

А К А Д Е М И Я Н А У К С С С Р
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД

С. И. КУЗНЕЦОВ
В. И. РОМАНЕНКО

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВНУТРЕННИХ ВОДОЕМОВ

ЛАБОРАТОРНОЕ
РУКОВОДСТВО

15041
25041



ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР

МОСКВА 1963 ЛЕНИНГРАД

АННОТАЦИЯ

Книга содержит рецептуру приготовления питательных сред, описание методик культивирования водных бактерий и выделения их в чистые культуры, новые методы микробиологического и химического анализов воды.

Издание рассчитано на научных работников, ведущих специальные исследования по водной микробиологии в связи с изучением круговорота веществ в водоемах, а также на студентов старших курсов биологических вузов.

**Ответственный редактор
Б. С. КУЗИН**

**Редактор издания
Б. К. ШТЕГМАН**

ПРЕДИСЛОВИЕ

Круговорот вещества в водоемах в значительной мере обуславливается деятельностью микроорганизмов. Чтобы ясно представить себе, как и с какой интенсивностью идут микробиологические процессы в водоеме, недостаточно одного определения только численности микроорганизмов. Необходимо также учесть экологические условия окружающей среды и непосредственно оценить интенсивность самого процесса. Например, если мы определим в каком-либо водоеме значительное количество денитрифицирующих бактерий, но в воде отсутствуют нитраты и содержится значительное количество растворенного кислорода, то едва ли можно говорить о том, что здесь интенсивно протекает процесс денитрификации. Основной чертой физиологии этой группы организмов является то, что они хорошо развиваются в аэробных условиях, а процессы денитрификации возможны лишь в присутствии нитратов и при резком дефиците кислорода.

Второй особенностью микробиологических процессов в водоемах является то, что почти все они прямо или косвенно связаны с круговоротом органического вещества. Одни микроорганизмы, как сапрофитные бактерии, фиксаторы азота, сульфатредуцирующие бактерии, разрушающие клетчатку, и многие другие, требуют готового органического вещества для построения своего тела. Другие бактерии — автотрофы, в качестве источника энергии используют сероводород, водород, метан, аммиачные соли и т. п., т. е. те продукты, которые образовались в результате минерализации органического вещества, синтезированного в водоеме фитопланктоном.

Эти соображения и легли в основу подбора материала для составления настоящего руководства. Нам казалось правильным дать основную рецептуру изготовления питательных сред для выделения и подсчета отдельных групп микроорганизмов. Ряд сред взят из оригинальных работ различных авторов. Рецептура сред была нами проверена и выбраны из них наилучшие.

Далее, нам казалось необходимым привести методы определения величины первичной продукции и деструкции органического вещества в водоемах за счет фотосинтетической деятельности фитопланктона. Определение этой величины дает очень много для выяснения не только направления, но и интенсивности микробиоло-

гических процессов в водоеме, особенно общей величины деструкции органического вещества.

Работы последних лет показали, что интенсивность процессов круговорота углерода и серы может быть с успехом определена путем постановки опытов в условиях, максимально приближающихся к природным, с применением радиоактивных изотопов углерода и серы. В настоящее время достаточно хорошо разработаны методы для определения величины фотосинтеза и хемосинтеза с применением C^{14} и восстановления сульфатов и окисления сероводорода путем использования соответствующих солей с S^{35} . Указанные методы также описаны в настоящем руководстве.

Наконец, для характеристики внешней среды, в которой протекают микробиологические процессы, в первую очередь необходимо знать содержание кислорода, сероводорода, активную реакцию окружающей среды (pH) и окислительно-восстановительный потенциал. Эти методы анализа можно найти в соответствующих руководствах по химическому анализу воды, но нам казалось необходимым привести их и в настоящем руководстве, так как в существующие прописи нами были внесены некоторые видоизменения, облегчающие и уточняющие самый анализ или его расчеты.

Мы также сочли необходимым ввести главу о методах культивирования и выделения чистых культур некоторых водных микроорганизмов, выделение которых представляет значительные затруднения. Эти методы также были разработаны или апробированы в нашей лаборатории.

В заключение нам казалось необходимым дать некоторые рекомендации по общей постановке микробиологических исследований, которых следует придерживаться в повседневной работе.

1. Прежде чем разливать питательный агар в чашки Петри или делать пересевы культур, необходимо протереть стол спиртом или раствором сулемы 1 : 1000.

Основной раствор содержит 1 часть сулемы на 2.5 части соляной кислоты. Для приготовления раствора 1 : 1000 берут 2.5 см³ основного раствора, разводят водой до 1 л, подкрашивают раствор фуксином и делают надпись «яд».

2. При пересеве культур пробирки следует держать, по возможности, горизонтально. Избегать открывать культуры на ветру. Если нет специальных указаний, то инкубацию вести при 28°.

3. Строго следить за аппаратурой. После взвешивания следует разновес убрать на место. Не оставлять на весах сора или солей. Твердые материалы, как ил, почву, агар-агар, вату, фильтровальную бумагу выкидывать в пустой ящик, а не в раковину.

4. В конце дня все реактивы и посуду убирать на место. Проверять чистоту оптической системы микроскопа. Все аппараты убирать в свои ящики, а газовые горелки выключать.

Часть I

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

1. ТИПЫ ПИТАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Начиная с работ Пастера и Коха многими авторами было предложено большое количество твердых, жидких и полужидких питательных сред для выделения и культивирования различных микроорганизмов. Само собой разумеется, что состав этих питательных сред зависит от тех питательных веществ, в которых нуждается изучаемая группа микроорганизмов. Поскольку различные группы микроорганизмов сильно отличаются друг от друга в потребности в питательных веществах для своего развития, то и состав питательных сред может резко отличаться друг от друга. 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 элективными или избирательными, и состав их согласуется со специфическими физиологическими особенностями данной группы организмов.

Каждая питательная среда должна содержать источник энергии, связанный азот и различные минеральные элементы: P, K, S, Ca, Mg, Fe и т. п., которые необходимы организму для синтеза его биомассы.

По своей потребности в энергии микроорганизмы можно разделить на две основные группы.

1. **Автотрофные микроорганизмы** способны для своего развития усваивать свободную углекислоту, используя энергию света или окисления неорганических веществ. Те организмы, которые подобно зеленому растению для усвоения углекислоты используют энергию света, называются фотосинтезирующими. Те же, которые способны развиваться в темноте и синтезировать органическое вещество своих клеток за счет использования химической энергии, выделяющейся при окислении неорга-

нических веществ, называются хемосинтезирующими микроорганизмами.

2. Гетеротрофные организмы получают для своего развития энергию и углерод из сложных органических соединений. Некоторые из них могут развиваться только на клетчатке, но большинство не может использовать клетчатку не только как источник энергии, но и как источник углерода. Некоторые организмы могут использовать в качестве источника азота только органические соединения, другие также нитраты и аммиачные соли. Ряд организмов может использовать и газообразный азот атмосферы. Сильно различаются и пределы активной реакции питательной среды, в которой могут развиваться отдельные микроорганизмы. Большое влияние на их развитие оказывает осмотическое давление, обусловливаемое концентрацией солей в питательной среде, т. е. на концентрацию питательных солей нужно обращать большое внимание. Часто для культивирования микроорганизмов необходимо иметь твердые питательные среды. С этой целью используются как неорганические, так и органические гели. Наиболее распространенными являются агар-агар, желатина, яичный альбумин, кремневый гель и т. д. Основываясь на вышеизложенном, следует правильно подбирать питательные среды, рецептура которых в смысле концентрации питательных солей, буферности, исключения и замены одних питательных веществ другими и тому подобного может быть сильно изменена в зависимости от задачи исследования.

2. УКАЗАНИЯ ПО ПРИГОТОВЛЕНИЮ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Из большого количества составов питательных сред, предложенных для различных микроорганизмов, в настоящем руководстве приводятся только наиболее важные, многократно нами проверенные. Предполагается, что у читателя под рукой имеются основные практические руководства по микробиологии (Омелянский, 1923а, 1940; Родина, 1950, 1956; Драчев и др., 1960) и по химическому анализу воды (Резников и Муликовская, 1954; Алекин, 1959). Приводимая ниже рецептура относится к основным физиологическим группам организмов.

Получение питательной среды с заданным рН. 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 разделить эти два

группы организмов. При подкислении питательной среды до $pH=4.0$ развитие бактерий практически прекращается, в то время как большинство грибов развивается нормально.

Для того чтобы довести реакцию питательной среды до определенной величины, лучше всего поступать следующим образом. В пробирку вносят 2 мл питательной среды, 8 мл дистиллированной воды и 4—5 капель фенол-рот или другого индикатора. Затем из бюретки по каплям вносят 0.1N или 0.05N раствор едкого натрия или соляной кислоты до тех пор, пока окраска раствора будет совпадать с окраской требуемого стандартного раствора индикатора.¹ Затем делают пересчет на весь объем питательной среды и добавляют необходимое количество нормального раствора едкого натра или соляной кислоты, так, чтобы реакция соответствовала необходимой величине pH . После этого проверяют реакцию и если нужно повторяют титрование. Подгонять реакцию питательной среды можно с точностью, не превышающей 0.1 pH , так как влияние температуры, стекла посуды и тому подобного смещает реакцию среды в более широких пределах.

Фильтрование. При фильтровании питательных сред обычно употребляется ватный фильтр. В горлышко стеклянной воронки помещают спиральку из железной проволоки. Поверх кладут два-три 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 снова через тот же фильтр.

Твердые питательные среды органического состава. Для приготовления твердых питательных сред употребляют агар-агар или желатину. Специфические особенности этих веществ представлены в табл. 1 и 2.

Агар-агар готовится путем обработки горячей водой некоторых морских водорослей (*Gelidium corneum*, *Anphelitia*). Он представляет из себя полисахарид, в основном состоящий из галактанов и пентозанов, и небольшого количества протеинов и минеральных веществ.

Агар выщелачивают следующим образом: 1 кг агара помещают в эмалированную или стеклянную посуду, заливают 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, агар раскладывают тонким слоем и просушивают на воздухе. Обработанный таким образом агар-

¹ См. часть VI, раздел 1.

Таблица 1

Основные особенности веществ, употребляемых при изготовлении
твердых питательных сред

	Агар-агар	Желатина	Кремневый гель
Происхождение. Химическая природа.	Растительное. Углевод.	Животное. Протеины.	Минеральное. Кремневая кислота.
Реакция.	Слабо кислая.	Кислая.	Кислая.
Температура плавления.	96°	25°	—
Застывание в той же концентрации.	40°	25°	—
Действие трипсина.	Не действует.	Разжижает.	Не действует.
Конденсационная вода.	Образуется.	Нет.	Нет.
Употребляемая концен- трация.	1.5—2.5 %	10—15 %	5—6 %

агар становится беднее как солями кальция и магния, так и растворимыми органическими веществами. Было найдено, что при приготовлении некоторых питательных сред на таком агаре во время стерилизации не выпадает осадка, и среда остается прозрачной.

Таблица 2

Примерный химический состав
агар-агара и желатины в процентах
от сухого веса

	Агар-агар	Желатина
Влажность . .	16.0	14—15
Зола на сухой вес	4.4	0.6
Окись кальция	1.15	0.0
Окись магния	0.77	0.0
Азот	0.40	18.3

Приготовление кремневого геля. Наиболее быстрое застывание кремневого геля происходит, если после смешивания растворов силиката и соляной кислоты реакция смеси получается близкой к нейтральной. Поэтому приготовление рабочих растворов производят следующим образом. Готовят 25%-й водный раствор кремнекислого калия, или натрия, или растворимого стек-

ла. Доводят удельный вес раствора до 1.06 или лучше до 1.1. 5 мл этого раствора вносят в чашку Петри и добавляют фенолфталеина. Затем из градуированной пипетки добавляют 5%-й раствор соляной кислоты до исчезновения окраски. Потом 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. Чашки 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 при выделении чистых культур бактерий можно завернуть в бумагу и стерилизовать в Коховском стерилизаторе текучим паром или в автоклаве при 110° .

3. СТЕРИЛИЗАЦИЯ

С т е р и л и з а ц и я п а р о м . Как общее правило, питательные среды рекомендуется стерилизовать в автоклаве. Необходимо помнить, что продолжительность стерилизации зависит от того, насколько хорошо и быстро прогревается среда в сосудах. 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 небольших объемах и располагать их так, чтобы пар свободно проходил между ними. Как видно из табл. 3, температура зависит от величины давления пара.

Т а б л и ц а 3

Зависимость между температурой стерилизации в автоклаве и давлением при отсчете по манометру (атмосферное давление обозначено как 0) (по Fred and Waksman, 1928)

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

Время стерилизации зависит от характера питательной среды. Агаровые среды лучше стерилизовать при давлении по манометру в 0.75 атм. 30 мин. или при давлении в 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 полностью простерилизовать почву. Ее стерилизуют в про-

бирках по 5—10 г один раз при 1 атм. 2 часа или два дня подряд по 1 часу при той же температуре. Текучим паром те же порции почвы нужно стерилизовать 7 дней подряд, каждый день по 1 часу.

При кислой реакции питательной среды многие вещества, входящие в ее состав, могут подвергнуться гидролизу. Чем ниже рН питательной среды, тем сильнее происходит гидролиз. При этом после стерилизации перестают застывать не только среды с желатиной, но и с агар-агаром. Так при $\text{pH}=4.0$, чтобы получить твердую питательную среду, 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 15—20 мин. при 120° или 20—30 мин. при 115° . Все материалы и предметы, которые при такой температуре не портятся, стерилизуются в автоклаве. Сюда относятся такие питательные среды, как бульон, агар, картофель, молоко, различные жидкости (вода, физиологический раствор), посуда, резиновые предметы (пробки, трубки), инструменты металлические, асбестовые фильтры и т. п.

Поставив предметы в котел и закрыв герметически крышку, оставляем в последней открытой трубку, выводящую пар, и начинаем нагревать котел. Вода через некоторое время начинает кипеть, пар вытесняет воздух из котла через свободное отверстие и, когда весь воздух вытеснен паром, закрываем выходное отверстие. Чтобы узнать, весь ли воздух вытеснен, так как стерилизующая способность насыщенного пара выше, чем смесь пара с воздухом, следует пропускать выходящую струю пара и воздуха через холодную воду. Пока имеется 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 доводим до определенной высоты (например, поднимаем на одну атмосферу). Тогда уменьшаем нагревание прибора настолько, чтобы давление оставалось на одном уровне, и сохраняем его в течение определенного времени (при 115° 20—30 мин., при 120° 15—20 мин.).

После этого прекращаем нагревание, давление постепенно падает и, когда оно дойдет по манометру до 0, открываем кран, выводящий пар. Когда пар выпущен, отвинчиваем крышку и вынимаем 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 авто-

клавах помещаются 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 уже требуется для стерилизации меньше времени, например, при 170° достаточно 20 мин., при 200 — 5 мин. Такой способ стерилизации применяется для сухой посуды, для ваты, бумаги, а также для металлических предметов, боящихся ржавчины, например стальных игл. Хотя температуры выше 170° быстро убивают микробов, но при этом вата и бумага обугливаются и продукты их сухой перегонки портят стеклянную посуду. Поэтому 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. Это металлический шкаф, имеющий двойные стенки, обшитые асбестом. Необходимая температура измеряется термометром, вставленным в отверстие в стенке прибора.

Х о л о д н а я с т е р и л и з а ц и я. Жидкие питательные среды можно стерилизовать фильтрованием через свечи Шамберлена, асбестовые или стеклянные фильтры марки Schott G-5. Наиболее распространенным является фильтрование через специальные диски из смеси асбеста и клетчатки.

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

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

4. МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АНАЭРОБОВ

Культивирование анаэробных или факультативно анаэробных микроорганизмов можно производить различными способами, основанными на двух приемах. 1. Посев производится обычным способом в жидкие или на 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 этих методов.

1. В обычный эксикатор с хорошо притертой крышкой вносят размельченную на терке картошку, морковь или подобные овощи. Растительная ткань быстро поглощает кислород и выделяет углекислый газ, создавая таким образом благоприятные условия для развития анаэробных бактерий. В случае картошки для поглощения кислорода достаточно 50 г из расчета на один литр воздуха. После этого в эксикатор помещают пробирки или чашки Петри и тщательно закрывают крышкой.

В качестве индикатора анаэробности можно употреблять стерильное молоко с небольшой добавкой метиленовой синей. При отсутствии кислорода воздуха метиленовая синяя обесцвечивается.

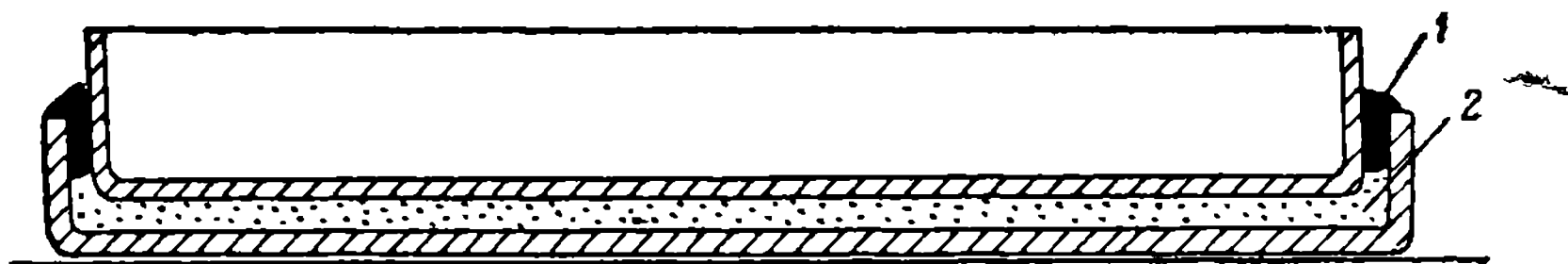


Рис. 1. Культивирование анаэробов в перевернутых чашках Петри.

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

2. Пирогалловая кислота (пирогаллол) для создания анаэробных условий. На каждые 100 мл воздуха берут 1 г пирогалловой кислоты и 10 мл 10%-го раствора едкого натра или едкого калия. Чтобы создать анаэробные условия в эксикаторе нужно на дно положить пирогалловую кислоту, откачать воздух и после этого опрокинуть стаканчик с едким калием.

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 пузырька воздуха, как это показано на рис. 1. Просвет между стенками крышки и доньшка заливают стерильным парафином. Культивирование микроорганизмов происходит в обычных условиях в термостате или при комнатной температуре.

4. Культивирование анаэробов в стеклянных трубочках описано в главе IV, раздел 3.

Часть II

РЕЦЕПТУРА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ¹

1. СРЕДЫ ДЛЯ САПРОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ

Среда № 1. Мясо-пептонный бульон (в дальнейшем изложении 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 $\text{pH}=6.6-7.0$, используя в качестве индикатора бром-тимол блау:

Среда № 2. Мясо-пептонный агар (в дальнейшем МПА). Состав питательной среды тот же, что № 1, но добавляют на 1 л среды 20 г агар-агара.

Среда № 3. Мясо-пептонная желатина.

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 мясо-пептонного бульона (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 $\text{pH}=6.6-7.0$, как это указано при приготовлении питательных сред. Желатина имеет кислую реакцию и обладает большой буферностью, поэтому на ее нейтрализацию идет больше NaOH , чем для нейтрализации

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

бульона или агара. Желатину можно фильтровать через бумажный или ватный фильтр.

С р е д а № 4. Почвенный агар.

Глюкоза	1.0 г
Двухкалийный фосфат (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. при 1 атм. 1 кг садовой почвы в 1000 мл водопроводной воды. Добавляют около 1 г карбоната кальция и все вместе фильтруют через двойной фильтр из фильтровальной бумаги. Если фильтрат останется мутным, то его повторно фильтруют через тот же фильтр (не заменять фильтр новым!).

Растворяют агар в 800 мл воды, добавляют фосфорнокислый калий и нагревают текучим паром в аппарате Коха не меньше одного часа, вносят 100 мл почвенного экстракта. Глюкозу стерилизуют отдельно в 100 мл воды, добавляют перед тем, как разливать агар по пробиркам. Реакцию доводят до $pH=6.8$.

С р е д а № 5. Среда для дифференцировки видов спорообразующих бактерий.

Мясо-пептонный агар (среда № 2)	500 мл
Сусловый агар (среда № 12)	500 мл

Сусловый агар готовится на неохмеленном сусле 7° Баллинга и смешивается в горячем состоянии с равным объемом растопленного мясо-пептонного агара. Реакция среды доводится до $pH=7.1-7.2$. Среду разливают небольшими порциями и стерилизуют. На этой среде колонии отдельных видов спорообразующих бактерий имеют очень характерный вид (Мишустин и Перцовская, 1954).

С р е д а № 6. Среда Стровинского для *Pseudomonas*.

Сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$)	0.5 г
Фосфорнокислый натрий одноосновный ($NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$)	1.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (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 ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	0.05 г
Лактоза	20.0 г
Тимол блау или О-крезол фталеин	0.05 г
Микроэлементы	Следы
Агар-агар	20.0 г
Вода дистиллированная	1000 мл

Реакция питательной среды устанавливается $pH=7.2$.

Многие виды *Pseudomonas* способны усваивать лактозу и растут элективно на этой среде. Вокруг колоний этих организмов

образуются синие зоны, благодаря переходу индикатора в щелочную форму (Beltrá, 1956).

Среда № 7. Среда для *Caulobacter*.

Сернокислый аммоний $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	1.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	1.0 г
Фосфорнокислый калий одноосновный (KH_2PO_4)	1.0 г
Сернокислый магний $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.4 г
Хлористый натрий (NaCl)	0.02 г
Сернокислое железо $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.02 г
Сернокислый марганец $(\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$	0.02 г
Глюкоза	5.0 г
Вода дистиллированная	1000 мл

Дрожжевой автолизат (см. среду № 9) — 2 мл на 100 мл среды. Н. Б. Заварзина (1961) с успехом культивировала *Caulobacter vibrioides* на среде Пратта для водорослей (№ 20) с добавкой 0.5% глюкозы и 2 мл дрожжевого автолизата на 100 мл среды.

Среда № 8. Среда для культивирования *Nurhormicrobium vulgare*.

Азотнокислый натрий (NaNO_3)	1.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	1.0 г
Хлористый натрий (NaCl)	0.5 г
Сернокислый магний $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.5 г
Водопроводная вода	1000 мл

В колбу Эрленмайера на 100 мл помещают 20 мл среды и после стерилизации добавляют несколько капель метанола или ставят в эксикатор, куда ставится открытая пробирка с метанолом. Через 3—5 дней после посева при инкубации при 28° на поверхности жидкости появляется пленочка *Nurhormicrobium* (Заварзин, 1960).

Среда № 9. Дрожжевой автолизат.

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°. Ставят в термостат при 50° на 72 часа, после этого нагревают в автоклаве при 105° 30 мин. Затем 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° (Омелянский 1923а).

Приготовление дрожжевой воды см. среду № 36.

2. СРЕДЫ ДЛЯ *BACT. COLI*

Среда № 10. Фуксин-сульфитный агар Эндо.

Мясной экстракт	5.0 г
Пептон	10.0 г
Хлористый натр (NaCl)	5.0 г
Лактоза	5.0 г
Сульфит натрия безводный (Na ₂ SO ₃)	5.0 г
Основной фуксин	0.4 г
Агар-агар	20.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Реакция агара перед добавлением сульфита доводится до pH=7.5. Среда эта готовится 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 сернистокислового натрия (безводного сульфита натрия) или 20%-й раствор той же семиводной кристаллической соли (Na₂SO₃ · 7H₂O) до получения ярко-розового 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 мясо-пептонного агара (pH=7.4—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 1.5—1%) (Разумов, 1947).

Среда № 11. Среда Эйкмана для *Bact. coli*.

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. 10, Б) и стерилизуют дробно текучим паром (Разумов, 1947).

3. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ДРОЖЖЕЙ, ГРИБОВ И АКТИНОМИЦЕТОВ

Среда № 12. Сусло.

Солод (тонко размолотый)	250.0 г
или солодовый экстракт	15.0 г
Вода водопроводная	1000 мл

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 одного литра. Для получения солодового агара добавляют 1.5% агар-агара.

По Омелянскому (1923а) способ приготовления сусла состоит в следующем. Отмеренное количество водопроводной воды (1 л) нагревают до 48—50° и в нее понемногу всыпают отвешенное количество солодовой ячменной муки (100—250 г) при непрерывном помешивании, чтобы избежать образования комков. Температура жидкости поддерживается 45° в течение получаса, чтобы образовалось возможно больше диастаза (амилазы). В следующие полчаса температуру поднимают до 55—58° и поддерживают ее на этом уровне в течение часа и более, не переходя этой температуры, чтобы не разрушить амилазу, — до тех пор пока взятая проба жидкости после остывания перестанет давать посинение с йодом, 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 платок и разливают в заранее стерилизованные колбы или пробирки, стараясь не запачкать их горлышка, ибо в таком случае ватные пробки прилипают к стеклу. Иногда к этой среде прибавляют мед для нейтрализации кислот, образующихся при разложении сахара микробами. Стерилизовать можно нагреванием в автоклаве при 110° в течение 15—20 мин., хотя предпочтительнее стерилизовать повторным нагреванием в аппарате Коха, первые три дня по полчаса (в промежутках среда остается на холоду), а на четвертый день за несколько часов до очередной стерилизации ставят среду при 35—40°. На пятый день жидкость не подвергают стерилизации, а сохраняют при 25—30°. Последняя стерилизация производится на шестой день в течение одного часа.

Среда № 13. Среда Ролэна для плесневых грибов.

Фосфорнокислый аммоний $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$	0.6 г
Сернокислый аммоний $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	0.25 г
Углекислый калий (K_2CO_3)	0.6 г
Углекислый магний (MgCO_3)	0.4 г
Азотнокислый аммоний (NH_4NO_3)	4.0 г
Сернокислый цинк ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.07 г

Сернокислое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.07 г
Кремнекислый калий (K_2SiO_3)	0.07 г
Винная кислота	4.0 г
Сахароза	70.0 г
Дистиллированная вода	1500 мл

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

Среда № 14. Среда Фреда и Ваксмана для плесневых грибов.

Азотнокислый аммоний (NH_4NO_3)	3.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_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 № 15. Среда Чапека для плесневых грибов.

Азотнокислый натрий (NaNO_3)	2.00 г
Фосфорнокислый калий одноосновный (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 твердой среды добавляют 15 г агар-агара на 1000 мл раствора, растворяют и фильтруют. Реакцию среды можно не устанавливать.

Среда № 16. 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 № 17. Сахарный агар с нитратами Ваксмана для актиномицетов.

Азотнокислый натрий (NaNO_3)	2.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (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
 Вода водопроводная 1000 мл
 Реакция среды приблизительно $\text{pH} = 7.0$.

Среда № 18. Крахмало-аммиачный агар для актиномицетов.

Растворимый крахмал 10.0 г
 Сернокислый аммоний $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 1.0 г
 Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4) 1.0 г
 Сернокислый 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
 Вода водопроводная 1000 мл

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

4. МИНЕРАЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ВОДОРОСЛЕЙ

Среда № 19. 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
 Сернокислый магний $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 0.025 г
 Фосфорнокислый калий одноосновный (KH_2PO_4) 0.025 г
 Углекислый калий (K_2CO_3) 0.035 г

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

Среда № 20. Среда Пратта для водорослей (Заварзина, 1961).

Азотнокислый калий (KNO_3) 0.1 г
 Сернокислый магний $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 0.01 г
 Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4) 0.01 г
 Хлорное железо $(\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ 0.001 г
 Вода водопроводная 1000 мл

Среда № 21. Голодный агар.

Вода из исследуемого водоема 1000 мл
 Выщелоченный агар 15 г

Для создания более питательной среды смешивают 4 части голодного агара с 1 частью среды Успенского (№ 19) и добавляют сахар, уксуснокислый кальций или аспарагин из расчета не более 25 мг/л (Разумов, 1953).

На голодном агаре хорошо культивируются водоросли и бактерии «олигокарбофилы», не развивающиеся при высокой концентрации органических веществ в питательной среде.

5. СРЕДЫ ДЛЯ БАКТЕРИЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В КРУГОВОРОТЕ АЗОТА

Среда № 22. Среда Зенгена для уробактерий.

Мочевина $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$	30.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (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

Реакция среды устанавливается около $\text{pH} = 7.0$.

Среда № 23. Среда Лениса для уробактерий.

Мочевина $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$	50.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	0.5 г
Почвенный экстракт (см. среду № 4)	100 мл
Водопроводная вода	900 мл

Среда № 24. Твердая среда для уробактерий.

Мочевина	20.0 г
Желатина	150.0 г
Мясной бульон	1000 мл

Реакция среды устанавливается около $\text{pH} = 7.5$.

Желатина может быть заменена 15.0 г агар-агара.

Среда № 25. Жидкая среда Виноградского для *Nitrosomonas*.

Сернокислый аммоний $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	1.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	1.0 г
Хлористый натрий (NaCl)	2.0 г
Сернокислый магний $(\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O})$	0.5 г
Сернокислое железо $(\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O})$	Следы
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 добавляется отдельно в каждую колбу.

Среда № 26. Среда с аммонийно-магнезимальным фосфатом.

Аммонийно-магнезимальный фосфат $(\text{NH}_4\text{MgPO}_4)$	1.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	0.5 г
Сернокислое железо $(\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O})$	Следы
Водопроводная вода	1000 мл

На этой среде развитие нитрозомонас идет очень хорошо.

Среда № 27. Кремневые пластинки для нитрифицирующих бактерий.

Приготавливают кремневые пластинки вышеописанным методом (стр. 8). На каждую пластинку добавляют 2.5 мл раствора «а», 1 мл раствора «б», одну каплю раствора «в» и несколько капель суспензии «г» так, чтобы вид у чашки Петри был молочный. Круговым движением чашки растворы перемешивают, и открытую чашку Петри оставляют в термостате при 60° до тех пор пока жидкость выпарится.

Раствор «а»:

Сернокислый аммоний $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	1.5 г
Фосфорнокислый калий одноосновный (KH_2PO_4)	0.5 г
Сернокислый магний $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.25 г
Дистиллированная вода	100 мл

Раствор «б»:

Сернокислое железо $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	1.0 г
Дистиллированная вода	100 мл

Раствор «в»:

Насыщенный раствор хлористого натрия (NaCl)

Раствор «г»:

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

Растворы «а», «в», «г» стерилизуют отдельно в колбах, а раствор «б» — в ампулах, предварительно откачав воздух. Раствор $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ можно заменить $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ и тогда его можно стерилизовать, не откачивая воздух.

Среда № 28. Среда для *Nitrobacter* (Виноградский, 1904).

Азотистокислый натрий (NaNO_2)	1.0 г
Углекислый натрий (Na_2CO_3)	1.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	0.5 г
Хлористый натрий (NaCl)	0.5 г
Сернокислый магний $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.3 г
Сернокислое железо $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	Следы
Дистиллированная вода	1000 мл

Среда № 29. Среда Гильтая для денитрифицирующих бактерий.

а) Азотнокислый калий (KNO_3)	1.0 г
Аспарагин $(\text{C}_4\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O})$	1.0 г
Дистиллированная вода	250 мл
б) Лимонная кислота	5.0 г
или лимоннокислый кальций	8.5 г
Фосфорнокислый калий одноосновный (KH_2PO_4)	1.0 г
Сернокислый магний $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	1.0 г
Хлористый кальций $(\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$	0.2 г
Хлористое железо $(\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$	Следы
Дистиллированная вода	250 мл

В случае употребления лимонной кислоты ее нейтрализуют 10%-м раствором КОН в присутствии фенолфталеина как индикатора. Оба раствора «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 (Омелянский, 1923а).

Для получения твердой среды добавляют 1.5% агар-агара. Среду можно употреблять и без аспарагина. Как это указывается в оригинальной прописи Гильтая (Giltay et 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 аминного азота аспарагина с азотистой кислотой.

Для количественного учета денитрифицирующих бактерий следует брать среду Гильтая без аспарагина, добавлять к ней 1.5% агар-агара и нейтрализовать до $pH=7.0-7.2$. Испытуемый материал из ряда последовательных десятикратных разведений вносят в стерильные пробирки и заливают стерильной вышеуказанной средой до пробки. О развитии бактерий судят по образованию в столбиках агара пузырей азота.

С р е д а № 30. Среда ван Итерсона для денитрификаторов.

Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4) . . .	0.5 г
Азотнокислый калий (KNO_3)	2.5 г
Сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5 г
Полоски фильтровальной бумаги	20.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Реакция среды устанавливается $pH=7.2-7.4$.

С р е д а № 31. Нитратный агар.

Мясо-пептонный агар (среда № 2)	1000 мл
Азотнокислый калий (KNO_3)	2.5 г

Азотнокислый калий до стерилизации добавляется в расплавленный мясо-пептонный агар.

С р е д а № 32. Среда Омелянского и Северовой для азотобактера.

Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4) . . .	1.0 г
Сервокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$)	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 (Омелянский, 1923а).

С р е д а № 33. Среда Эшби для азотобактера.

Маннит	20.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	0.2 г
Сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$)	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 приблизительно $pH=7.0-7.5$. Для получения твердой среды добавляют 1.5% агар-агара.

С р е д а № 34. Среда Федорова для азотобактера (Федоров, 1957).

Инвертный сахар	20.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (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 $[(NH_4)_2MoO_4]$	5.0 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

С р е д а № 35. Бобовый отвар.

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 текущим паром 2 часа. Фильтруют и доводят объем до 2500 мл. Добавляют 1% сахарозы и 0.5% мела. Эта среда содержит около 40 мг азота в 100 мл среды.

Среда № 36. Агар для выделения азотфиксирующих бактерий.

Маннит	10.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	0.5 г
Сернокислый 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% раствора конго-рот. Для приготовления дрожжевой воды берут 400 г прессованных дрожжей, взбалтывают 3—4 часа, стерилизуют в высоком слое жидкости и оставляют отстояться неделю. Дрожжи осаждаются на дно, а над ними остается прозрачная жидкость. Раствор сливают сифоном и доводят реакцию до $pH=6.6-6.8$. Дрожжевая вода почти не содержит растворимых углеводов и имеет около 50 мг азота в 100 мл.

Среда № 37. Среда Виноградского для *Clostridium pasteurianum*.

Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	1.0 г
Сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5 г
Хлористый натрий ($NaCl$)	Следы
Сернокислое железо ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	Следы
Сернокислый 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 № 38. Среда Бредемана.

Глюкоза	10.0 г
Пептон	12.0 г
Мясной экстракт	8.0 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* (Омелянский, 19236).

**6. СРЕДЫ ДЛЯ БАКТЕРИЙ, УЧАСТВУЮЩИХ
В КРУГОВОРОТЕ СЕРЫ**

Среда № 39. Среда Бейеринка для гнилостных бактерий, образующих сероводород.

Мясо-пептонный агар	1000 мл
Углекислый свинец ($PbCO_3$)	1.0 г

К слегка щелочному мясо-пептонному агару прибавляют столько тонко растертого углекислого свинца, чтобы получилась равномерно белая непрозрачная в тонком слое среда. Посевной материал вносится внутрь перевернутой крышки стерильной чашки Петри, заливается средой, перемешивается и, чтобы создать анаэробные условия, покрывается доньшком чашки Петри так, чтобы между слоем агара и доньшком перевернутой чашки Петри не осталось пузырька воздуха (рис. 1). При росте колоний, выделяющих сероводород, вокруг них замечается побурение или почернение за счет образования сернистого свинца (Омелянский, 1923а). Рост бактерий происходит лучше, если углекислый свинец заменен окисью висмута.

С р е д а № 40. Среда Морриса.

Мясо-пептонный агар	1000 мл
Уксуснокислый свинец $[Pb(CH_3CO_2)_2]$	1.0 г

С р е д а № 41. Среда Вильсона-Блера для 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 ($pH=7.4-7.6$) вышеприведенного состава, нагретого до 80° , добавляют 10 мл 20%-го раствора сернистокислого натрия (Na_2SO_3), 1 мл 8%-го раствора хлорного железа ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) и 0.6 мл 10% раствора $NaON$; эти растворы готовят на стерильной воде. Разводят агар равным количеством посевного материала.

С р е д а № 42. Среда ван Дельдена для сульфатредуцирующих бактерий.

Аспарагин	1.0 г
Сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	0.5 г
Молочнокислый натрий	5.0 г
Сернокислое железо ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	Следы
Водопроводная вода	1000 мл

С р е д а № 43. Среда Штурм для *Vibrio desulfuricans*.

Сернокислый аммоний $[(NH_4)SO_4]$	4.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	0.5 г
Сернокислый кальций ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$)	0.5 г
Сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1.0 г
Соль Мора $[(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O]$	0.5 г
Молочнокислый кальций	3.5 г
Вода водопроводная	1000 мл

Соль Мора стерилизуется отдельно и добавляется перед заражением среды; рН среды доводится до 7.0—7.4; при культивировании *V. aestuarii* в указанную среду добавляют 3% NaCl (Штурм, 1952).

С р е д а № 44. Среда Сорокина для водородной сульфатредукции.

Фосфорнокислый калий одноосновный (KH_2PO_4)	1.0 г
Фосфорнокислый натрий двухосновный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)	0.3 г
Двууглекислая сода (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
Вода водопроводная	1000 мл

Реакция среды устанавливается около $\text{pH} = 7.0$.

Стерилизация 20 мин. при 110° .

Перед заражением в среду добавляют соль Мора из расчета 1.0 г на литр и $\text{NaS} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ из расчета 30 мг/л. Растворы солей Мора предварительно разливают в перетянутые пробирки, откачивают из них воздух и перепаяивают в узком месте на пламени спиртовки или газовой горелки. Запаянные ампулы с питательными солями стерилизуют в автоклаве или аппарате Коха. 100 мл среды наливают в склянку объемом в 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, откачивание и наполнение повторяют три раза и закрывают герметически (Сорокин, 1952).

С р е д а № 45. Твердая среда Сорокина для выделения культуры *Vibrio desulfuricans*.

Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	0.5 г
Сернокислый аммоний [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]	2.0 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Молочнокислый кальций	3.0 г
Соль Мора [$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]	1.0 г
Натрий аскорбиновокислый	1.0 г
Агар-агар	25.0 г
Вода водопроводная	1000 мл

Реакция среды устанавливается перед посевом $\text{pH} = 7.0$.

Аскорбиновокислый натрий готовится перед стерилизацией путем нейтрализации содой (Na_2CO_3) раствора аскорбиновой кислоты. Растворы соли Мора и аскорбиновокислого натрия разливают в ампулы, из них выкачивают воздух, запаивают и стерилизуют нагреванием в водяной бане. Растворы вносятся в питательную среду перед посевом.

Среда № 46. Среда ван Нила для пурпурных серобактерий.

Хлористый аммоний (NH_4Cl)	1.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	0.5 г
Хлористый магний ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	0.2 г
Двууглекислая сода (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

Реакция среды устанавливается $\text{pH} = 7.6$.

Сернистый натрий добавляется после стерилизации. Питательная среда вносится в склянки из белого стекла и после заражения доливается до пробки так, чтобы под пробкой не осталось пузырька воздуха. Культивирование пурпурных и зеленых серобактерий производится на свету.

