

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

М. А. ЛИТВИНОВ

**МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ
ПОЧВЕННЫХ
МИКРОСКОПИЧЕСКИХ
ГРИБОВ**



А К А Д Е М И Я Н А У К С С С Р
БОТАНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ им. В. Л. КОМАРОВА

М. А. ЛИТВИНОВ

**МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ
ПОЧВЕННЫХ
МИКРОСКОПИЧЕСКИХ
ГРИБОВ**



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
Ленинградское отделение
Ленинград 1969

Методы изучения почвенных микроскопических грибов. Литвинов М. А. 1969. Изд-во «Наука», Ленингр. отд., Л. 1—124.

В брошюре представлены различные приемы и методы микробиологического исследования, позволяющие наиболее эффективно изучать основные систематические группы микроскопических грибов, заселяющих различные почвы. Дается подробное описание методов, применяемых для выделения из почвы, культивирования, микроскопического исследования и определения грибов из порядков *Moniliales*, *Mucorales* и *Chytridiales*. Илл. — 6, библи. — 70 назв.

ВВЕДЕНИЕ

В почве встречаются грибы всех систематических групп, но более всего из класса несовершенных — *Fungi imperfecti*. Среди последних постоянными обитателями почвы в значительном числе обнаруживаются микроскопические грибы из порядка *Moniliales*. Нередко в почве расселены низшие грибы из класса *Phycomycetes*, главным образом из порядка *Mucorales*. Грибы могут пребывать в почве как в активном состоянии в виде развивающегося мицелия с репродуктивными и вегетативными спорами, так и в покоем состоянии в виде различных покоящихся спор, микросклероций и т. п., способствующих их сохранению в почве. В почве, главным образом на растительных остатках, можно обнаружить различные фитопатогенные грибы, из которых большая часть не является истинными почвенными грибами. Почвенные микроскопические грибы играют значительную роль в почвообразовательных процессах и в общем круговороте веществ в природе. Гетеротрофное питание этих грибов обуславливает ведущее их значение в разрушении растительных и животных остатков в почве. Благодаря сложной биосинтетической деятельности почвенных грибов в почве обнаруживается ряд физиологически активных веществ — витамины, ауксины, гиббереллины, токсины, а также другие органические соединения, в частности аминокислоты, оказывающие весьма большое влияние на развитие высших растений. Жизнь почвенных грибов подчас тесно связана с высшими растениями.

Как известно, плодородие почв во многом зависит от жизнедеятельности почвенных микроорганизмов и, в частности, от микроскопических почвенных грибов.

В брошюре дается подробное изложение методов изучения грибов главным образом из порядков *Moniliales*,

Mucorales и *Chytridiales*, составляющих вместе бóльшую часть сообщества почвенных микромицетов.

Почвенные микромицеты — малоизученная группа грибов. Успешное изучение видового состава этих грибов, их географического распространения в различных почвах и взаимосвязей с высшими растениями в значительной степени зависит от совершенствования методов исследования. При изучении микроскопических почвенных грибов необходимо уметь выявлять их в почве, распознавать и точно идентифицировать видовую принадлежность, устанавливая их типичную группировку видов для данного образца почвы. Также не менее важно отдифференцировать истинные почвенные грибы от фитопатогенных и других форм микроскопических грибов.

В настоящей брошюре нами представлены различные современные приемы и методы микроскопического исследования, позволяющие наиболее полно выявить и изучить основные систематические группы микроскопических грибов, обильно заселяющих целинные и культурные поля, а также тонкие почвенные слои ризосферных и прикорневых зон различных растений.

ОСНОВНЫЕ СВЕДЕНИЯ ПО КЛАССИФИКАЦИИ ГРИБОВ

Грибы прежде всего подразделяются на две большие группы — низшие и высшие. У низших грибов вегетативное тело в виде нитевидной одноклеточной грибницы, а у самых простейших из них в виде голой плазматической массы — амебоида. У высших грибов грибница многоклеточная. Половое спороношение (зиготы) у большинства низших грибов формируется непосредственно из женских половых клеток (оплодотворенных) разного строения, имеющих большей частью значение покоящихся спор, прорастающих после периода покоя в органы бесполого размножения (зооспорангии или спорангии). У высших грибов в результате оплодотворения формируются сумки (сумчатые грибы) или базидии (базидиальные грибы). В сумках развиваются эндогенно аскоспоры, как правило, в числе восемь; на базидиях развиваются экзогенно базидиоспоры, как правило, по четыре на каждой базидии. Разделение грибов на классы базируется главным образом на особенностях полового и бесполого размножения.

В наиболее распространенной системе все грибы (*Fungi*; *Eumycotina*; *Eumycetes*) разделены на четыре класса.

1. Класс *Phycomycetes* — фикомицеты, или низшие грибы. Мицелий несептированный, редко слабосептированный, со многими ядрами, как правило, гаплоидный; у наиболее примитивных форм (подкласс архимицеты) мицелий зачаточный, безъядерный (ризомицелий), отходящий от одноядерной или многоядерной клетки, или мицелий совсем отсутствует. Бесполое размножение зооспорами (подвижными), спорангиоспорами (неподвижными) или у развитых наземных форм — конидиями, образующимися на особых отростках мицелия — конидие-

посцах. Половой процесс — оогамия или зигогамия, иногда в виде капуляции двух подвижных гамет. Конечный продукт полового процесса — покоящиеся споры типа ооспор или зигоспор.

2. Класс *Ascomycetes* — аскомицеты, или сумчатые грибы. Мицелий хорошо развитый, септированный (многоклеточный), гаплоидный. Бесполое размножение конидиями. Основным органом полового спороношения является сумка (аск), внутри которой развивается обычно восемь спор — аскоспор.

Прим. Сумка, или аск, возникает либо в результате слияния двух половых клеток, либо вследствие следующего за слиянием разрастания оплодотворенных клеток и развития из них аскогенных гиф, на концах которых образуются сумки. У некоторых грибов сумки располагаются непосредственно на грибнице или формируются внутри отдельных свободно живущих клеток (*Hemiascomycetidae*). У подавляющего большинства грибов сумки развиваются и группируются в особых плодовых телах (*Euscomycetidae*).

3. Класс *Basidiomycetes* — базидиомицеты, или базидиальные грибы. Мицелий септированный (многоклеточный), как правило, диплоидный, с характерным наличием особых пружек. Основным органом полового размножения является базидия. На поверхности базидии экзогенно развиваются базидиоспоры, обычно по четыре. Базидиоспоры одноклеточные и, как правило, гаплоидные; прорастая, они образуют гаплоидный мицелий; позже гомоталлический или гетероталлический первичный мицелий при диплоидизации дает развитие вторичному диплоидному (дикариотическому) мицелию с пружками.

Прим. Базидии у примитивных базидиомицетов возникают непосредственно на грибнице или при прорастании покоящихся спор (хламидоспор), а у более высокоорганизованных форм — на особых плодовых телах, скученно, с образованием гимениального слоя, или внутри плодовых тел. Гимениальный слой у наиболее примитивных форм поверхностный, открытый до вызревания (гимнокарпные плодовые тела); у высших форм гимений вначале закрытый особым слоем стерильного мицелия, ко времени созревания становится открытым (гемиангиокарпные плодовые тела).

На основе строения базидии, ее одноклеточности или многоклеточности, а также строения плодовых тел весь класс базидиальных грибов делится на два подкласса:

1) подкласс гетеробазидиомицеты (*Heterobasidiomycetidae*), или фрагмобазидиомицеты (*Phragmobasidiomycete-*

tidae), у которых базидии разделены перегородками на четыре клетки, развивающие каждая по одной базидиоспоре;

2) подкласс холобазидиомицеты (*Holobasidiomycetidae*), или хомобазидиомицеты (*Homobasidiomycetidae*), у которых базидии цельные, т. е. не разделены перегородками, развивающие по четыре базидиоспоры.

4. Класс *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*) — несовершенные грибы. Несовершенные грибы размножаются только бесполом (гаплоидным) путем при помощи конидий. Половое спороношение отсутствует или не обнаружено.

Прим. Происхождение несовершенных грибов большей частью связано с постепенной редукцией и угасанием половых функций и исчезновением половых органов. Несовершенные грибы большей частью произошли от сумчатых, некоторая часть от базидиальных и очень незначительная часть от фикомицетов. Они не представляют собой единую филогенетическую группу грибов. Большинство несовершенных грибов по характеру строения и развитию мицелия (ветвистого, многоклеточного) принадлежит к высшим грибам.

Класс несовершенных грибов подразделяется на три порядка: гифомицеты (*Hyphomycetales*, или *Moniliales*), меланкониевые (*Melanconiales*) и сферопсидные (*Sphaeropsidales*, или *Pycnidiales*). К этому классу относятся грибы *Mycelia sterilia*, не образующие конидий или каких-либо спор иного происхождения и размножающиеся только вегетативным путем (Курсанов, 1940; Словарь-справочник фитопатолога, 1967).

РНУСОМΥСЕТЕС — ФИКОМИЦЕТЫ, ИЛИ НИЗШИЕ ГРИБЫ

В классе фикомицетов имеется три эволюционных ряда: 1) *Uniciliata* — одножгутиковые (зооспоры с одним жгутиком), 2) *Biciliata* — двужгутиковые (зооспоры с двумя жгутиками), 3) *Aciliata* — безжгутиковые (споры без жгутиков).

Первый ряд (*Uniciliata*) включает 5 порядков:

1) *Hyphochytriales* — гиfoxитриевые (жгутик расположен на переднем конце зооспоры);

¹ Порядки *Muxochytridiales* и *Mycocytridiales* в некоторых микологических руководствах объединяются в один порядок *Chytridiales* (хитридиевые).

2) *Myxochytridiales*¹ — миксохитридиевые (жгутик на заднем конце зооспоры; вегетативное тело не имеет оболочки — амебоид, ризоидов нет);

3) *Mycochytridiales* — микохитридиевые (жгутик на заднем конце зооспоры; вегетативное тело с самого начала покрыто оболочкой, ризоиды имеются);

4) *Blastocladales* — бластокладиевые [зооспоры с одним задним жгутиком, имеется более или менее развитый мицелий; в половом слиянии участвуют подвижные гаметы (планогамия), обе или одинаковые (изогамия), или отличающиеся друг от друга (анизогамия)];

5) *Monoblepharidales* — моноблефаридовые [морфологически сходен с предыдущим, но в половом процессе участвуют подвижные гаметы (антерозоиды) и неподвижная оплодотворяемая клетка (оогоний)].

Второй ряд (*Biciliata*) включает 6 порядков:

1) *Plasmodiophorales* — плазмодиофоровые (вегетативное тело — амебоид, в зрелом состоянии распадающийся на споры с оболочками, после периода покоя прорастающие в двужгутиковые зооспоры, у которых один длинный жгутик направлен вперед, а другой, короткий, назад; внутриклеточные паразиты растений);¹

2) *Woroninales* — ворониновые (вегетативное тело — амебоид, в зрелом состоянии превращающийся в один или несколько зооспорангиев или в покоящиеся споры; паразиты водорослей и водных грибов);

3) *Leptomitales* — лептомитовые (зооспоры дипланетические, образующиеся при распаде всего содержимого зооспорангия; в оогонии возникает одна ооспора; имеется развитый многоядерный мицелий, гифы с перетяжками);

4) *Saprolegniales* — сапролегниевые (зооспоры дипланетические; мицелий состоит из хорошо развитых ветвящихся свободных гиф и слабо развитых ризоидов, внедряющихся в субстрат; на гифах развиваются зооспорангии, оогонии и антеридии; в оплодотворенном оогонии образуется несколько ооспор; гифы без перетяжек);

5) *Lagenidiales* — лагенидиевые (зооспоры монопланетические; вегетативные органы слабо развиты, иногда в виде простой или слабо разветвленной клетки; паразиты на водорослях);

¹ В литературе высказываются разноречивые мнения относительно количества жгутиков.

6) *Peronosporales* — пероноспорные (зооспоры дву-жгутиковые; зооспорангий или развивает зооспоры, или, не образуя зооспор, превращается в конидию; половой процесс — типичная оогамия).

Третий ряд (*Aciliata*) включает 4 порядка:

1) *Mucorales* — мукооровые (мицелий хорошо развитый, ветвящийся, многоядерный, вначале несептированный, позже появляются перегородки, отделяющие органы размножения от мицелия; при бесполом размножении образуются спорангии с большим числом спорангиоспор, или спорангиоли с очень ограниченным числом спор, или маленькие односпоровые спорангиоли — конидии; при половом процессе — типичная зигогамия с образованием покоящихся спор).

2) *Entomophthorales* — энтомофторные (мицелий вначале несептированный, но позже возникают поперечные перегородки, или мицелий распадается на отдельные клетки — геммы; бесполое размножение конидиями, образующимися на булабовидных конидиеносцах; спорангии отсутствуют; половое размножение типа зигогамии; большей частью паразиты на насекомых).

Два других порядка — *Ecscrinales* и *Zoopagales* — имеют мицелий слабо развитый, бесполое размножение конидиями; паразиты на амебах, нематодах, насекомых и других животных.

В почве обнаружены грибы главным образом из порядков *Mucorales*, *Mycocytridiales*, *Blastocladales*, *Monoblepharidales*, *Saprolegniales*, *Leptomitales*, *Peronosporales*. Низшие грибы из других порядков в почве почти или совсем не встречаются.

ASCOMYCETES — АСКОМИЦЕТЫ, ИЛИ СУМЧАТЫЕ ГРИБЫ

В классе насчитывается более 40 тыс. видов, из них несколько десятков видов, обнаруженных в почве, главным образом из сем. *Gymnoascaceae* и *Eurotiaceae* (пор. *Plectascales*), сем. *Chaetomiaceae*, *Sordariaceae* и *Sphaeriaceae* (пор. *Sphaeriales*) и сем. *Nectriaceae* (пор. *Hypocreales*) и по 2—3 вида из других порядков. Поэтому нет оснований излагать всю классификационную систему этого класса. Основная характеристика указанных порядков следующая.

1. Порядок *Plectascales* — плектасковые. Плодовые тела типа клейстокарпиев, без полости внутри, сумки расположены внутри общей склероциальной ткани; у наиболее простых форм сумки почти не прикрыты или покров вокруг них состоит из рыхлого сплетения мицелия (р. *Gymnoascus*).

2. Порядок *Sphaeriales* — сфериевые. Плодовые тела — перитеции с ясно заметным устьищем на вершине, нередко оттянутым в носик, твердой консистенции, кожистые, углистые, большей частью черного цвета; при расположении внутри стромы оболочка их всегда хорошо выражена.

3. Порядок *Hypocreales* — хипокриевые. Плодовые тела — перитеции всегда с ясно выраженным устьищем, мягкой консистенции, более или менее ярко- или светлоокрашенные; при погружении в строму оболочки их могут полностью утрачиваться.

DEUTEROMYCETES (FUNGI IMPERFECTI) — НЕСОВЕРШЕННЫЕ ГРИБЫ

В этом классе насчитывается около 30 тыс. видов, из них несколько сот почвенных.

Класс подразделяется на 5 порядков.

1. Порядок *Moniliales* (*Hypomycetales*) — гифомицеты. Образуют конидии на одиночных или собранных в пучки (коремии), или расположенных слоем конидиеносцах, развивающихся всегда на поверхности питательного субстрата.

2. Порядок *Melanconiales* — меланкониевые. Развивают конидиеносцы, сгруппированные в тесный слой и погруженные в питательный субстрат на так называемом ложе, т. е. подстилке, состоящей из плотного сплетения гиф.

3. Порядок *Sphaeropsidales* (*Pycnidiales*) — сферопсидные, или пикнидиальные. Образуют короткие конидиеносцы, расположенные внутри особых вместилищ — пикнид.

4. Порядок *Leptostromatales* (*Pseudopycnidiales*) — лептостроматовые, или псевдопикнидиальные. Образуют короткие конидиеносцы, расположенные в виде плоского гимениального слоя в пикнидах, не вполне развитых, или с основанием и боковыми стенками, или едва намечающихся на вершине, или в виде прикрывающего щитка.

5. Порядок *Mycelia sterilia*. Развивают только стерильный мицелий, лишенный способности образовывать как конидии, так и споры иного происхождения.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА пор. MONILIALES (HYPHOMYCETALES)

Порядок *Moniliales* охватывает примерно 700 родов, включающих около 7500 видов, из них свыше 500 почвенных.

Грибница у грибов этого порядка большей частью хорошо развита, бесцветная, светло- и яркоокрашенная или темноокрашенная, септированная, ветвящаяся, развивающаяся как на поверхности, так и внутри питательного субстрата (погруженная), иногда формирующая своеобразные подушковидные стромы. На определенной стадии развития в грибнице возникают вертикально приподнятые обособленные спороносные гифы (конидиеносцы), образующие репродуктивные споры бесполого размножения — конидии.

Конидиеносцы развиваются на поверхности субстрата одиночно, реже группами, или скученно (иногда плотно срастаясь в цельные пучки, называемые коремиями), или сплошным слоем на местном скоплении или сплетении гиф мицелия, образующем спородохнии (спороложа).

Конидии возникают непосредственно на конидиеносцах (на верхушке, с боков, вдоль всей продольной оси, на выступах, зубчиках, ответвлениях) или же на особых коротких веточках — фиалидах или стеригмах, расположенных на конидиеносце. Среди гифомицетов имеются грибы, у которых конидии образуются в результате расчленения гифы мицелия на отдельные клетки — конидии (споры). Конидии большей частью возникают экзогенно, изредка псевдоэндогенно.

У некоторых грибов наряду с репродуктивным имеется и вегетативное размножение. Развитие грибов при этом способе размножения может происходить из простых обрывков мицелия и его производных (склероциев, шнуров и т. п.), а также посредством так называемых вегетативных спор (хламидоспор, оидий, бластоспор и артроспор), возникающих непосредственно из гиф мицелия, но без участия специально дифференцированных спорообразующих ветвей мицелия или органов.

Порядок *Moniliales* подразделяется на четыре семейства: *Moniliaceae* (*Mucedinaceae*), *Dematiaceae*, *Stilbaceae* (*Stilbellaceae*) и *Tuberculariaceae*.

Таблица для определения семейств
порядка *Moniliales*

I. Конидиеносцы и спороносящие гифы на поверхности субстрата расположены поодиночке или собраны небольшими группами, не сросшиеся (не спаянные) в пучки (коремии).

А. Мицелий, конидиеносцы и конидии бесцветные или светлоокрашенные (конидии в массе часто окрашены в яркие цвета) Сем. **Moniliaceae**.

Прим. Как исключение, у некоторых видов р. *Aspergillus* Mich. конидии могут иметь темную или черную окраску.

Б. Мицелий и конидиеносцы темноокрашенные, обычно коричневые, оливковые или черноватые. Конидии большей частью темноокрашенные, обычно коричневые, бурые, оливковые, черноватые, редко дымчатые, светлоокрашенные или почти бесцветные Сем. **Dematiaceae**.

Прим. У этого семейства не очень редко встречаются виды, у которых мицелий или конидиеносцы бледноокрашенные, но, как правило, у любого представителя данного семейства один из важнейших элементов строения гриба (мицелий, конидиеносцы, конидии) всегда имеет темно-оливковую, коричневую, бурую или черную окраску.

II. Конидиеносцы расположены вертикально, группами, тесно сросшиеся (спаянные) в пучки — коремии Сем. **Stilbaceae**.¹

III. Конидиеносцы расположены тесным слоем, большей частью короткие, приподнимающиеся, возникающие на поверхности субстрата на плотном сплетении гиф, образующих выпуклые подушечки, обычно имеющие яркую окраску — спородохии, или на рыхлом сплетении гиф, образующем пионноты. Сем. **Tuberculariaceae**.

Из пор. *Melanconiales* в почве обнаружен лишь вид *Cryptomella acutispora* v. Веума из сем. *Melanconiaceae*.

¹ Род *Stilbum* в ряде микологических руководств дается под новым названием *Stilbella*, вследствие чего некоторые авторы изменили название сем. *Stilbaceae* на *Stilbellaceae*.

Несколько больше, но также очень немного встречаются грибы из пор. *Sphaeropsidales* и только из сем. *Sphaeropsidaceae*, которое характеризуется наличием шаровидных, темных, кожистых пикнид, имеющих устье или замкнутых.

ОСНОВНЫЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В СИСТЕМАТИКЕ ГРИБОВ пор. MONILIALES (HYPHOMYCETALES)

I. Конидиеносцы

1. Характер расположения

Расположенные поодиночке, свободно отстоящие друг от друга или объединенные в группы, но не сросшиеся (не спаянные) между собой.

Расположенные группами, сросшиеся (спаянные) между собой в пучки — коремии.

Расположенные тесным слоем на подушковидных стромах, состоящих из рыхло сплетенных гиф мицелия (спороложка, или спородохия), большей частью короткие.

2. Степень дифференциации

Отчетливо обособленные (дифференцированные), заметно отличающиеся от вегетативных гиф мицелия.

Мало или почти не отличающиеся от вегетативных гиф мицелия.

3. Тип ветвления

Неразветвленные (простые).

Разветвленные (моноподiallyно,¹ симподiallyно,² дихотомически,³ мутовчато, кистевидно и т. п.).

Наличие фиалид, стеригм, метул, добавочных веточек (рами), 1, 2 или 3 ярусов мутовок (фиалид, метул, веточек), количество элементов мутовки и их размеры.

¹ Моноподiallyным называется такое ветвление, при котором боковые ветви отходят от главной центральной оси конидиеносца.

² Симподiallyное ветвление — это ветвление, при котором центральная ось конидиеносца прекращает свой рост, а боковая ветвь ее служит как бы продолжением центральной оси; от этой боковой ветви отходит боковая ветвь следующего порядка, тоже как бы продолжающая центральную ось, и т. д. Таким образом, главная ось конидиеносца состоит из ветвей различных порядков.

³ Дихотомическим называется такое ветвление, при котором конидиеносец в точке роста разветвляется вилкообразно, обычно несколько раз, последовательно.

4. Окраска

Бесцветные, светло-, ярко- или темноокрашенные (оболочка и содержимое).

5. Разные признаки в строении и положении конидиеносца

Положение (приподнимающиеся, прямостоящие, ниспадающие, стелющиеся)

Размеры (высота и толщина).

Форма и характер окончания (вершинка).

Поверхность оболочки (гладкая, шероховатая и др.).

Способ отхождения (от субстратных или воздушных гиф мицелия).

II. Конидии

1. Строение и окраска

Одноклеточные, двуклеточные или многоклеточные; с поперечными и продольными перегородками (муральные); наличие придатков.

Бесцветные, светло-, ярко- или темноокрашенные; окраска в массе.

2. Способ образования

Путем расчленения (распадения) недифференцированной или слабо обособленной гифы мицелия на отдельные клетки — конидии (споры).

Путем возникновения на более обособленных (дифференцированных) ответвлениях грибницы (т. е. на конидиеносцах).

Акропетально или базипетально.

Экзогенно или псевдоэндогенно.

3. Расположение

Непосредственно на конидиеносце.

На фиалидах, стеригмах, зубчиках, выступах или веточках.

На интеркалярных расширенных клетках.

На вершине (апикально), с боков (плеврогенно).

Одиночные, в цепочках (параллельных, переплетающихся или соединенных в колонку) или собранные (скупенные) в головки или гроздьи и т. п.

4. Форма и структура оболочки (эписпория)

Цилиндрические, шаровидные, овальные, эллипсоидные, яйцевидные, продолговатые, грушевидные, булабовидные, обратно-булабовидные, серповидные, нитевидные, спиральнозагнутые, звездчатые и т. п.

Гладкая, шероховатая, шиповатая, бородавчатая, щетинистая и т. д.

5. Характер прорастания во влажной камере

III. Колонии (дернинки, дерновинки)

1. Характер строения, окраска и другие признаки

Строение: войлочные, бархатистые, шерстистые, пушистые, ватообразные, паутинистые, клочковатые.¹

Поверхность: ровная, бугристая, складчатая, зональная.

Окраска наружной (верхней) поверхности колонии и ее изменения с возрастом культуры.

Окраска обратной (нижней) стороны колонии.

Форма.

Характер края (цвет, ширина и контур).

Быстрота роста (величина колонии в разные сроки роста культуры).

Строение центральной части колонии: кратерообразная, куполообразная, плоская, наличие хохолка и т. п.

Наличие эксудата, его цвет.

IV. Мицелий и его производные

1. Расположение, окраска, строение и другие признаки

Воздушный, стелющийся по поверхности, погруженный в субстрат; размеры, окраска воздушного и субстратного; строение оболочки и т. д.; степень ветвления, образование петель, анастомозов, склероциев (микросклероциев), шнуров; диффузия пигмента в среду (агар).

2. Споры вегетативного размножения²

Хламидоспоры — отдельные участки гиф, обособившиеся от соседних частей мицелия и образовавшие вокруг себя утолщенную оболочку.

Оидии — короткие округлые или удлинённые членики отдельных веточек грибницы, быстро разъединяющиеся друг с другом.

Геммы — те же оидии, но с более плотной и обычно окрашенной оболочкой.

Бластоспоры — округлые клетки, размножающиеся почкованием (т. е. образованием небольшого вершинного, реже бокового бугорка, который дорастает до величины материнской клетки, а затем, потеряв с ней связь, становится независимым).

¹ Бархатистость колонии определяется плотно растущими спороносящими веточками, отходящими непосредственно от субстратного мицелия; пушистость — обильно развитым воздушным мицелием; шерстистость — большим количеством тяжёлых; шероховатость возникает в результате обильного образования коремий (Методы. . ., 1966).

² Описание спор вегетативного размножения дано по Н. А. Наумову (1952).

Артроспоры¹ — четковидно возникающие споры, образующиеся путем нарастания основной клетки, расположенной на воздушной грибнице, и отходящие от нее в воздух, где они быстро распадаются.

