛЕКИСЛОТЫ

Изучение процессов образования органического вещества из минеральных компонентов — один из основных вопросов водной микробиологии. Очевидно, первостепенное значение в этом процессе принадлежит фотосинтезу фитопланктона. Образовавшееся

органическое вещество, поступая из водной массы в иловые отложения, может подвергнуться анаэробному распаду с образованием водорода, метана, сероводорода или аммиака. Все эти соединения могут быть окислены биологически за счет растворенного в воде кислорода, а выделяющаяся при этом энергия может быть использована хемосинтезирующими организмами на усвоение углекислоты с образованием органического вещества бактериальных тел. Поскольку в процессах хемосинтеза кислород не выделяется и нет прямой пропорциональности между образованием органического вещества и потреблением кислорода на окисление минеральных вещества, то единственным методом для определения интенсивности процессов хемосинтеза служит радиоуглеродный метод. Однако в водоемах ассимиляция углекислоты в темноте представляет собой суммарную величину, которая образуется за счет хемосинтеза и гетеротрофной ассимиляции CO_2 с преобладанием ее в большинстве водоемов (Романенко, 1963, 1964а, 1964б). При этом по приблизительным расчетам около 6% углерода бактериальной биомассы гетеротрофных бактерий образуется за счет углекислоты.

Исходя из биомассы бактерий и интенсивности их размножения, можно рассчитать величину гетеротрофной ассимиляции углекислоты для отдельных конкретных случаев. Величина эта в основном колебалась от 0.002 до 0.006 мг С/л в сутки и соответствовала темновой фиксации углекислоты. Внесение соответствующей поправки показывает, что за счет хемосинтеза ощущаемая продукция органического вещества происходит лишь в ограниченных биотопах, когда наблюдается обильное выделение метана и водорода или сероводорода в евтрофных или мериотических водоемах.

Определение интенсивности темновой ассимиляции CO_2 в воде

1. Пробу воды с определенного горизонта отбирают батометром Рутнера.

2. Воду из батометра наливают в склянки с притертыми пробками емкостью около 60—100 мл. Заполнение склянок ведется так же, как при отборе проб для определения растворенного кислорода, т. е. через склянку пропускают 2—3 объема воды.

3. Заполненные водой склянки помещают в черные мешочки и только после этого в них вносят пипеткой со шприцем по 1 мл раствора радиоактивного карбоната $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$ с удельной активностью около 5 мкКи или 1×10^6 имп./мин. Раствор радиоактивной соды, применяемый для определения величины темновой фиксации углекислоты, после приготовления обязательно фильтруют через мембранный фильтр № 3 и хранят в запаянных ампулах по 5—15 мл, в которых он стерилизуется многократным кипячением на водяной бане.

После добавления изотопа склянки закрывают притертыми пробками, так чтобы под пробкой не оставалось пузырьков воздуха.

С каждого горизонта желательно заполнять по 2 параллельные склянки. На всю серию необходимо ставить 1—2 контрольные склянки, куда, кроме радиоактивного карбоната натрия, добавляют по 1 мл 40%-го формалина.

4. Мешочки со склянками плотно завязывают и помещают в водоем на 24 часа. Если не представляется возможности инкубировать склянки в водоеме, то их выдерживают в аквариуме при температуре, близкой к температуре водоема.

5. По прошествии срока инкубации в склянки добавляют формалин, но вынимая их из мешочка. Эта предосторожность предпринимается во избежание ассимиляции CO_2 за счет фотосинтеза водорослями при проникновении света в пробы.

6. По окончании опыта всю воду из склянок или часть ее (40—60 мл) фильтруют в воронке Зейтца через мембранный фильтр № 3, задерживающий бактерии. Фильтры высушивают и в таком виде хранят до возвращения в лабораторию. Здесь их обрабатывают 1%-й соляной кислотой для удаления остатков радиоактивного карбоната так, как это было описано в методике определения интенсивности фотосинтеза фитопланктона. Радиоактивность фильтров определяют под торцовым счетчиком Гейгера—Мюллера.

7. Суточную величину темновой ассимиляции CO_2 рассчитывают по формуле

$$C_T = \frac{r \cdot C_{\pi}}{R \cdot t},$$

где C_T — величина темновой ассимиляции CO_2 , мкг С/л в сутки; r — радиоактивность микроорганизмов в пробе воды на всю склянку, имп./мин.; $C_{\text{карб}}$ — содержание в воде свободной углекислоты и карбонатов, мкг С/л; R — общее количество изотопа, добавленного в склянку, имп./мин.; t — время инкубации проб, сутки.

Способы определения углерода бикарбонатов $C_{\text{карб}}$ и общей радиоактивности воды R см. на стр. 142.

Раздельное определение количества углекислоты, ассимилированной хемосинтезирующими и гетеротрофными бактериями, представляет большие трудности. Можно считать, что лишь на границе соприкосновения кислорода и сероводорода в меромиктических озерах ассимиляция CO_2 за счет хемосинтеза преобладает. Существующие методы позволяют разграничить эти величины в воде большинства водоемов лишь приблизительно.

**Разграничение величин хемосинтеза
и гетеротрофной ассимиляции CO_2
по приросту биомассы бактерий**

В пробе воды параллельно с определением темновой ассимиляции CO_2 определяют скорость размножения бактерий и продукцию их биомассы (см. стр. 120). Исходя из продукции биомассы рассчитывают количество углерода, усвоенного гетеротрофными бактериями из углекислоты. Если величина темновой ассимиляции углекислоты в данной пробе воды и расчетная величина углерода, который мог ассимилироваться за счет размножения бактерий, выражаются близкими величинами или различаются не более чем в 2—3 раза, то в данной пробе воды преобладает гетеротрофная ассимиляция CO_2 . В случае, когда тем-

новая ассимиляция углекислоты в 7—10 раз выше расчетной величины потребления CO_2 , можно говорить о преобладании хемосинтеза, так как биомасса хемосинтезирующих бактерий целиком образуется из углекислоты, а у гетеротрофных бактерий из CO_2 образуется лишь 6% биомассы по углеводу.

**Разграничение величин хемосинтеза
и гетеротрофной ассимиляции CO_2 в воде
по потреблению кислорода**

Изучение потребления кислорода гетеротрофными бактериями в чистых культурах показало (Романенко, 1965б), что на 1 мг потребленного кислорода ассимилируется до 6 до 12 мкг C/CO_2 , а в естественных водоемах эта величина равна 7.9 ± 2.3 мкг. В опытах с чистыми культурами хемосинтезирующих бактерий установлено, что на 1 мг использованного ими кислорода ассимилируется от 20 до 200 мкг C/CO_2 . Это дает возможность в первом приближении разделить величины хемосинтеза и гетеротрофной ассимиляции углекислоты, суммарно составляющие величину темновой фиксации углекислоты.

В исследуемой пробе одновременно определяется суточное потребление кислорода по Винбергу и темновая ассимиляция углекислоты с помощью C^{14} . Рассчитывают C/CO_2 , которое усвоено на 1 мг потребленного кислорода. Например, за сутки величина темновой ассимиляции углекислоты равна 6 мкг $\text{C}/\text{л}$, а потребление кислорода составляет 0.17 мг $\text{O}_2/\text{л}$. В расчете на 1 мг потребленного кислорода это будет 36 мкг C . Если у гетеротрофных бактерий на 1 мг кислорода как максимум ассимилируется 12 мкг C/CO_2 , то на долю хемосинтеза приходится $36 - 12 = 24$ мкг C/CO_2 . Из этого соотношения следует, что в данной пробе отношение гетеротрофной ассимиляции CO_2 к хемосинтезу равно 12 : 24 или 1 : 2 (в дальнейшем а : в).

Разделив количество ассимилированной углекислоты, определенное в естественной воде (6 мкг) в пропорции 1 : 2, найдем, что гетеротрофными бактериями ассимилировано 2 мкг, а хемосинтезирующими 4 мкг C/CO_2 в 1 л воды за сутки.

Расчет величины гетеротрофной ассимиляции углекислоты в полученной величине темновой фиксации CO_2 можно производить по формуле

$$C_r = \frac{C_t \cdot a}{(a + \sigma)},$$

где C_r — гетеротрофная ассимиляция CO_2 , мкг $\text{C}/\text{л}$ в сутки; C_t — темновая ассимиляция CO_2 , мкг $\text{C}/\text{л}$ в сутки; a , σ — данные из отношения гетеротрофной ассимиляции CO_2 к хемосинтезу в пропорции $a : \sigma$; a — максимальная величина ассимиляции CO_2 гетеротрофными бактериями в расчете на 1 мг потребленного кислорода в водоемах, соответствует 12; σ — расчетная вели-

чина ассимиляции углекислоты в процессе хемосинтеза в мкг $C/CO_2/л$ в сутки на 1 мг потребленного в опыте кислорода.

$$a + e = b,$$

где b — расчетная величина темновой ассимиляции CO_2 (в мкг C/CO_2 в 1 л на 1 мг потребленного O_2), которая определяется, исходя из соотношения темновой ассимиляции углекислоты и потребления кислорода в опыте. Хемосинтез (C_x) будет равен $C_x = C_r - C_t$ мкг $C/л$ в сутки.

Определение темновой ассимиляции CO_2 в иловых отложениях

Органическое вещество из водной массы поступает в иловые отложения, перекрывается новыми органическими и минеральными осадками и подвергается анаэробному распаду. Образующиеся при этом водород, метан, сероводород и другие продукты анаэробного распада диффундируют к поверхностным слоям ила и здесь начинают окисляться при непосредственном участии хемосинтезирующих микроорганизмов. Таким образом, процессы хемосинтеза в водоеме, где придонные слои воды насыщены кислородом, могут достигать наибольшей интенсивности именно в поверхностном слое ила.

В то же время в иловых отложениях в громадных количествах развиваются различные гетеротрофные бактерии в результате поступления сюда больших количеств органического вещества при седиментации, а общая численность бактерий здесь в расчете на единицу объема на три порядка выше, чем в водной массе.

Методика определения величины хемосинтеза в иловых отложениях была разработана Ю. И. Сорокиным (1958), однако предложенный им метод учитывает не только хемосинтез, но одновременно и гетеротрофную фиксацию CO_2 . Применяемая методика должна использоваться в следующей последовательности.

1. Монолит ила для определения темновой ассимиляции CO_2 отбирают из водоема стратометром. Из определенного слоя монолита илом наполняют на $\frac{3}{4}$ пенициллиновую баночку, туда же вводят 1 мл радиоактивного карбоната с удельной радиоактивностью около 1.0—5 мкКи или $1-2 \times 10^6$ имп./мин. при подсчете под счетчиком Гейгера и доливают придонной водой до пробки.

2. Баночку плотно закрывают пробкой, так чтобы под ней не осталось пузырьков воздуха, помещают в черный мешочек и хранят в водном термостате при температуре, близкой к температуре водоема.

3. По прошествии определенного срока содержимое опытных сосудов фиксируют формалином, разводят до 100 мл 0.001 н. раствором едкого натра и встряхивают 10 мин. для отделения бактерий от частичек ила.

4. После отстаивания в течение 1—2 мин. и осаждения крупных частичек ила 0.5—1.0 мл болтушки фильтруют через мембранный фильтр № 2. Фильтр обрабатывают 3%-м раствором соляной кислоты для удаления радиоактивных карбонатов, высушивают, и радиоактивность образовавшегося органического вещества бактериальных тел определяют под торцовым

счетчиком Гейгера—Мюллера. Если на фильтре образуется слишком плотный осадок из частичек ила, то возникает необходимость найти поправку на самопоглощение осадком β -излучения.

5. Для определения такой поправки фильтр с осадком нерадиоактивного ила в том же разведении высушивают. При этом осадок (в виде лепешки) отделяют от фильтра и им накрывают активный препарат C^{14} . Под счетчиком определяют степень ослабления излучения после прохождения его через толщу ила, и вносят поправку на поглощение излучения.

6. Общее количество минеральных форм углерода, участвующих в ассимиляции (величина $C_{\text{карб}}$) определяют путем отгонки углекислоты из ила в специальном приборе (рис. 32). В кьельдалевскую колбу (1) емкостью 50 мл вносят 5—15 г анализируемого ила, 2 мл бутапола и 20 мл воды. В поглотитель (5) наливают 20 мл 0.1 н. едкого калия. В приборе создается вакуум, и через него пропускают слабый ток воздуха, очищенного от углекислоты крепкой щелочью в поглотителе (3). Ил в колбе доводят до кипения и кипятят 3—5 мин., после чего ток воздуха усиливают и углекислоту отгоняют из ила в щелочь в течение 15 мин. После отгонки количество углекислоты определяют обратным титрованием едкого калия 0.05 н. (см. стр. 143) раствором соляной кислоты в присутствии хлористого бария. 1 мл 0.05 н. соляной кислоты соответствует 0.3 мг углерода в отгоняемой пробе.

7. Радиоактивность раствора $Na_2C^{14}O_3$ (R), вносимого в опыт, определяют в виде углекислого бария. С этой целью рабочий раствор $Na_2C^{14}O_3$ разводят в 100 раз. Для анализа берут 1 мл этого раствора (см. стр. 136).

8. Суточную величину темновой ассимиляции CO_2 рассчитывают по формуле

$$C_t = \frac{r \cdot C_{\text{карб}}}{R \cdot t},$$

где C_t — величина темновой ассимиляции CO_2 , мкг С/л в сутки; r — радиоактивность микроорганизмов за время опыта в расчете на содержимое склянки, имп./мин.; $C_{\text{карб}}$ — количество минеральных форм углерода, свободно обменивающихся с радиоактивным углеродом $Na_2C^{14}O_3$, мкг С/л; R — радиоактивность раствора $Na_2C^{14}O_3$, внесенного в опыт, имп./мин.; t — время инкубации пробы, сутки.

9. Если для анализа ил берется из слоя толщиной в 1 см, то можно произвести расчет темновой ассимиляции CO_2 на 1 м² ила, умножив результат на 10.

5. ДЕСТРУКЦИЯ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА В ВОДЕ

Растворенные и взвешенные органические вещества в водоемах состоят из автохтонных, образовавшихся за счет фотосинтеза, и аллохтонных, поступивших в водоем с поверхностным стоком.

Деструкция этих веществ в водоемах происходит в основном в аэробных условиях в водной толще или в анаэробных условиях в илистых отложениях.

В евтрофных и мезотрофных водоемах суммарную величину деструкции органического вещества в водной массе легче всего учитывать кислородным методом одновременно с определением продукции органического вещества (см. стр. 132), но в ряде случаев она может быть определена и отдельно.

Определение деструкции органического вещества кислородным методом

1. Воду, взятую с того или иного горизонта батометром Руттнера, наливают в 4 одинаковые склянки, объем которых может быть равен 65, 100, 250 мл, с предосторожностями, как и при отборе проб на анализ кислорода (см. стр. 176).

2. В двух склянках сразу же определяют содержание кислорода методом Винклера, а две другие помещают в темный мешок и инкубируют в водоеме или в аквариуме на палубе судна при температуре воды озера, после чего анализ кислорода повторяют. В евтрофных водоемах время инкубирования выбирается, исходя из температуры и визуального определения обилия органического вещества в воде — 6—12 час., в мезотрофных — 12—24 час. При низкой температуре время инкубирования увеличивают. Например, зимой подо льдом инкубирование в мезотрофных водоемах производят 10—15 дней. В евтрофных водоемах можно использовать склянки маленького объема и титровать 50 мл иода, выделившегося и отмеренного точно пипеткой. В олиготрофных водоемах следует брать склянки с большим объемом и титровать 100—250 мл.

3. Потребление кислорода на деструкционные процессы рассчитывается по формуле

$$O_d = O_n - O_r,$$

где O_d — деструкция органического вещества, мг O_2 л в сутки; O_n — исходное содержание кислорода в пробе воды, мг/л; O_r — содержание кислорода в пробе после инкубирования в расчете на сутки, мг/л.

Для выражения деструкции в мг органического вещества пересчет делают по табл. 8.