Среда № 47. Среда Постгейта для окрашенных серобактерий. Основная среда:

Фосфорнокислый калий одноосновный (KH_2PO_4)	1.0 г
Хлористый аммоний (NH_4Cl)	1.0 г
Хлористый магний ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Хлористый натрий (NaCl)	10.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Микроэлементы: после стерилизации добавляют 1 мл следующего раствора на 1 л основной среды:

Железо (в виде $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	1.5 г
Бор (в виде H_3BO_3)	0.1 г
Цинк (в виде $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0.01 г
Кобальт [в виде $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$]	0.05 г
Медь (в виде $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)	0.005 г
Марганец (в виде $\text{MnCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	0.005 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Дальнейшие добавки: готовят крепкие растворы нижеприводимых солей, стерилизуют холодным фильтрованием и добавляют перед самым употреблением, исходя из расчета на 1 л основной среды:

а) двууглекислая сода (NaHCO_3) — 2 г/л основной среды для культивирования всех видов пурпурных серобактерий;

б) сернистый натрий ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$) — 1 г/л для *Chlorobium limicola*, 0.2 г/л для *Chromatium*, *Thiopedia* и *Chlorobium thiosulphatophilum*;

в) гипосульфит ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) — 1 г/л для *Chlorobium thiosulphatophilum*, *Chromatium* и *Thiopedia*;

г) яблочнокислый натрий — 1 г/л для *Chromatium* и *Thiopedia*.

Реакция среды устанавливается фосфорной кислотой до следующей величины: $\text{pH} = 7.0 - 7.2$ для различных видов *Chlorobium*, $\text{pH} = 8.0 - 8.4$ для *Chromatium* и *Thiopedia* (Postgate, 1959).

Среда № 48. Среда Бавендама для бесцветных серобактерий.

Сернокислый аммоний $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	1.5 г
Хлористый калий (KCl)	0.05 г
Сернокислый магний $(\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$	0.05 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	0.05 г
Азотнокислый кальций $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	0.01 г
Углекислый кальций (CaCO_3)	10.0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Стерилизуют в небольших колбах или пробирках. После заражения инкубируют в установке, представленной на рис. 2, в атмосфере, состоящей из смеси сероводорода (25 мм рт. ст.),

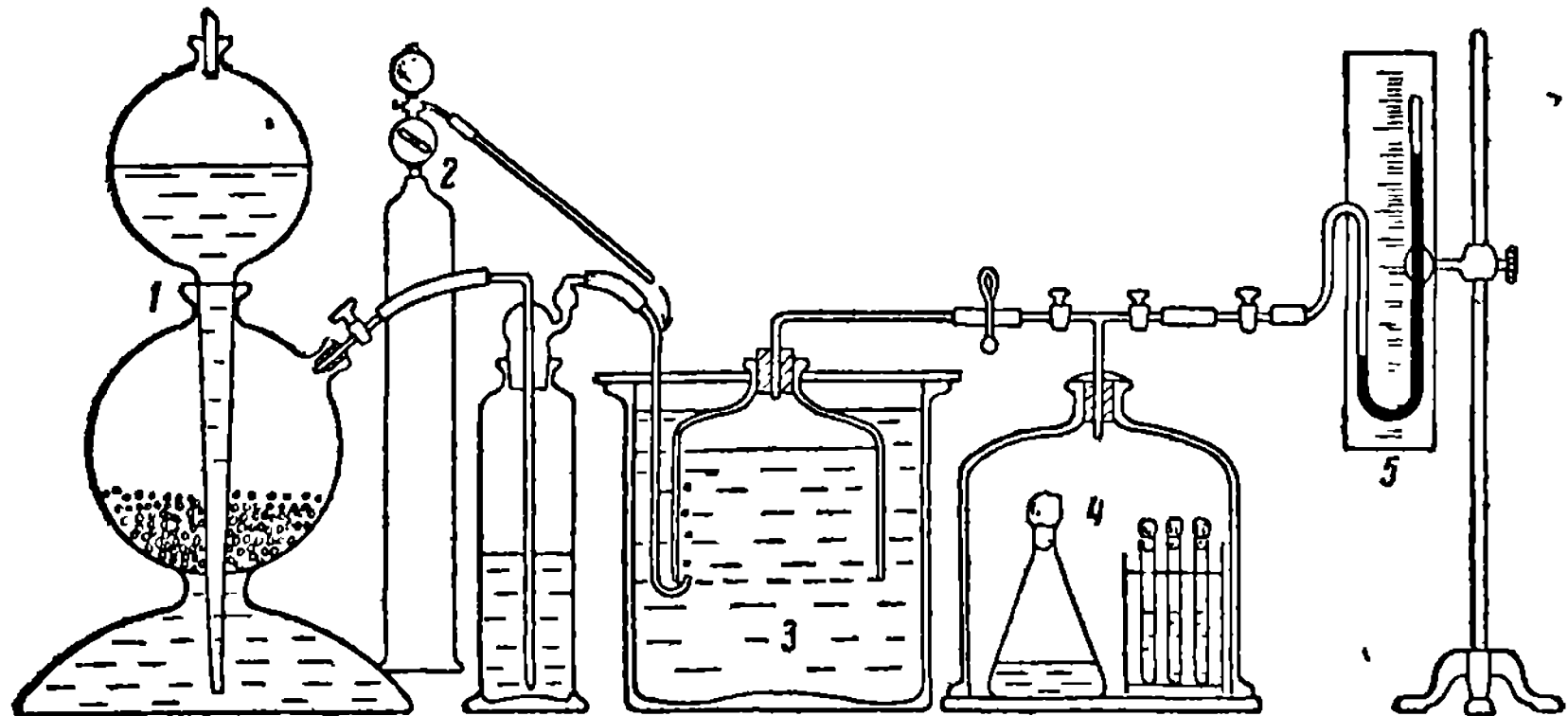


Рис. 2. Культивирование бесцветных серобактерий по Бавендаму.

1 — аппарат Киппа для получения сероводорода и углекислоты (изображен только один аппарат); 2 — баллон с водородом; 3 — газометр для приготовления газовой смеси; 4 — камера для выращивания серобактерий; 5 — манометр.

водорода и воздуха (26 мм). Если бактерий культивируют на твердой среде, то добавляют 5% углекислого кальция вместо 1%. Агар-агара добавляют к питательной среде 0.5%.

Среда № 49. Среда Молиша для пурпурных несерных бактерий.

Сернокислый магний $(\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O})$	0.5 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	0.5 г
Сернокислое железо $(\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O})$	Следы
Пептон	5.0 г
Декстрин	5.0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Для солоноватоводных форм добавляют 3‰ хлористого натрия.

Среда № 50. Среда Ленера (видоизмененная Б. Л. Исаченко) для пурпурных несерных бактерий.

Яблочная кислота	3.5 г
Аспарагин	2.0 г
Едкий натр (NaOH)	2.0 г

Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	6.4 г
Хлористый натрий (NaCl)	20.0 г
Сернистый натрий ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	4.0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

После стерилизации добавляются стерильно 4 мл 10%-го раствора одноосновного фосфорнокислого натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и 1 мл 10%-го двухосновного фосфорнокислого калия (K_2HPO_4). Реакция устанавливается $\text{pH}=7.5$; подкисляют 5%-й фосфорной кислотой, подщелачивают 10%-м едким натром (Осницкая, 1954).

Среда № 51. Среда Лиске для *Thiobacillus denitrificans* (Lieske, 1912).

Гипосульфит ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5.0 г
Азотнокислый калий (KNO_3)	5.0 г
Двууглекислая сода (NaHCO_3)	1.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (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 № 52. Среда Баалсруда для *Thiobacillus denitrificans*.

Гипосульфит ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5.0 г
Азотнокислый калий (KNO_3)	2.0 г
Хлористый аммоний (NH_4Cl)	0.5 г
Двууглекислая сода (NaHCO_3)	1.0 г
Хлористый магний ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Фосфорнокислый калий одноосновный (KH_2PO_4)	2.0 г
Сернокислое железо $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.0 мг
Дистиллированная вода	1000 мл

Реакция среды устанавливается $\text{pH} \sim 7.0$. Соли железа, фосфаты и бикарбонаты стерилизуются по отдельности (Baalsrud and Baalsrud, 1954).

Среда № 53. Среда Бейеринка для *Thiobacillus thioparus*.

Гипосульфит ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5.0 г
Хлористый аммоний (NH_4Cl)	0.1 г
Двууглекислая сода (NaHCO_3)	1.0 г
Фосфорнокислый натрий двухосновный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.2 г
Хлористый магний ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г
Водопроводная вода	1000 мл

Реакция среды устанавливается $\text{pH} \sim 8.0 - 8.5$.

Гипосульфит 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.

Среда № 54. Среда Натансона для галофильных тионовых бактерий.

Гипосульфит ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	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 [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$]	10 г
Фосфорнокислый натрий двухосновный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Углекислый магний (MgCO_3)	0.5 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Среда № 55. Тиосульфатный агар Бейеринка.

Гипосульфит ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (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 thioarvus* желательно добавлять избыток мела (CaCO_3).

Среда № 56. Среда Ваксмана для *Thiobacillus thiooxidans*.

	А	Б
Сернокислый аммоний [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]	0.2 г	2.0 г
Фосфорнокислый калий одноосновный (KH_2PO_4)	3.0 г	—
Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	—	1.0 г
Сернокислый 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
Сернокислое 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)	10.0 г	10.0 г
Дистиллированная вода	1000 мл	1000 мл

Реакцию питательного раствора устанавливают $\text{pH}=4.0$. Навески серы помещают в колбы или пробирки, где будут культивировать *Th. thiooxidans*, вносят жидкую питательную среду и стерилизуют текучим паром при 100° 3 дня подряд по 30 мин. Еще лучше развитие идет если взять серу из серного молока, которое приготавливается 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.

Среда № 57. Среда для *Thiobacillus thiooxydans* (de Kruyff, Walt a. Schwartz, 1957).

Роданистый калий (KCNS)	0.2 г
Калий фосфорнокислый одноосновный (KH ₂ PO ₄)	3.0 г
Сернокислый аммоний [(NH ₄) ₂ SO ₄]	0.2 г
Сернокислый магний (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.5 г
Хлорное железо (FeCl ₃ · 6H ₂ O)	0.02 г
Хлористый кальций (CaCl ₂ · 6H ₂ O)	0.3 г
Вода дистиллированная	1000 мл

Реакцию среды устанавливают рН = 4.8.

Стерилизуют 15 мин. при 110°.

Среда № 58. Тиосульфатный агар Ваксмана.

Гипосульфит (Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O)	5.0 г
Хлористый аммоний (NH ₄ Cl)	0.1 г
Хлористый кальций (CaCl ₂ · 6H ₂ O)	0.25 г
Хлористый магний (MgCl ₂ · 6H ₂ O)	0.1 г
Фосфорнокислый калий одноосновный (KH ₂ PO ₄)	3.0 г
Агар-агар	20.0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Стерилизуют 15 мин. при 110°. При культивировании *Thiobacillus thiooxydans* после стерилизации кислотность среды доводят до рН=4.0.

Среда № 59. Среда Летена для *Thiobacillus ferrooxydans*.

Сернокислый аммоний [(NH ₄) ₂ SO ₄]	0.15 г
Хлористый калий (KCl)	0.05 г
Сернокислый магний (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.5 г
Азотнокислый кальций [Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O]	0.01 г
Фосфорнокислый калий одноосновный (KH ₂ PO ₄)	0.1 г
Водопроводная вода	1000 мл

После стерилизации к среде добавляется 10 мл 10%-го раствора FeSO₄ · 7H₂O, подкисленного до рН=3.5, который стерилизуется отдельно. Раствор железа лучше стерилизовать в ампулах, из которых удален воздух, нагреванием в водяной бане. Для выделения чистой культуры *Th. ferrooxydans* к среде Летена добавляют 2% выщелоченного агар-агара. Реакция среды рН=4.0 в этом случае устанавливается после стерилизации и добавления раствора сернокислого железа (Leathen, McIntyre a. Braley, 1951).

7. СРЕДЫ ДЛЯ ЖЕЛЕЗОБАКТЕРИЙ

Среда № 60. Среда Лиске.

Аммоний сернокислый [(NH ₄) ₂ SO ₄]	1.5 г
Хлористый калий (KCl)	0.05 г
Сернокислый магний (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.05 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K ₂ HPO ₄)	0.05 г
Азотнокислый кальций [(Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ 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, чтобы она насытилась кислородом и углекислотой. Затем в каждую колбу добавляют приблизительно 0.05 г стерильной железной проволоки и заражают посевным материалом.

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

С р е д а № 61. Среда Вольфа (Kusaga a. Wolfe, 1957).

Хлористый аммоний (NH_4Cl)	1.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	0.5 г
Магний сернокислый ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	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 (FeS), которое разбалтывают в расплавленном 1.5%-м растворе агар-агара и вносят на дно пробирки. После того как агар застынет, стерильная жидкая среда наливается высоким слоем поверх агар-агара и через нее пропускается ток углекислоты. Активная реакция среды устанавливается $\text{pH}=6-7$.

Осадок сернистого железа (FeS) получается путем осаждения сернокислого железа сульфидом натрия в эквимольных растворах. Пробирки поверх ватной пробки затыкаются корковой.

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

С р е д а № 62. Среда для *Metallogenium symbioticum*.

Уксуснокислый марганец [$\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$]	0.1 г
Агар-агар выщелоченный	15.0 г
Среда № 60, без железа	1000 мл

Берется жидкая среда для железобактерий Лиске № 60 или дистиллированная вода и вместо солей железа добавляют марганец в виде уксуснокислого марганца (Заварзин, 1961).

С р е д а № 63. Среда для бактерий, окисляющих марганец.

Насыщенный раствор бикарбоната марганца [$\text{Mn}(\text{HCO}_3)_2$]	100 мл
Двууглекислая сода (NaHCO_3)	0.1 г
Сернокислый аммоний [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]	0.1 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	Следы
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Следы
Водопроводная вода	900 мл

Бикарбонат марганца готовят, пропуская ток углекислоты через суспензию карбоната марганца. Среда стерилизуется текущим паром 3 дня по 25 мин.

8. СРЕДЫ ДЛЯ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ,
ОТЛАГАЮЩИХ ЖЕЛЕЗО В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ

Среда № 64. Среда Разумова для *Cladothrix* (Разумов, 1961).

Азотнокислый калий (KNO_3)	1.00 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 двухосновный (K_2HPO_4)	0.02 г
Хлорное железо ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Следы
Сахароза	2.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Среда № 65. Среда Разумова для *Sphaerotilus*. Та же, что среда № 56, но азот вносится в виде аспарагина или пептона 1 г на литр (Разумов, 1961).

Среда № 66. Среда Калиненко.

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

Для получения твердой среды добавляют 1.5% агар-агара (Калиненко, 1946).

9. СРЕДЫ ДЛЯ БАКТЕРИЙ, ОКИСЛЯЮЩИХ ВОДОРОД ИЛИ
УГЛЕВОДОРОДЫ

Среда № 67. Среда Лебедева для водородных бактерий.

Азотнокислый калий (KNO_3)	0.2 г
Фосфорнокислый натрий одноосновный ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.5 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 г
Хлорное железо ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Следы
Водопроводная вода	1000 мл

Культивирование производится в атмосфере, содержащей 50% воздуха, 40% водорода, 10% углекислоты.

Среда № 68. Среда Руланда для водородных бактерий.

Двууглекислая сода (NaHCO_3)	1.0 г
Хлористый аммоний (NH_4Cl)	1.0 г
Фосфорнокислый калий одноосновный (KH_2PO_4)	0.5 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г
Хлористый натрий (NaCl)	0.1 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Реакция среды устанавливается $\text{pH} = 7.1 - 7.2$.

Свежеприготовленный раствор двууглекислой соды стерилизуют отдельно в ампулах. Простерилизованный раствор карбоната железа в воде, содержащей CO_2 , вносится в стерильную среду из расчета 0.01 мг/л. Культивирование производится в атмосфере гремучего газа, содержащей свободную углекислоту.

Среда № 69. Среда Мюнца для метанооксиляющих бактерий.

Хлористый аммоний (NH_4Cl)	1.0 г
Фосфорнокислый калий одноосновный (KH_2PO_4)	0.5 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (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 производится в атмосфере $\frac{2}{3}$ воздуха и $\frac{1}{3}$ метана (Müpsz, 1915).

Среда № 70. Среда Таусона для бактерий, окисляющих жидкие или 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 одноосновный (KH_2PO_4)	0.25 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (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
Вода дистиллированная	1000 мл

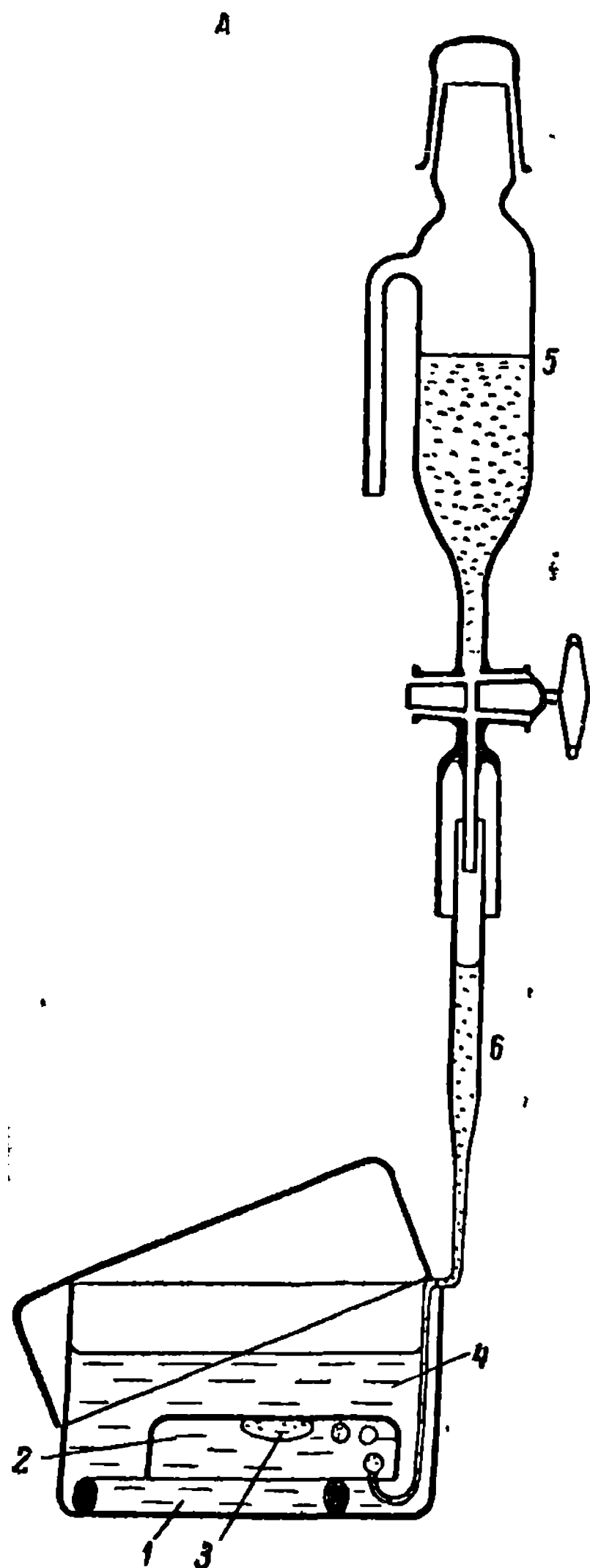
Кислотность среды устанавливается около $\text{pH} = 6.6$.

Вместо $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и KNO_3 можно брать $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1 г/л и CaSO_4 — 0.25 г/л. Среда стерилизуется в колбах или кристаллизаторах, куда поставлена перевернутая пробирочка или чашечка. При стерилизации воздух из нее выходит и пробирка заполняется средой. Затем тонкой пипеткой в пробирку вводится около 1 мл жидкого углеводорода, который в дальнейшем постепенно диффундирует под поверхность среды и создает благоприятные условия для развития бактерий в поверхностной пленке (рис. 3). Твердые углеводороды в простерилизованном и измельченном виде в избытке вносятся на поверхность питательной среды (Таусон, 1929).

Среда № 71. Среда Романенко для метанооксиляющих бактерий.

Двууглекислая сода (NaHCO_3)	0.1 г
Фосфорнокислый натрий одноосновный ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.3 г
Азотнокислый калий (KNO_3)	0.1 г
Сернокислый магний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.05 г
Выщелоченный агар	15.0 г
Вода водопроводная	20.0 мл
Вода дистиллированная	980 мл

Перед разливом среды в чашку Петри вносится 1 мл радиоактивного раствора углекислого натрия, меченого по углероду, с удельной активностью около $0.15 \mu \text{ Ci}$. Содержимое чашки тщательно перемешивается. Культивирование бактерий производится на мембранных фильтрах, помещенных на поверхность агара в чашках Петри при температуре $28-30^\circ$ в эксикаторах в атмосфере $\frac{1}{3}$ метана + $\frac{2}{3}$ воздуха (Романенко, 1959, см. также главу V, раздел 5).



10. СРЕДЫ ДЛЯ ЦЕЛЛЮЛОЗОРАЗРУШАЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Среды № 72. Среда Гетчинсона для аэробных бактерий.

Фосфорнокислый калий двухосновный (K_2HPO_4)	1.0 г
Хлористый кальций ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1 г
Сернокислый 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

Реакция среды устанавливается $\text{pH} = 7.2 - 7.3$.

Питательная среда до стерилизации наливается до $\frac{1}{3}$ про-

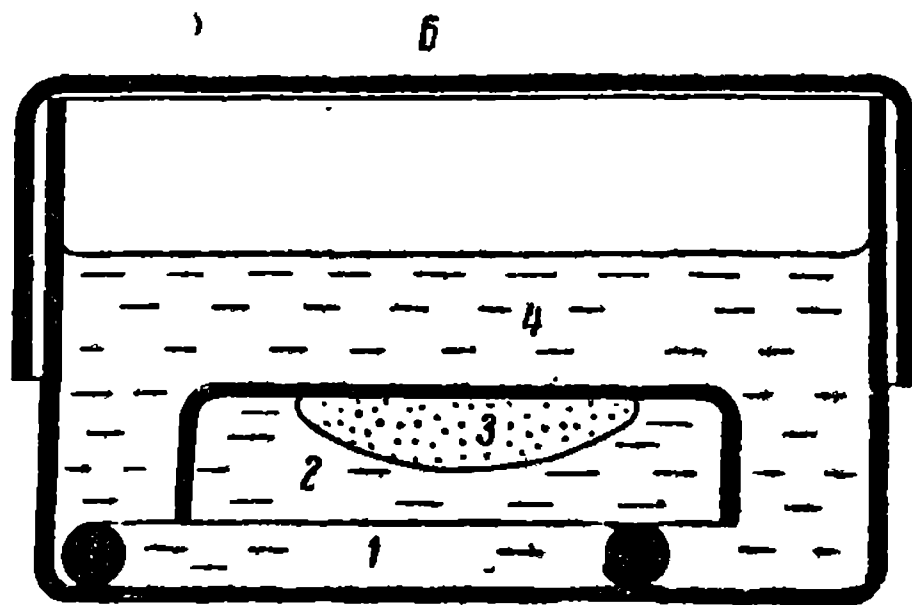


Рис. 3. Культивирование бактерий, окисляющих жидкие углеводороды по Таусону: А — внесение углеводородов в питательную среду; Б — схема постановки культур. Углеводороды диффундируют в среду, а бактерии развиваются на поверхности жидкости.

1 — подставка; 2 — опрокинутая чашка Петри; 3 — углеводороды; 4 — питательная среда; 5 — делительная воронка; 6 — изогнутый капилляр.

бирки, и в каждую пробирку опускается полоска фильтровальной бумаги так, чтобы она наполовину высывалась из раствора.

Среда № 73. Среда Омелянского для анаэробных бактерий.

Фосфорнокислый аммоний двухосновный [(NH) ₂ HPO ₄]	1.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K ₂ HPO ₄)	1.0 г
Сернокислый магний (MgSO ₄ · 7H ₂ 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 (Na₂S · 9H₂O).

11. СРЕДЫ ДЛЯ БАКТЕРИЙ, ОБРАЗУЮЩИХ МЕТАН

Среда № 74. Среда Викена.

Двууглекислая сода (NaHCO ₃)	3.5 г
Сернокислый аммоний [(NH ₄) ₂ SO ₄]	0.5 г
Сернокислый магний (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.5 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K ₂ HPO ₄)	1.0 г
Органическое вещество	10.0 г
Отмытый агар	15.0 г
Водопроводная вода	1000 мл

Реакция среды устанавливается рН = 6.8.

Перед посевом к питательной среде добавляется стерильный раствор (Na₂S · 9H₂O) из расчета 0.2 мг H₂S на 100 мл среды. В качестве источника углерода вносится 1% органического вещества: этиловый или бутиловый спирт, ацетон, уксуснокислый натрий, маслянокислый натрий или соли других жирных кислот. Культивирование производится в пробирках, заполненных до горлышка и закрытых стерильной резиновой пробкой. Начало развития отмечается по разрыву агарового столбика в пробирках в результате распада органического вещества с образованием метана (Wiken, 1957).

Среда № 75. Среда Романенко.

Хлористый аммоний (NH ₄ Cl)	0.2 г
Фосфорнокислый калий одноосновный (KH ₂ PO ₄)	1.0 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (K ₂ HPO ₄)	2.0 г
Сернокислый магний (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.01 г
Двууглекислая сода (NaHCO ₃)	0.5 г
Этиловый спирт или уксуснокислый натрий	10.0 г
Агар выщелоченный	7.5—10.0 г
Вода водопроводная	1000 мл

Сернистый натр ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) 1% в растворе 0.5% углекислого натрия стерилизуют отдельно, и в каждую пробирку добавляют по одной капле на 10 мл среды. Реакция среды устанавливается $\text{pH} = 7.0$.

С р е д а № 76. Среда Баркера.

Хлористый аммоний (NH_4Cl)	0.75 г
Фосфорнокислый калий двухосновный (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 спирт или	20.0 мл
Пропиловый или бутиловый спирты	10.0 мл
Водопроводная вода	1000 мл

На каждые 100 мл этой среды добавляется перед заражением 3 мл раствора 1% сернистого натра ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) в 5%-м растворе углекислого натрия (Na_2CO_3); среда затем нейтрализуется соляной кислотой до реакции $\text{pH} = 7.0$ (Barker, 1956).

С р е д а № 77. Среда для *Methanobacterium Omelianskii*.

Используется жидкая минеральная среда Баркера № 76 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.

Часть III

ПРИЖИЗНЕННОЕ ИЗУЧЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ И МЕТОДЫ ОКРАСКИ 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 использование фазово-контрастного устройства.

Чрезвычайно важно при употреблении осветителей добиваться оптимального освещения препарата. В большинстве случаев изучению подвергаются окрашенные препараты, но при изучении 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. Здесь уже подсушивание капилляра нарушает картину распределения микроорганизмов.

а. 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. 4).

Для установки правильного освещения:

- 1) микроскоп и осветитель устанавливаются на соединительную планку (5);
- 2) на столике микроскопа устанавливается 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 так, чтобы нить накаливания резко изображалась на клочке белой бумаги, лежащей на зеркале

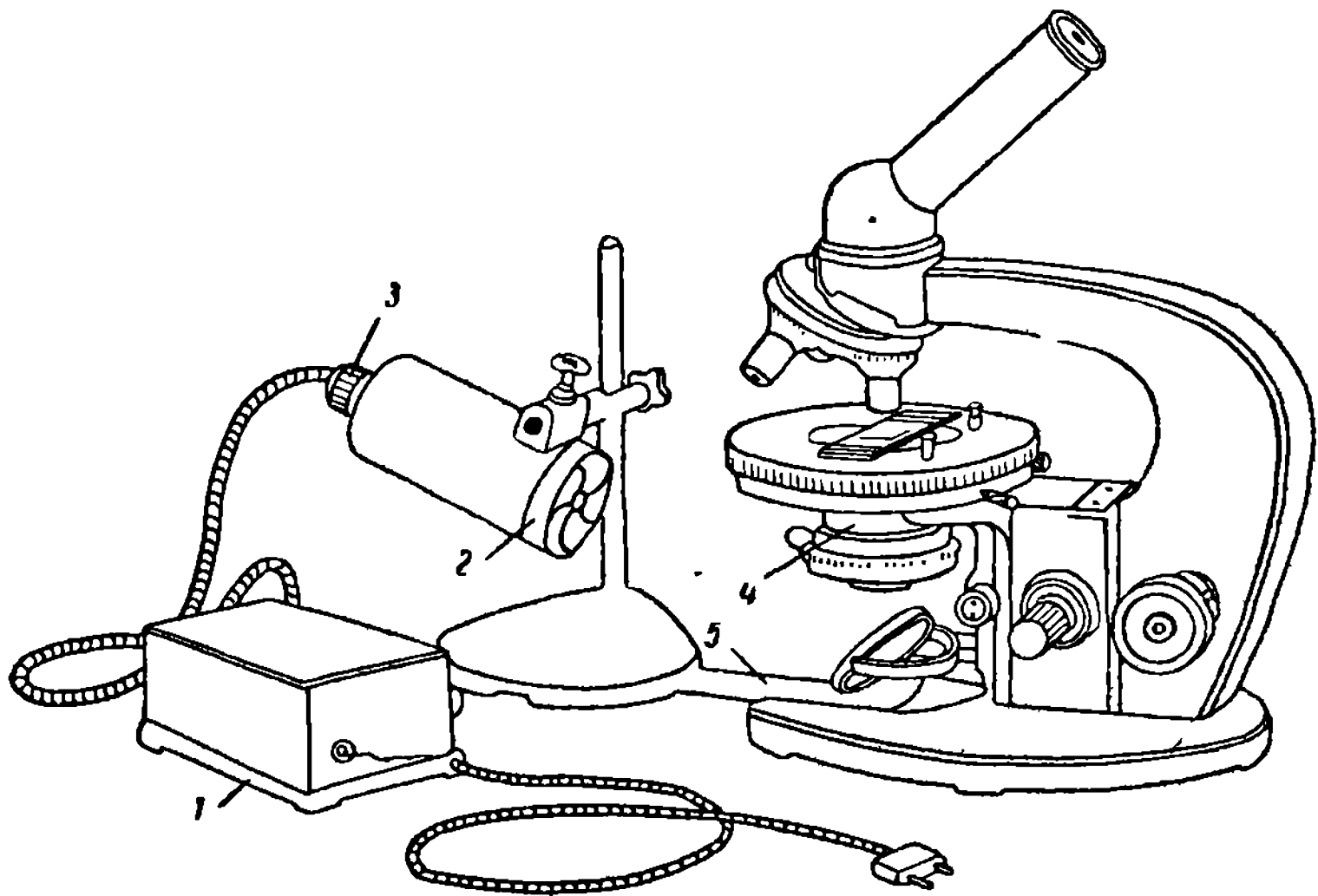


Рис. 4. Установка освещения по Келлеру.

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

микроскопа; бумагу удаляют и поворотом зеркала пучок света направляют в тубус микроскопа;

5) поворотом макро- и микровинта препарат устанавливают на фокус;

6) диафрагму конденсора микроскопа (4) суживают;

7) опуская и поднимая конденсор микроскопа (4), добиваются того, чтобы край диафрагмы осветителя (2) был резко виден в поле зрения микроскопа;

8) затем 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.

6. 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 соот-

ветствуют различной толщине или оптической плотности в препарате.

Основной частью контрастно-фазового устройства являются специальные ахроматические фазовые объективы, имеющие на одной из внутренних поверхностей линз фазовое кольцо определенных размеров и револьверный диск с кольцевыми диафрагмами, которые устанавливаются перед конденсором (рис. 5).

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

При работе с фазово-контрастным устройством:

1) выбранные окуляр и фазовоконтрастные объективы вставляют в тубус микроскопа;

2) нормальный конденсор микроскопа вынимают и в освободившееся гнездо вставляют фазово-контрастный конденсор револьвер которого ставится на «О»;

3) микроскопический препарат помещают на столик микроскопа и тубус устанавливают так, чтобы препарат был в фокусе

4) устанавливают правильное освещение по Келлеру, пользуясь осветителем ОИ-7 или ОИ-9, а именно: диафрагма осветителя должна быть видна в плоскости препарата, затем центрирована и открыта в соответствии с полем зрения окуляра;

5) полностью открывают ирисовую диафрагму конденсор (рис. 5, А, 3);

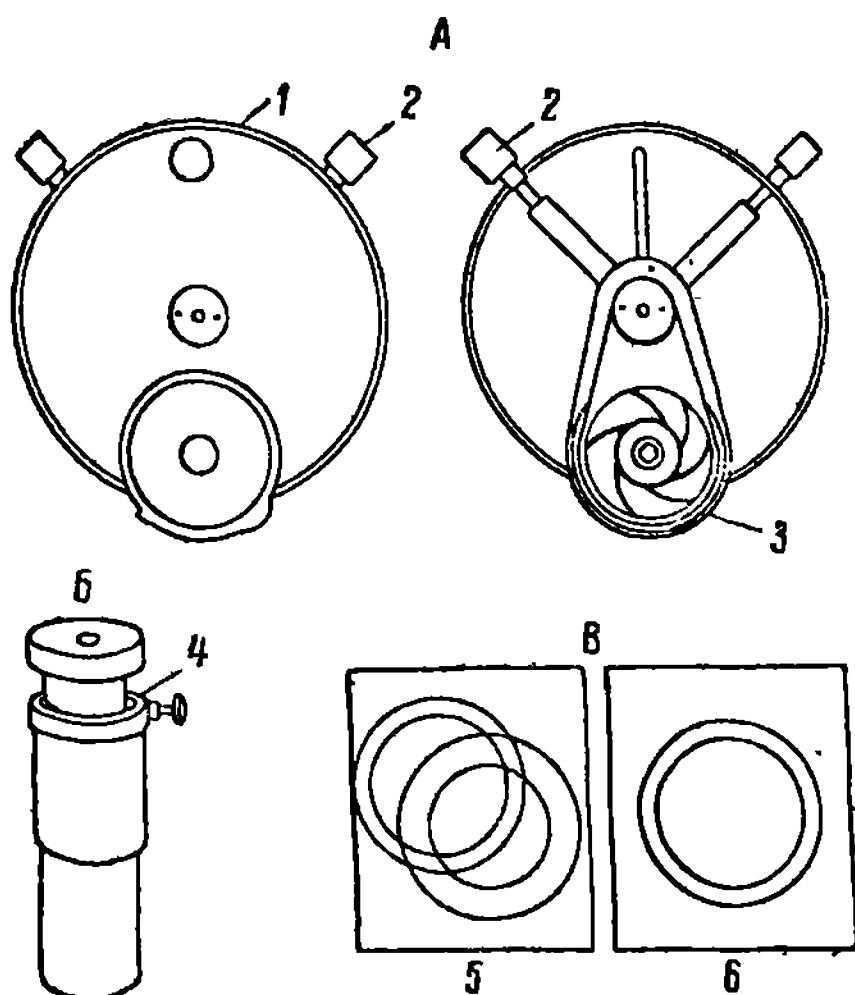


Рис. 5. Фазово-контрастное устройство: А — фазово-контрастный конденсор (1 — окно кожуха конденсора, 2 — центрировочные винты конденсора, 3 — ирисовая диафрагма конденсора); Б — вспомогательный микроскоп (4 — окуляр вспомогательного микроскопа); В — фазовое кольцо объектива и светлое кольцо диафрагмы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

б) вынимают из тубуса окуляр Гюйгенса и вместо него вставляют вспомогательный микроскоп (рис. 5, Б), прилагаемый к фазово-контрастному устройству; окуляр вспомогательного микроскопа (рис. 5, Б, 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. 5, А, 1) должна появиться цифра, соответствующая увеличению объектива;

8) вращая центрировочные винты конденсора (рис. 5, А, 2), совмещают видимое в вспомогательный микроскоп светлое кольцо с темным кольцом (рис. 5, В, 6);

9) снова заменяют вспомогательный микроскоп окуляром Гюйгенса.

Для получения большего эффекта рекомендуется пользоваться светофильтрами, входящими в комплект 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 (рис. 5, А, 3);

3) если получается недостаточный контраст, то необходимо проверить центрировку фазово-контрастного устройства с помощью вспомогательного микроскопа.

в. 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.

* г. 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 микрозонального профиля при воспроизведении микрозон превращения. 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».

Для того чтобы эти картины перенести под микроскоп без нарушения, авторы использовали прибор, названный ими капиллярным целоскопом. Основу прибора (рис. 6, А) составляет набор из 4—5 капиллярных ячеек длиной в 1—2 см. В каждой капиллярной ячейке 5 прямоугольных капилляров с просветом $40 \times 200 \mu$. Капилляры эти прикрепляются тонким резиновым кольцом из нипельной резины к стеклянной палочке и помещаются в стакан, куда был внесен перемешанный поверхностный ил из водоема.

Иловой раствор проникает в капилляры и его физико-химические свойства распределяются аналогично тому, как это имеет место в образце ила. Вместе с иловым раствором по соответствующим микрозонам распределяются и иловые 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 из миллиметровки (рис. 6, А).