Прим. К неветвящемуся типу конидиеносцев нами относятся такие конидиеносцы, у которых по всей длине осевого стволика отсутствуют какие-либо ответвления, включая метулы и фиалиды. Разные спороносные веточки, метулы, в том числе фиалиды, расположены только на вершине конидиеносца. Конидии могут возникать не только на веточках, фиалидах, стеригмах и подобных им образованиях, расположенных на верхушке конидиеносца, но и плеврогенно на боковой поверхности осевого стволика конидиеносца, на различных утолщениях, сгибах, бугорках, зубчиках и т. п. К неветвящимся конидиеносцам относятся, например, конидиеносцы родов *Aspergillus*, *Periconia*, *Cephalosporium*, *Trichothecium*, *Acrothecium*, *Dactylaria* и др. К ветвящемуся типу конидиеносцев нами причисляются такие конидиеносцы, у которых не только от вершины, но и по длине всего осевого стволика отходят различные ветви: рами, метулы, фиалиды и т. п. К ветвящимся конидиеносцам относятся, например, конидиеносцы родов *Diplocladium*, *Cylindrocladium*, *Dactylium* и часть видов р. *Penicillium* и др.

Фиалиды и стеригмы в некоторых микологических руководствах полностью отождествляют, например в «Определителе низших растений» (1954). В других справочниках, в частности «A glossary of Mycology» (London, 1957), «Dictionary of the Fungi» (London, 1956, 1961), дается разное описание этих структур. Обычно к стеригмам относят маленькие шиловидные выросты, несущие споры, например базидиоспоры на базидиях. Фиалида [термин, данный Вьюллемином (Vuillemin, 1910a, 1910b)] — большей частью конечная спороносящая клеточка — веточка сложного по строению конидиеносца, обычно бутылевидной формы, образующая на своем верхнем конце одиночную конидию или в базипетальной последовательности цепочку или головку конидий. Фиалиды могут возникать на метулах или непосредственно на стволике конидиеносца, а также самостоятельно на гифе мицелия. Фиалиды встречаются, например, на конидиеносцах родов *Penicillium*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Spicaria* и др.

НЕКОТОРЫЕ ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О СТРОЕНИИ ПОЧВ

До проведения микологического анализа почв необходимо иметь по возможности морфологическое описание их, которое наиболее правильно производить в естественном их сложении. Лучший способ такого изучения — это

¹ Артроспоры иногда входят в состав сложно дифференцированного конидиального аппарата и поэтому являются как бы связующим звеном между вегетативным и репродуктивным размножением.

описание почвенного разреза, закладываемого в поле. Для этого в поле вырывают специальную почвенную яму глубиной не менее 1 м и отвесно зачищают одну из стенок. Эта стенка ямы должна быть расположена так, чтобы солнечный свет падал сзади на человека, описывающего ее. Изучение морфологических особенностей почвы начинают с выделения почвенных горизонтов и дают им название по условиям образования (генезису). Весь почвенный разрез прежде всего подразделяют на почву и подпочву. В свою очередь почву делят на два основных горизонта, обозначаемых А и В; подпочву называют горизонтом С. Горизонт А является верхней частью почвы. В нем почвообразовательный процесс развивается наиболее полно, происходит накопление органических веществ и вынос различных воднорастворимых минеральных и органических веществ в глубину. Если горизонт А неоднороден по свойствам (выявляются различия в цвете, механическом составе, структуре и т. д.), его обычно еще подразделяют на А₁, А₂, А₃. Органические остатки, скапливающиеся над минеральной частью почвы, например в лесу в виде лесной подстилки, в целинной степи в форме степного войлока, принято обозначать А₀. Поверхностный горизонт А в случае его распашки выделяют как А_{пах}. Горизонтом В называют нижнюю часть почвы, куда вымываются из верхнего горизонта различные вещества (горизонт иллювия).

Ниже приводим пример морфологического описания почвы лесолуговой зоны (Воробьев и Аваев, 1961, стр. 111).

Слабоподзоленная почва на светло-желтом рыхлом песке (основной лес на песках третьей террасы к р. Лене, южнее г. Якутска).

Горизонт А₀ — 0—2 см. Лесная подстилка, состоит из хвои сосны и лиственницы с включением угля (следы лесных пожаров).

Горизонт А₁ — 2—5 см. Подзолистый, желтовато-серый, песчаный, рыхлый, пронизан корешками растений; при подсыхании приобретает белесоватый оттенок; переход в следующий горизонт малозаметный.

Горизонт А₂ — 5—12 см. Подзолистый, желтовато-белесоватый, песчаный, оподзолен очень неравномерно в виде пятен по ходам корней лесной растительности; переход неотчетливый.

Горизонт В — 12—25 см. Неясно иллювиальный, слабо-охристый, песчаный, рыхлый; от нижеследующего горизонта отделяется слабо.

Горизонт С — 25—60 см (конец разреза). Почвообразующая порода, рыхлый бледно-желтый песок без валунов, мелкий, однородный.

ОТБОР ОБРАЗЦА ПОЧВЫ ДЛЯ МИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Познание видового состава почвенной микрофлоры возможно лишь путем выделения грибов из почвы и культивирования их на искусственных средах. Только при соблюдении определенных приемов выделения микроскопических грибов из почвы удастся приблизительно выяснить истинный количественный и качественный состав их в исследуемых образцах. Распределение и видовой состав этих грибов зависят от механических, физических и химических свойств почвенных горизонтов, а также в значительной степени от заселенности почвы высшими растениями.

Прежде чем приступить к детальному изучению почвенных микроскопических грибов, необходимо выделить их из почвы в чистые культуры. Надо быть полностью уверенным, что изучаемые грибные организмы действительно являются обитателями исследуемого образца почвы, а не попали извне. Существенное значение в проведении микологического анализа почвы имеет методика взятия почвенной пробы. При несоблюдении определенных требований асептики в пробу почвы можно легко занести споры микроскопических грибов из воздуха, лабораторной посуды и инструментов, с одежды, рук исследователя и т. д.

Флора почвенных микроскопических грибов очень богата и разнообразна по своему видовому составу. Необходимо учитывать то обстоятельство, что не всегда наибольшее число этих грибов обитает в самом верхнем слое почвы. Под влиянием температуры, света, сухости и других причин здесь их может быть меньше, чем в нижележащем слое. Поэтому при исследовании состава и степени заселенности почвы микромицетами следует пробы брать по профилю почвы с разных глубин: 0—2, 2—5, 5—10, 10—20, 20—30, 30—50 и иногда 50—70 см. Из более глубоких слоев почвы имеет смысл исследовать те, которые расположены вблизи корневой системы растений, или же по ходу отдельных корней, так как глубоко в почве, свободной от корней, грибы обнаруживаются редко. Лучшие всего почвенные пробы брать из специально заложенной почвенной ямы. В этом случае почвовед отмечает на почвенном профиле все основные генетические горизонты и дает им соответствующую почвенную характеристику. Эти сведения помогут правильно избрать для исследова-

ния те горизонты, которые представляют наибольший интерес для микологического анализа. Почвенный разрез может быть глубоким, до 3 м. Микологу нет нужды исследовать глубоко лежащие материнские породы, он должен фиксировать свое внимание главным образом на верхних горизонтах почвы в пределах 0—50 см.

Перед взятием почвенных образцов в полевых условиях необходимо заранее заготовить специальную сумочку с нужными инструментами и материалами. В сумочке должны находиться саперная металлическая лопатка, большой нож, три столовые алюминиевые ложки со специально отточенными краями, шпатель, скальпель, стамеска, металлическая сантиметровая линейка, пинцет, вата, бутылочка с денатуратом и бумажные стерильные пакеты (делаются большей частью из бумаги «Крафт» или пергаментной бумаги).¹ Кроме того, необходимо иметь при себе почвенный бур на случай, если не будет специальной почвенной ямы. Назначение каждого предмета в сумке следующее: саперная лопатка — для откапывания небольшой ямы; нож — для выравнивания стенки почвенной ямы; три столовые ложки — для взятия пробы (двумя ложками последовательно снимается внешний слой, который откидывается в сторону, ибо он может быть загрязнен посторонней микрофлорой, а третьей вычерпывается почва, примерно 250—300 г, и вносится в один из стерильных пакетов); шпатель и пинцет — для раскрытия конвертов и для других необходимых манипуляций; металлическая линейка — для измерения глубины почвенного слоя.

Все предметы перед каждым употреблением тщательно протирают стерильной марлей и обжигают над пламенем зажженного кусочка ваты, смоченной денатурированным спиртом. Причем вату, смоченную спиртом, нужно вложить в пустую консервную банку и затем поджечь, иначе при сильном ветре будет трудно поддерживать нормальное пламя, необходимое для тщательной стерилизации инструментов. При взятии пробы, помимо записей в полевом дневнике, пишут простым карандашом подробную этикетку, а также делают все важные пометки на кон-

¹ Некоторые исследователи предлагают образцы исследуемых почв брать в пергаментные пакеты, заложенные в полотняные мешочки или стеклянные банки с ватными пробками.

верте (дата отбора пробы, место и глубина горизонта почвы).¹ Целесообразно взять пробы почв из одного горизонта в 3—5 конвертов из разных мест. После взятия пробы использованные металлические предметы тут же на месте тщательно очищают от прилипших к ним частиц почвы и затем вновь стерилизуют (фламбируют) на огне. При взятии пробы необходимо быть весьма осторожным и не занести в нее частицы почвы из других горизонтов. Для этой цели на основании нашего опыта предлагаем пользоваться козырьком, сделанным из любой металлической пластинки. Козырек втыкается в почву сверху над тем горизонтом, из которого будет взята проба почвы, чтобы защитить ее от осыпавшихся частиц почвы верхних пластов. При этом рекомендуется брать пробы почвы по профилю почвенной ямы снизу вверх (по ломаной линии). Средний почвенный образец составляется смешиванием трех-пяти индивидуальных проб весом по 100—200 г. При необходимости охарактеризовать микрофлору почвы участка площадью в 1 га Н. А. Красильников (1936) рекомендует выбрать на нем несколько стометровок, например 5, и на каждой из них взять по 5 образцов. Каждый образец составляют из 3 смешанных проб. В случае, если участок менее 100 м², берут 3 образца по диагонали. Каждый образец составляют из 3 проб и анализируют отдельно. Микроскопические грибы, так же как и другие микроорганизмы, расположены в почве неравномерно, в виде макро- и микроочагов, и поэтому следует анализировать как можно большее число почвенных образцов. При изучении пахотных почв образцы надо брать на всю глубину пахотного слоя, удаляя лишь самый верхний слой почвы, который обычно загрязнен посторонней микрофлорой. Собранные образцы почв в пакетах в летнее время года просушивают на воздухе в тени, причем лучше где-нибудь на сквозняке, в течение нескольких часов. Если влажность почв была значительной, то их следует сушить в термостате или сушильном шкафу при 30°. При медленном высыхании влажных образцов почвы

¹ В полевом дневнике записывают следующее: 1) дату отбора почвенной пробы, 2) место взятия пробы, 3) краткое описание рельефа и растительности участка, 4) характер почвы и описание почвенного профиля, 5) агрономические мероприятия на участке (внесение удобрений, фунгицидов и т. д.), 6) глубину горизонта взятия пробы.

может произойти сильное изменение видового состава микроскопической грибной флоры.

Одновременно необходимо брать почву в специальные металлические закрывающиеся стаканчики для учета влажности. Первый засев почвы для проращивания микроскопических грибов на искусственных питательных средах необходимо осуществить не позднее первых 2—3 суток после взятия пробы; его лучше всего производить в полевой лаборатории, организованной вблизи места взятия почвенных образцов. Повторные засева на различные среды можно провести через неделю и позже. В исключительных случаях допускается хранение образцов почвы в воздушно-сухом состоянии в течение нескольких месяцев. Однако следует иметь в виду, что за это время возможна гибель части почвенных грибов. Почву перед засевом следует измельчить молоточком в пакетах, если бумага плотная, или в стерильной ступке.

Хранить сухие образцы почвы рекомендуется в прохладном, но не сыром месте. Сухую почву в пергаментных пакетах, заложенных в полотняные мешочки, можно хранить сравнительно недолгое время. Для лучшего и более длительного сохранения в почве жизнеспособности грибов необходимо образцы почвы содержать в условиях доступа к ним свободного воздуха. В этом отношении удобны конверты из бумаги «Крафт», так как внутри их создается и поддерживается та степень небольшой аэрации, которая обеспечивает нормальное существование и сохранение жизнеспособности грибных зародышей, содержащихся в почве.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ ИЗ ПОЧВЫ

Почвенные микроскопические грибы можно исследовать непосредственно в почве или после выделения их из почвы (при росте на искусственных питательных средах). И в том и в другом случае необходимо наиболее полно выявить и идентифицировать весь видовой состав грибов, обитающих в почве. Существующие методы исследования почвенных микроскопических грибов можно подразделить на две основные группы.

К первой группе относятся методы, основанные на выделении грибов из почвы путем посева мелких частичек почвы или водно-почвенных суспензий (болтушек), приготовленных из смеси почвы и воды, на питательные микробиологические среды для выращивания грибных культур из различных грибных зародышей, находящихся в почве.

Ко второй группе относятся методы, основанные на исследовании грибов в условиях их естественного существования в почве.

В ранних микологических работах для выделения микроскопических грибов из почвы пользовались главным образом следующими двумя способами.

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

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

Оба эти способа использовались и в последующих исследованиях по почвенным грибам или в неизменном, или несколько модифицированном виде.

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

Отрицательная сторона указанной группы методов выражается в их ограниченной способности к выделению всех форм грибов, обитающих в почве.

Почвенные грибы, выращиваемые в лабораторных средах, развиваются в условиях, весьма не схожих со средой их существования в природе. Значительная часть грибов не способна развиваться на лабораторных средах, и поэтому они остаются вне поля зрения исследователя. При выделении почвенных микроскопических грибов рекомендуем одновременно пользоваться указанными выше двумя основными методами первой группы.

При пользовании способом «сухого», или «непосредственного» посева на поверхность питательной агаровой

пластинки в чашки Петри засеваются мелкая измельченная почва в количестве 10—15 мг с кончика скальпеля путем его встряхивания, по возможности равномерно. В другие чашки почву можно разложить по агаровой пластинке пинцетом отдельными небольшими комочками. В среднем засев почвы производится в 6—8 чашках Петри.

При пользовании способом разливки предварительно изготовленная водная почвенная суспензия высевается на поверхность агаровой питательной среды или вносится в ее толщу. При этом взятая почва подвергается намачиванию в стерильной воде в течение 30 мин. с последующим тщательным встряхиванием в течение 20 мин. Количество воды во много раз больше навески.

При помощи методов второй группы удается фиксировать природные группировки почвенных грибов, выявить и исследовать почти все формы грибов, обитающих в почве. Полное сохранение ценоза всех микробных организмов, обитающих в почве, и в том числе микроскопических грибов, является наиболее положительной стороной этой группы методов исследований.

При применении методов второй группы возможность выделения грибов в чистые культуры очень ограничена.

Существенный недостаток этих методов состоит в том, что при их применении не представляется возможным произвести точную видовую идентификацию грибов, обнаруженных в почве.

Ниже мы приводим детальное описание способов первой группы методов.

ПОДГОТОВКА И ПРОВЕДЕНИЕ ПОСЕВА ПОЧВЫ НА ИСКУССТВЕННЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

При микологических анализах почвы следует брать не менее 3—4 образцов и каждый из них высевать на 3—5 повторных чашек Петри для каждой из сред.

Посев почвы производят в виде водно-почвенных суспензий в разведениях 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000 и т. д. в зависимости от типа, состояния, влажности почвы и т. п. Наиболее точный подсчет получается, если на чашке с агаром развивается от 30 до 50 колоний гри-

бов. При более разреженном или, наоборот, более густом посеве почвы при подсчете на 1 г абсолютно сухой почвы результаты окажутся сравнительно менее точными.

Обычно первую исходную водно-почвенную суспензию делают из расчета 10 г почвы на 90 мл воды. Предварительно перед посевом почвы на агаровые питательные среды рекомендуется взятую навеску почвы в 10 г поместить в стерильную фарфоровую чашку или ступку и тща-

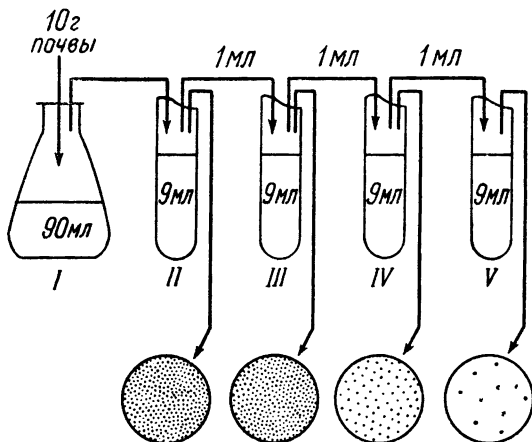


Рис. 1. Схема посева из разведений почвенной суспензии.

I—V — разведения.

тельно растереть. Перед посевом готовят для каждого образца по две стерильные колбочки (Эрленмейера) емкостью 250 мл. Одна содержит 90 мл воды, другая остается пустой. Почва перед растиранием в ступке увлажняется водой из первой колбы и после растирания переносится во вторую. Колбу с водно-почвенной суспензией встряхивают в течение 5 мин., затем суспензии дают отстояться в течение 30 сек., чтобы осели на дно крупные минеральные частицы, которые могут в дальнейшем затруднить поступление суспензии в пипетки. После этого готовят различные разведения водно-почвенной суспензии для посева на питательный агар.

После взбалтывания водно-почвенной суспензии и последующего отстаивания в течение 30 сек. из колбы сте-

рильной пипеткой переносят 1 мл суспензии в пробирку с 9 мл стерильной воды. Суспензию в этой пробирке с помощью новой стерильной пипетки тщательно перемешивают, трижды вбирая и выпуская из нее взвесь, и 1 мл данной суспензии переносят в следующую (вторую) пробирку, содержащую также 9 мл стерильной воды. И, наконец, из последних разведений производят посев водно-почвенной суспензии на питательный агар (рис. 1). На поверхность агара обычно наносят одну каплю водно-почвенной суспензии; с помощью стеклянного стерильного шпателя ее распределяют по всей поверхности агаровой пластинки в чашке Петри. Таким образом, для каждого нового разведения необходимо брать отдельную чистую стерильную пипетку. Предварительно необходимо измерить размер капель пипеток и отобрать пипетки с одинаковой величиной капли. На каждый посев необходимо также употреблять по одному стерильному шпателю. Обычно водно-почвенные суспензии из различных разведений, большей частью из разведений 1 : 10 000, в количестве 0.1 или 0.2 мл наносят на поверхность немного подсушенного питательного агара каждой чашки Петри. Для учета и выделения грибов рекомендуется делать посев водно-почвенной суспензии не на поверхность застывшего агара, а вносить почвенную суспензию в количестве 0.5 (до 1.0) мл непосредственно в растопленную толщу неостывшего, но не очень горячего агара, имеющего температуру около 40—45° и разлитого по 25—30 мл в чашки Петри. При разливке агара необходимо стремиться к тому, чтобы на крышке агара не конденсировалась вода. После внесения суспензии путем легкого покачивания чашки Петри добиваются равномерного распределения водно-почвенной суспензии по всему слою растопленного агара. Следует заметить, что такой способ исключает возможность разрушения мицелия гриба на отдельные маленькие участки (обрывки), которое может иметь место при растирании эмульсии на твердом агаре с помощью шпателя.

Развитие колоний микроскопических грибов в толще агаровой пластинки в чашке Петри происходит постепенно, что облегчает их выделение в отдельные культуры. Засеянные чашки Петри помещают в термостат при температуре 23—25° не менее чем на 10—15 суток; через каждые 5 суток рекомендуется просматривать колонии

грибов и производить их учет. Следует подсчитывать как общее количество колоний, так и количество каждого типа колоний с отливкой их в пробирки на косяки с питательной агаризованной средой.

Для посева на каждый почвенный образец необходимо подготовить следующее (Звягинцев, 1966):

1) колбу (Эрленмейера) объемом 250 мл с 90 мл стерильной водопроводной воды;

2) такого же объема стерильную пустую колбу на случай, если посев производят с предварительным растиранием почвенной суспензии;

3) стерильную фарфоровую трубку для растирания почвы;

4) пробирки с 9 мл стерильной водопроводной воды; обычно заготавливают от 3 до 5 пробирок с водой на каждый посев;

5) стерильные мерные пипетки 1—2 мл; количество пробирок и пипеток определяется тем, какое разведение необходимо приготовить для посева исследуемой почвы; пипетки надо отобрать обязательно одинакового размера;

6) стерильные шпатели;

7) стерильные чашки Петри;

8) стерильные питательные среды.

Метод посева водно-почвенной суспензии на питательные агаровые среды все же не дает возможности выявить полную почвенную грибную флору, так как базидиальные и большая часть сумчатых грибов вовсе не учитываются. Также удается выявить далеко не все фикомицеты и несовершенные грибы. Кроме того, число грибных колоний, образовавшихся на поверхности питательного агара, не совсем точно, а иногда очень относительно отражает действительное соотношение разных систематических групп грибов в исследуемой почве. Так, например, обрывок активного мицелия при посеве на агар даст начало развитию только одной колонии, в то время как гриб, находящийся в почве в состоянии массового спороношения, может в этих условиях образовать множество колоний.

Кроме того, при подготовке почвы к микологическому анализу методом «разведений» ее измельчают и затем в виде водных суспензий встряхивают до 15—20 мин. на качалке. В результате гифы мицелия разламываются на разные по величине части (обрывки), и поэтому при высеве суспензии на агаровые питательные среды и по-

следующем подсчете выросших колоний нельзя получить точного представления об истинном количестве грибов в почве. Приемы непосредственного учета бактериальной флоры в почве не могут быть полностью применены к грибам. Описанный выше метод «разведения» также пригоден главным образом для учета почвенных бактерий, а не микроскопических грибов.

Вообще количественный учет грибов в почве менее совершенен, чем учет бактерий, однако он все же осуществляется этим методом с последующим посевом на агаровые среды. Но надо иметь в виду, что учет грибов по методу «разведения» охватывает не только различные споры (конидии), хламидоспоры и другие генеративные образования, но и отдельные части многоклеточных спор, обрывки (фрагменты) гиф, различные структурные фрагменты вегетативного мицелия, мицелиальные шнуры и т. п., способные в соответствующих условиях дать начало развитию новых грибниц и формированию колоний грибов. Ко всем грибным зачаткам, или зародышам, независимо от их морфологической структуры иногда применяют термин «диаспора».

Таким образом, количественный учет грибов по методу «разведений» почвенной суспензии и последующего посева на твердые питательные среды позволяет судить об общем числе грибных зародышей — диаспор в весовой единице почвы, т. е. составить относительное представление о степени заселенности исследуемого образца почвы микроскопическими грибами.

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

$$a = \frac{b \times v \times z}{\partial},$$

где a — количество грибных зародышей (диаспор) в 1 г сухой почвы; b — среднее количество колоний на чашке; v — разведение, из которого сделан посев; z — количество капель в 1 мл суспензии; ∂ — вес почвы, взятой для анализа (Звягинцев, 1966).

Следовательно, существующие методы позволяют характеризовать численность грибов в почве не количеством

колоний на искусственных питательных средах, а количеством обнаруженных видов.

Имеются сведения, что характер распределения грибных диаспор менее однороден (равномерен), чем бактерий. Например, в смежных почвенных образцах, взятых на расстоянии не более 1 м друг от друга, можно обнаружить соотношение грибов, как 1:2. Поэтому для таких количественных анализов необходимо тщательно готовить среднюю почвенную пробу из 3—4 образцов при большом количестве повторностей.

Если в почве явно преобладают какие-либо быстрорастущие грибы, как например виды р. *Penicillium*, то следует прибегать к более высоким разведениям почвы в водных суспензиях и производить высев на различные питательные среды, и в особенности на «голодные» среды, содержащие незначительное количество питательных веществ. На средах, богатых питательными веществами, как например на агаризированном неохмельненном пивном сусле (сусле-агаре), картофельном агаре и Чапек-агаре, обычно пышно развиваются быстрорастущие плесневые почвенные грибы из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* и других, являющиеся в некотором смысле космополитами. На «голодных» средах все формы грибов развиваются сравнительно медленно и трудно, поэтому не наблюдается картины, при которой одни виды грибов «забивают» другие; каждый вид гриба развивается в виде небольшой колонии, отчетливо отграниченной от других растущих колоний. Рекомендуется водные почвенные суспензии высевать на следующие среды: сусло-агар, Чапек-агар (среды, богатые питательными веществами) и на агар с почвенной вытяжкой, водный агар и на агар с разведенным в 8—10 раз суслом (среды, бедные питательными веществами). На «голодные» среды лучше непосредственно высевать почву в виде мелких частичек.

На агаре с почвенной вытяжкой или на водном агаре большинство микромицетов развивается медленно, размеры их колоний очень невелики, иногда не превышают 2—3 мм в диаметре. Даже грибы, начинающие сразу энергично развиваться на этих «голодных» средах, все же не захватывают всей площади поверхности агаровой пластинки в чашке Петри. Значительная часть площади агара остается не заросшей грибами. Через 10—14 суток (иногда более) после высева почвы на агар постепенно

появляются мелкоочечные колонии особенно медленно произрастающих грибов. Они развиваются на свободных участках агара. При выращивании микромицетов на агаре с почвенной вытяжкой и других «голодных» средах удается выделить наибольшее разнообразие видов грибов. Как правило, на почвенном и водном агарах колонии грибов хорошо отделены друг от друга, что благоприятствует их выделению в чистые культуры.

Надо иметь в виду, что при посеве почвенных суспензий или почвенного мелкозема на питательные микробиологические среды необходимо принять меры для предупреждения развития почвенных бактерий (см. меры подавления бактерий, стр. 37).