Определение интенсивности деструкции органического вещества по гетеротрофной ассимиляции CO_2

При изучении соотношения между потреблением микроорганизмами кислорода и гетеротрофной ассимиляцией углекислоты (Романенко, 1965б) установлено, что на 1 мг использованного на дыхание кислорода у подавляющего большинства гетеротрофных бактерий ассимилируется около 7 мкг C/CO_2 . Подобное же соотношение было получено для естественных микробиоценозов в озерах и водохранилищах. Лишь у некоторых видов бактерий, чаще всего споровых, на 1 мг потребленного кислорода ассимилируется около 3 мкг C/CO_2 . Отсюда возникла возможность производить определение количества кислорода, потребленного микроорганизмами на дыхание, по гетеротрофной ассимиляции CO_2 . Это особенно важно в тех случаях, когда водоемы олиготрофные, и суточное потребление кислорода в склянках при определении деструкции органического вещества находится на грани чувствительности метода Винклера.

В пробе нефилтрованной воды с помощью радиоактивного углерода определяют суточную величину темновой ассимиляции

CO₂ (см. стр. 149). Расчет кислорода, пошедшего на дыхание микрофлоры (деструкцию), производят по формуле

$$O_d = \frac{C_r}{7},$$

где O_d — потребление кислорода на деструкцию, мг л в сутки; C_r — темповая ассимиляция CO₂, мкг С/л в сутки; 7 — коэффициент соотношения между потреблением кислорода и ассимиляцией CO₂.

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕСТРУКЦИИ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА В ИЛОВЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ

Остатки фитопланктона и взвешенные органические частицы аллохтонного происхождения оседают из воды на дно и здесь подвергаются дальнейшей деструкции. В олиготрофных водоемах, где растворенный кислород присутствует в придонных слоях воды, распад органического вещества в илах идет в основном за счет аэробных процессов, в евтрофных же озерах, где растворенного кислорода в придонных слоях мало, преобладает анаэробный процесс распада органического вещества. При полном аэробном распаде ила выделяется углекислота и вода. В анаэробных условиях практически все органические вещества разрушаются с образованием углекислоты, воды, водорода, жирных органических кислот и других веществ. Во вторую фазу происходит распад жирных кислот до метана и углекислоты и, наконец, образование метана из водорода и углекислоты.

Таким образом, об аэробной деструкции ила можно судить по потреблению кислорода из изолированного над илом объема воды, а об анаэробном распаде — по разности между суммарным количеством углекислоты, выделившейся за счет аэробных и анаэробных процессов, и в результате аэробного разложения ила. Последнее рассчитывается на основании потребления кислорода.

Методика разработана В. И. и В. А. Романенко (1969), за основу которой взят и видоизменен метод определения потребления кислорода изолированной колонкой ила, описанный Хайесом и Мак-Эли (Hayes, MacAulay, 1959) и М. Е. Гамбаряном (1962).

Определение деструкции органического вещества в илу за счет аэробных процессов

1. Ил из водоема извлекают дночерпателем Экмана—Берджи. Верхние крышки дночерпателя открывают, и в стеклянную трубку (длиной 40 и диаметром 3,5 см) осторожно, при слабом отсасывании воздуха из ее верхней части, отбирают колонку ила (10—15 см) с ненарушенной структурой. Снизу трубку затыкают резиновой пробкой (рис. 34).

2. Трубку с илом и такую же трубку без ила (контрольная) с помощью сифона заполняют водой, отобранной из придонного слоя водоема. Необходимо обратить внимание на то, чтобы поверхностный слой ила не взмучи-

вался во время наполнения трубки водой. С этой целью стеклянный конец сифонной трубки загибают вверх и опускают вначале до самого ила. Наполнение трубки придонной водой производят очень медленно и ускоряют, когда слой воды достигнет 3—5 см. Этой же водой наполняют и контрольную трубку без ила. При наполнении объем воды в трубках меняют несколько раз. После этого трубки закрывают резиновыми пробками, имеющими сливные трубочки, отверстия которых затыкают стеклянной палочкой, так чтобы под пробкой не оставалось пузырьков воздуха.

3. Инкубацию проб производят в течение суток в темных мешках непосредственно в водоеме или в лабораторных условиях в сосуде с водой, имеющей температуру придонного слоя воды водоема.

4. При снятии опыта трубки закрепляют в штативе, стеклянную пробочку из сливной трубочки на пробке удаляют, и пробку извлекают из трубки. Столб воды над илом осторожно перемешивают тонким винилпластовым прутиком со спиралькой на нижнем конце, так чтобы ил не взмучивался, а вода не перемешивалась с воздухом. Эта процедура необходима для выравнивания содержания кислорода во всем столбе воды, так как содержание кислорода в столбе воды над илом неравномерно, а

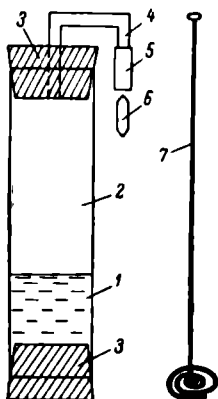


Рис. 34. Прибор для анализа деструкции органического вещества в илах.

1 — ил; 2 — вода; 3 — пробка; 4 — стеклянная трубка для стока лишней воды при постановке опыта; 5 — резиновая трубка; 6 — стеклянная пробка; 7 — мешалка из винилпласта.

для расчетов необходимо определить поглощение кислорода во всем объеме воды. Поскольку перемешивание воды производится как в опытной, так и в контрольной трубках, ошибка анализа от соприкосновения воды с воздухом учитывается автоматически.

Воду из трубок разливают сифоном в 60-миллилитровые склянки со сменой объемов воды. Содержание кислорода определяют методом Винклера при титровании гипосульфитом 50 мл пробы. Для расчета необходимо знать объем воды над илом в опытной трубке. Поскольку при расчетах (см. ниже) ряд величин в формуле сокращается, то достаточно в каждой опытной трубке определить линейкой расстояние (в см) от поверхности ила до пробки.

5. Потребление кислорода илом на 1 м³ производят по формуле

$$O_2 = \frac{n \cdot 8 \cdot n \cdot \pi r^2 l \cdot 10000 \cdot 24}{50 \cdot \pi r^2 \cdot t},$$

где O_2 — потребление кислорода илом на 1 м³ за время опыта, мг; n — разность между контролем и опытом при титровании 50 мл пробы, выраженная в мл тиосульфата; 8 — эквивалент кислорода; n — нормальность раствора тиосульфата; $\pi r^2 l$ — объем воды над илом (r и l , см); πr^2 — площадь ила в трубке, см²; 10000 — площадь 1 м², выраженная в см; 24 — пересчет на сутки, час.; 50 — количество жидкости, взятой на титрование, мл; t — время инкубации пробы, часы.

После сокращения формула принимает вид

$$O_2 = \frac{n \cdot n \cdot l \cdot 1600 \cdot 24}{t}, \text{ мг/м}^2 \text{ в сутки.}$$

Для выражения деструкции в мг органического вещества пересчет делают по табл. 8.

Определение деструкции органического вещества в илу за счет анаэробных процессов

Анаэробный распад ила может быть учтен по количеству выделившейся из ила углекислоты за вычетом той, которая образовалась при аэробном распаде ила. Если же придонные слои воды кислорода не содержат, то всю выделившуюся за время опыта углекислоту можно принять за меру анаэробного распада органического вещества ила.

1. Отбор проб и постановка опытов идентичны таковым при определении потребления илами кислорода.

2. По истечении срока инкубации трубки помещают в штатив, стеклянную пробочку из сливной трубочки на пробке удаляют, и пробку извлекают из трубки. Слой воды в трубках не перемешивают, а целиком сливают сифоном и содержание свободной углекислоты определяют титрованием 0.02 н. углекислого натрия¹ в присутствии фенолфталеина.

3. Расчет количества выделившейся углекислоты производят по формуле, которая после соответствующих сокращений, аналогично вышеописанному, принимает вид:

$$C/CO_2 = \frac{n \cdot n_1 \cdot l \cdot 1200 \cdot 24}{t} \text{ мг } C/m^3 \text{ в сутки,}$$

где n — разность между опытом и контролем при титровании 100 мл пробы, выраженная в мл карбоната; n_1 — нормальность раствора Na_2CO_3 ; l — расстояние между поверхностью ила и пробкой в опытном сосуде, см; 1200 — множитель, полученный после сокращения ряда величин, учитывающий молекулярный вес углерода CO_2 и пересчет от площади ила в сосуде к $1 m^3$ водоема; 24 — пересчет на сутки, часы; t — время опыта, час.

4. Величина деструкции за счет анаэробных процессов в илу равна

$$D_{ан} = C/CO_2 - (O_2 \times 0.44),$$

где $D_{ан}$ — деструкция за счет анаэробных процессов, мг C/m^3 в сутки; C/CO_2 — количество углекислоты, выделившейся за счет аэробных и анаэробных процессов в илу, мг C/m^3 в сутки; $(O_2 \times 0.44)$ — деструкция за счет аэробных процессов, выраженная в кислороде и пересчитанная на углерод при дыхательном коэффициенте 0.85, мг C/m^3 в сутки.

7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЫСТРОТЫ ПОТРЕБЛЕНИЯ РАСТВОРЕННЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ОЗЕРНОЙ ВОДЕ

Определение скорости потребления органических веществ основано на установлении величины радиоактивности бактерий и планктона при внесении небольших концентраций (от 1 до 50 мкг/л) меченого органического вещества в естественную воду (Hobbie et al., 1968; Wright, Hobbie, 1965).

Исходя из уравнения Линевивера и Бурка, основанного на правиле Михаэлиса—Ментена по кинетике энзиматических про-

¹ В данной реакции нормальный раствор карбоната натрия соответствует молярному.

цессов, расчет быстроты потребления данного органического вещества и запаса его в водоеме можно проводить графическим методом. Постановка опыта производится следующим образом.

1. Образец воды отбирают из водоема с нужной глубины батометром из органического стекла или непосредственно в стеклянную посуду.

2. Воду немедленно разливают в серию склянок объемом в 100 мл из стекла «Пирекс» по 50 мл в каждую.

3. В серию из 6 склянок одновременно вносят меченое органическое вещество вместе с носителем в количестве 10, 25, 50, 100 и 200 мкг С/л с удельной активностью 0.5 или 1.0 Ки/мл. Абсолютная активность органического вещества и его общее содержание определяют в виде BaCO_3 после сжигания хромовой смесью в приборе до CO_2 (см. стр. 179).

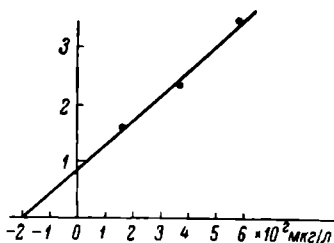


Рис. 35. Определение запаса и интенсивности процесса поглощения бактериями определенных органических веществ в природной воде по Хобби.

По оси ординат — отношение общей радиоактивности субстрата к радиоактивности препарата за время опыта, по оси абсцисс — количество добавленного субстрата.

Чаще всего для этих целей берут меченые глюкозу или ацетат, можно использовать гидролизат меченых водорослей, тщательно отделенный путем фильтрования от взвешенных частиц.

4. В каждой серии ставится контроль: 50 мл воды и 100 мкг/л органического вещества фиксируют 4 каплями иодуксусной кислоты или люголевским раствором. Пробу сразу же профильтровывают через мембранный фильтр и ее радиоактивность определяют под счетчиком.

5. Склянки с пробамы инкубируют в водоеме или аквариуме на палубе судна при температуре воды водоема. Длительность инкубирования проб определяется температурой: при высокой температуре пробы инкубируются 0.5—1 час, при низкой — до нескольких часов.

6. После инкубации пробы фиксируют 4 каплями люголевского раствора или небольшим количеством формалина. Фиксация должна быть произведена осторожно. Надо иметь в виду, что при этом организмы могут выделить часть меченого органического вещества наружу. Пробы фильтруют через мембранный фильтр № 3 с порами диаметром около 0.3 мкм и промывают небольшим количеством озерной воды или изотоническим раствором.

7. Фильтры высушивают и радиоактивность организмов на них определяют под торцовым счетчиком Гейгера.

Расчет результатов. Быстрота потребления данного вещества рассчитывается по формуле

$$V = \frac{r \cdot (S + A)}{R \cdot t},$$

где V — скорость потребления органического вещества, мкг/л в час; r — радиоактивность микроорганизмов на фильтре, имп./мин.; S — количество органического вещества в озерной воде, мкг/л; A — количество добавленного немеченого органического вещества в пробу, мкг/л, R — радиоактивность внесепного органического вещества в пробу, имп./мин.; t — время опыта, час.

Графически расчет производят следующим образом (рис. 35). При концентрации добавленного субстрата от 1 до 50 мкг/л потребление его следует правилу Михаэлиса—Ментена.

При увеличении концентрации добавляемого органического вещества, скажем глюкозы, отношение $\frac{R \cdot t}{r}$ возрастает — точки ложатся на прямой (рис. 35). Наклон этой прямой к оси абсцисс соответствует $\frac{1}{V}$, т. е. обратной величине максимальной скорости потребления органического вещества бактериями, пока транспортная система переноса данного органического вещества в клетку не будет полностью насыщена.

Отрезок оси абсцисс влево от ординаты до пересечения с наклонной прямой показывает количество данного органического вещества в испытуемой воде вместе с константой Михаэлиса—Ментена (K), которая для естественных вод близка к 0.005 мг/л (1×10^{-7} моля). Отрезок оси ординат от пересечения ее с абсциссой до пересечения с наклонной линией отражает быстроту усвоения естественного субстрата, иными словами, за сколько часов при скорости V данное органическое вещество усваивается бактериями при данной температуре.

Бактерии, у которых механизм усвоения органических веществ клеткой связан с транспортными системами, максимальная быстрота потребления субстрата будет наблюдаться при его низких концентрациях, не превышающих в 10 раз константу Михаэлиса—Ментена.

8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ПРОЦЕССА РЕДУКЦИИ СУЛЬФАТОВ С ПОМОЩЬЮ РАДИОАКТИВНОГО ИЗОТОПА СЕРЫ

Метод краткосрочных опытов с изолированными образцами воды или ила позволяет исследовать деятельность микроорганизмов не в питательной среде, а в естественных условиях обитания. В течение всего краткосрочного опыта сульфатредуцирующие бактерии проявляют свою деятельность в условиях естественного биоценоза при естественных концентрациях питательных веществ и при тех же температурных условиях, что и в водоеме. Применение меченого сульфата позволяет определить наличие процесса сульфатредукции и учесть его активность, а высокая чувствительность изотопного метода дает возможность установить ничтожно малые изменения в соотношении сульфатов и сероводорода, измеряемые сотыми и тысячными долями мг л. Метод предложен М. В. Ивановым (Иванов, 1956, 1959; Иванов, Терещкова, 1959).

Сущность метода определения интенсивности сульфатредукции основана на том, что в изолированный объем исследуемой

воды или ила вносят определенное количество радиоактивного сульфата натрия — $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$. Образец помещают в водоем в темном сосуде или сохраняют в лаборатории при температуре, соответствующей температуре водоема. После одного-двух дней инкубации определяют количество образовавшегося меченого сульфида. В качестве контроля ставят параллельный опыт. В темный сосуд с меченым сульфатом одновременно вносят формалин или другой антисептик. Появление меченого сульфида в контроле свидетельствует о наличии абиогенного процесса восстановления сульфатов. Как правило, в контроле меченых сульфидов не обнаруживается.

П о с т а н о в к а о п ы т о в . Пропись дана для определения интенсивности редукции сульфатов в иловых отложениях, где процессы редукции идут наиболее интенсивно, и здесь чаще всего она и определяется. В ряде случаев редукция сульфатов идет и в придонных слоях воды в анаэробных условиях. Различие методов состоит лишь в том, что для анализа отбирается вода в склянки до пробки объемом 50—100 мл, и в этой же воде производится определение содержания сульфатов.

1. Ил из водоема отбирают стратометром или дночерпателем Экмана—Берджи. Слой воды над илом осторожно сливают, и стерильной стеклянной трубкой или ложечкой наполняют на $\frac{2}{3}$ объема илом две склянки из-под пенициллина. Чаще всего анализ проводят в слое ила 0—2 см, но в зависимости от цели можно проводить его на любой глубине.

