

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. Ломоносова

**Т. Г. Добровольская, А. В. Головченко,
Л. В. Лысак, Г. М. Зенова**

**ФИЗИКОХИМИЯ И БИОЛОГИЯ ТОРФА
МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЧИСЛЕННОСТИ И РАЗНООБРАЗИЯ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ И АКТИНОМИЦЕТНЫХ КОМПЛЕКСОВ
ТОРФЯНЫХ ПОЧВ**

Учебное пособие

Томск 2010

УДК 631.4
ББК 40.6 я73
Ф50

Печатается по решению
учебно-методического совета
Томского государственного
педагогического университета

Ф 50 Физикохимия и биология торфа. Методы оценки численности и разнообразия бактериальных и актиномицетных комплексов торфяных почв : учебное пособие / Добровольская Т. Г., Головченко А. В., Лысак Л. В., Зенова Г. М. – Томск : Издательство Томского государственного педагогического университета, 2010. – 97 с.

ISBN 978–5–89428–496–5

Впервые подготовлено учебное пособие для микробиологов, работающих с торфяными почвами. В содержание этого пособия включены как теоретические вопросы (дана оценка состояния современной систематики бактерий и экологической оценки микробного разнообразия), так и все методические рекомендации, касающиеся определения численности и идентификации бактерий и актиномицетов.

Авторы предлагают новые экологические подходы к оценке бактериального разнообразия почв. Приводится перечень экологических индексов биоразнообразия, которые рекомендуются для количественной оценки структуры прокариотных сообществ почв. Даны списки родов бактерий и актиномицетов, наиболее характерных для торфяных почв и сопряженных субстратов, и ключи для их идентификации. Описаны методы и тесты, необходимые для определения прокариотных микроорганизмов. Приводится состав сред, рекомендуемых для выделения из почв бактерий и актиномицетов разных групп и родов.

Учебное пособие предназначено для студентов высших учебных заведений, специализирующихся в области почвенной биологии, микробиологии, торфоведения, почвоведения, экологии.

Научный редактор:

д.-р с.-х. наук, член-корр. РАСХН, профессор *Л. И. Инишева*.

Рецензенты:

доцент, канд. биол. наук, *В. Е. Аристархова*,
канд. биол. наук, *Т. М. Тронова*.

ISBN 978–5–89428–496–5

© Издательство ТГПУ, 2010
© Коллектив авторов, 2010

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что анализ бактериальных сообществ торфяных почв проводится уже более полувека, остаются так и нерешенными те главные вопросы, на которые предстоит ответить микробиологам. Эти вопросы таковы – какие же группы и таксоны бактерий преобладают в торфяниках разного генезиса, какие экологические функции они способны осуществлять в той специфической среде обитания, где процессы микробной деструкции блокированы высокой степенью обводнённости, низкими температурами, кислотностью, анаэробнозом и т.д.

В большинстве последних работ по определению микробного разнообразия почв с помощью молекулярно-биологических методов указывается на необходимость выделения культур бактерий и определения их экологических функций. Иными словами необходимо возвращение к традиционным методам посева и работе с чистыми культурами. Для этого требуются методические рекомендации, состав сред, ключи для определения основных родов бактерий и актиномицетов, встречающихся в почве. Все это содержится в пособии, которое мы предлагаем. Основой для его написания послужили материалы из опубликованных нами ранее учебных пособий (Методы..., 2003; Зенова, 2000). Однако настоящее издание содержит дополнительные сведения о бактериях и актиномицетах, обитающих именно в торфяных почвах, приводятся списки новых форм бактерий, выделенных из торфяников, а также ссылки на авторов, предлагающих специальные среды и методы, позволяющие оценить бактериальное разнообразие торфяных почв.

Авторы настоящего пособия при составлении ключа для идентификации выбрали в качестве основного объекта исследования комплекс аэробных и факультативно-анаэробных гетеротрофных бактерий и актиномицетов, участвующих в деструкции растительных остатков. Такое ограничение связано с методическими трудностями, возникающими при определении таких групп бактерий как железобактерии, серные, фототрофные, метаногены и др. С другой стороны, именно микробные деструкторы торфа, участвующие на разных этапах его разложения в качестве гидролитиков, копиотрофов и олиготрофов, представляются наиболее

интересными объектами для микробиологов, уже давно пытающихся решить загадки длительной консервации торфа.

В качестве новых признаков, характерных для микробных сообществ торфяных почв, описаны: равномерное распределение бактерий и актиномицетного мицелия по профилю торфяников; присутствие, а иногда и доминирование, факультативно-анаэробных, микроаэрофильных и ацидофильных форм прокариот.

Работа проводилась при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (Госконтракт 02.740.11.0325).

ГЛАВА 1. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ТОРФЯНИКОВ

1.1. Состояние современной систематики и классификации бактерий

Длительный период определения бактерий на основе морфологических и физиологических признаков постепенно заменяется в настоящее время их идентификацией на основе одного признака – последовательности нуклеотидов в рРНК. Для этого был выбран ген 16S рРНК, как наиболее удаленный от эколого-функциональных особенностей организма и находящийся в его внутренней сфере. Иными словами, фенотипическая систематика сменяется филогенетической. Если первая основана на эмпирическом изучении сходства между систематизируемыми объектами и не претендует на эволюционные и формально-таксономические построения, то вторая отображает генеалогические связи между разными таксонами, представленными в виде ветвей филогенетического древа. Благодаря исследованиям Карла Везе, его коллег и учеников было построено такое дерево, состоящее из трех основных ветвей эволюции. Все живое разделено на три царства (домена, империи): *Archaea* (прежде – *Archaeobacteria*), *Bacteria* (*Eubacteria*) и *Eukarya* (*Eukaryotes*). Общие и дифференцирующие признаки археобактерий, эубактерий и эукариот представлены в таблице 1.

В настоящее время филогенетическая система классификации микроорганизмов находится в активном развитии, с одной стороны она учитывает родственные связи между организмами и опирается на эволюционные представления, а с другой – предполагается сделать ее удобной для практической микробиологии, что позволит быстро найти место конкретного микроорганизма в мире микробов. Пока же пользуются морфологической классификацией с некоторыми элементами молекулярно-генетического подхода. Основы такой классификации заложил Д. Берджи в 1923 г. В настоящее время для практической идентификации бактерий применяют девятое издание определителя, выпущенное Комитетом Берджи, а также его русский перевод «Определитель бактерий Берджи» (Москва: Мир, 1997. Т. 1. С. 5–436 и Т. 2. С. 437–799).

Много полезных сведений, касающихся методов выделения, морфологии, физиологии и систематики отдельных таксонов бактерий содержатся в книге «Prokaryotes», имеющей электронную версию (<http://www.springerlink.com/books>).

Таблица 1

Основные признаки археобактерий, эубактерий и эукариот (Заварзин, Колотилова, 2001)

Признак	Archaeobacteria	Eubacteria	Eukarya
Типичные организмы	Метаногены, экстремальные термофилы, галофилы	См. основные группы (по руководству Берджи)	Протисты, грибы, растения, животные
Типичные размеры, мкм	0,5 – 4	0,5 – 4	>5 и >>5
Геном	Кольцевая хромосома	Кольцевая хромосома	Ядро со многими сложными хромосомами
Гистоны	Есть	Нет	Есть
Обратная гираза	Есть	Нет	Нет
Клеточная стенка	Протеин, псевдомуреин	Муреин, липополисахарид	Различная
Мембрана	Этерифицированные изопреноиды	Эфиры жирных кислот и глицерина	Эфиры жирных кислот, стеролы
Внутрицитоплазматические мембраны	Нет	Обычно нет, или белковые	Обычны для компартментализации клетки
Рибосомы	70S	70S	80S (в цитоплазме) +70S рибосомы органелл, как у бактерий
РНК-полимераза	Сложная	Простая	сложная
Синтез белка ингибируется хлорамфениколом	Нет	Да	Нет
Синтез белка ингибируется циклогексимидом	Нет	Нет	Да

Все прокариотические микроорганизмы в последнем издании определителя бактерий «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» разделены на основании их происхождения и родства на филогенетические группы, называемые филумами. Филумы, в свою очередь, делят на классы, порядки семейства и т.д. Предлагаемая иерархия таксонов на примере рода *Legionella* приведена в таблице 2.