К первой группе методов следует отнести еще три.

Метод выращивания микроскопических грибов на мембранном фильтре. Дэвей и Уайльд (Davey and Wilde, 1955) предложили производить высеv водно-почвенной суспензии на мембранный фильтр. Для этого берут почву, просеянную через сито, и помещают в термостат при 23° на 24 часа. Из просушенной почвы и стерильной воды приготавливают суспензию определенного разведения. 100 мл суспензии с помощью электрического вакуума пропускают через молекулярный мембранный фильтр, который после фильтрации суспензии помещают на питательную агаровую среду. Рекомендуется брать среду, пригодную для роста грибов и с низким значением $pH = 4.0-3.8$.

Метод почвенных пластинок. Уоркап (Warcup, 1950) предложил на дно чашки Петри наносить тонким слоем размельченную почву в смеси со стерильным песком и сверху заливать ее расплавленным питательным агаром. В качестве среды он рекомендует использовать подкисленный Чапек-Докс-агар с 0.5%-м дрожжевым автолизатом. Подкисляют среду до $pH = 4.0$. При осторожном встряхивании и вращении чашки Петри находящаяся в ней смесь почвы и песка равномерно распределяется по всей толще расплавленного агара. Если почва сухая и уплотненная или с большим содержанием глины, то лучше ее смешать с несколькими каплями стерильной воды. В одну чашку Петри обычно вносят от 0.005 до 0.15 г почвы. Уоркап указывает, что данный метод по сравнению с методом «разведений» водно-почвенной суспензии позволяет выявить большее

видовое разнообразие грибов, находящихся в почве, в частности грибы из родов *Pythium*, *Mortierella*, и некоторые виды из темноокрашенных гифомицетов, которые обычно не обнаруживаются при исследовании почвы другими методами. Этот метод, по его наблюдениям, дает возможность изолировать также отдельных представителей из класса *Basidiomycetes*, участвующих в образовании «ведьминых колец», как например *Marasmius oreades*, *Tricholoma nudum* и *Psalliota arvensis*. По мнению Т. П. Сизовой и Т. П. Супрун (1958), пользуясь данным методом, легко выделить грибы в чистую культуру. Метод почвенных пластинок лишен недостатков метода прямого посева (инокуляции), при котором вокруг комочков почвы образуется водная пленочка, способствующая росту бактерий даже на кислых агаровых средах. Однако метод Уоркапа все же имеет существенный недостаток, который заключается в том, что при исследовании почв, значительно заселенных грибами, колонии грибов будут возникать и развиваться на питательных средах как из гиф мицелия, так и из спор, находящихся в почве, при этом быстрорастущие виды грибов обычно «забивают» медленно растущие.

Метод выделения грибов из гиф мицелия, находящихся в почве. Уоркап (Warcap, 1955) предложил еще один метод, предназначенный для выделения микроскопических грибов, находящихся в почве в виде мицелия. Метод состоит в следующем: в стакан насыпают 1,0—1,5 г почвы и сильной струей воды наполняют его. Затем образовавшейся водно-почвенной суспензии дают осесть в течение 4—5 мин., воду сливают и суспензию вновь промывают, повторяя это несколько раз, пока она не станет совсем прозрачной. Осевшие частицы почвы распределяют в малом количестве воды, переносят в чашки Петри и обследуют под бинокуляром. Обнаруженные отдельные гифы очищают от частиц почвы, помещают в чистые стерильные чашки и заливают расплавленным питательным агаром, который равномерно распределяют по всей чашке. Чашки ставят в термостат при температуре 20—23°. Через 2—3 суток производят первый просмотр и подсчет выросших на агаре колоний грибов. Следующие просмотры производят на 5—8—10-е сутки. Подсчет количества колоний грибов ведут с нижней стороны чашки Петри; тушью в виде

отдельных точек отмечают учтенные колонии. Из сформировавшихся колоний делают отсевы на свежие косяки агара. Этим методом удается выделять грибы, которые не изолировались другими методами, например *Rhizoctonia solani*.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ ГРИБОВ В ПОЧВЕ ПОСРЕДСТВОМ ВЫСЕВА ПОЧВЕННОГО МЕЛКОЗЕМА НА АГАРИЗОВАННУЮ ВОДУ

По некоторым литературным данным можно сделать вывод, что метод прямого посева почвенных комочков на питательные агаризованные среды в отличие от метода посева водных почвенных суспензий лучше способствует выявлению видов микроскопических грибов, находящихся в почве в виде активного мицелия. Посев почвы в этом случае производят на подкисленный агар (до $\text{pH}=3.8-3.6$); при меньшей степени кислотности вокруг комочков почвы будут энергично и обильно развиваться различные бактерии. Следует иметь в виду, что небольшая часть почвенных микроскопических грибов культивируется плохо или совсем не культивируется при низком значении pH ; оптимальные условия для их развития — щелочная или нейтральная среда. В этих случаях питательную среду нельзя искусственно подкислять, в нее вводят специальные ингибиторы и, в частности, различные антибиотики для предотвращения развития сопутствующих бактерий.

Для исследования почвенной микрофлоры можно с известным успехом пользоваться методом проращивания мелкозема на агаризованной воде, предложенным Д. М. Новоградским (1948).

Вместо искусственных питательных сред, избыточно снабженных азотом и органическими соединениями, используются бедные питательные субстраты. Основной средой, применяемой при этом методе, является агаризованная вода, т. е. водопроводная вода с агар-агаром (вода, содержащая 1.5—2.0% агар-агара). На поверхность ее непосредственно высевают почвенный мелкозем.

Водно-почвенные суспензии при их изготовлении смещают и глубоко изменяют группировки микробов, характерные для данной почвы, ее состояние в момент анализа.

При их применении часть микроорганизмов подвергается десорбции, а другая, значительно бóльшая, остается на частичках почвы и поэтому ускользает от общего учета; многократное взбалтывание суспензии разбивает и расчленяет грибные гифы на множество отдельностей.

Непосредственный высеv почвенного мелкозема на агаризованную воду устраняет вышеуказанные недостатки, в частности явление адсорбции микроорганизмов частичками почвы. При непосредственном высеvе почвенного мелкозема на агаризованные пластинки почвенные грибы развиваются за счет примесей питательных элементов, которые могут содержаться в агар-агаре, а также в самих частичках почвы. Вследствие малого количества питательных веществ развивающиеся грибы образуют преимущественно микроскопические формы роста вокруг почвенных частиц и на их поверхности.

Взятый образец почвы доводят до воздушно-сухого состояния, после чего его растирают в ступке деревянным или каучуковым пестиком и просеивают через мелкое сито с отверстиями 0.25 мм. Просеянный образец почвы Д. М. Новогрудский называет мелкоземом. В весовой стаканчик отвешивают 50 мг мелкозема, который тотчас же переводят в стерильную посевную вороночку, закупоренную ватной пробкой. Вороночка представляет собой стеклянную трубочку длиной 10 см и шириной 0.8—1.0 см, нижний конец которой сужен и снабжен краном. Подобные вороночки можно изготовить из бюреток, срезав нижнюю часть их на расстоянии 8—10 см выше крана. Таких вороночек полезно иметь несколько. После каждого употребления их промывают и стерилизуют. Субстратом для посева служит агаризованная вода. 15—20 г агар-агара расплавляют на водяной бане в 1 л водопроводной воды и разливают в маленькие колбочки по 20—25 мл, которые стерилизуют в автоклаве при давлении в 1.5 атм. в течение 40 мин. Стерильную агаризованную воду разливают в чашки Петри.

Посев мелкозема производят следующим образом. Держа посевную вороночку в горизонтальном положении, открывают ее кран, затем приподнимают крышку чашки Петри и равномерными движениями покачивают вороночку над поверхностью агаризованной воды. Вороночку с мелкоземом держат при этом слегка наклонно, благодаря чему частички почвы высыпаются медленно и постепенно.

При правильном посеве частички почвы равномерно распределяются на агаризованной пластинке, не образуя кучек. Равномерного высева мелкозема легко достигнуть, если последний находится в воздушно-сухом состоянии, а стенки посевной вороночки — сухие. Так как мелкозем не высыпается свободно через узко оттянутый конец вороночки, а собирается в нем и даже закупоривает его, при покачивании посевной вороночки необходимо слегка ударять по ней. По окончании высева необходимо убедиться, что вся навеска распределена по поверхности агаровой пластинки. Почва частично может застрять в узком проходе воронки или в отверстии ее крана. В таком случае воронку опрокидывают концом вверх и легким постукиванием переводят застрявшие частицы в широкую часть воронки. Отсюда их высевают так, как уже было описано. Посев мелкозема можно производить более упрощенным способом, используя металлическое ситечко с диаметром 0.25 мм. Ситечко стерилизуют над пламенем спиртовки, затем его помещают в стерильную чашку Петри и дают полностью остыть. В ситечко насыпают немного сухой, предварительно растертой в фарфоровой ступке почвы и взвешивают. Посев производят так, чтобы частички почвы были равномерно распределены по всей поверхности агаровой пластинки. После посева ситечко с оставшейся почвой снова взвешивают и по разности веса определяют количество почвы, засеянной на агар.

На каждую чашку Петри высевают обычно 50—100 мг почвы. Навеску почвы менее указанного веса брать не рекомендуется, так как при пересчете это может привести к значительным погрешностям.

Чашки Петри помещают в термостат при температуре 18—22°. Вокруг почвенных частиц после попадания на поверхность агара образуются своеобразные пленки из микроорганизмов. Вследствие небольшого количества питательных веществ развивающиеся грибы образуют преимущественно микроскопические формы роста вокруг почвенных частиц на поверхности.

Изучение развившихся организмов ведут под микроскопом, используя объективы 10 ×, 20 × и 40 ×.

Открытую чашку Петри помещают на столик микроскопа. Сначала рассматривают почвенные частицы и микроорганизмы при малом увеличении. При общем осмотре различают основные группы микроорганизмов. Затем

переходят к более подробному рассмотрению отдельных частичек почвы при среднем увеличении микроскопа. Обращают внимание на строение гиф, конидиеносцев и конидий, однако использование всей агаровой пластинки для микроскопических наблюдений связано с рядом неудобств (опасность загрязнения и высыхания пластинки, невозможность фиксации всех ее участков, неудобство рассмотрения пластинки в проходящем свете). Указанные затруднения устраняются, когда для наблюдения вырезают из агаровой пластинки с помощью стеклянной трубки или пробочного сверла отдельные небольшие кружочки.

Для фиксации агаровых кружочков их обрабатывают смесью Меркеля, состоящей из равных частей 1.25%-й хромовой кислоты и 1.25%-й хлористой платины. Несколько капель этой смеси наносят на поверхность агарового кружочка и через 15—30 мин. промывают водой. Для окрашивания фиксированные агаровые кружочки погружают на 30—60 мин. в разведенный раствор карбол-эритрозина (к 5%-му раствору карболовой кислоты добавляют 1 г эритрозина; перед окраской 1 мл исходного раствора краски разбавляют 100 мл воды).

Для количественных учетов наиболее удобна навеска в 50 мг почвенного мелкозема. Количественный учет грибов производят начиная с 1—2 суток после посева. Каждый количественный учет производят на пяти агаровых кружочках диаметром 1 см. Один кружок вырезают в центре пластинки, а четыре — по двум взаимно перпендикулярным диаметрам. Агаровые кружочки после перенесения на предметные стекла разрезают лезвием безопасной бритвы пополам, а затем каждую половинку еще на две доли параллельно первой линии разреза. В итоге весь агаровый кружочек оказывается разрезанным на четыре доли. При помощи того же лезвия каждую дольку разделяют на три полоски. Каждая полоска уместается в поле зрения при малом увеличении, что позволяет систематически просматривать одну полоску за другой, а в пределах каждой из них — исследовать каждую почвенную частицу и отмечать, какие микроскопические грибы развиваются в ее сфере. Полученное непосредственным подсчетом на пяти агаровых кружках число почвенных частиц, засеянных данным организмом, пересчитывают на 1 г почвы.

Недостаток этого метода в отношении количественного учета микроорганизмов заключается в том, что обрастание частиц почвы может обуславливаться не одной клеткой, а большим количеством клеток, которые находились на частицах в адсорбированном состоянии.

Наблюдения за развивающимися на частичках почвы грибами в условиях агаризованной воды показывают, что они: 1) большей частью не различаются невооруженным глазом или различаются в виде небольших микроскопических колоний; 2) обладают упрощенной структурой и нередко состоят только из одной или немногих ги́ф, стерильных или образующих конидиальное плодоношение; 3) размеры как вегетативных, так и репродуктивных элементов гриба, как правило, редуцированы, т. е. толщина ги́ф, длина конидиеносцев, размеры и число конидий всегда меньше, чем у тех же форм на обычных питательных средах.

Зная количество микроорганизмов на 5 кружках, можно определить количество их в 1 г почвы (x) по формуле

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

где A — количество колоний на 5 кружках агара; B — площадь кружка (в см); C — площадь агаровой пластинки в чашке Петри (в см); D — навеска почвы (в г).

Метод высева почвенного мелкозема на агаризованную воду, по наблюдениям Д. М. Новогрудского, выявляет не только больше грибов, чем метод «разведения», но и большее их видовое разнообразие. Т. П. Сизова и Т. П. Супрун (1958) отмечают, что этим способом удавалось обнаруживать в почве грибы, редко выделяемые (*Acrothecium*, *Hyalopus*, *Helminthosporium* и *Dictyostelium*). Недостаток этого метода они видят в том, что при его применении все же учитываются главным образом быстрорастущие виды грибов, возможно находящиеся в почве в активном состоянии. На основании нашего опыта все подобные методы могут быть использованы и для выделения медленно растущих грибов. Чем меньше по величине комочек почвы, посеянный на «голодный» агар, тем хуже развиваются быстрорастущие виды. Так, например, при посеве водной почвенной суспензии с очень мелкими комочками на «голодный» агар обычно наряду

с быстрорастущими видами постепенно развиваются и медленно растущие виды грибов. Если же почвенные комочки очень крупные, до 1 мм и более, на «голодном» агаре развиваются главным образом быстрорастущие виды грибов.

При пользовании методом «проращивания мелкозема» на поверхности агара вокруг крупных и средних почвенных комочков часто образуются пленки, толщина которых зависит от их величины. При тщательном изучении этих пленок под микроскопом можно в течение 1—2 суток видеть развитие гиф мицелия грибов, главным образом из быстрорастущих видов; через сутки—двое, т. е. на 3—5-й день происходит массовое развитие бактерий и на 10—12-е сутки — актиномицетов.

С помощью этого метода удается выявить ряд форм грибов, плохо или совсем не развивающихся на обычных искусственных средах, богатых питательными веществами. Преимущество метода, как отмечает Асеева и др. (1966), в том, что микроорганизмы развиваются вблизи почвенных комочков как в естественных условиях. С его помощью возможно получить ценные сведения о морфологических особенностях почвенных микроорганизмов.

Метод Д. М. Новогрудского также частично можно рассматривать и как метод непосредственного изучения микроскопических грибов в почве.

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП ПОЧВЕННЫХ ГРИБОВ НА СТЕРНЕВЫЕ ОТРЕЗКИ

Для выделения различных грибов из почвы Т. Н. Шкляр (1953) предлагает метод, при котором культивирование грибов проводилось бы в условиях, приближенных к естественным. Для этого она рекомендует использовать в качестве питательных сред для посева почвы растительные остатки сельскохозяйственной культуры, выращиваемой в поле, как например измельченные розетки клевера, стебли льна и ржаную стерню.

Наилучшие результаты показали посеvy почвы на стерневые отрезки, которые были использованы в качестве стандартной среды для почвенных анализов. Отрезки стерни одинакового размера закладывали в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу, стерилизовали и за-

тем на них производили посев измельченной почвы определенного объема. При посеве на стерневые отрезки наблюдается последовательность в появлении видов грибов. Первыми появлялись представители порядка *Mucorales*, затем пленки мукоровых постепенно исчезали, и на стерневых отрезках развивались белые, впоследствии зеленеющие пуговики шаровидных колоний *Trichoderma*, затем черные точечнообразные коростинки *Acremoniella*. Последним из представителей гифомицетов появляется *Stachybotrys alternans*. Этот гриб вытесняет других представителей микофлоры и заселяет стерневые отрезки и фильтровальную бумагу плотным сажистым налетом. Через месяц и более после посева на стерневых отрезках выявлялись сумчатые грибы, главным образом родов *Sordaria* и *Chaetomium*, и некоторые представители сферопсидных.

Преимуществом этого метода по сравнению с посевами на агаризованные питательные среды является его простота и быстрота, отсутствие чрезмерно пышного развития быстрорастущих почвенных космополитов, таких как мукоровые и виды родов *Penicillium* и *Trichoderma*.

МЕТОДЫ ПОДАВЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ ПРИ СОВМЕСТНОМ ИХ РОСТЕ С ГРИБАМИ НА ИСКУССТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

При выделении микроскопических грибов из почвы необходимо надежно подавить развитие различных бактерий, сопутствующих их росту. Обычно это достигается установлением кислой среды ($\text{pH} = 3.8-3.6$), на которую производят высев исследуемой почвы, или добавлением борной кислоты (H_3BO_3) из расчета 3 г на 1 л среды. К избытку борной кислоты весьма чувствительны как бактерии, так и актиномицеты. Однако последнее средство менее надежно, чем первое, при котором бактерии, как правило, не развиваются. Для подкисления среды употребляют лимонную ($\text{C}_6\text{O}_7\text{H}_8$), молочную ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$), фосфорную (H_3PO_4), серную (H_2SO_4) или соляную (HCl) кислоты. В среднем на 1 л агаровой среды добавляют 15—20 мл 0.1 н. раствора серной, соляной и фосфорной кислот. Молочную кислоту обычно применяют концент-

рированную в количестве 4 мл на 1 л среды.¹ Кислоты следует прибавлять в простерилизованные среды. Если их вводить в агаровые среды до стерилизации, то последние после их стерилизации вместе с кислотами не будут уплотняться. Прибавление кислот к агаровым средам после стерилизации (до $pH = 3.8-3.6$) не оказывает отрицательного влияния на их способность уплотняться при остывании и превращаться в твердое состояние.

В качестве ингибиторов роста бактерий применяют ряд химических веществ, губительно действующих на них. А. Рихтер и А. Вернер (1931) использовали роданистый натрий ($NaCNS$), прибавляя его к агаровой среде в количестве 0.25—0.4 моля на 1 л. Бактерии под влиянием роданистого натрия гибнут. Грибы же обладают устойчивостью к воздействию роданатов и поэтому развиваются на искусственных средах в присутствии их. Не изменяет реакцию среды применение в качестве ингибитора бактерий красителя «бенгальский розовый» и ряда антибиотиков. Краситель «бенгальский розовый» употребляется в концентрации 70 мг/л среды (т. е. в концентрации 1 : 15 000 до 1 : 30 000), а антибиотики в следующих концентрациях: стрептомицин-сульфат — 40—50 мг/л среды, или 40—50 μ на 1 мл, или 30—40 активных единиц на 1 мл среды; натрий-пенициллин — 40 активных единиц на 1 мл среды; тетрациклин, окситетрациклин, хлортетрациклин — 2—5 мг на 1 л; неомицин, полимиксин, бацитрацин — 50 мг/л среды.

К применению антибиотиков и красителя «бенгальский розовый» следует прибегать в том случае, когда из почвы необходимо выделить грибы, которые нормально развиваются на среде с нейтральной ($pH = 7.0$) или щелочной ($pH = 7.2-7.8$) реакцией и не могут развиваться на кислых средах, и в особенности на средах с $pH = 4.0-3.8$ или 3.6.

При высеве почвы на кислые среды не удастся выделить все виды микромицетов, в том числе те из них, которые не в состоянии развиваться на столь сильно кислых средах. При внесении антибиотиков в питательные среды, используемые под высевы почвы, последние можно не под-

¹ Концентрированные кислоты не надо стерилизовать; неконцентрированные кислоты и, в частности, 0.1 н. водные растворы H_2SO_4 , HCl и H_3PO_4 следует отдельно стерилизовать.

кислять. В этом случае питательные среды могут быть или нейтральными, со значением рН = 7.0, или слабокислыми, с рН = 6.8—6.5.

Абсолютное большинство почвенных микроскопических грибов хорошо развивается на нейтральных или слабокислых средах.

Мартин (Martin, 1950) предложил применять краситель «бенгальский розовый» (70 мг/л среды) в сочетании со стрептомицином (30 мг/л среды).

Добавление антибиотиков производится асептически. Их обычно вносят после окончания стерилизации и последующего охлаждения питательной агаровой среды до 45° или жидкой среды до 25—30°.

МЕТОДЫ ПРЯМОГО МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ ГРИБОВ В ПОЧВЕ

Помимо изучения культур микроскопических грибов, выделенных из почв и выращиваемых на искусственных питательных средах, большое значение имеет непосредственное исследование природных форм этих организмов, обитающих в почве. Это позволяет наблюдать под микроскопом распределение различных групп почвенных микромитозов в их природной среде.

Грибы в почве могут пребывать в виде спор и в состоянии вегетативного мицелия. Для обнаружения грибов, находящихся в почве в форме развивающегося активного мицелия, используют нижеописываемые методы исследования.

Наиболее ранним способом обнаружения мицелия грибов в почве является способ, предложенный Х. Конном (Conn, 1922). Его методика состоит в том, что маленький комочек почвы помещают на предметное стекло и смешивают с 2—3 каплями воды, а затем окрашивают каплей метиленовой сини или раствором Лёффлера¹ и накрывают покровным стеклом. Препарат просматривают под большим увеличением микроскопа. В этом окрашенном препарате удается обнаружить наличие грибных гиф мицелия.

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

Методы прямого изучения почвенных микроорганизмов в дальнейшем разрабатывались главным образом Н. Г. Холодным (1930, 1933, 1935, 1949). Для наблюдения микромицетов в живом состоянии в почве Н. Г. Холодный (1933) рекомендует пользоваться двумя методами: почвенных камер и проращивания грибов из почвенной пыли на чистом стекле.

МЕТОД ПОЧВЕННЫХ КАМЕР

На поверхности предметного стекла с помощью особого приборчика — почвенного пресса — готовится из подлежащей исследованию почвы квадратная пластинка (18 × 18 мм) с совершенно гладкой верхней поверхностью, на которую накладывают покровное стекло. Почвенная пластинка имеет толщину до 22 мм, посередине ее находится цилиндрическая полость, не содержащая почвы, с диаметром около 4 мм. Таким образом, между поверхностями предметного и покровного стекл создается небольшая камера, наполненная воздухом и ограниченная по бокам слоем почвы. Если такой препарат оставить на несколько дней во влажных условиях (в чашке Петри с кружком влажной фильтровальной бумаги) при комнатной температуре или в термостате, то скоро внутрь камеры начинают проникать и разрастаться грибные гифы, которые частично располагаются на поверхности покровного стекла. Здесь грибы легко наблюдать под микроскопом при самых сильных увеличениях в живом состоянии и к тому же довольно продолжительное время, в течение которого совершаются различные стадии их роста и размножения. Если у грибов образуются спороношения, то можно произвести и их идентификацию, хотя бы в пределах рода. В том случае, когда края покровного стекла больше размера почвенной пластинки, грибы могут расти не только внутри камеры, но и за ее пределами.

При использовании почвенных камер можно наблюдать развитие некоторых видов грибов, которые не удается выделить на искусственных питательных средах, в частности *Coetansia reversa*, *Helicomyces candidus* и др.

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

МЕТОД ПРОРАЩИВАНИЯ ГРИБОВ И ДРУГИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ПОЧВЕННОЙ ПЫЛИ НА ЧИСТОМ СТЕКЛЕ

Взятые образцы почв доводят до воздушно-сухого состояния при комнатной температуре, а затем хранят в конвертах из плотной бумаги.

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

Плохо приставшие частицы почвы следует удалить, повернув стекло и слегка постукав пальцем.

Немедленно после этого покровное стекло кладут на предметное запыленной стороной книзу и закрепляют. Чтобы получить влажную камеру раньше, чем покровное стекло будет положено на предметное, рекомендуется внести в углубление предметного стекла маленькую каплю дистиллированной воды величиной немного более макового зерна. Таким образом, увлажнение почвенных частиц происходит за счет конденсации пара, образующегося из капли воды.

Для закрепления покровного стекла на предметном необходимо капиллярное пространство между ними заполнить стерильной водой; лишь небольшой участок камеры оставляют свободным для поступления в нее воздуха. Готовые препараты помещают во влажную камеру и в термостат при 23—25°. Через день-два препараты почвенной пыли начинают прорасти, т. е. около почвенных крупинок начинают появляться разнообразные микроорганизмы. Через 5—6 дней на препаратах обычно можно уже наблюдать густое население из бактерий, грибов, актиномицетов и протозоя.

Степень развития микроорганизмов и качественный их состав на препаратах почвенной пыли в значительной степени зависят от влажности камеры. Если капля воды, помещенная в углубление (лунку) покровного стекла, очень маленькая и быстро испаряется, то около почвенных частиц развиваются почти исключительно грибы и актиномицеты. При сильном увлажнении почвы обычно обильно развиваются бактерии.

МЕТОД СТЕКОЛ ОБРАСТАНИЯ

Широко распространенным способом изучения микробных синузий в почве является метод стекол обрастания Н. Г. Холодного (1930) и его модификации, предложенные разными авторами.

Особенность данного метода заключается в том, что в почву вносят чистые предметные стекла, поверхность которых вскоре покрывается почвенными коллоидами, на которых почвенные микроорганизмы развиваются в условиях, близких к естественным (Звягинцев, 1966).