2. Из этой же пробы в другую склянку сразу же отбирают 50—100 г ила для определения в лаборатории содержания сульфатов, а если необходимо и сульфидов. В последнем случае в склянку на 50 г ила добавляют 1 мл 10%-го едкого натра, 100 мг углекислого цинка и содержимое перемешивают для фиксации свободного сероводорода и прекращения жизнедеятельности бактерий. В лаборатории сульфаты определяют весовым методом, а сульфиды — путем отгонки из кислого раствора в щелочь с последующим иодометрическим титрованием (стр. 179).

3. В каждую пенициллиновую склянку пипеткой со шприцем вносят по 1 мл меченого сульфата натрия ($\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$) с удельной активностью около 1 мкКи, или $2-5 \times 10^6$ имп./мин. под счетчиком Гейгера. Изредка параллельно с опытом ставят контрольную склянку, в которую, кроме изотопа, вносят 1 мл 40%-го формалина.

Склянки доливают доверху придонной водой и закрывают резиновой пробкой, так чтобы не осталось пузырьков воздуха. После этого их ставят в мешочки и помещают в водоем на сутки или в термостат с температурой, которая соответствует температуре придонного слоя воды в водоеме.

4. После инкубирования весь сероводород в склянках фиксируют. Для этого в каждую склянку добавляют по 0.3 мл 10%-го раствора едкого натра, 50—100 мг углекислого цинка (на кончике скальпеля), а микрофлору убивают добавлением 0.5 мл 40%-го формалина. Все содержимое тщательно перемешивают. Как закрывание склянок после внесения изотопа, так и процесс фиксации необходимо производить в резиновых перчатках, так как при этом часть изотопа выливается из склянок и попадает на руки.

5. В лаборатории сероводород из каждой пробы после подкисления отгоняют и под счетчиком Гейгера определяют радиоактивность серы, перешедшей из сульфатов в сульфиды. Отгон производят по вышеописанному методу (см. стр. 143) в приборе (рис. 32). Отличие состоит в том, что отгон сероводорода производят не в щелочь, а в 0.1 н. раствор KMnO_4 с продувкой азотом или водородом из аппарата Киппа. После 20 мин. отгона погло-

титель с марганцевокислым калием открывают, содержимое его спускают в колбу, а в верхнюю часть поглотителя приливают 1 мл крепкого раствора перекиси водорода (H_2O_2), 1 мл концентрированной соляной кислоты и сразу же 50 мл кипящей дистиллированной воды. В результате сероводород окисляется до сульфата, с которым легче работать.

6. Далее в колбу вносят 2 мл 10%-го раствора хлористого бария, и содержимое нагревают до кипения на плитке. Если количество образовавшегося осадка сернокислого бария незначительно, то в пробу вносят несколько капель 0.1 н. серной кислоты. Часть или все содержимое колбы профильтровывают через мембранный фильтр № 3, который предварительно взвешивают на аналитических весах.

7. После высушивания фильтр с осадком вторично взвешивают и радиоактивность осадка определяют под счетчиком Гейгера. По разности весов определяют навеску $BaSO_4$ на фильтре и, исходя из площади воронки, в которой производилось фильтрование пробы, производят расчет количества сернокислого бария, приходящегося на 1 cm^2 площади. В полученную величину радиоактивности вносят поправку (табл. 10) на величину самопоглощения β -излучения в осадке сернокислого бария.

Таблица 10

Коэффициенты поправок на величину самопоглощения β -излучения в осадках $BaSO_4$ (по: Романенко, 1970б)

Навеска $BaSO_4$, мг/ cm^2	К	Навеска $BaSO_4$, мг/ cm^2	К
0.2	0.93	5.9	1.56
0.38	0.96	7.2	1.72
0.96	1.00	7.7	1.93
1.91	1.10	9.2	2.08
3.0	1.19	10.5	2.29
4.2	1.30	11.4	2.56
5.1	1.42	12.4	2.62

$R_0 = R_1 \cdot K$, где R_0 — радиоактивность S^{35} при нулевой толщине осадка $BaSO_4$, имп./мин.; R_1 — радиоактивность S^{35} при навеске $BaSO_4$ в данном опыте; K — коэффициент поправки на величину самопоглощения β -излучения.

8. Определение радиоактивности внесенного в пробу меченого сульфата и образовавшихся меченых сульфидов следует производить в один день, тогда автоматически вносится поправка на падение радиоактивности в связи с распадом S^{35} , период полураспада которой равен 96 дням.

Определение радиоактивности изотопа серы $Na_2S^{35}O_4$ производят так же, как $Na_2C^{14}O_3$ (см. стр. 136). Разница состоит лишь в том, что карбонат осаждают барием в щелочной среде, а сульфат — в кислой. Делают разведение изотопа $Na_2S^{35}O_4$ до примерной активности около 5000—10 000 имп./мин. на дистиллированной воде. В пробирку наливают 10 мл 0.1 н. соляной кислоты, вносят 1 мл данного разведения изотопа, 1 мл 10%-го хлористого бария и, если осадка мало, — несколько капель 0.1 н. серной кислоты. Содержимое нагревают на водяной бане и фильтруют через фильтр № 3. Радиоактивность осадка $BaS^{35}O_4$ определяют под счетчиком и в данную величину вносят поправку на величину поглощения β -излучения в осадке $BaSO_4$ (табл. 10), исходя из навески сульфата бария на фильтре в расчете на 1 cm^2 фильтра. Окончательный расчет производят, исходя из разведения.

9. Абсолютная величина интенсивности редукции сульфатов рассчитывается по формуле

$$S_r = \frac{r \cdot S_{SO_4} \cdot 24}{R_{SO_4} \cdot t},$$

где S_r — интенсивность редукции сульфатов, мг S/л в сутки; r — радиоактивность сульфидов в пробе ила, имп./мин.; S_{SO_4} — содержание сульфатов в анализируемом иле, мг S/л; 24 — пересчет на сутки, часы; R_{SO_4} — радиоактивность сульфата, внесенного в пробу, имп./мин.; t — время опыта, часы.

10. После отгона сульфидов из проб одной станции прибор (рис. 32) следует разобрать, тщательно промыть горячей дистиллированной водой, и только после этого производить следующий анализ. Эта процедура необходима, так как прибор сильно загрязняется радиоактивной серой, что может привести к значительным ошибкам при отгонке образца ила, где сульфатредукция шла слабо.

9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ПРОЦЕССА ОКИСЛЕНИЯ СУЛЬФИДОВ И СЕРОВОДОРОДА С ПОМОЩЬЮ РАДИОАКТИВНОГО ИЗОТОПА СЕРЫ

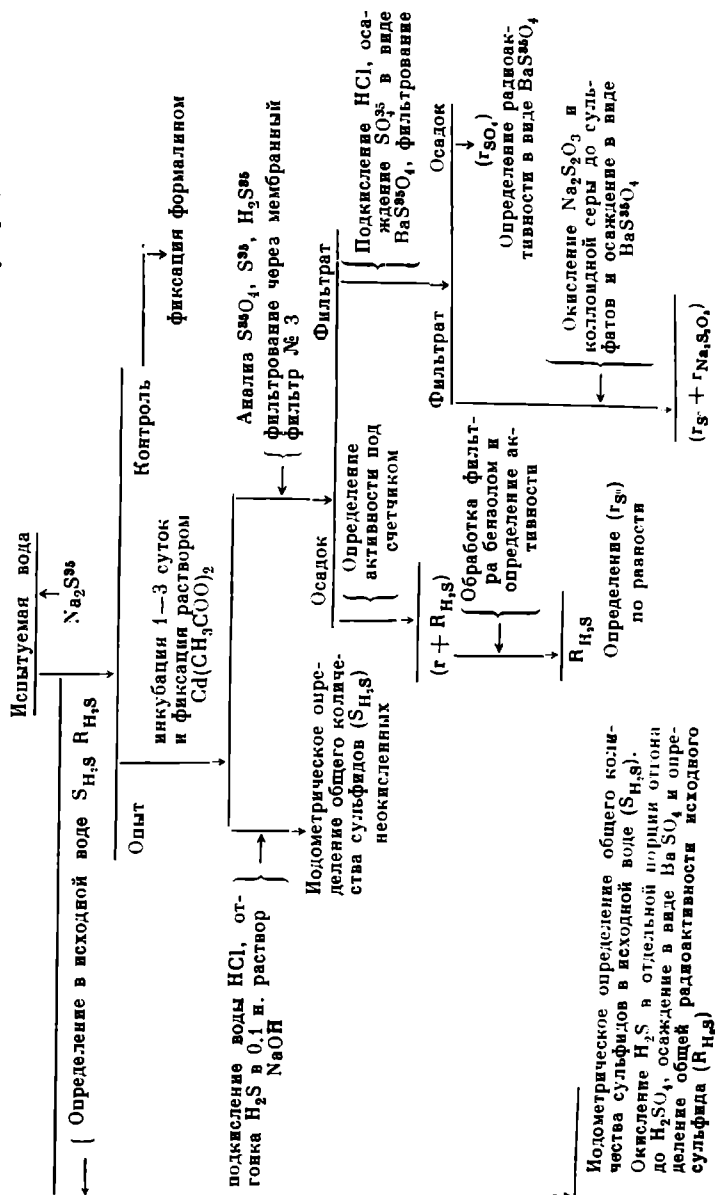
Окисление сероводорода и сульфидов натрия или кальция, которые чаще всего встречаются в природных водах, может происходить химически кислородом воздуха, а также биологически за счет деятельности тионовых бактерий или фотосинтезирующих и бесцветных серобактерий.

Тионовые бактерии и бесцветные серобактерии ведут окисление сульфидов как в темноте, так и на свету. Пурпурные и зеленые серобактерии используют сероводород как донатор водорода в процессе фотосинтеза, поэтому процесс этот может идти только на свету в отсутствие кислорода воздуха.

Схема постановки опытов была разработана М. В. Ивановым (1959). В изолированный объем испытуемой воды вводят меченый по сере сульфид натрия, а в конце опыта (через сутки) определяют количество образовавшихся меченых сульфатов и молекулярной серы. С каждым образцом воды ставят три варианта опыта. Фабричный препарат сульфида натрия (Na_2S^{35}) часто бывает загрязнен мечеными сульфатами $Na_2S^{35}O_4$, поэтому перед постановкой опытов его следует очищать перегонкой в щелочь из кислого раствора. Схема постановки опытов по определению процессов окисления сульфидов в естественных водоемах приведена ниже.

Вариант опыта	Процессы, происходящие в склянке
1. Светлая склянка без формалина.	Сероводород окисляется химическим путем, тионовыми, бесцветными серобактериями и окрашенными серобактериями.
2. Светлая склянка с формалином или хлороформом.	Сероводород окисляется только химическим путем, так как микрофлора убита.
3. Темная склянка без формалина.	Сероводород окисляется химическим путем тионовыми и бесцветными серобактериями. Окрашенные серобактерии неактивны, так как отсутствует свет.

Схема анализа H_2S , S^{0} и SO_4 , образовавшихся при окислении меченого сульфида



Постановка опытов (см. схему анализа).

1. Воду из водоема отбирают с определенной глубины плексигласовым батометром Руттнера. С одного батометра забирают три склянки из белого стекла с притертыми пробками объемом 60—150 мл.

В каждую склянку пипеткой со шприцем (рис. 36) вносят 1 мл раствора Na_2S^{35} с удельной радиоактивностью 0.3—0.5 мкКи или 50—100 тыс. имп./мин. при подсчете под торцовым счетчиком с коэффициентом пересчета около 7. В первую контрольную склянку одновременно с изотопом вносят 1 мл 40%-го формалина, вторую помещают в черный мешочек, а третья остается на свету.

2. Склянки закрывают притертыми пробками и помещают на соответствующую глубину в водоем на 24 часа. При определении окисления сероводорода лишь в темноте (см. вариант 3 опыта № 3) пробы можно инкубировать на палубе судна в аквариуме при температуре воды в водоеме.

3. По окончании опыта сразу после извлечения склянок из водоема остаточные сульфиды во всех склянках фиксируют раствором уксуснокислого кадмия, и в таком виде пробы доставляют в лабораторию. Анализ серы производят по прилагаемой схеме.

4. Часть воды из каждой склянки фильтруют через мембранный фильтр в воронке Зейтца с внутренним диаметром 2 см, соответствующим диаметру слюдяного окошечка торцового счетчика Гейгера—Мюллера $T=25$, и фильтр промывают слабым раствором сернокислого натрия. Сульфаты проходят через фильтр, а на фильтре остаются меченые сульфиды, образовавшаяся меченая молекулярная сера и сера внутри клеток фотосинтезирующих серобактерий. Общую их радиоактивность определяют под торцовым счетчиком.

5. После этого фильтры обрабатывают бензолом, в результате молекулярная сера растворяется, и активность CdS^{35} вновь определяют под счетчиком. Количество образовавшейся молекулярной серы рассчитывают по разности активности фильтра до и после обработки бензолом.

6. Фильтрат подкисляют соляной кислотой и сульфаты в нем осаждают 10%-м раствором хлористого бария. Осадок сернокислого бария отфильтровывают на мембранный фильтр и его активность определяют под торцовым счетчиком. При этом через фильтр проходит коллоидальная сера и тиосуль-



Рис. 36. Шприц с пипеткой для внесения радиоактивных изотопов в пробы.

фаты. Их окисляют перманганатом до SO_4^{2-} . С этой целью в колбочку с фильтратом вносят 2 мл 5%-го раствора марганцевокислого калия, 0.5 соляной кислоты (1 : 2) и 1 мл 10%-го хлористого бария. Смесь кипятят и обесцвечивают перекисью водорода. Осадок сернокислого бария отфильтровывают, определяют его радиоактивность и пересчитывают на сумму коллоидной серы и тиосульфата.

7. Из второй порции испытуемой воды (см. вариант 3 опыта) после растворения серной кислотой осадка сернистого кадмия сероводород отгоняют в раствор 0.1 н. щелочи или 0.05 н. вода. Общее количество сероводорода в отгоне определяют иодометрически титрованием и пересчитывают на серу. Отгон из контрольной склянки показывает исходное количество сероводорода, которое подвергалось окислению.

Общую радиоактивность добавленного в пробу сульфида определяют в виде CdS^{35} после осаждения сульфидов уксуснокислым кадмием $[\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ из определенного объема воды контрольной склянки или после отгона H_2S^{35} окисляют, как было указано выше, до $\text{H}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ и осаждают хлористым барием в виде $\text{BaS}^{35}\text{O}_4$. Радиоактивность CdS^{35} или $\text{CdS}^{35}\text{O}_4$ определяют на мембранном фильтре под торцовым счетчиком.

Расчет интенсивности окисления сероводорода до молекулярной серы или до сульфатов производят по формуле

$$S_{\text{мол}} = \frac{r_s \cdot S_{\text{H}_2\text{S}} \cdot 24}{R_{\text{H}_2\text{S}} \cdot t},$$

$$S_{\text{SO}_4} = \frac{r_{\text{SO}_4} \cdot S_{\text{H}_2\text{S}} \cdot 24}{R_{\text{H}_2\text{S}} \cdot t},$$

где $S_{\text{мол}}$ — общее количество образовавшейся молекулярной серы, мг S/л в сутки; r_s — общая радиоактивность молекулярной серы, образовавшейся за счет окисления сульфидов тионовыми бактериями, имп./мин. на всю пробу; $S_{\text{H}_2\text{S}}$ — общее количество сульфидов в пробе, мг S/л; 24 — пересчет на сутки, часы; $R_{\text{H}_2\text{S}}$ — общая радиоактивность добавленного в пробу сульфида, имп./мин.; t — время инкубации проб, часы; S_{SO_4} — общее количество образовавшегося сульфата в результате окисления сульфидов, мг S/л в сутки; r_{SO_4} — общая радиоактивность серы образовавшихся сульфатов, имп./мин. на всю пробу.

10. БИОХИМИЧЕСКОЕ ПОТРЕБЛЕНИЕ КИСЛОРОДА

Природные воды всегда содержат большее или меньшее количество взвешенных и растворенных органических веществ, весьма различающихся как по своему химическому составу, так и по усвояемости микроорганизмами. Окисление легкодоступной части органического вещества происходит при участии микроорганизмов и чисто химическим путем. В качестве окислителя используется растворенный в воде кислород.

Под биохимическим потреблением кислорода (БПК) понимается количество кислорода (в мг/л), которое используется на окисление легкодоступной части органических веществ, находящихся в этой воде.