Все известные в настоящее время прокариоты (бактерии) входят в два домена: *Archaea* и *Bacteria*.

Таблица 2

Иерархия таксонов (кроме *Cyanobacteria* и *Actinobacteria*)

Таксон	Пример
Домен	Bacteria
Филум	Proteobacteria
Класс	Alphaproteobacteria
Порядок	Legionellales
Семейство	Legionellaceae
Род	Legionella
Вид	Legionella pneumophilla
Подвид	Legionella pneumophilla subsp. pneumophilla

Домен *Archaea* делят на три филума: филум A1 (*Crenarchaeota* – обитатели горячих серных источников); филум A2 (*Euryarchaeota* – метаногены, экстремальные галофилы, термоплазмы); филум A3 (Некультивируемые формы).

Домен *Bacteria* подразделен на 23 филума: филум B1 (*Aquificae* – анаэробные и факультативно анаэробные термофилы); филум B2 (*Thermotoga* – обитатели геотермальных зон, морских гидротерм, имеют внешние покровы, отстающие от клетки (тога); филум B3 (*Thermodesulfobacteria* – анаэробные термофильные сульфатредукторы); филум B4 (*Deinococcus-Thermus* – бактерии, обладающие исключительно высокой устойчивостью к радиации); филум B5 (*Chrysiogenetes* – бактерии, способные окислять арсенат (мышьяк)); филум B6 (*Chloroflexi* – фототрофные бактерии, способные к скользящему движению); филум B7 (*Thermomicrobia* – гипертермофильные бактерии с оптимальной для роста температурой 70–75С⁰); филум B8 (*Nitrospirae* – аэробные хемолитотрофы, способные к нитрификации, железобактерии и формы с магнитотаксисом); филум B9 (*Deferribacteres* – хемоорганогетеротрофы, анаэробы, способные окислять железо, марганец, серу, кобальт); филум B10 (*Cyanobacteria* – сине-зеленые водоросли); филум B11 (*Chlorobi* – зеленые серные бактерии); филум B12 (*Proteobacteria* – грамотрицательные аэробные и факультативно анаэробные бактерии, широко распространенные в природе, разнообразные по морфологии и физиологическим признакам); филум B13 (*Firmicutes* – грамположительные

бактерии с низким содержанием ГЦ в ДНК, широко распространенные в природе, способные к образованию спор); филум B14 (*Actinobacteria* – грамположительные бактерии (как одноклеточные актинобактерии, так и спороактиномицеты) с высоким содержанием ГЦ в ДНК, морфологически и физиологически очень разнообразные); филум B15 (*Planctomycetes* – олиготрофные бактерии, водные организмы, труднокультивируемые формы); филум B16 (*Chlamydiae* – внутриклеточные облигатные паразиты человека и животных); филум B17 (*Spirochaetes* – грамтрицательные бактерии со специфическим типом движения, паразиты и свободноживущие водные формы); филум B18 (*Fibrobacteres* – грамтрицательные облигатные анаэробы); филум B19 (*Acidobacteria* – грамтрицательные ацидотолерантные анаэробные и аэробные бактерии); филум B20 (*Bacteroidetes* – грамтрицательные бактерии, широко представленные в природе, особенно в водных местообитаниях (пресные и морские воды); филум B21 (*Fusobacteria* – грамтрицательные анаэробные бактерии, бродильщики, обитатели рубца жвачных); филум B22 (*Verrucomicrobia* – грамтрицательные бактерии своеобразной формы, размножаются почкованием); филум B23 (*Dictioglomi* – грамтрицательные экстремально термофильные палочковидные бактерии).

Основные ветви филогенетического дерева биоты и структуры доменов Archaea и Bacteria представлены на рис. 1, 2. Наиболее широко ветвящимися эволюционными линиями являются ветви, представленные цианобактериями, грамположительными бактериями и протеобактериями. Было сделано предположение (Заварзин, Колотилова, 2001), что «этот комплекс отражает свое происхождение из циано-бактериального сообщества как стволовой эволюционной группировки микроорганизмов».

Следует отметить, что методами молекулярной диагностики *in situ* было показано, что прокариотные сообщества сфагновых болот включают представителей доменов как Archaea, так и Bacteria. Были идентифицированы с помощью метода FISH представители следующих филогенетических групп: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*. Наиболее многочисленными в болотных экосистемах были бактерии класса *Alphaproteobacteria* и филогенетических групп *Actinobacteria* и *Planctomycetes* (Dedysh et al., 2006).

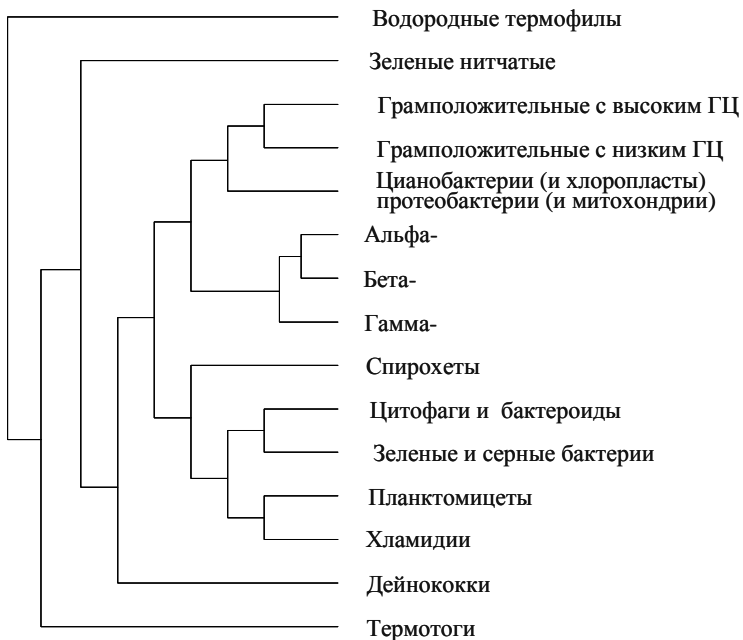


Рис. 1. Основные ветви филогенетического дерева эубактерий

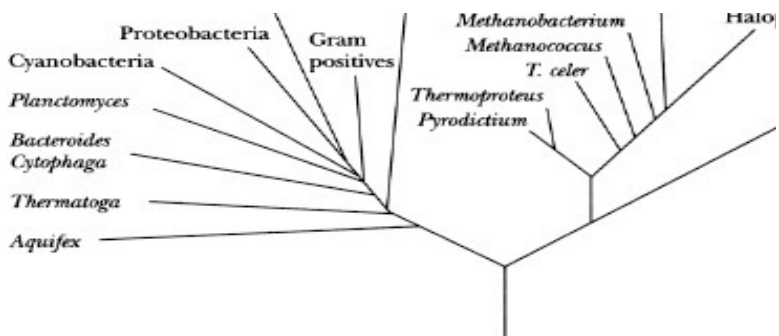


Рис. 2. Основные ветви филогенетического дерева биоты

Недостатки классификации бактерий по одному признаку – гену малой рибосомальной РНК – прекрасно сформулированы Г. А. Заварзиным: «Неудобством классификации по 16S рРНК оказывается появление случаев, когда фенотипически сходные организмы оказываются принадлежащими разным ветвям, и возникает дробление родов по единственному критерию с возрастающей неустойчивостью систематики на родовом уровне. Из положения организма на филогенетическом дереве можно сделать лишь ограниченные заключения об его функции» (Заварзин, Колотилова, 2001).