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

4. Сроки пребывания целоскопических капилляров в иле, необходимые для получения достаточно четких микробных пейзажей, зависят от скорости формирования вертикальной градации окислительно-восстановительных условий и физико-химических свойств в образце ила и от быстроты развития соответствующей

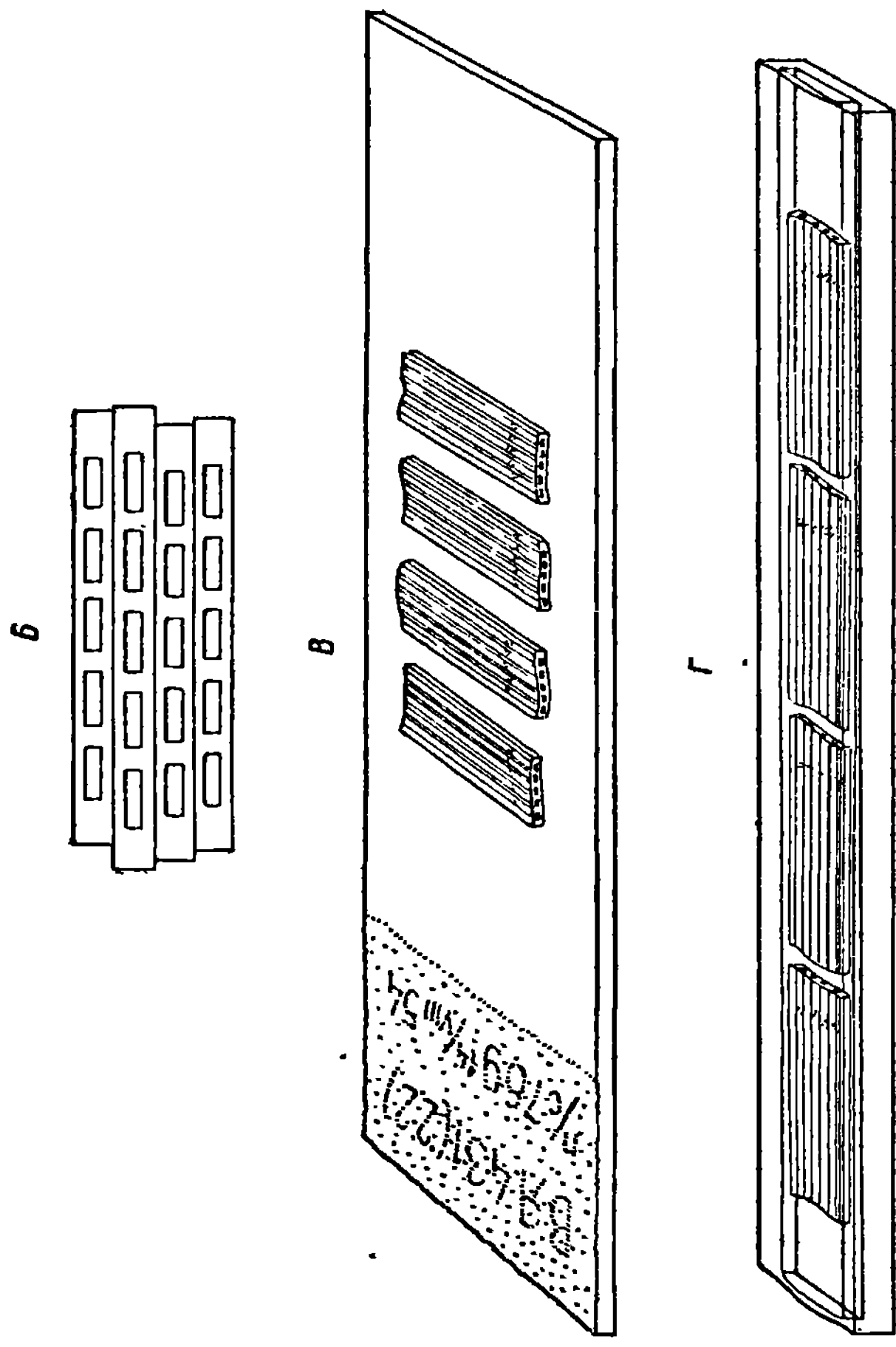
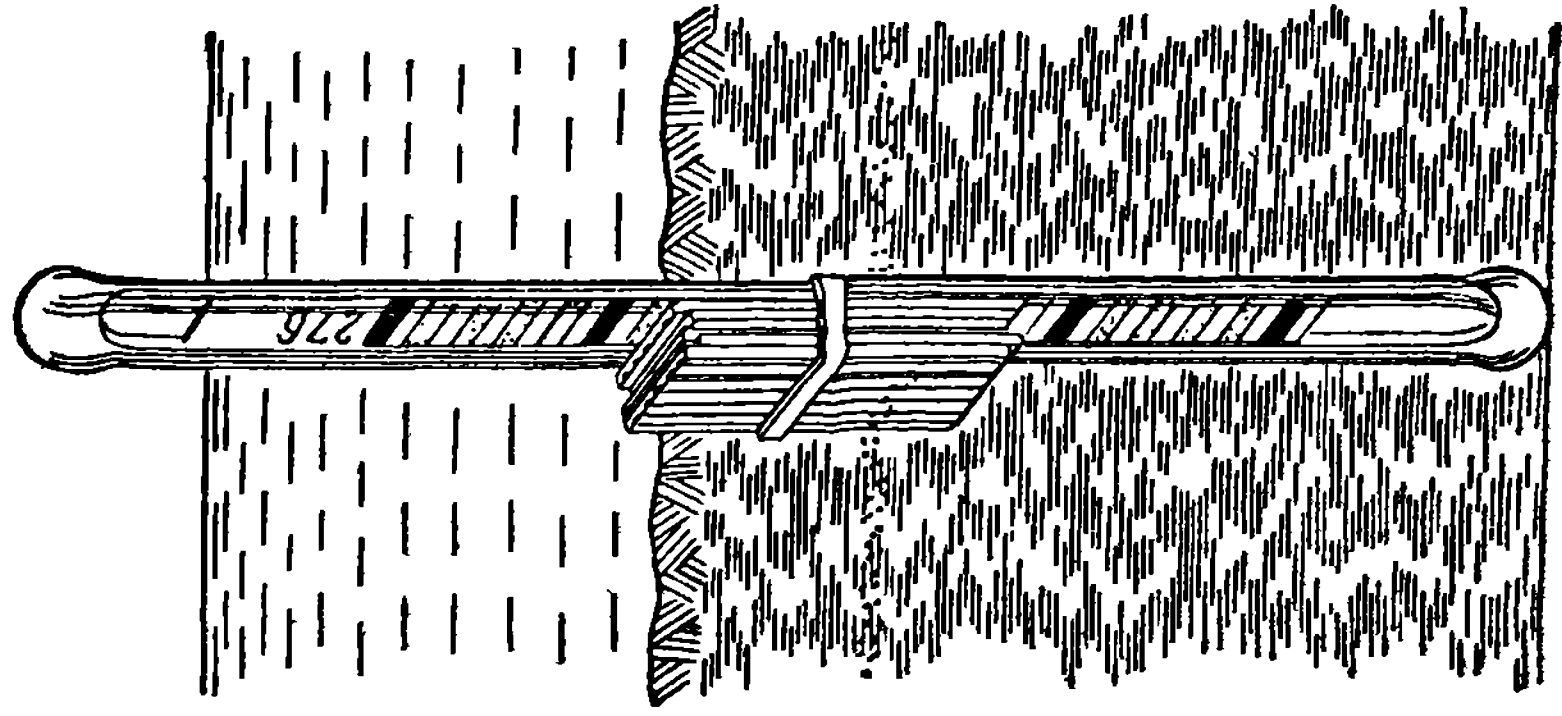


Рис. 6. Капиллярный пелоскоп: А — капиллярный пелоскоп в сосуде с илом (развитие в каналах капиллярных ячеек микрообращения соответствует их микрозональному распределению в иле); Б — набор капиллярных ячеек в поперечном сечении; В — капиллярные ячейки на предметном стекле; Г — капиллярные ячейки в защитном капилляре с фиксирующей жидкостью. (Из Перфильева и Габе, 1961).

микрофлоры. Пределы колебания от 2—3 дней до нескольких месяцев. Срок экспозиции капилляров устанавливается опытным путем.

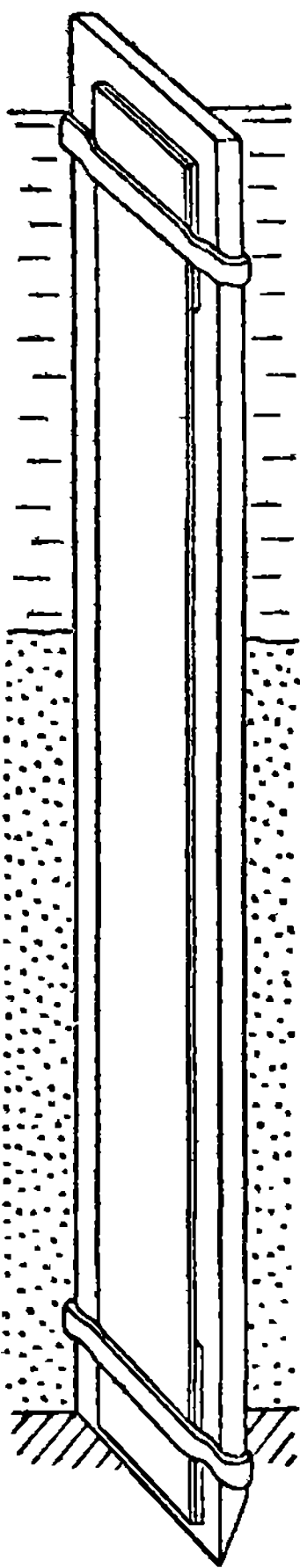


Рис. 7. Щелевой пелоскоп, состоящий из широкой стеклянной ленты и опорной стеклянной пластинки, соединенных резиновыми кольцами. (Из Перфильева и Габе, 1961).

5. Пелоскоп, вынутый из ила, осторожно обмывают снаружи водой из промывалки, пачку ячеек снимают с держателя и извлекают из резинового 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. 6, В).

6. После извлечения из ила пелоскопические капилляры необходимо немедленно микроскопировать или микрофотографировать, иначе сложившиеся в капиллярах микробные пейзажи сильно видоизменяются. Особенно сильные изменения происходят при их высушивании, при этом бактериальные микроколонии распадаются на отдельные клетки. Весьма типичные микрорейзажи из закономерно расположенных микроорганизмов меняются до неузнаваемости. Хорошо предохраняет от высыхания помещение пелоскопических капилляров в защитные «футлярные» капилляры значительно большего размера, но также допускающие при микроскопировании применение сильных систем. Футлярные капилляры (рис. 6, Г) представляют собой отрезки плоского капилляра с тонкой кровлей и одним широким щелевым каналом, форма и размеры просвета которого близки к габаритам пелоскопических ячеек.

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

8. При отсутствии пелоскопических капилляров близкие картины можно получить, применяя щелевой пелоскоп (рис. 7). Он представляет пару прямоугольных стеклянных пластин, соединенных между собой резиновыми колечками. Между ними имеется узкая щель, образовавшаяся благодаря двум тонким стеклянным прокладкам у верхнего и нижнего концов. Прокладки можно делать из осколков или тонких отрезанных полосок покровного

стекла. Одна из стеклянных пластин обязательно должна быть тонкой, примерно 0.16—0.17 мм. Вторая опорная стеклянная пластинка щелевого пелоскопа имеет длину 70—80 мм и ширину 15—17 мм. В случае плотных грунтов ее толщину делают 1.0—1.3 мм. Тонкая пластинка должна быть по ширине несколько уже толстой. Для скрепления пластин следует брать тонкостенную трубку из натурального 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.

2. ГЛАВНЕЙШИЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ БАКТЕРИЙ

а. Окраска бактерий на фиксированных препаратах

Общую структуру бактерий и других микроорганизмов лучше рассматривать на окрашенных препаратах. Процесс окраски заключается в том, что суспензию бактерий размазывают на чистом стекле, подсушивают на воздухе, фиксируют мазок, проводя его 2—3 раза через пламя, 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. Последнее необходимо прижать так, чтобы не осталось пузырьков воздуха и был удален избыток бальзама. Стекло оставляют в теплом месте для быстреего испарения растворителя бальзама.

Наиболее употребительными красками являются метиленовая синяя, кристалл violet, 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.

М е т и л е н о в а я с и н я я п о Л е ф л е р у:

Насыщенный спиртовой раствор метиленовой синей 30.0 мл
Раствор едкого калия (KOH) в дистиллированной воде
1 : 1000 100.0 мл

К а р б о л о в ы й ф у к с и н п о Ц и л ю:

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

Перед окраской бактерий раствор разводят в 10 раз дистиллированной водой.

О к р а с к а э р и т р о з и н о м с д о к р а с к о й ф у к с и н о м:

1) Эритровин 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) Кристалл виолет:
Насыщенный спиртовой раствор кристалл виолет или
генциан виолет 10.0 мл
Щавелевокислый аммоний, 1%-й водный раствор 40.0 мл
2) Люголевский раствор:
Йод 1.0 г
Йодистый калий (KI) 2.0 г
Дистиллированная вода 300.0 мл
3) Сафранин:
Насыщенный спиртовой раствор сафранина 10.0 мл
Дистиллированная вода 100.0 мл

Окраска служит для диагностических признаков, так как некоторые бактерии после окраски кристалл-виолетом или генциан-виолетом и обработки йодом легко обесцвечиваются спиртом, в 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. кристалл-виолетом и 1 мин. обрабатывают раствором

йода. Обесцвечивают окрашенный препарат 30 сек. 95%-м спиртом, 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 обесцвечиваются в спирту и окрашиваются сафранином в красный цвет.

б. 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°	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 для окраски кровяных телец:

Азур II	1 : 1000
Эозин ВА	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 ледяная	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.

в. 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 малахит-грюн 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.

г. Окраска жгутиков по методу Трибонто и Фишейт

Окраска жгутиков требует тщательной подготовки культуры и аккуратности в работе. Жгутики очень легко обламываются даже при лёгком 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 небольшую пробирку с 2 мл стерильной воды. Не взбалтывать, бактерии самостоятельно переходят в воду.

На чистое покровное 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° спиртом.

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

Готовят основной 20%-й раствор кристалл виолет на абсолютном спирту, который перед употреблением разводят абсолютным спиртом 1/200, 1/100, 1/50.

При окраске в небольшой фарфоровой чашечке смешивают 5 мл протравы и 0.5 мл краски и нагревают до кипения. 1 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 имерсией.

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 et German, 1961).

Часть IV

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР НЕКОТОРЫХ ВИДОВ АЗОТФИКСАТОРОВ И АВТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

Выделение чистых культур в ряде случаев представляет значительные затруднения, особенно когда основной вид имеет сопутствующие ему виды бактерий. Опыт показал, что наилучшие результаты дает излагаемый ниже метод, предложенный Хуттоном и Зобелом (Hutton a. Zobell, 1949). Сущность метода заключается в том, что испытуемый материал высевают на жидкую селективную среду и получают культуру накопления данного вида бактерий. Далее, из культуры накопления бактерий делают ряд последовательных разведений и производят высев на агаризованную селективную питательную среду. В том случае, если искомый вид бактерий хорошо растет на твердой питательной среде, то высев можно делать из ряда последовательных разведений испытуемого материала непосредственно на твердую питательную среду, минуя получение накопительной культуры. 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 делаются отсевы в пробирки с косым агаром, приготовленным на селективной питательной среде.

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

«Чистые» культуры высеваются на жидкую селективную питательную среду, и отбраковываются те культуры, которые не дали роста.

«Чистые» культуры, давшие рост на жидкой селективной среде, высеваются на МПА и другие среды для проверки чистоты куль-

туры по отсутствию роста. Затем вновь производится отбраковка таких культур, которые дали 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 чашки Петри на косую агаризованную среду в пробирках и вновь пересев на чашки Петри и т. д.

1. ВЫДЕЛЕНИЕ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В КРУГОВОРОТЕ АЗОТА

а. Выделение чистых культур аммонификаторов

Для выделения чистой культуры аммонификаторов производится высев испытуемого материала с разведением в чашки Петри на МПА. Чашки инкубируются при температуре около 20° в течение 10 дней и из отдельных колоний производится отсев в пробирки на косой МПА. Проверка чистоты культуры производится, как было указано выше; определение видового состава — по определителю Красильниковца или Берджа.

б. Выделение чистой культуры *Azotobacter*

Получение культуры накопления *Azotobacter*. Образцы воды или ила с разведением высевают на жидкую питательную среду для азотобактера № 32, 33 или 34 и инкубируют 10 дней при 20—25°. Из последнего разведения, где обнаружено развитие азотобактера, делают высев с разведениями на твердые среды Эшби с сахаром (№ 33) или Омелянского и Северовой (№ 32).

Выделение и проверка чистоты культуры. Выделение чистой культуры производится путем массового посева на косой агар Эшби из отдельных колоний и последующего контроля и отбраковки, как это было указано выше.

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

в. Выделение чистой культуры *Clostridium pasteurianum*

Выделение чистой культуры *Clostridium pasteurianum* представляет значительные затруднения при окончательной ее очистке от спутников, к которым относится *Bac. closterioides*. При освобождении от этого организма прекращался и рост *Clostridium*

pasteurianum (Емцов, 1959). Поэтому Емцов, разрабатывая методику выделения чистой культуры, получил положительные результаты лишь на среде, оптимальной для развития *C. pasteurianum*.

Получение культуры накопления. Безазотистую среду Виноградского № 37 засевают в колбах Эрленмайера 1 г почвы или другого исследуемого материала и инкубируют в термостате при 25—28°. После начала развития клостридий, 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 (№ 37), в которую добавлена смесь микроэлементов по Федорову, смотри среду № 34, и 0.1—0.2 мл дрожжевого автолизата (среда № 9) на 1 л среды и 0.2% агар-агара. Надежным способом, сохраняющим активность накопительных культур *C. pasteurianum* в течение длительного времени, являются 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 следующего состава: 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 (№ 37), 0.5% пептона, 4 мл дрожжевого автолизата и 1.5% агара. Чашки помещают в эксикатор, который после откачки воздуха заполняют газовой смесью из азота и углекислоты. Инкубируют в течение 2—4 суток при 24—25°. В случае отсутствия эксикатора 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 (среда № 37 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 Емцов (1959) рекомендует производить 3—5 раз. Выгоднее сразу сделать высев большого количества колоний на полужидкую среду и сразу же отбраковать грязные культуры, пользуясь визуальным наблюдением и контролем препаратов из культур под микроскопом.

Проверка чистоты культуры. Чистота культур проверяется при каждом пересеве посевом 0.5—1.0 мл на МПА

и МПБ высоким столбиком, МПБ — низким столбиком, МПБ + +0.2% агар-агара, на среды Кит-Тароцци, Вильсона-Блера (№ 41) и ван Дельдена для сульфатредуцирующих бактерий (№ 42). Отсутствие роста других бактерий указывает на чистоту культуры. Судить о чистоте полученной культуры можно только на основании результатов многократной проверки на мясо-пептонных средах.

Поддержание культуры следует вести путем пересевов 1 раз в месяц пастеризованного материала на вышеуказанную полужидкую среду.

г. Выделение чистой культуры нитрификаторов (*Nitrosomonas* и *Nitrobacter*)

Получение чистых культур нитрифицирующих бактерий 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* был предложен Е. Л. Рубан (1961). Аналогично можно выделять культуру *Nitrobacter* на питательной среде № 28.

Получение культуры накопления. Для получения культуры накопления нитрификаторов жидкую питательную среду Виноградского (№ 25 или среды №№ 26, 28) разводят в 10 раз и 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 нитритов и исчезновению аммиака или появлению нитрата. 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 № 25, разведенную в 10 раз, или на среду № 26. 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 незначительном количестве клеток в жидкости можно нанести 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 1 бактерия.

При помощи стерильной микропипетки наносят капли на стерильные осколки покровных стекол, лежащие в стерильной чашке Петри. Далее осколки стерильным пинцетом переносят в колбы Эрленмайера 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 длительных и многократных пересевов накопительных культур *Nitrosomonas* банальные формы загрязняющих микроорганизмов отсеиваются и в культурах устанавливается устойчивая ассоциация нитрификаторов и олигокарбофилов обычно из рода *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, МПБ, картофельном агаре, картофельной крошке — мелкоизмельченном стерильном картофеле, промытом содой, жидком сусле, сусло-агаре с мелом и без мела, крахмало-аммиачном агаре, среде Гетчинсона для целлюлозоразлагающих бактерий, среде Калиненко с лимоннокислым кальцием и агаре Эшби (Рубан, 1955).

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

Хранение культур. Чистые культуры нитрозомонас 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 тому подобного показали, что коренного улучшения роста чистой культуры таким образом достигнуть не удастся.

Для длительного сохранения чистых культур *Nitrosomonas* Е. Л. Рубан рекомендует хранить их на жидкой питательной среде № 25, 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 также, как и *Nitrosomonas*, но в качестве питательной среды используется среда № 28.

2. ВЫДЕЛЕНИЕ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В КРУГОВОРОТЕ СЕРЫ

а. Выделение чистой культуры *Vibrio desulfuricans*

Получение культуры накопления. Для выделения чистой культуры сульфатредуцирующих бактерий первоначально необходимо получить активную и быстрорастущую культуру накопления *Vibrio desulfuricans*. Для этого в несколько стерильных пробирок вносится по 1 мл посевного материала. В качестве последнего может служить ил или вода из сероводородных источников или озер, пластовые сероводородные воды нефтяных месторождений, речной ил и т. п. Пробирки с посевным материалом наполняют до пробки жидкой или агаризованной стерильной питательной средой Штурм (№ 43) для сульфатредуцирующих бактерий и закрывают стерильной резиновой пробкой так, чтобы под ней не оставалось пузырька воздуха.

Очистка культуры накопления. Из тех пробирок, где раньше других началось наиболее интенсивное восстановление сульфатов, производят посев на среду Сорокина № 44, не содержащую органических веществ. Культивирование производится в склянке с резиновой пробкой, в которую вставлен стеклянный кран или отводная трубочка. Питательной среды вносится $\frac{1}{5}$ объема. Из склянки откачивают насосом воздух до 40 мм ртутного столба и наполняют ее водородом из аппарата Кипа. Для наиболее полного удаления воздуха операцию повторяют 3 раза.

После 2—3 последовательных пересевов на минеральную среду в атмосфере водорода получается визуально чистая активная культура сульфатредуцирующих бактерий. Пересевы необходимо делать из молодой 1—2-недельной культуры.

Выделение чистой культуры. Из визуально чистой культуры *V. desulfuricans* делают от 1 до 6 разведений в пробирках с МПБ. К 1 мл каждого разведения добавляют 9 мл твердой среды Сорокина № 45. После тщательного перемешивания смесь засасывают в стерильные стеклянные трубки диаметром 3—5 мм. После застывания агара концы трубок запаивают менделеевской замазкой и инкубируют в термостате при 30°. Обычно

через 3—4 дня в них начинают появляться черные колонии сульфатредуцирующих бактерий.

Если накопительная культура была недостаточно очищена, то в трубках вырастают многочисленные колонии посторонних бактерий, а колонии сульфатредуцирующих бактерий не появляются вовсе.

Для выделения чистых культур *V. desulfuricans* необходимо брать трубки с посевами из наиболее высоких разведений, где еще наблюдается образование черных колоний сульфатредуцирующих бактерий. На трубке прямо против колонии делается надрез напильником, трубка протирается спиртом, обжигается и разламывается по разрезу. Из центра разрезанной колонии расплюснутым кончиком стерильной иглы берется едва заметный кусочек агара и переносится в пробирку с 1 мл бульона. Одновременно производится посев в пробирки из 10—15 отдельных колоний.

Зараженные пробирки заливаются питательной средой № 45 с добавлением 0.25% агар-агара вместо 2.5%, закрываются ватными пробками и инкубируют при 31°.

Через 2—4 дня начинается развитие сульфатредуцирующих бактерий и наблюдается сильное почернение питательной среды. Светлой остается лишь полоска агара шириной в 1—1.5 см в верхней части пробирки. В том случае, если высеваемая колония *V. desulfuricans* содержала посторонние бактерии, то в верхней светлой части пробирки появляются белые колонии, это дает возможность сразу отбраковывать загрязненные культуры.

Проверка чистоты культуры. После отбраковки загрязненных культур визуально чистые культуры из полужидкой среды высеваются по 1 мл в пробирки с МПБ и косым МПА. Те культуры, которые обнаруживают рост на косом агаре или дают через 24 часа сильную муть на МПБ, отбраковываются как загрязненные. Остальные культуры, которые не дают роста на МПА в аэробных условиях, а на бульоне дают слабую муть только через 2—3 дня, пересеваются вторично по 0.5 мл в пробирки с МПБ. При наличии посторонней микрофлоры при этом втором пересеве она легко обнаруживается.

Микроскопирование бульонных культур дает возможность сразу обнаружить посторонние микроорганизмы, так как сульфатвосстанавливающие бактерии дают при посеве на бульон очень характерные и легко отличимые формы в виде вибрионов и спиралл длиной до 200 μ .

После вышеописанной проверки культуры высеваются на чашки с МПА и на среду без сульфатов следующего состава: K_2HPO_4 — 0.5 г, NH_4Cl — 1 г, молочнокислый кальций — 2 г, глюкоза — 3 г, бульон — 200 мл, водопроводная вода — до 1 л, pH=7.1.

Среда сразу же после стерилизации наливается в пробирки почти доверху и заражается 1 мл проверяемой культуры.

При наличии анаэробных метанобразующих бактерий происходит разрыв среды с образованием пузырьков газа.

Отсутствие роста на МПА в аэробных условиях и на вышеуказанной среде указывает на чистоту культуры *V. desulfuricans*.

б. Выделение чистой культуры *Thiobacillus thioaragus*

Получение культуры накопления. Накопительная культура *Thiobacillus thioaragus* получается путем заражения среды Бейеринка для тионовых бактерий (№ 53) небольшим количеством ила или воды из евтотрофных или сероводородных озер и т. п. 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 среду того же состава с добавкой 1.5% агар-агара. Через 3—5 дней на агаровых пластинках появляются мелкие колонии 1—1.5 мм в диаметре, белые от выпавшей серы. Из выросших на твердой среде колоний производят массовый отсев в количестве 80—100 штук в пробирки со скошенным агаром. Когда через несколько дней в пробирках появляется рост по штриху, то в каждую пробирку вносят 2—3 мл стерильной жидкой питательной среды того же состава. Появление пленки серы на поверхности жидкости в пробирках указывает на хороший рост *Th. thioaragus*. 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 производится высев на следующие среды: МПА, МПБ, МПБ с глюкозой, сусло с мелом, сусло-агар, картофельный агар, картофельная крошка, ломтики картофеля, среда Виноградского для нитрификаторов (№ 25, 26), среда Ваксмана для *Th. thiooxidans* (№ 56), среда Баалсруда для *Th. denitrificans* (№ 52), среда Бейеринка (№ 53), но без гипосульфита с добавкой 1% различных органических соединений как глюкоза, лактат кальция, щавелевокислый, уксуснокислый или муравьинокислый натрий. В случае чистой культуры *Th. thioaragus* рост на этих средах отсутствует. При высева 100 колоний с агаровых пластинок на косяки по вышеуказанному методу удается сразу получить 2—3 активные чистые культуры *Th.*

thioparus. Чистую культуру следует поддерживать на жидкой питательной среде, причем нужно делать пересевы не позднее чем через 7—10 дней 3—5 мл инокулята. При таких условиях культивирования *Th. thioparus* не теряет своей активности.

в. Выделение чистой культуры *Thiobacillus thiooxidans*

Получение культуры накопления. Для получения культуры накопления жидкая питательная среда Ваксмана с серой (№ 56, А) заражается образцами воды или ила из сероводородных озер, окисленной серной руды или другим материалом, где предполагается наличие данного организма, и инкубируется при 25—28°. Через 7—10 дней в среде появляется легкая муть, а микроскопический контроль показывает наличие значительного количества тионовых 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, производят посев на твердую среду Ваксмана с гипосульфитом (№ 58). 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 пересев в 50—100 пробирок на жидкую среду Ваксмана с серой (№ 56). Начало развития определяют по снижению реакции среды до $\text{pH}=1.0-2.0$, по легкому помутнению среды и путем микроскопии, по наличию бактерий в мазке.

Одновременно производят отбраковку загрязненных культур путем высева на МПА, картофельный агар и сусло-агар, так как именно на этих средах хорошо растут сопутствующие микроорганизмы.

Проверка чистоты культуры. Окончательная проверка чистоты культуры производится путем микроскопического контроля и высева на ряд сред: МПА, МПБ, МПБ с глюкозой, сусло с мелом, сусло-агар, картофельная крошка, среда Виноградского для нитрификаторов, среда Бейеринка для *Th. thioparus*, среда Баалсруда для *Th. denitrificans* и среда Бейеринка без гипосульфита, но с добавкой 1% глюкозы, или молочнокислого кальция, или натриевых солей щавелевой, уксусной или муравьиной кислоты. Отсутствие роста на этих средах указывает на чистоту культуры.

Чистая культура поддерживается на жидкой среде Ваксмана. Пересевы следует делать из молодой культуры большим количеством посевного материала не реже чем через 2—3 недели.

г. Выделение чистой культуры *Thiobacillus ferrooxidans*

Получение культуры накопления. Культура накопления *Th. ferrooxidans* получается путем заражения питательной среды Летена (№ 59) железистыми осадками или кислыми водами из угольных шахт или месторождений полиметаллических сульфидных руд. Начало развития определяют по появлению в питательной среде осадка гидрата окиси железа.

Из обогащенной культуры, полученной путем нескольких последовательных пересевов одним 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, производят отсев в небольшие объемы, 4—6 мл, жидкой питательной среды Летена. Удобнее всего эти массовые посевы выращивать в баночках из-под пенициллина объемом в 10 мл. Появление желтого осадка и подкисление питательной среды указывает на начало развития.

Через неделю из тех склянок, где началось развитие, производят пересев большим объемом жидкости в колбы Эрленмайера с 50 мл среды Летена и одновременно ведут проверку чистоты культуры посевом на МПА, сусло- и крахмало-аммиачный агар, так как культуры чаще всего бывают загрязнены плесневыми грибами.

Проверка чистоты культуры. После предварительной отбраковки производится окончательная проверка жидких культур, развившихся в колбах Эрленмайера путем высева на следующие питательные среды: МПА, МПБ, среда Виноградского для нитрификаторов (№ 25), среда Эшби (№ 33), картофельный агар, крахмало-аммиачный агар, картофельная крошка, сусло, сусло-агар, среда Гетчинсона для аэробных клетчаткуразрушающих бактерий и среда Летена (№ 59) без соли Мора, но с добавкой 1% глюкозы или солей органических кислот. По отсутствию роста на этих средах судят о чистоте культуры *Th. ferrooxidans*.

д. Методы культивирования серобактерий

Бесцветные серобактерии. Для бесцветных серобактерий элективных сред практически не существует. Их почти никто не выделял в чистой культуре; обычно культуры накопления получают методом, который был описан еще Виноградским. Теоретически элективной средой для них должна быть среда, содержащая свободную углекислоту и сероводород, находящаяся в аэробных или микроаэрофильных условиях. Но на практике такие условия создать трудно, так как при нейтральной реакции углекислота вытесняет сероводород из раствора.

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

Для получения культуры накопления нитчатых или одноклеточных бесцветных серобактерий в стеклянный цилиндр (рис. 8) наливают 3—5 см слой агар-агар с добавкой 1.0 г на 1 л $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, который был подкислен до $\text{pH}=6.0$. После того как агар-агар застынет, сверху наливают жидкую питательную среду Бавендама (№ 48) слоем около 10 см.

Бавендам рекомендует получать культуру накопления серобактерий на жидкой среде (№ 48) в атмосфере, состоящей из воздуха, водорода и сероводорода (1 : 28 : 1) (рис. 2 на стр. 28).

Пурпурные серобактерии. Окрашенные серобактерии являются фотосинтезирующими организмами, развиваются только на свету и в качестве донаторов водорода используют сероводород, сульфиды и водород. Для получения накопительных культур можно с успехом применять опыт культивирования пурпурных серобактерий путем совместного их выращивания с сульфатредуцирующими бактериями (Гинсбург-Карагичева, 1932; Штурм и Орлова, 1954).

Расплавленная агаризованная среда ван Дельдена (№ 42) или Штурм (№ 43), с уменьшенным до следов количеством соли

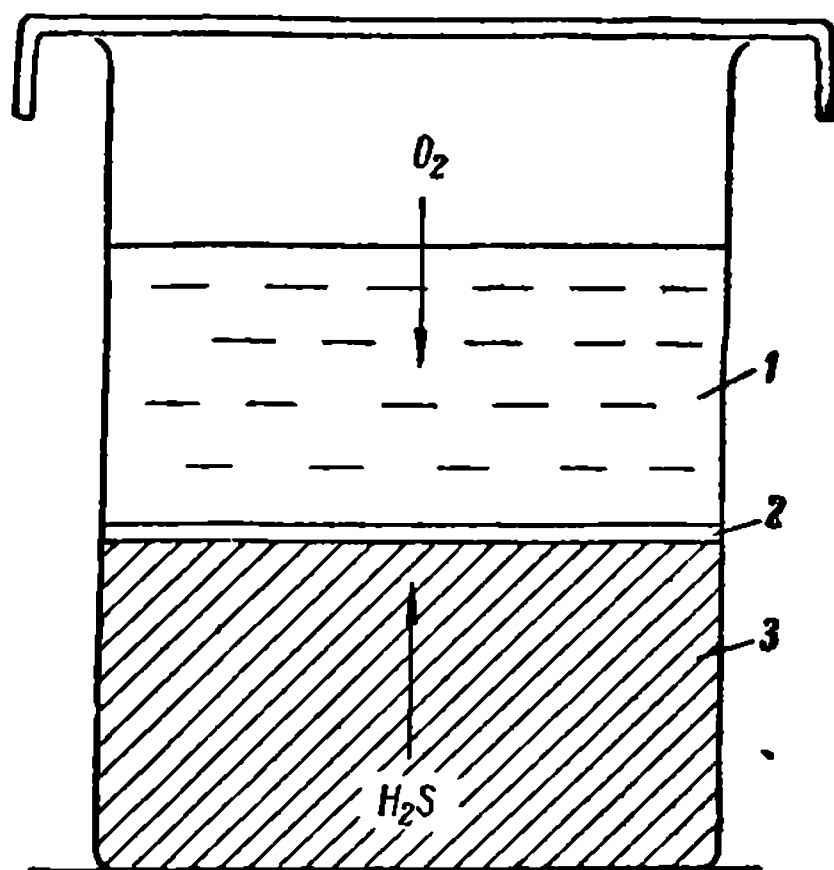


Рис. 8. Схема опыта по культивированию бесцветных серобактерий.

1 — среда Бавендама; 2 — слой, где идет развитие серобактерий; 3 — агар-агар с добавкой сернистого натрия.

Мора, заражается активной культурой накопления сульфатредуцирующих бактерий и разливается до $\frac{2}{3}$ высоты в стерильные пробирки.

Культуры помещают в термостат при 30—35° и выдерживают до момента хорошего развития и обильного образования сероводорода. Далее эту же пробирку доверху заполняют озерной водой или расплавленной агаризированной (0.5% агара) средой Бавендама (№ 48). Пробирки хорошо встряхивают, чтобы мел распределился по всей среде, заражают испытуемым материалом или культурой пурпурных серобактерий. Затем пробирки закрывают корковыми пробками, охлаждают под струей холодной воды и выставляют на окно, выходящее на север или северо-восток. Уже через четыре-пять дней отмечается развитие пурпурных или зеленых серобактерий. В случае жидкой среды пурпурные бактерии вначале развиваются в виде сплошной розовой пленки, которая в дальнейшем спускается вглубь между агаром и стеклом пробирки, а жидкая среда теряет свою окраску.

Дальнейшие пересевы делают на среду ван Нила (№ 46) или среду Постгейта (№ 47) в склянки из белого стекла, залитые до самой пробки, и инкубируют на свету при 30°.

Пурпурные бактерии, как это указывают Постгейт (Postgate, 1959) и другие авторы, способны к фотогетеротрофной ассимиляции и их рост ускоряется при добавлении 0.1% дрожжевого экстракта или яблочнокислого натрия. В качестве донатора водорода они могут использовать тиосульфат, но предпочтительнее употреблять сульфид, так как в этом случае исключается возможность развития несерных пурпурных бактерий.

Зеленые серобактерии. Из зеленых серобактерий *Chlorobium limicola* растет только на средах с сульфидами. Наилучший рост наблюдается, если питательная среда была приготовлена накануне заражения и сохранялась в течение ночи в холодильнике в заполненных до пробки склянках. Тотчас же после заражения на каждые 10 мл среды вносят добавочно 1 каплю 10%-го раствора $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$.

Ch. thiosulphatophilum использует также тиосульфат, и этим и отличается питательная среда, предназначенная для этого организма.

Очень важно при начале развития проверить культуру под микроскопом, так как некоторые синезеленые водоросли хорошо развиваются на средах для хлоробиум.

3. 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, заполненную питательной средой, опускается небольшая перевернутая пробирка, которую заполняют водородом или соответствующей смесью газов, среду заражают испытуемым материалом и пробирку затыкают фламбированной резиновой пробкой (рис. 10).

Процедура постановки опыта заключается в следующем.

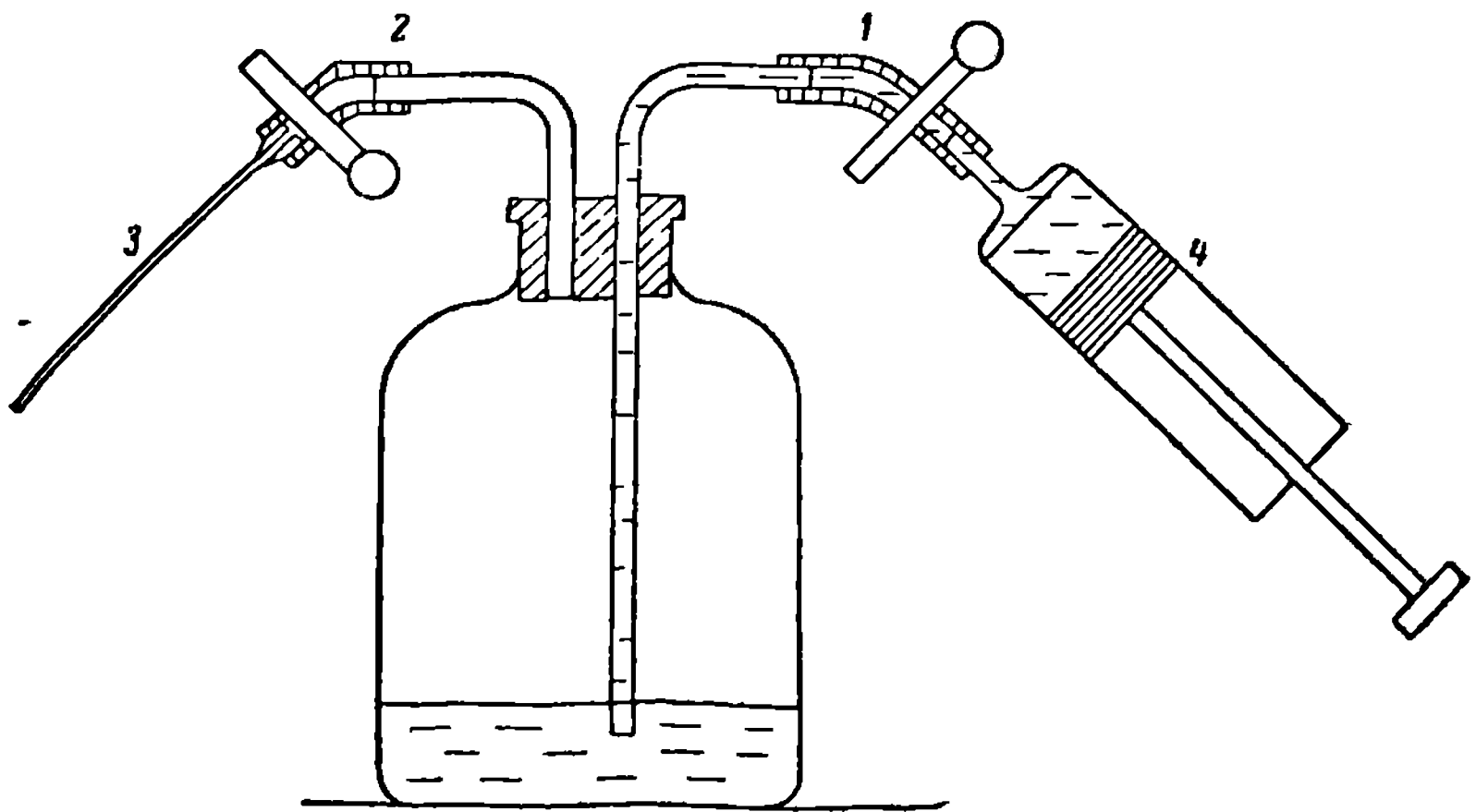


Рис. 9. Микрогазометр для наполнения пробирок газом:

1 — длинная трубка с зажимом Мора; 2 — короткая стеклянная трубка с зажимом Мора; 3 — игла от подкожного шприца; 4 — подкожный шприц.