Если для анализа берут нефильтрованную воду, то в результате определяют сумму окисленных за время опыта растворенных и взвешенных веществ. Когда же для анализа используют фильтрованную воду, то устанавливают количество окисленных растворенных веществ.

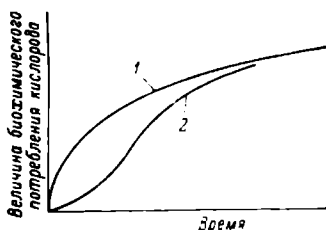


Рис. 37. Различные типы кривых биохимического потребления кислорода.

1 — потребление кислорода идет по закону мономолекулярных реакций; 2 — потребление кислорода не соответствует закону мономолекулярных реакций

При определении химического потребления кислорода (ХПК) постановка опыта остается та же, как будет описано ниже для определения БПК, только в воду вносят несколько капель насыщенного раствора сулемы, чтобы прекратить деятельность бактериальной флоры.

Путем большого количества анализов удалось установить, что окислительный процесс во времени идет, как правило, с убывающей скоростью. К нему приложимо уравнение мономолекулярных реакций

$$\lg \frac{D}{D - D_t} = Kt,$$

где D — полное БПК, мг O_2 /л, D_t — БПК за t дней, мг O_2 /л, K — константа скорости биохимического потребления кислорода.

Графически поглощение кислорода в процессе окисления растворенных легкоокисляемых веществ может быть представлено логарифмической кривой 1, как это видно из рис. 37 (Лапшин, 1952). В этом случае можно по формуле вычислить полное БПК на основании двух наблюдений, сделанных через разные промежутки времени.



Рис. 38. Схема водного запора склянок при определении БПК.

1 — соска; 2 — водяной запор.

Однако в ряде случаев, когда в водоем поступают органические вещества, не свойственные для автохтонной микрофлоры, первые стадии распада этих веществ в опыте по определению БПК могут задерживаться до тех пор, пока не разовьется соответствующая микрофлора. Тогда потребление растворенного кислорода уже не будет идти согласно законам мономолекулярной реакции, и его можно представить кривой 2. В этом случае полное БПК нельзя вычислить по приведенной выше формуле, наиболее приближенные величины его могут быть получены при непосредственном наблюдении в длительном опыте.

О п р е д е л е н и е: 1. Исследуемую воду из батометра переливают в колбу и температуру ее доводят до 20° .

2. В случае пониженного содержания кислорода или его отсутствия воду аэрируют, взбалтывая в течение 1—5 мин. или продувая через нее воздух при помощи резиновой груши или насоса, после чего дают пузырькам воздуха выйти из воды.

3. Воду из колбы разливают при помощи сифона в 6 склянок с притертыми пробками, так чтобы в них не осталось пузырьков воздуха.

4. В две склянки добавляют реактивы и определяют исходное содержание растворенного в воде кислорода по Винклеру. На остальные четыре склянки надевают водяные затворы, чтобы предохранить попадание воздуха в склянки во время их инкубации в термостате.

В качестве водяного запора используют стеклянные колпачки или резиновые соски. Соску заполняют водой. Опытную склянку переворачивают вверх дном, и на ее горлышко натягивают заполненную водой соску (рис. 38).

5. Склянки инкубируют в термостате при температуре 20°. Через 3 дня в двух склянках из четырех определяют содержание растворенного кислорода. Через 6 дней устанавливают содержание растворенного кислорода в двух других склянках.

Разность в содержании кислорода между исходной водой и после трех суток инкубации при 20° обозначается как БПК₃ и соответственно после шести дней инкубации — БПК₆. Для сравнения различных водоисточников аналогичным же образом определяют в специальном опыте БПК₆ после пятисуточной экспозиции при 20°.

6. Расчет константы скорости биохимического потребления кислорода и полного БПК производят по нижеприведенным формулам (Лапшин, 1952).

$$\text{БПК}_{\text{полн}} = \frac{a_1^2}{2a_1 - a_2}; \quad K = \frac{1}{t} \cdot \lg \frac{a_1}{a_2 - a_1},$$

где a_1 — БПК за t суток (в частности, за 3 дня); a_2 — БПК за $2t$ суток (в частности, за 6 дней).

11. АНАЛИЗ ВОДЫ НА ПРИСУТСТВИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФЕКАЛЬНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Наличие фекального загрязнения воды устанавливается нахождением в ней бактерий из группы кишечной палочки — *Bacterium coli*, в которую включаются также бактерии из подгруппы *coli aerogenes*. Вся группа бактерий — показателей фекального загрязнения — характеризуется следующими признаками: аэробные, короткие, грамтрицательные, неспоровые палочки, сбраживающие глюкозу с образованием газа в течение 24 час. при 43—45°. На среде Эндо бактерии этой группы образуют красные колонии с золотым блеском или темно-красные и розовые с темным центром.

Необходимо заметить, что бактерии группы кишечной палочки способны развиваться за счет органических веществ, переходящих в раствор при распаде водной растительности. Таким образом, *Bact. coli* нельзя принимать как абсолютный показатель фекального загрязнения. Проводя этот анализ, необходимо учитывать и общий характер подоема.

Результаты анализа выражаются или в виде коли-индекса, т. е. количества бактерий в 1000 мл воды, или в виде коли-титра, т. е. наименьшего объема, содержащего одну кишечную палочку.

Для чистой воды озер и водохранилищ наилучшие результаты получаются путем ультрафильтрации испытуемой воды

и проращивания мембранных фильтров на среде Эндо. Методика эта была разработана А. С. Разумовым и К. К. Барсовым (Разумов, 1947).

1. Подготовка к посеву. Фильтровальный аппарат протирают тампоном, смоченным спиртом, и обжигают. После охлаждения на площадку фильтровальной воронки кладут свежепрокипяченный мембранный фильтр меткой или надписью вверх. На фильтр помещают верхнюю часть прибора (стакан воронки) закрепляют ее.

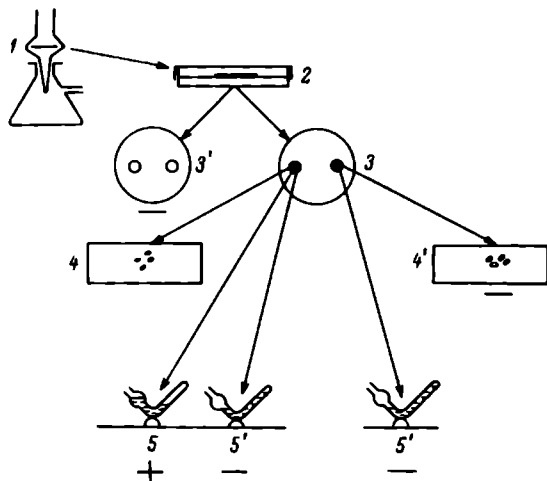


Рис. 39. Схема анализа воды на фекальные загрязнения.

1 — фильтрование воды через мембранный фильтр; 2 — проращивание бактерий на агаре Эндо; 3 — наличие золотистого вида колоний; 3' — отсутствие золотистого вида колоний; 4 — положительная окраска по Граму; 4' — отрицательная окраска по Граму; 5 — газообразование на среде Эсмана. Результаты опытов: знак минус — окончательный отрицательный результат; знак плюс — окончательный положительный результат.

2. Посев. В стакан фильтровальной воронки вносят стерильной пипеткой намеченный объем воды, и в приемном сосуде создают вакуум. По окончании фильтрования, когда вся вода пройдет через фильтр, прибор разбирают. Мембранный фильтр с осевшими бактериями берут обожженным пинцетом и просушивают на воздухе, пока на его нижней стороне исчезнут капли воды. Фильтр помещают в чашки Петри на поверхность застывшей среды Эндо (№ 16). Необходимо следить, чтобы под фильтром не осталось пузырьков воздуха.

Сторона фильтра с меткой должна быть обращена вверх. В рабочей тетради записывают номер фильтра, дату, номер пробы, количество профильтрованной воды. В одну чашку Петри можно положить несколько фильтров с диаметром фильтрующей поверхности в 3 см.

3. В ы р а щ и в а н и е. Чашки с посевами ставят в термостат столбчато не более 3—4 шт., повернув крышками вниз. Инкубируют посевы 24 часа при 27°.

4. Учет результатов анализа. По окончании выращивания результаты анализа учитывают по схеме (рис. 39). Крышку снимают с чашки Петри и, пользуясь лупой с увеличением $\times 10$ или бинокулярным микроскопом, подсчитывают типичные колонии.

Отсутствие в посевах типичных колоний дает окончательный отрицательный ответ. При их наличии из некоторых делают мазок и окрашивают по Граму. Отсутствие грамотрицательных, неспороносных клеток указывает на то, что фекальных загрязнений нет.

При наличии колоний грамотрицательных бактерий из них делают посев в пробирки с поплавками со средой Эйкмана (№ 17). Посевы выращивают 24 часа при $43-45^{\circ}$. Если не наблюдается газообразования, то фекальное загрязнение не имеет места.

Наличие газообразования дает положительный и окончательный ответ во всех случаях анализа воды на фекальное загрязнение.

Через мембранный фильтр с диаметром фильтрующей поверхности в 3 см нужно пропускать такое количество воды, чтобы после проращивания на фильтре не было более 50 колоний. Если вода сильно загрязнена, что определяется опытным путем, то ее следует предварительно развести в 10 или 100 раз стерильной водой.

**НЕКОТОРЫЕ СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ
ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

Наиболее полно методы гидрохимического анализа описаны в руководствах А. А. Резникова и Е. П. Муликовской (1954), О. А. Алекина (1959) и др. Ниже мы приводим или наиболее употребительные упрощенные методы анализа, справку о которых всегда желательно иметь под рукой, или некоторые новые методы, не описанные в вышеприведенных руководствах, но необходимые при работе с радиоактивными изотопами.

**1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОЙ КИСЛОТНОСТИ
СРЕДЫ (рН)**

Развитие большинства микроорганизмов происходит в определенных интервалах кислотности среды. При исследовании естественных водоемов в ряде случаев требуется определение кислотности окружающей среды с точностью до 0.1 рН. В этих случаях правильнее всего вести определения на месте, пользуясь электрометрическим методом и применяя стеклянный электрод.

Во многих случаях при приготовлении питательных сред такой точности определений не требуется и возможно пользоваться колориметрическим методом сравнения со стандартными растворами при добавке соответствующих индикаторов.

**Приготовление растворов индикаторов
по Кларку**

Кларковские индикаторы представляют собой свободные кислоты и плохо растворимы в воде. Для перевода их в раствор 0.1 г индикатора растирают в ступке с указанным в табл. 11 количеством 1/20 н. раствора едкого натра до полного растворения и разбавляют далее дистиллированной водой до 25 мл. Таким образом получают запасной раствор индикатора. Для употребления раствор разбавляют еще в 10 раз.

При определении pH на 10 мл испытуемой жидкости добавляют 5 капель раствора индикатора.

Пределы концентрации водородных ионов, в которых отдельные индикаторы меняют свою окраску, приведены в табл. 11.

Т а б л и ц а 11
Приготовление индикаторов по Кларку

Индикатор	Интервал pH для применения индикаторов	Изменение цвета	Количество мл 1/20 н. раствора NaOH на 0.1 г индикатора
Тимоловый синий (кислый)	1.2—2.8	Красный—желтый	4.3
Бромфеноловый синий	3.0—4.6	Желтый—голубой	3.0
Метиловый красный	4.4—6.0	Красный—желтый	7.4
Бромкрезоловый пурпуровый	5.2—6.8	Желтый—пурпурный	3.7
Бромтимоловый синий	6.0—7.6	Желтый—синий	3.2
Фенолрот	6.8—8.4	Желтый—красный	5.7
Крезолрот	7.2—8.8	То же	5.3
Тимоловый синий щелочной	8.0—9.6	Желтый—синий	4.3
Крезолфталеин	8.2—9.8	Бесцветный—красный	5.3
Метиловый оранжевый	3.1—4.4	Оранжевый—красный	0
Фенолфталеин	8.3—10.0	Бесцветный—красный	0

Определение pH без буферных растворов по методу Джиллесли

Метод основан на том принципе, что при рассматривании двух стоящих друг за другом пробирок с кислым и щелочным растворами индикатора, количество которых варьируют, можно получить все переходные окраски. Если количество индикатора (0.8 мл) в пробирке с испытуемой водой будет равно количеству индикатора в обеих пробирках с кислым и щелочным растворами, то всегда можно подобрать соотношение индикатора в кислом и щелочном растворах, так чтобы окраска соответствовала таковой испытуемой воды. Окраска в пробирках со щелочным

и кислым растворами всегда постоянна для определенного отношения объемов индикатора, добавленных в кислый и щелочной растворы, и соответствует определенным значениям рН, приводимым в табл. 12.

Этот метод применим как в поле, так и в лаборатории.

Необходимые реактивы: 1) соляная кислота — растворы 0.001, 0.1 и 0.5 объемных процентов от концентрированной; 2) едкий натрий — растворы 0.05 и 0.005 н.; 3) чистые пробирки одинакового диаметра; 4) растворы индикатора; 5) пипетки, градуированные на 0.1, 1.0 и 10.0 мл.

Метод определения. 1. Располагают 18 пробирок в 2 ряда. 2. Надписывают каждую пару пробирок от № 1 до 9.

3. В каждую пробирку первого ряда добавляют по 10 мл щелочного раствора, в каждую пробирку второго ряда — по 10 мл кислоты соответствующей концентрации — табл. 12.

Таблица 12

Приготовление стандартных цветных растворов для определения рН по методу Джиллеспы (по: Levine, 1954)

Количество водного раствора индикатора в пробирке, мл		Значение рН для каждой пары пробирок							
с кислотой	со щелочью	тимоловый синий кис- лый	бромфеноло- вый синий	метиловый красный	бромкрезо- ловый пур- пуровый	бромтимоло- вый синий	фенолрот	крезолрот	тимоловый синий ще- лочной
0.8	0.0	1.2	3.2	4.4	5.2	6.2	6.8	7.2	8.0
0.7	0.1	1.4	3.4	4.7	5.4	6.4	7.0	7.4	8.2
0.6	0.2	1.6	3.6	4.9	5.6	6.6	7.2	7.6	8.4
0.5	0.3	1.8	3.8	5.1	5.9	6.8	7.4	7.8	8.6
0.4	0.4	2.0	4.0	5.3	6.1	7.0	7.6	8.0	8.8
0.3	0.5	2.2	4.2	5.4	6.3	7.2	7.8	8.2	9.0
0.2	0.6	2.4	4.4	5.6	6.5	7.5	8.0	8.4	9.2
0.1	0.7	2.6	4.6	5.8	6.7	7.6	8.2	8.6	9.4
0.0	0.8	2.8	4.8	6.0	6.8	7.8	8.4	8.8	9.6
Концентрация водного раство- ра индикатора, %		0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.04	0.02	0.02
Раствор для по- лучения щелоч- ного индикато- ра		0.001% HCl	н. 200 NaOH	н. 20 NaOH	н. 20 NaOH	н. 20 NaOH	н. 100 NaOH	н. 20 NaOH	н. 20 NaOH
Раствор HCl для получения ки- слого оттенка индикатора, %		0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.001

4. Готовят основные спиртовые 0.2%-е растворы индикаторов, которые перед употреблением разводят водой до концентрации, указанной в табл. 12.

5. В пробирки первого ряда вносят последовательно 0, 0.1, 0.2, 0.3 ... 0.8 мл индикатора, в пробирки второго ряда соответственно 0.8, 0.7, 0.6 ... 0.1, 0.0 мл индикатора, так что в каждой паре пробирок в сумме заключается по 0.8 мл индикатора.

6. К испытуемой воде прибавляют 0.8 мл индикатора, в парную к ней пробирку наливают дистиллированную воду. Сравнение цветов удобно производить в компараторе (рис. 40).

Джиллесли рекомендует вести определения в пробирках 1.5×15 см, подбирая их по диаметру. При определении в ряд пробирок

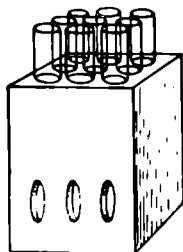
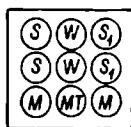


Рис. 40. Схема устройства компаратора для определения pH по методу Джиллесли.