Отсюда следует, что фенотипическая, или функциональная, система сохранит свое значение, о чем свидетельствует продолжающаяся работа над усовершенствованием и переизданием Определителя бактерий Берджи, являющимся справочным материалом, необходимым в каждой лаборатории при идентификации бактерий. Следует иметь в виду, что при построении схем идентификации выбирают такие признаки, которые легко определить, в отличие от признаков, используемых для классификации, которые часто требуют сложных молекулярно-генетических методов.

1.2. Методы, используемые для классификации и идентификации прокариот

До 60-х годов прошлого века в таксономии прокариот доминировал фенотипический подход, основанный, главным образом, на изучении морфологических, биохимических и физиологических признаков, используемых для описания и дифференциации таксонов. Во второй половине XX века, благодаря значительным успехам в методах исследования ДНК и РНК, начато детальное изучение наследственного аппарата клеток, что привело к внедрению филогенетического подхода в таксономии бактерий и широкому использованию генотипической информации в систематике прокариот. Однако в практической работе по идентификации бактерий наряду с генотипическими признаками продолжают часто и довольно успешно использовать фенотипические признаки.

Современный этап развития таксономии и систематики прокариот следует охарактеризовать как период полифазной (консенсусной) таксономии (Vandamme et al., 1996). Суть ее состоит

в выявлении соответствия филогенетических характеристик организма с фенотипическими, получаемыми с использованием различных современных методов.

Один и тот же признак часто используется на разных таксономических уровнях. Поиск относительно стабильных фенотипических признаков, дифференцирующих филогенетически обособленные группы, а также поиск и адаптация к таксономическим задачам новых молекулярных методов, позволяющих определить сходство геномов на уровне вид-род, и являются основной задачей полифазной таксономии.

Анализу методов и подходов к оценке микробного разнообразия почв посвящено значительное число вышедших в последнее время обзоров (Amann et al., 1995; Kennedy, Gevin, 1997; Ogram, 2000; Rhondon et al., 1999; Torsvik, Ovreas, 2002), в которых подчеркивается роль почвы как источника огромного микробного разнообразия. Авторы публикаций акцентируют внимание на очень слабой изученности почвенного микромира и приводят при этом цифры, подтверждающие этот постулат: известно лишь 1–5% почвенных бактерий. Неизбежный вывод, который следует из анализа таких цифр, сводится к признанию неэффективности существующих методов, используемых для оценки микробного разнообразия почв. Преимущества и недостатки основных известных в настоящее время методов представлены в таблице 3.

1.3. Традиционный метод посева – «новые возможности старого метода»

Взятое в кавычки название заимствовано из статьи И. Ю. Чернова (1997), в которой доказывается возможность использования метода посева для количественной оценки разнообразия сообществ дрожжей. Оно точно отражает суть проблемы. Аналогичные доказательства применимости метода посева для характеристики бактериального разнообразия на примере группы сапротрофных бактерий даны в монографии Т. Г. Добровольской (2002).

Важным направлением современных исследований в области изучения бактериального разнообразия почвы является изучение бактерий, которые не культивируются на обычных микробиологи-

ческих средах рутинными методами или не были до настоящего времени культивированы. Поэтому в настоящее время многими исследователями в области микробной экологии считается, что чашечные методы культивирования дают сравнительно меньше информации, чем другие методы, появившиеся в последнее время. Чашечные методы стали применяться реже, однако они продолжают до настоящего времени снабжать нас данными об изменении разнообразия на уровне популяции видов, растущих на определенных питательных средах.

Чашечные методы имеют определенные преимущества перед другими методами, появившимися в последнее время, заключающиеся в скорости, дешевизне и достаточной надежности получения информации. Методы эти наиболее полезны для сравнительного изучения различных типов почв (см. табл. 3).

Хотя чашечные методы и ограничивают точность таксономического анализа сообщества культивируемыми видами, они дают возможность исследователю выделить и идентифицировать те виды, которые осуществляют определенную известную функцию в сообществе, они незаменимы при проведении биологического контроля и биоремедиации загрязненных территорий.

Выделенные штаммы используются для оценки фенотипического разнообразия бактерий, а также являются потенциальным ресурсом для биотехнологии.

При оценке бактериального разнообразия почв методом посева следует придерживаться следующего – не стараться описать разнообразие всех групп и таксонов бактерий (гетеротрофов, хемолитотрофов, фототрофов, строгих анаэробов и облигатных метанотрофов), что практически невозможно, а выбрать в качестве модельной группу бактерий, все представители которой способны расти на одной и той же питательной среде. При этом становится возможным определение доли разных таксонов бактерий в сообществе, складывающемся на используемой среде, выявление доминантов, субдоминантов и минорных компонентов, т.е. анализ сообщества на основании использования различных общепринятых синэкологических показателей. При этом можно считать, что модельная группа была выбрана удачно, если удалось установить закономерности распределения и особенности таксономической и типологической структуры исследуемого бактериального

Таблица 3

Преимущества, недостатки и основная информация, представляемая современными методами почвенных микробиологических анализов
(по материалам обзоров Kennedy, Gevin, 1997; Rhondon et al., 1999; Amann et al., 1995; Ogden, 2002)

Метод	Преимущества	Недостатки	Получаемая информация
Культуральные методы			
Чашечные методы	Быстрота и простота метода. Дешевизна. Изолируются отдельные виды.	Множество видов не культивируются на чашках, из чего следует ограниченность получаемой информации.	Разнообразие сообществ оценивается только по культивируемым видам.
Спектры утилизации субстратов	Быстрота и простота метода. Дешевизна. Надежный "фингерпринт" микробных сообществ.	Относительность получаемой информации. Система BIOLOG не предназначена для почвенных анализов.	Метод позволяет оценить сходство сообществ по метаболическому потенциалу.
Газовая хроматография			
Метилловые эфиры жирных кислот. Почвы	Быстрота и простота метода. Надежный "фингерпринт" липидных профилей по биомаркерам.	Выявляет как живые, так и мертвые клетки микроорганизмов, а также жирные кислоты, входящие в состав растений и гумуса.	Позволяет оценить сходство и различие сообществ по индивидуальным пикам, как биомаркерам.
Метилловые эфиры жирных кислот фосfolипидов. Почвы	Надежный "фингерпринт" живых микробных сообществ. Идентификация по биомаркерам.	Длительность процедуры определения. Образование токсических веществ в ходе анализа.	Позволяет оценить сходство и различие сообществ по индивидуальным пикам, как биомаркерам.
Молекулярно-биологические методы			
Анализ нуклеиновых кислот, экстрагируемых из почвы. Полимеразная цепная реакция. (ПЦР) ДНК с помощью Taq-полимеразы.	Селективная амплификация фрагментов гена 16 рРНК из смеси ДНК. Быстрота метода.	Образование химерных ПЦР-продуктов в ходе реакции. Некоторые последовательности могут быть преимущественно амплифицированы.	Снабжает информацией, которая может быть использована в последующих анализах. Возможность амплификации специфических генов.

комплекса, отражающие адаптацию бактерий к условиям, складывающимся в данном типе экосистемы, почвы или природно-климатической зоны. Следует отметить, что все общебиологические закономерности, связанные с расселением и пространственно-временной организацией биотических сообществ, были выявлены на определенных выборках, например, птицы, беспозвоночные животные, бабочки и т.д.

При оценке бактериального разнообразия почв методом посева следует придерживаться следующего – не стараться описать разнообразие всех групп и таксонов бактерий (гетеротрофов, хемолитотрофов, фототрофов, строгих анаэробов и облигатных метанотрофов), что практически невозможно, а выбрать в качестве модельной группу бактерий, все представители которой способны расти на одной и той же питательной среде. При этом становится возможным определение доли разных таксонов бактерий в сообществе, складывающемся на используемой среде, выявление доминантов, субдоминантов и минорных компонентов, т.е. анализ сообщества на основании использования различных общепринятых синэкологических показателей. При этом можно считать, что модельная группа была выбрана удачно, если удалось установить закономерности распределения и особенности таксономической и типологической структуры исследуемого бактериального комплекса, отражающие адаптацию бактерий к условиям, складывающимся в данном типе экосистемы, почвы или природно-климатической зоны. Следует отметить, что все общебиологические закономерности, связанные с расселением и пространственно-временной организацией биотических сообществ, были выявлены на определенных выборках, например, птицы, беспозвоночные животные, бабочки и т.д.