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 клочок бумаги удаляют. Операцию эту надо произвести таким образом, чтобы в перевернутую пробирку не попало пузырька 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 следующего устройства.

В склянку объемом в 150—200 мл вставляют резиновую пробку с двумя стеклянными трубками. Трубка 1, как видно на рис. 9, доходит до дна склянки, а вторая (2) короткая, оканчивается в уровень с пробкой. На наружные концы трубок надевают каучуковые трубки с моровскими зажимами.

Склянку заполняют водой так, чтобы под пробкой не осталось пузырька воздуха и обе стеклянные трубки также были заполнены водой. Затем открывают зажимы и через трубку 2 наполняют

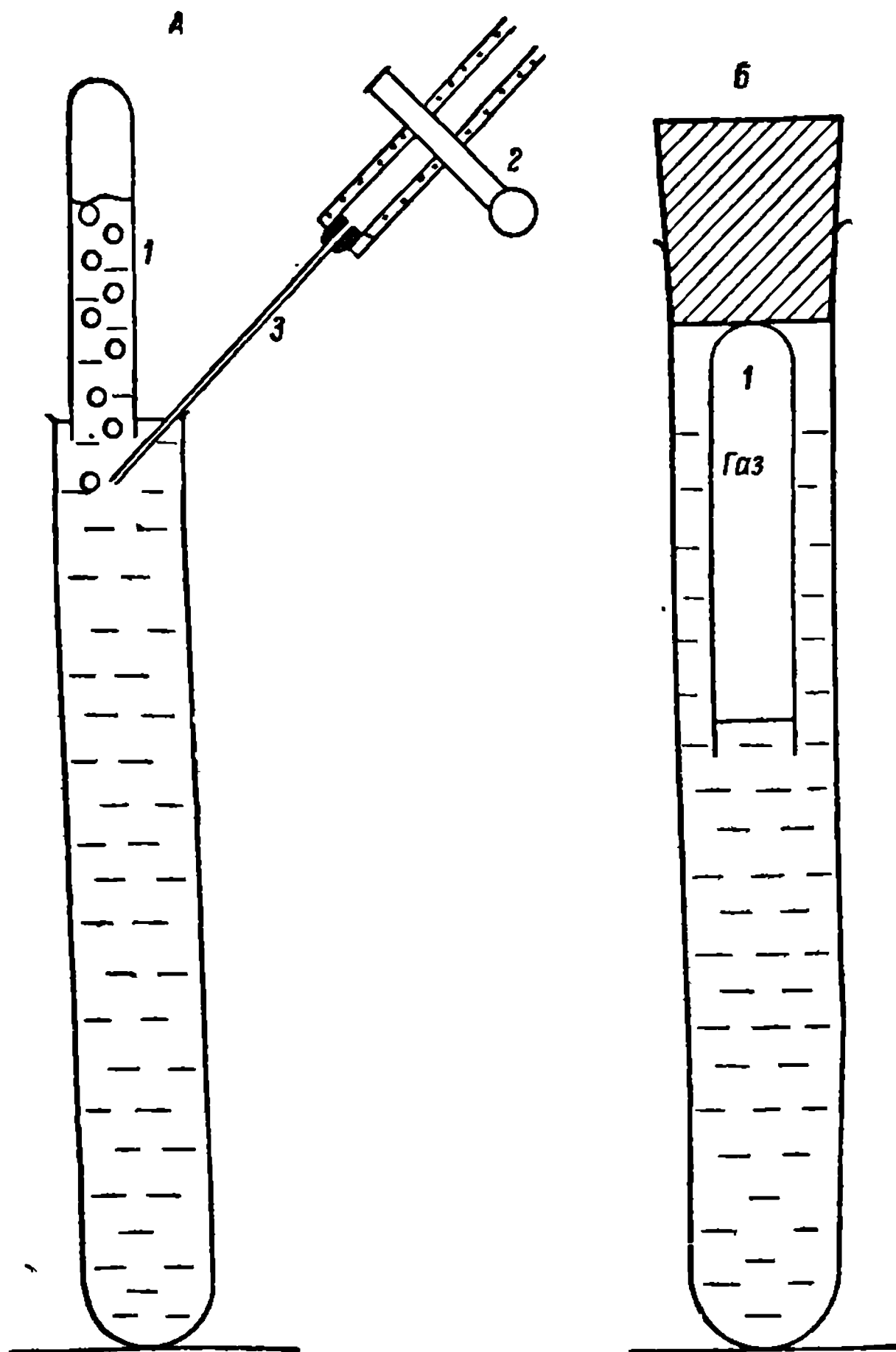


Рис. 10. Постановка микроопыта по культивированию бактерий в искусственной газовой атмосфере:

А — заполнение опрокинутой пробирки газом; Б — схема постановки опыта.
1 — опрокинутая пробирка (поплавок); 2 — зажим микрогазо-метра; 3 — игла шприца.

склянку газовой смесью. При этом вытесняемая вода вытекает из склянки через трубку 1. Когда $\frac{4}{5}$ объема склянки будет заполнено газом, оба зажима закрывают и газометр готов к употреблению.

Для введения газа из газометра в маленькую пробирку в каучукую трубку 2 вставляют иглу от подкожного шприца 3, а к трубке 1 присоединяют наполненный водой шприц 4 объемом в 10 мл. Поршнем воду из шприца вводят в склянку и зажим на трубке 1 закрывают. При этом газ в склянке оказывается под небольшим повышенным давлением. Иглу 3 шприца подводят под открытый конец маленькой пробирки, как показано на рис. 10, 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 пузырька воздуха (рис. 10, Б). Пробку привязывают к пробирке и стерилизуют текучим паром.

4. При учете бактерий, окисляющих углеводороды, резиновую пробку открывают, асептически выливают 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 также вносят в количестве 0,1—1 мл, но перед посевом в пробирки добавляют $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ из расчета 10 мг H_2S на 1 л и $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ из расчета 1 г на 1 л. Пробирку вновь затыкают так, чтобы под резиновой пробкой не осталось пузырька 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.

4. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЖЕЛЕЗОБАКТЕРИЙ В КОНВЕКЦИОННОЙ ПРОТОЧНОЙ УСТАНОВКЕ ПО ПЕРФИЛЬЕВУ

Культивирование автотрофных 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 Габе, 1961) предложил использовать для культивирования *Gallionella* конвекционную проточную установку. Принцип устройства этого прибора заключается в том, что основная масса питательного субстрата, содержащего закисное двууглекислое железо, находится в анаэробных условиях. Развитие же железобактерий происходит в небольшой

микрокювете и только у самой поверхности воды, не проникая в бутылку питающей системы.

В опытах Б. В. Перфильева вода в бутылки, несмотря на содержание закисного железа до 25 мг/л, оставалась в течение нескольких недель прозрачной, т. е. закисное железо не окислялось.

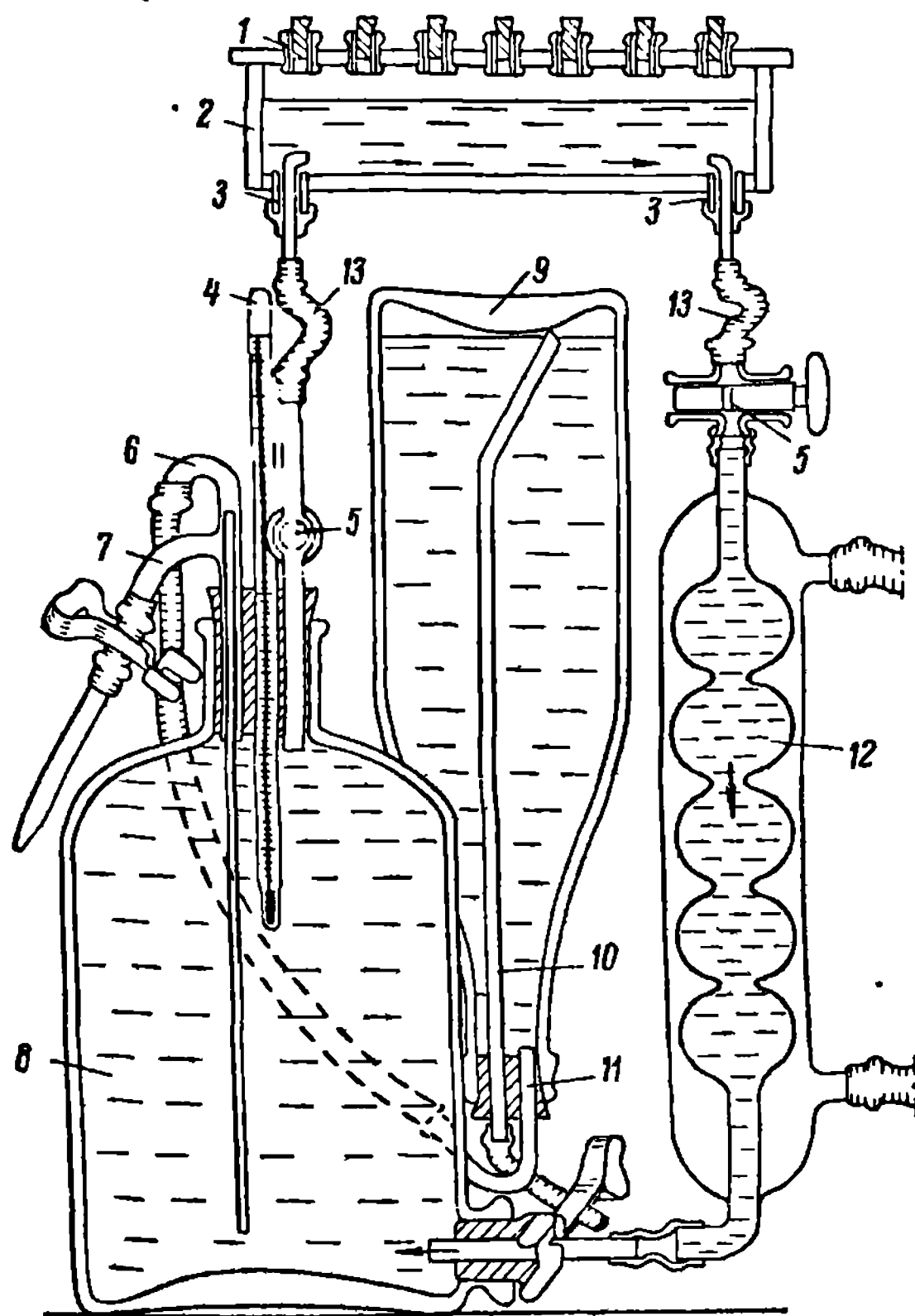


Рис. 11. Конвекционная проточная установка по Перфильеву.

1, 2 и 3 — вертикально-щелевая проточная камера, связанная трубками (13) и кранами (5) с питающим сосудом (8) и холодильником (12); 4 — термометр; 6, 7 — тройник для взятия проб субстрата; 9, 10, 11 — бутылки с дополнительным субстратом.

Очевидно, кислород, поступающий из воздуха в кювету, весь перехватывался пленкой из *Gallionella* и не проникал в сосуд питающей системы.

Конвекционная проточная установка представлена на рис. 11. Питающая система, заполняемая жидким субстратом, состоит из трех элементов: из 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 целевой стеклянной или пластмассовой проточной камере (2). Стеклянная камера делается шириной 2—3 мм при длине 200 мм и высоте 30—50 мм. Ширина пластмассовой камеры может быть увеличена до 1 см, что облегчает ее конструкцию из оргстекла. Крышка камеры делается из оргстекла и имеет 2—3 отверстия диаметром 7—8 мм. Дно камеры имеет два отверстия (3), в которые через резиновую муфту вставляют выдвигающиеся стеклянные трубочки.

Одна из них каучуком (13) соединяется через вертикальную стеклянную трубку с краном (5), 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, 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 будет разность температуры субстрата и водопроводной воды в холодильнике, тем быстрее будет 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 понадал 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, или субстрат, пользуясь подкожным шприцем. Под давлением нагнетаемого газа жидкость из вспомогательной бутылки через выводную трубку (11) перетекает по верхнему отрогу тройника (6) в основную тубулярную склянку и вытесняет через нижний отрог тройника (7) соответствующее количество измененного субстрата.

Благодаря узкой длинной трубке, вставленной в тройник на каучуковой муфточке, в этом тройниковом устройстве не могут 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 (№ 60) с добавкой свежеосажденного углекислого железа при насыщении углекислотой.

Часть V

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 сильно связана со специфическими особенностями различных сезонов года. Наиболее сильно характерные особенности микробиологических процессов для различных типов водоемов бывают выражены в период летней стагнации. Вследствие этого при сравнительном изучении ряда водоемов путем одноразовых исследований работы эти следует проводить в июле или августе.

При этом намечается следующая схема анализов.

1. Вертикальное распределение температуры, кислорода, углекислоты, сероводорода, сульфатов, хлоридов, ионов кальция или жесткости воды.
2. Анализ величины первичной продукции и деструкции органического вещества.
3. Анализ сапрофитов, общего количества бактерий и времени их генерации.
4. Определение величины хемосинтеза в воде и поверхностных слоях ила.
5. Изучение распределения водород- и метанооксиляющих 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: а) учет сульфатредуцирующих и тионовых бактерий; б) определение интенсивности процессов редукции сульфатов и окисления сероводорода путем применения радиоизотопа серы S^{35} .
8. Учет нитрификационной способности воды, количественный учет азотобактера в воде, поверхностном слое ила и в обрастаниях водной растительности. Учет *Clostridium pasteurianum* и денитрификаторов в воде и поверхностном слое ила.

Методические указания по отбору проб воды и ила и по методам анализа можно найти у Омелянского (1923а), Родиной (1950), Кузнецова (1952а), Кюстера (Küster, 1921), Федорова (1957)

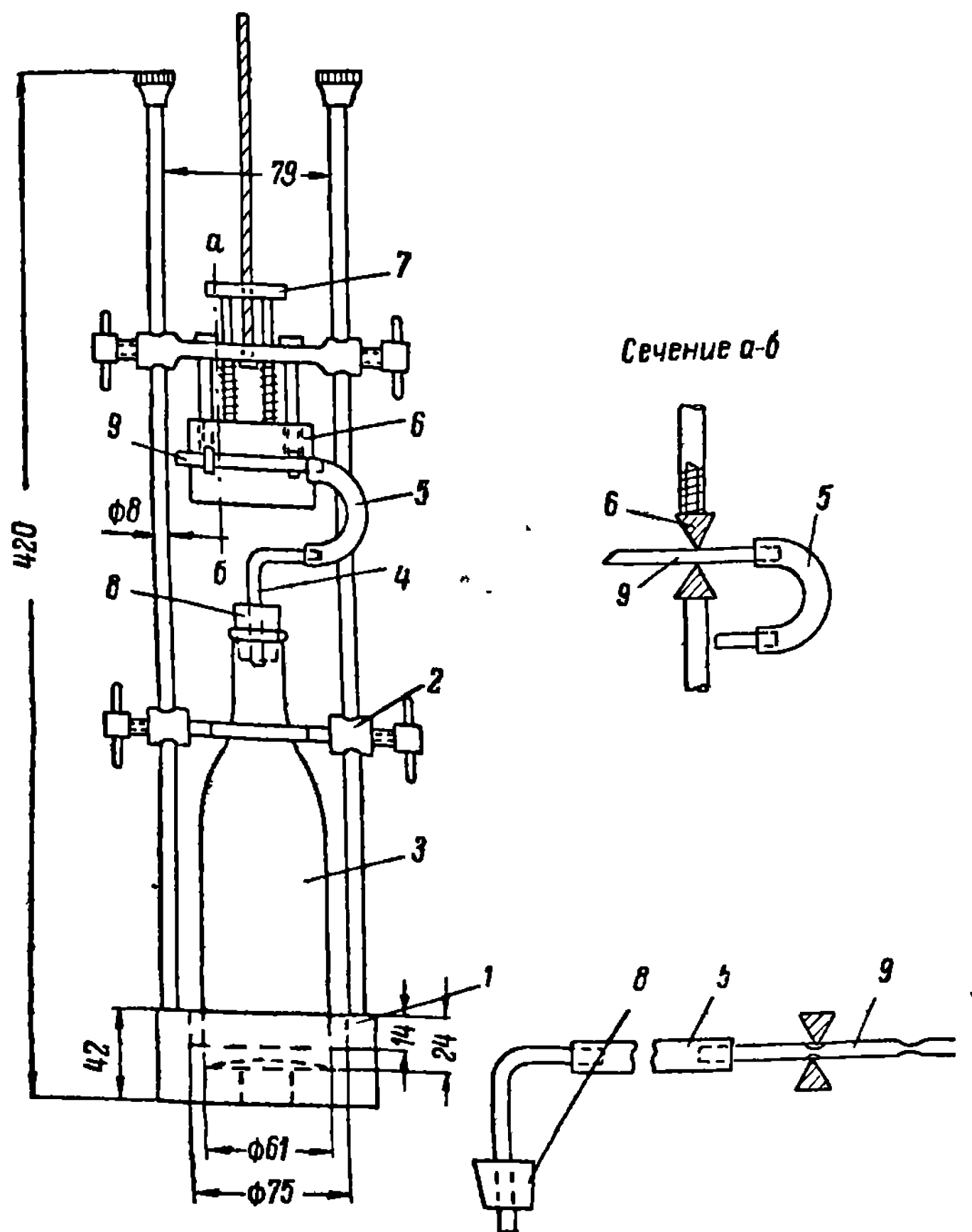


Рис. 12. Схема батометра для стерильного отбора проб воды.

1 — гнездо утяжеленной рамы батометра; 2 — зажим для закрепления стерильного сосуда для отбора проб воды; 3 — эвакуированная стерильная бутылка емкостью 0.25—0.5 л; 4 — стеклянная трубка; 5 — резиновая толстостенная трубка; 6 — вателка с острыми гранями; 7 — пластинка, о которую ударяется посыльный груз; 8 — запасные резиновые пробки со стеклянными трубками; 9 — стеклянные наконечники, которые равбиваются при отборе проб воды. Размеры даны в мм.

и ряда других авторов. Здесь мы приводим те методы из предусмотренных в вышеизложенной схеме анализов, которые описаны лишь в периодической печати.

1. БАТОМЕТР ДЛЯ ОТБОРА ПРОБ ВОДЫ НА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Пробы воды для бактериологического анализа необходимо отбирать непосредственно из водоема в стерильную посуду. Для глубин, не превышающих 10 м, удобнее всего использовать «бутылку Мейера», усовершенствованную Францевым и описанную С. И. Кузнецовым (1952а) как «батометр Францева». С больших глубин успешно применяется для стерильного отбора проб воды из водохранилища батометр, конструкция которого была разработана Ю. И. Сорокиным (1960в) и приводится на рис. 12. В гнезде утяжеленной рамы (1) с помощью зажима (2) укрепляется стерильная бутылка (3) емкостью 0.25 или 0.5 л, из которой предварительно был откачан воздух, закрытая резиновой пробкой. Через пробку проходит изогнутая стеклянная стерильная трубка (4), на конец которой надета резиновая толстостенная трубка (5) длиной 10—15 см и внешним диаметром 0.8 см, закупоренная стеклянным наконечником (9) с запаянным концом. Стеклянный наконечник зажимается в защелку (6) с острыми гранями, соединенную с пластинкой (7), о которую ударяется посыльный груз.

Батометр опускают на нужную глубину, после чего посылают посыльный груз, разбивающий стеклянный наконечник. Трубка (5) при этом распрямляется, и через нее с некоторого расстояния от батометра в него набирается вода.

При длительных экспедициях на водохранилище для работы с помощью описываемого батометра берут с собой бутылки, закрытые ватными пробками и простерилизованные сухим жаром. Отдельно в бумажных пакетах стерилизуются в автоклаве резиновые пробки (8), снаряженные, как показано на рисунке. Перед отбором проб ватные пробки в бутылках заменяют резиновыми. Через трубки с помощью ручного вакуумного насоса Комовского из бутылок откачивают воздух. Стеклянные наконечники (9), надетые на трубки, запаивают на пламени спиртовки. В таком виде бутылки готовы к употреблению.

При небольших экспедиционных обследованиях целесообразно откачивать воздух из стерильных бутылок в лаборатории. Перед началом работы батометр рекомендуется протереть ватой, смоченной в спирте.

2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ ОКУЛЯРНОГО СЕТЧАТОГО МИКРОМЕТРА

При учете общего числа бактерий методом А. С. Разумова производится подсчет количества бактерий на определенной площади препарата. Для этого необходимо иметь окулярный сетчатый микрометр, который помещают на диафрагму окуляра микроскопа. Диафрагма в окуляре может быть сдвинута выше

или ниже. Ее следует поставить так, чтобы при ввинченной верхней линзе деления сетчатого микрометра были четко видны.

Окулярный сетчатый микрометр можно приготовить фотографическим путем. С этой целью на листе белой бумаги вычерчивают тушью сетку, состоящую из 25 квадратов, согласно прилагаемому рисунку (рис. 13).

Сторона каждого маленького квадратика должна равняться 1 см. Затем между корпусом и объективом зеркального фотоаппарата ввинчивают добавочное кольцо и производят фотосъемку сетки на киноплёнку так, чтобы на негативе сторона всего большего квадрата равнялась приблизительно 5 мм. Негатив следует

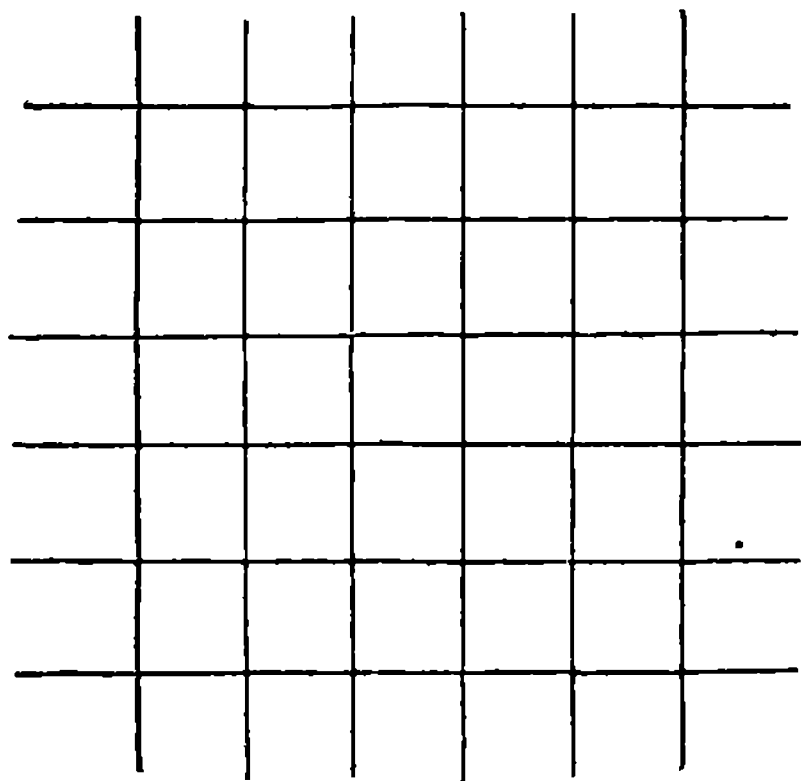


Рис. 13. Сетка для изготовления окулярного микрометра.

готовить с максимальным контрастом. Для этого снимать рекомендуется на диапозитивную пленку и проявлять контрастным проявителем.

Затем с негатива делают контактный отпечаток на полоски шириной в 14 мм, вырезанные из диапозитивной пластинки, или на диапозитивную пленку и проявляют контрастным проявителем.

Отпечатки следует делать контрастными так, чтобы сетка была видна в виде тонких серых или черных линий, хорошо заметных в лупу, на белом фоне.

Для того чтобы пленка не коробилась после сушки, на нее можно наклеить канадским бальзамом круглое или квадратное стекло, соответствующее по своим размерам диаметру окуляра.

Прежде чем обрезать лишние края пленки, необходимо выждать, чтобы канадский бальзам окончательно затвердел, иначе под стекло попадут пузырьки воздуха и сетка придет в негодность.

Если отпечатки сделаны на полосках из диапозитивных пластинок, то из них вырезают квадратики с шириной стороны в 14 мм, канадским бальзамом на эмульсионную сторону наклеивают покровное стекло и после того как бальзам окончательно застынет уголки квадратика стачивают на наждачном камне так, чтобы сетка легко входила в окуляр микроскопа и ложилась на его диафрагму.

Если нет зеркального аппарата, то пересъемку сетки можно делать на киноплёнку и обычным фотоаппаратом, но в этом случае размер сетки, вычерченной на бумаге, должен быть больше, так как указанные аппараты дают возможность делать резкую

наводку на фокус лишь с большего расстояния. Величина стороны сетки на негативе должна быть, как уже указывалось, около 5 мм.

3. МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ ПОДСЧЕТ БАКТЕРИЙ

а. Подсчет бактерий в воде

«Прямой метод» состоит в прямом 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 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), Б. В. Перфильевым и Д. Р. Габе (1961), Д. Р. Габе (1957), С. И. Кузнецовым и Г. С. Карзинкиным (1930) и др. Ниже мы приводим модификацию, разработанную в 1932 г. А. С. Разумовым (1947; Разумов и Корш, 1960).

1. Пробы воды отбираются батометром и выливаются в стерильную, чисто вымытую посуду. В случае транспорта проб, их следует фиксировать формалином (0.1—1 мл на 100 мл воды).

2. Взятый для анализа объем воды пропускают через мембранный фильтр № 1—3, помещенный в воронку Зейтца. Наиболее пригодны воронки с внутренним диаметром в 11.3 мм, так как тогда площадь фильтра равна 1 см².

Фильтры предварительно кипятят в дистиллированной воде, которая сменяется несколько раз.

Из приемного сосуда аппарата отсасывают воздух. Внесенная в воронку вода профильтровывается до конца. После фильтрования фильтр сушат на воздухе. На полях его делают тушью отметку с указанием номера или даты и профильтрованного объема воды.

3. Весь фильтр или его часть окрашивают карболовым эритрозин (3%-й эритрозин в 5%-й карболовой воде). Фильтр красится 3—4 часа или его оставляют в краске на ночь. Продолжительность окраски зависит от качества краски. Окраску производят так: в чашку Петри помещают кружок фильтровальной бумаги и увлажняют краской. На смоченную краской бумагу нижней стороной кладут фильтры с осевшими на них взвесями и закрывают крышкой.

По окончании окрашивания краску отмывают, перекладывая фильтры в чашки Петри с фильтровальной бумагой, обильно

смоченной дистиллированной водой. Перекладывание фильтров из одной чашки в другую продолжают до тех пор, пока фильтр перестанет окрашивать влажную фильтровальную бумагу.

После отмывания фильтр высушивают на воздухе при комнатной температуре. Площадь фильтра, задержавшая взвеси, остается розовой а края фильтра — почти бесцветными.

4. Для подсчета микроорганизмов готовится микроскопический препарат. С этой целью на предметное стекло наносят каплю канадского бальзама или иммерсионного масла. На него накладывают окрашенный мембранный фильтр так, чтобы бактериальная взвесь была сверху. Поверх него наносят еще каплю бальзама или иммерсионного масла, покрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом с иммерсионным объективом с увеличением 90, при окуляре с сетчатым микрометром с увеличением 10.

5. Расчет бактерий в 1 мл производится по формуле $x = \frac{e \cdot 10^6 \cdot d}{a \cdot ж \cdot z}$ клеток бактерий в 1 мл, где x — количество бактерий в 1 мл воды, e — площадь фильтра, в мм^2 , 10^6 — переводной коэффициент мм^2 в μ^2 ; a — просчитываемая площадь окулярного сетчатого микрометра в μ^2 , измеренная при том же увеличении; z — число полей зрения, в которых просчитывались бактерии, d — сумма подсчитанных бактерий в z полях зрения, $ж$ — объем профильтрованной воды, в мл.

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 этого коэффициента сильно упрощает все вычисления результатов анализов.

Подсчитывать следует 20 полей зрения так, чтобы в просчитываемой сетке, состоящей из 25 маленьких квадратиков, было не меньше 50 микробов. Снижение числа просчитываемых полей зрения до 10, как показала М. И. Новожилова (1959), увеличивает вероятную ошибку до 10%.

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

В табл. 4 даны ориентировочные объемы воды, которые следует профильтровывать при анализе воды различных водоемов.

Продажные мембранные фильтры могут быть сильно загрязнены бактериями (Рукина и 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 заме-

Потребные для анализа объемы воды в миллилитрах

Тип водоемисточника	Диаметр фильтрующей площади воронки Зейтца	
	2.5 см	1.3 см
Артезианские воды, ключи, родники	50—100	10—20
Чистые районы рек, озер и водохранилищ . .	10—20	1—5
Загрязненные водоемы	0.1—1	0.001—1

нить более чистыми, то нужно фильтровать такое количество воды, чтобы число бактерий на просчитываемой площади было раз в 10 больше, чем на контрольном фильтре (Разумов, 1952; Кузнецов, 1952б).

6. Подсчет бактерий в иловых отложениях

Для учета бактерий в иловых озерных отложениях и грунтах водохранилищ с успехом применяется метод микроскопического анализа численности бактерий в почвах. Впервые он был предложен С. Н. Виноградским в 1924 г. В дальнейшем целый ряд авторов вносил в эту методику свои изменения. Наиболее полный учет бактерий в почвах и иловых отложениях может быть произведен методом Германова в модификации А. Н. Наумовой (1933).

1. Производится качественная реакция наличия в иловых отложениях карбонатов кальция. С этой целью около 1 г ила обрабатывается 5%-й соляной кислотой; вскипание ила указывает на наличие углекислых солей. В этом случае 1 г сырого веса ила помещают на плотный беззольный 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 операция опускается.

2. 1 г сырого веса ила помещают на беззольный фильтр с синей чертой в стеклянной воронке и промывают 2N раствором хлористого натрия. При этом кальций в поглощающем комплексе замещается натрием, склеивающие свойства поглощающего комплекса ила разрушаются, и бактерии легче отстают от частичек ила. 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 0.0004N раствора едкого натрия в колбочку Эрленмайера объемом в 80 мл.

Если кальций в поглощающем комплексе ила отсутствует, то операция промывания 2N раствором хлористого натрия исключается и навеска ила в 1 г сырого веса непосредственно вносится в колбу Эрленмайера и обрабатывается раствором 0.0004N 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. После этого болтушку ила разливают в 4 центрифужных пробирки и центрифугируют 3 мин. при 1000 оборотах в 1 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 вновь центрифугируют. Раствор с осадка сливают в ту же колбу.

Операцию повторяют 3—4 раза, а в последний раз и осадок из пробирок переносят в ту же мерную колбу и доводят объем до метки водой без бактерий.

6. При изготовлении микроскопического препарата 1 каплю полученной болтушки наносят на обезжиренное предметное стекло и туда же наносят 1 каплю 0.05%-го раствора агар-агара, профильтрованного через мембранный фильтр № 3 для очистки от бактерий. Капли перемешивают, и мазок распределяют на 6 см², подложив под стекло миллиметровую бумагу. Агар-агар служит для закрепления бактерий на стекле. Препарат подсушивают, фиксируют спиртом и окрашивают несколько часов 3%-м раствором эритрозина на 5%-й карболовой воде.

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

Количество бактерий рассчитывается по следующей формуле
$$x = \frac{6 \cdot 10^8 \cdot b \cdot c \cdot d}{a \cdot z}$$
 бактерий в 1 г сырого ила, где x — количество бактерий в 1 г сырого ила, 6×10^8 — площадь мазка, в μ^2 ; a — площадь всего окулярного сетчатого микрометра, в μ^2 , установленная по объективному микрометру для данного увеличения; b — число капель в 1 мл пипетки, которой наносилась капля болтушки на предметное стекло для изготовления препарата; c — объем мерной колбы, в которой делалась болтушка

бактерий при изготовлении препарата, z — число полей зрения, в которых подсчитывались бактерии, δ — сумма подсчитанных бактерий в z полях зрения.

Изготовление микроскопического препарата возможно путем фильтрования бактериальной суспензии через мембранный фильтр, как это показали Ю. И. Сорокин (1958) и Н. Б. Заварзина (1955).

С этой целью после изготовления бактериальной суспензии, согласно пунктам 1—5, мерную колбу с болтушкой ила взбалтывают и оставляют в спокойном состоянии на 1—2 мин. Когда грубые частицы ила осядут, 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 фильтруется через мембранный фильтр и препарат готовится так, как это принято при подсчете бактерий в воде.

Подсчет бактерий производится при увеличении $\times 900$, с окуляром $\times 10$ и объективом — масляной иммерсией $\times 90$. Площадь окулярного сетчатого микрометра определяется по объективному микрометру при данном увеличении.

Количество бактерий рассчитывается по следующей формуле $x = \frac{e \cdot 10^6 \cdot v \cdot \delta}{a \cdot ж \cdot z}$ бактерий в 1 г сырого ила, где x — количество

бактерий в 1 г сырого ила; e — площадь фильтра, в мм^2 ; 10^6 — переводной коэффициент мм^2 в μ^2 ; a — площадь окулярного сетчатого микрометра, в μ^2 ; v — объем мерной колбы, в которой приготавлилась болтушка ила; z — число полей зрения, в которых подсчитывались бактерии; δ — сумма подсчитанных бактерий в z полях зрения; $ж$ — число миллилитров болтушки, которое фильтровалось через мембранный фильтр.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ ГЕНЕРАЦИИ БАКТЕРИЙ И ПРОДУКЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОМАССЫ

Определение количества бактерий методом прямого счета дает нам представление об общей 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.

Существует два метода определения скорости размножения бактерий в водоеме. Первый метод был предложен А. Е. Криссом (Крисс и Рукина, 1952) и заключается в том, что время генерации определяется путем учета размножения бактерий на стек-

ила смывают с фильтра 25 мл 0.0004N раствора едкого натрия в колбочку Эрленмайера объемом в 80 мл.

Если кальций в поглощающем комплексе ила отсутствует, то операция промывания 2N раствором хлористого натрия исключается и навеска ила в 1 г сырого веса непосредственно вносится в колбу Эрленмайера и обрабатывается раствором 0.0004N 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. После этого болтушку ила разливают в 4 центрифужных пробирки и центрифугируют 3 мин. при 1000 оборотах в 1 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 вновь центрифугируют. Раствор с осадка сливают в ту же колбу.

Операцию повторяют 3—4 раза, а в последний раз и осадок из пробирок переносят в ту же мерную колбу и доводят объем до метки водой без бактерий.

6. При изготовлении микроскопического препарата 1 каплю полученной болтушки наносят на обезжиренное предметное стекло и туда же наносят 1 каплю 0.05%-го раствора агар-агара, профильтрованного через мембранный фильтр № 3 для очистки от бактерий. Капли перемешивают, и мазок распределяют на 6 см², подложив под стекло миллиметровую бумагу. Агар-агар служит для закрепления бактерий на стекле. Препарат подсушивают, фиксируют спиртом и окрашивают несколько часов 3%-м раствором эритрозина на 5%-й карболовой воде.

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

Количество бактерий рассчитывается по следующей формуле
$$x = \frac{6 \cdot 10^8 \cdot b \cdot v \cdot d}{a \cdot z}$$
 бактерий в 1 г сырого ила, где x — количество бактерий в 1 г сырого ила, 6×10^8 — площадь мазка, в μ^2 ; a — площадь всего окулярного сетчатого микрометра, в μ^2 , установленная по объективному микрометру для данного увеличения; b — число капель в 1 мл пипетки, которой наносилась капля болтушки на предметное стекло для изготовления препарата; v — объем мерной колбы, в которой делалась болтушка

бактерий при изготовлении препарата, z — число полей зрения, в которых подсчитывались бактерии, δ — сумма подсчитанных бактерий в z полях зрения.

Изготовление микроскопического препарата возможно путем фильтрования бактериальной суспензии через мембранный фильтр, как это показали Ю. И. Сорокин (1958) и Н. Б. Заварзина (1955).

С этой целью после изготовления бактериальной суспензии, согласно пунктам 1—5, мерную колбу с болтушкой ила взбалтывают и оставляют в спокойном состоянии на 1—2 мин. Когда грубые частицы ила осядут, 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 фильтруется через мембранный фильтр и препарат готовится так, как это принято при подсчете бактерий в воде.

Подсчет бактерий производится при увеличении $\times 900$, с окуляром $\times 10$ и объективом — масляной иммерсией $\times 90$. Площадь окулярного сетчатого микрометра определяется по объективному микрометру при данном увеличении.

Количество бактерий рассчитывается по следующей формуле
$$x = \frac{e \cdot 10^6 \cdot v \cdot \delta}{a \cdot ж \cdot z}$$
 бактерий в 1 г сырого ила, где x — количество бактерий в 1 г сырого ила; e — площадь фильтра, в мм^2 ; 10^6 — переводной коэффициент мм^2 в μ^2 ; a — площадь окулярного сетчатого микрометра, в μ^2 ; v — объем мерной колбы, в которой приготавлилась болтушка ила; z — число полей зрения, в которых подсчитывались бактерии; δ — сумма подсчитанных бактерий в z полях зрения; $ж$ — число миллилитров болтушки, которое фильтровалось через мембранный фильтр.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ ГЕНЕРАЦИИ БАКТЕРИЙ И ПРОДУКЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОМАССЫ

Определение количества бактерий методом прямого счета дает нам представление об общей 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.

Существует два метода определения скорости размножения бактерий в водоеме. Первый метод был предложен А. Е. Криссом (Крисс и Рукина, 1952) и заключается в том, что время генерации определяется путем учета размножения бактерий на стек-

лах обрастания. Однако при нашей проверке оказалось, что, помимо своей громоздкости, метод обладает рядом существенных недостатков. В частности, при опускании стекла в воду на него садятся бактерии поверхностной пленки.

Второй метод — определение времени генерации бактерий путем постановки кратковременных опытов с изолированными пробами воды — был предложен А. С. Разумовым (1948) и детализирован М. В. Ивановым (1955). Ниже мы приводим второй вариант метода.

1. Проба воды объемом около 1 л отбирается из водоема в стерильную посуду.

2. Из нее берут 10 мл воды в стерильную пробирку и производят анализ общего количества бактерий прямым методом Разумова.

3. 500 мл этой же воды фильтруют в стерильную посуду через прокипяченный мембранный фильтр № 6 с порами около 7 μ для удаления фито- и зоопланктона.

4. По 250 мл фильтрованной воды вносят в две параллельных стерильных склянки с притертыми пробками емкостью около 300 мл и в каждой из склянок определяют общее количество бактерий микроскопическим методом Разумова и количество сапрофитных бактерий посевом на МПА в чашки Петри.

5. Склянки, заполненные профильтрованной водой, затыкают корковой пробкой и помещают обратно в водоем на 8 час. так, чтобы условия опыта по температуре и освещению максимально приближались к природным.