Предметные стекла перед закладкой в почву тщательно очищают и обезжиривают, выдерживая их в концентрированной серной кислоте, и затем отмывают в 1%-м растворе соды и в дистиллированной воде. На поверхности почвы делают вертикальный разрез ножом и в него вставляют предметное стекло. Стекло сверху засыпают той же почвой и около него ставят какую-нибудь вежу. При необходимости установки стекол в различные почвенные горизонты пользуются специальными разрезами (ямамп). Стекла вставляют начиная с нижнего горизонта по направлению к верхнему. В исследуемом горизонте вначале

приготавливают соответствующую нишу, которую выкапывают параллельно поверхности почвы, глубиной в 6—10 см. Стамеской сверху стекло немного прижимают нижней поверхностью к почве (рис. 2, а). К нижней стороне стекла нельзя прикасаться никакими предметами, так как она будет в дальнейшем подвергнута микроскопическому исследованию.

Необходимо по возможности сохранить естественное сложение почвы. В каждом горизонте всегда ставится

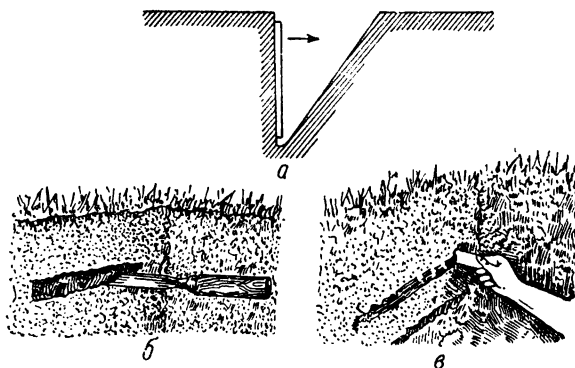


Рис. 2. Установка стекол обрастания.

а — по методу Н. Г. Холодного; б и в — по Л. В. Рыбалкиной и Е. В. Кононенко: б — приготовление ниши, в — установка стекол.

несколько стекол. После установки стекол ниша закапывается ранее вынутой из нее почвой. Установленные в почве стекла экспонируются от нескольких дней до месяца, иногда немного более. Продолжительность пребывания стекол в почве зависит от ряда конкретных условий, и прежде всего от температуры и влажности почвы.

В теплую влажную погоду иногда достаточно 2—3 суток; в холодную и засушливую погоду обрастание стекол происходит медленно, и поэтому время нахождения их в почве увеличивается во много раз, примерно до нескольких недель и даже месяца. Обычно стекла вынимают из почвы через каждые 3—5 суток с тем, чтобы иметь возможность наблюдать за изменениями, происходящими

в сообществе почвенных микроорганизмов. По истечении срока экспозиции стекла извлекают так, чтобы не повредить ценоз микроорганизмов на их нижней стороне. Нельзя допускать скользящего движения стекла по почве, так как при этом развившиеся на стекле различные микроорганизмы могут механически счищаться с его поверхности. Перед тем как вынуть стекло из ниши, необходимо удалить почву с его верхней стороны, т. е. с той стороны, которая не будет подвергаться микроскопированию; почву удобно счищать ножом. Затем, быстро подняв стекло, его вынимают из почвенной ниши. После очистки почвы ножом верхнюю сторону стекла еще дополнительно обтирают ватой. Нижнюю сторону стекла вначале подсушивают на воздухе, а затем осторожно фиксируют на пламени спиртовки, чтобы убить микроорганизмы и одновременно укрепить их связь со стеклом. Фиксацию также можно осуществлять в парах осмия. После фиксации удаляют приставшие к стеклу крупные частицы почвы, которые могут мешать микроскопированию препарата. Для этого стекло нижней стороной (т. е. мазком) вниз опускают в стакан с водой на 1—2 мин. При этом от поверхности предметного стекла отделяются крупные частицы почвы. Вынув стекло из воды, его дополнительно промывают под струей водопроводной воды из-под крана для удаления мелких частиц почвы, которые безусловно мешали бы микроскопированию. Наконец, препарат ополаскивают дистиллированной водой. После промывания его окрашивают карболовым эритрозином (1%-й раствор эритрозина в 5%-й карболовой кислоте) в течение 30 мин., иногда и более в зависимости от качества красителя. Стекла, залитые красителем, помещают в кристаллизатор, закрытый крышкой или стеклом, или в иные влажные камеры, так как во время окраски стекла не должны высыхать. Препарат после окраски подсушивают и микроскопируют.

Изучение препарата лучше осуществлять с использованием масляной иммерсии. На стеклах обрастания при их микроскопировании представляется возможным, в относительной степени, дифференцировать плесневые грибы, актиномицеты, бактерии и микроскопические почвенные водоросли. Метод Н. Г. Холодного позволяет наблюдать всю почвенную микрофлору в ее естественном состоянии. Он как бы «фотографирует» или производит «отпечаток»

состояния микрофлоры в почве, и в этом состоит основное его преимущество по сравнению с другими методами. Однако этот метод имеет и существенные недостатки, которые заключаются прежде всего в том, что поверхность стекла, прижатого к почве, вызывает местное скопление влаги, что может явиться причиной усиленного размножения бактерий в данном месте, а также избирательного прохождения гиф (Сизова и Супрун, 1958). Кроме этого, на основании только визуальной картины, наблюдаемой под микроскопом, невозможно полностью идентифицировать и выделить непосредственно в чистую культуру различные формы микроорганизмов. Метод стекол обрастания не позволяет получить достаточно достоверных количественных показателей численности микробного населения исследуемого образца почвы (Аристовская, 1959).

Различные варианты метода стекол обрастания. А. П. Крючкова (1934) покрывала питательным агаром стекла обрастания после извлечения их из почвы. Часть микроорганизмов, развившихся на стекле, потом прорастала на питательный агар, покрывший стекло.

Маршевская-Замецкая (Marszewska-Ziemiecka, 1935), Л. В. Рыбалкина и Е. В. Кононенко (1953) покрывали питательным агаром стекла перед установкой их в почву (рис. 2, б, в).

Торнтон (Thornton, 1952) предложил метод экранированных погруженных стекол (рис. 3). Сущность его состоит в том, что через отверстия в стекле-экране проникают только формы грибов, находящихся в почве в состоянии активного мицелия (Мирчинк, 1966). Для этого готовят специальную прямоугольную стеклянную камеру размером 10×4 см. Сверху ее покрывают стеклом-экраном толщиной в 1 мм с 10 отверстиями диаметром по 5 мм. На дно камеры помещают предметное стекло, которое плотно прилегает к ее стенкам. Камеру вместе со стеклом-экраном и предметным стеклом предварительно стерилизуют. После стерилизации на стекло наливают 8 мл растопленного стерильного водного агара, отверстия в стекле-экране закрывают стерильными покровными стеклами. Доставленную в поле камеру освобождают от покровных стекол и помещают в почву. Через 7—10 суток камеру извлекают из почвы; стекло с агаром, находящееся внутри нее, вынимают и просматривают под

лупой или микроскопом. Из обнаруженных колоний выделяют культуры грибов в пробирки с косым агаром.

Честерс и Торнтон (Chesters a. Thornton, 1956) предметные стекла обрастания, извлеченные из почвы, помещали нижней стороной, где фиксировались микроорганизмы, на агар Чапека с добавлением 2%-го дрожжевого экстракта и затем просматривали под микроскопом. Существенный недостаток данного метода заключается в том, что низкое содержание кислорода в камере мешает

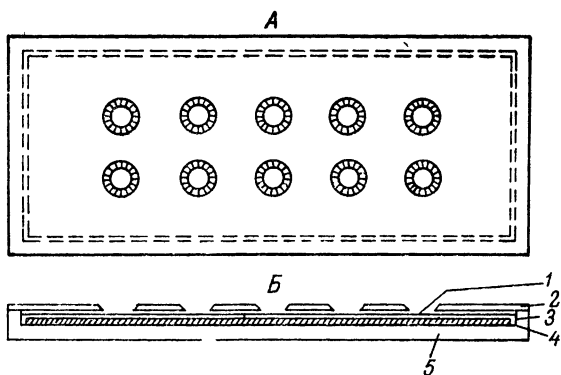


Рис. 3. Экранизированные стекла Торнтон.

А — вид сверху, Б — вид сбоку.
1 — отверстие в стекле-экране; 2 — стекло-экран; 3 — первый слой агара; 4 — второй слой агара; 5 — стеклянная камера.

дальнейшему развитию грибов в ней (Сизова и Супрун, 1958).

Т. П. Сизова (Сизова и Супрун, 1958) помещала в почву стекла со слоем агаризованной питательной среды, уложенные в стерильные целлофановые пакетики с отверстиями. Это предохраняет питательную среду от грубых механических повреждений при извлечении стекол из почвы.

МЕТОД СТЕКЛЯННЫХ ИММЕРСИОННЫХ ТРУБОК

Честерс (Chesters, 1940, 1948) предложил для выделения из почвы микроскопических грибов использовать специальные трубочки, подобные пробиркам, но имеющие

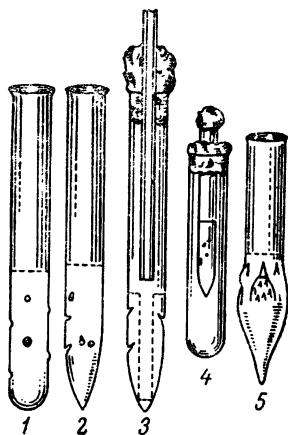
в нижней своей части несколько маленьких отверстий по 0.5 мм в диаметре, наполненные почти наполовину питательным агаром. Автор предложил четыре типа трубочек.

1-й тип. Трубочка длиной 15 см и шириной 2 см с 9 отверстиями, расположенными на спирали; края отверстия должны быть вровень со стенками трубочки (рис. 4, 1).

2-й тип. Трубочка такого же размера с 6 наружными отверстиями, которые ведут к конусообразным внутренним капиллярам длиной 2 мм (рис. 4, 2, 3).

3-й тип. Трубочка вставлена в наружную трубку большего диаметра (рис. 4, 4).

4-й тип. Трубочка длиной 10 см и шириной 2.5 см; конец трубочки конусовидно-луковичный, имеющий 3—4 отверстия, расположенных на одном уровне (рис. 4, 5).



Общие указания к применению иммерсионных трубок

Трубочки перед употреблением вначале стерилизуют, а затем почти наполовину заполняют растопленным стерильным питательным агаром, охлажденным до 50°. Трубочки, наполненные питательной средой, помещают в другие стерильные трубки (контейнеры) большего размера и в таком виде доставляют в поле. Там иммерсионные трубочки вынимают из контейнеров и вставляют в почву на нужную глубину сроком от 7 до 14 суток. По истечении срока трубочки быстро вынимают из почвы и помещают в новые стерильные контейнеры, которые доставляют в лабораторию. Содержимое трубочек извлекают стерильной иглой и вносят в стерильную чашку Петри. Колонии, образовавшиеся на агаре против отверстий капилляров, отсеивают в пробирки со свежей питательной средой.

Рис. 4. Трубочки Честерса.

1 — трубочка с гладкими отверстиями, края которых находятся на уровне стенок; 2, 3 — отверстия трубочек ведут к конусообразным внутренним капиллярам; 4 — трубочка вставлена в наружную трубку большего диаметра; 5 — трубочка с луковичным вздутием.

Данный метод рассчитан на то, что через капилляры в стенках трубочек проникает только активно растущий мицелий почвенных микроскопических грибов (Мирчинк, 1966).

МЕТОД СТЕКОЛ-ЛОВУШЕК ЛЯ-ТУШ

Данный метод, предложенный Ля-Туш (La Touche, 1948), принципиально сходен с методом стеклянных иммерсионных трубок Честерса, но несколько упрощен. При этом методе используют два стерильных предметных стекла с луночками для висячих капель. Луночки одного

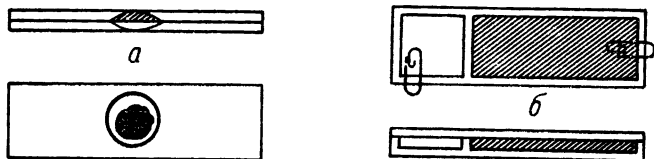


Рис. 5. Стекла-ловушки по Ля-Туш (а) и по Сьюэллу (б).

стекла заполняют питательным агаром и затем оба стекла соединяют так, чтобы одна лунка располагалась прямо над другой (рис. 5, а). Стекла плотно прижимают друг к другу и закрепляют скрепками. В таком виде их вставляют в почву и выдерживают в ней определенное время, примерно от двух до трех недель. После этого стекла извлекают из почвы и просматривают под микроскопом. Активно растущий мицелий проникает между стеклами и достигает агара. Автор отмечает, что под микроскопом легко проследить строение мицелия и репродуктивных органов грибов, развивающихся в почве, и выделить их в чистую культуру; бактерии обычно не развиваются. Однако Т. П. Сизова и Т. П. Супрун (1958) отмечают, что при использовании данного метода в основном выделяются быстрорастущие грибы.

МЕТОД СТЕКОЛ ЛОВУШЕК СЬЮЭЛЛА

Этот метод, предложенный Сьюэллом (Sewell, 1956), так же как и предыдущий, рассчитан на выделение активно растущих грибов в почве, т. е. грибов, способных развивать там вегетативный мицелий.

Неглубокую стеклянную камеру размером с предметное стекло разделяют на две неравные части (рис. 5, б). Камеру стерилизуют и при помощи пипетки на ее дно наносят расплавленный питательный агар. Затем сверху ее прикрывают стерильным предметным стеклом, которое скрепками прочно соединяют с камерой. Камеру, за исключением малой ее части, не залитой агаром, вместе со стеклом в вертикальном положении зарывают в почву. Щель в почве делают заранее стамеской. Камеру для защиты от влаги сверху прикрывают оцинкованным щитком. Гифы грибов обычно проникают между стеклом и камерой. По истечении срока камеру извлекают из почвы, агар, находящийся внутри камеры, делят на ряд полосок и подвергают тщательному микроскопированию, при этом удается выделить ряд грибных культур.

ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУРЫ ГРИБА ИЗ ОДНОЙ СПОРЫ

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

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

МЕТОД ЛИНДНЕРА

Этот метод основывается на приготовлении разбавленной суспензии культуры в жидкой среде и получении ряда маленьких капелек этой смеси на стерильном покровном стекле. Практически это осуществляется следующим образом: на стерильное покровное стекло наносят стерильным чертежным пером ряд мелких капель из последовательных разведений грибов в жидком сусле. Затем его перевертывают и помещают над лункой стерильного предметного стекла; края покровного стекла смазывают вазелином. При просмотре под микроскопом отмечают капли, содержащие по одной споре. При повторном просмотре через 12—24 часа отмечают капли, в которых развивалась только одна колония. Содержимое такой капли переносят в пробирку со стерильной питательной средой.

МЕТОД ЛИНДНЕРА-НАДСОНА

Покровное стекло фламбируют (стерилизуют) над пламенем спиртовой горелки, после чего его края обводят специальной мастикой (смесь равных частей парафина и вазелина). На центральную часть стекла наносят плоскую довольно широкую каплю прозрачной среды, содержащей 10% желатины (например, сусло-желатину) или 0.5% агара. В эту расплавленную каплю вносят платиновой иглой суспензию исследуемого гриба с таким расчетом, чтобы в капле содержалось всего несколько спор (4—5), расположенных изолированно друг от друга на сравнительно отдаленном расстоянии. Затем покровное стекло помещают каплей вниз над лункой предметного стекла и рассматривают препарат под микроскопом, вначале под малым увеличением. При этом увеличении находят ориентиры на препарате и вычерчивают карту их расположения на бумаге. При большом увеличении отмечают отдельные споры или клетки гриба возле ориентиров, нанося их также на карту. Так фиксируют около 5—10 спор в препарате. Последующие наблюдения осуществляют через каждые 10—12 час. Когда отмеченные споры или клетки разрастаются в колонии, хорошо видимые при малом увеличении микроскопа, их снимают с агара и производят обычное выделение чистой культуры пересевом в пробирки с питательной средой.

Подробное описание методов получения чистых культур грибов из одной клетки при помощи специальных приборов — микроманипулятора и микроселектора см. в книге Б. В. Перфильева и Д. Р. Габе «Капиллярные методы изучения микроорганизмов» (Изд. АН СССР, 1961).

КЛАССИФИКАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, УПОТРЕБЛЯЕМЫХ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПОЧВЕННЫХ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Питательные среды делятся на две группы: 1) среды неопределенного состава и 2) среды определенного состава (синтетические). Синтетические среды, имеющие постоянный химический состав, представляют ценность для получения сравнимых данных. Кроме того, питательные среды можно подразделить на: 1) природные и 2) ис-

кусственные. К последним относят не только синтетические среды, приготовленные из различных химических соединений, но и среды, изготовленные из различных растений в виде вытяжек, настоев и т. д.

По своему составу питательные среды могут быть минеральными и органическими. Для нормального развития грибов необходимо, чтобы питательная среда содержала все основные элементы (азот, углерод, натрий, серу, магний и т. д.) и чтобы они были в таких химических соединениях, которые усваивались бы грибами. Основу питания грибного организма составляют углерод и азот. Источниками азота могут служить органические и неорганические соединения — пептон, азотнокислый натрий или калий и др.; источниками углерода — только органические соединения. Из них наиболее распространенным являются углеводы. На чисто минеральных средах грибы не развиваются, так как они не могут усваивать углерод из минеральных соединений. Поэтому в любой среде, предназначенной для культивирования грибов, должно быть органическое вещество, содержащее углерод. Из минеральных соединений для питания грибов необходимы в более или менее значительных дозах натрий, калий, фосфор, сера, магний и др. Кроме того, грибы подчас нуждаются в дополнительных факторах питания, состоящих из так называемых ростовых веществ и микроэлементов в очень незначительных долях. Для своего развития некоторые грибы также нуждаются в витаминах, которые влияют на их строение, размножение, процессы обмена и другие свойства (см. таблицу).

Питательных сред для выращивания грибов предложено очень много, поэтому придется остановиться только на наиболее употребительных, при применении которых удается добиться наилучшего развития исследуемых грибов.

Совершенно очевидно, что абсолютно универсальной искусственной питательной среды, пригодной для культивирования всех систематических групп грибов, нет. Разнообразию питательной среды также необходимо для выявления различных стадий развития гриба. Большинство грибных организмов довольно хорошо развивается на многих искусственных микробиологических средах, но имеется значительная часть грибов, которые отличаются довольно строгой приуроченностью к средам

**Активность различных витаминов
и витаминоподобных веществ
(по данным Иерусалимского, 1949)**

Вещество	Дозировка в 1 л среды (γ)	
	минимум	оптимум
Биотин	0.002—0.01	0.1—10
Фолиевая кислота	0.02	0.05—0.5
<i>n</i> -Аминобензойная кислота	0.01	0.02
Тиамин	0.1—0.3	1—100
Пиродоксин	0.01	10—1000
Кальций-пантотенат	4	30—1000
Рибофлавин	5	10—1000
Никотиновая кислота	5—10	100—1000
β -Аланин	200	500—1000
Холин	20	1000—2000
<i>i</i> -Инозит	1000	3000—6000
Пуриновые и пиридиновые основания	1000	5000—10000

Прим. $\gamma = 0.000001$ г.

с определенным составом, как например грибы из пор. *Chytridiales*.

Следует заметить, что непригодность той или иной питательной среды для выращивания определенного вида гриба в условиях чистой культуры легко обнаружить из-за отсутствия его роста. В этом случае обычно производят замену использованной среды другой, имеющей иной состав питательных веществ. Значительно сложнее выбрать питательные среды для высева почвы с целью выявления всего сообщества грибов, ее населяющих. Невозможно выявить все видовое разнообразие грибов при высева почвы на одну из известных в настоящее время нескольких десятков питательных микробиологических сред. Универсальной питательной среды для выращивания всех систематических групп грибов нет, так как каждая из них предъявляет свои требования к условиям питания.

Развитие одних систематических групп грибов может стимулироваться данной средой, других же, наоборот, подавляться. Разные питательные среды обладают различными селективными свойствами к определенным грибным организмам. Однако это не отвергает те обязательные

условия, которым должны отвечать все питательные среды: они должны быть достаточно питательными, иметь подходящую для роста гриба кислотность (рН), быть абсолютно стерильными и свежеприготовленными.

Питательные среды бывают разной консистенции — жидкие и плотные. Плотные среды изготавливаются путем добавления к жидкому питательному раствору агара в количестве 1.5—2.0% или желатины в количестве 15—20%. Агаровые среды употребляют для первоначального выделения и выращивания почвенных грибов при посеве почвы. Желатиновые среды пригодны для изоляции культур гриба из одной споры. В таком случае желатину необходимо профильтровать или еще лучше подвергнуть осветлению, после чего она становится прозрачной, что весьма облегчает микроскопическое рассмотрение препаратов. Для осветления желатиновой среды берут один куриный белок (из расчета на 1 л среды), взбивают его до появления небольшой пены и смешивают с теплой (не горячей!) средой. Полученную смесь вновь подогревают, доводя до кипения, и интенсивно кипятят в течение 15 мин., после чего фильтруют сначала через марлю для удаления крупных сгустков белка, а затем через бумажный фильтр при помощи горячей воронки или в нагретом автоклаве.

Некоторые замечания к стерилизации питательных сред

Наиболее надежна стерилизация сред в автоклаве. Она может осуществляться при разных давлениях пара, т. е. при высоких температурах. Следует иметь в виду, что растительные субстраты — картофель, морковь, рис и др., а также ряд веществ — сахара, аммиачные соли, желатина и др., используемые для приготовления питательных сред, подвергаются значительному изменению под воздействием высоких температур, особенно в присутствии кислот. Все эти среды стерилизуют методом дробной стерилизации текучим паром в кипятильнике Коха или в автоклаве при открытом кране (без добавочного давления) в течение одного часа три раза через каждые сутки. При необходимости срочного изготовления сред, содержащих сахара, их можно стерилизовать в автоклаве при повышенном давлении, но не более 0.5 атм. по показанию манометра (112°) в течение 30 мин.; картофель, морковь и некоторые другие естественные субстраты можно стерилизовать при 1 атм. (121°) в пределах 20 мин.

При стерилизации питательных сред следует пользоваться таблицей, в которой сопоставлены показатели температуры, давления водяных паров в автоклаве и показания манометра.

Температура (°C)	Давление (в атм.)	Показания манометра (в атм.)
100	1.00	0
107	1.25	0.25
112	1.50	0.50
115	1.75	0.75
121	2.00	1.00
134	3.00	2.00

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПОЧВЕННЫХ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Для изучения культуральных, морфологических и физиологических особенностей почвенных микроскопических грибов необходимо выращивать их на искусственных питательных средах. Культивирование в лабораторной обстановке позволяет наблюдать за всем циклом онтогенетического развития этих организмов. Кроме того, искусственное выращивание грибов обеспечивает возможность длительного их сохранения в живом состоянии. Известно, что почвенные микромицеты из порядков *Mucorales* и *Moniliales* по усвоению питательных ингредиентов относятся к миксотрофам, для которых источником углерода могут являться лишь органические вещества, содержащие углеродистые соединения. Другие химические элементы, в частности азот, кислород, сероводород, натрий, калий, фосфор и др., усваиваются этими грибами как из органических, так и неорганических соединений.

В настоящее время методы выращивания чистых культур почвенных микроскопических грибов достаточно разработаны. Почвенные грибы из порядков *Mucorales* и *Moniliales* в отличие от всех других групп почвенных грибов можно изучать лишь в том случае, если можно организовать наблюдение за ними в культуре при росте их на искусственных питательных средах.

Наилучшими источниками углерода для этих грибов являются различные сахара, в первую очередь глюкоза, мальтоза и сахароза, слабее усваиваются неинвертированные сахара и, в частности, молочный сахар. Многие виды почвенных грибов также используют крахмал, спирты, органические кислоты, декстрины и клетчатку. Однако

надо иметь в виду, что богатая по калорийности среда иногда не может обеспечить определенному виду гриба достаточного углеродного питания из-за отсутствия у него соответствующего энзима, способного расщепить сложное органическое соединение, являющееся единственным источником углерода.

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

внести в среду так называемые ростовые вещества. Для этого следует к изготовленному синтетическому питательному раствору добавить немного дрожжевой воды, вытяжки из семян гороха или листьев березы, пивного сусла и т. п.

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

Для культивирования грибов имеет значение и освещенность помещения. В темной комнате (термостатной) наблюдается задержка спорообразования и интенсивное развитие стерильного мицелия. Прямые солнечные лучи также отрицательно влияют на рост грибов. Как показали наблюдения, микроскопические грибы лучше всего развиваются при дневном отраженном свете. Поверхность колоний грибов в этом случае обильно покрывается конидиями, а развитие воздушного стерильного мицелия заметно замедляется. Рекомендуется как культивировать, так и сохранять почвенные грибы в комнатных условиях в специальных стеклянных шкафах с вытяжными трубами и при дневном свете, исходящем из окон, расположенных не на солнечной стороне дома.

Для накопления, выделения и изучения почвенных микроскопических грибов используют различные микробиологические питательные среды. Выбор питательной среды следует производить с учетом эколого-физиологических особенностей изучаемых групп почвенных микроско-

пических грибов. Так, например, если из исследуемой почвы выделяется очень большое число быстрорастущих муконовых грибов, резко подавляющих развитие других почвенных микроскопических грибов, то в этом случае прибегают к посеву почвы на синтетическую среду Чапека с сахарозой. Как известно, сахароза слабо усваивается муконовыми грибами, поэтому рост их на среде замедляется, что позволяет нормально развиваться другим группам грибов.