1.3.1. Теоретические основы экологической оценки микробного разнообразия

На кафедре биологии почв факультета почвоведения МГУ были разработаны новые концептуально-методологические подходы к экологической оценке бактериального разнообразия природных микробных сообществ и количественные методы, позволяющие охарактеризовать структуру микробных сообществ почв (Звягинцев и др., 1999).

Разработанный системный подход к оценке биоразнообразия почв основан, прежде всего, на концепции иерархии местообитаний микроорганизмов. От традиционного масштаба рассмотрения (средние образцы – генетические горизонты почв – почвенный профиль) интересы почвенных микробиологов сместились как в сторону детализации, т.е. изучения мезо- и микроразнообразия архитектуры микробного сообщества почвы, так и в сторону генерализации, т.е. попыток взглянуть на микробные сообщества в биогеоэкологическом и географическом глобальных масштабах. Чтобы располагать всей этой информацией необходим постепенный переход от меньшего масштаба к большему.

Особого внимания заслуживает при этом новый взгляд на почву, как множестве микросред, предоставляющих возможности для развития самых разнообразных групп микроорганизмов (Звягинцев, 1987). Такие внутрпочвенные среды могут быть разбиты на несколько основных типов: связанные с неоднородностью минеральной составляющей (различные почвенные новообразования типа ортштейнов, журавчиков и др.); подземные части растений (ризосфера, ризоплана); зоны вокруг гиф грибов (микосфера и микоризосфера); ходы червей (дрилосфера); копролиты, кишечный тракт и поверхностные покровы почвенных беспозвоночных животных.

В каждом из этих локусов складывается особый тип микробных сообществ, поэтому для анализа бактериального разнообразия почвы необходим отбор образцов с учетом всех или хотя бы большинства микроразнообразий. При этом условия микроразнообразий необходимо воспроизводить в макромасштабах на питательных средах. Таких вариантов по составу сред и условий культивирования могут быть сотни. Естественно, что на одной среде из одного местообитания вырастает лишь 1 % от тех форм бактерий, которые, в принципе, можно выделить из почвы. Увеличение числа местообитаний, воспроизводимых на питательных средах, может, следовательно, расширить спектр учитываемых таксонов бактерий в десятки раз.

С другой стороны, появилось стремление взглянуть на микробные сообщества почв в масштабе всего биогеоценоза, что связано с новой трактовкой представления о почве, как открытой системе, и признанием роли почвы в развитии и функционировании отдельных экосистем и биосферы в целом (Добровольский,

Никитин, 1990). Для оценки закономерностей пространственного распределения микроорганизмов в пределах БГЦ был предложен вертикально-ярусный анализ микробных сообществ, заключающийся в одновременном исследовании микробных комплексов во всех ярусах экосистемы: надземном (филлоплана древесных и травянистых растений), наземном (подстилки, моховой и лишайниковый покров, напочвенные разрастания водорослей), почвенном (включая все почвенные генетические горизонты). Каждый из ярусов представляет по отношению к микроорганизмам определенный набор субстратов как сред обитания, а переход от одного яруса к другому – плавный переход от живых частей растений к находящимся на разных стадиях разложения растительным остаткам и минеральным горизонтам, бедным легкодоступными органическими веществами.

При оценке микробного разнообразия почв следует также учитывать, что структура микробных комплексов изменяется во времени, при этом наблюдаются как сезонная динамика микроорганизмов (разная для разных групп), так и сукцессионные изменения, направленность которых определяется разными факторами, вскрываемыми, как правило, в модельных опытах. Поэтому, сукцессионный подход в комплексе с вертикально-ярусным и микролокусным позволили выявить основные закономерности в организации микробных сообществ в пространстве и времени на примере некоторых групп как эукариотных, так и прокариотных микроорганизмов (Добровольская и др., 1996; Звягинцев и др., 1999).

1.3.2. Экологические индексы, рекомендуемые для оценки структуры бактериальных сообществ почв

Мы будем использовать термин «микробное сообщество» в самом широком смысле, понимая его как набор популяций микроорганизмов (всех или относящихся к определенной группе) в некоем рассматриваемом пространстве. Даже при таком формальном подходе имеется предмет для изучения, лежащий вне дискуссии о том, как определять сообщество, а именно его структура, то есть набор отдельных элементов (например, таксонов), их относительное обилие, пространственное и временное расположение, а также взаимосвязи между ними. Структуру имеет любая группировка, вне зависимости от ее функционального

единства и естественности границ. Экспериментальный анализ структуры сообщества становится возможным только после выделения в качестве объекта какой-либо группы популяций, учитываемых конкретным методом.

Споры о применимости того или иного термина по отношению к совокупности почвенных микроорганизмов могут быть отчасти разрешены, если рассматривать почву как сложную, биокосную, гетерогенную систему, микробные сообщества которой могут быть изучены в разных по масштабам местообитаниях: мезо- и микролокусах (почвенные новообразования, ризосфера, микросреды, создаваемые почвенными беспозвоночными, и т. п.), разных генетических горизонтах, почвах разных типов ландшафтов, географических зон и биомов, т. е. с учетом иерархии местообитаний, как бы вставленных друг в друга. Такой подход представляется весьма продуктивным для решения вопросов строения и функционирования почвенных микробных сообществ. В пределах иерархии местообитаний можно выделять сообщества любого размера, масштаба или уровня в зависимости от цели и области интересов почвенного микробиолога, и изучать их структуру в разных аспектах.

Нами было предложено использовать не вид, а род в качестве таксономической единицы биоразнообразия бактерий, а в некоторых случаях и таксоны более высокого порядка, когда идентификация до рода по фенотипическим признакам затруднена, например, в порядке *Mycococcales* или группе *Flavobacterium-Cytophaga*. Думается, что при эколого-географических исследованиях, когда оцениваются и сравниваются сообщества бактерий разных типов почв и разных природно-климатических зон, более эффективным будет принять за операционную единицу именно такие, т. е. более крупные, чем вид таксоны. При этом, общепринятые в синэкологии индексы разнообразия, такие как индекс Шеннона (альфа-разнообразии) или индекс Уилсона-Шмиды (бета-разнообразии) вполне оказываются применимыми для количественной оценки бактериального разнообразия почв и сопряженных субстратов.

Однако более информативными следует считать показатели, характеризующие иерархическую и синтипологическую структуру бактериальных сообществ: соотношение бактерий различных родов в сообществе (относительное обилие), частота встречаемости

и доминирования бактерий определенных родов, спектры потенциальных доминантов, таксономический состав бактерий в пределах каждой из эколого-трофических групп, соотношение протеобактерий и актинобактерий (Добровольская и др., 1997, 1999).

При определении относительного обилия таксонов в исследуемом сообществе следует выделить, прежде всего, группу доминантов. Мы предлагаем рассматривать как доминирующие те таксоны, доля которых составляет более 30 % от общего числа бактерий, учитываемых на данной среде, субдоминантами – 20–30 %. Тогда к группам среднего обилия можно отнести те роды бактерий, доля которых в исследуемом сообществе составляет 10–20 %, а к минорным компонентам – менее 10 %. При таком подходе в сообществе может быть от одного до трех доминантов, при этом в зависимости от типа сообщества могут отсутствовать те или иные группы обилия. Например, структура может быть монодоминантной, когда 80–90 % в сообществе занимает какой-либо один доминант, что свидетельствует большей частью о неблагоприятных условиях, в которых вынуждено существовать данное сообщество. И, наоборот, выравненность сообщества – т.е. отсутствие доминантов при равномерном распределении бактерий по группам среднего обилия – отражает благоприятный баланс между условиями среды и развитием данного сообщества. Такая структура бактериального сообщества характерна для ризосферы растений или кишечника почвенных беспозвоночных.