6. По окончании опыта из каждой склянки отбирают воду в две стерильные пробирки. В одной из них воду фиксируют формалином и тотчас по возвращении в лабораторию фильтруют через мембранный фильтр и количество бактерий учитывают прямым методом Разумова. Из второй пробирки делают посев на МПА для учета сапрофитных бактерий. Если посев делается в лаборатории, то за продолжительность опыта считается промежуток времени между посевами из исходной воды и в конце опыта.

7. Время между двумя генерациями бактерий рассчитывается по формуле $g = \frac{t \lg 1,8}{\lg B - \lg \phi}$ часов, где g — время генерации бактерий, т. е. промежуток времени между двумя периодами размножения; ϕ — исходное число бактерий; B — количество бактерий в конце опыта; t — продолжительность опыта в часах. Коэффициент 1.8 взят потому, что обычно около 10% бактерий, учитываемых прямым методом, являются отмершими, и поэтому в период размножения количество бактерий увеличивается в 1.8 раза, а не вдвое.

8. Одновременно с определением времени генерации бактерий определяется и продукция бактериальной биомассы. Для этого взятая из того же батометра нефильтрированная вода, в которой

было определено общее количество бактерий, разливается по 250 мл в две параллельные стерильные склянки с притертыми пробками, объемом по 300 мл, и помещается в водоем на 8 час., как это было описано выше.

9. В конце опыта из склянок отбирают пробы воды, фиксируют формалином и в них вновь микроскопическим методом Разумова определяют общее количество бактерий.

10. Часовая продукция бактериальной биомассы, выраженная в числе бактерий в 1 мл, рассчитывается по следующей формуле, предложенной М. В. Ивановым (1955), $y = \frac{e'}{g} + \frac{e' - B'}{t}$ клеток бактерий в 1 мл в 1 час, где e' — количество бактерий в естественной нефильтрованной воде в начале опыта; B' — то же в конце опыта; y — часовая продукция бактерий, выраженная в их числе в 1 мл; t — продолжительность опыта, в часах; g — время генерации в часах, определенное в опыте с фильтрованной водой.

11. Для перехода от численности бактерий к их биомассе разные авторы принимают различные коэффициенты. Если принять среднюю величину бактерий $0.5 \times 1 \mu$, то при 1 млн бактерий в 1 мл их сырой вес в 1 л будет равняться 0.8 мг, или сухой вес 0.16 мг.

5. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА РАДИОАВТОГРАФИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА БАКТЕРИЙ, ОКИСЛЯЮЩИХ ВОДОРОД И ГАЗООБРАЗНЫЕ УГЛЕВОДОРОДЫ

Количественный учет мезотрофных бактерий таких, как окисляющие водород и газообразные углеводороды, представляет значительные 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 также мало пригоден, так как в этих условиях, кроме метаноокисляющих бактерий, на поверхности агара вырастает ряд колоний олигокарбофилов, не способных окислять метан, а довольствующихся теми небольшими количествами растворимого органического вещества, которые еще имеются в выщелоченном агаре.

В связи с этим при исследовании воды и грунтов Рыбинского водохранилища В. И. Романенко (1959) была разработана методика, основанная на применении метода радиоавтографии.

Сущность метода основана на том, что указанные виды бактерий способны к автотрофному росту и, развиваясь на минеральной среде с радиоактивным карбонатом натрия, $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$, образуют радиоактивные колонии, легко дающие радиоавтографы.

1. Вода в количестве 1—5 мл профильтровывается через предварительно прокипяченные мембранные фильтры № 3. Последние надписываются и раскладываются в чашках Петри на среду Романенко (№ 71).

Перед заполнением средой в чашки Петри вносят по 1 мл радиоактивного бикарбоната натрия $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ с удельной активностью 0.2—0.3 μ Ci.

1а. При учете метанооксиляющих бактерий в иле делается разведение ила 1 : 200 на стерильной воде. В фильтровальную воронку предварительно наливается несколько миллиметров стерильной воды для более равномерного распределения бактерий и вносится одна или несколько капель разведения. Фильтры раскладываются на чашки Петри с указанной средой.

2. Чашки с фильтрами помещаются в эксикаторы, наполненные на $\frac{1}{3}$ CH_4 и на $\frac{2}{3}$ воздухом. В случае количественного учета бактерий, окисляющих водород или пропан, эксикаторы, где инкубируются чашки Петри с фильтрами, наполняются смесью соответствующего газа с воздухом.

Через 7—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.

3. Затем фильтры снимают со среды, высушивают на фильтровальной бумаге и обрабатывают 5%-й HCl для удаления радиоактивного карбоната, который мог попасть на фильтр из питательной среды. Обработку можно вести в чашках Петри, в которые наливается раствор кислоты, и фильтры осторожно, чтобы не смыть колонии бактерий, пинцетом раскладываются на 2—3 мин. на поверхности жидкости. Далее они таким же образом 3 раза промываются от HCl в чашках со свежей 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 ставится номер клеем, в который добавлено некоторое количество радиоактивного карбоната натрия $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$.

В темноте к полоске бумаги с приклеенными фильтрами прикладывают эмульсионной стороной обыкновенную киноплёнку с чувствительностью 65—90 ед. госта. Затем в вышеуказанном положении они туго наматываются на катушку от кассеты так, чтобы фильтры с выросшими на них колониями плотно прилегли к эмульсионному слою киноплёнки. Катушку вкладывают обратно в кассету и в таком состоянии она остается в темноте в течение некоторого времени. В это время радиоактивные колонии метанооксиляющих бактерий воздействуют на фотоэмульсию.

Время, в течение которого контрольные фильтры с сапрофитными колониями начинают давать бледные отпечатки, а опытные фильтры — хорошо выраженные радиоавтографы зависит от концентрации изотопа, состава среды, чувствительности фото пленки и определяется опытным путем. Обычно оптимальное время экспозиции равняется 4—7 суткам.

4. После экспозиции пленку вынимают, проявляют в контрастном проявителе, закрепляют в растворе гипосульфита, тщательно промывают, высушивают, и отпечатки микроколоний подсчитывают под бинокуляром МБС-1. Пересчет производится в соответствии с количеством профильтрованной воды. Параллельно несколько фильтров можно поставить в качестве контроля в эксикаторы с воздухом без добавки метана или другого газа.

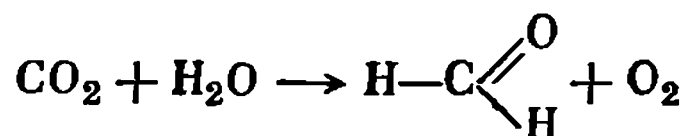
Сапрофиты или совсем не дают отпечатков, или при более продолжительной экспозиции дают слабые отпечатки.

Надо полагать, что, добавляя подобным образом радиоактивные изотопы в виде $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$ в соответствующие питательные среды, будет возможно учитывать количество автотрофных бактерий и других физиологических групп, в частности тионовых.

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА В ВОДОЕМАХ В ПРОЦЕССЕ ФОТОСИНТЕЗА

Единственным первоисточником образования органического вещества в водоемах служит фотосинтетическая деятельность зеленых организмов, в частности фитопланктона.

При этом на одну молекулу потребленной углекислоты выделяется одна молекула кислорода.



Один грамм освобожденного кислорода соответствует 0.93 г синтезированной глюкозы, при этом потребляется 3.5 больших калорий солнечной энергии. Таким образом по выделению свободного кислорода в процессе фотосинтеза мы можем судить о количестве образовавшегося органического вещества.

Другой путь определения количества органического вещества, образовавшегося в процессе фотосинтеза, заключается в том, что в испытуемый объем воды вводится некоторое количество углекислоты, содержащей радиоактивный углерод C^{14} . Тогда в процессе фотосинтеза образуется радиоактивное органическое вещество, которое легко обнаруживается при помощи счетчика Гейгер—Мюллера.

Радиоизотопный метод применим на больших водоемах, где при обследовании больших акваторий затруднительно делать большое количество суточных станций, или в олиготрофных во-

доемах, где величина первичной продукции органического вещества слишком мала и не может быть учтена кислородным методом.

Органическое вещество, образовавшееся в процессе фотосинтеза, частично находится в виде запасных веществ в теле фитопланктонных организмов, а частично переходит в водную массу. Фитопланктон использует накопившиеся органические вещества в процессе дыхания, окисляя их растворенным кислородом до углекислоты. Находящиеся в водной массе растворенные органические вещества, поступившие сюда из фитопланктона и в виде готовых органических веществ с водосборного горизонта, подвергаются дальнейшей минерализации за счет деятельности бактерий. Все эти процессы минерализации органического вещества определяются величиной «деструкции» и могут быть выражены как в кислороде, так и в органическом веществе. Переходный коэффициент приводится ниже. Необходимо указать, что величина деструкции органического вещества может быть определена лишь кислородным методом и не может быть учтена радиоуглеродным.

а. Определение продукции и деструкции органического вещества в водоемах скляночным методом

Г. Г. Винберг (1934) предложил определять скорость образования и деструкции органического вещества по изменению содержания кислорода в замкнутом объеме воды, помещенном в условия, максимально приближающиеся к естественным.

С этой целью вода исследуемого водоема заключается в светлую и темную склянки с притертыми пробками так, чтобы под пробкой не осталось пузырька воздуха. Пробы воды на станции берут по вертикали через 1 м с различных глубин, начиная от поверхности до глубины удвоенной прозрачности воды по диску Секки, и помещают на ту же глубину, с которой была взята вода для анализа. Инкубация склянок в водоеме продолжается 1 сутки.

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 обозначается как величина «деструкции».

Разница между содержанием кислорода в светлой и затемненной склянках после суточной экспозиции в озере показывает величину фотосинтеза фитопланктона и обозначается как величина «первичной продукции».

Вся установка со склянками в озере имеет вид, показанный на рис. 14.

Наибольшую ценность для определения величины первичной продукции в различных водоемах имеют данные, получаемые при постановке склянок у самой поверхности, так как на других го-

ризонтах интенсивность фотосинтеза в первую очередь определяется количеством света, проникновение которого в воду резко различно в разных водоемах.

Оборудование. Склянки обязательно должны быть из белого стекла с притертыми пробками. Объем склянок 120—160 мл. Для определения величины деструкции можно пользоваться теми же склянками, но обязательно заворачивать их в двойной слой черной клеенки, чтобы исключить здесь возможность фотосинтеза.

Укреплять склянки в водоеме можно, подвешивая их к заранее прикрепленным в нужных местах троса кольцам, с помощью также заранее прикрепленных к склянкам проволоочных крючков. Необходимо процедуру подвешивания склянок вести быстро.

Определение растворенного в воде кислорода ведется методом Винклера (см. часть VI, 3). При указанном объеме склянок достаточно при фиксации кислорода добавлять по 0.5 мл растворов щелочи и хлористого марганца. После осаждения осадка, растворения его кислотой и выделения йода удобно для титрования гипосульфитом брать не весь объем, а 50 или 100 мл раствора.

При колебании объема склянок 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 склянок в водоеме. Склянки полезно надписать эмалевой краской по следующей схеме. Группы по три склянки, предназначенные для заполнения из одного батометра, получают один номер. В этой группе одна склянка служит для определения начального содержания кислорода, а две других — светлая и темная, устанавливаются в водоеме. Следует тщательно следить, чтобы при заполнении склянок водой под пробкой не осталось пузырька воздуха.

1. Вода из озера берется батометром Рутнера и из одного батометра заполняются три склянки — две светлых и одна темная. В одну из светлых склянок добавляют реактивы для фиксации кислорода. Другую светлую и темную прикрепляют к тросу для помещения в водоем, защищая от прямых солнечных лучей.

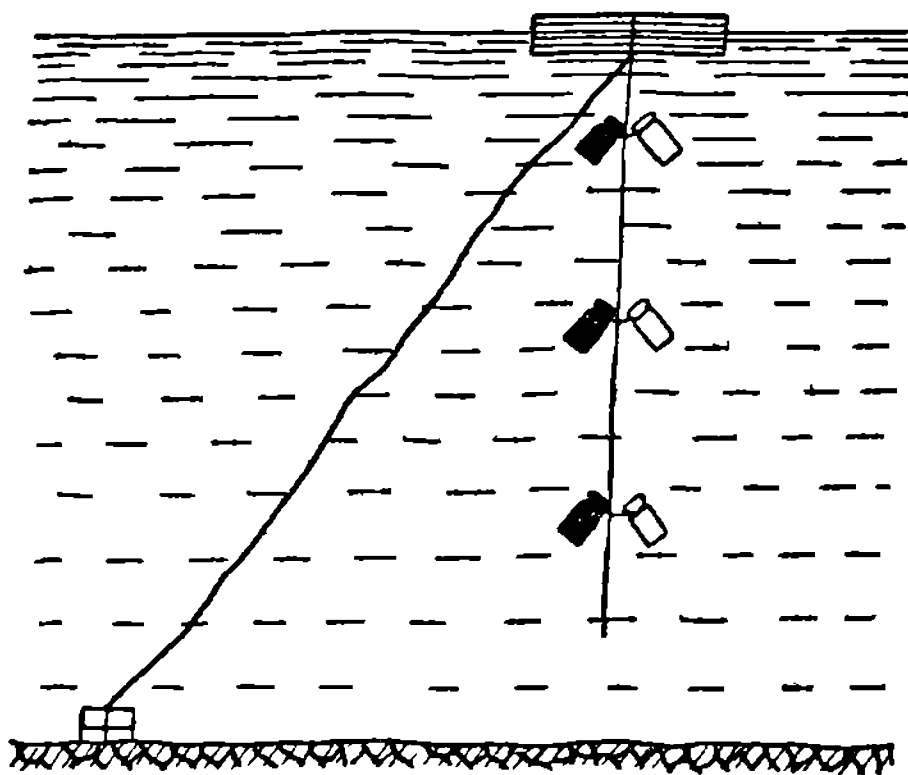


Рис. 14. Схема установки для определения фотосинтеза и деструкции органического вещества в водоемах.

2. Первый батометр для заполнения склянок берется из поверхностного слоя воды, далее из следующего горизонта, и процедура повторяется. Склянки, устанавливаемые на каком-либо горизонте, следует заполнять водой с той же глубины.

3. Когда все склянки заполнены, то тросик с ними подвешивают к буйку и оставляют в водоеме возможно точно на 24 часа.

Хорошо опыт ставить с повторностью по две светлых и темных склянки.

4. Через 24 часа установку вынимают и тотчас же во всех склянках фиксируют кислород.

При постановке опыта следует возможно точно вести записи: 1) название водоема, 2) местоположение установки, 3) дата постановки и снятия опыта, 4) условия погоды, 5) температура и прозрачность воды.

Вычисление величины продукции и деструкции органического вещества в водоеме. Предположим, что исходное содержание кислорода в темной склянке упало 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 деструкции $B = 10.17 - 9.57 = 0.6$ мг/л. Величина выделения кислорода в процессе фотосинтеза или валовая продукция $A = 14.18 - 9.57 = 4.61$ мг/л. Следовательно, суточная, выраженная в кислороде чистая продукция органического вещества, т. е. количество кислорода, или эквивалентное ему количество ор-

ганического вещества, которое осталось в течение этих суток в поверхностном слое воды ($A - B$), равна 4.01 мг/л.

Подобным образом величина деструкции и продукции органического вещества рассчитывается для всех горизонтов и наносится на график, рис. 15.

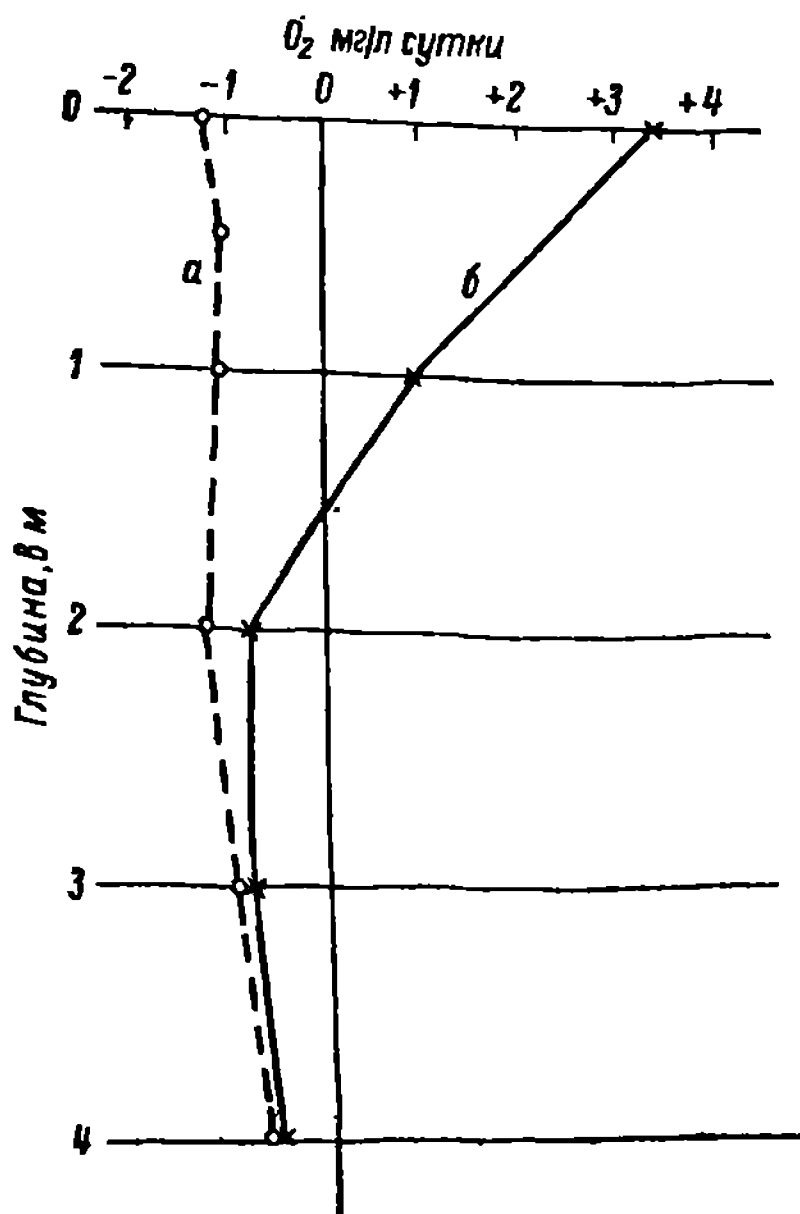


Рис. 15. Распределение интенсивности фотосинтеза и дыхания по глубинам в Белом озере. (По Винбергу, 1934).

На горизонтальной оси отложена разность в содержании кислорода до и после экспозиции склянок. За нуль принято содержание кислорода в момент опускания склянок. а — данные затемненных склянок; б — незатемненных. Расстояние между кривыми соответствует суточной интенсивности фотосинтеза на данной глубине, а площадь, заключенная между кривыми, общей сумме кислорода, выделенного во всем столбе воды, или валовой продукции органического вещества.

На вертикальной оси откладывается глубина в метрах, на горизонтальной — разность содержания кислорода до и после экспозиции склянок (в мг/л за сутки). Вертикальная линия принята за нуль. Левая кривая (*a*) — данные затемненных склянок, правая (*б*) — светлых. Расстояние между кривыми соответствует интенсивности фотосинтеза на данной глубине, а площадь, заключенная между ними, общей сумме кислорода, выделенного в процессе фотосинтеза во всем столбе воды, или величине первичной продукции.

Если на горизонтальной оси отложить величины кислорода в граммах на 1 м^3 , а на вертикальной — глубину в метрах, то площадь между кривыми *a* и *б* будет выражать величину валовой или первичной продукции органического вещества за сутки в граммах на 1 м^2 водоема.

Площадь между вертикальной, нулевой осью и положительной частью кривой *б* будет выражать величину «чистой» продукции органического вещества в слое воды, где идет фотосинтез, в граммах на 1 м^2 водоема. Наконец, площадь между нулевой осью и кривой *a* будет выражать величину деструкции органического вещества в граммах на 1 м^2 водоема.

Наиболее просто численную величину площади между кривыми можно определить весовым методом. Для этого искомая площадь чертежа вырезается и взвешивается. За единицу измерения — 1 г О_2 на 1 м^2 — принимается вес прямоугольника, вырезанного из той же бумаги, на которой делался чертеж. Длина такого прямоугольника в масштабе чертежа должна быть равна 1 м , а ширина $1\text{ г кислорода на } 1\text{ м}^3$.

Чтобы перейти от кислорода на органическое вещество, нужно полученную величину умножить на 0.93, а при переходе на углерод — на 0.37 (Винберг, 1960).

б. Определение продуктивности фотосинтеза фитопланктона в водной толще путем применения радиоактивного углерода

Сущность методики заключается в том, что экспериментально определяется фотосинтез поверхностного слоя воды, инкубируя склянки не в водоеме, а на палубе судна в аквариуме, и из этой величины уже рассчитывается величина фотосинтеза в толще воды (Сорокин, 1959; Винберг и др., 1960). Для этого необходимо и достаточно определять на каждой станции влияние на фотосинтез фитопланктона двух факторов: с одной стороны, неравномерности распределения фитопланктона в трофическом слое и с другой — снижения светопроницаемости в зависимости от глубины слоя. Приводимая модификация метода была разработана Ю. И. Сорокиным (1959) и состоит из нижеприводимых трех определений.

Определение суточного фотосинтеза в поверхностной пробе воды. 1) Пробы воды отбирают из поверхностного слоя батометром Рутнера. В 3 склянки из белого стекла, объемом 150 мл, вносят по 100 мл воды. В две склянки пипеткой со шприцем вносят по 1 мл раствора радиоактивного карбоната натрия ($\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$) в 0.005N растворе KOH удельной радиоактивностью около 1 μ Ci или $0.5-1 \times 10^5$ имп./мин. на 1 мл, учитываемых под торцовым счетчиком, коэффициент которого около 7. В третью склянку добавляют 2—3 капли фенолфталеина и воду подщелачивают до слабо-розовой окраски 0.1N раствором KOH, лишенным углекислоты. Эта проба воды служит для определения в ней общего количества углерода бикарбонатной и свободной углекислоты.

2) Склянки с добавкой радиоактивного изотопа инкубируют в аквариуме на палубе экспедиционного судна в течение суток. Аквариум стоит на полном свете, а вода в нем периодически меняется так, чтобы температура опыта соответствовала температуре воды в водоеме.

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 μ . Фильтры с осевшим планктоном подсушивают и сохраняют до возвращения в лабораторию.

4) По возвращении в лабораторию фильтры в течение 5 мин. обрабатывают 1N раствором соляной кислоты для удаления меченых карбонатов, отмывают от избытка кислоты путем помещения на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой, и высушивают. Радиоактивность органического вещества, образовавшегося в процессе фотосинтеза фитопланктона, определяется под торцовым счетчиком Гейгера—Мюллера и обозначается г.

Определение зависимости фотосинтеза от светопроницаемости воды и нахождение поправочных коэффициентов K_T . 1) Зависимость фотосинтеза от светопроницаемости определяется на полусуточных станциях следующим путем. Берут пробу воды с какого-либо среднего горизонта, например с 1 м (рис. 16, K_T). Воду разливают поровну в склянки из светлого стекла и в них добавляют по 1 мл раствора радиоактивного карбоната удельной радиоактивности 1—3 μ Ci или от 1×10^6 до 5×10^6 имп./мин. на 1 мл под торцовым счетчиком. Затем склянки помещают на тресе в водоеме на разные горизонты, начиная от поверхности и до горизонта, где фотосинтез уже отсутствует. Ввиду высокой чувствительности изотопной методики, этот опыт лучше всего ставить в такой 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 уже в воде.

2) Опыт ставить лучше на сутки или, по крайней мере, с 12 час. дня до вечера, или вечером до 12 час. следующего дня с тем, чтобы водоросли могли использовать всю сумму изменений 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. 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, равны во всех склянках. Поэтому величины фотосинтеза в склянках будут прямо пропорциональны величине радиоактивности соответствующих фильтров. Отношение радиоактивности фильтров с разных глубин к радиоактивности поверхностного фильтра обозначается как K_T и показывает, какая часть поверхностного света достигала соответствующей глубины. Если умножить величину поверхностного фотосинтеза, определенную в опыте на палубе судна, на коэффициенты K_T , найденные для отдельных горизонтов, то мы получим величины фотосинтеза, которые наблюдались бы на этих горизонтах при равной насыщенности толщи воды фитопланктоном и биогенами.

О п р е д е л е н и е з а в и с и м о с т и ф о т о с и н т е з а в т о л щ е в о д ы о т в е р т и к а л ь н о г о р а с п р е д е л е н и я ф и т о п л а н к т о н а (н а х о ж д е н и е п о п р а в о ч н о г о к о э ф ф и ц и е н т а K_p). 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. Причина этого состоит не только в том, что любой метод прямого учета фитопланктона является весьма трудоемким и достаточно субъективным. Главным образом причина заключается в отсутствии пропорциональности между общей биомассой клеток, учитываемой прямым счетом, и их способностью к фотосинтезу, которое имеет место ввиду разного физиологического состояния клеток в различных условиях их функционирования, а также ввиду того, что при прямом счете наряду с живыми клетками учитываются отмирающие и отмершие клетки фитопланктона.

Схема определения вертикального распределения фитопланктона в водоеме представлена на рис. 16, K_p . Пробы воды отбираются с ряда горизонтов начиная от поверхности до глубины удвоенной прозрачности по диску Секки. С каждого горизонта равное количество воды наливают в склянки светлого стекла и

тут же добавляют равные объемы раствора $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$ из расчета общей активности $0.4\text{--}1.5 \times 10^6$ имп./мин. на 1 л (в зависимости от количества фитопланктона в воде).

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 Фотосинтез же в свою очередь зависит от исходного коли-

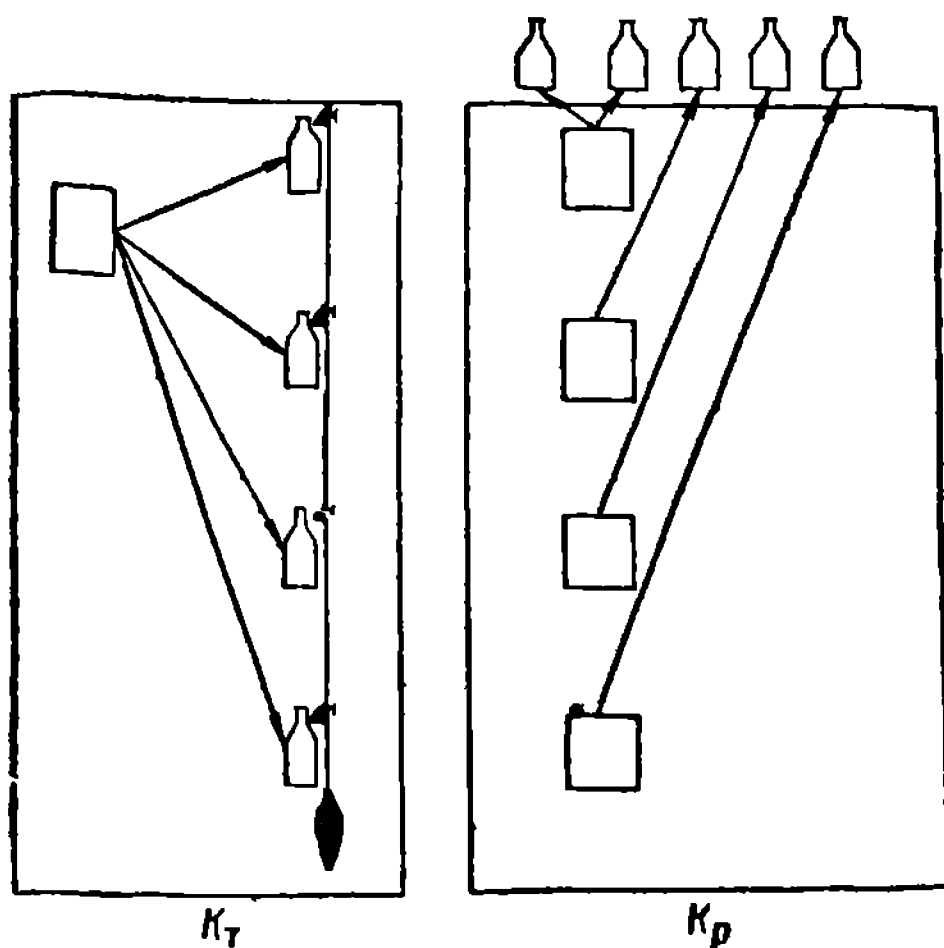


Рис. 16. Схема постановки опыта по определению величины продукции органического вещества в процессе фотосинтеза при помощи изотопного метода: K_T — определение коэффициента K_T — зависимости фотосинтеза от проникновения света; K_P — определение коэффициента K_P — зависимости фотосинтеза от распределения водорослей.

чества жизнедеятельного фитопланктона на соответствующих горизонтах, так как по условиям опыта именно этот фактор является ограничивающим фактором для фотосинтеза. С другой стороны, кратковременность опыта гарантирует от искажений исходную картину 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 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 по-

¹ В случае разного содержания карбонатов и CO_2 (C_K) в пробах с разных горизонтов, прямая пропорциональность между величинами фотосинтеза и радиоактивностью фильтров будет нарушена и для ее восстановления необходимо определить C_K на разных горизонтах. Однако последнее необходимо только для определений вертикального распределения фитопланктона, не связанных с определением его продуктивности. Для нахождения же коэффициентов K_P распределение величин C_K учитывать не следует, так как поправка на распределение C_K по горизонтам автоматически входит в поправочный коэффициент K_{Pr} .

верхностной пробы будет соответствовать степени влияния вертикального распределения фотосинтезирующего фитопланктона на продуктивность фотосинтеза в водной толще.

Это отношение обозначается как поправочный коэффициент K_p . При умножении величины поверхностного фотосинтеза на коэффициенты K_p , найденные для отдельных горизонтов, мы получим величины фотосинтеза, которые наблюдались бы на соответствующих горизонтах в случае равномерной освещенности всех слоев водной толщи.

О п р е д е л е н и е о б щ е й р а д и о а к т и в н о с т и
в о д ы п о с л е д о б а в л е н и я м е ч е н о й у г л е к и с л о т ы. Производится следующим образом. 1) Для определения общей радиоактивности углерода карбонатов и свободной углекислоты, которую обозначаем R , из склянок в конце опыта перед фильтрованием воды через мембранный фильтр отбирают пробу воды в пробирку. Радиоактивные бикарбонаты и свободная углекислота фиксируются добавлением нескольких капель 10%-й щелочи, очищенной от карбонатов. Пробирки плотно закрывают пробками и хранят в перевернутом состоянии до конца экспедиции.

2) Анализы общей радиоактивности проводят в лаборатории следующим образом. В пробирки, тщательно промытые хромовой смесью, наливают по 3 мл свободного от карбонатов 0.1N KOH. Затем в них добавляют по 1 мл раствора, содержащего 0.3% Na_2CO_3 , по 1 мл 5% NH_4Cl , по 2 мл анализируемой жидкости и по 1 мл 10%-го раствора BaCl_2 . Пробирки нагревают 10 мин. на водяной бане при 80° , после чего выпавший в них осадок BaCO_3 отфильтровывают через мембранный фильтр № 3. Остатки осадка смывают со стенок пробирок и фильтровальной воронки горячим раствором 5% NH_4Cl в 0.1N KOH. После фильтрования фильтры высушивают и взвешивают с точностью до 4-го знака. Вес осадка BaCO_3 на фильтре делится на площадь фильтра, выраженную в квадратных сантиметрах, для учета самопоглощения β -излучения в толще осадка. Радиоактивность осадка BaCO_3 определяется вскоре после фильтрования на высушенных фильтрах ввиду того, что радиоактивный карбонат бария обменивает свой углерод с углеродом CO_2 воздуха и с течением времени радиоактивность осадка на фильтрах падает.

С тем, чтобы избежать введения поправок на условия счета, фильтрование осадков BaCO_3 производят через воронку того же диаметра, что и воронка для фильтрования радиоактивного фитопланктона, и фильтры с осадком BaCO_3 просчитывают под счетчиком в том же положении, что и фильтры с фитопланктоном.

В табл. 5 приводятся значения (K) на ослабление β -излучения в осадках BaCO_3 разной толщины. Для получения исходной радиоактивности C^{14} в исследуемом растворе карбоната достаточно помножить активность полученного из него осадка (R_1) на поправку, соответствующую толщине его слоя на фильтре, выра-

Таблица 5

Поправочные коэффициенты (K) для вычисления исходной активности (R) C^{14} в осадках $BaCO_3$, $R = R_1 \times K$

$BaCO_3$, мг/см ²	K	$BaCO_3$, мг/см ²	K	$BaCO_3$, мг/см ²	K	$BaCO_3$, мг/см ²	K
2.0	1.161	4.4	1.581	6.4	1.998	8.8	2.578
2.4	1.213	4.6	1.630	6.6	2.040	9.2	2.680
2.8	1.272	4.8	1.664	6.8	2.086	9.6	2.800
3.0	1.305	5.0	1.692	7.0	2.136	10.0	2.915
3.2	1.342	5.2	1.733	7.2	2.178	10.4	3.020
3.4	1.377	5.4	1.770	7.4	2.220	10.8	3.115
3.6	1.415	5.6	1.810	7.6	2.270	11.0	3.170
3.8	1.455	5.8	1.855	7.8	2.324	12.0	3.450
4.0	1.495	6.0	1.902	8.0	2.379	13.0	3.750
4.2	1.539	6.2	1.951	8.4	2.479	14.0	4.050
						15.0	4.370

женную в миллиграммах на квадратный сантиметр. Оптимальная толщина осадков $BaCO_3$ для определения R лежит в пределах 3—7 мг $BaCO_3$ на 1 см².

Для нахождения поправки на самопоглощение можно пользоваться графиком Сорокина или Кальвина (рис. 17) зависимости самопоглощения от веса осадка $BaCO_3$ (Сорокин, 1962). В этом случае для получения исходной радиоактивности раствора карбоната достаточно разделить радиоактивность полученного осадка $BaCO_3$ на коэффициент самопоглощения, соответствующий толщине его слоя на фильтре, найденный из графика (рис. 17).

Определение в воде общего количества свободной углекислоты и бикарбонатов. 1) Определение общего содержания углерода карбоната и CO_2 , $C_{карб.}$ можно проводить двумя методами — прямым титрованием в воде и титрованием после отгонки в щелочь. Анализы по первому методу проводятся на судне по следующей схеме. Проба воды 100 мл наливается в коническую колбу и подщелачивается 0.1N KOH до слабо-розовой окраски по фенолфталеину. Затем добавляют 1—2 капли HCl до первого исчезновения окраски. При этом все формы угольной кислоты переходят в бикарбонат. Далее, бикарбонат оттитровывается 0.05N HCl в присутствии смешанного индикатора метилоранж+метиленблау до розового окрашивания. Метод прямого титрования не является вполне точным, так как при этом вместе с бикарбонатом титруются гуминовые кислоты и другие вещества, растворенные в воде.

Метод титрования CO_2 после отгонки ее в щелочь более точен (см. часть V). Анализы по этому методу проводятся в лаборатории по окончании экспедиции. Пробы воды фиксируются для анализа добавлением 2—3 мл 0.1N KOH. В специальном приборе углекислота вытесняется кислотой из карбонатов и отгоняется током

воздуха в 0.1N щелочь, после чего она оттитровывается HCl в присутствии BaCl₂.

Количество органического углерода, новообразованного при фотосинтезе ($C_{\text{фп}}$), вычисляется, исходя из радиоактивности фитопланктона (r), общей радиоактивности карбонатов и CO₂ (R) и их общей концентрации в воде (C_k) по формуле:

$$C_{\text{фп}} = \frac{C_k \cdot r}{R}.$$

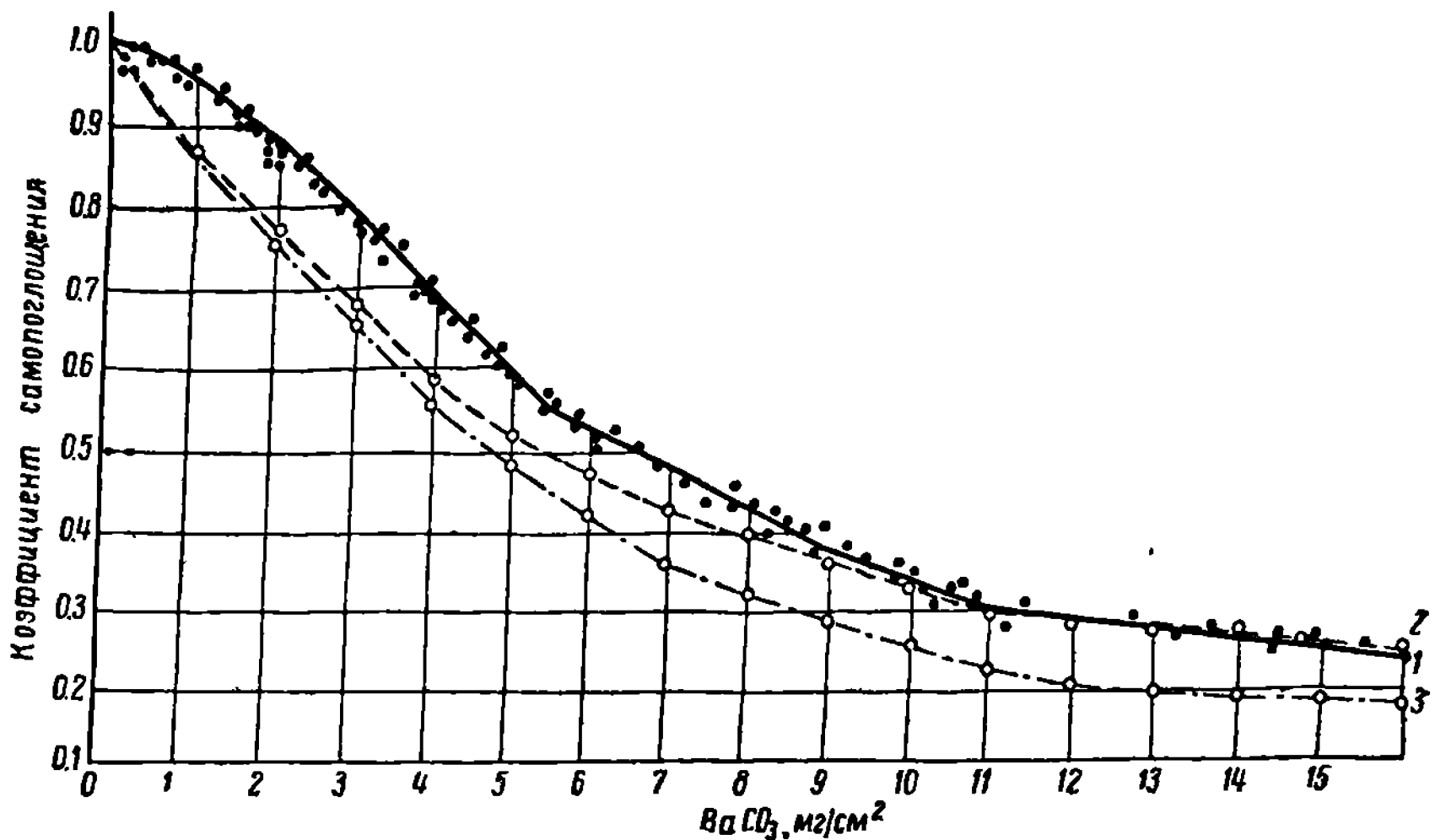


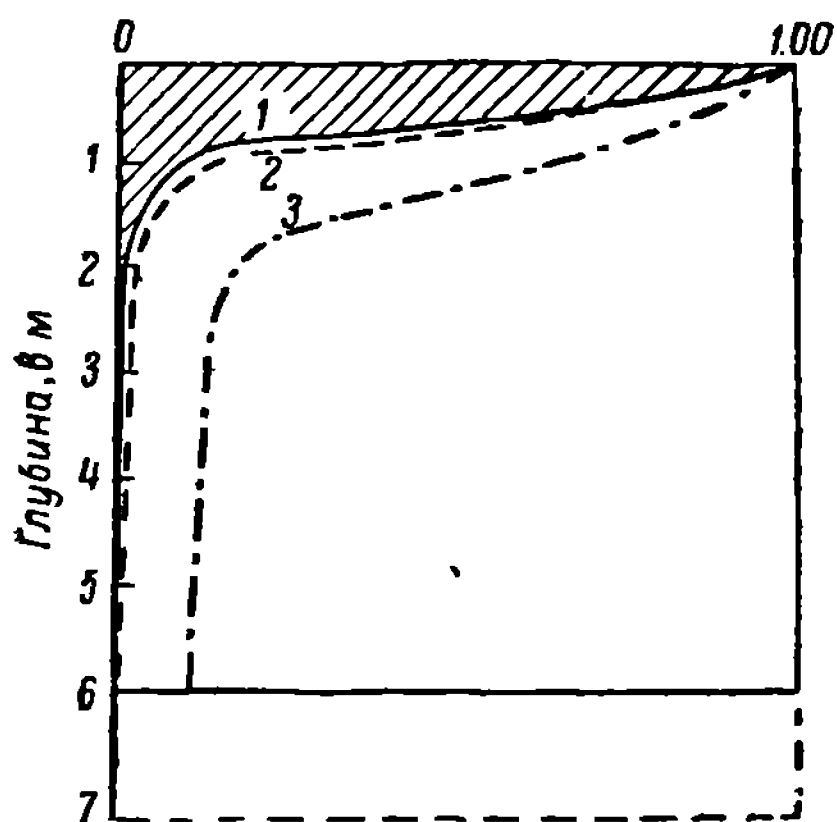
Рис. 17. Величина самопоглощения излучений углекислым барием в зависимости от толщины осадка.

