

Министерство образования и науки Астраханской области
Государственное автономное учреждение
Астраханской области дополнительного образования
«Эколого-биологический центр»

**Методика изучения
химических и микробиологических
показателей почв**

Составитель: Мухамбетова А.Б.,
педагог дополнительного образования

г. Астрахань, 2018

Методика изучения химических и микробиологических показателей почв

В методику изучения химических и микробиологических показателей почв для анализа входят такие методы исследования, как окраска по методу Грама, изучение экзоферментной активности почвенноживущих микроорганизмов и химический анализ концентрации нитритов (NO_2^-), нитратов (NO_3^-) и аммония (NH_4^+) в почве с помощью аквариумного набора.

Отбор и подготовка проб почвы с исследуемых участков

На обследуемой территории до 1000 м² выделяют два участка по 25 м² каждый. Один участок выбирают вблизи от источника загрязнения, другой — на той же территории, но вдали от него. С каждого выделенного участка отбирают среднюю пробу, составленную из 5 образцов, взятых по диагонали участка или в четырех точках по краям и одной в центре. При проведении микробиологических исследований поверхностных слоев почвы образцы берут на глубине до 20 см.

Пробы отбирают стерильной железной лопаткой, совком или специальным буром. Пробы следует помещать в стерильные чашки Петри, которые затем нужно загерметизировать. ½ весовую часть каждой пробы обычно берут на химический анализ (изучение концентрации азотосодержащих ионов), остальная часть идет на микробиологический анализ.

Масса каждого образца должна быть 200—300 г, а смешанного — не менее 1 кг. Отобранные пробы почвы направляют в лабораторию и исследуют сразу же или не позднее чем через 12—18 ч при условии их хранения при 1—5°C.

При подготовке пробы почвы для анализа образцы почвы освобождают от крупных включений (щебень, корни, стекла), размельчают, просеивают через сито, высыпают на стерильную бумагу, тщательно перемешивают и отвешивают 30 г. В колбу вместимостью 500 мл наливают 270 мл стерильной водопроводной воды и вносят отвешенный образец почвы. Колбу встряхивают в течение 10 мин и из полученной суспензии (1 : 10) без отстаивания с учетом предполагаемого загрязнения почвы готовят последующие разведения: для чистых почв до 4 разведения (1 : 10000), для загрязненных — до 6 разведений, (1:1000000).

Приготовленные разведения используют для проведения краткого или полного микробиологического анализа почвы.

Химический анализ концентрации нитритов (NO_2^-), нитратов (NO_3^-) и аммония (NH_4^+) в почве с помощью аквариумного набора.

Из каждой пробы нужно взять навеску почвы (около 10 грамм каждая).

Далее в почву следует добавить около 50 мл дистиллированной воды и перемешивать до гомогенного состояния (объем дистиллированной воды измеряется мерным цилиндром с точностью до 1 мл). После этого раствор

через сито с ячейей 0,5 мм лучше отфильтровать от крупных частиц грунта. Затем раствор нужно центрифугировать в течение 3-5 минут.

Полученный надосадок используется для дальнейшего анализа с помощью тест-наборов для аквариумной воды. С помощью этого набора можно определить концентрации нитритов (NO₂-), нитратов (NO₃-) и аммония (NH₄⁺) в мольных долях (α). Расчет массовой доли азотсодержащих соединений в пробах проводится по формулам:

$$\omega(\text{NO}_3^-) = \alpha * M * 3,4m,$$

$$\omega(\text{NO}_2^-) = \alpha * M * 2,3m,$$

$$\omega(\text{NH}_4^+) = \alpha * Mm,$$

где

ω — массовая доля нитритов (NO₂-), нитратов (NO₃-) и аммония (NH₄⁺) в мольных долях (α).

m — масса навески почвы

M — масса дистиллированной воды, добавляемую в навеску

α — мольная доля нитритов (NO₂-), нитратов (NO₃-) и аммония (NH₄⁺)

Изучение экзоферментной активности микроорганизмов на исследуемых участках

Микробиологическая активность почв может быть определена по протеазной активности почвенноживущих микроорганизмов, а протеазная активность почв определяется активностью экзоферментов почвенных микроорганизмов и зависит от их численности и активности. Экзоферменты-ферменты, выделяемые микроорганизмами во внешнюю среду, которые расщепляют белки, полисахариды и липиды.