W — дистиллированная вода; M — испытуемая вода без добавки индикатора; MT — испытуемая вода с добавкой индикатора; S и S₁ — парные стандартные растворы кислоты и щелочи с различными соотношениями добавляемого индикатора по методу Джиллесли.



наливают по 10 мл воды. Колебаниями уровня в 3—4 мм при высоте столба жидкости в 8 см можно пренебречь.

Ошибка при определении активной кислотности этим методом может достигать 0.2 pH, однако такая точность часто бывает вполне достаточной при установлении реакции питательной среды (Levine, 1954).

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА

Учет растворенного в воде кислорода еще не может полностью характеризовать окислительно-восстановительных условий окружающей среды. Как известно, всякий окислительный процесс сводится к потере электрона окисляющимся атомом вещества, независимо от участия в этой реакции молекулярного кислорода. Кроме того, необходимо учитывать не только количество окислителя, в частности общее количество растворенного кислорода, но и то напряжение, с которым в данной среде могут протекать реакции окисления или восстановления.

Величина окислительно-восстановительного (О-В) потенциала и является показателем напряжения окислительных процессов. О-В потенциал может быть выражен в вольтах и представлять разность потенциалов между нормальным водородным электродом и потенциалом, который принимает пластинка из индифферентного металла в равновесии с окружающей средой (*Eh*). Другая форма выражения О-В потенциала — индекс gH_2 , представля-

ющий собой отрицательный логарифм концентрации молекулярного водорода, при которой могут создаваться данные окислительно-восстановительные условия.

Зависимость между этими величинами выражается следующими уравнениями:

$$E_h = 0.029 \times (rH_2 - 2pH) \quad \text{или} \quad rH_2 = \frac{E_h}{0.029} + 2pH$$

Как видно из формулы, величина E_h , представляющая собой разность потенциалов между индифферентным электродом и нормальным водородным электродом, зависит как от концентрации молекулярного водорода, так и от концентрации его ионов. Вследствие этого E_h сам по себе еще не характеризует окислительно-восстановительные условия среды. Для получения сравнительных величин всегда необходимо вести определения при какой-то неизменной величине pH. В противоположность этому величину rH_2 мы можем всегда получить, определяя одновременно E_h и pH. Значительные сдвиги в rH_2 знаменуют переход к другой степени аэробности, а зачастую и к другому типу обмена веществ. Колебания эти могут быть особенно значительными около нейтральной реакции, где небольшие абсолютные изменения концентрации водород-

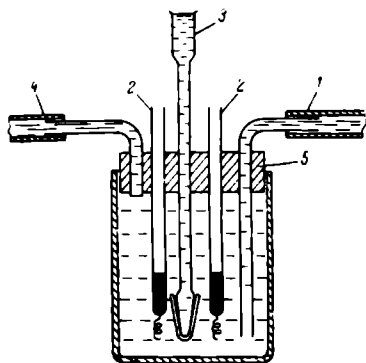


Рис. 41. Форма сосуда для определения О-В потенциала в воде.

1 — подводная трубка; 2 — платиновый электрод; 3 — сифонный наломельного электрода; 4 — выводная трубка; 5 — пробка с вмонтированными электродами.

ных ионов сильно сказываются на величине pH и еще более на величине rH_2 .

1. Электроды для определения О-В потенциала готовят из платиновой проволоки диаметром 0.5 мм, впаявают в стеклянную трубочку, так чтобы свободный конец был длиной около 1 см.

Электроды очищают последовательно обработкой крепким раствором едкого натрия и горячей азотной кислотой и тщательно промывают дистиллированной водой. Перед употреблением электроды калибруют. С этой целью берут стандартный раствор смеси, который имеет значение $E_h = 430$ мВ при 25°, состоящий из M/300 $K_2Fe(CN)_6$ и M/300 $K_4Fe(CN)_6$ в M/10 KCl. Электроды должны показать правильный О-В потенциал. К показанию на шкале прибора прибавляют поправку согласно табл. 13. Например, для температуры 25° отсчет на приборе будет +184, поправка +246 (184 + 246 = +430). Если показания отличаются от теоретических, то электроды подвергают повторной очистке. Следует тщательно проверять, чтобы не было трещин стекла в месте впая платиновой проволоки.

2. При определении О-В потенциала необходимо следить, чтобы испытуемые образцы воды или ила не соприкасались с воздухом. С этой целью для определения О-В потенциала в воде можно рекомендовать следующую форму сосуда.

В стеклянную широкогорлую банку вставляют резиновую пробку с четырьмя отверстиями, как это видно из рис. 41. В два отверстия вставляют стеклянные трубочки (1 и 4), трубку 4 вставляют в резиновую пробку. Трубка 1 каучуком приклеивается к батометру, что дает возможность заполнить сосуд и пропустить ток воды, так чтобы все пузырьки воздуха были удалены через трубку 4. В другие два отверстия в резиновой пробке вставляется платиновый электрод (2) и палочковидный каломельный электрод (3) или сифончик, заполненный агаром на насыщенном хлористом калии.

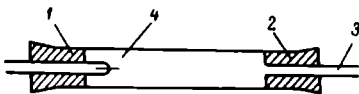


Рис. 42. Форма сосуда для определения окислительно-восстановительного потенциала в иле.

1 — резиновая пробка с электродом; 2 — резиновая пробка без электрода; 3 — трубка для контакта ила с раствором хлористого калия; 4 — гладкий платиновый электрод.

Для определения О-В потенциала в иловых отложениях удобно использовать электрод, представленный на рис. 42. Последний состоит из стеклянной трубки диаметром 8—10 мм, в ней подобраны две резиновые пробки.

В одну из пробок вставлена стеклянная трубочка с впаянным в нее электродом (4) из платиновой проволоки, в другую (2) — стеклянная трубочка (3) с внутренним просветом в 2—3 мм. При заполнении сосуда пробку (1) с электродом (4) вынимают и ил засасывают в стеклянную трубку вплоть до пробки 2, затем вставляют пробку 1 с электродом. При этом монолит с илом несколько продвигается к противоположному концу. После этого пробку 2 вновь вдавливают, так чтобы между ней и илом не было пузырьков воздуха. Избыток ила выступает через трубочку 3, которая и служит для контакта между электродом и соединительным сосудом с насыщенным хлористым калием.

Таблица 13

Поправка на хлорсеребряный и каломельный полужелезные электроды для приведения отсчета к нормальному водородному электроду

Температура, °C	Платиновый полужелезный электрод по отношению к	
	хлор-серебряному насыщенному	каломельному насыщенному
10	+206	—
20	+200	+250
25	+197	+246
30	+194	—
35	+191	+239
40	+191	—

платинового электрода, который впивается в тонкую стеклянную трубку. Монолит ила отбирают в плексигласовую трубку. После поднятия стратометра на палубу судна нижнее отверстие трубки закрывают пробкой и плексигласовую трубку отнимают от стабилизатора. Колонку ила подают с помощью нижней пробки на соответствующую высоту. Шурупы, которыми закрыты отверстия, вывинчивают, и на их место вставляют платиновые электроды. Каломельный электрод помещают в верхнее отверстие до сопри-

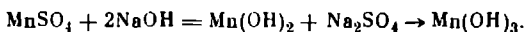
косновения с илом. Таким образом удастся промерить О-В потенциал на глубину 20—40 см через небольшие расстояния.

В том случае, когда ил сложен вязкими глинами, монолит его из трубки стратометра выталкивают на эмалированный поднос, верхнюю боковую сторону зачищают ножом и тонкий платиновый электрод вставляют непосредственно в монолит ила. Таким образом, О-В потенциал может быть промерен в тонких слоях, а разрез монолита позволяет установить, что это за слои.

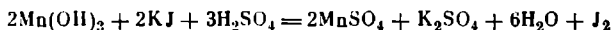
3. Отсчет О-В потенциала (в мВ) представляет разность потенциалов между платиновым и каломельным электродами и выражается через $E_{\text{калом.}}$. Если каломельный электрод присоединен к клемме потенциометра «—», то $E_{\text{калом.}}$ будет величиной положительной, если каломельный электрод присоединен к клемме «+», то величина $E_{\text{калом.}}$ будет отрицательной. При этом $E_A = E_{\text{калом.}} + \alpha$, где α — поправка для перехода от показаний насыщенного каломельного электрода к нормальному водородному электроду и при температуре 18° равна +249 мВ (табл. 13).

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАСТВОРЕННОГО В ВОДЕ КИСЛОРОДА ПО МЕТОДУ ВИНКЛЕРА

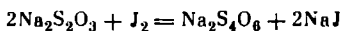
Сущность метода заключается в том, что гидрат закиси марганца в щелочном растворе окисляется за счет растворенного в воде кислорода с образованием гидрата окиси марганца.



После растворения осадка соляной или серной кислотой гидрат окиси марганца образует трехвалентный марганец, который в кислой среде реагирует с иодистым калием, окисляя его до свободного иона, и восстанавливается до Mn^{2+} .



Следовательно, 2 атома иода эквивалентны одному атому кислорода. Количество выделившегося иода оттитровывается гипосульфитом



Р е а к т и в ы:

1. Раствор хлористого или сернокислого марганца, содержащий 42.5 г $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ или 48 г $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, доводят до 100 мл дистиллированной водой.

2. Щелочной раствор иодистого калия готовят, растворяя 70 г КОН или 50 г NaOH и 15 г KJ в дистиллированной воде и доводят объем до 100 мл.

3. 0.02 н. раствор тиосульфата готовят разбавлением 0.2 н. раствора. Каждый мл 0.02 н. раствора $\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_3$ эквивалентен 0.16 мг кислорода.

А н а л и з:

1. Воду из водосема берут с соответствующей глубины батометром Рутнера. При наполнении склянок к крану батометра присоединяют резиновую или стеклянную трубку, которую опускают через горлышко до дна склянки. Следят, чтобы через воду не проскакивали пузырьки воздуха. Воду дают переливаться через верх склянки, так чтобы сменилось 2—3 объема. Склянки для анализа берут одного объема — 65—150 мл.

2. После заполнения склянки водой в нее сразу же вносят 0.5 мл раствора сернокислого марганца и 0.5 мл щелочного раствора иодистого калия

на расчета на 100 мл воды. Слянку закрывают притертой пробкой, так чтобы не осталось пузырьков воздуха, и содержимое слянки тщательно взбалтывают. Дают осадку осесть примерно в течение 30 мин.

3. Затем вводят 1 мл серной кислоты, разведенной водой 1 : 1, или концентрированной соляной кислоты, закрывают слянку пробкой и тщательно взбалтывают, так чтобы осадок полностью растворился.

Пипеткой отбирают 50 мл жидкости, вносят в колбу и титруют 0,02 н. тиосульфатом до бледно-желтого цвета, после чего вносят несколько капель крахмала и титруют до обесцвечивания.

4. Расчет количества растворенного в воде кислорода определяют по формуле

$$O_2 = \frac{n \cdot 8 \cdot n_1 \cdot 1000}{V} \text{ мг/л.}$$

где n — количество тиосульфата, пошедшего на титрование 50 мл пробы, мл, 8 — эквивалент кислорода, n_1 — нормальность тиосульфата (около 0,02), 1000 — для перевода результатов на 1 л; V — количество раствора, взятого для титрования, мл.

Расчеты показывают, что если объем слянок, взятых для серийных определений кислорода, колеблется не более чем на 20 мл (в пределах от 120 до 140 мл), то можно титровать не весь объем слянки, а, скажем, по 50 или 100 мл. При этом ошибка из-за неравности объемов не превышает 0,25%, а массовые расчеты результатов очень упрощаются и могут производиться в случае 50 мл титруемой жидкости по формуле, которая после сокращения принимает вид $O_2 = n \cdot (160 \cdot n_1)$. Когда же точно известна нормальность тиосульфата, величина в скобках превращается в коэффициент K : $O_2 = n \cdot K$ мг/л. При определении деструкции и ЕПК объем титруемого раствора отмеряют мерной пипеткой на 50 или 100 мл.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРБОНАТОВ, СВОБОДНОЙ УГЛЕКИСЛОТЫ И ОРГАНИЧЕСКОГО УГЛЕРОДА В ГРУНТАХ¹

Изучение грунтов Рыбинского водохранилища показало, что соотношение свободной двуокиси углерода и связанных форм угольной кислоты (карбонаты) в иловых отложениях — весьма существенная величина, которая до некоторой степени характеризует физико-химические свойства илов с точки зрения пригодности их как биологической среды.

Двуокись углерода, как и свободный сероводород, часто накапливается в кислых грунтах, образовавшихся при размывании торфяников. Присутствие в илах значительного количества обоих газов указывает на неблагоприятные условия существования донной фауны, поскольку совместное присутствие свободных форм этих соединений токсично для организмов (Сорокин, 1958б).

¹ Определение свободной углекислоты и карбонатов в воде см. на стр. 142.

Ниже приводится описание метода, разработанного Фридеманом и Кендалем (Friedemann, Kendall, 1929), для определения свободной углекислоты, карбонатов и мокрого сжигания органического вещества. Метод и прибор модифицированы Ю. И. Сорокиным (19596).

Определение CO_2 и карбонатов

Содержание CO_2 и карбонатов в илах определяется в приборе, изображенном на рис. 32. Ил в количестве 5—20 г помещают в колбу 1 емкостью около 100 мл, в которую предварительно наливают 30—40 мл свежeproкипяченной дистиллированной воды. Сюда же вносят 2 мл насыщенного раствора сернистой меди и 0.5 мл бутилового спирта. В пробирку 2 поглотителя 5 наливают 10—20 мл 0.1 н. едкого калия, очищенного от CO_2 (можно брать из фиксаля). Поглотитель 3 заполняют 20%-м раствором КОН. Затем в приборе создают вакуум порядка 300—400 мм рт. ст. После проверки на герметичность при закрытом зажиме 6 через прибор с помощью этого зажима устанавливают слабый ток воздуха, который очищается от CO_2 при прохождении через поглотитель 3. Сернистую медь добавляют в ил для связывания сероводорода, мешающего определению CO_2 . Образующийся при этом сульфид меди не разлагается при последующем подкислении ила.

Током воздуха двуокись углерода отгоняют из ила в течение 20—30 мин.. время от времени колбу 1 встряхивают, после чего прибор отсоединяют от вакуума, щелочь из поглотителя 5 и пробирки 2 смывают 100 мл прокипяченной горячей воды в склянку с притертой пробкой, в которую добавляют предварительно 1 мл 10%-го раствора хлористого бария. Через 5 мин. избыток щелочи, не вошедший в реакцию с CO_2 , оттитровывают 0.05 н. соляной кислотой с индикатором фенолфталеином.

Далее из той же пробы после отгонки из нее свободной углекислоты делают отгонку карбонатной CO_2 . Для этого в пробирку 2 поглотителя 5 наливают новую порцию 0.1 н. едкого калия. Через воронку 4 в ил добавляют 5 мл 5%-й серной кислоты и производят отгонку образовавшейся CO_2 вышеописанным способом. Одновременно делают холостой опыт, т. е. производят отгонку в том же порядке, но вместо ила в колбу 1 наливают лишь прокипяченную дистиллированную воду. Количество углерода CO_2 и карбонатов в илу рассчитывают по разности объемов соляной кислоты, пошедшей на титрование щелочи в холостом опыте и после отгонки из ила. 1 мл 0.05 н. соляной кислоты соответствует 0.3 мг углерода углекислоты или карбонатов.

При определении бактериальной ассимиляции CO_2 в илу (см. стр. 152) отгонку минеральных форм гидрокарбонатов, обменивающихся с радиоактивным углеродом, производят таким же

образом, как и при определении свободной углекислоты без подкисления, только колбу 1 с илом при отгоне нагревают на горелке и кипятят 1—2 мин. с последующей отгонкой CO_2 в течение 15—20 мин.

Определение органического углерода

Содержание органического углерода в илу, взвеси бактерий или водорослей можно определять в том же приборе.