1 — по данным Сорокина; 2 — по данным Кальвина; 3 — по данным Аронова.

Для контроля за поглощением радиоактивного углерода карбонатов, не связанных с фотосинтезом (хемосинтез, темновая фиксация), параллельно ставят опыты в темных склянках. При этом, как показали наблюдения, нет необходимости каждый раз ставить контрольный опыт, так как поглощение C¹⁴ водорослями в темноте не превышает обычно 0.5% от поглощения C¹⁴ за счет фотосинтеза в светлой склянке.

Чувствительность определений фотосинтеза с помощью изотопной методики в среднем составляет величину порядка сотых долей миллиграмма углерода на литр. Поэтому с помощью C¹⁴ можно определять фотосинтез считанных клеток водорослей.

Вычисление продуктивности фотосинтеза под 1 м² поверхности водоема. 1) 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_p и K_t . Поправочные коэффициенты, получающиеся при перемножении коэффициентов K_p и K_t для каждого горизонта, обозначаются как суммарные коэффициенты K_c . Эти то коэффициенты и показывают, как меняются величины фотосинтеза с глубиной на соответствующих горизонтах.



Поэтому, умножая величину суточного фотосинтеза в поверхностной пробе ($C_{фп}$) на коэффициенты K_c , можно рассчитать величины фотосинтеза для каждого горизонта и по этим величинам построить общую поправочную кривую, учитывающую влияние обоих факторов на фотосинтез (рис. 18).

Затем, найдя путем взвешивания отношение заштрихованной площади графика, ограниченной кривой 1, к общей площади графика до того горизонта, до которого производились измерения, вычисляют поправочный коэффициент $K_{ф}$, дающий возможность рассчитать фотосинтез во всей водной толще.

Если обозначить суточную продукцию фитопланктона в поверхностной воде $C_{фп}$ г углерода

Рис. 18. Схема построения поправочных кривых при вычислении суммарного поправочного коэффициента K_c при определении изотопным методом величины продукции органического вещества под 1 м².

1 — суммарная поправочная кривая коэффициента K_c ; 2 — кривая коэффициента K_t ; 3 — кривая коэффициента K_p .

рода в 1 м³, а глубину, до которой велись наблюдения l м, то полную продукцию фитопланктона в граммах органического углерода под 1 м² водоема $C_{ф}$ можно вычислить по следующей формуле $C_{ф} = C_{фп} \times K_{ф} \times l$ г углерода под 1 м².

7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЛИЧИНЫ ПРОДУКЦИИ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА В ВОДОЕМАХ ЗА СЧЕТ ПРОЦЕССОВ ХЕМОСИНТЕЗА (ПРИМЕНЕНИЕ РАДИОАКТИВНОГО ИЗОТОПА УГЛЕРОДА)

Изучение процессов образования органического вещества из минеральных компонентов является одним из основных вопросов водной микробиологии. Очевидно, что первостепенное значение

в этом процессе принадлежит фотосинтезу фитопланктона. Образовавшееся органическое вещество, поступая из водной массы в иловые отложения, может подвергнуться биогенному 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 нет прямой пропорциональности между образованием органического вещества и потреблением кислорода, то единственным методом для определения интенсивности процессов хемосинтеза является радиоуглеродный метод, детально разработанный Ю. И. Сорокиным (1957, 1958).

а. Определение интенсивности процессов хемосинтеза в водной толще водоемов

1. Проба воды с определенного горизонта отбирается батометром Руттнера. Для отделения фитопланктона к выводной трубке батометра присоединяют металлическую или плексигласовую фильтровальную воронку с вставленным в нее «предварительным» (№ 6) мембранным фильтром или двойным слоем мелкоячеистого планктонного газа. Фильтр должен задерживать фито- и зоопланктон и пропускать бактерий (рис. 19).

Воронка переворачивается нижним концом вверх и у этого конца воронки создается вакуум. При этом вода заполняет внутреннюю часть воронки и не оставляет пузырьков воздуха. Затем конец воронки с присоединенной к нему стеклянной трубкой опускают в склянку и в нее отбирают пробу фильтрованной воды. В случае отсутствия воронки следует конец трубки, через которую выпускается вода из батометра, обвязать двойным слоем частого планктонного газа. Такой способ отбора проб для определения хемосинтеза позволяет получить фильтрованную воду без изменения ее газового состава, так как в процессе фильтрования столб воды не прерывается.

При незначительном содержании фитопланктона в придонной воде и небольшой ее мутности возможно определение хемосинтеза вести без предварительного фильтрования.

2. Воду из батометра наливают в склянки с притертыми пробками емкостью около 100 мл, предварительно помещенные в черные мешочки. Заполнение склянок ведется так же, как при отборе проб для определения растворенного кислорода, т. е. через склянку пропускают 2—3 объема воды (см. часть VI, раздел 3).

3. Заполненные водой склянки помещают в черные мешочки и только после этого в них вносят пипеткой со шприцем по

1 мл раствора радиоактивного карбоната $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$ удельной активности около $5 \mu \text{Ci}$ или при учете под счетчиком 10^6 имп./мин. в 1 мл. Изотоп соды, применяемый для определения величины хемосинтеза, предварительно фильтруют через мембранный фильтр № 3 и хранят в запаянных ампулах по

10—15 мл, в которых он стерилизуется многократным кипячением на водяной бане.

После добавления изотопа склянки закрывают притертыми пробками так, чтобы под пробкой не оставалось пузырька воздуха.

С каждого горизонта желательно заполнять по 2 параллельных склянки. На всю серию необходимо ставить одну-две контрольных 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, не вынимая из мешочков, добавляют формалин. Описанные предосторожности предпринимаются во избежание длительного засвечивания воды в склянке. Это необходимо, чтобы свести до минимума фотосинтез, который мог бы идти в них за счет

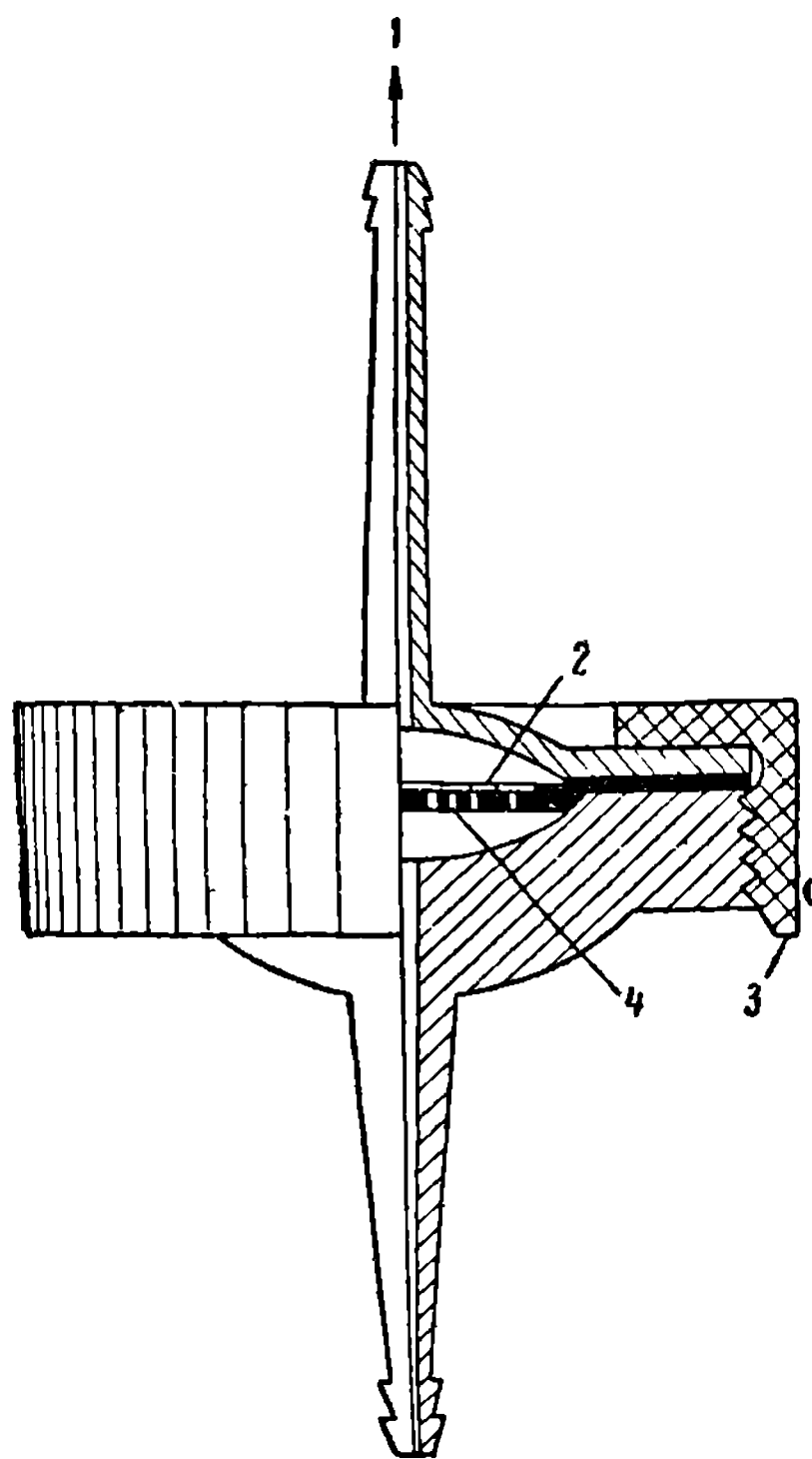


Рис. 19. Схема устройства воронки для очистки воды от фитопланктона при определении величины хемосинтеза.

1 — батометр; 2 — мембранный фильтр; 3 — гайка, закрепляющая мембранный фильтр; 4 — пористая пластинка.

присутствия отдельных клеток водорослей, проскочивших через планктонный газ.

6. По окончании опыта вода из склянок в количестве 40—60 мл фильтруется в воронке Зейтца через мембранный фильтр № 3, задерживающий бактерий. Фильтры высушивают и в таком виде хранят до возвращения в лабораторию. Здесь их обрабатывают 2%-й соляной кислотой для удаления остатков радиоактивного карбоната так, как это было описано в методике определения

продуктивности фотосинтеза фитопланктона. Радиоактивность фильтров определяют под торцовым счетчиком Гейгера—Мюллера.

7. Величину суточного хемосинтеза рассчитывают по следующей формуле: $C_x = \frac{C_{\text{карб.}} \cdot r}{R \cdot t} - C_{\text{гет}}$ мг С на 1 л в сутки,

где C_x — величина суточного хемосинтеза, в мг углерода на 1 л; $C_{\text{карб.}}$ — содержание углерода свободной углекислоты и бикарбонатов в воде; R — общая радиоактивность воды в склянках после добавления в них раствора $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$, выраженная в имп./мин. на 1 л; r — радиоактивность бактерий на фильтре в имп./мин. на 1 л профильтрованной воды; t — срок инкубации склянок в сутках; $C_{\text{гет}}$ — поправка на гетеротрофное усвоение CO_2 .

Способы определения углерода бикарбонатов $C_{\text{карб.}}$ и общей радиоактивности воды R приводятся в разделе методики определения продукции фотосинтеза фитопланктона.

Нужно заметить, что существенное значение при определении величины хемосинтеза в водоемах имеет поправка на усвоение углекислоты гетеротрофными микроорганизмами. Как показал Ю. И. Сорокин, величина эта для гетеротрофных бактерий равна около 2% от величины конструктивного обмена (Сорокин, 1962).

Для получения этой поправки необходимо знать общее количество бактерий в воде, учтенное прямым методом, время генерации бактерий и вычислить их биомассы.

Если количество бактерий в 1 мл равно 1 млн и время генерации 24 часа, а средний объем бактериальной клетки $0.5 \mu^3$, то за сутки прирост бактерий в 1 л, выраженный в сухом весе, будет примерно равен 0.16 мг или 0.08 мг углерода. Таким образом, гетеротрофная фиксация углекислоты будет равняться 0.0016—0.002 мг углерода на 1 л воды в сутки.

Соответствующую величину следует вычитать из величины хемосинтеза, которая определяется радиоуглеродным методом.

б. Определение продукции органического вещества в иловых отложениях за счет процессов хемосинтеза .

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 могут достигать наибольшей интенсивности именно в поверхностном слое ила.

Методика определения величины хемосинтеза в иловых отложениях была разработана Ю. И. Сорокиным (1958) и с некоторыми изменениями приводится ниже.

1. Монолит ила для определения величины хемосинтеза отбирается из водоема стратометром. 6—7 мл ила из определенного слоя монолита вводят в баночку из-под пенициллина и доливают придонной водой до пробки, туда же вводят 1 мл радиоактивного карбоната с удельной радиоактивностью около 10—15 μ Си или $1-2 \times 10^6$ имп. в 1 мин. при подсчете под счетчиком.

2. Баночки плотно закрывают резиновой пробкой так, чтобы под ней не осталось пузырька воздуха, помещают в черные мешочки 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 раствором 0.001N NaOH и встряхивают на качалке 10 мин. для отделения бактерий от частичек ила (Сорокин, 1958).

4. После отстаивания в течение 1—2 мин. и осаждения крупных частичек ила 10.5—1.0 мл болтушки фильтруется через мембранный фильтр № 2. Фильтр обрабатывается 3%-м раствором соляной кислоты для удаления радиоактивных карбонатов, высушивается и радиоактивность образовавшегося органического вещества бактериальных тел определяется под торцовым счетчиком Гейгера—Мюллера.

5. Если на фильтре образуется слишком плотный осадок из частичек ила, то возникает необходимость найти поправку на самопоглощение осадком β -излучений.

Для определения такой поправки фильтр с осадком нерадиоактивного ила в том же разведении высушивается. При этом осадок в виде лепешки отделяется от фильтра и им накрывается активный препарат C^{14} . Под счетчиком определяется степень ослабления излучения после прохождения его через толщу ила. Это и является удвоенной величиной поправки на самопоглощение.

6. Общее количество минеральных форм углерода, участвующих в хемосинтезе, величина $C_{\text{карб.}}$, определяется путем отгонки углекислоты из ила в специальном приборе (рис. 20). В кьельдалевскую колбу А емкостью в 50 мл вносится 10—15 г анализируемого ила, 2 мл спирта и 20 мл воды. В поглотитель В наливают 20 мл 0.1N едкого калия. В приборе создается вакуум и через него пропускают слабый ток воздуха, очищенного от углекислоты крепкой щелочью в поглотителе Б. Ил в колбе доводится до кипения и кипятится 3—5 мин, после чего ток воздуха усиливают и углекислота отгоняется из ила в щелочь. После ее отгонки количество углекислоты определяется обратным титрованием едкого калия 0.05N раствором соляной кислоты в присутствии $BaCl_2$. 1 мл 0.05N соляной кислоты соответствует 0.3 мг углерода.

7. R радиоактивность раствора $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$, вносимого в опыт, определяется в виде BaCO_3 . С этой целью рабочий раствор $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$ разводится в 100 раз. Для анализа берется 1 мл этого раствора.

Осаждение хлористым барием производится так, как это было указано в разделе «Определения продукции фотосинтеза».

8. Суточный хемосинтез можно рассчитать по формуле: $C_x = \frac{r \cdot C_k \cdot 1000}{R \cdot v \cdot n} - C_{\text{гет.}}$ мг углерода на 1 л сырого ила в сутки, где C_x — интенсивность хемосинтеза в миллиграммах углерода на 1 л ила в сутки; $C_{\text{гет.}}$ — усвоение углекислоты гетеротрофными бактериями в мг С на 1 л ила в сутки; r — радиоактивность новообразованного органического вещества за время опыта в пересчете на весь объем ила в имп./мин., учтенных под счетчиком; C_k — количество минеральных форм углерода в илу, свободно обменивающих свой углерод с радиоактивным углеродом $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$ в миллиграммах углерода в пересчете на все содержимое опытного сосуда; R — радиоактивность раствора $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$, внесенного в опыт в имп./мин., учтенных под счетчиком; v — объем ила, взятого в опыт, в мл; n — срок инкубации, в сутках.

Для определения в пробе количества углекислоты, участвующей в хемосинтезе, необходимо определить содержание ее во всем объеме ила, внесенного в опыт, и прибавить к этой величине количество углекислоты в том объеме придонной воды, который был добавлен к илу для заполнения опытного сосуда.

9. Поскольку в иловых отложениях находится большое количество гетеротрофных бактерий, необходимо в полученную величину вводить поправку на гетеротрофное усвоение углекислоты — $C_{\text{гет.}}$, аналогично тому, как это делается в случае определения хемосинтеза в водной массе $C_{\text{гет.}} = \frac{B \cdot \Gamma \cdot 2}{100}$ мг С на 1 л сырого

ила в сутки. $C_{\text{гет.}}$ — усвоение CO_2 гетеротрофными бактериями в мг углерода в сутки в 1 л сырого ила; B — биомасса бакте-

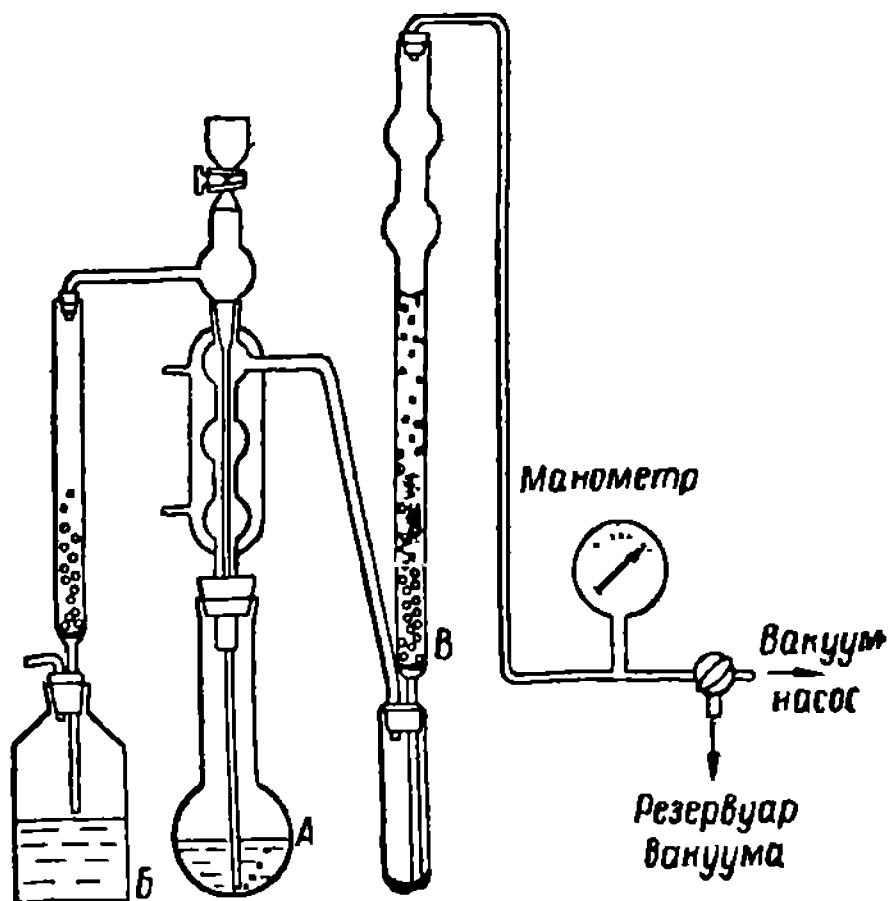


Рис. 20. Схема прибора для определения углекислоты и карбонатов в воде и илах (при определении величины хемосинтеза). Объяснение в тексте.

рий в 1 л сырого ила в мг С (расчет биомассы на основании численности бактерий смотри выше); G — число генераций бактерий в сутки. Величину эту условно можно считать равной числу генераций бактерий в придонном слое воды, т. к. методы определения времени генерации бактерий в иловых отложениях в настоящее время еще не разработаны; $\frac{2}{100}$ — коэффициент, полученный опытным путем, показывает, что 2% от продукции биомассы бактерий произошло за счет гетеротрофного усвоения углекислоты.

10. Принимая во внимание, что для анализа берется ил из слоя отложений толщиной в 1 см, правильное весь расчет делать не на 1 л ила, а на слой ила в 1 см толщиной, площадью в 1 м². Для этого величину хемосинтеза полученную на 1 л, следует помножить на 10.

8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ПРОЦЕССА РЕДУКЦИИ СУЛЬФАТОВ (ПРИМЕНЕНИЕ 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 в тех же температурных условиях, которые имеются в водоеме. Применение меченого сульфата позволяет определить наличие процесса сульфатредукции и учесть его активность, а высокая чувствительность изотопного метода дает возможность определить ничтожно малые изменения в соотношении сульфатов и сероводорода, измеряемые сотыми и тысячными долями миллиграмма на 1 л. Метод был предложен М. В. Ивановым (Иванов, 1956, 1959; Иванов и Теребкова, 1959).

Сущность метода определения интенсивности сульфатредукции основана на том, что в изолированный объем исследуемой воды или ила вносится определенное количество радиоактивного сульфата натрия $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$. Образец помещается в темном сосуде обратно в водоем или сохраняется в лаборатории при температуре, соответствующей температуре водоема. После одного-двух дней инкубации в нем определяется количество образовавшегося меченого сульфида. В качестве контроля ставится параллельный опыт, в который одновременно с меченым сульфатом вносится формалин или другой антисептик. Как правило, в контроле меченый сульфид не образуется. Появление меченого сульфида в опыте с антисептиком показывает наличие абиогенного процесса восстановления сульфатов.

Вся процедура метода заключается в следующем.

1. Образцы испытуемой воды, отобранные с определенной глубины водоема, из одного плексигласового батометра Руттнера помещают в склянки с притертой пробкой объемом около 100 мл. В каждую склянку вносят пипеткой со шприцем по 1 мл меченого сульфата натрия $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ с удельной активностью около 1 μ Си. В контрольную склянку, кроме $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$, вносят 1 мл 40%-го формалина.

2. Склянки закрывают притертой пробкой так, чтобы под ней не осталось пузырька воздуха, и помещают на 1 сутки обратно в водоем на ту же глубину, с которой был взят образец воды, или в водный термостат с температурой, которая соответствует температуре водоема.

3. После периода экспозиции склянок весь сероводород фиксируют в них путем добавления раствора уксуснокислого кадмия в уксусной кислоте до прекращения выпадения желтого осадка, а микрофлору убивают добавлением 40%-го формалина.

4. По возвращении в лабораторию сероводород отгоняют из подкисленной пробы воды в раствор щелочи в атмосфере водорода или по методу Ю. И. Сорокина (см. ниже) и вновь осаждают уксуснокислым кадмием в виде осадка CdS^{35} . Таким образом гарантируется отсутствие загрязнения осадка сернистого кадмия радиоактивными сульфатами, которые были внесены в пробу воды при постановке опыта.

5. Осадок сернистого кадмия отфильтровывают через мембранный фильтр № 3 диаметром равным диаметру слюдяного окошечка счетчика Гейгер—Мюллера. Вес осадка сернистого кадмия на мембранном фильтре не должен превышать 0.5 мг сульфид-иона на 1 cm^2 фильтра, тогда исключается поправка на самопоглощение осадка.

6. После отгонки сероводорода в определенном объеме воды сульфаты осаждают 5%-м раствором хлористого бария или хлористым бензидином, отфильтровывают на мембранном фильтре и их активность определяют под торцовым счетчиком Гейгера—Мюллера.

7. Общее содержание сульфатов в воде определяют путем титрования хромовым или бензидинным методом или весовым путем, осаждая их в виде сернокислого бария.

8. Определение радиоактивности внесенных сульфатов в виде $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ и радиоактивности образовавшихся меченых сульфидов следует производить в один день, тогда отпадает поправка, связанная с падением радиоактивности за счет распада S^{35} .

9. Абсолютную интенсивность процесса образования сероводорода можно рассчитать в мг/л в сутки, исходя из следующей пропорции

$$\frac{x}{S_{\text{SO}_4}} = \frac{r_{\text{CdS}}}{R_{\text{SO}_4}},$$

где x — количество образовавшегося сероводорода, в мг/л; S_{SO_4} — мг/л количество сульфатов, выраженное в сере; R_{SO_4} — радиоактивность исходных сульфатов; r_{CdS} — радиоактивность образовавшихся сульфидов.

Отсюда $x = \frac{S_{SO_4} \cdot 24 \cdot 1.06 \cdot r_{CdS}}{R_{SO_4} \cdot t}$ мг/л H_2S в сутки, где t — время опыта в часах; 1.06 — коэффициент перехода от серы к сероводороду.

9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ПРОЦЕССА ОКИСЛЕНИЯ СУЛЬФИДОВ И СЕРОВОДОРОДА (ПРИМЕНЕНИЕ 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 окрашенных 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, и поэтому процесс этот может идти только на свету в отсутствие кислорода воздуха.

Схема постановки опытов была разработана М. В. Ивановым (1959) и заключается в том, что в изолированный объем испытуемой воды вводится меченый по сере сульфид натрия, а в конце опыта, через сутки, определяется количество образовавшихся меченых сульфатов и молекулярной серы. С каждым образцом воды ставится три варианта опыта (табл. 6). Продажный сульфид натрия Na_2S^{35} часто бывает загрязнен меченым сульфатом $Na_2S^{35}O_4$, поэтому перед постановкой опытов сульфид следует очищать перегонкой в щелочь из кислого раствора.

Т а б л и ц а 6

Схема постановки опытов по определению процессов окисления сульфидов в естественных водоемах

Вариант опыта	Процессы, происходящие в склянке
1. Светлая склянка без формалина.	Сероводород окисляется химическим путем, тионовыми и бесцветными серобактериями и окрашенными серобактериями.
2. Светлая склянка с формальном.	Сероводород окисляется только химическим путем, так как микрофлора убита.
3. Темная склянка без формалина.	Сероводород окисляется химическим путем и тионовыми бактериями. Окрашенные серобактерии неактивны, так как свет отсутствует.

Вся процедура опыта заключается в следующем.

1. Вода из водоема отбирается с определенной глубины плексигласовым батометром Рутнера. Из одного батометра заполняются три склянки белого стекла с притертыми пробками объемом 100—150 мл.

В каждую склянку пипеткой со шприцем вносят 1 мл раствора Na_2S^{35} удельной радиоактивности 0.3—0.5 μ Си или 50—70 тыс. имп./мин. при подсчете под торцовым счетчиком с коэффициентом подсчета около 7.

В первую контрольную склянку одновременно вносят 1 мл 40%-го формалина. Вторую склянку помещают в черный мешочек, а третья остается светлой.

2. Склянки закупоривают притертыми пробками и помещают на соответствующую глубину в водоем на 24 часа.

3. По окончании опыта тотчас после извлечения склянок из водоема остаточные сульфиды во всех склянках фиксируют раствором уксуснокислого кадмия и в таком виде пробы доставляют в лабораторию. Анализ форм серы производится согласно схеме, представленной на рис. 21.

4. Часть воды из каждой склянки фильтруют через мембранный фильтр в воронке Зейтца с внутренним диаметром около 2 см, соответствующим диаметру слюдяного окошечка торцового счетчика Гейгер—Мюллера, 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 пурпурных серных бактерий. Общая их радиоактивность определяется под торцовым счетчиком.

5. Фильтрат подкисляют соляной кислотой и сульфаты в нем осаждают 10%-м раствором хлористого бария. Осадок сернокислого бария отфильтровывают на мембранном фильтре и его активность определяют под торцовым счетчиком.

6. Из второй порции испытуемой воды (см. пункт 3), после растворения соляной кислотой осадка сернистого кадмия, сероводород отгоняют в раствор йода или щелочи. В воде остается молекулярная сера, капельная в клетках бактерий, и сульфаты. Количество сероводорода определяется в отгоне титрованием.

7. Вода, оставшаяся после отгонки сульфидов, фильтруется через мембранный фильтр, на котором остается молекулярная и внутриклеточная сера. Фильтр промывается раствором нерадиоактивного сернокислого натрия, и сумма активности молекулярной и внутриклеточной серы $S_{\text{мол.}}$ определяется под торцовым счетчиком.

8. После этого фильтр обрабатывается бензолом. При этом молекулярная сера растворяется, а активность внутриклеточной серы вновь определяется под торцовым счетчиком.

Расчет интенсивности окисления сероводорода до молекулярной серы или до сульфатов производится по формуле

$$x = \frac{S_{H_2S} \cdot 24 \cdot r_{SO_4}}{R_{H_2S} \cdot t} \text{ мг/л } S_{SO_4} \text{ в сутки,}$$

$$y = \frac{S_{H_2S} \cdot 24 \cdot r_S}{R_{H_2S} \cdot t} \text{ мг/л } S_{\text{мол.}} \text{ в сутки,}$$

где S_{H_2S} — общее количество серы сульфидов в воде после добавления меченого сульфида, в мг/л; R_{H_2S} — общая радиоактивность добавленного Na_2S^{35} , в имп./мин. на 1 л; r_{SO_4} — общая радиоактивность серы образовавшихся сульфатов, в имп./мин. на 1 л; r_S — общая радиоактивность молекулярной серы, образовавшейся за счет окисления в темноте сульфидов тионовыми бактериями, в имп./мин. на 1 л; t — время опыта, в час.

Расчет интенсивности отдельных процессов окисления серы производится, исходя из вышеприведенной схемы опытов (рис. 21).

10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ 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 для микроорганизмов. Окисление легкодоступной части органического вещества происходит при участии микроорганизмов и чисто химическим путем. В качестве окислителя используется растворенный в воде кислород.

Таким образом под биохимическим потреблением кислорода или «БПК» понимается величина потребления растворенного кислорода в миллиграммах на 1 л на окисление легкодоступной части органических веществ, находящихся в этой воде при участии бактерий и химических процессов.

Если для анализа берется нефльтрованная вода, то тогда определяется сумма растворенных и взвешенных веществ. В случае фильтрованной воды определяются лишь растворенные легкоокисляемые органические вещества.

При определении химического потребления кислорода или условно «ХПК» постановка опыта остается та же, как это будет описано ниже для определения БПК, только в воду вносится несколько капель насыщенного раствора сулемы, чтобы прекратить деятельность бактериального населения.

Путем большого количества анализов удалось установить, что, как правило, окислительный процесс во времени идет с убы-

вающей скоростью. Таким образом, к нему приложимо уравнение мономолекулярных реакций, а именно .

$$\lg \frac{D}{D - D_t} = Kt,$$

где D — полное БПК, в мг O_2 /л; D_t — БПК за t дней, в мг O_2 /л; K — константа скорости биохимического потребления кислорода.

Графически поглощение кислорода на окисление растворенных легко окисляемых веществ может быть представлено логариф-

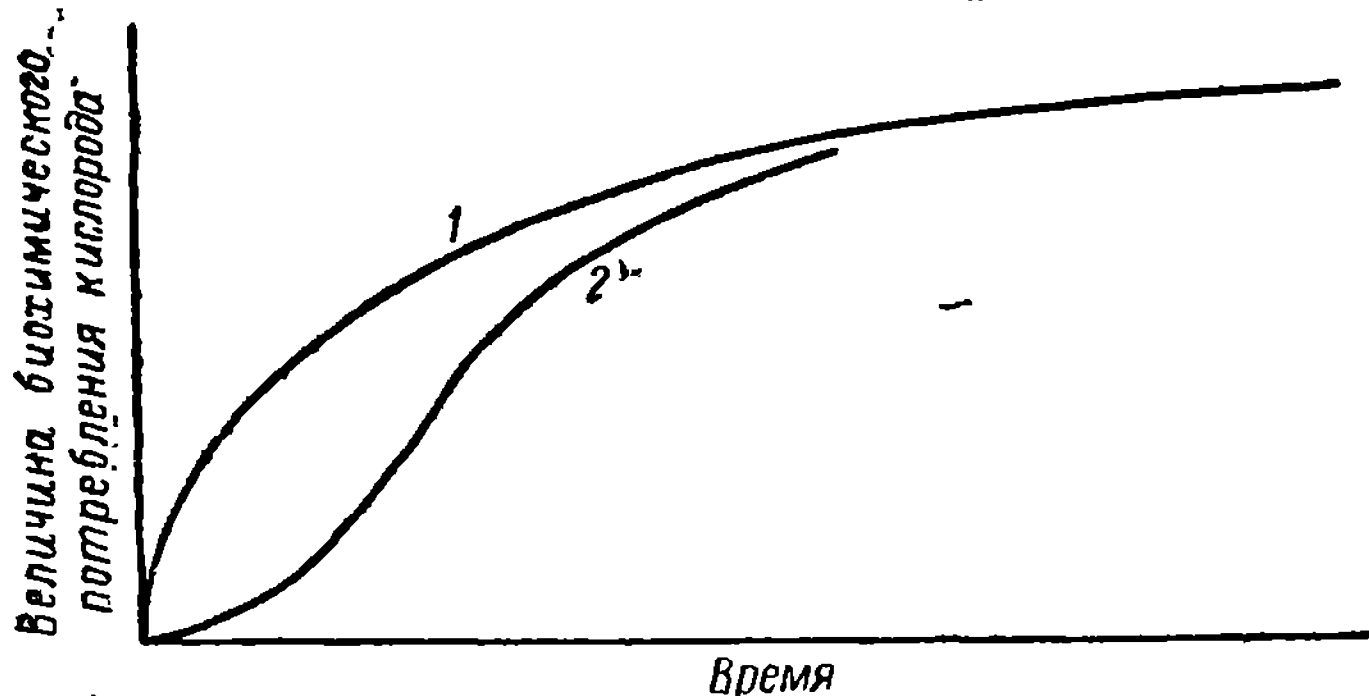


Рис. 22. Различные типы кривых биохимического потребления кислорода.

1 — потребление кислорода идет согласно закону мономолекулярных реакций; 2 — потребление кислорода не соответствует закону мономолекулярных реакций.

мической кривой 1, как это видно из рис. 22 (Лапшин, 1952). В этом случае можно по формуле вычислить полное БПК на основании двух наблюдений, сделанных через разные промежутки времени.

Однако в ряде случаев, когда в водоем поступают органические вещества, не свойственные для автохтонной микрофлоры, то 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 уже нельзя вычислить по приведенной выше формуле и наиболее приближенные величины БПК могут быть получены непосредственным наблюдением в длительном опыте.

Определение ведется следующим образом.

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 ее в течение 1 мин. или

продувая через нее воздух при помощи резиновой груши или насоса. Дают пузырькам воздуха выйти из воды.

3.. Воду из колбы разливают при помощи сифона в 5 склянок с притертыми пробками так, чтобы в них не осталось пузырька воздуха.

4. В одну из склянок добавляют реактивы и определяют исходное содержание растворенного в воде кислорода. На остальные четыре склянки надевают водяные затворы, чтобы предохранить попадание воздуха в склянки во время их инкубации в термостате.

В качестве водяного затвора используются резиновые соски. Соску заполняют водой. Опытную склянку переворачивают вверх дном и на ее горлышко натягивают заполненную водой соску так, как это показано на рис. 23.

5. Склянки инкубируются в термостате при температуре 20°. По прошествии трех дней в двух склянках из четырех определяют содержание растворенного кислорода. По прошествии шести дней содержание растворенного кислорода определяется в остальных двух склянках.

Разность в содержании кислорода между исходной водой и после трех суток инкубации при 20° обозначается как БПК₃ и соответственно после шести дней инкубации как БПК₆. Для сравнения различных водоисточников аналогичным же образом определяется в специальном опыте БПК₅ после пятисуточной экспозиции при 20°.

6. Расчет константы скорости биохимического потребления кислорода и полного БПК производится по нижеприведенным формулам (Лашин, 1952)

$$\text{БПК}_{\text{пол.}} = \frac{a_1^2}{2a_1 - a_2}, \quad K = \frac{1}{t} \lg \frac{a_1}{a_2 - a_1},$$

где a_1 — БПК за t суток, в частности за 3 дня; a_2 — БПК за $2t$ суток, в частности за 6 дней.