Если мы хотим сравнить насколько часто (во времени или пространстве) встречается или доминирует тот или иной таксон, целесообразно использовать такие показатели как вероятность встречаемости или доминирования. Эти показатели рассчитываются как доля образцов, в которых данный таксон встречается (или доминирует) к общему числу проанализированных образцов и выражается в процентах. Иными словами вероятности доминирования определяют как долю образцов, в которых относительное обилие данной таксономической группы превышало 30 %, от общего числа проанализированных образцов.

Поскольку в зависимости от сезона взятия образцов или его пространственного положения в вертикальной структуре биогеоценоза (БГЦ), происходят постоянные изменения в составе групп разного обилия, в том числе и доминантов, вводится понятие –

число и спектр потенциальных доминантов. Это количество и таксономический перечень тех доминирующих родов бактерий, которые могут быть обнаружены в качестве доминантов при анализе сообщества в одном и том же субстрате, но в разные сезоны, либо могут встречаться только в данном типе БГЦ, но отсутствовать во всех субстратах другого типа БГЦ.

При обработке полученных данных, возможно, использовать также и методы (например, метод главных компонент), которые демонстрируются в публикациях, посвященных оценке биоразнообразия почв с помощью молекулярно-биологических методов.

Таким образом, представляется вполне реальным выявление бактериального разнообразия почв на основании как разработанных нами подходов, так и показателей, в основе которых лежит идентификация бактерий преимущественно до рода по простым фенотипическим признакам, прибегая в то же время, когда это необходимо к хемотаксономическим и молекулярно-биологическим методам.

1.4. Спектр основных родов бактерий, обнаруженных в торфяных почвах

В таблице 4 приведен перечень родов бактерий, выделенных из торфяных почв методом посева на питательные среды, и указана филогенетическая принадлежность этих родов. Список составлен как по литературным источникам, так и результатам собственных исследований.

Таким образом, получается, что из почв и сопряженных с ними субстратов можно выделить до 50 родов бактерий. На самом деле список приведенных родов значительно шире, если учесть, что в настоящее время многие виды бактерий переведены в ранг родов – например, вместо одного рода *Bacillus* предложено выделить 10 родов.

В группе актинобактерий также появилось много новых родов – *Rathaybacter*, *Terrabacter*, *Gordona*, *Dietzia* и др., представители которых также выделялись ранее из почв или растений под видовыми названиями в пределах родов *Clavibacter* и *Rhodococcus*. Многие виды *Pseudomonas* и *Flavobacterium* выделены в настоящее время в отдельные роды. Наблюдающаяся тенденция дробления

родов, проводящаяся большей частью по единственному критерию (16S РНК), приводит к возрастающей неустойчивости систематики на родовом уровне и создает ложное впечатление увеличения знаний (Заварзин, Колотилова, 2001).

Таблица 4

Филогенетическая принадлежность бактерий сфагновых болот по данным метода посева на питательные среды

Название рода	Количество родов	В % от общего числа родов
Proteobacteria: Alpha: <i>Asticcacaulis</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Hyphomicrobium</i> , <i>Methylocapsa</i> , <i>Methylocella</i> , <i>Methylocystis</i> , <i>Prosthecomicrobium</i> , <i>Rhodomicrobium</i> , <i>Sphingomonas</i> ; Beta: <i>Achromobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Aquaspirillum</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Chromobacterium</i> , <i>Rhodoblastus</i> , <i>Rubrivivax</i> ; Gamma: <i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rahnella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Vibrio</i> ; Delta: <i>Myxococcus</i> , <i>Coralloccoccus</i> , <i>Polyagnum</i>	30	59
Actinobacteria: <i>Micrococcus</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Rhodococcus</i>	8	15
Bacteroidetes: <i>Cytophaga</i> , <i>Sporocytophaga</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Pedobacter</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Mucilaginibacter</i> , <i>Chitinophaga</i>	7	14
Acidobacteria: <i>Terriglobus</i>	1	2
Planctomycetes: <i>Schlesneria</i> , <i>Singulisphaera</i>	2	4
Firmicutes: <i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Clostridium</i>	3	6
Итого:	51	100

Некоторые виды претерпевали многочисленные переименования, например, вид *Erwinia herbicola* – *Enterobacter agglomerans* – *Pantoea agglomerans*. Такие таксономические нововведения основаны на детальном изучении хемотаксономических (состав жирных кислот и менахинонов, структура пептидогликана клеточной стенки и др.) и молекулярно-биологических признаков культур, которые позволяют проводить все более и более дробную дифференциацию таксонов.

Однако при этом все более трудной становится идентификация культур по фенотипическим признакам, теряется объединяв-

шая ранее таксоны одного ранга связь, основанная на таких значимых биологических и экологических признаках как формирование спор в клетке, цикл развития, эколого-трофические особенности, определяющие приуроченность к определенным экологическим нишам. В таблице 5 приведен список разных таксонов бактерий, представители которых были выделены из торфяников разными авторами на специальных средах, либо описаны молекулярно-биологическими методами. Из анализа этой таблицы следует, что в торфяных почвах обитают и функционируют представители самых разнообразных групп бактерий, включающих как гидролитиков, так и олиготрофов, как метаногенов, так и метиловых бактерий, как органотрофов, так и фототрофов.

Таблица 5

Спектр таксонов бактерий, выделенных из торфяных почв на специфических средах, либо определенных молекулярно-биологическими методами

Ацидофильные бактерии <i>Acetobacterium, Acidiphilum, Acidobacterium, Gluonoacetobacter</i>	Inagaki et al., 1998
Ацидофильные метаногенные археи семейств <i>Methanomicrobiales, Methanosarcinales, Methanobacteriales, Methanococcales</i>	Kotsyurbenko et al., 2007
Метанотрофные психрофильные бактерии <i>Methylobacter psychrophilus, Methylocella palustris, Methylocapsa acidiphila, Methylocystis heyeri</i>	Омельченко и др., 1996; Дедыш, 2002; Dedysh et al., 2004, 2007
Фототрофные бактерии <i>Rhodomicrobium, Rhodoblastus, Rubrivivax</i>	Kulichevskaya et al., 2006
Бактерии гидролитического комплекса Аэробные и факультативно-анаэробные <i>Sorangium, Polyangium, Cytophaga, Sporocytophaga, Bacillus, Cellulomonas, Burkholderia, Chitinophaga</i> Анаэробные бактерии <i>Bacteroides, Ruminococcus, Butyrivibrio, Clostridium</i> <i>Cytophaga xylanolitica</i>	Жукова, 1962; Наплекова, 1974; Добровольская и др., 2002; Белова и др., 2006; Панкратов, 2007; Gummedi, Kumar, 2005
Олиготрофные бактерии <i>Caulobacter, Prostheco bacter, Hyphomicrobium</i> <i>Asticcacaulis</i>	Головченко и др., 1993; Берестовская и др., 2006; Vasilyeva et al., 2006
Специфические таксоны бактерий Филумы <i>Planctomycetes, Acidobacteria, Verrucomicrobia</i>	Панкратов и др., 2005; Куличевская и др., 2006
Образующие чехол бактерии <i>Sphaerotilus</i>	Гродницкая, Сорокин, 2004
Бактерии из сфагнома, обладающие антигрибной активностью <i>Burkholderia, Pseudomonas, Serratia</i>	Opelt and Berg, 2004

В данном руководстве мы ограничиваем круг анализируемых нами бактерий хемоорганотрофными аэробными или факультативно-анаэробными бактериями. Несмотря на то, что мы старались исключить бактерии, являющиеся патогенами или фитопатогенами, многие обитатели (чаще отдельные виды) филопланов, растительных остатков являются условными или облигатными фитопатогенами – например, *Erwinia*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas*. Представители большинства родов семейств Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Mycobacteriaceae являются возбудителями заболеваний человека и животных, но мы рассматриваем лишь сапрофитные виды.