В колбу 1 емкостью не более 50 мл вносят навеску сухого ила с ориентировочным содержанием углерода (1—4 мг) или соответствующую взвесь бактерий и пр. При малых навесках вещества колбу лучше заменить пробиркой из жаростойкого стекла емкостью 10—15 мл. В пробу вносят несколько миллиграммов сернокислого серебра в качестве катализатора. Через воронку 4 приливают 1—2 мл 5%-й серной кислоты, и в приборе создают ток воздуха для разрушения и удаления карбонатов из анализируемого вещества. После этого в пробирку 2 поглотителя 5 наливают 5—15 мл 0.1 н. едкого калия, а в воронку 4 — 1—2 мл хромового ангидрида (50%-й раствор на дистиллированной воде) и 10—15 мл 0.4 н. $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, приготовленного на концентрированной серной кислоте и прокипяченного для удаления органического вещества.

В приборе создают вакуум, и после проверки на герметичность через него пропускают слабый ток воздуха. Вакуум можно создать с помощью водоструйного насоса. Из воронки 4 в колбу 1 вносят хромовую смесь и содержимое ее кипятят на слабом пламени в течение 15—20 мин. Затем горелку убирают, усиливают ток воздуха и производят отгон еще в течение 10 мин. Зажимы перекрывают, содержимое в поглотителе 5 смывают горячей водой в колбу, куда вносят заранее 1 мл 10%-го хлористого бария, 2 капли фенолфталеина и содержимое титруют 0.05 н. соляной кислотой до исчезновения окраски. Холостой опыт производят в том же порядке, но вместо ила добавляют 1 мл дистиллированной воды. Количество миллилитров 0.05 н. соляной кислоты, найденное по разности между холостым и опытным титрованием, умножают на 0.3. Результат соответствует мг С органического вещества на взятую навеску.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕРОВОДОРОДА И СУЛЬФИДОВ В ИЛОВЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ

Обычно употребляемая методика определения сульфидов и сероводорода в иловых отложениях сводится к тому, что в специальном приборе сероводород отгоняют током углекислоты при кипячении из подкисленной пробы ила в титрованный раствор иода (Резников, Мулиновская, 1954). Этот метод весьма трудо-

емок, так как для улавливания иода необходимо ставить поглотитель с тиосульфатом и после каждого определения разбирать прибор, из-за чего одно определение занимает более 2 час. Кроме того, поскольку отгонка происходит при кипячении, малейшая примесь кислорода в CO_2 ведет к большим погрешностям, потому что сероводород быстро окисляется даже следами кислорода.

Сероводород следует отгонять из подкисленного ила на холоду током водорода или азота.

В качестве поглотителя сероводорода применяется слабый раствор щелочи. Опыты показали, что в этих условиях сероводород не окисляется и количественно поглощается щелочью. Все определение занимает не более 20 мин. Отгонка сероводорода производится в простом приборе (рис. 32) (Сорокин, 1960) с отсоединяемым поглотителем двуокиси углерода.

1. Пробы грунта помещают в банки емкостью 100 мл с притертыми пробками. Сероводород в них фиксируют щелочью (2 мл 10%-го едкого калия на 100 г ила), и в таком виде сосуды доставляются в лабораторию.

2. Калиброванной трубкой или путем взвешивания на весах берут 10—20 г ила и помещают в колбу 1. Сюда же вносят 3 мл метилового красного и 0.5 мл бутилового спирта. Индикатор вносят для контроля за подкислением ила, бутиловый спирт — для предотвращения вспенивания при разрушении карбонатов и продувания ила газом. Если ил слишком вязкий, то необходимо добавить несколько миллилитров дистиллированной воды. В системе создают вакуум и при закрытом зажиме 6 прибор проверяют на герметичность. Вместо поглотителя CO_2 к входящему отверстию 6 присоединяют аппарат Киппа с водородом или газометр с азотом. Затем с помощью зажимов 6 и 8 через прибор устанавливают ток газа и маленькими порциями из воронки 4 в пробирку переливают кислоту. Сероводород, образующийся при разрушении сульфидов, подхватывается током газа и поглощается щелочью в поглотителе 5. Отгонка длится 10—15 мин.

3. Вакуум отключают с помощью крана 8 и 10, пробирку 2 отсоединяют от прибора и на ее место подставляют склянку с титрованным раствором иода — примерно 10 мл 0.05 н. иода с 5 мл раствора соляной кислоты (1 : 1). Пробку 9 поглотителя 5 отнимают, содержимое поглотителя спускают в раствор иода. Остатки щелочи смывают несколькими порциями воды. Сероводород, поглощенный щелочью и выделяющийся при подкислении, реагирует с иодом, избыток которого оттитровывают 0.02 н. раствором тиосульфата. В серии анализов делают 1—2 холостых отгона, когда в пробирку 1 добавляют лишь дистиллированную воду. По разности между холостым и опытным титрованием определяют количество тиосульфата, эквивалентное отогнанному сероводороду. Для определения свободной формы сероводорода в иле его отгоняют из нефиксированной пробы без подкисления.

Расчет производится по формуле

$$\text{H}_2\text{S} = \frac{n \cdot 17 \cdot n. \cdot 1000}{V},$$

где H_2S — количество сероводорода в иле, мг/л; n — разность между холостым и опытным титрованием, выраженная в мл тиосульфата; 17 — эквивалент сероводорода; $n.$ — нормальность тиосульфата; 1000 — для перевода данных в 1 л; V — вес ила, взятого для анализа.

ЛИТЕРАТУРА

- А лекс и н О. А. 1954. Химический анализ вод суши. Гидрометеониздат, Л. : 1—200.
- Б и р ю з о в а В. И., Б о р о в я к и н В. Л., Г и л е в В. П., К и с е л е в Н. А., Т и х о н е н к о А. С. и Ч е н ц о в Ю. С. 1963. Электронномикроскопические методы исследования биологических объектов. Изд. АН СССР, М. : 1—204.
- В и н б е р г Г. Г. 1934—1939. К вопросу о балансе органического вещества в водоемах. Сообщ. I—V. Тр. Лимнол. станции в Коспие, вып. 18 : 5—24, 1934; вып. 20 : 5—34, 1935; вып. 21 : 75—87, 1937; вып. 22 : 144—153, 1939.
- В и н б е р г Г. Г. 1960. Первичная продукция водоемов. Изд. АН БССР, Минск : 1—329.
- В и н б е р г Г. Г. 1971. Сравнительная оценка некоторых распространенных методов расчета продукции водных бактерий. Гидробиол. ж., т. 7, № 4 : 86—96.
- В и н о г р а д с к и й С. Н. 1952. О микроскопическом изучении почвы. В кн.: Микробиология почвы. Изд. АН СССР, М. : 419—421.
- Г а б е Д. Р. 1957. Капиллярный метод прямого счета микробных тел. Микробиол., т. 26, вып. 1 : 109—117.
- Г а к Д. З. 1967. К расчету бактериальной продукции водоема. Гидробиол. ж., т. 3, № 5 : 93—96.
- Г а м б а р я н М. Е. 1962. К методике определения интенсивности деструкции органического вещества в донных отложениях глубоководных водоемов. Микробиол., т. 31, вып. 5 : 895—898.
- Г и н з б у р г-К а р а г и ч е в а Т. Л. 1932. О бесцветных и пурпурных серобактериях. В сб.: Очерки микробиологии нефти. Гос. научно-технич. изд., М.—Л. : 1—66.
- Г о р б е н к о Ю. А. 1961. О наиболее благоприятном количестве сухого питательного агара в среде для культивирования морских гетеротрофных бактерий. Микробиол., т. 30, вып. 1 : 168—172.
- Д у б и н и н а Г. А. 1970. Цикл развития марганецокисляющего организма *Mettallogenium*. Информ. бюлл. Инст. биол. внутр. вод АН СССР, № 8 : 21—25.
- Е м ц е в В. Т. 1959. Анаэробные азотификрующие микроорганизмы рода *Clostridium*, их распространение и взаимоотношения с высшими растениями. Тр. конф. Инст. землед. центр. района нечерноземной полосы, посвящ. 40-й годовщине Октября, Изд. Мин-ва сельского хоз-ва РСФСР, М. : 105—120.
- Ж и л я н а Т. Н. 1970. Выделение лито-гетеротрофной водородной бактерии. Микробиол., т. 39, вып. 5 : 812—816.
- Ж и л я н а Т. Н. 1973. Особенности биологии метаносарцины. Автореф. канд. дисс. Инст. микробиол. АН СССР, М. : 1—28.

- Заварзин Г. А. 1960. Цикл развития и ядерный аппарат *Hyphomicrobium vulgare* Stutz. et Hartleb. Микробиол., т. 29, вып. 1 : 38—42.
- Заварзин Г. А. 1961. Симбиотическая культура нового, окисляющего марганец, микроорганизма. Микробиол., т. 30, вып. 3 : 393—395.
- Заварзин Г. А. 1964. Хемосинтез и анаэробная окислительная реакция. В сб.: Успехи микробиол., вып. 1 : 30—60.
- Заварзин Г. А. 1972. Литотрофные микроорганизмы. Изд. «Наука», М. : 1—323.
- Заварзина Н. Б. 1955. Изучение причин, задерживающих развитие микроорганизмов в толще иловых отложений в озере Бисерово. Микробиол., т. 24, вып. 5 : 573—579.
- Заварзина Н. Б. 1961. Литический агент в культурах *Chlorella pirenoidosa* Pringh. ДАН СССР, т. 137, № 2 : 435—437.
- Иванов М. В. 1955. Метод определения продукции бактериальной биомассы в водоеме. Микробиол., т. 24, вып. 1 : 79—89.
- Иванов М. В. 1956. Применение изотопов для изучения интенсивности процесса редукции сульфатов в озере Беловодь. Микробиол., т. 25, вып. 3 : 305—309.
- Иванов М. В. 1959. Изучение интенсивности процессов круговорота серы в озерах с помощью радиоактивной серы S^{35} . Тр. VI совещ. по проблемам биол. внутр. вод. Изд. АН СССР, М.—Л. : 152—158.
- Иванов М. В. и Терехова Л. С. 1959. Изучение микробиологических процессов образования сероводорода в соленом озере. I. Микробиол., т. 28, вып. 2 : 251—256.
- Инструкция по работе с радиоактивными веществами и другими источниками ионизирующих излучений в научных учреждениях АН СССР. 1963. Изд. АН СССР, М. : 1—239.
- Каленченко В. О. 1946. Роль бактерий в формировании железомарганцевых конкреций. Микробиол., т. 15 : 364—369.
- Каравайко Г. И., Кузнецов С. И. и Голомазк А. И. 1972. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. Изд. «Наука», М. : 1—248.
- Комарова Л. И. 1949. Пипетка для выделения культур из одной клетки. Микробиол., т. 18, вып. 4 : 370—371.
- Кожова О. М. 1964. Бактериопланктон Иркутского водохранилища в первые после заполнения годы (1957—1960). В сб.: Биол. Иркутского водохр., изд. «Наука», М. : 115—134.
- Кравцов П. В., Сорокин Ю. И. 1959. Образование сероводорода за счет восстановления сульфатов в Куйбышевском водохранилище. Тр. Инст. биол. водохр. АН СССР, вып. 2(5) : 191—196.
- Красильников Н. А., Беляев С. С. 1967. О распространении *Caulobacter* в некоторых почвах. Микробиол., т. 36, вып. 6 : 1083—1086.
- Кузнецов С. И. 1952. Роль микроорганизмов в круговороте веществ в озерах. Изд. АН СССР, М. : 1—300.
- Кузнецов С. И. 1970. Микрофлора озер и ее геохимическая деятельность. Изд. «Наука», Л. : 1—440.
- Кузнецов С. И. и Карзинкин Г. С. 1930. Метод количественного учета бактерий в воде. Русск. гидробиол. ж., т. 9, вып. 1—3 : 85—89.
- Кузнецов С. И. и Романенко В. И. 1963. Микробиологическое изучение внутренних водоемов. Лабор. руководство, Изд. АН СССР, М.—Л. : 1—129.
- Кузнецов С. И., Романенко В. И. и Карпова Н. С. 1966. Численность бактерий Рыбинского водохранилища в 1963 и 1964 гг. В сб.: Продукция и круговорот органич. вещества во внутр. водоемах. Тр. Инст. биол. внутр. вод АН СССР, вып. 13(16) : 123—132.
- Лапшин М. И. 1952. Разработка способов очистки сточных вод. Изд. АН СССР, М. : 1—242.

- Левин Р. А. и Скрипс Дж. 1966. Флексибактерии. IX Междунар. конгресс по микробиологии. Тез. докл. Изд. «Медицина», М. : 349.
- Мейсель М. Н., Медведева Г. А., Александрова В. М. 1961. О выявлении живых, поврежденных и мертвых микроорганизмов. Микробиол., т. 30, вып. 5 : 855—859.
- Мишустин Е. Н., Перцовская М. И. 1954. Микроорганизмы и самоочищение почвы. Изд. АН СССР, М. : 1—651.
- Мюллер А. А. 1933. Санитарная бактериология. Изд. 2-е, М. : 1—780.
- Наумова А. Н. 1933. Методы непосредственного учета микроорганизмов в почве и характеристика отдельных почв Союза. В кн. : Тр. Научн. инст. по удобр. Микробиол. почвы и удобрения, вып. 108, Гостехиздат М. : 115—142.
- Никитин Д. И., Васильев Л. В., Лохмачева Р. А. 1966. Новые и редкие формы почвенных микроорганизмов. Изд. «Наука», М. : 1—97.
- Омелянский В. Л. 1923а. Практическое руководство по микробиологии. Научн. хим.-техн. изд., Пгр. : 1—330; изд. 2-е, 1940, Изд. АН СССР, М.—Л. : 1—432.
- Омелянский В. Л. 1923б. Связывание атмосферного азота почвенными микробами. Изд. Росс. АН, Пгр.; то же: В. Л. Омелянский, Избр. тр., т. I, 1953 : 175—366.
- Перфильев Б. В., Габеев Д. Р. 1961. Капиллярные методы изучения микроорганизмов. Изд. АН СССР, М.—Л. : 1—534.
- Пешков М. А. 1955. Цитология бактерий. Изд. АН СССР, М.—Л. : 1—220.
- Работнова И. Л. 1957. Роль физико-химических условий (рН и гН₂) в жизнедеятельности микроорганизмов. Изд. АН СССР, М. : 1—275.
- Разумов А. С. 1932. Прямой метод учета бактерий в воде. Сравнение его с методом Коха. Микробиол., т. 1, вып. 2 : 131—146.
- Разумов А. С. 1947. Методы микробиологических исследований воды. Изд. Министерства строит. предпр. тяжелой индустрии ВОДГЕО, М.
- Разумов А. С. 1948. Взаимоотношение между сапрофитными бактериями и планктоном в водоемах. В сб. : Вopr. санитарной бактериол., Изд. АМН СССР : 30—34.
- Разумов А. С. 1952. Замечания к статье Е. Рукиной и В. Бирюзовой «Методы получения мембранных ультрафильтров для прямого счета свободных от микробных клеток». Микробиол., т. 21, вып. 4 : 478—479.
- Разумов А. С. 1957. К вопросу о хемосинтезе у железобактерий. Микробиол., т. 26, вып. 3 : 392—396.
- Разумов А. С. 1961. Микробные показатели сапробиости водоемов, загрязненных промышленными стоками. 1. Нитчатые бактерии из рода *Cladotrix*. Микробиол., т. 30, вып. 3 : 515—524.
- Разумов А. С. 1962. Микробный планктон воды. Тр. Всесоюз. гидробиол. общ., т. 12 : 60—190.
- Разумов А. С. и Корш Л. Е. 1960. Методы санитарно-микробиологических исследований. В сб. : Приемы санитарного изуч. водоемов, ч. 5, Изд. АМН СССР : 241—312.
- Резников А. А. и Муликовская Е. П. 1954. Методы анализа природных вод. Госгеолтехиздат., М. : 1—236.
- Родина А. Г. 1965. Методы водной микробиологии (практическое руководство). Изд. «Наука», М.—Л. : 1—363.
- Романенко В. И. 1959. Учет метаноокисляющих бактерий в воде методом радиоавтографии колоний с мембранных фильтров. Бюлл. Инст. биол. водохр. АН СССР, № 5 : 40—42.
- Романенко В. И. 1963. Потенциальная способность микрофлоры воды к гетеротрофной ассимиляции углекислоты и к хемосинтезу. Микробиол., т. 32, вып. 4 : 668—674.