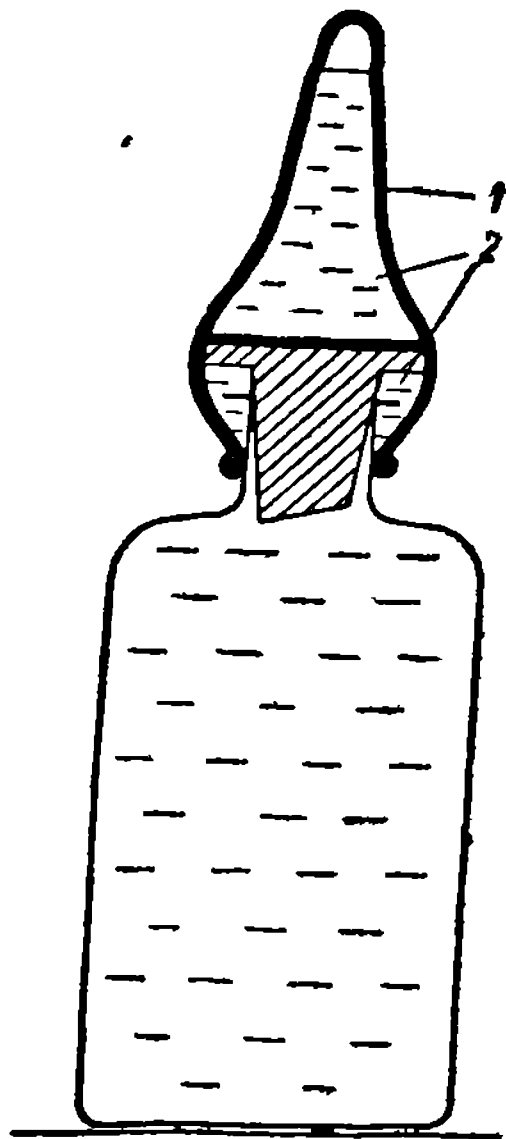


Рис. 23. Схема водяного затвора склянок при определении БПК.

1 — соска; 2 — водяной vapor.

И. АНАЛИЗ ВОДЫ НА ПРИСУТСТВИЕ В НЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФЕКАЛЬНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Наличие фекального загрязнения воды устанавливается нахождением в ней бактерий из группы кишечной палочки — *Bact. coli*, в которую включаются также бактерии из подгруппы *coli aerogenes*. Вся группа бактерий, показателей фекального загрязнения, характеризуется следующими признаками: это аэробные, короткие, грамотрицательные, неспороносные 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 водоема.

Результаты анализа выражаются или в виде коли-индекса, т. е. количества показательных бактерий 1000 мл воды, или параллельно они могут быть выражены 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).

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 кладут верхнюю часть прибора — стакан воронки, и закрепляют ее.

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 пинцетом, обожженным на пламени газовой или спиртовой горелки, и просушивают на воздухе, пока на его нижней стороне исчезнут капли воды. Фильтр помещают в чашки Петри на поверхность застывшей среды Эндо (№ 10). Необходимо следить, чтобы под фильтром не осталось пузырька 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.

В ы р а щ и в а н и е. Чашки с посевами ставят в термостат стопочками не более 3—4 штук, повернув крышками вниз. Инкубируют посевы 24 часа при 37°.

У ч е т р е з у л ь т а т о в а н а л и з а. По окончании выращивания результаты анализа учитывают, согласно схеме (рис. 24). Крышку с чашки Петри снимают и, пользуясь лупой

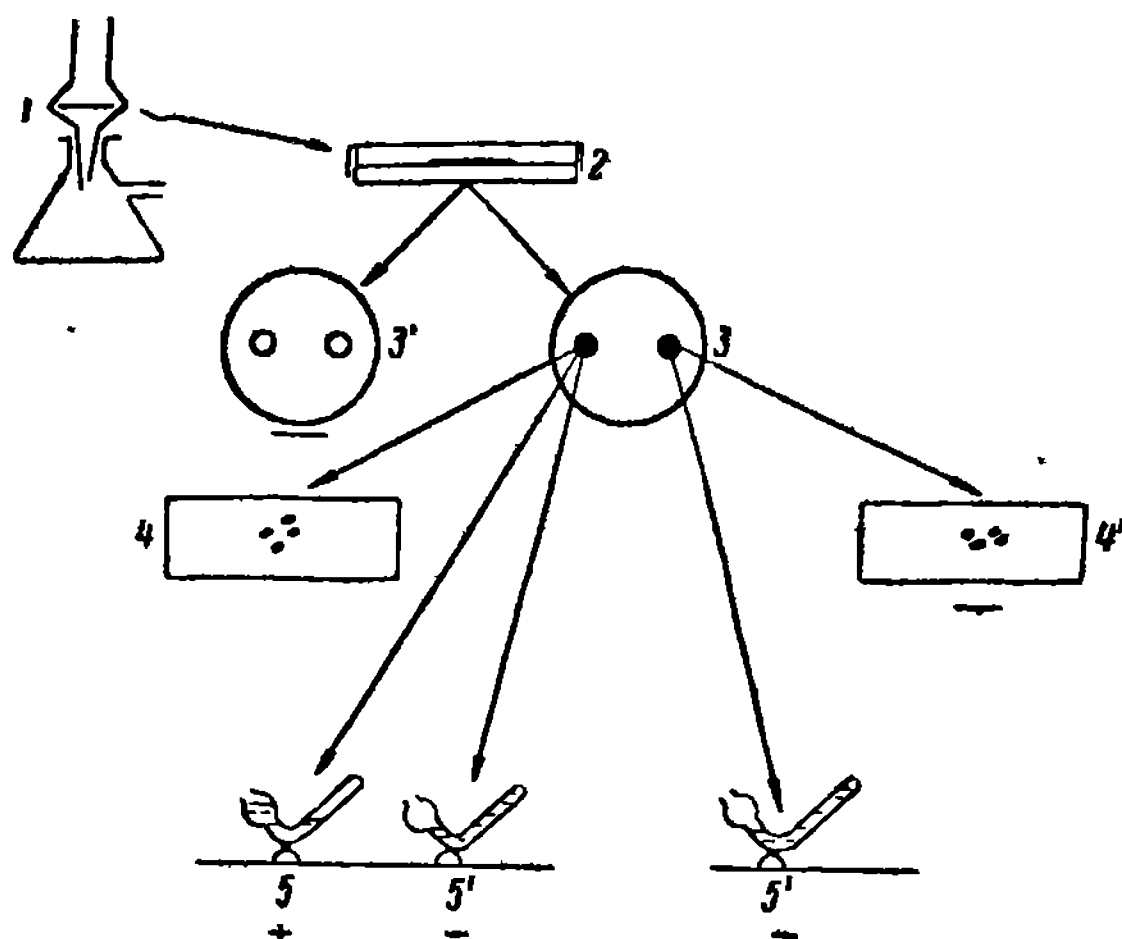


Рис. 24. Схема анализа воды на фекальные загрязнения.

1 — фильтрование воды через мембранный фильтр; 2 — выращивание 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 Экмана при посеве из золотистых колоний; 5' — отсутствие газообразования на среде Экмана. Результаты опытов: — окончательный отрицательный результат, + окончательный положительный результат.

с увеличением $\times 10$ или бинокулярным микроскопом, подсчитывают типичные колонии.

Отсутствие в посевах «типичных» колоний дает окончательный отрицательный ответ. При наличии типичных колоний из некоторых делают мазок и окрашивают по Граму. Отсутствие грамотрицательных, неспоровых клеток дает окончательный отрицательный ответ на фекальное загрязнение.

При наличии колоний грамотрицательных бактерий из них делают посев в пробирки с поплавками (рис. 10, Б) со средой Экмана (№ 11). Посевы выращивают 24 часа при 43—45°. Отсутствие газообразования дает отрицательный и окончательный

ответ во всех случаях анализа воды на фекальное загрязнение.

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 было не более 50 колоний. Если вода сильно загрязнена, то ее следует предварительно развести в 10 или 100 раз стерильной водой.

Часть VI

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 РЕАКЦИИ 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 изготовлении питательных сред такой точности определений не требуется и возможно пользоваться колориметрическим методом сравнения со стандартными растворами при добавке соответствующих индикаторов.

а. Приготовление растворов индикаторов по Кларку

Кларковские индикаторы представляют собой в продажном виде свободные кислоты и плохо растворимы в воде. Для перевода их в раствор 0.1 г индикатора растирают в ступке с указанным в табл. 7 количеством 1/20N раствора NaOH 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 рН на 10 мл испытуемой жидкости добавляется 5 капель раствора индикатора.

Пределы концентрации водородных ионов, в которых отдельные индикаторы меняют свою окраску, также приведены в табл. 7.

Приготовление индикаторов по Кларку

Индикатор	Интервал рН для применения индикаторов	Изменение цвета	Количество мл 1/20 N раствора NaOH на 0.1 г индикатора
Тимол блау (кислый)	1.2—2.8	Красный—желтый	4.3
Бром фенол блау	3.0—4.6	Желтый—голубой	3.0
Метил рот	4.4—6.0	Красный—желтый	7.4
Бром крезол пурпур . .	5.2—6.8	Желтый—пурпурный	3.7
Бром тимол блау	6.0—7.6	Желтый—синий	3.2
Фенол рот	6.8—8.4	Желтый—красный	5.7
Крезол рот	7.2—8.8	Желтый—красный	5.3
Тимо блау (щелочной)	8.0—9.6	Желтый—синий	4.3
Крезол фталеин	8.2—9.8	Бесцветный—красный	
Метил оранж	3.1—4.4	Оранжевый—красный	
Фенол фталеин	8.3—10.0	Бесцветный—красный	

б. Метод Джиллесапи определения рН без буферных растворов

Метод основан на том принципе, что при рассматривании двух находящихся друг за другом пробирок с кислым и щелочным растворами индикатора при варьировании количества индикатора, находящегося в пробирке с кислым и щелочным растворами, 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 была тождественна с окраской испытуемой воды. Окраска в паре пробирок 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. 8.

Этот метод определения рН применим как в поле, так и в лаборатории.

Необходимы следующие материалы:

- 1) соляная кислота; растворы приблизительно равны 0.001, 0.1 и 0.5 объемных процентов от концентрированной;
- 2) едкий натрий; растворы приблизительно N/20 и N/200;
- 3) чистые пробирки одинакового диаметра;
- 4) растворы индикатора;

5) пипетки, градуированные на 0.1, 1.0 и 10.0 мл.

Рекомендуется следующий метод определения:

1) располагают в штативе 18 пробирок в 2 ряда так, чтобы одна стояла против другой;

2) надписывают каждую пару пробирок от № 1 до № 9;

3) в каждую пробирку первого ряда добавляют по 10 мл щелочного раствора и в каждую пробирку второго ряда по 10 мл кислоты той концентрации, которая показана в табл. 8;

4) готовят основные спиртовые 0.2%-е растворы индикаторов, которые перед употреблением разводят водой до концентрации, указанной в табл. 9, т. е. в 10 раз, за исключением фенол рот, который разводят в 5 раз;

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. 25).

Джиллеспи рекомендует вести определение в пробирках 1.5×15 см, подбирая их по диаметру. При определении в ряд пробирок наливается 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,

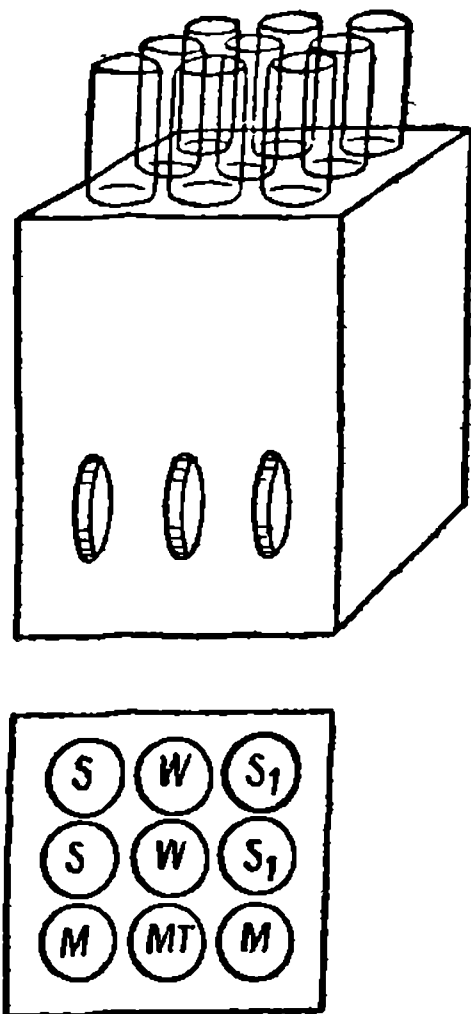


Рис. 25. Схема устройства компаратора для определения pH по методу Джиллеспи.

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 добавленного индикатора, по методу Джиллеспи.

Таблица 8

Приготовление стандартных цветных растворов для определения рН по методу Джиллесли (по: Levine, 1954)

Количество водного раствора индикатора в мл		Значение рН для каждой пары пробирок							
пробирка с кислотой	пробирка со щелочью	тимол блау кислый	бром фенол блау	метил рот	бром крезол пурпур	бром тимол блау	фенол рот	крезол рот	тимол блау щелочной
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	5.2	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 раствора индикатора, в %		0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.04	0.02	0.02
Раствор для получения щелочного индикатора		0.001% HCl	N/200 NaOH	N/20 NaOH	N/20 NaOH	N/20 NaOH	N/100 NaOH	N/20 NaOH	N/20 NaOH
Раствор для получения кислого оттенка индикатора		0.5% HCl	0.1% HCl	0.1% HCl	0.1% HCl	0.1% HCl	0.1% HCl	0.1% HCl	0.001% HCl

независимо от того участвует ли в этой реакции молекулярный кислород. 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 потенциала и является показателем напряжения окислительных процессов. Окислительно-восстановительный потенциал может быть выра-
жен в вольтах и представлять разность потенциалов между нор-
мальным водородным электродом и потенциалом, который при-
нимает пластинка из индифферентного металла в равновесии
с окружающей средой. Другой формой выражения окислительно-

восстановительного потенциала является индекс rH_2 , представляющий собой отрицательный логарифм концентрации молекулярного водорода, при которой могут создаваться данные окислительно-восстановительные условия.

Зависимость между этими величинами выражается следующим образом

$$E_h = 0.029 (rH_2 - 2pH) \text{ или } rH_2 = \frac{E_h}{0.029} + 2pH.$$

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 водородных ионов сильно сказываются на величине pH и еще более на величине rH_2 (Работнова, 1957).

Определения окислительно-восстановительного потенциала лучше всего вести с ламповым потенциометром. Наилучшим в полевых условиях является модель „30V portable pH meter“ фирмы „Electronic Instruments Limited, Richmond, Surrey, England“. Без лампового усилителя для избежания поляризации электрода рекомендуется подключать параллельно испытуемому элементу конденсатор емкостью 2 микрофарада (Сердобольский, 1954).

1. Электроды для определения окислительно-восстановительного потенциала готовятся из платиновой проволоки диаметром в 0.5 мм, впаиваются в стеклянную трубочку так, чтобы свободный конец был длиной в 1 см. Платинировать электроды не следует, так как это вызывает ошибку анализа.

Электроды очищаются последовательной обработкой крепким раствором едкого натрия и горячей азотной кислотой и тщательно промываются дистиллированной водой. Перед употреблением электроды калибруют. С этой целью берут стандартный раствор смеси $M/300 K_3 Fe(CN)_6$ и $M/300 K_4 Fe(CN)_6$ в $M/10 KCl$, который имеет значение $E_h = +0.430$ в. при 25° . Электроды должны показать правильный окислительно-восстановительный потенциал. Если показания отличаются от теоретических, то электроды подвергаются повторной очистке. Следует тщательно проверять, чтобы не было трещин в месте впая платиновой проволоки в стеклянную трубочку.

2. При определении окислительно-восстановительного потенциала следует тщательно следить, чтобы испытуемые образцы воды или ила не соприкасались с воздухом. С этой целью для определения окислительно-восстановительного потенциала в воде можно рекомендовать следующую форму сосуда.

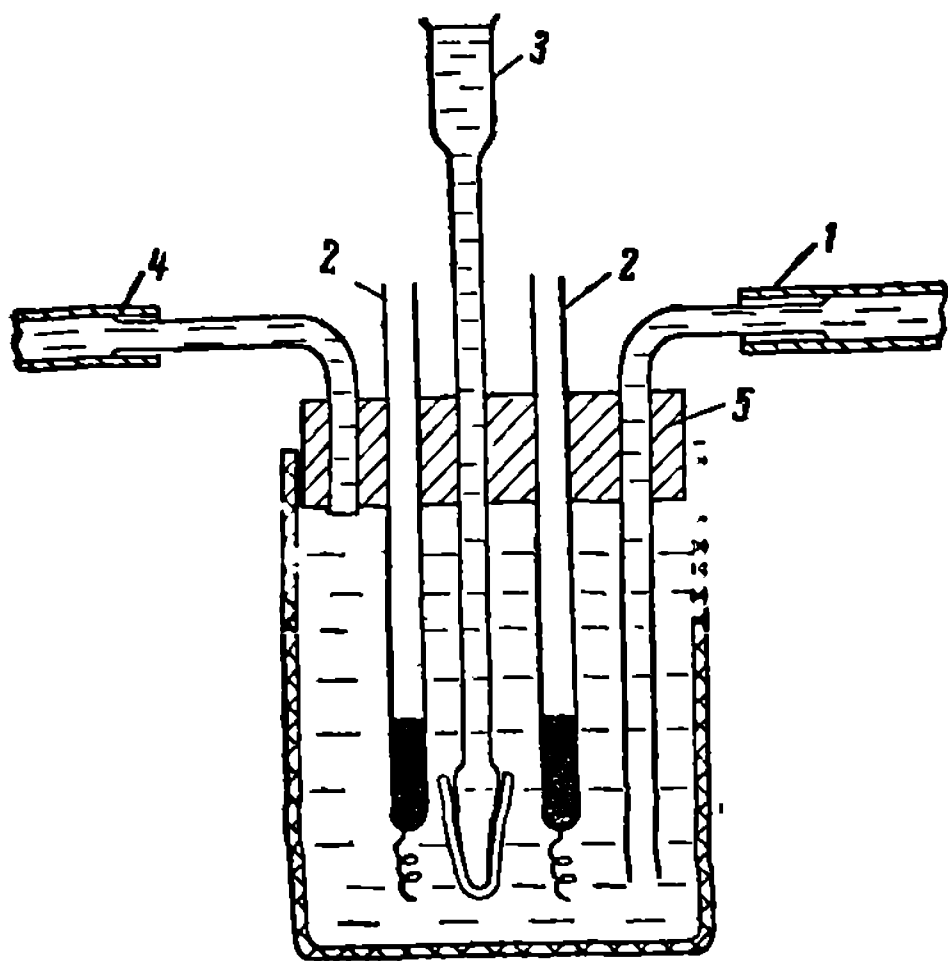


Рис. 26. Форма сосуда для определения окислительно-восстановительного потенциала в воде.

1 — подводящая трубка; 2 — платиновый электрод; 3 — сифончик каломельного электрода; 4 — выводная трубка; 5 — пробка с вмонтированными электродами.

лочковидный каломельный электрод 3 или сифончик, заполненный агаром на насыщенном хлористом калии.

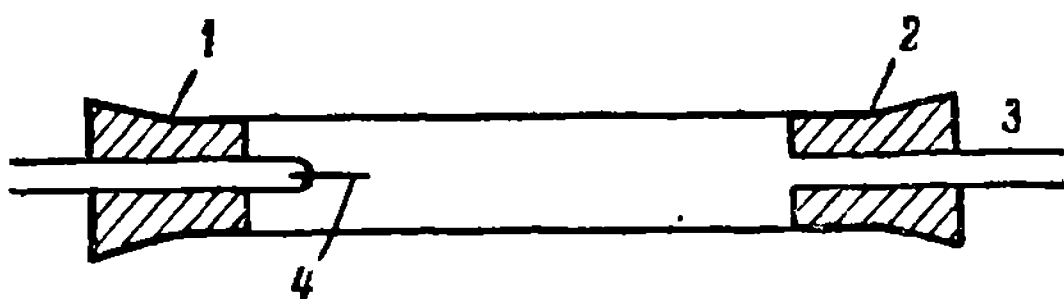


Рис. 27. Форма сосуда для определения окислительно-восстановительного потенциала в иле.

1 — резиновая пробка с электродом; 2 — резиновая пробка; 3 — трубка, через которую происходит контакт ила с раствором; 4 — гладкий платиновый электрод.

Для определения окислительно-восстановительного потенциала в иловых отложениях удобно использовать электрод, представленный на рис. 27. Последний состоит из стеклянной трубки диаметром 8—10 мм, к ней подобраны две резиновые пробки.

В одну из пробок вставлена стеклянная трубочка с впаянным в нее электродом (4) из платиновой проволоки. В другую пробку (2) вставлена стеклянная трубочка (3) с внутренним просветом в 2—3 мм. При заполнении сосуда пробку (1) с электродом (4) вынимают и наполняют непосредственно из взятого тем или иным путем образца ила, последний затягивают в стеклянную трубку вплоть до пробки 2, затем пробку вынимают и вставляют пробку 1 с электродом. При этом монолит с илом несколько продвигается к противоположному концу. После этого пробку 2 вновь вставляют

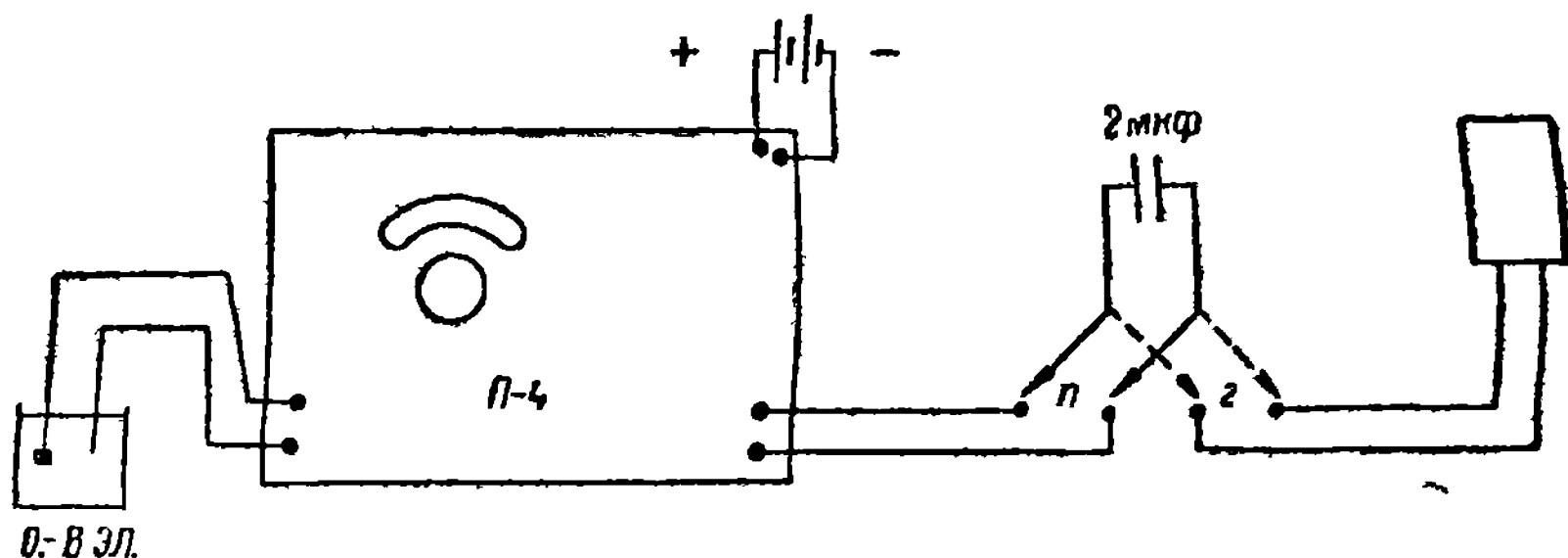


Рис. 28. Схема подключения конденсатора к потенциометру для исключения возможности поляризации гладкого платинового электрода. Объяснение в тексте.

так, чтобы между ней и илом не было пузырька воздуха. Избыток ила выступает через трубочку 3, которая и служит для контакта между электродом и соединительным сосудиком с насыщенным хлористым калием.

3. Отсчет окислительно-восстановительного потенциала производится в милливольтках и представляет разность потенциалов между платиновым и каломельным электродами и выражается через $E_{\text{кал.}}$. Если каломельный электрод присоединен к клемме потенциометра «—», то $E_{\text{кал.}}$ будет величиной положительной. Если каломельный электрод присоединен к клемме «+», то величина $E_{\text{кал.}}$ будет отрицательной

$$E_h = E_{\text{кал.}} + \alpha,$$

где α есть электродвижущая сила насыщенного каломельного электрода и при температуре 18° равна $+249$ милливольт.

4. Общая схема определения окислительно-восстановительного потенциала на потенциометре П-4 с подключением конденсатора представлена на схеме (рис. 28).

После присоединения к потенциометру сухого, нормального и испытуемого элементов включают конденсатор емкостью 2 мкФ и гальванометр, как это показано на схеме (рис. 28).

Для измерения электродвижущей силы переключатель переводят в положение л и включают ток, который аккумулируется на конденсаторе. Зарядка конденсатора продолжается от 15 сек. до 1 мин. в зависимости от того, насколько близко от точки компенсации производится отсчет по реохорду. Затем потенциометр выключают и переключатель переводят в положение г. При этом накопившийся на конденсаторе заряд сбрасывается на гальванометр, стрелка которого отклоняется.

После передвижки реохорда потенциометра на несколько делений операцию повторяют пока не будет достигнута компенсация и конденсатор перестанет заряжаться.

Для компенсации сухого элемента гальванометр непосредственно подключают к потенциометру П-4, минуя конденсатор.

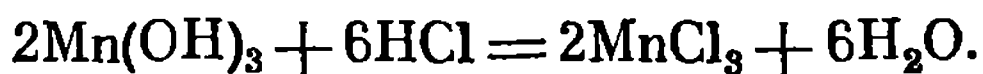
При такой схеме определений окислительно-восстановительного потенциала сила тока, проходящего через окислительно-восстановительный электрод при поисках компенсации, ограничена конденсатором. Ошибка измерения при включенном конденсаторе емкостью в 2 мкф не превышает 10 мв. Электроды не поляризуются.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАСТВОРЕННОГО В ВОДЕ КИСЛОРОДА ПО МЕТОДУ ВИНКЛЕРА

Сущность метода определения растворенного кислорода заключается в том, что гидрат закиси марганца в щелочном растворе окисляется за счет растворенного в воде кислорода с образованием гидрата окиси марганца



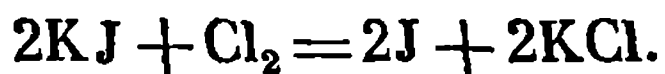
После растворения в соляной кислоте гидрат окиси марганца образует хлорный марганец



Хлорный марганец легко распадается с выделением свободного хлора



В присутствии йодистого калия свободный хлор выделяет из него эквивалентное количество йода



Следовательно, 2 атома йода эквивалентны одному атому кислорода. Количество выделившегося йода оттитровывается гипосульфитом.

Применяются следующие реактивы.

1. Раствор хлористого 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 йодистого калия готовят, растворяя 70 г KOH или 50 г NaOH и 15 г KI в дистиллированной воде и доводят объем до 100 мл.

3. Химически чистую соляную кислоту разводят дистиллированной водой в отношении 1 : 1 по объему или химически чистую серную кислоту 1 : 3 по объему.

4. Тиосульфат, 0.02N, раствор готовят разбавлением 0.2N раствора. Каждый миллилитр 0.02N раствора $\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_3$ эквивалентен 0.16 мг кислорода.

Анализ производится следующим образом.

1. Вода из водоема берется с соответствующей глубины батометром Руттнера. При наполнении склянок к крану батометра присоединяют резиновую или стеклянную трубку, которая опускается через горлышко до дна склянки. Следят, чтобы не проскакивало через воду пузырьков воздуха. Воду дают переливаться через верх склянки так, чтобы сменилось 2—3 объема. Склянки для анализа берут примерно одного объема 120—140 мл.

2. После заполнения склянки водой в нее тотчас же вносят по 0.5 мл раствора сернокислого марганца и щелочного раствора йодистого калия. Склянку закрывают притертой пробкой так, чтобы под ней не осталось пузырька воздуха, и содержимое склянки тщательно перебалтывают. Дают осадку осесть, примерно в течение минут 30.

3. После этого вводят 1 мл серной или соляной кислоты, закрывают склянку пробкой и тщательно перебалтывают так, чтобы осадок полностью растворился. Берут 50 мл жидкости, определяют количество выделившегося йода титрованием гипосульфитом в присутствии крахмала до обесцвечивания раствора.

4. Расчет растворенного кислорода производится по формуле
$$x = \frac{0.16F \cdot n \cdot 1000}{V_1 - V_2} \text{ мг } \text{O}_2 \text{ на 1 л, где } n \text{ — количество 0.02N раствора гипосульфата, в мл; } F \text{ — поправка на титр 0.02N гипосульфита; } V_1 \text{ — объем воды в склянке, в мл; } V_2 \text{ — объем взятых реактивов.}$$

Расчеты показывают, что если объемы склянок, взятых для серийных определений кислорода, колеблются не более 20 мл, в пределах от 120 до 140 мл, то можно титровать не весь объем склянки, 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 проводиться в случае 50 мл

титруемой жидкости по следующей формуле:
$$x = \frac{0.16 \cdot F \cdot n \cdot 1000}{49.6} = 3.22 \cdot F \cdot n \text{ мг } \text{O}_2 \text{ на 1 л.}$$

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРБОНАТОВ, СВОБОДНОЙ УГЛЕКИСЛОТЫ И ОРГАНИЧЕСКОГО УГЛЕРОДА В ГРУНТАХ ¹

Изучение грунтов Рыбинского водохранилища (Сорокин, 1959) показало, что соотношение свободной двуокиси углерода (CO_2) и связанных форм угольной кислоты (карбонаты) в иловых отложениях является весьма существенной величиной, которая до не-

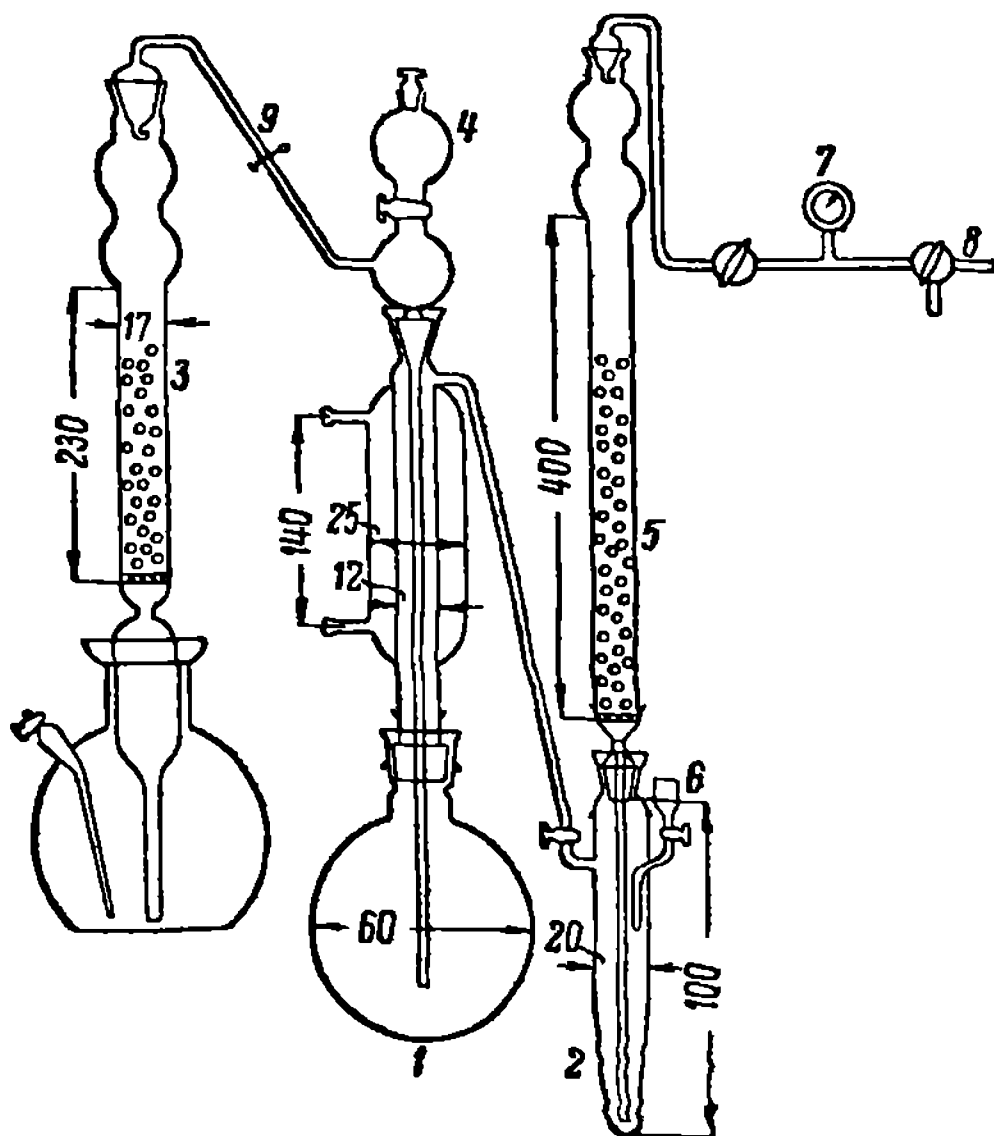


Рис. 29. Схема прибора для определения в воде и илах карбонатов и органического углерода.

1 — колба для разрушения карбонатов и сжигания органического вещества; 2 — пробирка, в которую вводится раствор щелочи; 3 — поглотитель углекислоты из воздуха; 4 — воронка для внесения испытуемого материала и реактивов; 5 — поглотитель углекислоты, выделившейся при обработке испытуемого материала; 6 — боковой отросток пробирки (можно работать без него); 7 — вакуумметр; 8 — к вакуумному насосу; 9 — зажим Мора. Размеры даны в мм.

которой 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 существова-

¹ Определение свободной углекислоты и карбонатов в воде см. в разделе определения фотосинтеза с C^{14} .

ния донной фауны, поскольку совместное присутствие свободных форм этих соединений токсично для организмов (Сорокин, 1958).

Ниже приводится описание методики, разработанной Ю. И. Сорокиным по определению CO_2 и карбонатов в грунтах. С небольшими видоизменениями эту методику можно использовать также и для анализа содержания в них органического углерода. Подобные определения необходимы в качестве контроля результатов анализа содержания органического углерода в грунтах путем прямого мокрого сжигания.

а. Определение CO_2 и карбонатов

Содержание CO_2 и карбонатов в илах определяется в приборе, изображенном на рис. 29. Ил в количестве 15—20 мл помещают в колбу 1 емкостью около 100 мл, в которую предварительно наливают 30—40 мл свежeproкипяченной воды. В пробирку 2 поглотителя 5 наливают 20 мл 0.1N раствора KOH , очищенного от CO_2 (можно брать из фиксаля), а в воронку 4 — 2 мл насыщенного раствора CuSO_4 и 0.5 мл бутилового спирта. Поглотитель 3 заполняют 20%-м раствором KOH . Затем в приборе создают вакуум (300—400 мм рт. ст.). После проверки прибора на герметичность при закрытом зажиме 9 через прибор с помощью этого же зажима устанавливают слабый ток воздуха. Воздух очищается от CO_2 , проходя через поглотитель 3. В колбу 1 из воронки 4 вносят раствор CuSO_4 и бутиловый спирт. Сернокислую медь добавляют в ил для связывания сероводорода, мешающего определению CO_2 . Образующийся при этом осадок CuS не разлагается при последующем подкислении ила. Бутиловый спирт добавляется для предотвращения вспенивания ила. Содержимое колбы 1 нагревают до кипения и кипятят 2—4 мин. Затем горелку отставляют и усиливают ток воздуха. Двуокись углерода отгоняют в щелочь в течение 10—15 мин., после чего прибор отсоединяют от вакуума. Щелочь из поглотителя 5 смывают 100 мл прокипяченной горячей дистиллированной воды в склянку с притертой пробкой, в которую добавлено 1.0 мл 10%-го раствора BaCl_2 . Через 5 мин. избыток щелочи, не вошедшей в реакцию с CO_2 , оттитровывают 0.05N HCl с индикатором фенолфталеином.

Далее из той же пробы, после отгонки из нее свободной CO_2 , делают отгонку карбонатной CO_2 . Для этого в пробирку 2 поглотителя 5 наливают новую порцию 0.1N раствора щелочи. Через воронку 4 в ил добавляют 5 мл 5%-й H_2SO_4 и проводят отгонку CO_2 , как описано выше. Одновременно делают холостой опыт, т. е. производят отгонку в том же порядке, но вместо ила в колбу 1 добавляют свежeproкипяченную дистиллированную воду. Количество углерода свободной CO_2 и карбонатов в илу рассчитывают по разности объемов соляной кислоты, пошедшей на титрование щелочи после холостой отгонки CO_2 и после отгонки ее из ила; 1 мл 0.05N HCl соответствует 0.3 мг углерода.

6. Определение органического углерода

Содержание органического углерода можно определять в том же приборе.

В колбу 1 емкостью не более 50 мл вносят навеску сухого ила с ориентировочным содержанием углерода 4—8 мг. При малых навесках ила колбу можно заменить пробиркой из жаростойкого стекла емкостью в 10—15 мл. В пробирку 2 поглотителя 5 наливают 15 мл 0.1N раствора щелочи, а в воронку 4 4—5 мл хромовой смеси.

В приборе создается вакуум и после проверки прибора на герметичность через него устанавливается очень слабый ток воздуха. Из воронки 4 в колбу 1 вносят хромовую смесь, и ее содержимое кипятят на слабом огне в течение 10 мин. Затем горелку отставляют и усиливают ток воздуха. Двуокись углерода отгоняют из колбы 1 в течение 10 мин. Количество углекислоты, поглощенной щелочью, определяют тем же способом, который применяется для определения CO_2 и карбонатов.

Холостой опыт проводят в том же порядке, но вместо ила в колбу вносят 1 мл дистиллированной воды.

Если ил содержит карбонаты, то прежде чем определять в нем содержание органического углерода, необходимо предварительно их разрушить. Для этого в колбу 1 после внесения в нее навески ила добавляют 5 мл 60%-й H_2SO_4 . Колбу присоединяют к прибору и через нее производят просасывание воздуха для удаления CO_2 . Щелочь в поглотитель 5 добавляют в этом случае лишь после удаления CO_2 из ила. После добавления щелочи в поглотитель 5 в колбу 1 вносят хромовую смесь и определение ведут в том же порядке.

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 отгоняется током CO_2 при кипячении из подкисленной пробы ила в титрованный раствор йода (Резников и Муликовская, 1954). Этот метод весьма трудоемок, так как для улавливания йода необходимо ставить поглотитель с тиосульфатом и после каждого определения разбирать прибор, из-за чего одно определение занимает более 2 час. Кроме того, поскольку отгонка ведется при кипячении, малейшая примесь кислорода в CO_2 ведет к большим погрешностям, так как сероводород быстро окисляется даже следами кислорода.

Для проведения массовых определений сероводорода и сульфидов в иловых отложениях Ю. И. Сорокин разработал быстрый и надежный метод. Сероводород по этому методу отгоняется из

подкисленного ила на холоду сильным током разреженного воздуха.

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, изображенном на рис. 30.