Большинство питательных сред для культивирования почвенных микромицетов должно иметь кислую реакцию. Кислая реакция среды для почвенных грибов необходима по двум основным причинам: 1) кислые среды затрудняют или совсем лишают возможности развиваться почвенным бактериям; 2) кислые среды благоприятны для роста многих видов (хотя не для всех) почвенных грибов. Питательные среды, применяемые для выделения грибов из почвы, должны иметь $pH = 4.0-3.8$; питательные среды, предназначенные для морфолого-культурального изучения развивающихся на них грибов, должны иметь в среднем $pH = 5.5-6.0$. Если требуется подкисление питательной среды ниже $pH = 4.0$, то нужно иметь в виду, что агар такой кислой среды после стерилизации в автоклаве под давлением не застывает. Поэтому водные растворы фосфорной (H_3PO_4), соляной (HCl) или серной (H_2SO_4) кислот, обычно употребляемые для подкисления питательных сред, предварительно стерилизуют, а затем вносят в агаровую среду, еще не остывшую после стерилизации. Кислоты должны быть слабой концентрации, примерно 1:10—1:15 н. раствора. На 1 л агаровой среды в среднем добавляют 15—20 мл 0.1 н. раствора кислоты (см. стр. 37).

Рецепты наиболее применяемых питательных сред для культивирования почвенных микромицетов

(количество компонентов здесь и далее в граммах)

Среда Чапека и Чапека—Докса

	Среда Чапека	Среда Чапека—Докса
Сахароза	20.0	30.0
Натрий азотнокислый ($NaNO_3$)	2.0	3.0
Калий фосфорнокислый однозамещенный или двузамещенный ¹ (KH_2PO_4 , K_2HPO_4) . .	1.0	1.0

¹ Для грибов большей частью рекомендуют пользоваться однозамещенным фосфорнокислым калием (KH_2PO_4).

Магний сернокислый ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	0.5
Калий хлористый (KCl)	0.5	0.5
Железо сернокислое (закисное) ($FeSO_4$)	0.01	0.01

Агар¹ 15—20
 Вода дистиллированная 1000 мл

Вариант среды Чапека

Сахара (глюкоза или сахароза)	30.0	$ZnSO_4$	0.04
$NaNO_3$	3.0	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.005
KH_2PO_4	0.3	Вода дистиллированная	1000 мл
KCl	0.25	Дрожжевой экстракт (добавка)	по 5—10 мл на 100 мл среды
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25		
$FeSO_4$	0.01		

Среда Райстрика

(для улучшения спорообразования почвенных грибов)

Глицерин	7.0	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05
Фруктоза	5.0	KH_2PO_4	0.06
Мальтоза	5.0	$FeSO_4$	3 мл (0.1%)
Сахароза	5.0	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1 мл (0.1%)
Пептон	10.0	Агар	20—25
NaCl	4.0	Вода дистиллированная	1000 мл

Среда Ролэна в различных вариантах

I вариант		K_3SiO_4	0.07
Сахароза	70.0	Вода дистиллированная	1000—1500 мл
Винная кислота (Acidum tartaricum)	4.0	II вариант	
NH_4NO_3	4.0	Сахароза	50.0
$(NH_4)_2HPO_4$	0.6	NH_4NO_3	3.0
K_2CO_3	0.6	KH_2PO_4	1.0
$MgCO_3$	0.6	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0
$(NH_4)_2SO_4$	0.25	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.02
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.07	Вода дистиллированная	1000 мл
$FeSO_4$	0.07		

¹ Агар-агар — вещество полисахаридного характера, не содержащее азота. Температура плавления 2%-го геля (студия) около 90°, застывание происходит при 40—50°. При высокой кислотности (pH < 3.8—3.6) и многократном нагревании при высокой температуре желеобразующие свойства агаровых сред снижаются, т. е. агар после расплавления не уплотняется.

III вариант

Сахароза	30.0
NH_4NO_3	2.5
KH_2PO_4	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0
FeSO_4	0.01
Вода дистиллиро- ванная	1000 мл

IV вариант

Сахароза	50.0
NH_4NO_3	3.0
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0
FeSO_4	0.5
Вода дистиллиро- ванная	1000 мл

V вариант

Сахароза	50.0—70.0
NH_4NO_3	3.0
KH_2PO_4	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
Вода дистиллиро- ванная	1000 мл

Среда Конна с аспарагинатом натрия

Аспарагинат нат- рия	1.0	KCl	0.1
Сахароза или глю- коза	10.0	CaCl_2	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	FeCl_3	Следы
NaH_2PO_4	1.5	Вода дистиллиро- ванная	1000 мл

Минеральные среды с органическим азотом

I вариант

Сахароза	50.0— 70.0
Пептон	10.0
KH_2PO_4	3.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0
Вода дистиллиро- ванная	1000 мл

II вариант

Глюкоза (декстро- за)	20.0— 30.0
Пептон	2.0
KH_2PO_4	1.0
MgSO_4	0.5
Вода дистиллиро- ванная	1000 мл

III вариант

Среда Ваксмана

Глюкоза (декстро- за)	10.0
Пептон	5.0
KH_2PO_4	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
Вода дистиллиро- ванная	1000 мл

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

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

Белково-глюкозная среда

Глюкоза (декстроза)	10.0
Белок (в порошке)	0.1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$. . .	0.2
KH_2PO_4	0.5
Агар	20.0
Вода дистиллиро- ванная	1000 мл

Солодовое сусло и сусловый агар (сусло-агар)

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

Прим. Для приготовления сусло-агара следует к неохмеленному пивному суслу добавить 2—2.5% сухого агара и расплавить его при подогревании, затем фильтровать через марлю, сложенную в несколько слоев, или вату; отфильтрованную жидкость разлить по пробиркам и колбам и стерилизовать в автоклаве при 0.5 атм. (показания по манометру) в течение 30 мин. или при 1 атм. в течение 20 мин. pH среды для выделения грибов из почвы в пределах 3.8—4.0; для культивирования — $pH=5.0-5.5$.

Неохмеленное пивное сусло содержит 12% сахаров, преимущественно мальтозу и частично глюкозу, декстрозу, азотистые вещества, зольные элементы, различные ростовые вещества и витамины, в основном группы В. Для приготовления среды от сусла отфильтровывают осадок белковых веществ и определяют в ней содержание сахара ареометром Баллинга, градусы которого примерно соответствуют содержанию сахара в процентах.

Приготовление сусла в лаборатории

В эмалированную посуду наливают 1 л водопроводной воды и нагревают до 50° , затем всыпают при помешива-

нии 250 г высушенного и размолотого солода (проросших семян ячменя). Смесь подогревают до 57° и поддерживают эту температуру в течение 1 часа, затем постепенно поднимают температуру до 63° и поддерживают ее на этом уровне до исчезновения реакции на крахмал (синее окрашивание с иодом). Готовое сусло процеживают, потом фильтруют через бумажный фильтр. Приготовленное таким образом сусло содержит обычно 10—12% сахара. Его разбавляют водой до содержания сахара в 6—8%. Стерилизуют пивное сусло в автоклаве при 115° в течение 20 мин. После стерилизации устанавливают рН.

Прим. Готовое сусло можно получить на пивоваренном заводе.

Мальц-пептоно-желатиновая среда

И вариант

Желатина	100
Мальц-экстракт . .	20
Пептон	10
Вода водопроводная	1000 мл

Прим. В теплое время года количество желатины увеличивают до 20%.

Указанная желатиновая среда употребляется при изоляции грибов методом выращивания гриба из одной споры.

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

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

II вариант

Желатина	120
Мальц-экстракт . . .	24
Пептон	10
Лимонная кислота .	0.5
Вода водопроводная	1000 мл

Прим. Мальц-экстракт можно заменить пивным сушлом, которое берется в количестве 25.0 мл, что повлечет соответствующее уменьшение количества воды.

Виноградная желатина

Изюм	25
Желатина	10
Вода водопроводная	100 мл

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

Прим. Очень хорошая среда для многих почвенных грибов.

Картофельная желатина

Картофель (очищен- ный)	100
Желатина	10
Вода водопровод- ная	150 мл

Картофель нарезают на маленькие кусочки, опускают в 150 мл воды и варят в течение 1.5 часа, затем фильтруют. Объем восстанавливают, добавляют желатину и стерилизуют в автоклаве текучим паром в продолжение 1 часа. Затем фильтруют, разливают по пробиркам и стерилизуют текучим паром в течение 1 часа 2 дня подряд.

Мясо-пептонный бульон с глюкозой

500 г свежего, без жира и сухожилий мяса, мелко изрубленного или измельченного в мясорубке, заливают 1 л воды, нагретой до 50° и выдерживают в течение 1 часа при этой же температуре или в течение 12 час. при 10—15°. Затем настой процеживают через холст или марлю и кипятят в течение 30 мин. К полученной (0.5 л)

мясной воде (объем жидкости после кипения восстанавливают, прибавляя водопроводную воду) добавляют 2.5 г поваренной соли, 5 г пептона и 10 г глюкозы (или сахарозы) и в горячем состоянии фильтруют через бумажный фильтр. Затем устанавливают нужную реакцию среды (рН), разливают по пробиркам и стерилизуют в автоклаве при 120° в течение 20 мин.

Картофельный агар

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

Картофельный агар с глюкозой (декстрозой)

I вариант		II вариант	
Картофель очищенный	200	Картофельный отвар	300 мл
Глюкоза (декстроза)	20.0	Глюкоза (декстроза)	20.0
Агар	15.0— 20.0	Агар	15.0
Вода водопроводная	1000 мл	Вода водопроводная	1000.0 мл

Стерилизовать в автоклаве при 120° в течение 30 мин.

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

Среда Вольге (аспарагиновая)

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

Прим. Желательно добавить в эту среду 0.5 мг thiamine hydrochloride.

Дрожжевой экстракт

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

Дрожжевая вода

1. Применение в качестве стимулятора роста грибов

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

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

2. Применение в качестве питательной среды для грибов

Прессованные дрожжи промывают и разводят в 5—6 раз водой, нагревают до 55° и ставят в темноту при температуре 28—30° на одни сутки. Затем среду стерилизуют в автоклаве при 0.5 атм. (по показанию манометра) в течение 25 мин. и снова оставляют на сутки. Через сутки сливают прозрачный слой с осадка дрожжевых клеток. К дрожжевой воде добавляют 2% сахара, 0.5% NaCl и 0.1% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Дрожжевой автолизат (по Скородумовой)

500 г прессованных дрожжей смешивают с 500 мл воды и в банке с притертой пробкой ставят в термостат при температуре 45° на 2—3 суток или при 55—58° —

на 1 сутки. Затем смесь фильтруют, остаток на фильтре промывают 1 л воды; общий фильтрат доводят водой до 2 л и стерилизуют при 110° в течение 30 мин.

Среды из семян растений и отрубей

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

NaNO ₃	3.0
KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
Вода водопровод- ная	1000 мл

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

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

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

Отвары из семян бобовых растений

Семена бобовых (белой фасоли, гороха, бобов) варят 1 час в 4—5-кратном количестве воды. Слитую вытяжку доводят водой до прежнего объема, устанавливают нужный рН, прибавляют сахара до 1% и KH₂PO₄ — до 0.05—0.1%. Стерилизуют в автоклаве при 120° в течение 20 мин.

Среда из проросшего гороха

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

Среда из экстракта пшеничных отрубей

Сухие пшеничные отруби замешивают водопроводной водой, предварительно нагретой до 40° в соотношении 1:10. На 1 л воды добавляют 3 г NaNO₃. После размешивания температуру доводят до 62—65° и при помешивании производят экстракцию в течение 3 час. Затем взвесь фильтруют через двойной слой марли и тщательно отжимают. Полученный фильтрат стерилизуют в автоклаве при 1 атм. (120°) в течение 20 мин.; рН = 5.5—6.0.

Овсяный агар

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

Среда из овса

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

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

Среда из стеблей донника

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

Среды из экстрактов овощей и плодов

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

Среды из стерилизованного картофеля, моркови и других овощей

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

Навозная агаризованная среда

Свежий конский помет (из расчета 100 г на 1 л воды) сначала настаивают, затем кипятят и фильтруют через обычный фильтр. Восстановив первоначальный объем жидкости, устанавливают нужный рН, добавляют 2—2.5% агара и стерилизуют в автоклаве при 120° в течение 25 мин.

Почвенная агаризованная среда

И вариант

400—500 г плодородной почвы настаивают в течение суток на 1 л воды, затем тщательно взбалтывают, кипятят в течение 30 мин. и фильтруют.¹ Вытяжку смешивают с тальком и после отстаивания вновь фильтруют через двойной бумажный фильтр. К вытяжке добавляют 0.5 г K_2HPO_4 , устанавливают нужный рН и восстанавливают прежний объем жидкости. Стерилизуют при 120° в течение 40 мин.

¹ Берут воздушно-сухую почву, освобожденную от растительных остатков, измельченную в ступке и просеянную через сито. Агар обычно добавляется в количестве 1.5—2.0%.

II вариант

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

III вариант

Воздушно-сухую измельченную почву помещают в колбу и заливают дистиллированной водой в соотношении от 1:5 до 1:9. В полученную суспензию вносят 1.5—2.0% агара, стерилизуют в автоклаве при 120° в течение 1 часа.

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

Среда с почвенным экстрактом

а) Агаризованный почвенный экстракт

Почвенный экстракт	200 мл
Глюкоза (декстроза)	10.0
KH_2PO_4	0.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
Агар	20.0
Вода водопроводная	800 мл

б) Желатинизированный почвенный экстракт

Почвенный экстракт	100 мл
Глюкоза (декстроза)	1.0
Желатина	120.0
Вода водопроводная	900 мл

в) Почвенный экстракт по Локхиду

K_2HPO_4	0.2
Агар	15.0
Почвенный экстракт	1 л

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

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

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

1 кг садовой почвы заливают 1 л водопроводной воды и помещают в автоклав на 30 мин. при давлении 2 атм., после чего дают отстояться. Жидкость сливают и фильтруют через двойной фильтр. Фильтрат нейтрализуют содой до $\text{pH} = 7.0-7.2$. К 100 мл почвенной вытяжки добавляют 900 мл дистиллированной воды и 15 г агара. Кипятят, разливают в пробирки или колбы и стерилизуют в автоклаве при 120° в течение 30 мин.

Почвенный экстракт по Пошону

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

*Среда для культивирования грибов,
разрушающих целлюлозу*

Фильтровальную бумагу (лучше обеззольные фильтры) нарезают длинными узкими полосками шириной в 1 см и длиной до 10 см и опускают в обычные пробирки. Затем вливают в пробирки по 2—3 мл минеральной жидкой среды Гетчинсона и Клейтона или упрощенной среды Ролэна, но без источника углерода (т. е. без сахара). Полоска фильтровальной бумаги окажется погруженной в жидкость примерно на 2—3 см, большая же ее часть останется на воздухе, но будет увлажненной. Пробирки затыкают ватными пробками и подвергают стерилизации в автоклаве при $115-120^\circ$ в течение 25—30 мин. Посев целлюлозоразрушающих грибов надо производить на непогруженную влажную часть фильтровальной бумаги.

Для изолирования целлюлозоразрушающих грибов применяют посевы маленьких комочков исследуемой почвы на следующие агаровые среды.

Среда Гетчинсона и Клейтона (рН = 7.6)

K_2HPO_4	1.0	$FeCl_3$	0.01
$CaCl_2$	0.1	$NaNO_3$	2.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3	Агар	15
$NaCl$	0.1	Вода дистиллиро- ванная	1000 мл

Вторая среда аналогична предыдущей, но с заменой K_2HPO_4 соответствующим количеством KH_2PO_4 ; рН = 6.1.

*Кислая среда Частухина, видоизмененная Захаровым
(рН = 4.5—5.0)*

$(NH_4)_2SO_4$	0.75
KH_2PO_4	0.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25
$FeSO_4$	Следы
$MnSO_4$	Следы
Агар	4
Вода дистиллиро- ванная	200 мл

Прим. На этой среде четко дифференцируется видовой состав грибов.

На поверхность застывшего агара накладывают стерильный обеззоленный фильтр или фильтровальную бумагу. Фильтровальную бумагу следует предварительно прокипятить в дистиллированной воде и затем проверить на иодную реакцию. Она должна дать отрицательную подную реакцию, т. е. показать отсутствие у нее примеси крахмала. Обычно для выращивания почвенных целлюлозоразрушающих грибов на указанных выше агаровых средах берут навеску исследуемой почвы в 0.1 г, которую раскладывают на 50 комочков. Затем чашку Петри с агаровой пластинкой после посева почвы помещают в термостат при 25—27° или лучше во влажную камеру при той же температуре. Вместо использования комочков для выделения и даже количественного учета целлюлозоразрушающих грибов рекомендуется применять метод посева разведений почвенных болтушек, предложенный О. И. Пушкинской. По данному методу, из приготовленного разведения почвенной болтушки производится посев на поверхность агара, пропитанного минеральными растворами. Почвенная болтушка посредством шпателя равномерно распределяется по всей агаровой пластинке чашки Петри, после чего сверху на агар накладывается

стерильный обеззоленный фильтр или кружок фильтровальной бумаги (см. детальное описание данного метода на стр. 74).

В настоящее время для выращивания микроскопических грибов, разрушающих целлюлозу, широко используются гелевые (кремнекислые) пластинки или «голодный» агар. На поверхность пластинок кремнекислого геля или «голодного» агара накладывают бумажные обеззоленные фильтры и увлажняют их следующими минеральными растворами Частухина.

<i>Раствор № 1 (физиологически кислый)</i>	<i>Раствор № 2 (физиологически щелочной)</i>
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5	KNO_3 3.0 г
KH_2PO_4 1.0	KH_2PO_4 1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5
FeSO_4 Следы	NaCl 0.5
MnSO_4 Следы	FeSO_4 Следы
Вода дистиллиро- ванная 200 мл	MnSO_4 Следы
	Вода дистиллиро- ванная 200 мл

Растворы стерилизовать в автоклаве при 120° в течение 30 мин.

На поверхность увлажненных (пропитанных) фильтров производят посев почвы или комочками, или в виде почвенной суспензии. Чашки Петри помещают во влажную камеру (относительная влажность 60%) при температуре $25-27^\circ$.

Методика приготовления гелевых пластинок

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

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

3. К 0.5 л соляной кислоты (уд. вес 1.10) при постоянном помешивании добавляют 0.5 л жидкого стекла.¹

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

5. Открытые чашки с гелем помещают в бачок, который ставят в раковину; на водопроводный кран надевают резиновую трубку, опускают ее на дно бачка и промывают чашки Петри проточной водой. Через 2—3 суток чашки ополаскивают не-

¹ Нельзя кислоту добавлять к жидкому стеклу.

сколько раз дистиллированной водой и проверяют полноту промывания, пользуясь пробой на хлор (AgNO_3 в присутствии HNO_3).

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

7. Перед посевом поверхность кремневой пластинки пропитывают стерильной питательной средой (см. предыдущие прописи сред).

«Голодные» среды

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

а) Водный агар («голодный»)

Агар 15.0—20.0
Вода водопроводная . . . 1000 мл

Стерилизовать при 120° в течение 25 мин.

б) Агар с разбавленным суслом

Неохмеленное пивное сусло ($16\text{—}17^\circ$ по Баллингу) разбавляют водой в соотношении 1 : 9.

Агар 10.0—15.0
Разбавленное сусло . . . 1000 мл

Стерилизовать при 110° в течение 30 мин.

*Количественный учет микроскопических грибов,
способных разлагать клетчатку по методу
О. И. Пушкинской (1954)*

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

Среда Пидопличко для грибов, разрушающих целлюлозу

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

Среда Камышко для сумчатых грибов

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

Культивирование грибов на предметных стеклах по методу Н. М. Пидопличко (1938)

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

под микроскопом проводят в любое время, но многократно. Этот метод «живых препаратов» часто применялся Н. М. Пидопличко и В. И. Билай (Підоплічка, Деняк, 1938, 1941) при изучении ими грибов р. *Cladosporium*. Они для диагностики видов р. *Cladosporium* применяли среду Чапека с большим количеством сахарозы (28—70%). Кроме того, они употребляли для этих грибов танин и сливочное масло как единственные источники углеродного питания.

Среды для выделения и изучения почвенных хищных грибов

Среда Дарлингтона

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

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

«Голодный» агар (по Сопрунову)

В чашку Петри тонким слоем наливают стерильный агар, приготовленный из расчета 4—5 г агара на 100 г колодезной воды, с добавлением лимонной кислоты до установления рН в пределах 6.0—6.5.

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

	K ₂ HPO ₄ 1.0
	MgSO ₄ 0.3
	NaCl 0.1
	FeCl ₂ 0.01
Арбузный сок, разбавленный на 1/2 водой 100 мл	
Лимонная кислота 0.2	Вода дистиллированная 1000 мл
Агар 3	Агар 20.0

Среда Мехтиевой

Раствор Гетчинсона: NaNO ₃	2.5
--	-----

Сверху накладывается фильтровальная бумага, на которую помещают кусочки почвы.

ПОЧВЕННЫЕ ГРИБЫ р. FUSARIUM, ИХ ИЗУЧЕНИЕ И МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

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

Главными видовыми признаками грибов этого рода являются отдельные элементы в морфологии макроконидий, образующихся в спородохиях и пионнотах.

Значительный вклад в систематику и классификацию р. *Fusarium* сделала отечественный миколог Александра Ивановна Райлло (1950). Тщательное изучение степени и характера изменчивости отдельных отличительных признаков, принятых для разграничения видов и разновидностей в систематике Волленвебера и Рейнкинга (Wollenweber u. Reinking, 1935), позволило А. И. Райлло сделать следующие основные выводы.

Длина макроконидий не может являться, как правило, существенным признаком вида. Размеры макроконидий в целом могут быть использованы в качестве видовых признаков, но с учетом степени их изменчивости, выявленной при развитии гриба как в природных, так и в экспериментальных условиях. Преобладающее число перегородок в макроконидиях у моноспоровых культур может служить для характеристики вида в пределах секции, но более всего является признаком подвида или разновидности. Изогнутость конидий (с учетом степени ее изменчивости) служит признаком подвида в пределах секции и отдельных разновидностей. Характер пигментации культуры служит признаком форм в пределах вида. Тип спороношения используется для характеристики отдельных культур. Форма верхней клетки макроконидий — ведущий признак для отдельных видов в пределах секций.

Таким образом, в данной системе культуральные признаки используются для выделения форм или штаммов культур, а элементы морфологии макроконидий, т. е. форма их верхней клетки, изогнутость и преобладающее число перегородок используются соответственно для характеристики подвида и разновидности.

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

Изменения, сделанные В. И. Билай в систематике р. *Fusarium*, привели к значительному сокращению в нем общего количества видов.

ОСНОВНЫЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ ВИДОВ р. FUSARIUM (ПО РАЙЛЛО, 1950)

Виды р. *Fusarium* обладают двумя типами конидий: макроконидиями и микроконидиями.

Микроконидии образуются обычно в воздушной грибнице на простых или разветвленных конидиеносцах, иногда на коротких отростках или выступах гиф, собраны в цепочки или ложные головки, большей частью одноклеточные, реже с 1 и очень редко с 2—3 перегородками; по форме чаще овальные, яйцевидные, эллипсоидные, реже шаровидные, грушевидные, веретеновидные.

Макроконидии образуются в воздушной грибнице на простых или разветвленных конидиеносцах, сгруппированных (скупенных) в спородохиях, пионнотах или псевдопионнотах.¹

¹ Спородохии представляют собой своеобразные подушечки, состоящие из скопления коротких простых или разветвленных

Макроконидии, образуемые в спородохиях и пионнотах, отличаются от макроконидий, возникающих у этих же культур в воздушном мицелии. Макроконидии большей частью с 3—5, реже 6—9 перегородками; по форме преобладают веретенovidные, веретенovidно-серповидные, серповидные, реже веретенovidно-ланцетовидные, клиновидные, суженные к обоим концам; у основания с четко или слабо выраженной ножкой (в виде сосочка) или совсем без нее; с верхушечной клеткой, часто имеющей характерную форму; в массе макроконидии светлоокрашенные (беловато-охряные, охряно-розовые, оранжевые, реже желтые, пурпуровые, синие, зеленовато-синие).

По характеру изогнутости макроконидии бывают: 1) эллиптически изогнутые — конидии незначительно и равномерно изогнуты на обоих концах, 2) параболически изогнутые — конидии изогнуты главным образом в верхней части, 3) гиперболически изогнутые — конидии значительно и равномерно изогнуты на обоих концах в виде полумесяца, 4) угревидно изогнутые — конидии дорсовентральные (изогнутость вогнутой стороны меньше, чем выпуклой).

Характер изогнутости, размер, количество перегородок, форма верхней клетки, наличие ножки у основания и другие признаки морфологии макроконидий имеют большое значение для видовой систематики р. *Fusarium*.

конидиеносцев, образующих макроконидии; под слоем конидиеносцев у их основания имеется плотное плектенхиматическое сплетение гиф мицелия или даже строма паренхиматического или псевдопаренхиматического строения; окрашены обычно в лососевый, оранжевый, синий или фиолетовый цвета.

Пионноты отличаются от спородохий тем, что образуют слизистый слой, состоящий из слизи и массы макроконидий; конидиеносцы отходят более или менее сплошным слоем от субстратного мицелия; у основания пионнот имеется лишь рыхлое сплетение гиф, какой-либо стромы не имеется; окрашены в такие же цвета, как и спородохий. Пионноты бывают поверхностные и погруженные: первые развиваются на воздушной грибнице и представлены или в виде слизи, покрывающей сплошь весь субстрат, или в форме мелких бугорков; вторые погружены в субстрат, без слизи, имеют вид окрашенных блестящих полированных поверхностей.

Псевдопионноты имеют вид бугорков; расположены на воздушной грибнице над самым питательным субстратом или погружены в него; окрашены в оранжевый и лососевый цвета или бесцветны.