- Романенко В. И. 1964а. Гетеротрофная ассимиляция CO_2 бактериальной флорой воды. Микробиол., т. 33, вып. 4 : 679—683.
- Романенко В. И. 1964б. Потенциальная способность микрофлоры иловых отложений к гетеротрофной ассимиляции углекислоты и к хемосинтезу. Микробиол., т. 33, вып. 1 : 134—139.
- Романенко В. И. 1965а. Микробиологическое обследование Онежского озера, Выгозерского водохранилища и озер Беломорско-Балтийского канала. Микробиол., т. 34, вып. 7 : 350—356.
- Романенко В. И. 1965б. Соотношение между потреблением кислорода и углекислоты у гетеротрофных бактерий при росте на пептоне. Микробиол., т. 34, вып. 3 : 397—402.
- Романенко В. И. 1966а. Характеристика микробиологических процессов образования и разрушения органического вещества в Рыбинском водохранилище. В сб.: Производство и круговорот органич. веществ во внутр. водоемах. Тр. Инст. биол. внутр. вод АН СССР, вып. 13(16) : 133—153.
- Романенко В. И. 1966 б. Метод быстрого определения радиоактивности растворов $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$ и $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$. В сб.: Производство и круговорот органич. веществ во внутр. водоемах. Тр. Инст. биол. внутр. вод, вып. 13(16) : 166—169.
- Романенко В. И. 1969. Время генерации и время удвоения ассимиляции CO_2 гетеротрофными бактериями. Информ. бюлл. Инст. биол. вод АН СССР, № 4 : 8—11.
- Романенко В. И. 1970а. Длительное хранение культур бактерий в соединяющихся пробирках. Информ. бюлл. Инст. биол. внутр. вод АН СССР, № 7 : 32—33.
- Романенко В. И. 1970б. Поправочные коэффициенты на величину самопоглощения β -излучения в осадках $\text{BaS}^{35}\text{O}_4$. Информ. бюлл. Инст. биол. внутр. вод АН СССР, № 8 : 19—21.
- Романенко В. И. 1971а. Определение фотосинтеза фитопланктона во внутренних водоемах. В сб.: Биол. и продуктивность пресноводных организмов. Тр. Инст. биол. внутр. вод АН СССР, вып. 21(24) : 234—240.
- Романенко В. И. 1971б. Величины суточного и кратковременного фотосинтеза фитопланктона при определении с помощью C^{14} . Информ. бюлл. Инст. биол. внутр. вод АН СССР, № 5 : 18—22.
- Романенко В. И. 1973. Размножение бактерий на природной воде. Информ. бюлл. Инст. биол. внутр. вод АН СССР, № 17 : 5—7.
- Романенко В. И., Младова Т. А. 1969. Шарообразные стекляные баллоны для стерильного отбора проб воды с больших глубин. Информ. бюлл. Инст. биол. внутр. вод АН СССР, № 4 : 72—75.
- Романенко В. И., Романенко В. А. 1969. Деструкция органического вещества в иловых отложениях Рыбинского водохранилища. В сб.: Физiol. водных организмов и их роль в круговороте органич. вещества. Тр. Инст. биол. внутр. вод АН СССР, вып. 19(22) : 24—31.
- Романенко В. И., Романенко В. А. 1971. К методике определения численности бактерий в иловых отложениях водоемов. Микробиол., т. 40, вып. 5 : 912—915.
- Романенко В. И., Добрынин Э. Г. 1972. Определение удельного веса сухих бактериальных клеток. Информ. бюлл. Инст. биол. внутр. вод АН СССР, № 16 : 6—8.
- Романенко В. И., Кузнецов С. И., Кореньков В. Н. 1973. О новом виде бактерий, разрушающих NH_4ClO_4 в анаэробных условиях. Информ. бюлл. Инст. биол. внутр. вод АН СССР, № 19 : 6—8.
- Романова А. П., Зонов А. И. 1964. К определению продукции бактериальной биомассы в водоемах. ДАН СССР, т. 155, № 1 : 194—196.
- Рубин Е. Л. 1955. О проверке чистых культур *Nitrosomonas*. Микробиол., т. 24, вып. 1 : 22—24.

- Рубан Е. Л. 1961. Физиология и биохимия нитрифицирующих микроорганизмов. Изд. АН СССР, М.: 1—175.
- Рукина Е. А. и Бирюзова В. И. 1952. Методы получения мембранных ультрафильтров для прямого счета, свободных от микробов клеток. Микробиол., т. 21, вып. 1: 60—65.
- Сорокин Ю. И. 1952. Новые приемы выделения сульфатредуцирующих бактерий. Тр. Инст. микробиол. АН СССР, вып. 2: 121—129.
- Сорокин Ю. И. 1958а. Роль хемосинтеза в продукции органического вещества в водохранилищах. II. Изучение хемосинтеза в иловых отложениях с помощью C^{14} . Микробиол., т. 27, вып. 2: 206—213.
- Сорокин Ю. И. 1958б. Микрофлора и химический состав грунтов Рыбинского водохранилища. Тр. биол. ст. «Борок», вып. 3: 89—111.
- Сорокин Ю. И. 1959а. Определение продуктивности фотосинтеза фитопланктона в водной толще с помощью C^{14} . Физiol. растений, т. 6, вып. 1: 118—125.
- Сорокин Ю. И. 1959б. Методика определения карбонатов, свободной углекислоты и органического углерода в грунтах. Бюлл. Инст. биол. водохр. АН СССР, № 5: 48—50.
- Сорокин Ю. И. 1960. О методике определения сероводорода и сульфидов в иловых отложениях. Бюлл. Инст. биол. водохр. АН СССР, № 6: 50—52.
- Сорокин Ю. И. 1962. Вопросы методики отбора проб при изучении морской микрофлоры. Океанол., т. 11, вып. 5: 808—817.
- Стефанов С. Б. 1962. Простой способ приготовления электронномикроскопических препаратов из неочищенных вирусных суспензий. Биофизика, т. 7, вып. 6: 725—726.
- (Таусон В. О.) Taussan W. O. 1929. Über die Oxydation der Benzolkohlenwasserstoffe durch Bacterien. Planta, Bd. 7, H. 5: 735—758.
- Успенский Е. Е. 1925. Железо как фактор распределения водорослей. Тр. Ботан. инст. Изд. Ассоц. научно-исслед. инст. физ.-мат. фак. 1-го МГУ: 1—94.
- Федоров М. В. 1957. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Сельхозгиз, М.: 1—231.
- (Холодный Н. Г.) Cholodny N. 1929. Zur Methodik der quantitativen Erforschung des bakteriellen Planktons. Zbl. Bacteriol., Abt. 2, Bd. 77, H. 1: 8—14.
- Штурм Л. Д., Орлова Р. И. 1954. Серобактерии и экологические условия водоема, сопутствующие их обильному развитию. Тр. Инст. микробиол., АН СССР, вып. 3: 176—184.
- Aaronsen S. 1970. Experimental microbial ecology. Acad. Press. N.-Y.—London: 1—236.
- Attwood M. M., Harder W. 1972. A rapid and specific enrichment procedure for *Hyphomicrobium* spp. Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. v. 38, № 3: 369—378.
- Vaars J. K. 1930. Over sulfatreduktie door bacterien. Thesis, Meinema, Delft: 1—164.
- Baalsrud K., Baalsrud K. S. 1954. Studies on *Thiobacillus denitrificans*. Arch. Mikrobiol., Bd. 20, H. 1: 34—62.
- Barker H. A. 1956. Biological formation of methane. Industr. and Engng. Chem., v. 48, part. 1, № 9: 1438.
- Beltra R. M. 1956. Nuevo tecnica para identification del *Pseudomonas savastanoi*. Microbiol. esp., v. 9: 433—504.
- Breed R. S., Murray E. G. D., Smith N. R. 1957. Bergey's manual of determinative bacteriology (ed. Breed), 7th ed. Balliere, Tindall & Cox. London: 1—1094.
- Bromfield S. M. 1954. Reduction of ferric compounds by soil bacteria. J. Gen. Microbiol., v. 11, part 1: 1—6.

- Burton S. D., Morita R. Y. 1964. Effect of catalase and cultural condition of growth of *Beggiatoa*. J. Bacteriol., v. 88, № 6 : 1755—1761.
- Campbell L. a. Postgate J. R. 1965. Classification of the spore-forming sulfate-reducing *Bacteria*. Bacteriol. Revs, v. 29, N 2—3: 359—363.
- Cohen J. S., Burris R. H. 1955. J. Bacteriol., v. 69: 316—319 (no: Collins, 1969). In: Methods in Microbiol., v. 3b, Academic Press, London : 1—52.
- Collins V. G. 1963. The distribution and ecology of *Bacteria* in freshwater. Proc. Soc. Wat. Treat. Exam., v. 12 : 40—73.
- Collins V. G. 1969. Isolation, cultivation and maintenance of autotrophs. In: Methods in microbiology, v. 3b. Acad. Press, London : 1—52.
- Derx N. G. 1950. Beijerinckia, a new genus of nitrogen fixing bacteria, occurring in tropical soils. Proc. Koninkl. nederl. Acad. wet., v. 53 : 140.
- Emoto Y. 1933. Studien über die Physiologie der Schwefeloxidierende Bakterien. Bot. Mag., v. 47, № 6 : 405—422.
- Foster J. W., Davis R. H. 1966. A methane-dependent coccus, with notes on classification and nomenclature of obligate methane-utilizing bacteria. J. Bacteriol, vol. 91, № 7 : 1924—1931.
- Fred E. B., Waksman S. A. 1928. Laboratory manual of general microbiology. N.-Y.—London : 1—145.
- Friedemann T. E., Kendall A. J. 1929. The determination of carbon dioxide. Biol. Chem., v. 82, № 1 : 45—55.
- Fry B. A., Peel J. L. 1954. Editors preface. Autotrophic microorganisms. Univ. Press, Cambridge : X—XI.
- Giltay E., Aberson G. 1892. Recherches sur un mode de dénitrification. Arch. neerl. sci. nat., v. 25 : 341.
- Hayes F. R., MacAulay N. A. 1959. Lake water and sediment. V. Oxygen consumed in water over sediment cores. Limnol. a. Oceanography, v. 4, № 4 : 291—298.
- Henrici A. T., Johnson D. E. 1935. Studies of freshwater bacteria. II. Stalked *Bacteria*, a new order of *Schizomycetes*. J. Bacteriol., v. 30, № 1 : 61—92.
- Hirsch P. 1968. Gestielte und knospende Bakterien : Spezialisten für C-1 Stoffwechsel an nähr stoffarmen Standorten. Mitt. Intern. Verein. Limnol., Bd. 14 : 52—63.
- Hirsch P. 1972. Neue Methoden zur Beobachtung und Isolierung ungewöhnlicher oder wenig bekannter Wasserbakterien. Z. allg. Mikrobiol., Bd. 12, № 3 : 203—212.
- Hirsch P., Conti S. F. 1964. Biology of budding bacteria. I. Enrichment isolation and morphology of *Hyphomicrobium* spp. Arch. Microbiol., Bd. 48, H. 4 : 339—357.
- Hirsch P., Pankratz S. H. 1970. Study of bacterial populations in natural environments by use of submerged electron microscope grids. Z. allg. Mikrobiol., Bd. 10, H. 8 : 589—605.
- Hobbie J. E., Raleigh N. C., Wright R. T. 1968. A new method for the study of bacteria in lakes : description and results. Mitt. Intern. Verein. Limnol., Bd. 14 : 64—71.
- Hutton W. E., Zobell C. E. 1949. The occurrence and characteristics of methane oxidizing bacteria in marine sediments. J. Bacteriol., v. 58 : 463—473.
- Jannasch H. W. 1965. Die Isolierung geterotropher aquatischer Spirillen. In: Anreicherungskultur und Mutantenauslese. Zbl. Bacteriol., Abt. I, Suppl. 1 : 198—203.
- Knaysi G. 1951. Elements of bacterial cytology. 2-d ed., Ithaca, N.-Y., Comstock : 1—375.
- Kruffy de C. B., Walt I. P., Schwartz H. 1957. The utilization of thiocyanate and nitrate by thiobacilli. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol., v. 23, № 3—4 : 305—316.

- Kucera S., Wolfe R. S. 1957. A selective enrichment method for *Gallionella ferruginea*. J. Bacteriol., v. 74 : 344—349.
- Lambin S., German A. 1961. *Precis de microbiologie*, t. I, Paris : 1—458.
- Leathen W., McIntyre L., Braley S. 1951. A medium for the study of the bacterial oxidation of ferrous iron. Science, v. 114, № 2458 : 280.
- Levine M. 1954. An introduction to laboratory technique in bacteriology. N.-Y.
- Lewin R. A. 1969. A classification of *Flexibacteria*. J. Gen. Microbiol., v. 58, part 2 : 189—206.
- Lewin R. A., Lounsbury D. M. 1969. Isolation, cultivation and characterization of *Flexibacteria*. J. Gen. Microbiol., v. 58, part 2 : 145—170.
- Lieske R. 1912. Untersuchungen über die Physiologie denitrifizierender Schwefelbakterien. Ber. Dtsch. bot. Ges., Bd. 30, H. 1 : 12—22.
- London J. 1963. *Thiobacillus intermedius* nov. sp. A novel type of facultative autotroph. Arch. Mikrobiol., Bd. 46 : 329—337.
- London J., Rittenberg S. C. 1967. *Thiobacillus perometabolis* nov. sp. a non-autotrophic *Thiobacillus*. Arch. Microbiol., Bd. 59, H. 4 : 218—225.
- Marshall K. C., Stout R., Mitchell R. 1971. Selective absorption of bacteria from seawater. Canad. J. Microbiol., v. 17 : 1413—1416.
- Münz E. 1915. Zur Physiologie der Methanbakterien. Inaug. Dissertat. Halle : 1—61.
- Noren B. 1955. Studies on *Myxobacteria*. III. Organic factors in nutrition. Bot. notiser, v. 108 : 81—134.
- Pfennig N. 1965. Anreicherungskulturen für rote und grüne Schwefelbakterien. Zbl. Bacteriol. Abt. I, Origin., Suppl. Bd. 1 : 179—189; 503—505.
- Poindexter J. L. 1964. Biological properties and classification of the *Caulobacter* group. Bacteriol. Revs., v. 28, № 3 : 231—291.
- Postgate J. R. 1959. Differential media for sulphur *Bacteria*. J. Sci. Food and Agric., № 12 : 669—674.
- Postgate J. R. 1965. Recent advances in the study of sulfate reducing bacteria. Bacteriol. Revs, 29 (№ 4) : 425—441.
- Postgate J. R. 1966. Media for sulfur bacteria. Lab. Practice, v. 15, № 11 : 1240—1244.
- Postgate J. R., Campbell L. L. 1966. Classification of *Desulfovibrio* species, the nonsporulating sulphatreducing bacteria. Bacteriol. Revs, v. 30, № 4 : 732—738.
- Riviere J. W. M. 1963. Cultivation and properties of *Thiovulum majus* Hinze. Symposium Marine Microbil. Oppenheimer. C. Thomas Publ. : 61.
- Schatz A., Bovell C. 1952. Growth and hydrogenase activity a new bacterium *Hydrogenomonas facilis*. J. Bacteriol., v. 63, № 1 : 87.
- Schlegel H. G., Kaltwasser H., Gottschalk G. 1961. Ein Summersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien. Wachstumspysiologische Untersuchungen. Arch. Mikrobiol., Bd. 38, H. 3 : 209—222.
- Silverman M. P., Lundgren D. G. 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. J. Bacteriol., v. 77 : 642—647.
- Skerman V. B. D. 1967. A guide to the identification of the genera of *Bacteria*. 2-ed. Williams and Wilkins. Baltimore : 303.
- Staley J. T. 1968. *Prosthecomicrobium* and *Ancalomicrobium*, new prosthecate freshwater *Bacteria*. J. Bacteriol., v. 95, № 5 : 1921—1942.
- Starkey R. L. 1934. Cultivation of organisms concerned in the oxidation of thiosulfate. J. Bacteriol., v. 28 : 387—400.