1. Пробы грунта помещаются в банки емкостью 100 мл с притертыми пробками. Сероводород в них фиксируется щелочью (2 мл 25% КОН на 100 г ила) и в таком виде сосуды доставляются в лабораторию. Анализы можно проводить в полевых условиях, используя для создания вакуума насос Камовского.

2. Калиброванной трубкой берут 15—20 г ила и помещают его в пробирку 1, в которую предварительно наливают 20 мл 2%-го раствора Na_2CO_3 . Пробирку присоединяют к прибору. В воронку 6 наливают 20 мл 2%-го раствора H_2SO_4 , 3—4 мл раствора метилрот и 0.5 мл бутилового спирта. Индикатор добавляют для контроля за подкислением ила, бутиловый спирт — для предотвращения вспенивания при продувании воздуха. Создают вакуум

до 50 мм остаточного давления и при открытом важме 10 прибор проверяют на герметичность. Затем с помощью важма 10 через прибор устанавливают ток разреженного воздуха и порциями переливают содержимое воронки 6 в пробирку 1. Ил при этом подкисляется. Сероводород, образующийся при разрушении сульфидов, подхватывается током воздуха и углекислоты, выделяющейся при разложении карбонатов ила, и поглощается щело-

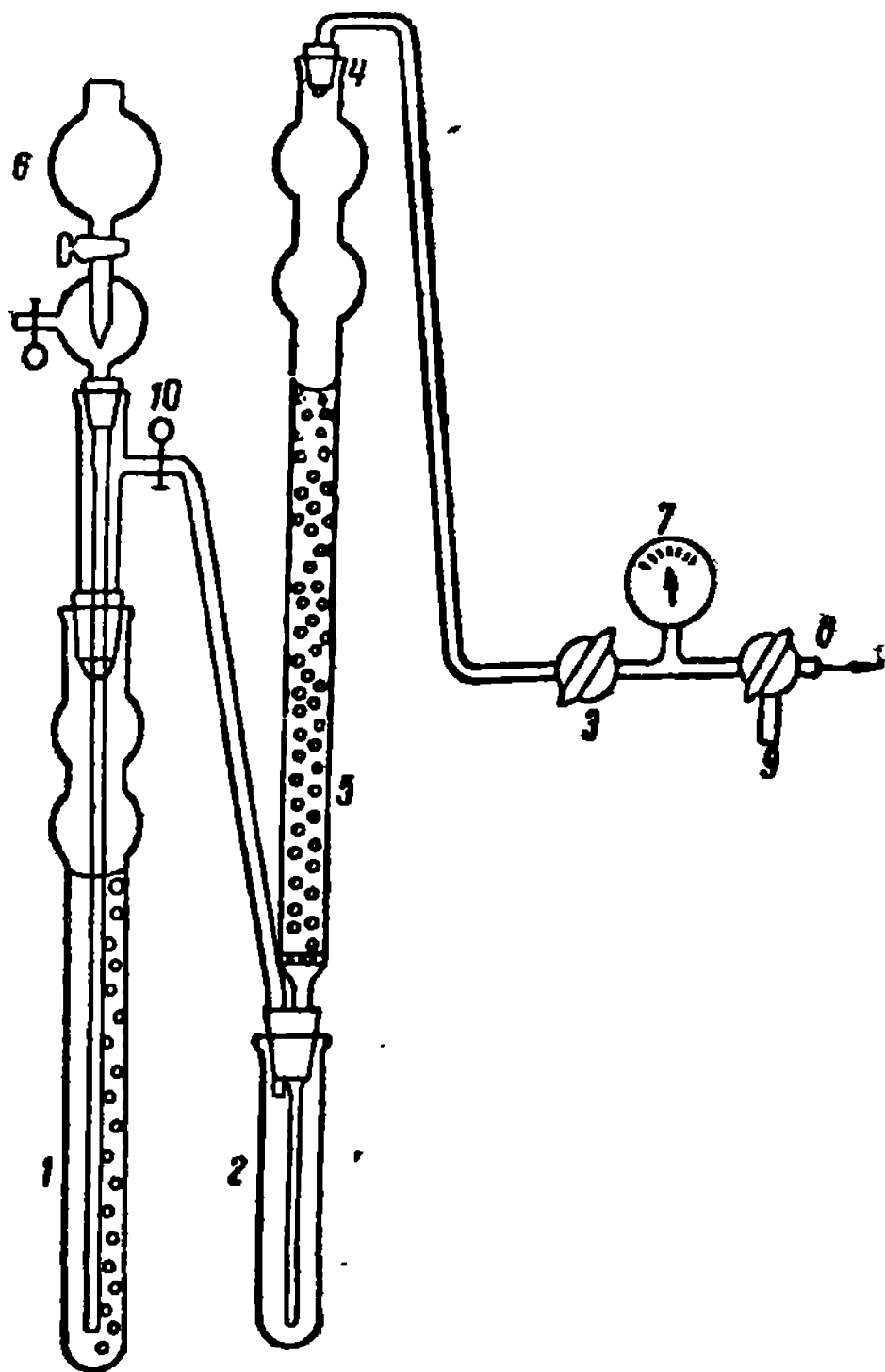


Рис. 30. Схема прибора для определения сероводорода и сульфидов.

1 — пробирка для выделения сероводорода из испытуемого материала; 2 — пробирка с поглотителем сероводорода; 3 — кран; 4 — пробка поглотителя; 5 — поглотитель сероводорода; 6 — воронка для внесения реактивов; 7 — вакуометр; 8 — вакуумный насос; 9 — резерв вакуума; 10 — важим Мора.

чью в поглотителе 5. Отгонка длится 10 мин. при разрежении в приборе от 50 до 250 мм остаточного давления.

3. После окончания отгонки вакуум отсоединяют краном 3. Пробирку 2 отсоединяют от прибора, а на ее место подставляют склянку с раствором подкисленного йода: 10 мл 0.05N раствора J + 5 мл раствора HCl (2 : 1) в 50 мл воды. Пробку 4 поглотителя 5 вынимают, и содержимое последнего спускают через капилляр в раствор йода. Остатки щелочи из поглотителя и из пробирки смывают несколькими порциями воды. Сероводород, поглощенный щелочью, связывается йодом, избыток которого оттитровывают 0.02N раствором тиосульфата и по объему последнего рассчитывают количество сероводорода. Необходимая полнота отгонки обеспечивается тем, что воздух проходит мелкими пузырьками через высокий слой ила. Для определения свободной формы сероводорода в илу он отгоняется из незафиксированной пробы без подкисления в том же приборе.

Результаты определений сероводорода в одной и той же пробе ила из Рыбинского водохранилища по методике, описанной в руководстве А. А. Резникова и Е. Н. Муликовской (1954), и по вышеописанной методике, показывают, что последняя дает вполне удовлетворительную сходимость параллельных определений.

ЛИТЕРАТУРА

- А лекс и н О. А.** 1959. Методы исследования физических свойств и химического состава воды. Жизнь пресных вод СССР, т. 4, ч. 2, гл. 50, стр. 213—300.
- В и н б е р г Г. Г.** 1934—1939. К вопросу о балансе органического вещества в водоемах. Сосбщ. I—V. Тр. Лимнолог. станции в Косине, вып. 18, стр. 5—24, 1934; вып. 20, стр. 5—34, 1935; вып. 21, стр. 75—87, 1937; вып. 22, стр. 144—153, 1939.
- В и н б е р г Г. Г.** 1960. Первичная продукция водоемов. Изд. АН БССР, Минск.
- В и н б е р г Г. Г., Ю. Г. Кабанова, И. О. Кобленц-Мишке, Н. Н. Хмелева и В. А. Калер.** 1960. Методическое пособие по определению первичной продукции органического вещества в водоемах радиоуглеродным методом. Инст. океаногр. АН СССР, Изд. Бел. гос. унив., Минск, стр. 28.
- (В и н о г р а д с к и й С. Н.) W i n o g r a d s k i S. N.** 1904. Die Nitrification. Handbuch der technischen Mycologie, Bd. 3. Herausgegeben von Lafar. В кн.: Микробиология почвы, 1952. Изд. АН СССР, стр. 229—258.
- (В и н о г р а д с к и й С. Н.) W i n o g r a d s k i S. N.** 1924. Sur L'étude mikroskopique du sol, C. R. Ac. sci., v. 179. В кн.: Микробиология почвы, 1952. Изд. АН СССР, стр. 419—421.
- Г а б е Д. Р.** 1957. Капиллярный метод прямого счета микробных тел. Микробиология, т. 26, вып. 1, стр. 109—117.
- Г и н с б у р г - К а р а г и ч е в а Т. Л.** 1932. О бесцветных и пурпурных серсбактериях. Сб.: Очерки микробиологии нефти, Гос. научн. техн. нефтян. изд., М.—Л., стр. 66.
- Д р а ч е в С. М., А. С. Разумов, Б. А. Скопичев и Н. М. Кабанов.** 1960. Приемы санитарного изучения водоемов. Медгиз. М.
- Е м ц е в В. Т.** 1959. Анаэробные азотфиксирующие микроорганизмы рода *Clostridium*, их распространение и взаимоотношения с высшим растением. Тр. Ковфер. инст. землед. центр. района нечерноземной полосы, посвящ. 40-й годовщ. Октября, М., стр. 105—120.
- З а в а р з и н Г. А.** 1960. Цикл развития и ядерный аппарат *Nurhomicobium vulgare* Stutr. et Hartleb. Микробиология, т. 29, вып. 1, стр. 38—42.
- З а в а р з и н Г. А.** 1961. Симбиотическая культура нового окисляющего марганец микроорганизма. Микробиология, т. 30, вып. 3, стр. 393—395.
- З а в а р з и н а Н. Б.** 1955. Изучение причин, задерживающих развитие микроорганизмов в толще иловых отложений в озере Бисерово. Микробиология, т. 24, вып. 5, стр. 573—579.
- З а в а р з и н а Н. Б.** 1961. Литический агент в культурах *Chlorella pyrenoidosa* Pringh. Докл. АН СССР, т. 137, № 2, стр. 435—437.
- И в а н о в М. В.** 1955. Метод определения продукции бактериальной биомассы в водоеме. Микробиология, т. 24, вып. 1, стр. 79.

- Иванов М. В.** 1956. Применение изотопов для изучения интенсивности процесса редукции сульфатов в озере Беловодь. Микробиология, т. 25, вып. 3, стр. 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., стр. 152.
- Иванов М. В. и Л. С. Терехова.** 1959. Изучение микробиологических процессов образования сероводорода в соленом озере. 1. Микробиология, т. 28, вып. 2, стр. 251—256.
- Калиненко В. О.** 1946. Роль бактерий в формировании железомарганцевых конкреций. Микробиология, т. 15, вып. 5, стр. 364—369.
- Комарова Л. И.** 1949. Пипетка для выделения культур из одной клетки. Микробиология, т. 18, вып. 4, стр. 370—371.
- Крисс А. Е.** 1959. Морская микробиология. Изд. АН СССР, М., стр. 365.
- Крисс А. Е. и Е. А. Рукина.** 1952. Биомасса микроорганизмов и скорость их размножения в океанических глубинах. Журн. общ. биол., т. 13, вып. 5, стр. 346—362.
- Кузнецов С. И.** 1952а. Роль микроорганизмов в круговороте веществ в озерах. Изд. АН СССР, М., стр. 300.
- Кузнецов С. И.** 1952б. Замечание к статье «Методы получения мембранных ультрафильтров для прямого счета, свободных от микробных клеток» Е. Рукиной и В. Бирюзовой. Микробиология, т. 21, вып. 4, стр. 477.
- Кузнецов С. И. и Г. С. Карзинкин.** 1930. Метод количественного учета бактерий в воде. Русск. гидробиол. журн., т. 9, вып. 1—3, стр. 85—89.
- Лапшин М. И.** 1952. Разработка способов очистки сточных вод. Изд. АН СССР, М.
- Мишустин Е. Н. и М. И. Перцовская.** 1954. Микроорганизмы и самоочищение почвы. Изд. АН СССР, М., стр. 651.
- Мюллер А. А.** 1933. Санитарная бактериология. Изд. 2-е, Госмедиздат, М.
- Наумов А. Н.** 1933. Методы непосредственного счета микроорганизмов в почве и характеристика отдельных почв Союза. Тр. Научн. инст. по удобр., вып. 108. Сб.: Микробиология почвы и удобрения, стр. 115—142.
- Ножилова М. И.** 1959. Определение вероятной ошибки при учете бактерий в водоемах методом прямого счета. Тр. VI совещ. по проблемам биол. внутр. вод, Изд. АН СССР, М.—Л., стр. 569—573.
- Омелянский В. Л.** 1923а. Практическое руководство по микробиологии. Изд. 1-е, Научн. хим.-тех. изд., Пгр.; изд. 2-е, 1940, Изд. АН СССР, Л.
- Омелянский В. Л.** 1923б. Связывание атмосферного азота. Изд. Росс. АН, Пгр., стр. 172.
- Осницкая Л. К.** 1954. Новый вид пурпурной бактерии из пластовых вод нефтяного месторождения (*Rhodopseudomonas Issatchenkoi*). Тр. Инст. микробиол., вып. 3, Изд. АН СССР, М., стр. 5—20.
- Перфильев Б. В. и Д. Р. Габее.** 1961. Капиллярные методы изучения микроорганизмов. Изд. АН СССР, М.—Л., стр. 534.
- Работнова И. Л.** 1957. Роль физико-химических условий (рН и rH_2) в жизнедеятельности микроорганизмов. Изд. АН СССР, М., стр. 275.
- Разумов А. С.** 1947. Методы микробиологических исследований воды. Изд. Водгео, М.
- Разумов А. С.** 1948. Взаимоотношения между бактериями и планктоном в связи с некоторыми вопросами гигиены воды. Сб.: Вопросы санитарной бактериологии. Изд. АМН СССР, стр. 30—43.
- Разумов А. С.** 1952. Замечание к статье «Методы получения мембранных ультрафильтров для прямого счета, свободных от микробных клеток» Е. Рукиной и В. Бирюзовой. Микробиология, т. 21, вып. 4, стр. 478—479.

- Р а в у м о в А. С. 1953. Микробиальный планктон воды. Автореф. дисс. на соискание уч. степ. докт. биол. наук. Инст. общей и коммун. гигиены АМН СССР, М.
- Р а в у м о в А. С. 1957. К вопросу о хемосинтезе у железобактерий. Микробиология, т. 26, вып. 3, стр. 392—396.
- Р а в у м о в А. С. 1961. Микробиальные показатели сапробности водоемов, загрязненных промышленными стоками, 1. Нитчатые бактерии из рода *Cladotrix*. Микробиология, т. 30, вып. 3, стр. 515—524.
- Р а в у м о в А. С. и Л. Е. К о р ш. 1960. Методы санитарно-микробиологических исследований. Сб.: Приемы санитарного изучения водоемов, ч. 5, стр. 241—312.
- Р е з н и к о в А. А. и Е. П. М у л и к о в с к а я. 1954. Методы анализа природных вод. Гос. геол.-тех. изд., М., стр. 236.
- Р о д и н а А. Г. 1950. Микробиологические исследования водоемов. Изд. АН СССР, М.—Л., стр. 68.
- Р о д и н а А. Г. 1956. Методы микробиологического исследования водоемов. Жизнь пресных вод СССР, т. 4, ч. 1, гл. 34. Изд. АН СССР, М.—Л., стр. 7—121.
- Р о м а н е н к о В. И. 1959. Учет метанооксиляющих бактерий в воде методом радиоавтографии колоний с мембранных фильтров. Бюлл. Инст. биол. водохр., № 5, стр. 40—42.
- Р у б а н Е. Л. 1955. О проверке чистоты культур *Nitrosomonas*. Микробиология, т. 24, вып. 1, стр. 22—24.
- Р у б а н Е. Л. 1961. Физиология и биохимия нитрифицирующих микроорганизмов. Изд. АН СССР, М., стр. 175.
- Р у к и н а Е. А. и В. И. Б и р ю з о в а. 1952. Метод получения мембранных ультрафильтров для прямого счета, свободных от микробных клеток. Микробиология, т. 21, вып. 1, стр. 60—65.
- С е р д о б о л ь с к и й И. П. 1954. Методы определения рН и окислительно-восстановительного потенциала при агрохимических исследованиях. Сб.: Агрохимические методы исследования почв, Изд. АН СССР, стр. 150—204.
- С о р о к и н Ю. И. 1952. Новые приемы выделения сульфатвосстанавливающих бактерий. Тр. Инст. микробиол., вып. II, стр. 121—129.
- С о р о к и н Ю. И. 1957. Роль хемосинтеза в продукции органического вещества в водоемах. I. Подледный хемосинтез в водной толще Рыбинского водохранилища. Микробиология, т. 26, вып. 6, стр. 736—744.
- С о р о к и н Ю. И. 1958. Роль хемосинтеза в продукции органического вещества. II. Изучение хемосинтеза в иловых отложениях с помощью C^{14} . Микробиология, т. 27, вып. 2, стр. 206—213.
- С о р о к и н Ю. И. 1959. Определение продуктивности фотосинтеза фитопланктона в водной толще с помощью C^{14} . Физиология растений, т. 6, вып. I, стр. 118—125.
- С о р о к и н Ю. И. 1960а. Методы определения карбонатов, свободной углекислоты и органического углерода в грунтах. Бюлл. Инст. биол. водохр., № 5, стр. 48—50.
- С о р о к и н Ю. И. 1960б. О методике определения сероводорода и сульфидов в иловых отложениях. Бюлл. Инст. биол. водохр., № 6, стр. 50—52.
- С о р о к и н Ю. И. 1960в. Ба-ометр для отбора проб воды на бактериологический анализ. Бюлл. Инст. биол. водохр., № 6, стр. 53—54.
- С о р о к и н Ю. И. 1960г. Определение изотопического эффекта при усвоении меченой углекислоты в процессе фотосинтеза и хемосинтеза. Микробиология, т. 29, вып. 2, стр. 204—208.
- С о р о к и н Ю. И. 1962. Определение поправочных коэффициентов на самопоглощение излучений C^{14} при определении продукции фотосинтеза и хемосинтеза в водоемах. Микробиология, т. 31, вып. I, стр. 121—128.
- (Т а у с о н В. О.) T a u s s o n W. O. 1929. Über die Oxydation der Benzolkohlenwasserstoffe durch Bakterien. Planta, Bd. 7, H. 5, S. 735—758.

- Успенский Е. Е. 1925. Железо как фактор распределения водорослей. Тр. Ботан. инст. Ассоц. н.-иссл. инст. физ.-мат. фак. I МГУ, стр. 1—94.
- Федоров М. В. 1957. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Сельхозгиз, М., стр. 231.
- (Холодный Н. Г.) Choldny N. 1929. Zur Methodik der quantitativen Erforschung des bakteriellen Planktons. Zbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 77, S. 8—14.
- Штурм Л. Д. 1952. Морфологические особенности сульфатвосстанавливающих бактерий, встречающихся в нефтяных месторождениях. Тр. Инст. микробиол. АН СССР, вып. 2, стр. 3—32.
- Штурм Л. Д. и Р. И. Орлова, 1954. Серобактерии и экологические условия водоема, сопутствующие их обильному развитию. Тр. Инст. микробиол. АН СССР, вып. 3, стр. 176—184.
- Baalsrud K. a. K. S. Baalsrud. 1954. Studies on Thiobacillus denitrificans. Arch. f. Mikrobiol., Bd. 20, S. 34.
- Barker H. A. 1956. Biological formation of methane. Industr. and Eng. Chem., part I, v. 48 (9), p. 1438.
- Beltrá R. M. 1956. Nueva tecnica par a identificacion del Pseudomonas savastanoi. Microbiologia Espanola, v. 9, pp. 239, 433—504.
- Fred E. B. a. S. A. Waksman. 1928. Laboratory manual of general microbiology. N. Y.—London.
- Giltay E. et Aberson G. 1892. Recherches sur un mode de denitrification Arch. neerl sc. nat., v. 25, p. 341.
- Hutton W. E. a. C. E. Zobell. 1949. The occurrence and characteristics of methane oxidizing bacteria in marine sediments. J. Bact., v. 58, p. 463—473.
- de Kruff C. B., I. P. Walt, H. Schwartz. 1957. The utilization of thiocyanate and nitrate by Thiobacilli. Ant. v. Leeuwenhaek J. Micr., v. 23 (3—4), p. 305—316.
- Kucera S. and R. S. Wolfe. 1957. A. Selective enrichment method for Gallionella ferruginea J. Bact., v. 74, p. 344—349.
- Küster E. 1921. Kultur der Mikroorganismen. Leipzig—Berlin.
- Münz E. 1915. Zur Physiologie der Methanbakterien. Inaug. Dissertat. Halle.
- Lambin S. et A. German. 1961. Précis de microbiologie, t. I, Paris, p. 458.
- Leathen W., L. McIntyre a. S. Braley. 1951. A medium for the study of the bacterial oxidation of ferrous iron. Science, v. 114, N 2458, p. 280.
- Levine M. 1954. An introduction to laboratory technique in bacteriology. N. Y.
- Lieske R. Untersuchungen über die Physiologie denitrifizierender Schwefelbakterien. Ber. Deutsch. Bot. Ges., Bd. 30, S. 11—22.
- Postgate J. R. 1959. Differential media for sulphur bacteria. J. Sci. of Food a. Agric., № 12, p. 669—674.
- Wiken T. O. 1957. Über den Mechanismus des anaeroben bakteriellen Abbaus von Kohlehydrat, Eiweiss und Fett in Faulräumen. Schweizerische Zeitschr. für Hydrologie, Bd. 19, 1, S. 428—456.

ОГЛАВЛЕНИЕ

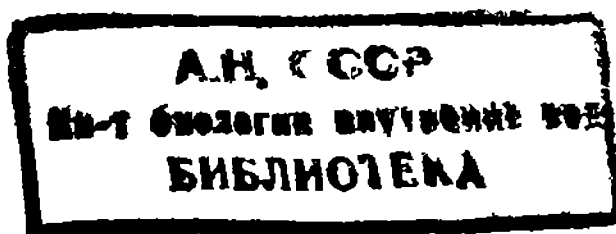
	Стр.
Предисловие	3
Часть I. Основные принципы изготовления питательных сред и культивирования микроорганизмов	5
1. Типы питания микроорганизмов	5
2. Указания по приготовлению питательных сред	6
Получение питательной среды с заданным рН (6). — Фильтрация (7). — Твердые питательные среды органического состава (7). — Приготовление кремневого геля (8).	
3. Стерилизация	9
Стерилизация паром (9). — Стерилизация сухим жаром (11). Холодная стерилизация (11).	
4. Методы культивирования анаэробов	11
Часть II. Рецептúra питательных сред для выделения и культивирования микроорганизмов	13
1. Среды для сапрофитных бактерий	13
Среда № 1. Мясо-пептонный бульон (МПБ) (13). — Среда № 2. Мясо-пептонный агар (МПА) (13). — Среда № 3. Мясо-пептонная желатина (13). — Среда № 4. Почвенный агар (14). — Среда № 5. Среда для дифференцировки видов спорообразующих бактерий (14). — Среда № 6. Среда Стровинского для <i>Pseudomonas</i> (14). — Среда № 7. Среда для <i>Caulobacter</i> (15). — Среда № 8. Среда для культивирования <i>Hyphomicrobium vulgare</i> (15). — Среда № 9. Дрожжевой автолизат (15).	
2. Среды для <i>Bact. coli</i>	16
Среда № 10. Фуксия-сульфитный агар Эндо (16). — Среда № 11. Среда Эйкмана для <i>Bact. coli</i> (16).	
3. Питательные среды для дрожжей, грибов и актиномицетов.	17
Среда № 12. Сусло (17). — Среда № 13. Среда Ролана для плесневых грибов (17). — Среда № 14. Среда Фреда и Ваксмана для плесневых грибов (18). — Среда № 15. Среда Чапека для плесневых грибов (18). — Среда № 16. Картофельный агар для актиномицетов (18). — Среда № 17. Сахарный агар с нитратами Ваксмана для актиномицетов (18). — Среда № 18. Крахмало-аммиачный агар для актиномицетов (19).	
4. Минеральные среды для водорослей	19
Среда № 19. Среда Успенского (19). — Среда № 20. Среда Пратта для водорослей (19). — Среда № 21. Голодный агар (19).	
5. Среды для бактерий, участвующих в круговороте азота	20

- Среда № 22. Среда Зенгена для уробактерий (20). —
 Среда № 23. Среда Лениса для уробактерий (20). —
 Среда № 24. Твердая среда для уробактерий (20). —
 Среда № 25. Жидкая среда Виноградского для *Nitrosomonas* (20). — Среда № 26. Среда с аммонийно-магnezияльным фосфатом (20). — Среда № 27. Кремневые пластинки для нитрифицирующих бактерий (21). —
 Среда № 28. Среда для *Nitrobacter* (21). — Среда № 29. Среда Гильтая для денитрифицирующих бактерий (21). — Среда № 30. Среда ван Итерсона для денитрификаторов (22). — Среда № 31. Нитратный агар (22). —
 Среда № 32. Среда Омелянского и Северовой для азотобактера (22). — Среда № 33. Среда Эшби для азотобактера (23). — Среда № 34. Среда Федорова для азотобактера (23). — Среда № 35. Бобовый отвар (23). — Среда № 36. Агар для выделения азотфиксирующих бактерий (24). — Среда № 37. Среда Виноградского для *Clostridium pasteurianum* (24). —
 Среда № 38. Среда Бредемана (24).
6. Среды для бактерий, участвующих в круговороте серы 24
 Среда № 39. Среда Бейеринка для гнилостных бактерий, образующих сероводород (24). — Среда № 40. Среда Морриса (25). — Среда № 41. Среда Вильсона-Блера для анаэробов (25). — Среда № 42. Среда ван Дельдена для сульфатредуцирующих бактерий (25). — Среда № 43. Среда Штурм для *Vibrio desulfuricans* (25). —
 Среда № 44. Среда Сорокина для водородной сульфатредукции (26). — Среда № 45. Твердая среда Сорокина для выделения культуры *Vibrio desulfuricans* (26). —
 Среда № 46. Среда ван Нила для пурпурных серобактерий (27). — Среда № 47. Среда Постгейта для окрашенных серобактерий (27). — Среда № 48. Среда Бавендама для бесцветных серобактерий (28). —
 Среда № 49. Среда Молиша для пурпурных несерных бактерий (28). — Среда № 50. Среда Ленера (видоизмененная Б. Л. Исаченко) для пурпурных несерных бактерий (28). — Среда № 51. Среда Лиске для *Thiobacillus denitrificans* (29). — Среда № 52. Среда Баалсруда для *Thiobacillus denitrificans* (29). — Среда № 53. Среда Бейеринка для *Thiobacillus thioarvus* (29). —
 Среда № 54. Среда Натансона для галофильных тионовых бактерий (30). — Среда № 55. Тиосульфатный агар Бейеринка (30). — Среда № 56. Среда Ваксмана для *Thiobacillus thiooxidans* (30). —
 Среда № 57. Среда для *Thiobacillus thioscyanoxidans* (31). — Среда № 58. Тиосульфатный агар Ваксмана (31). — Среда № 59. Среда Летена для *Thiobacillus ferrooxidans* (31).
7. Среды для железобактерий 31
 Среда № 60. Среда Лиске (31). — Среда № 61. Среда Вольфа (32). — Среда № 62. Среда для *Metallogenium symbioticum* (32). — Среда № 63. Среда для бактерий, окисляющих марганец (32).
8. Среды для гетеротрофных бактерий, отлагающих железо в слизистой оболочке 33
 Среда № 64. Среда Разумова для *Cladothrix* (33). —
 Среда № 65. Среда Разумова для *Sphaerotilus* (33). —
 Среда № 66. Среда Калининко (33).

	Стр.
9. Среда для бактерий, окисляющих водород или углеводороды	33
Среда № 67. Среда Лебедева для водородных бактерий (33). — Среда № 68. Среда Руланда для водородных бактерий (33). — Среда № 69. Среда Мюнца для метанооксиляющих бактерий (34). — Среда № 70. Среда Таусона для бактерий, окисляющих жидкие или твердые углеводороды (34). — Среда № 71. Среда Романенко для метанооксиляющих бактерий (34).	
10. Среда для целлюлозоразрушающих бактерий	35
Среда № 72. Среда Гетчинсона для аэробных бактерий (35). — Среда № 73. Среда Омелянского для анаэробных бактерий (36).	
11. Среда для бактерий, образующих метан.	36
Среда № 74. Среда Викена (36). — Среда № 75. Среда Романенко (36). — Среда № 76. Среда Баркера (37). — Среда № 77. Среда для <i>Methanobacterium Omelianskii</i> (37).	
Часть III. Прижизненное изучение микроорганизмов и методы окраски бактерий	38
1. Прижизненное изучение микроорганизмов	38
а. Установка освещения объекта по Келлеру при работе с оптическим микроскопом	38
б. Метод фазовых контрастов для исследования живых объектов	40
в. Изучение живых микроорганизмов в висячей капле.	41
г. Изучение микрофлоры поверхностного слоя ила в микробном пейзаже	41
2. Главнейшие методы окраски бактерий	45
а. Окраска бактерий на фиксированных препаратах Метиленовая синяя по Лефлеру (46). — Карболовый фуксин по Цилю (46). — Окраска эритрозином с докраской фуксином (46). — Окраска по Граму (46)	45
б. Дифференциальная окраска по Пешкову для отличия живых и мертвых бактерий	47
в. Окраска спор по методу Шеффер-Фультона	47
г. Окраска жгутиков по методу Трибонто и Фишейт	48
Часть IV. Методы культивирования и выделения чистых культур некоторых видов азотификсаторов и автотрофных бактерий	49
1. Выделение культур бактерий, участвующих в круговороте азота	50
а. Выделение чистых культур аммонификаторов	50
б. Выделение чистой культуры <i>Azotobacter</i>	50
Получение культуры накопления <i>Azotobacter</i> (50). — Выделение и проверка чистоты культуры (50).	
в. Выделение чистой культуры <i>Clostridium pasteurianum</i>	50
Получение культуры накопления (51). — Выделение чистой культуры (51). — Проверка чистоты культуры (51).	
г. Выделение чистой культуры нитрификаторов (<i>Nitrosomonas</i> и <i>Nitrobacter</i>)	52
Получение культуры накопления (52). — Выделение чистой культуры (52). — Проверка чистоты культуры (53). — Хранение культур (53).	
2. Выделение культур бактерий, участвующих в круговороте серы	54
а. Выделение чистой культуры <i>Vibrio desulfuricans</i>	54

	Стр.
Получение культуры накопления (54). — Очистка культуры накопления (54). — Выделение чистой культуры (54). — Проверка чистоты культуры (55).	
б. Выделение чистой культуры <i>Thiobacillus thioparus</i> . Получение культуры накопления (56). — Выделение чистой культуры (56). — Проверка чистоты культуры (56).	56
в. Выделение чистой культуры <i>Thiobacillus thiooxidans</i> . Получение культуры накопления (57). — Выделение чистой культуры (57). — Проверка чистоты культуры (57).	57
г. Выделение чистой культуры <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	58
Получение культуры накопления (58). — Выделение чистой культуры (58). — Проверка чистоты культуры (58).	
д. Методы культивирования серобактерий	59
Бесцветные серобактерии (59). — Пурпурные серобактерии (59). — Зеленые серобактерии (60).	
3. Культивирование микроорганизмов в атмосфере водорода или смеси воздуха и углеводородных газов	60
4. Культивирование железобактерий в конвекционной проточной установке по Перфильеву	63
Часть V. Некоторые специальные методы бактериологического анализа воды и ила озер и водохранилищ	67
1. Батометр для отбора проб воды на бактериологический анализ	69
2. Изготовление окулярного сетчатого микрометра	69
3. Микроскопический подсчет бактерий	71
а. Подсчет бактерий в воде	71
б. Подсчет бактерий в иловых отложениях	73
4. Определение времени генерации бактерий и продукции бактериальной биомассы	75
5. Применение метода радиоавтографии для количественного учета бактерий, окисляющих водород и газообразные углеводороды	77
6. Определение продукции органического вещества в водоемах в процессе фотосинтеза	79
а. Определение продукции и деструкции органического вещества в водоемах скляночным методом	80
Оборудование (81). — Работа на водоеме (81). — Вычисление величины продукции и деструкции органического вещества в водоеме (82).	
б. Определение продуктивности фотосинтеза фитопланктона в водной толще путем применения радиоактивного углерода	83
Определение суточного фотосинтеза в поверхностной пробе воды (84). — Определение зависимости фотосинтеза от светопроницаемости воды и нахождение поправочных коэффициентов K_t (84). — Определение зависимости фотосинтеза в толще воды от вертикального распределения фитопланктона (нахождение поправочного коэффициента K_p) (85). — Определение общей радиоактивности воды после добавления меченой углекислоты (87). — Определение в воде общего количества свободной углекислоты и бикарбонатов (88). — Вычисление продуктивности фотосинтеза под 1 м ² поверхности водоема (90).	

	Стр.
7. Определение величины продукции органического вещества в водоемах за счет процессов хемосинтеза (применение радиоактивного изотопа углерода)	90
а. Определение интенсивности процессов хемосинтеза в водной толще водоемов	91
б. Определение продукции органического вещества в иловых отложениях за счет процессов хемосинтеза .	93
8. Определение интенсивности процесса редукции сульфатов (применение радиоактивного изотопа серы)	96
9. Определение интенсивности процесса окисления сульфидов и сероводорода (применение радиоактивного изотопа серы) . .	98
10. Определение биохимического потребления кислорода	100
11. Анализ воды на присутствие в ней бактериальных показателей фекального загрязнения	104
Подготовка к посеву (104). — Посев (104). — Выращивание (105). — Учет результатов анализа (105).	
Часть VI. Некоторые специальные методы химического анализа . . .	107
1. Определение активной реакции среды (рН)	107
а. Приготовление растворов индикаторов по Кларку . .	107
б. Метод Джиллеси определения рН без буферных растворов	108
2. Определение окислительно-восстановительного потенциала .	109
3. Определение растворенного в воде кислорода по методу Винклера	114
4. Определение карбонатов, свободной углекислоты и органического углерода в грунтах	116
а. Определение CO_2 и карбонатов	117
б. Определение органического углерода	118
5. Определение сероводорода и сульфидов в иловых отложениях	118
Литература	121



25041

**Сергей Иванович Кузнецов
и Виталий Иванович Романенко**
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ
ВНУТРЕННИХ ВОДОЕМОВ
Лабораторное руководство

Утверждено к печати
Институтом биологии внутренних вод
Академии наук СССР

Редактор Издательства *А. А. Стрелков*
Художник *В. В. Грибакин*
Технический редактор *Г. П. Арефьева*
Корректоры *М. В. Евдокимова*
и *М. А. Судакова*

Сдано в набор 10/XII 1962 г. Подписано к печати
19 II 1963 г. РИСО АН СССР № 13—68Р. Формат
бумаги 60×90^{1/16}. Бум. л. 4^{1/6}. Печ. л. 8^{1/4} =
8,25 усл. печ. л. Уч.-изд. л. 8,57. Изд. № 1916.
Тип. зак. № 950. М-19240. Тираж 3000.
Цена 43 коп.

Ленинградское отд. Изд. Академии наук СССР.
Ленинград, В-164, Менделеевская лин., д. 1

1-я тип. Издательства Академии наук СССР.
Ленинград, В-34, 9 линия, д. 12

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР

В МАГАЗИНАХ КОНТОРЫ «АКАДЕМКНИГА»

ИМЕЮТСЯ В ПРОДАЖЕ КНИГИ:

Актуальные вопросы вирусологии. 1960. 316 стр. Цена 60 к.

Достижения советской микробиологии. 1959. 128 стр. Цена 58 к.

Включены работы на темы: успехи общей микробиологии, изучение геологической деятельности микроорганизмов, развитие технической микробиологии в СССР за 40 лет, достижения в области почвенной микробиологии.

Кузнецов С. И. и др. Введение в геологическую микробиологию. 1962. 240 стр. Цена 1 р. 17 к.

Исследуются геологическая среда, где протекает деятельность микроорганизмов, влияние ряда физических факторов на развитие микроорганизмов, распространение бактерий в глубинных водах и осадочных породах, роль микроорганизмов в геологических процессах; намечаются основные пути управления геологической деятельностью микроорганизмов.

Микроорганизмы и органическое вещество почв. 1961. 291 стр. Цена 1 р. 90 к.

Микрофлора почв европейской части СССР. Рыбалкина А. В. Микрофлора тундровых, подзолистых и черноземных почв. Рыбалкина А. В., Кононенко Е. В. Активная микрофлора почв. 1957. 258 стр. Цена 80 к.

Мирзоева В. А. Бактерии группы сенной и картофельной палочек. 1959. 175 стр. Цена 86 к.

Одинцова Е. Н. Микробиологические методы определения витаминов. 1959. 379 стр. Цена 80 к.

Перфильев Б. В. и Габе Д. Р. Капиллярные методы изучения микроорганизмов. 1961. 534 стр. Цена 3 р. 40 к.

Излагаются новые методы изучения микроорганизмов на основе разработанной авторами специальной технологии изготовления стеклянных капилляров. Новые капиллярные приборы дают возможность изучать природную микрофлору в микропейзаже, воспроизводить микрокультуры в субстратах, близких к природным, и значительно расширяют возможность экспериментальных работ под контролем микроскопа.

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР

**В МАГАЗИНАХ КОНТОРЫ «АКАДЕМКНИГА»
ИМЕЮТСЯ В ПРОДАЖЕ КНИГИ:**

Рубан Е. Л. Физиология и биохимия нитрифицирующих микроорганизмов. 1961. 175 стр. Цена 79 к.

Сухов К. С. Вирусы. 370 стр. Цена 2 р. 43 к.

Эта книга — ценный вклад в отечественную биологическую литературу. Автор обобщил огромный и ценный материал по химии и биологии фотопатогенных вирусов, по их распространению, условиям размножения, изменчивости и филогенетическому развитию, а также затронул вопросы патологии вирусных болезней и меры борьбы с вирусами.

Экспериментальное получение полезных форм микроорганизмов.
Труды Института микробиологии. Выпуск X. 1961. 199 стр.
Цена 1 р. 14 к.

Ваши заказы на книги просим направлять по адресу:
Москва, К-12, Б. Черкасский пер., 2/10,
Контора «Академкнига», отдел «Книга—почтой»
или в ближайший магазин «Академкнига»

Адреса магазинов «Академкнига»: Москва, ул. Горького, 6 (магазин № 1); 1-й Академический проезд, 55/5 (магазин № 2); Ленинград, Литейный проспект, 57; Свердловск, ул. Белинского, 71в; Киев, ул. Ленина, 42; Харьков, Горяиновский пер., 4/6; Алма-Ата, ул. Фурманова, 129; Ташкент, ул. Карла Маркса, 29; Баку, ул. Джапаридзе, 13.

При получении заказа книги, как имеющиеся в наличии, так и печатающиеся, по поступлении в продажу, будут направлены в Ваш адрес наложенным платежом. Пересылка за счет заказчика.

Предварительные заказы на книги принимаются также местными магазинами книоторгов и потребительской кооперации.