Верхушечная клетка макроконидий бывает по форме слегка суженная, тупая, отчасти загнутая; слегка суженная, тупая, но прямая; слегка и внезапно суженная, сравнительно короткая; слегка суженная, но усеченная и немного удлиненная; постепенно и равномерно суженная, заметно удлиненная (коническая); сильно и резко суженная, очень удлиненная; сильно и резко суженная, нитевидно и значительно удлиненная; очень сильно суженная, значительно удлиненная и загнутая на конце.

Размеры (длина и ширина) макроконидий и количество поперечных перегородок в них используются для разграничения видов лишь с учетом амплитуды их изменчивости. Макроконидии обычно с 3—5, реже с 6—10 поперечными перегородками.

Хламидоспоры также являются органами вегетативного размножения грибов р. *Fusarium*. Они образуются на грибнице и конидиях; могут быть конечными (терминальными) и промежуточными (интеркалярными); в гифах встречаются по одной, по две, цепочками или даже в виде узелков (клубочков); по форме — круглые или овальные, с гладкой или покрытой зубчиками утолщенной оболочкой; часто бесцветные, реже окрашенные в охряный, охряно-коричневый или коричневый цвета.

Склероции возникают у многих видов в культуре на рисе или картофеле, на агаровых средах развиваются плохо; по форме бывают круглые, иногда типа *Stilbum*, внутри без полости, одиночные или собранные группами, мелкие, размером до 1 мм, или крупные, размером до 5—12 мм; по окраске очень варьируют в зависимости от питательного субстрата, на котором выращивается гриб: на ломтиках картофеля или рисе от белых, желтых, коричневых до пурпуровых или темно-синих.

Мицелий на агаровых средах обычно белый, беловато-желтый, розовый, пурпуровый, фиолетовый, часто образует заметные шнуры из параллельно растущих гиф.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДА, ПОДВИДА И РАЗНОВИДНОСТИ р. FUSARIUM

Культуры гриба пересевают на картофельный и кислый картофельный агары для получения молодых генераций, из которых затем следует выделить моноспоровые

культуры. Одновременно делают высеv культуры на рис. Контрольный просмотр для установления образования споронотения на агарах производят на 15-е сутки после посева.

Вид, подвид и разновидность определяют только по форме макроконидий, образованных в спородохиях и пионнотах в культурах, выращенных на картофельных агарах. Конидии, образованные в воздушном мицелии, не характеризуют вид.

Признаки, выявленные при изучении культур, имеют различное диагностическое значение. Форма верхней клетки макроконидий будет главным признаком вида (*species*); длина верхней клетки, изогнутость и число перегородок в макроконидии — признаком подвида (*subspecies*); специализация (биологический критерий) — большей частью признаком разновидности (*varieties*); пигмент культуры на рисе — признаком формы (*forma*).

Прим. Форма верхней клетки макроконидий всегда является признаком вида, но признаки низших таксономических единиц могут меняться; так, например, для изменчивого вида *F. scirpi* (секция *Gibbosum*) форма верхней клетки будет признаком вида (*sp.*); изогнутость конидий — признаком подвида (*subsp.*); длина верхней клетки и число перегородок — признаком разновидности (*var.*); пигмент — признаком формы (*f.*).

Иногда очень характерный биологический признак может являться критерием для распознавания вида, как например для *F. culmorum* — типичного паразита *Triticum*.

Среды для культивирования грибов р. *Fusarium*

Картофельный агар (по Щербакову)

Картофель очищенный	200
Агар	20
Вода водопроводная	1000 мл

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

Картофельный агар с глюкозой

Картофель (очи- щенный)	200
Глюкоза	100
Агар	20
Вода водопровод- ная	1000 мл

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

Картофельный агар (обычный)

Картофель, наре- занный ломти- ками	200
Вода водопровод- ная	1000 мл

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

Кислый картофельный агар

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

Прим. Прибавлять кислоту в агар следует после его стерилизации, но когда агар еще расплавлен.

Эта среда употребляется главным образом при выделении фузариев из материала, сильно загрязненного бактериями.

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

Среда из риса

1 часть (объема) риса смешать с 2 частями воды. Стерилизацию производить в 2 приема: в первый день

в течение 1 часа в текучем паре и на второй день в течение 30 мин. в автоклаве при 120°.

Прим. Для описания цвета пигмента рекомендуется пользоваться цветными таблицами Риджвея (Ridgway, 1912).

Ломтики картофеля

Нарезают небольшие ломтики картофеля, помещают их в пробирки и стерилизуют, как рис. Эта среда применяется для культивирования фузариев секции *Martiella*, не дающих спороношения на других средах.

Культуры, не образующие конидии на картофельном или кислом картофельном агаре, необходимо высевать на другие микробиологические питательные среды и подвергать действию разных температур или снова выделять из них моноспоровые культуры. Получив спороношение культуры на какой-либо среде, из нее следует сделать посев на картофельные среды. Определять виды р. *Fusarium* можно только на принятых вышеуказанных стандартных средах.

Все моноспоровые культуры, не давшие спороношения в короткие сроки, следует хранить в термостате в течение 3—4 месяцев и периодически через каждые 15 суток исследовать, отмечая появление спорообразования. Если возникает спороношение, то надо произвести измерение конидий на этих средах.

Измерение конидий производят на 15-е сутки роста культуры на картофельных средах (агарах). Если же спороношение не появилось к этому сроку, то последующий просмотр культуры и измерение конидий осуществляют снова через 15 суток, т. е. на 30-е, а затем на 45-е сутки и т. д. после посева культуры.

Описание пигмента производят на 30-е сутки роста культуры на рисе. Описывается окраска первичной грибницы, окраска зерен риса, каймы вокруг зерен, появление вторичной грибницы, окраска ее, образование склероций и т. д. При изучении пигмента нужно обратить внимание на появление вторичной грибницы. Вторичная грибница на 30-е сутки иногда покрывает уже $\frac{2}{3}$ культуры или даже всю ее, маскируя при этом пигментацию первичной грибницы.

Запах культуры отмечать обязательно только при условии ее выращивания на рисе.

ПОЧВЕННЫЕ ХИТРИДИЕВЫЕ ГРИБЫ (CHYTRIDIALES) И МЕТОДЫ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Изучению почвенных хитридиевых грибов до сих пор уделяют недостаточное внимание. Часть хитридиевых грибов ведет в почве сапрофитный образ жизни, встречаясь в изобилии на разлагающихся растительных и животных остатках. Так, например, известный гриб *Rhizophlyctis rosea* принимает непосредственное участие в разложении клетчатки. Наряду с целлюлозофильными почвенными хитридиевыми грибами имеются каратинофильные, развивающиеся на таких субстратах, как волос, перья, рог. Получение накопительных культур *Rh. rosea*, по данным Д. М. Новогрудского (Новогрудский и Теплякова, 1949), хорошо удается на агаровых пластинках минеральной питательной среды Гетчинсона с кружком фильтровальной бумаги. Хороших результатов добиваются также и на пластинках кремневого гелия, пропитанных той же средой и покрытых фильтровальной бумагой. Посев исследуемой почвы производят комочками. При 25° на свету через 70 суток при наличии *Rh. rosea* вокруг комочков возникают ярко-розовые зоны, причем бумага быстро разрыхляется.

Стеньер (Stanier, 1942) пользовался синтетической средой: водопроводная вода — 1000 мл, фосфорнокислый калий двузамещенный 1.0 г, сернокислый аммоний 1.0, сернокислый магний 0.1, хлористый натрий 0.1, хлористый кальций 0.1, хлористое железо 0.02, глюкоза 5.0 г. Он рекомендует освобождаться от сопутствующих бактерий следующим образом. Куски фильтровальной бумаги с культурой *Rh. rosea* помещают на дно пробирки, содержащей 10—15 мл стерильной водопроводной воды. Через некоторое время под микроскопом можно наблюдать появление многочисленных зооспор. Так как зооспоры движутся быстрее сопутствующих бактерий и так как они весьма аэробны, они раньше накапливаются в верхних слоях жидкости. В этот момент берут с поверхности каплю жидкости, высевают ее штрихами на минеральную глюкозо-агаровую пластинку указанной выше среды Стеньера. Спустя 24 часа (при 28°) отмечают места, где изолированно расположены молодые зооспорангии ризофликтиса. После этого пластинки инкубируют еще в продолжение 12—36 час. до освобождения зооспор из зооспорангиев.

К последним под микроскопом прикасаются иглой и переносят их на свежие пластинки среды Стеньера. Однако получение чистых культур по этому методу не всегда удается.

Д. М. Новогрудский и З. Ф. Теплякова (1949) проводили посев из накопительной культуры в пробирки, содержащие минеральный раствор Гетчинсона и Клейтона и полоски фильтровальной бумаги, к которому асептически добавляли 2000 единиц чистого пенициллина. После двух последовательных пересевов через пробирки с пенициллином *Rh. rosea* был полностью освобожден от сопутствующих бактерий.

Кроме указанных методов для выделения хитридиевых грибов из почвы применяют так называемые приманки, в частности прокипяченные и расщепленные на две половинки семена конопли, вареные листья кукурузы, пшеницы, риса и других злаков, фильтровальную бумагу, целлофан, мертвых насекомых (плодовые мухи, мошки, комары), яйца и личинки муравьев, пыльцевые зерна сосны и других растений. Листья растений лучше обесцвечивать кипячением в 95° спирте на водяной бане, так как при этом облегчается изучение развившихся в них хитридиевых грибов. Однако обесцвеченные листья как питательный субстрат для этих грибов менее благоприятны, чем листья, содержащие хлорофилл. На чашку Петри насыпают одну или две столовые ложки почвы и заливают стерильной водой, предварительно обработанной животным углем (Charcoal water).¹ Одну из вышеперечисленных приманок погружают в эту воду и через 2—3 дня исследуют ее. Если грибы не будут найдены, то следует добавить свежей приманки. Лишь после того как на приманке будут выявлены хитридиевые грибы, можно перейти к выделению их в чистые культуры.

Коуч (Couch, 1939) предлагает шесть способов получения чистых культур, а именно: 1) путем изоляции одного спорангия гриба в воде, 2) путем изоляции одного спорангия гриба на агаре, 3) путем изоляции спор из одного спорангия на предметном стекле, 4) путем изоляции одной споры в капиллярную пипетку, 5) путем

¹ Коуч (Couch, 1939) предлагает Charcoal water изготовлять следующим образом: 1 л дистиллированной воды тщательно смешать с 1 чайной ложкой животного угля и через час отфильтровать, затем автоклавировать при 115° в течение 30 мин.

изоляции одной споры на агаре и б) путем изоляции одного или нескольких кусочков гиф мицелия на агаре.

Первый способ состоит в том, что на стерильную чашку Петри наносят две стерильные капли воды на расстоянии 1 см друг от друга. В одну из капель помещают кусочек листа растения, пораженного грибом. Затем под биноклем (40—100×) тонкой иглой из этого листа извлекают маленькую его частичку с одним спорангием. Эту частичку переносят в другую каплю и под микроскопом убеждаются в наличии только одного спорангия. После того как будет выделен один спорангий, его переносят на стерильный кусочек листа, который в свою очередь помещают в новую стерильную чашку Петри в каплю стерильной воды, предварительно обработанной животным углем. В этой чашке создают условия влажной камеры посредством нанесения ряда капель стерильной дистиллированной воды на дно и крышку чашки. Этот способ употребляется главным образом при исследовании грибов, образующих крупные спорангии. Чаще употребляется второй способ, особенно при изучении грибов, имеющих спорангии малой величины, когда на пораженном субстрате выявляется несколько видов грибов. В этом случае извлеченным из листа спорангием делают штрих по поверхности агара; после того как при микроскопическом просмотре удастся выделить на агаре один спорангий, вырезают кружочек агара вместе со спорангием и помещают в другую стерильную чашку Петри в каплю воды, обработанной углем, со свежим стерильным кусочком листа. В дальнейшем Коуч несколько изменил этот способ, извлекая споры из выделенного спорангия с последующим их переносом на свежий лист.

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

Четвертый способ основывается на том, что в тонкую капиллярную пипетку втягивают немного спор, которые затем смешивают с каплями воды до тех пор, пока в одной из капель не окажется одна спора. Эту каплю воды с одной спорой наносят на стерильный лист с водой, обработанный животным углем.

Вышеуказанные способы все же не оберегают культуры гриба от сопутствующих бактерий.

Следующий, пятый, способ основан на том, что споры, способные прорасти на агаре, высевают штриховым посевом на одну из вышеуказанных сред. Споры при этом посеве часто изолируются поодиночке, и тогда можно вырезать кружочек агара с одной спорой и помещать в отдельную чашку Петри. При этом методе основная трудность заключается в том, чтобы штриховым посевом максимально рассеять споры по поверхности агара. Через 12—24 часа они обычно прорастают, что можно наблюдать под микроскопом.

У некоторых полицентрических хитридиевых грибов, как например у *Cladochytrium replicatum*, споры прорастают на агаре, образуя отчетливый мицелий. Из него вырезают один или два кусочка и вместе с кусочком агара помещают в чашку Петри с влажными условиями для получения культуры.

Этот шестой метод не применим к моноцентрическим видам.

Обычно для выделения хитридиевых грибов используют следующие среды: 1) простой 3%-й водный агар (агар предварительно тщательно промывается водой); 2) агар № 12 (Leitner) (2% агара и 0.004% пептона); 3) агар № 13 (Foust) (2% агара, 0.15% мальтозы и 0.004% пептона); 4) кукурузный агар. 2—4 ложки кукурузной муки на 1 л воды слегка нагревают на водяной бане при температуре 60° в течение 1 часа. Жидкость отфильтровывают, добавляют воды до 1 л и 2% агара.

Для выделения из почвы хитридиевых грибов Гертнер (Gaertner, 1954) брал навеску почвы в 1.5 г, рассыпал по чашке Петри и заливал стерилизованной ключевой водой. На 1 чашку Петри он помещал в качестве приманки 2 мг стерилизованной пыльцы *Pinus montana* или 4 половинки конопляного семени, или две муравьиные личинки и др. Пыльцу, конопляное семя, солому, мура-

вьиные личинки стерилизовали в сушильном шкафу при 103°. Комнатную муху, волосы свиньи или рогатого скота автоклавировали при 120°. Чашки с приманками ставили в термостат при 22° на 5—15 суток в темное помещение; в течение этого времени приманки периодически просматривали под микроскопом.

Гардер и Убелмессер (Harder a. Uebelmesser, 1957, 1959) предлагали брать несколько больше почвы на одну чашку Петри, которую заливали стерильной водой, употребляя те же приманки, включая еще целлофан и пыльцу разных видов *Pinus*. Приманки должны свободно плавать по поверхности воды.

Рейнболд (Reinboldt, 1951) использовал в основном те же приманки, но на одну чашку Петри он рассыпал 2 мг пыльцы *Pinus montana* или 5 муравьиных коконов (*Formica rufa*), или обрезки высохшей соломы, шелковые нити, корни злаковых растений, кустарников, земляных орехов, пыльцу растений различных семейств (*Gramineae*, *Compositae*, *Malvaceae*). Он рекомендует на 1 г исследуемой почвы брать до 50 мл водопроводной воды так, чтобы приманки свободно плавали по ее поверхности. Приманки вылавливались петлей. Чашки выдерживались в темноте и в термостате при +20°.

Ниже предлагается ряд сред для культивирования хитридиевых грибов.

I среда (Whiffen)

NH_4NO_3	0.5
Солевой раствор	500 мл
Декстроза	2.5
Агар	3.0
Для получения	
рН = 7.2 добавляется	
0.2 н. NaOH	

Солевой раствор:

K_2HPO_4	0.3
KH_2PO_4	0.2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
NaCl	0.1
$\text{CaCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.01
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001
Дистиллированная	
вода	1000 мл

II среда (Ajello)

NH_4NO_3	0.5
KH_2PO_4	1.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
Декстроза	10.0
Тиамин	0.0002
Агар	15.0
Солевой раствор	0.5 мл
Дистиллированная	
вода	1000 мл
Для получения	
рН = 5.5 добавляется	
0.2 н. NaOH	

Солевой раствор:

H_3BO_3	0.0057
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0186
$\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.173
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.0081

ZnSO₄ · 7H₂O 0.079
 (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O 0.0036
 Ga₂(SO₄)₃ 0.0068
 Дистиллированная
 вода 100 мл

III среда
 (Haskins a. Weston)

KNO₃ 2.0
 или NH₄NO₃ 8.0
 Глюкоза 10.0
 Целлобиоза 5.0
 Агар 10.0
 Солевой раствор . 500 мл
 Для получения
 рН = 7.2 добавляется
 0.2 н. NaOH

Солевой раствор:

K₂HPO₄ 0.3
 KH₂PO₄ 0.2
 MgSO₄ · 7H₂O 0.2
 NaCl 0.1
 CaCl₂ · 3H₂O 0.1
 FeCl₃ 0.01
 ZnSO₄ · 7H₂O 0.001

Дистиллированная
 вода 1000 мл

IV среда (Stanier)

(NH₄)₂SO₄ 1.0
 Глюкоза 5.0
 K₂HPO₄ 1.0
 MgSO₄ · 7H₂O 0.2
 NaCl 0.1
 CaCl₂ 0.1
 FeCl₂ 0.02
 Агар 15.0
 Водопроводная вода 1000 мл
 Целлюлоза — филь-
 тровальная бумага
 рН = 7.0—7.2

V среда (Emerson)

Дрожжевой экстракт 4 мл
 Растворимый крах-
 мал 15.0
 KH₂PO₄ 1.0
 MgSO₄ · 7H₂O 0.5
 Агар 20.0
 Дистиллированная
 вода 1000 мл

Прим. Крахмал можно заменить 15 г глюкозы или 10 г пептона и 10 г глюкозы.

**ПОЧВЕННЫЕ СУМЧАТЫЕ ГРИБЫ р. CHAETOMIUM
 И МЕТОДЫ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Из сумчатых грибов в почве довольно широко распространены различные виды р. *Chaetomium* (пор. *Sphaeriales*), примерно 17 видов. Эти организмы на обычных питательных средах обнаруживаются довольно редко, но, как правило, выделяются на средах с целлюлозой, древесной и на растительных остатках.

Перитеции р. *Chaetomium* поверхностные, свободно образующиеся, без стромы, расположенные на рыхлом мицелиальном сплетении, обычно с коротким слабо заметным устьищем, шаровидные, яйцевидные или эллиптические; оболочка перитеция перепончатая, разрывающаяся, непрозрачная, паренхиматического строения. Сумки большей частью с длинной ножкой, широкобулавовидные, булаво-

видно цилиндрические, реже цилиндрические, легко расплывающиеся в воде; парафизы отсутствуют. Иногда на концах щетинок, покрывающих перитеций, образуются бесцветные конидии.

Аскоспоры одноклеточные, эллиптические, лимоновидные или округлые, всегда темноокрашенные в зрелом возрасте. Сапрофиты.

Среды для культивирования грибов р. *Chaetomium*

Культивирование грибов р. *Chaetomium* рекомендуется производить на следующих средах (Сергеева, 1960, 1961).

Стебли *Melilotus* + водопроводная вода.

Полоски древесины (фанеры) + водопроводная вода.

Фильтровальная бумага + питательный раствор Гетчинсона.

»	»	+	»	»	Кнопла.
»	»	+	»	»	Леониана. ¹
»	»	+	»	»	Чуди. ¹
»	»	+	»	»	Чанега.
»	»	+	раствор пивного сусла	4°	по Бал-

лингу.

Фильтровальная бумага + » » » 8° по Баллингу.

Бумага, древесина (фанера) и растительные остатки являются обычными субстратами для культивирования грибов р. *Chaetomium*.

Раствор Гетчинсона

K_2HPO_4	1
KCl	0.1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3
NaCl	0.1
$FeCl_3$	0.01
$NaNO_3$	2.5
Вода дистиллиро-		
ванная	1000 мл
pH = 7.5		

Раствор Леониана

KH_2PO_4	1.2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.6
Пептон	0.6
Мальтоза	6.25
Пивное сусло	6.5 мл
Вода дистиллиро-		
ванная	1000 мл
pH = 6.7		

¹ В растворах Леониана и Чуди вместо мальц-экстракта в том же количестве добавляется неразведенное цельное сусло (16—18° по Баллингу).

Раствор Кноппа

Ca (NO ₃) ₂	1
K ₂ HPO ₄	0.25
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25
FeCl ₃	Следы
Вода дистиллиро- ванная	1000 мл
pH = 5.7	

Раствор Чуди

Глюкоза	10
Крахмал	10
Пивное сусло	20
Вода дистиллиро- ванная	1000 мл
pH = 5.1	

Растворы пивного сусла

- 1) Раствор пивного сусла,
по Баллингу 4—5°
 - 2) Раствор пивного сусла,
по Баллингу 8—9°
- pH = 5.6

Посев гриба производят обычно в пробирки. В пробирки наливают по 3 мл воды и питательных растворов и в них опускают стебли *Melilotus*, полоски древесины (фанеры) в воду и фильтровальную бумагу (в этом случае свернутую в виде трубочек, закрепленных ниткой) в растворы. Стебли *Melilotus* — 8 см дл. и одинакового диаметра, полоски древесины (фанеры) и бумаги — 8 см дл. и 0.5 см в диам. Температура обычно 18—20°. Агаровую среду разливают в пробирки также по 3—4 мл и скашивают так, чтобы находившаяся там полоска бумаги полностью покрывалась ею.

Наблюдение за ростом культуры ведется до полного подсыхания среды. Образование новых перитециев на питательной среде происходит все время, пока имеются благоприятные условия для их развития. Поэтому в культуре выявляются перитеции разного возраста.

Можно также выращивать грибы из почвы в колбах Эрленмейера. 10—15 мл из указанных сред наливают в колбу Эрленмейера объемом 50 мл, на дно колбы опускают складчатый бумажный фильтр, направленный конусом вверх. Содержимое колбы засевают комочками почвы или водно-почвенной суспензией на фильтровальную бумагу.

ПОЧВЕННЫЕ ПЕСОВЕРШЕННЫЕ ГРИБЫ пор. SPHAEROPSIDALES И МЕТОДЫ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Несовершенные грибы пор. *Sphaeropsidales* представлены небольшим числом, главным образом родами *Phoma*, *Macrophomina*, *Sphaeronaema*, *Coniothyrium*, *Chaet-*

tomella и др. На обычных питательных средах эти организмы выделяются из почвы редко; что касается грибов р. *Chaetomella*, то они легко изолируются из почвы при посеве почвенных комочков на кружках фильтровальной бумаги, наложенных поверх агаровых пластинок с минерально-азотной средой следующего состава.

K_2HPO_4	0.1
KCl	0.1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3
NaCl	0.1
$NaNO_3$	2.5
Агар	15.0
Вода дистиллиро- ванная	1000 мл

ПОЧВЕННЫЕ ГРИБЫ ПОР. MUCORALES И МЕТОДЫ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Мукоровые грибы являются типичными плесневыми грибами, ведущими сапрофитический образ жизни и в значительной степени обитающими в почве. Мицелий у мукоровых грибов обычно хорошо развит, несептированный, моноподиально или дихотомически разветвленный, распространяющийся как внутри субстрата (погруженный), так и на его поверхности (воздушный). При росте гриба в жидкой питательной среде, содержащей сахар, мицелий в погруженном состоянии делится поперечными перегородками на округлые или цилиндрические клетки, которые вначале соединяются в цепочки, затем распадаются и почкуются, образуя так называемые мукоровые дрожжи.

Воздушный мицелий у некоторых представителей этого порядка развивается в виде особых столонов, состоящих из утолщенных маловетвящихся гиф с дугообразным ростом и образующих в местах соприкосновения с субстратом пучки корнеобразных ризоидов, проникающих в питательную среду и извлекающих из нее питательные вещества для роста гриба.

Большинство видов мукоровых грибов образует хламидоспоры, расположенные внутри гиф мицелия (интеркалярные, или промежуточные) или на их концах (терминальные, или верхушечные). Нередко также обнаруживается другой вид хламидоспор, так называемые

стилоспоры, образующиеся на специальных коротких гифах (ножках). У мукоровых грибов имеется бесполое и половое размножение.

БЕСПОЛОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

Бесполое спороношение представлено неподвижными спорами, образующимися эндогенно в спорангии (спорангиоспоры), эндо- или экзогенно в цилиндрическом мероспорангии по типу артроспор гифомицетов или экзогенно по типу одиночных или акропетальных (по две в цепочке) бластоспор («конидии», мероспорангии, экзоспоры). Спорангии шаровидные или грушевидные, реже колбовидные, много-, мало- (спорангиола) и реже односпоровые, с колонкой или без нее, с растворяющейся или разрывающейся оболочкой, реже опадающие. Мероспорангии малоспоровые, простые или слабо разветвленные, образуются в виде выроста на особых плодущих структурах (спорокладии) или терминальном вздутии спороносца, расчленяются по поперечным перегородкам (перетяжкам). Спороносцы (спорангиеносцы, «кониdienосцы») простые или разветвленные, отходят от субстрата или надсубстратных гиф (столоны, ризоиды или морфологически недифференцированные гифы).

ПОЛОВОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

Половое размножение зигогамное, наблюдается в субстрате, над субстратом или на его поверхности, известно не у всех видов. Зигоспоры шаровидные, голые или окружены перидием (сетчатым, войлочным), гладкие или с утолщениями (пирамидальными, бородавчатыми, звездчатыми), золотисто-желтые, буровато-красные или темно-бурые, образуются между противоположными или клещевидно изогнутыми морфологически высоко дифференцированными копулирующими отростками или возникают в виде почковидного выроста над местом их слияния. В последнем случае отростки параллельно лежащие и обычно морфологически не дифференцированные. Копулирующие отростки от грушевидной до нитевидной формы, иногда с нитевидными или шиповидными придатками; гетеро- и реже гомоталлические; изо- или гетерогамные.

Физиологически не специализированные сапрофиты, реже копрофилы или микопаразиты, чаще на своих со-родичах.