1.5. Количественный учёт бактерий в торфе с помощью люминесцентной микроскопии

Люминесцентно-микроскопический метод является одним из наиболее современных методов выявления, изучения и количественного учёта микроорганизмов в их естественной среде обитания (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991). Использование этого метода позволяет получить репрезентативные данные относительности численности и биомассы прокариотных микроорганизмов в торфяниках.

Метод сводится к тому, что приготовленные из суспензии торфа препараты окрашиваются специальным красителем (флюорохромом) – акридином оранжевым. Яркие зелёные клетки бактерий и мицелий актиномицетов хорошо заметны на тёмном фоне препарата.

Этапы:

- Подготовка предметных стёкол – один из важных этапов, от которых зависит успех метода. Применять следует только тщательно обезжиренные стёкла. Новые или использованные ранее стёкла предварительно кипятят в растворе стирального порошка (без биодобавок) в течение 10 мин. Затем стёкла промывают и процедуру кипячения с порошком повторяют еще раз. Стёкла промывают вновь и держат до употребления в чистой ёмкости со спиртом. Непосредственно перед приготовлением препаратов стёкла вытаскивают из спирта и прожигают

над пламенем горелки, затем остужают при комнатной температуре.

- Подготовка основного 0,1 % раствора акридина оранжевого (в дистиллированной воде), которым можно пользоваться в течение всей серии опытов. Основной раствор красителя следует хранить при $T = 40^{\circ}\text{C}$ в посуде из тёмного стекла с притертой пробкой.
- Берут 1 г свежего торфа и помещают в колбу со 100 мл стерильной воды. Далее для десорбции прокариотных клеток торфяную суспензию обрабатывают на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-1 в течение 2 мин при силе тока 0,44 А и частоте колебаний 22 кГц.
- Перед приготовлением препаратов колбу энергично встряхивают и суспензию наносят микропипеткой на предметное стекло (0,01 мл на препарат) и равномерно распределяют петлёй на площади 4 см^2 (т.е. квадрат $2 \times 2\text{ см}$). При данной площади на каждом предметном стекле можно приготовить 3 препарата. Рекомендуется предварительно начертить расположение препаратов в натуральную величину (трафарет) на бумаге, на которую в дальнейшем кладут предметные стёкла для приготовления препаратов.
- Препараты высушивают на воздухе при комнатной температуре, а затем фиксируют легким нагреванием над пламенем газовой горелки. После этой процедуры препараты могут достаточно долго храниться, что позволяет проводить подсчёт в удобное для исследователя время.
- Подготовка рабочего раствора красителя. Для этого из ёмкости с основным раствором акридина оранжевого стерильной пипеткой отбирают 1 мл красителя и помещают в пробирку с 10 мл стерильной воды. Полученный рабочий раствор красителя (1:10000) наносят на предметные стёкла, равномерно распределяют и выдерживают в течение 3 минут. Избыток красителя удаляют в процессе промывки, для чего стёкла погружают на 5 мин в стакан или кювету с водопроводной водой. Затем воду аккуратно сливают и промывку повторяют второй раз в течение 5 мин. Окрашенные препараты высушивают при комнатной температуре.

- Для микроскопии на препарат наносят каплю воды и покрывают обезжиренным покровным стеклом. Правильно приготовленный препарат не содержит пузырьков воздуха. Лишнюю воду удаляют фильтровальной бумагой.
- На подготовленные препараты с покровными стёклами наносят специальное нелюминесцирующее иммерсионное масло, которое при необходимости можно заменить вазелиновым, предварительно убедившись, что оно не люминесцирует. Далее препараты просматривают на люминесцентном микроскопе МЛ-1; МЛ-4; ЛЮАМ-ИЗ (светофильтры ЖС-19, ЖС-18, объектив Х90 Л, окуляры Х4 или Х5).

Для учёта бактерий рекомендуется из каждого образца торфа готовить 2 предметных стекла и подсчитывать клетки под каждым покровным стеклом в 20 полях зрения (т. е. 120 полей зрения на один образец торфа). Подсчёт длины актиномицетного мицелия осуществляется с помощью окулярной линейки на тех же предметных стёклах, но уже в 50 полях зрения (т. е. 300 полей зрения на один образец торфа).

При подсчёте клеток бактерий и актиномицетного мицелия крайне важно не выбирать поля для подсчёта, а переходить к новому полю зрения, поворачивая микрометр столика на определённую величину. Не следует подсчитывать микроорганизмы в близко расположенных полях зрения из-за возможной корреляции между числом бактерий в них.

Количество бактериальных клеток, содержащихся в 1 г сухого торфа, вычисляют по формуле:

$$N = \frac{4 \cdot a \cdot n}{s \cdot b} 10^{10},$$

где N – количество клеток в 1 г сухого торфа; a – среднее число клеток в поле зрения; s – площадь поля зрения (мкм²); n – показатель разведения; b – навеска сухой почвы. Если препараты готовились по нашей схеме, то n=100. Степень разведения может быть изменена в зависимости от численности микроорганизмов в конкретном образце. Желательно подобрать разведение таким образом, чтобы среднее число бактериальных клеток в поле зрения составляло 5–10.

Длину актиномицетного мицелия в расчёте на 1 г сухого торфа рассчитывают по формуле:

$$N_1 = \frac{4 \cdot a_1 \cdot n}{s \cdot b} 10^4,$$

где N_1 – длина актиномицетного мицелия в $\text{м}\cdot\text{г}^{-1}$ сухого торфа; a_1 – средняя длина актиномицетного мицелия в поле зрения, s – площадь поля зрения (мкм^2); n – показатель разведения; b – навеска сухой почвы.

Обязательно следует сделать пересчёт количества микробных клеток на 1 г сухого торфа, так как образцы торфа имеют разную влажность.

Содержание бактерий в сухом торфе составляет в среднем – десятки миллиардов клеток в 1 грамме; актиномицетного мицелия – сотни метров в 1 грамме торфа.

Биомассу бактерий и актиномицетного мицелия вычисляют следующим образом. Учитывая, что удельная масса (плотность) микроорганизмов равна $1 \text{ г}\cdot\text{см}^{-3}$, а содержание воды в клетках – 80 %, то сухая биомасса одной бактериальной клетки объёмом $0,1 \text{ мкм}^3$ составляет – $2 \cdot 10^{-14} \text{ г}$, а одного метра актиномицетного мицелия диаметром $0,5 \text{ мкм}$ – $3,9 \cdot 10^{-8} \text{ г}$. Соответственно, биомасса бактерий = $2 \cdot 10^{-14} \cdot N$, где N – количество клеток $\cdot \text{г}^{-1}$ сухого торфа; биомасса актиномицетного мицелия равна $3,9 \cdot 10^{-8} \cdot N_1$, где N_1 – длина актиномицетного мицелия в $\text{м}\cdot\text{г}^{-1}$ сухого торфа (Кожевин и др., 1979; Полянская, 1996).

Расчет количества микроорганизмов в определенном слое торфа следует проводить по формуле: $M = N \cdot b \cdot c$, где M – количество клеток в данном слое в расчёте на 1 см^2 поверхности этого слоя; N – количество клеток в 1 г сухого торфа; b – мощность слоя (см); c – удельная плотность слоя ($\text{г}\cdot\text{см}^{-3}$). Затем следует суммировать количество микроорганизмов, определённое в разных слоях торфяной толщи: $M_{\text{общ}} = M_1 + M_2 + M_3$, где M_1, M_2, M_3 – количество микроорганизмов в последовательных слоях торфяной толщи.