- Starkey R. L. 1935. Isolation of some bacteria which oxidize thiosulfate. Soil Sci., v. 39, № 3 : 197—220.
- Starkey R. L. 1938. A study of sporof ormation and other morphological characteristics of *Vibrio desulfuricans*. Arch. Microbiol., Bd. 9 : 368—404.
- Stee mann - Nielsen E. 1952. The use of radioactive carbon (C^{14}) for measuring organic production in the Sea. J. Conseil l'explorat. mer, v. 18, № 2 : 717—140.
- Taylor B. F., Hoare D. S. 1969. New facultative *Thiobacillus* and re-valuation of the heterotrophic potential of *Thiobacillus novellus*. J. Bacteriol., v. 100, № 1 : 487—497.
- Trautwein K. 1921. Beitrag zur Physiologie und Morphologie der Thion-säurebakterien. Zbl. Bacteriol., Abt. 2, Bd. 53, H. 22—24 : 513—548.
- Trüper H. G. 1970. Culture and isolation of phototrophic sulfur bacteria from the marine environment. Helgolander Wiss. Meeresunters., Bd. 20 : 6—16.
- Trüper H. G., Yentsch C. S. 1967. Use of glass filters for the rapid preparation of in vivo absorption spectra of photosynthetic bacteria. J. Bacteriol., v. 94 : 1255—1256.
- Tyler P. A., Marshall K. C. 1967. Microbial oxidation of manganese in hydroelectric pipelines. Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol., v. 33, № 1 : 171—183.
- Watson S. W., Mandel M. 1971. Comparison of the morphology and deoxyribonucleic acid composition of 27 strains of nitrifying bacteria. J. Bacteriol., v. 107, № 2 : 563—569.
- Wiken T. O. 1957. Über den Mechanismus des anaeroben bakteriellen Abbaus von Kohlehydrat, Eiweiss und Fett in Faulräumen. Schweiz. Z. Hydrobiol., Bd. 19, H. 1 : 428—456.
- Williams M. A., Rittenberg S. C. 1957. A taxonomic study of the genus *Spirillum* Ehrenberg. Internat. Bull. Bacteriol. Nomencl. and Taxon., v. 7, № 1 : 49—110.
- Wright R. T., Hobbie J. E. 1965. The uptake of organic solutes in lake water. Limnol. a Oceanogr., v. 10, № 1 : 22—28.

Добавление (к стр. 48)

14. СРЕДЫ ДЛЯ БАКТЕРИЙ, ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ ХРОМ

Среда № 101. Среда Романенко для *Bact. dechromaticans*.

Хлористый аммоний (NH_4Cl)	0.3 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный (KH_2PO_4)	0.5 г
Фосфорнокислый калий двузамещенный (K_2HPO_4)	0.3 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г
Хлористый натрий (NaCl)	0.1 г
Углекислый кальций (CaCO_3)	0.05 г
Хлорное железо ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.05 г
Хромовокислый калий (K_2CrO_4)	0.1 г
Ацетат натрия	0.2 г
Микроэлементы по Хогланду	0.5 мл
Витамины B_{12}	10 мкг
МПБ	100 мл
Вода из водоема, профильтрованная через бумаж- ный фильтр	1000 мл

Среду стерилизуют в колбах. Растворы ацетата, микроэлементов, витамин и МПБ стерилизуют отдельно и вносят в колбу перед посевом. рН среды устанавливают до 7—7.2. Бактерии культивируют в пробирках с резиновыми пробками. Среда доливается до пробки. О потреблении хромата судят по изменению окраски среды с желтой на бесцветную. Чистую культуру выделяют на МПА в аэробных условиях. Культура хорошо сохраняется на МПЖ.

О Г Л А В Л Е Н И Е

	Стр.
П р е д и с л о в и е	3
Ч а с т ь I. Основные принципы изготовления питательных сред и культивирования микроорганизмов	5
1. Типы обмена микроорганизмов	5
2. Указания по приготовлению питательных сред	7
3. Стерилизация	10
4. Методы культивирования микробов	12
Ч а с т ь II. Рецептура питательных сред для выделения и культи- вирования микроорганизмов	14
1. Среды для сапрофитных бактерий	14
2. Среды для стебельковых, почкующихся и ползающих бакте- рий	16
3. Среды для <i>Bacterium coli</i>	19
4. Питательные среды для дрожжей, грибов и актиномицетов . .	20
5. Минеральные среды для водорослей	22
6. Среды для бактерий, участвующих в круговороте азота . . .	23
Среды для уробактерий	23
Среды для нитрификаторов	23
Среды для денитрифицирующих бактерий	25
Среды для азотфиксирующих бактерий	26
7. Среды для бактерий, участвующих в круговороте серы . . .	29
Среды для гнилостных бактерий	29
Среды для сульфатредуцирующих бактерий	29
Среды для окрашенных и бесцветных серобактерий	32
Среды для тиоповых бактерий	35
8. Среды для железобактерий	40
Среды для гетеротрофных бактерий, отлагающих железо в слизистой оболочке	41
9. Среды для бактерий, окисляющих водород или углеводороды	42
10. Среды для целлюлозоразрушающих бактерий	45
11. Среды для бактерий, образующих метан	46

12. Среды для бактерий, восстанавливающих перхлораты . . .	47
13. Среды для олигокарбофильных бактерий	47
14. Среды для бактерий, восстанавливающих хром	48
Часть III. Прижизненное изучение микроорганизмов и методы окраски бактерий	
1. Прижизненное изучение микроорганизмов	49
Установка освещения объекта по Келлеру при работе с оптическим микроскопом	49
Метод фазовых контрастов для исследования живых объектов	50
Изучение живых микроорганизмов в висячей капле	52
Ш-образная камера Пешкова	52
Изучение микрофлоры поверхностного слоя ила в микробном пейзаже	53
2. Главнейшие методы окраски бактерий	56
Окраска бактерий на фиксированных препаратах	56
Дифференциальная окраска по Пешкову для отличия живых и мертвых бактерий	58
Выявление живых и мертвых бактерий путем окраски флюорохромами	58
Окраска спор по методу Ожешки	59
Окраска спор по методу Шеффер—Фультон	59
Окраска жгутиков по методу Трибондо—Фишет	60
3. Определение ферментативной активности бактерий	60
Определение наличия оксидазы	60
Определение наличия цитохромоксидазной активности . .	61
Определение у микроорганизмов дыхательной системы, содержащей цитохромы	61
Определение дегидрогеназной активности	61
Часть IV. Методы культивирования и выделения чистых культур некоторых видов бактерий	
1. Лабораторные правила	62
Правила техники безопасности при работе с индикаторными дозами радиоактивных изотопов C^{14} и S^{35}	62
2. Методы культивирования и выделения чистых культур . .	63
Общие положения	63
Длительное сохранение культур бактерий на жидкой среде	64
3. Выделение стебельковых и почкующихся бактерий	65
Выделение культур стебельковых бактерий	66
Выделение культур почкующихся бактерий	67
4. Выделение ползающих бактерий — <i>Flexibacteria</i>	68
5. Выделение гетеротрофных водных спиралей — <i>Spirillum volutans</i>	71
6. Выделение культур хищных бактерий — <i>Bdellovibrio</i> . . .	73
7. Выделение культур бактерий, участвующих в круговороте азота	73
Выделение чистых культур аммонификаторов	73
Фиксаторы свободного азота	73
Выделение чистой культуры <i>Azotobacter</i>	74

Выделение <i>Clostridium</i>	75
Выделение культур нитрификаторов	76
8. Выделение культур бактерий, участвующих в круговороте серы	78
Выделение сульфатредуцирующих бактерий	78
Выделение тионовых бактерий	82
Выделение <i>Thiobacillus thioparus</i>	83
Выделение <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	84
Выделение <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	85
Методы культивирования серобактерий	86
Бесцветные серобактерии (86). — Общность строения связанных водорослей, нефотосинтезирующих серобак- терий и гетеротрофных ползающих бактерий (86). — Фотосинтезирующие бактерии (91). — Определение аб- сорбционных спектров фотосинтезирующих бактерий (93). — Выделение фотосинтезирующих бактерий (94).	
9. Выделение культур метанокисляющих и водородокисляющих бактерий	96
10. Культивирование микроорганизмов в атмосфере водорода или смеси воздуха и углеводородных газов	98
11. Выделение бактерий, окисляющих закисные соединения железа и марганца	100
Выделение <i>Metallogenium</i>	101
Выделение <i>Gallionella</i>	102
Выделение нитчатых железобактерий	102
Культивирование железобактерий в конвекционной проточной установке по Перфильеву	103

Часть V. Некоторые специальные методы бактериологического анализа воды и ила озер и водохранилищ 106

1. Батометр для отбора проб воды на бактериологический анализ с небольших глубин	106
2. Батометр для отбора глубоководных проб при бактериологическом анализе	107
3. Отбор проб ила	109
✓ 4. Изготовление окулярного сетчатого микрометра	110
✓ 5. Микроскопический подсчет бактерий	112
Подсчет бактерий в воде	112
Подсчет бактерий в иловых отложениях	115
Метод Германова (115). — Метод микропавесок (116). — Микроскопия в отраженном свете (117).	
6. Определение времени удвоения численности бактерий, времени генерации и продукции бактериальной биомассы	118
Определение времени удвоения общей численности бактерий	119
Определение продукции бактериальной биомассы	120
7. Определение объема и веса бактериальной биомассы	120
8. Определение продукции бактериальной биомассы радиоуглеродным методом	122
9. Определение времени удвоения биомассы бактерий и времени генерации по гетеротрофной ассимиляции CO_2	122

Комбинированный метод	122
По времени удвоения ассимиляции CO_2	122
10. Метод изготовления препаратов для получения электронно-микроскопических снимков бактерий из воды и озерного ила	123
Изготовление электронномикроскопических препаратов из воды	124
Изготовление электронномикроскопических препаратов из ила	128
Микроскопирование	128
11. Применение метода радиоавтографии для количественного учета автотрофных бактерий	129
Часть VI. Продукция и деструкция органического вещества в водоемах	131
1. Определение продукции и деструкции органического вещества в водоемах	131
Определение продукции и деструкции органического вещества в водоемах методом Вияберга	132
2. Определение интенсивности фотосинтеза фитопланктона в воде путем применения радиоактивного углерода	135
Приготовление рабочего раствора $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$	135
Определение радиоактивности рабочих растворов	136
Полевые исследования	139
Определение суточного фотосинтеза в поверхностной пробе воды изотопным методом (139). — Определение зависимости фотосинтеза от светопропускаемости воды (нахождение поправочного коэффициента « K_p ») (139). — Определение зависимости фотосинтеза в толще воды от вертикального распределения фитопланктона (нахождение поправочного коэффициента « K_v ») (141). — Определение общей радиоактивности воды после добавления меченой углекислоты (142). — Определение в воде общего количества свободной углекислоты и бикарбонатов (142). — Расчет продукции органического вещества фитопланктоном в процессе фотосинтеза в пробе воды (144). — Расчет продукции органического вещества фитопланктоном в процессе фотосинтеза под 1 м^2 поверхности водоема (144).	
3. Экспресс-метод определения продукции органического вещества фитопланктоном в водоемах с большой акваторией	146
Определение продукции органического вещества в кратковременных опытах	146
Определение суточной продукции органического вещества в 1 л воды	147
Определение суточной продукции органического вещества под 1 м^2 водоема	147
4. Определение продукции органического вещества бактерий в водоемах за счет процессов темновой ассимиляции углекислоты	148
Определение интенсивности темновой ассимиляции CO_2 в воде	149
Разграничение величин хемосинтеза и гетеротрофной ассимиляции CO_2 по приросту биомассы бактерий (150). —	

Разграничение величин хемосинтеза и гетеротрофной ассимиляции CO_2 в воде по потреблению кислорода (151).	
Определение темновой ассимиляции CO_2 в иловых отложениях	152
5. Деструкция органического вещества в воде	153
Определение деструкции органического вещества кислородным методом	154
Определение интенсивности деструкции органического вещества по гетеротрофной ассимиляции CO_2	154
6. Определение деструкции органического вещества в иловых отложениях	155
Определение деструкции органического вещества в илу за счет аэробных процессов	155
Определение деструкции органического вещества в илу за счет анаэробных процессов	157
7. Определение быстроты потребления растворенных органических веществ в озерной воде	157
8. Определение интенсивности процесса редукции сульфатов с помощью радиоактивного изотопа серы	159
9. Определение интенсивности процесса окисления сульфидов и сероводорода с помощью радиоактивного изотопа серы	162
10. Биохимическое потребление кислорода	165
11. Анализ воды на присутствие бактериальных показателей фекального загрязнения	167
Часть VII. Некоторые специальные методы химического анализа	170
1. Определение активной кислотности среды (рН)	170
Приготовление растворов индикаторов по Кларку	170
Определение рН без буферных растворов по методу Джиллеса	171
2. Определение окислительно-восстановительного потенциала	173
3. Определение растворенного в воде кислорода по методу Винклера	176
4. Определение карбонатов, свободной углекислоты и органического углерода в грунтах	177
Определение CO_2 и карбонатов	178
Определение органического углерода	170
5. Определение сероводорода и сульфидов в иловых отложениях	179
Л и т е р а т у р а	181
Д о б а в л е н и е	189

Виталий Иванович Романенко и Сергей Иванович Кузнецов

**ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРЕСНЫХ
ВОДОЕМОВ**

Лабораторное руководство

*Утверждено к печати
Институтом биологии внутренних вод
Академии наук СССР*

Редактор издательства Л. М. Мамонова
Художник Д. С. Данилов
Технический редактор А. П. Чистякова
Корректор Л. Я. Комм

Сдано в набор 25 XII 1973 г. Подписано к печати
7/V 1974 г. Формат бумаги 60×90¹/₁₆. Бумага № 2.
Печ. л. 12¹/₂ = 12,25 усл. печ. л. Уч.-изд. л. 13,27. Изд.
№ 5398. Тип. зак. № 812. М-08368. Тираж 1850.
Цена 1 р. 02 к.

Ленинградское отделение издательства «Наука»
199164, Ленинград, В-164, Менделеевская линия, д. 1

1-я тип. издательства «Наука»
199034, Ленинград, В-34, 9 линия, д. 12

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»

В МАГАЗИНАХ КОНТОРЫ «АКАДЕМКНИГА» ИМЕЮТСЯ В НАЛИЧИИ КНИГИ:

Биологические ресурсы поймы Оби. 1972. 390 стр. *Цена 2 р. 35 к.*

Динамика водных масс водохранилищ в связи с распределением организмов. Труды Инст. биол. вн. вод, вып. 7 (10). 1965. 119 стр. *Цена 67 к.*

Лучистые факторы жизни водных организмов. Труды Инст. биол. вн. вод, вып. 14 (17). 1967. 147 стр. *Цена 80 к.*

Методика биологических исследований по водной токсикологии. 1971. 299 стр. *Цена 1 р. 39 к.*

Органическое вещество и элементы гидрологического режима волжских водохранилищ. Труды Инст. биол. вн. вод, вып. 23 (26). 1972. 248 стр. *Цена 2 р. 24 к.*

Проблемы биологических повреждений и обрастаний материалов, изделий и сооружений. 1972. 276 стр. *Цена 1 р. 08 к.*

Проблемы микробиологии внутренних вод. 1971. 148 стр. *Цена 87 к.*

Продукция и круговорот органического вещества во внутренних водоемах. Труды Инст. биол. вн. вод, вып. 13 (16). 1967. 274 стр. *Цена 1 р. 65 к.*

Радиоактивные изотопы в гидробиологии и методы санитарной гидробиологии. 1964. 192 стр. *Цена 94 к.*

Рыбное водохранилище и его жизнь. 1972. 364 стр. *Цена 3 р. 98 к.*

Теория и практика биологического самоочищения загрязненных вод. 1972. 240 стр. *Цена 1 р. 04 к.*

Труды Института биологии водохранилищ. Вып. 1 (4). 1959. 358 стр. *Цена 80 к.*

Труды Института биологии водохранилищ. Вып. 5 (8). 1963. 352 стр. *Цена 2 р. 25 к.*

Формирование природных условий и жизни Братского водохранилища. 1970. 279 стр. *Цена 1 р. 82 к.*

Заказы просим присылать по адресу:

117463, Москва, Мичуринский пр., 12.

Магазин «Книга — почтой»

Центральной конторы «Академкнига»

197110, Ленинград, Петрозаводская ул., 7

Магазин «Книга — почтой»

Северо-Западной конторы «Академкнига»