Грибы пор. *Mucorales* встречаются в природе всюду, в частности в значительном количестве в почве и помете различных животных, являясь сапрофитными организ-мами. Немногие из муковых грибов известны как фа-культативные паразиты человека и животных. Кроме того, среди муковых грибов часть видов паразитирует (факультативно и облигатно) на высших грибах.

Среды для культивирования муковых грибов

Подбор сред для культивирования грибов пор. *Muco-
rales* производится с учетом того, для какой группы они
предназначаются. Наиболее пригодной средой для сапро-
фитных и факультативных паразитов пор. *Mucorales*
является среда Кука.

Среда Кука

Глюкоза (декстро- за	20.0
K_2HPO_4	0.25
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25
Пептон	10.0
Агар	15.0
Вода дистиллиро- ванная	1000 мл

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

Для изоляции грибов пор. *Mucorales* рекомендуется использовать агаровую среду Кука кислой реакции ($pH = 4.2-4.5$). Для учета муковых грибов следует брать среды с желатиной и пептоном. При исследовании морфологии мицелия гриба лучше пользоваться желатиной с мальц-экстрактом и пептоном. При изучении строения и окраски колоний, расположения и строения спорангиев рекомендуется использовать в качестве питательных сред рис и картофель, но для видов грибов родов *Zygorhynchus*, *Chaetocladium* и отчасти *Thamnidium* лучше всего употреб-лять желатиновые или агаровые среды. Что касается видов р. *Pilobolus*, то их хорошо определять и изучать

на стерилизованном конском помете или на среде с навозной вытяжкой. Последняя среда благоприятна и для роста других родов мукоровых грибов. Приготавливается навозная вытяжка следующим образом. Берется свежий конский помет в количестве 100 г и размешивается в 1 л водопроводной воды. Смесь кипятится или настаивается, после чего вначале фильтруется через марлю, а затем через обычный фильтр. Иногда после фильтрации через марлю производят осаждение муты яичным белком. Полученную жидкость подкисляют и стерилизуют в автоклаве под давлением при 115—120°.

Среда из риса

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

МЕТОДЫ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЧВЕННЫХ ГРИБОВ

Чтобы определить род и вид почвенного микромицета, необходимо провести детальное микроскопическое изучение морфолого-культуральных признаков его строения в процессе роста и в особенности в период формирования органов репродуктивного размножения.

Как известно, строение конидиального аппарата у видов грибов пор. *Moniliales* (*Hyphomycetales*) имеет основное значение для их систематики. Высокая дифференцированность конидиеносца и его ветвей у этих грибов значительно затрудняет их микроскопическое исследование. Следует учесть, что конидиеносцы весьма хрупки и легко повреждаются при изготовлении препаратов для микрофотографирования.

Наиболее обычный и широко применяемый метод исследования микроскопических препаратов — это так называемый метод «раздавленной» капли, при котором небольшую каплю водопроводной воды наносят на предметное стекло, затем на кончике препаровальной иглы вносят в нее небольшое количество материала, взятого

из культуры гриба; препарат сверху прикрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом. Этот метод, несмотря на его широкое применение в микологических исследованиях, все же не позволяет подробно рассмотреть все детали строения конидиеносного аппарата. Как правило, в этих препаратах наблюдаются в огромном количестве конидиальные споры, мелкие обрывки конидиеносцев и мицелия, заполняющие подчас все поле зрения микроскопа. Лишь изредка, случайно, на этом фоне удастся заметить единичные неповрежденные конидиеносцы.

Для распознавания почвенного микроскопического гриба исследования одного или двух конидиеносцев в препарате крайне недостаточно, ибо полученные при этом данные весьма скудны, чтобы изучаемый штамм гриба можно было с уверенностью отнести к тому или иному роду и виду. Различные индивидуальные отклонения в пределах одного или двух случайно сохраненных в препарате конидиеносцев могут быть такими, что из-за них очень легко ошибочно отнести исследуемую форму гриба к чуждому ей виду, а иногда даже и роду.

А. Флеминг и Дж. Смит (Fleming a. Smith, 1944), изучавшие виды грибов р. *Penicillium*, разработали специальную методику для их микроскопического исследования. Ими был предложен своеобразный способ изготовления препаратов: небольшой кусочек стерилизованной тонкой вязкой пленки, верхняя поверхность которой инокулировалась в отдельных точках исследуемым видом гриба, помещался в чашку Петри на питательный агар. Жидкая часть питательного агара легко проникала в пленку и обеспечивала на поверхности ее нормальное развитие гриба. После образования колонии гриба на пленке последняя снималась с агара и укладывалась на предметное стекло для микроскопирования. Авторы рекомендуют согнуть пленку посередине выросшей колонии, так как на линии сгиба торчащие отдельные конидиеносцы будут отчетливо выделяться из общей массы колонии. Другие исследователи предлагали для микроскопирования кистевидной плесени пользоваться предметными стеклами с нанесенным на одну из поверхностей тонким слоем питательного агара, который предварительно инокулировался грибом. Колонии по мере разрастания на стеклах подвергались детальному микроскопированию.

Совершенно иной способ предложил А. Т. Генрици (Henrici, 1930). Он использовал для этого предметное стекло с углублением, которое наполовину заполнял расплавленным питательным агаром. Застывший в углублении (луночке) агар в одной точке инокулировался грибом, а затем углубление сверху закрывалось покровным стеклом. Гриб разрастался в пространстве между слоем агара и нижней поверхностью покровного стекла и подвергался микроскопированию как при малом, так и при большом увеличении.

Для изучения сапрофитных микромицетов также пользуются двумя методами их выращивания: под покровным стеклом и в кольцах Ван-Тигема, имеющих диаметр 10—12 мм внутри и 7 мм высоты. В первом случае на стерильное покровное стекло наносится капля расплавленной агаризованной питательной среды (например, Чапек-агар), в нее вносятся иглой споры или мицелий исследуемого гриба. Покровное стекло прикрепляется к предметному по углам кусочками расплавленного парафина с таким расчетом, чтобы между стеклами оставалось расстояние 1—1.5 мм. Во втором случае на предметном стекле при помощи расплавленного парафина укрепляются кольца Ван-Тигема, сверху на них накладываются покровные стекла, на нижней стороне которых нанесены капли агара. Иглой в капли агара вносятся споры гриба. Покровные стекла прикрепляются к кольцам вазелином. Второй метод менее удобен, чем первый, так как рост гриба идет в основном в глубь кольца, в результате чего трудно рассмотреть под микроскопом все детали строения конидиеносного аппарата. Во избежание быстрого подсыхания агара препараты помещают во влажную камеру.

Метод «живых препаратов» был применен Н. М. Пидопличко и В. И. Билай (1938) при изучении спорообразования у грибов рода *Cladosporium*.

Они рекомендуют прокалить одну из поверхностей чистого предметного стекла над пламенем спиртовой горелки и положить его в горизонтальном положении прокаленной стороной вниз на какую-либо подставку так, чтобы стекло опиралось на нее лишь краями. Затем на прокаленную сторону стекла наносят снизу стерильной платиновой петлей небольшую массу расплавленной питательной агаровой среды. На прикрепленную к стеклу

агаровую среду вносят мицелий и споры гриба. Затем снизу прижимают стерильное покровное стекло к предметному, расплющивая при этом агар в тонкий слой. Покровное стекло должно лежать на предметном так, чтобы одной стороной оно вплотную прикасалось к предметному стеклу и было расположено по отношению к нему под углом 10—15°. Для уменьшения возможности загрязнения культуры иногда целесообразно залить три смежные стороны покровного стекла расплавленным парафином, кроме его четвертой стороны, наиболее удаленной от поверхности предметного стекла. Во избежание подсыхания среды препарат ставят во влажную камеру с таким расчетом, чтобы наиболее открытая сторона культуры была направлена вниз, а вершина угла, образуемая покровным и предметным стеклами, — вверх.

Выращивание гриба на предметном стекле производится в термостате или при комнатной температуре. Наблюдения под микроскопом можно проводить многократно, но в периоды между наблюдениями препарат нужно хранить во влажной камере.

В своем пособии по определению грибов из рода *Aspergillus* и *Penicillium* Л. И. Курсанов (1947) предложил методику микроскопического исследования этих плесеней, которое он разделяет на два основных этапа. На первом этапе выросшие и достигшие обильного конидиального спорообразования колонии плесневых грибов подвергаются микроскопированию на месте роста в открытых чашках Петри (колонии изучаются при средних увеличениях в 200—300 раз; при таком увеличении удается рассмотреть общее сложение кисточек, расположение конидиеносцев, наличие воздушного мицелия и т. д.). Второй этап заключается в изготовлении обычных препаратов на предметных стеклах. Автор отмечает, что при изготовлении препаратов нужно по возможности не нарушать расположения частей колонии, для чего следует снять с агара целую молодую колонию гриба, небольшую по величине (какая иногда бывает в результате самосева), поместить в каплю воды и накрыть покровным стеклом. В иных случаях рекомендуется вырезать радикальные ломтики из взрослой крупной колонии плесени и рассматривать их сбоку. Изготовленные таким способом препараты исследуются при сильных увеличениях. Изу-

чаются детали строения и характер ветвления конидиеносцев, форма, размеры и структура спор и т. д.

При экспериментальных исследованиях по изучению морфологии грибов из родов *Penicillium* и *Aspergillus* М. А. Литвинов и Н. Н. Стрыгин (1948) пришли к выводу, что ни один из изложенных способов микрофотографирования микромицетов не достигает своей цели без соответствующей обработки исследуемого материала. Авторами был предложен следующий метод микроскопического исследования грибов.

В чашку Петри очень тонким слоем разливается расплавленный агар (Чапек-агар, сусло-агар и т. п.), так что после застывания агара на чашке заметна лишь тонкая агаровая пленка. На поверхность застывшего агара в различные места препаровальной иглой вносят споры гриба. Культуру в чашке Петри на несколько суток помещают в термостат при температуре 24—26°. Если замечается подсыхание тонкого слоя агара, то в чашку кладут небольшой кусочек стерильной фильтровальной бумаги, смоченной стерильной дистиллированной водой. Обычно на 3—4-е сутки колония гриба хорошо разрастается с достаточным образованием конидиального спороношения. С этого момента следует приступить к исследованию колонии гриба. Чашку Петри раскрывают и нижнюю крышку со слоем агара исследуют под микроскопом. Вначале колонию рассматривают при малом увеличении безо всякой обработки (микроскоп МБ-9, объектив 8×, окуляр 10× или 15×). При этом увеличении удастся выяснить расположение конидиеносцев: одиночных или сближенных в пучки, места их отхождения от субстратного или воздушного мицелия, характер расположения конидий — в виде расходящихся цепочек или склеенных в колонку.¹ Общую картину строения гриба удастся лучше рассмотреть, если использовать бинокулярную лупу Цейса или отечественный стереоскопический бинокулярный микроскоп марки МШ. Последний при объективе 12× и окуляре 15× дает увеличение в 180 раз, т. е. в полтора раза больше, чем малое увеличение микроскопа МБ-9. Стереоскопический микроскоп МШ, приспособленный для исследования объектов, имеющих протяжен-

¹ Культуральные признаки гриба изучаются на колониях, выросших на обычном слое питательного агара.

ность в глубину, в этом случае является особенно удобным.

Однако при изучении строения конидиеносного аппарата недостаточно исследовать его только при малом увеличении. Необходимо изготовить препараты, пригодные для микроскопирования при больших увеличениях. Для этого рекомендуется использовать те же колонии грибов, которые ранее рассматривались при малом увеличении. Колонии перед исследованием при увеличениях в 400—600 раз необходимо предварительно обработать 70° спиртом. При таком разведении спирт меньше деформирует объект по сравнению с более концентрированным и в то же время вполне достаточно, чтобы в колонию после обработки легко проникала вода. Последняя не обладает достаточно низким поверхностным натяжением, чтобы самостоятельно вытеснить воздух из капиллярных пространств, образованных густым сплетением конидиеносцев и мицелия, прикрытых сверху плотным слоем конидий. Только спирт способен проникнуть через эту корку из конидий в узкие межмицелиальные пространства.

Кроме 70° спирта, можно было бы использовать абсолютный спирт, почти не вызывающий заметной деформации объекта, но последующее применение воды или водного раствора уксуса, которого нельзя избежать при дальнейшей обработке колоний, приведет к серьезным и непоправимым изменениям в конидиальном аппарате гриба. Употребление 95° спирта наиболее опасно, так как может вызвать глубокую деформацию объекта. Учитывая это, следует применять 70° спирт (этиловый), как наименее изменяющий исследуемые формы гриба. Использование спирта должно быть очень кратковременным. Рекомендуется вслед за спиртом сейчас же нанести несколько капель крепкой уксусной кислоты, которая в таких условиях прекрасно проникает в глубь колонии.

Как известно, уксусная кислота почти не деформирует объект, однако применение ее без предварительной обработки колонии спиртом часто не приводит к нужным результатам: она значительно хуже, чем спирт, проникает в глубь колонии гриба, в особенности если последняя на агаре обильно разрослась. Уксусная кислота, употребляемая в чистом виде, без предварительной обработки

колоний гриба спиртом, не освобождает спороносящие веточки конидиеносного аппарата гриба от масс конидий, облипающих его со всех сторон. Спирт, очищая спороносящий конидиеносец от излишних спор, делает его доступным для микроскопического исследования.

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

Некоторые исследователи рекомендуют рассматривать препараты, изготовленные из живых культур грибов, в молочной кислоте или в смеси ее с другими веществами (лактофенол Аммана, хлор-лактофенол и т. п.). Использование для этих целей молочной кислоты все же не дало удовлетворительных результатов. Молочная кислота весьма пригодна для изучения сухого гербарного материала. Насколько хороша молочная кислота и ее смеси при обработке плотных и малопрозрачных гербарных объектов, настолько она не пригодна при исследовании живых культур грибов. Если же возникает необходимость изготовить постоянные препараты, то в этом

случае следует применять смеси типа лактофенола Аммана.¹

Для изготовления демонстрационных препаратов рекомендуется применять окраску грибов. Лучше всего употреблять 0.1—0.2%-й водный раствор генцианвиолета. Колония, промытая водой и обработанная слабым раствором уксусной кислоты, окрашивается 2—3 каплями этой краски. В препаратах наблюдается хорошо окрашенные конидиеносцы грибов.

Для прижизненной (витальной) окраски микромицетов может быть применен ряд основных красок (генцианвиолет, метиленблау, сафранин, нейтральрот, метилвиолет) и кислых красок (эритрозин, оранж-д и др.), однако концентрация их в растворе в этом случае должна быть в среднем от 1:1000 до 1:10 000 и иногда, как исключение, 1:500. Дальнейшее повышение концентрации краски может повести к гибели гриба, особенно в тех случаях, когда вместо водных растворов красок в качестве их растворителей употребляют молочную кислоту, спирт-глицерин и другие органические соединения.

Быстро распадающиеся цепочки спор у грибов пор. *Moniliales* и быстро растворяющиеся оболочки спорангиев у грибов пор. *Mucorales* затрудняют их микроскопическое исследование. Этих недостатков в значительной степени лишены препараты, в которых вместо воды применяется смесь из спирта, глицерина и воды, взятых в равных объемах. В этой смеси цепочки спор распадаются медленнее, чем в воде, и изготовленные с этой смесью препараты могут храниться в течение нескольких недель (Пидопличко, 1953).

Можно изготовить препараты, сохраняющиеся в течение многих месяцев, на глицерин-желатине.

Желатина	1	вес. ч.
Глицерин (чистый)	7	вес. ч.
Вода	6	вес. ч.
Тимол или фенол	0.5—1.0	%

После нагревания глицерин-желатина образует однородную массу и может продолжительно храниться в за-

¹ Состав лактофенола Аммана: молочная кислота — 1 часть, фенол — 1 часть, глицерин — 2 части, вода дистиллированная — 1 часть.

крытой посуде. Перед употреблением глицерин-желатина разжижается нагреванием, и капля ее наносится на предметное стекло. В эту каплю вносится во влажном виде исследуемый материал (гриб), который плотно прикрывается покровным стеклом при слабом подогреве, и после остывания препарат изучается под микроскопом (Пидопличко, 1953).

МЕТОДИКА ВЫДЕЛЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ, ОБИТАЮЩИХ В РИЗОСФЕРНОЙ, ПРИКОРНЕВОЙ И КОРНЕВОЙ ЗОНАХ РАСТЕНИЙ

Многочисленные наблюдения показали, что естественные синусии бактерий, актиномицетов и микроскопических грибов в почве корневой сферы растений резко отличаются от таковых во внекорневой почве. Количественные различия почвенных микроскопических грибов в корневой сфере и вне ее обычно усиливаются по мере углубления корневой системы растения в нижележащие почвенные горизонты и выявляются главным образом в изменении соотношения числа родов грибов. Большинство проведенных исследований, касающихся расселения микроорганизмов и в том числе микромицетов в корневой почве растений, показало, что наибольшее скопление их наблюдается в тонком слое почвы, непосредственно прилегающем к поверхности корней. В слое почвы, расположенном несколько далек от поверхности корней, на расстоянии примерно до 1 см, количество грибных микроорганизмов меньше, чем в слое почвы, непосредственно облегающем корни.

При анализе микромикрофлоры корневой системы растений необходимо иметь в виду, что вокруг корней имеется несколько зон, различающихся по количеству и качеству населяющих их микроскопических грибов. Различаются три зоны расположения микроорганизмов в корневой системе растений:

1) корневая — микроорганизмы этой зоны обитают непосредственно на поверхности и внутри тканей корней (так называемая корневая микрофлора);

2) прикорневая — микроорганизмы этой зоны заселяют тонкий слой почвы в 1—2 мм, плотно примыка-

ющий к поверхности корней (так называемая почвенная прикорневая микрофлора);

3) ризосферная — микроорганизмы этой зоны развиваются в слое почвы, расположенном за предыдущим слоем почвы на расстоянии до 1 см от поверхности корней (так называемая почвенная ризосферная микрофлора).

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

Для выделения микромицетов почвенно-ризосферной микрофлоры (3-я зона) обычно пользуются двумя методами. При первом методе грибы изолируются из слоя почвы, опавшей при тщательном встряхивании пучка мелких корней, предварительно освобожденных от прилипших к ним крупных уплотненных комочков почвы; при втором методе грибы выделяют из почвы, смытой стерильной водой с поверхности мелких корней. Во втором случае с корней смывается как ризосферный слой, так и частично прикорневой слой почвы, поэтому состав микроскопических грибов будет смешанный, т. е. ризосферно-прикорневой. По нашему мнению, для выделения ризосферной грибной флоры следует пользоваться первым методом. Опавшая с мелких корней при их встряхивании почва представляет собой основной фонд почвы для анализа ризосферной микрофлоры 3-й зоны.

Если внимательно под лупой рассмотреть корни после их встряхивания, то можно легко убедиться, что остается достаточно заметный тонкий слой почвы, крепко прилипший к корням и обычно непадающий при их встряхи-

вании. Он представляет собой основной фонд почвы для выделения грибов прикорневой (2-й) зоны. Для отделения этого слоя почвы необходимо корни тщательно обмыть стерильной водой.

Однако трудно провести резкое разграничение между ризосферным и прикорневым слоями. Поэтому почва первого смыва с корней будет состоять из почвы прикорневого слоя и частично из почвы остаточно-ризосферной. Учитывая это обстоятельство, мы предлагаем рассматривать микофлору, выделенную из почвы первого смыва корней, как своеобразную ризосферно-прикорневую группировку грибов. Грибы, выделенные из почв всех последующих смывов корней, составляют исключительно микофлору 2-й зоны корневой системы, т. е. прикорневую микофлору. Последовательные смывы корней рекомендуется проводить 10—12 раз, иногда более.

Таким образом, для микологического анализа прикорневой зоны растения используется почва, примыкающая тонким слоем непосредственно к корням и отделяемая от них только путем смыва водой, а для анализа ризосферной зоны — почва, расположенная от поверхности корней в пределах до 1 см и легко отделяемая от корней путем обычного встряхивания.

Для выделения микроскопических грибов из почв ризосферной и прикорневой зон растений необходимо корни растений осторожно извлечь из почвенных монолитов. Обнаженные корневые ответвления, предварительно освобожденные от приставших к ним крупных уплотненных комочков почвы, но с прилипшей к их поверхности почвой в виде мелких частичек, отрезают стерильными ножницами или отрывают пинцетом. Корневые отрезки затем тщательно встряхивают для отделения от них слоя ризосферной почвы. Из этой опавшей с корней почвы берут две равные навески. Одну часть первой навески почвы непосредственно высевают на питательные среды, а из другой части готовят водные почвенные суспензии разных разведений, которые затем также высевают на жидкие и твердые питательные среды для культивирования микроскопических грибов. Вторую навеску ризосферной почвы доводят до постоянного сухого состояния и из расчета на 1 г абсолютно сухой почвы производят количественный расчет микроскопических грибов, выросших на искусственных питательных средах.

Для определения веса прикорневой почвы, смытой с поверхности корней, поступают следующим образом. Почвенный водный смыв с поверхности корней, взятый в определенном объеме, фильтруется через заранее высушенный до постоянного веса и точно взвешенный фильтр. Разница в весе между первоначально высушенным фильтром и вторично высушенным фильтром после фильтрации через него смыва будет указывать на вес сухой почвы, осевшей на фильтр. По отношению к весу абсолютно сухой почвы, смытой с корней, проводится подсчет колоний грибов, выросших при посеве водных смывов на сусло-агар, Чапек-агар или водный агар.

Для анализа корневой микрофлоры (1-я зона корневой системы) доставленные в лабораторию почвенные монолиты с растениями ставят в таз с обычной кипяченой водой на 30—60 мин. После размягчения почвы корни осторожно извлекают из всей массы, затем освобождают от приставших к ним заметных крупных частичек почвы и отрезают стерильными ножницами (прокаленными на спиртовке и остуженными). Отрезанные корни помещают в колбочку, содержащую 100 мл стерилизованной водопроводной воды. Корни тщательно промывают и вновь извлекают из колбы для дальнейшей очистки от мелких комочков почвы и всех посторонних механических примесей (мертвых растительных остатков, посторонних корней и т. д.). Затем корни повторно до 4—5 раз и более обмывают стерильной водой. После того как с корней стечет вода, их разрезают ножницами на небольшие отрезки 3—4 см длины. Для анализа можно брать все корни, за исключением стержневого, который не подвергается исследованию. Корневые отрезки просушиваются между 2 листами стерильной фильтровальной бумаги, взвешиваются и быстро, в течение 20—30 сек., растираются в стерильной фарфоровой ступке со стерильным кварцевым песком. Обычно из нарезанных корней берут навеску в 1 г (для бобовых растений лучше брать навеску в 5 г). Растертые корни переносят в колбу со 100 мл стерилизованной водопроводной воды, предварительно отливая несколько кубиков воды для обмывания пестика и ступки после освобождения от растертых корней. Воду после обмывания пестика и ступки сливают обратно в колбу, затем эту колбу встряхивают в течение 5—7 мин. После 30-секундного отстаивания из нее берут пипеткой

жидкость, которую после соответствующего разведения высевают на жидкие питательные микробиологические среды по 6 пробирок на каждую взятую среду (три разведения по две пробирки на каждое) и на твердые питательные среды по 4 чашки Петри (два разведения в двухкратной повторности). Обычно для посева на твердые среды берут жидкость третьего и четвертого разведений. Для определения сухого веса корней, взятых для анализа, делают вторую навеску корней, отмытых от почвы, которую высушивают до постоянного веса.

Для контроля необходимо подвергнуть микологическому анализу почву, взятую вблизи изучаемого растения, но вне его корней.

Часто бывает трудно получить действительно контрольную, лишённую корней пробу почвы. Даже при самом тщательном выборе места для контроля в почвенных образцах могут быть мельчайшие корешки. Следовательно, контроль является в известной мере условным. Однако брать контрольную пробу почвы вдали от исследуемого растения нельзя, так как возможно, что этот образец почвы по своим физико-химическим особенностям будет резко отличаться от почвы корневой системы растения.

Почву для микологического анализа рекомендуется брать в поверхностных слоях (от 5 до 20 см), т. е. в зоне наибольшего распространения микроорганизмов. В отдельных случаях, в зависимости от характера развития корневой системы растения, можно брать почву и на глубине 20—35 см.

При исследовании микроскопических грибов корневой системы растения вначале учитывается общее количество грибов, т. е. количество всех выросших форм грибных колоний при высеве почвенной болтушки на различные искусственные питательные среды. Затем производится учет родов грибов. Наконец, исследуется видовой состав грибов. Прослеживаются изменения, наступающие в составе ризосферных, прикорневых и корневых сообществ микроскопических грибов в зависимости от фазы развития изучаемого растения.

Тщательное изучение видового состава грибов необходимо для выяснения специфичности ризосферной и прикорневой почвенной микомикрофлоры различных растений, которая выражается в первую очередь в количест-

венном превосходстве одного или нескольких родов и групп видов грибов, не встречающихся в таких количествах и соотношениях в контрольной внекорневой почве, и в выявлении доминантных видов в данной синузии. Кроме того, важно установить влияние исследуемого растения на формирование качественного состава ризосферной и прикорневой микрофлоры, а также проследить изменения комплексов ризосферной и прикорневой микрофлоры изучаемого растения в условиях обитания его в различных естественных растительных ассоциациях.

При изучении микроскопических грибов различных почв в первую очередь следует отметить приуроченность отдельных видов или групп видов грибов к различным географическим и климатическим зонам, характеризовать микрофлору почв, занятых естественной растительностью, в зависимости от типа почвы, состава растительного ценоза, сезона года и т. д. Исследователю необходимо фиксировать факты географической и экологической изменчивости в пределах вида. Следует также проследить образование местных географических вариантов и экотипов грибов, особенно тех форм, которые по характеру и степени изменений выходят за пределы обычной видовой изменчивости.