1.6. Ключ для определения основных родов почвенных бактерий. Принципы составления и пояснения к ключу

При составлении ключа мы руководствовались, прежде всего, следующими принципами: использовать, по возможности, наиболее

простые и доступные для микробиологов тесты и методы для идентификации; идти от простого к более сложному. Первоначальная дифференциация бактерий основана на окраске по Граму, наличию пигмента, культуральных особенностях; далее следует морфология (форма, размеры клеток, цикл развития), физиолого-биохимические особенности (отношение к кислороду, предпочтительный источник углерода, наличие определенных ферментов). К сожалению, не удалось избежать и довольно сложных биохимических методов, необходимых при идентификации КПБ – определение аминокислот и сахаров в клеточной стенке, миколовых и тейхоевых кислот.

В процессе идентификации следует руководствоваться, прежде всего, здравым смыслом, позволяющим избежать многих сложных и ненужных процедур. Так, большую помощь при определении бактерий могут оказать данные по экологии бактерий. При анализе почвенных образцов следует иметь в виду, что из коринеподобных бактерий в почвах встречаются, как правило, представители родов *Arthrobacter* (белый, реже желтый цвет колоний) и *Rhodococcus* (розовый, реже оранжевый оттенки колоний).

Бактерии рода *Cellulomonas*, наоборот, крайне редко выделяются из почв, они приурочены к лесным и степным подстилкам (изолируются из этих субстратов в осенний сезон), гниющим растительным остаткам. Ни артробактеры, ни целлюломонады не обнаруживаются на живых растениях (метод исключения!), в то время как представители родов *Curtobacterium*, *Clavibacter*, *Micrococcus* являются характерными эккриссотрофами. Эрсковии выделяются либо из подстилок широколиственных лесов, либо экскрементов и желудочно-кишечного тракта диплопод, обитающих в подстилках. В нестерильной почве они быстро погибают. В почвах, лишенных растений (примитивные каменистые почвы, пары, пески), практически отсутствуют грамотрицательные бактерии. Доминирующей группировкой в этих биотопах являются коринеподобные бактерии, и, наоборот, преобладающими в филлоплане и ризоплане растений – грамотрицательные бактерии родов *Pseudomonas* и *Erwinia*.

Таким образом, знание и использование экологических данных позволят исследователю оценить вероятность обнаружения того или иного организма в исследуемом образце и избежать нелепых поисков энтеробактерий на поверхности бесплодных скал, либо представителей *Renibacterium* (патогены рыб) в почвах.

Следует также помнить о корреляции между местообитанием бактерий и их потребностями в питании. Так, адаптированные к жизни на растениях или разлагающихся растительных остатках, бактерии, требующие готовых аминокислот и витаминов для роста, не могут быть выделены на средах для почвенных олиготрофов. Некоторые представители рода *Aureobacterium* возможно изолировать лишь на средах, содержащих *terregens* – фактор, бактерии рода *Agromyces* первоначально удалось выделить из почв, используя лишь сложные среды с добавками крови, а КПБ, принадлежащие к роду *Corynebacterium* (характерные обитатели организма человека и животных), практически не встречаются в природных биотопах.

Таким образом, при идентификации выросших на чашках колоний, прежде следует оценить вероятность высева бактерий того или иного рода, исходя из состава используемой для посева среды и места взятия образца.

В процессе диагностики бактерий могут быть также полезными знания о следующих коррелирующих признаках.

- Пигментные организмы приурочены, как правило, к растениям либо растительным субстратам, в то время как большинство почвенных обитателей, либо симбионтов почвенных беспозвоночных, являются атипичными.
- Ярко окрашенные (красно-оранжевые, розово-красные, малиновые пигменты) свойственны КПБ с IV типом клеточной стенки (*Rhodococcus*, *Mycobacterium*), либо микрококкам (*Micrococcus*).
- Коринеподобные бактерии со слабо выраженным циклом развития содержат в клеточной стенке орнитин (*Cellulomonas*, *Aureobacterium*, *Curtobacterium*)
- Внеклеточный, диффундирующий в среду зеленый пигмент свойственен лишь представителям родов *Pseudomonas*, *Aquaspirillum* и *Azotobacter*.
- Постепенное изменение окраски колоний при дневном освещении от кремовых до розово-оранжевых тонов может встречаться у бактерий родов *Brevibacterium* и *Mycobacterium*.
- Побурение или почернение колоний по мере старения культур может наблюдаться у бактерий, принадлежащих к родам *Azotobacter*, *Derxia*, *Bacillus*.

В настоящем ключе группа коринеподобных бактерий названа нами условно и не претендует на какой-либо таксономический статус, она содержит разнообразные роды, которые подобраны нами по принципу их экологической значимости – т. е. представители этих родов наиболее часто обнаруживаются в почвах и сопряженных с ними субстратах. Все они входят в класс *Actinobacteria* (Stackebrandt et al., 1997), включающий 5 подклассов, 6 порядков и 120 родов. Предложенная этими авторами классификационная схема отражает состояние систематики актиномицетов в целом, когда четкие фенотипические, а тем более, экологические критерии, для выделения высших таксонов часто отсутствуют. В результате роды, объединенные нами при составлении ключа в одну группу, оказываются в разных подпорядках и семействах.

При составлении ключа были допущены некоторые условности:

- Роды *Aureobacterium* и *Curtobacterium* включены в группу коринеподобных бактерий (КПБ), имеющих кремовую и желтую окраску колоний. Однако фитопатогенные представители *Curtobacterium* и один вид *Aureobacterium* (*A. testaceum*), могут иметь розово-оранжевые оттенки пигмента.
- Родококки и микобактерии включены в группу КПБ, не образующих субстратного мицелия, однако, бывают исключения: некоторые культуры образуют первичный мицелий на ранних стадиях развития, однако колонии никогда не вырастают в агар. Следует иметь в виду, что родококки, принадлежащие к виду *Rhodococcus erythropolis*, имеют бледно-розовую окраску колоний, проявляющуюся по мере роста культуры, молодые колонии бактерий этого вида практически атипичны.

КЛЮЧ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РОДОВ БАКТЕРИЙ САПРОТРОФНОГО КОМПЛЕКСА

Грамотрицательные бактерии

Апигментные бактерии		
А	Оксидазоположительные	
а	Аэробы	б
аа	факультативные анаэробы (ферментируют глюкозу или другие углеводы под маслом; см. тест Хью-Лейфсона)	л
б	растут на глюкозе и других углеводах, образуют кислоту при окислении углеводов	в
бб	не используют углеводы в качестве единственного источника углерода, хороший рост на органических кислотах и аминокислотах	и
в	клетки палочковидные, прямые или слегка изогнутые, подвижные	г
вв	форма клеток иная	е
г	размеры клеток 0,5–1х1,5–4 мкм; не растут при pH = 4,5; многие виды образуют водорастворимый флюоресцирующий пигмент	<i>Pseudomonas</i>
г	клетки от эллипсоидных до палочковидных (0,6–0,8х1–3 мкм); растут при pH=4,5; окисляют этанол до уксусной кислоты	<i>Gluconobacter</i>
е	крупные, овальные клетки 2 мкм и более, в молодых культурах часто палочковидные; подвижные, ярко выражен полиморфизм; много капсульной слизи	ж
ее	клетки от прямых или слегка изогнутых палочек до грушевидных форм (0,5–1,5х1,7–4,5 мкм); содержат внутриклеточные глобулярные липоидные тельца; колонии в виде высоко возвышающихся башен со складчатой или морщинистой поверхностью	з
еее	клетки спиральные, либо вибриодные; короткие, 1 мкм в диаметре; с характерным штопорообразным движением; содержат гранулы оксибутирата	<i>Azospirillum</i>
ж	образуют цисты	<i>Azotobacter</i>
жж	не образуют цист	<i>Azomonas</i>
з	липоидные тельца биполярны; каталазоположительны	<i>Beijerinckia</i>
зз	липоидные тельца многочисленны; каталазоотрицательны	<i>Derxia</i>
и	палочки, кокковидные палочки или кокки (0,5–1,2х0,5–2,6 мкм); подвижные; метаболизм дыхательный	<i>Alcaligenes</i>
ии	спирально извитые палочки (0,25–1,7 мкм, длиной 2–60 мкм), число витков от одного до многих, у некоторых видов в старых культурах преобладают кокковидные тела; в цитоплазме гранулы оксибутирата	<i>Aquaspirillum</i>
л	обладают гидролитическими ферментами; не используют инозит	м
лл	не вырабатывают экзоферментов; используют инозит	<i>Plesiomonas</i>
м	палочки изогнутые или прямые (0,5–1,5х3,0 мкм), иногда объединены в S-образные формы или спирали; декарбоксилируют орнитин и лизин, не используют аргинин	<i>Vibrio</i>