В чашки Петри с образцами почвы нужно поместить нарезанную по 2-3 кадра засвеченную фотопленку, предварительно замоченную в воде на 10 минут. Воду следует предварительно простерилизовать кипячением в течение 10 минут (100 0C). Также лучше поместить один фрагмент пленки в пустую стерильную чашку Петри (контроль) для того, чтобы в конце эксперимента сравнить полученные результаты с контролем и минимизировать риск возникновения погрешностей.

Далее образцы почвы нужно выдерживать при комнатной температуре (20 0C) 9 дней. Затем пленку следует осторожно вынуть и промыть под струей воды, после чего высушить. После этого нужно подсчитать процент «съеденного» эмульсионного слоя по палетке. Чем выше процент разрушения эмульсионного слоя, тем выше экзоферментная активность почвы.

Окраска *по* *методу*
Грама <http://ru.vlab.wikia.com/wiki/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D0%B8%D0%B7%D1%83%D1%87%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%8F%D1%85%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D1%85%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D1%85%D0%BF%D0%BE%D0%BA%D0%B0%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D0%B9%D0%BF%D0%BE%D1%87%D0%B2?action=edit§ion=4>

Особенностью окраски по методу Грама является неодинаковое отношение различных микробов к красителям трифенилметановой группы: генцианвиолету, метилвиолету, кристалвиолету. Микробы, входящие в группу грамположительных дают прочное соединение с указанными красителями и йодом. Окрашенные микробы не обесцвечиваются при воздействии на них спиртом, вследствие чего при дополнительной окраске фуксином грамположительные микробы не изменяют первоначально принятый фиолетовый цвет. Грамотрицательные микроорганизмы образуют с генциан-, кристалл- или метилвиолетом и йодом легко разрушающееся под действием спирта соединение, в результате чего они обесцвечиваются и затем окрашиваются фуксином, приобретая красный цвет. Отношение микроорганизмов к окрашиванию по Грамму имеет большое диагностическое значение.

Подготовка микробной культуры

Небольшое количество почвенной пробы следует высеять в чашки Петри с водородселективным агаром с помощью микробиологической петли, далее засеянные чашки Петри нужно выдержать при комнатной температуре в течение 9 дней. Также лучше сделать контрольный посев из воздуха, чтобы позже сравнить колонии микроорганизмов, выросших в разных чашках Петри, и знать какие микроорганизмы могли попасть из воздуха, а не из почвы.

Приготовление мазка

На чистое, обезжиренное предметное стекло поместить каплю дистиллированной воды, затем с помощью микробиологической петли в нее внести небольшое количество выросшей на агаре микробной культуры. Далее нужно сделать мазки и фиксировать их на пламени. Лучше сделать по 2-3 мазка на каждый образец почвы и один контрольный мазок.

Окрашивание микроорганизмов

Окраску микроорганизмов по Граму следует производить следующим образом:

Мазок, фиксированный на огне, нужно окрашивать через фильтровальную бумагу основным красителем- раствором основного карболового кристалвиолета. Прокрашивание должно длиться 1-2 минуты.

Далее бумагу следует снять, избыток краски слить и налить раствор Люголя на 1-2 минуты до почернения препарата.

Далее раствор Люголя нужно опять слить, предметное стекло для обесцвечивания мазка погрузить несколько раз в стаканчик со спиртом; процесс обесцвечивания считается завершенным, когда от мазка перестают отделяться окрашенные в фиолетовый цвет струйки жидкости.

Затем препарат следует тщательно промыть водопроводной водой и докрасить спиртово-водным раствором фуксина в течение двух минут.

В конце мазок нужно промыть водой и высушить.

Результат окраски: грамположительные бактерии окрашиваются основной краской в темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные бактерии, воспринимая дополнительную окраску, приобретают ярко-малиновый цвет.

Список литературы

1. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. М.: МГУ, 2005.
2. Нетрусов, А. И. Общая микробиология: учебник / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. - М.: Академия, 2007. - 288 с.
3. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Г.И. Переверзева Практикум по микробиологии. - М.: Дрофа, 2004.