МЕТОДИКА САМЦЕВИЧА

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

бумагой и взвешивают. По разнице в весе почвы ризосферы с корешками до отмывания и в весе корешков после отмывания узнают вес почвы ризосферы, взятой для анализа. Взвешенные отмытые корешки стерильно переносят в колбочку с 100 мл стерильной воды, куда для лучшего отмывания микроорганизмов добавляют 10 г стерильного кварцевого песка. Отмывание и посев производятся так же, как и при анализе ризосферы.

Образцы контрольной почвы (вне ризосферы) берутся из середины комочков, в которых совершенно отсутствуют корешки.

ОКРАСКА ПРЕПАРАТОВ ПОЧВЕННЫХ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

ОКРАСКА ПРЕПАРАТОВ ЖИВЫХ ГРИБОВ

При микроскопическом исследовании грибов, особенно форм, не имеющих темной окраски мицелия и спор, весьма желательно окрашивать их соответствующими красками.

При приготовлении окрашенных препаратов можно произвести витальную окраску без нарушения жизнеспособности исследуемых грибов. Для этой цели может быть применен ряд красок: из основных — генцианвиолет, метиленблау, сафранин, нейтральрот, анилиблау, метилвиолет и др.; из кислых красок — эритрозин, оранж-д и др. Концентрация краски не должна превышать 0.001—0.005 %.

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

ОКРАСКА ПРЕПАРАТОВ УБИТЫХ (ФИКСИРОВАННЫХ) ГРИБОВ

Фиксация препарата преследует цели: а) убить организм, б) обеспечить его надежное прилипание к предметному стеклу, в) сделать мазок из тканей гриба более восприимчивым к окраске. Для фиксации используют физические и химические средства. При применении

физических средств обычно высушенный на воздухе препарат несколько раз проводится над пламенем спиртовки. Однако для детального микроскопического рассмотрения строения грибной клетки фиксация препарата путем нагревания не годится, и для этого применяют химические средства.

При применении химических средств препарат обычно обрабатывают следующими веществами: 1) этиловым спиртом (96°) в течение 5—20 мин.; 2) смесью этилового спирта и эфира в равных объемах (жидкость Никифорова) до испарения; 3) метиловым спиртом в течение 5 мин. (погружением препарата в спирт); 4) спиртформолом (смесь этилового спирта — 95 мл и формалина — 5 мл) в течение 5—10 мин.; 5) жидкостью Карнуа (смесь этилового спирта — 60 мл, хлороформа — 30 мл, ледяной уксусной кислоты — 10 мл) в течение 15 мин.; 6) парами осмиевой кислоты. Фиксация этой кислотой достигается очень быстро и производится следующим образом. В чашку Петри помещают часовое стеклышко со стеклянной ватой. На вату наливают небольшое количество 1—2%-го раствора осмиевой кислоты; сверху на часовое стеклышко накладывают предметное стекло влажным мазком вниз и чашку Петри закрывают. Через 1—2 мин. препарат вынимают и высушивают.

Фиксированный препарат покрывают раствором какого-либо красителя. Для получения более чистых препаратов краситель наливается на фильтровальную бумагу, покрывающую поверхность препарата. Для лучшего окрашивания рекомендуется при нанесении красителя препарат слегка подогреть до легкого выделения пара. Краситель держится на стекле до 2—3 мин. (метиленовая синь не более 0.5 мин.), после этого его сливают, а мазок промывают легкой струей воды и высушивают (можно подсушить посредством фильтровальной бумаги).

После указанной процедуры препарат исследуется под малым и большим увеличениями.

Метиловый фиолетовый (метилвиолет)

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

2) 10 мл насыщенного спиртового раствора краски в 20 мл дистиллированной воды и добавляется 2.5 мл уксусной кислоты.

Генциановый фиолетовый (генцианвиолет)

Неочищенный препарат метилового фиолетового, употребляется в тех же растворах.

Нейтральный красный (нейтральрот)

Употребляется в виде 1—1.5%-го водного раствора. Перед употреблением фильтруется. Раствор непрочен.

Прим. Дистиллированная вода добавляется в кипящем виде.

Люголевский раствор

Состоит из 1 г иода, 2 г иодистого калия и 300 мл воды. Сначала растворяют 2 г иодистого калия в 5 мл воды, затем добавляют 1 г иода. Объем доводят водой до 300 мл.

Эритрозин карболовый

Состоит из 100 мл дистиллированной воды, 5 г карболовой кислоты (фенол) и 1—5 г эритрозина. После растворения карболовой кислоты и эритрозина жидкости дают отстояться и после этого используют для окраски препаратов.

Метиленовая синь (метиленблау)

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

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

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

Фуксин

1) Фуксин — основной насыщенный спиртовой раствор: 10 г сухого красителя в 100 мл 96° спирта.

2) Водно-спиртовой раствор фуксина: 10—20 мл насыщенного спиртового раствора в 100 мл воды.

Сафронин

2 г сафронина ссыпают в стеклянную воронку на бумажный фильтр и заливают 100 мл кипящей дистиллированной воды.

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ У ПОЧВЕННЫХ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Метод агаровых блоков. Поверхность питательной агаровой пластинки в чашке Петри засеивается сплошным «газоном» культурой гриба, испытываемого в качестве антагониста. После того как гриб хорошо разовьется (обычно это наступает на 7—8-е сутки роста гриба), стерильным пробочным сверлом (диам. 20—22 мм) вырезают агаровые блоки. Далее с помощью стерильного скальпеля их вынимают из сверла и переносят по одному в центр других стерильных чашек Петри, в каждую из которых затем наливают питательный агар, пригодный для развития тест-организмов. Заливку чашек Петри агаром, предназначенным для тест-организмов, производят так, чтобы блок агара с испытываемой грибной культурой возвышался на 1—1.5 мм над поверхностью агара.

В течение 2—3 суток агар в чашках Петри не засеивается тест-организмом. Этот срок необходим для того, чтобы антибиотическое вещество, продуцируемое грибной культурой, успело продиффундировать в агар, прежде чем на нем разрастется тест-организм. По истечении этого срока на питательный агар по радиусам от самого края блока в сторону края чашки Петри производят посев тест-организма. После посева чашки Петри инкубируют в термостате при температуре, благоприятной для роста тест-организма. По зонам отсутствия роста тест-организма на агаровой пластинке можно судить об антибиотической эффективности исследуемой культуры гриба.

Агаровые блоки с грибной культурой также можно перенести непосредственно на поверхность другой агаровой пластинки, предварительно засеянной тест-организмом. После инкубации в термостате (время инкубации зависит от развития тест-организма) вокруг агаровых блоков образуется зона отсутствия роста тест-организма.

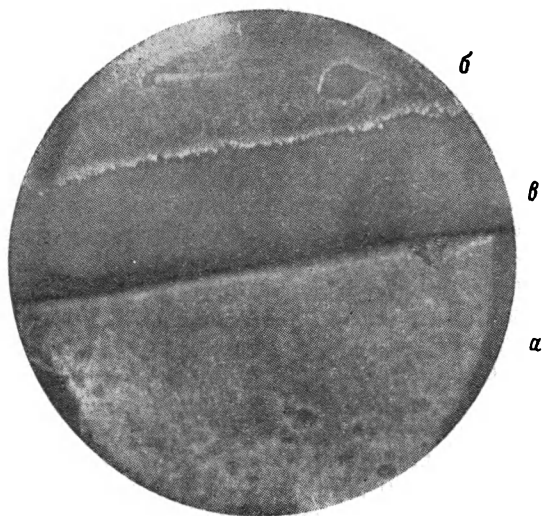


Рис. 6. Испытание гриба-антагониста на антибиотические свойства.

а — гриб-антагонист, *б* — тест-культура, *в* — зона отсутствия роста тест-культуры.

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

организме, развитие которого начинается далее всего от штриха роста гриба.

Метод М. А. Литвинова (Литвинов, Стрыгин, 1948). Чашку Петри разделяют перегородкой на две части. В одну половину наливают 8—10 мл питательного агара (сусла-агара или Чапек-агара), пригодного для развития почвенного микроскопического гриба, испытуемого в качестве антагониста. Культуру гриба вносят перед заливкой агара или после заливки в чашки Петри. Чашки помещают в термостат при температуре 25—27°, обычно являющейся оптимальной для роста многих почвенных грибов (температуру выбирают в зависимости от вида гриба), на 7—8 суток. После того как гриб разовьется достаточно хорошо, перегородку удаляют и вторую половину чашки Петри заполняют агаром, пригодным для развития тест-организма. Чашку оставляют на 18—20 час., с тем чтобы антибиотическое вещество, синтезируемое грибом-антагонистом, из одной половины пластинки агара проникло в другую половину. Только после этого срока питательный агар второй половины чашки Петри засеивается тест-организмом. Затем чашку инкубируют в термостате при температуре, пригодной для роста тест-организма. По образовавшейся зоне отсутствия роста тест-организма судят об антибиотических свойствах испытуемого гриба (рис. 6).

Для определения антибиотической активности грибов Н. С. Егоров предложил упрощенную модификацию метода М. А. Литвинова. Усовершенствование состоит в том, что опыт ставится без применения стеклянной перегородки.

При этой методике в чашку сразу вливается питательный агар в количестве 20 мл, благоприятный для развития гриба-антагониста. Через определенный срок роста гриба, обычно на 7—8-е сутки, половину агаровой пластинки с выросшим на ней грибом удаляют. Свободную часть чашки заливают 10 мл агаровой среды, оптимальной для развития тест-организма. Чашку оставляют на 18—20 час., после чего вторую половину засеивают тест-организмом. Через сутки устанавливают антибиотическую активность испытуемого почвенного гриба.

ЛИТЕРАТУРА

- Аристовская Т. В. Методы исследования микрофлоры почв. В кн.: Полевая геоботаника, 1. Изд. АН СССР, М.—Л., 1959.
- Аристовская Т. В., М. Е. Владимирская, М. М. Голлербах, Г. А. Катанская, П. Н. Кашкин, С. Е. Клупт, Л. К. Лозина-Лозинский, С. П. Норкина, В. М. Румянцева, Г. Л. Селибер, И. С. Скалон, А. М. Скородумова, Ф. В. Хетагурова и В. Я. Частухин. Большой практикум по микробиологии. Изд. «Высшая школа», М., 1962.
- Асеева И. В., И. П. Бабьева, Д. Г. Звягинцев, Т. Г. Мирчинк, Ю. А. Худякова. Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов. Под ред. Н. А. Красильникова. Изд. МГУ, 1966.
- Билай В. И. Фузарии (биология и систематика). Киев, 1955.
- Воробьев С. А. и М. Г. Аваев. Лабораторно-практические занятия по почвоведению и земледелию. Сельхозгиз, М., 1961.
- Дудка І. О. Огляд методів дослідження водних грибів. Укр. ботанічн. журн., 18, 6, 1961.
- Захарченко А. Ф. Результаты сравнительных анализов приготовления почвенной болтушки без смены и со сменой стерильных пипеток. Изв. АН ТаджССР, Отд. естеств. наук, 12, 1955.
- Звягинцев Д. Г. Изучение почвы как компонента биогеоценоза. В кн.: Программа и методы биогеоценологических исследований. Изд. «Наука», М., 1966.
- Иерусалимский Н. Д. Азотное и витаминное питание микробов. Изд. АН СССР, М., 1949.
- Имшенецкий А. А. Микробиология целлюлозы. Изд. АН СССР, М., 1953.
- Камышко О. П. Почвенные микроскопические грибы Ленинградской области. Автореф. канд. дисс., Л., 1954.
- Красильников Н. А. Очаговое распространение микроорганизмов в почве. Изв. АН СССР, сер. биол., 1, 1936.
- Крючкова А. П. К изучению экологической изменчивости микроорганизмов в связи с агрономической диагностикой. Микробиология, 3, 2, 1934.
- Курсанов Л. И. Микология. Учпедгиз, М., 1940.
- Курсанов Л. И. Пособие по определению грибов из рода *Aspergillus* и *Penicillium*. Медгиз, М., 1947.
- Лани-Поздеева И. П. Новый метод изучения микроорганиз-

- мов непосредственно в почвенных условиях. Микробиология, 16, 2, 1937.
- Ластинг В. Р. и Д. Б. Гурфель. К методике количественного учета грибов в почве. Микробиология, 25, 5, 1956.
- Литвинов М. А. и Н. Н. Стрыгин. О методике микроскопирования кистевидной плесени. Природа, 9, 1948.
- Литвинов М. А. Определитель микроскопических почвенных грибов. Изд. «Наука», М., 1967.
- Методики микробиологических исследований почвы и корневой системы растений, принятые на пленуме. Сб. тр. расширенного пленума секции удобрений, Сельхозгиз, М., 1953.
- Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов. Изд. МГУ, 1966.
- Милько А. А. Таксономия и синонимы *Mucorales*. Микология и фитопатология, 1, 1, 1967.
- Мирчик Т. Г. В кн.: Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов. Изд. МГУ, 1966.
- Мишустин Е. Н., О. И. Пушкинская и З. Ф. Теплякова. Эколого-географическое распространение микроскопических почвенных грибов. Тр. Инст. почв АН КазССР, 12, 1961.
- Наумов Н. А. О нахождении в природе и способах выделения в чистую культуру плесневых грибов из порядка *Mucorales*. Матер. по микологии и фитопатологии, 1, 1927, Л.
- Наумов Н. А. Методы микроскопических исследований в фитопатологии. Сельхозгиз, Л., 1932.
- Наумов Н. А. Методы микологических и фитопатологических исследований. Изд. колх. и совх. литерат., М.—Л., 1937.
- Наумов Н. А. Болезни сельскохозяйственных растений. Изд. 2-е. Сельхозгиз, М., 1952.
- Новогрудский Д. М. Влияние размеров почвенных частиц на распределение почвенных микроорганизмов. Микробиология, 16, 2, 1947а.
- Новогрудский Д. М. Определение численности грибов и актиномицетов в почве методом непосредственного высева почвенного мелкозема. Микробиология, 16, 6, 1947б.
- Новогрудский Д. М. Метод исследования микрофлоры отдельных почвенных частиц. Вестник АН КазССР, 11, 1948.
- Новогрудский Д. М. и З. Ф. Теплякова. К биологии сапрофитной целлюлозоразрушающей микохитридии *Rhizophlyctis rosea*. Бюлл. Моск. общ. испыт. природы, Отд. биол., 54, 2, 1949.
- Новогрудский Д. М. Почвенная микробиология. Изд. АН КазССР, Алма-Ата, 1956.
- Омелянский В. Л. Практическое руководство по микробиологии. Изд. АН СССР, М.—Л., 1940.
- Определитель низших растений. Под редакцией Л. И. Курсанова. Т. 3. Изд. «Сов. наука», М., 1954.
- Підоплічка М. М. і В. Деняк (Білай). Матеріали до вивчення роду *Cladosporium* Link. Повідомл. I. Мікробіол. журн. АН УССР, 5, 2, 1938.
- Підоплічка М. М. і В. Деняк (Білай). Матеріали до вивчення роду *Cladosporium* Link. Повідомл. II. Мікробіол. журн. АН УССР, 7, 1, 1941.

- Идодпличко Н. М. Грибная флора грубых кормов. Изд. АН УССР, Киев, 1953.
- Пушкинская О. И. К методике количественного учета микроорганизмов, способных разлагать клетчатку в почве. Микробиология, 23, 1, 1954.
- Разумовская З. Г., Г. Я. Чижик, Б. В. Громов. Лабораторные занятия по почвенной микробиологии. Изд. ЛГУ, 1960.
- Райлло А. И. Грибы рода Фузариум. Сельхозгиз, М., 1950.
- Рихтер А. и А. Вернер. Опыт учета флоры грибов в почвах Нижне-Волжского края. Журн. опытно-агрономии Юго-Востока, 9, 1931.
- Рыбалкина Л. В. и Е. В. Кононенко. Непосредственное наблюдение микофлоры в почве модифицированным методом Холодного. Микробиология, 22, 4, 1953.
- Самцевич С. А. О сезонности и периодичности развития микроорганизмов в почве. Микробиология, 24, 5, 1955.
- Сергеева К. С. Новые виды рода *Chaetomium* и их изменчивость. Бот. матер. Отд. спор. раст., 13, 1960; 14, 1961.
- Сизова Т. П. и Т. П. Супрун. Обзор основных методов почвенной микофлоры. Научн. докл. Высшей школы, 1, 1958.
- Словарь-справочник фитопатолога. Под ред. П. Н. Головина. Изд. «Колос», Л., 1967.
- Теплякова З. Ф. Целлюлозоразрушающие грибы почв Казахстана. Изв. АН КазССР, сер. почв., 5, 1949.
- Федоров М. В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Сельхозгиз, М., 1957.
- (Холодный Н. Г.) Choldny N. G. Ueber eine neue Methode zur Untersuchung der Bodenmikroflora. Arch. Mikrobiol., 1, 1930.
- Холодный Н. Г. Почвенная камера как метод исследования почвенной микофлоры. Микробиология, 2, 4, 1933.
- Холодный Н. Г. Методы непосредственного наблюдения почвенной микофлоры. Микробиология, 4, 2, 1935.
- Холодный Н. Г. Исследование микофлоры почвы. Микробиология, 5, 2, 1936.
- Холодный Н. Г. Как наблюдать жизнь микроорганизмов почвы. Из серии «Среди природы и в лаборатории». Изд. МОИП, 1949.
- Частухин В. Я. Экологический анализ распада растительных остатков в еловых лесах. Почвоведение, 2, 1945.
- Черемисинов Н. А., Л. И. Боева и О. А. Семихатова. Практикум по микробиологии. Изд. «Высшая школа», М., 1961.
- Шкляр Т. Н. К вопросу о методах исследования почвенных грибов в полях севооборота. Реф. докл. С.-х. академии им. К. А. Тимирязева, XVII, 1953.
- Ajello L. A cytological and nutritional study of *Polychytrium aggregatum*. Amer. Journ. Bot., 35, 3, 1948.
- Chesters C. G. C. A Method of isolating soil fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc., 24, 3/4, 1940.
- Chesters C. G. C. A contribution to the study of fungi in the soil. Trans. Brit. Mycol. Soc., 31, 1, 1948.

- Chesters C. G. C. a. R. H. Thornton. A comparison of techniques for isolating soil fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 39, 3, 1956.
- Conn H. J. A microscopic method for demonstrating fungi and actinomycetes. *Soil Sci.*, 14, 1922.
- Cooke W. B. a. A. F. Bartsch. Aquatic fungi in some Ohio streams. *Ohio Journ. Sci.*, 60, 3, 1960.
- Couch J. N. Technic for collection, isolation and culture of chytrids. *Journ. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 55, 1, 1939.
- Davey C. B. a. S. A. Wilde. Determination of the numbers of soil microorganisms by the use of molecular membrane filters. *Ecology*, 36, 4, 1955.
- Emerson R. Mycological organization. *Mycologia*, 50, 5, 1958.
- Fleming A. a. G. Smith. Some methods for the study of moulds.
- Gaertner A. Einige physiologische und morphologische Beobachtungen und Kulturen nieder Phycomyceten (*Rhizophidium*, *Phlyctochytrium*). *Arch. Mikrobiol.*, 21, 2, 1954.
- Hagem O. Untersuchungen über norwegische Mucorineen, I. *Vidensk. Selskab. Skrifter.*, I (Math.-Natury klasse), 7, 1907 (1908).
- Harder R. and E. Uebelmesser. Notiz zur Frage des Vorkommens von Chytridinen und anderen Pilzen in tiefen Bodenschichten. *Arch. Mikrob.*, 26, 4, 1957.
- Harder R. and E. Uebelmesser. Über niedrigere Erdphycomyceten Australiens. *Arch. Mikrob.*, 32, 2, 1959.
- Haskins R. H. New chytridiaceous fungi from Cambridge. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 29, 3, 1946.
- Henrici A. T. *Molds Yeasts and Actinomycetes*. . . N. Y., 1930.
- Koch W. J. Two new chytrids in pure culture *Phlyctochytrium punctatum* and *Phlyctochytrium irregulare*. *Journ. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 73, 1, 1957.
- La Touche C. J. Slide-Traps for soil fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 31, 3/4, 1948.
- Martin J. P. Use of acid, Rose bengal and streptomycin in the platemethod for estimating soil fungi. *Soil Sci.*, 69, 3, 1950.
- Marszewska-Ziemińska. The use of a modified Rossi-Cholodny technic for studying the organisms that decompose certain organic compounds in soil. *Zentr. Bact.*, 11, 91, 1935.
- Oudemans C. A., J. A. C. J. Köning. Prodrôme d'une flore mycologique obtenue par la culture sur gelatine préparée de la terre humeuse du Spanderswoud, près de Bussum. *Arch. Néerland Sci. Nat.*, 2 ser., 7, 1902.
- Reinboldt B. Über die Verteilung einiger niederer Phycomyceten in Erdboden. *Arch. Mikrob.*, 16, 2, 1951.
- Ridgway R. Color standards and color nomenclature (53 colored plates, 1113 named colors). Washington, 1912.
- Sewell B. W. F. A slide-trap method for the isolation of soil fungi. *Nature*, 177, 1956.
- Stanier R. J. The cultivation and nutrient requirements of a chytridiaceous fungus, *Rhizophlyctis rosea*. *Journ. Bact.*, 43, 1942.
- Thornton R. N. The screened immersion plate. Method of isolating soil microorganisms. *Research*, 5, 1952.

- Vuillemin P. Matériaux pour une classification rationnelle des
Fungi Imperfecti. C. R. Acad. Sci., Paris, 150, 1910a.
- Vuillemin P. Les conidiophores. Bull. Soc. Sci., Nancy, ser. 3,
XI, 1910b.
- Warcup J. H. The soil-plate method for isolation of fungi soil.
Nature, 166, 1950.
- Warcup J. H. Isolation of fungi from hyphae present in soil.
Nature, 175, 1955.
- Whiffen A. J. Cellulose decomposition by the saprophytic
chytrids. Journ. Elisha Mitchell Sci. Soc., 57, 2, 1941.
- Wollenweber H. W. u. O. A. Reiking. Die Fusarien. Berlin,
1935.
-

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
Введение	3
Основные сведения по классификации грибов	5
<i>Phycomycetes</i> — фикомицеты, или низшие грибы	7
<i>Ascomycetes</i> — аскомицеты, или сумчатые грибы	9
<i>Deuteromycetes (Fungi imperfecti)</i> — несовершенные грибы	10
Общая характеристика пор. <i>Moniliales (Hyphomycetales)</i>	11
Основные культуральные и морфологические признаки, используемые в систематике грибов пор. <i>Moniliales (Hyphomycetales)</i>	13
Некоторые общие сведения о строении почв	16
Отбор образца почвы для микологического анализа	18
Методы выделения микроскопических грибов из почвы	21
Подготовка и проведение посева почвы на искусственные питательные среды для выделения микроскопических грибов	23
Метод определения численности грибов в почве посредством высева почвенного мелкозема на агаризованную воду	31
Метод выделения различных групп почвенных грибов на стерневые отрезки	36
Методы подавления бактерий при совместном их росте с грибами на искусственных питательных средах	37
Методы прямого микроскопического изучения грибов в почве	39
Метод почвенных камер	40
Метод проращивания грибов и других микроорганизмов из почвенной пыли на чистом стекле	41
Метод стекол обрастания	42
Метод стеклянных иммерсионных трубок	46
Метод стекол-ловушек Ля-Туш	48
Метод стекол-ловушек Сьюэлла	48
Получение культуры гриба из одной споры	49
Метод Линднера	50
Метод Линднера-Надсона	51
Классификация питательных сред, употребляемых для культивирования почвенных микроскопических грибов	51

Методы культивирования почвенных микроскопических грибов	55
Почвенные грибы р. <i>Fusarium</i> , их изучение и методы культивирования	77
Основные морфологические и культуральные признаки видов р. <i>Fusarium</i> (по Райлло, 1950)	78
Методика определения вида, подвида и разновидности р. <i>Fusarium</i>	80
Почвенные хитридиевые грибы (<i>Chytridiales</i>) и методы их культивирования	84
Почвенные сумчатые грибы р. <i>Chaetomium</i> и методы их культивирования	89
Почвенные несовершенные грибы пор. <i>Sphaeropsidales</i> и методы их культивирования	91
Почвенные грибы пор. <i>Mucorales</i> и методы их культивирования	92
Методы микроскопического исследования почвенных грибов	95
Методика выделения и изучения микроскопических грибов, обитающих в ризосферной, прикорневой и корневой зонах растений	103
Методика Самцевича	108
Окраска препаратов почвенных микроскопических грибов	109
Окраска препаратов живых грибов	109
Окраска препаратов убитых (фиксированных) грибов	109
Выявление антибиотической активности у почвенных микроскопических грибов	112
Литература	115

Матвей Абрамович Литвинов

**МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ПОЧВЕННЫХ МИКРО-
СКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ**

Утверждено к печати

*Ботаническим институтом им. В. Л. Комарова
Академии наук СССР*

Редактор издательства *Е. А. Чекулаева*

Технический редактор *О. Н. Скобелева*

Корректоры *Л. М. Бова* и *Ш. А. Иванова*

Сдано в набор 21.I.1969 г. Подписано к печати
21/X 1969 г. РИСО АН СССР № 13—79В. Формат
бумаги $84 \times 108 \frac{1}{32}$. Бум. л. $3\frac{7}{8}$. Печ. л. $7\frac{3}{4} = 13.2$
усл. печ. Уч. -изд. л. 6.40. Изд. № 3616. Тип. зак.
№ 45. М-21889. Тираж 2200. Бумага № 1.
Цена 40 коп.

Ленинградское отделение издательства «Наука»
Ленинград, В-164, Менделеевская лин., д. 1

1-я тип. издательства «Наука»

Ленинград, В-34, 9 линия, д. 12