мм	клетки прямые, от палочковидных до кокковидных (1,0–4,4 мкм); не декарбоксилируют орнитин и лизин, используют аргинин	<i>Aeromonas</i>
В	Оксидазоотрицательные	
а	строгие аэробы; короткие толстые палочки (1,0–1,5 x 1,5–2,5 мкм), в стационаре кокки	<i>Acinetobacter</i>
аа	факультативные анаэробы	
б	дезаминируют фенилаланин, гидролизуют мочевины	<i>Proteus</i>
бб	не дезаминируют фенилаланин, не гидролизуют мочевины	в
в	растут в присутствии KCN, реакция Вогес-Проскауэра отрицательна	<i>Escherichia</i>
вв	не растут в присутствии KCN, реакция Вогес-Проскауэра положительна	г
г	клетки подвижны, декарбоксилируют орнитин	<i>Enterobacter</i>
гг	клетки неподвижны, не декарбоксилируют орнитин	<i>Klebsiella</i>
Пигментные грамотрицательные бактерии		
А	Оксидазоотрицательные	
а	аэробы; цвет колоний желтый; слизистые; фитопатогены	<i>Xanthomonas</i>
аа	факультативные анаэробы	б
б	цвет колоний желтый, желто-коричневый; не декарбоксилируют орнитин	<i>Erwinia</i>
бб	цвет колоний розовый, красный, фиолетовый; декарбоксилируют орнитин	<i>Serratia</i>
В	Оксидазоположительные	
а	колонии желтые, оранжевые, красные	б
аа	колонии фиолетовые; клетки палочковидные с закругленными концами, иногда изогнутые (0,6-1,2 x 1,5-6 мкм); подвижны; факультативные анаэробы; обладают лецитиназной активностью; образуют кислоту из трегалозы	<i>Chromobacterium</i>
ааа	аэробы; не обладают лецитиназной активностью; не образуют кислоту из трегалозы	<i>Janthinobacterium</i>
б	колонии правильной округлой формы, плоские или слегка выпуклые, гладкие, часто прозрачные	в
бб	колонии неправильной формы, вырастающие целиком в агар, либо только край колонии (шварм) вырастает в агар с радиально или концентрически исчерченной поверхностью, либо колонии в виде башен неправильной формы из плотной слизи со складчатой поверхностью	г
в	палочки прямые или слегка изогнутые (0,5-1x1,5-4 мкм); подвижны; облигатные аэробы	<i>Pseudomonas</i>
вв	клетки от коккобацилл до тонких палочек, часто расположены в виде V-форм; неподвижны, не обладают скольльзящим движением; не используют фумарат в качестве акцептора электронов в анаэробных условиях	<i>Flavobacterium</i>
ввв	клетки плеоморфные: палочковидные, короткие или длинные, иногда спиральные (0,3-0,7x5-60 мкм), с закругленными или конусовидными концами, способны к скольльзящему движению; используют фумарат в анаэробных условиях	д

г	клетки короткие, цилиндрические с тупо закругленными концами; микоспоры сходны с вегетативными клетками	семейство Polyangiaceae
гг	клетки с заостренными концами, микроцисты образуются	е
д	микроцисты не образуются	<i>Cytophaga</i>
дд	микроцисты образуются	<i>Sporocytophaga</i>
е	микроцисты сферические или овальные	Семейство Мухососсасеae
ее	микроцисты палочковидные	ж
ж	микроцисты в спорангиях	Семейство Cystobacteraceae

Грамположительные бактерии

1	клетки палочковидные, прямые (0,3-2,2x1,2-7,0 мкм), обычно подвижные, часто соединены в цепочки; образуют термоустойчивые эндоспоры; содержание Г+Ц в ДНК от 32 до 62 мол %	<i>Bacillus</i> ¹
2	неспоробразующие плеоморфные палочки, может образовываться субстратный мицелий на ранних стадиях развития, с возрастом фрагментируются на палочковидные и кокковидные элементы; характерен особый способ обособления дочерних клеток путем раскалывания (snapping), либо изгибания (bending), приводящий к образованию V – или Y – сочетаний клеток; содержание ГЦ в ДНК 57-75 мол %	группа коринеподобных бактерий (КПБ), родственная актиномицетам
Группа коринеподобных бактерий		
	Колонии белые, кремовые, от светло-желтых до ярко-желтых	
А	имеется субстратный и воздушный мицелий, гифы первичного мицелия тонкие (0,5-0,8 мкм), ветвящиеся, искривленные, с возрастом распадаются на короткие палочки и кокковидные клетки, аэробы; колонии с гладкой пастообразной либо кожистой поверхностью	
а	воздушные гифы делятся с возрастом на цилиндрические фрагменты, превращающиеся в артроспоры; I тип клеточной стенки (LL-ДАПК, глицин), менахиноны МК-8(H ₄), арабиноза отсутствует	<i>Nocardioides</i> ²
аа	воздушный мицелий слабый, стерильный, развивается лишь на некоторых средах, для гиф субстратного мицелия характерны утолщенные участки различной величины и формы; VI тип клеточной стенки (лизин), как правило, нет галактозы	<i>Promicromono spora</i>
Б	воздушный мицелий отсутствует; субстратный мицелий распадается с возрастом на палочковидные и кокковидные элементы	
а	колонии после соскабливания их петлей оставляют четкий след на поверхности среды (ободок), благодаря вращению в агар субстратного мицелия; после фрагментации мицелия клетки могут приобретать подвижность; VI тип клеточной стенки (лизин), как правило, имеется галактоза; факультативные анаэробы	<i>Oerskovia</i>

aa	колонии в молодом возрасте паукообразные, зрелые – гладкие, с цельным краем, имеется ветвящийся субстратный мицелий; VII тип клеточной стенки (ДАМК; глицин); основные менахиноны МК-12; микроаэрофилы до аэробов	<i>Agromyces</i>
B	субстратный мицелий не образуется, клетки в молодом возрасте палочковидные, часто ветвящиеся	
a	цикл развития (нитевидные или палочковидные клетки – кокки) четко выражен	б
aa	цикл развития не выражен, с возрастом палочки лишь укорачиваются, в старых культурах иногда наблюдается небольшое количество кокковых форм	в
б	колонии пастообразные, гладкие, блестящие, (клетки 0,6-1,2x1,0-0,7 мкм), распадаются на кокки через 24-72 ч в зависимости от состава среды и условий культивирования; облигатные аэробы	г
г	I тип клеточной стенки (LL-ДАПК, глицин), присутствуют глицеринтейхоевые кислоты, основной компонент фракции менахинонов МК-8(H4)	<i>Terrabacter</i> ³
гг	VI тип клеточной стенки (лизин); строгие аэробы; тейхоевые кислоты не обнаружены, основной компонент фракции менахинонов МК-9 (H2); характерный обитатель почв	<i>Arthrobacter</i>
B	клетки палочковидные (0,5-0,6x0,7-2 мкм), прямые или слегка изогнутые, с возрастом укорачиваются, но только небольшая часть клеток превращается в кокки; окисляют и ферментируют глюкозу, разлагают целлюлозу; VIII тип клеточной стенки (орнитин); требуют биотин и тиамин для роста	<i>Cellulomonas</i>
BB	клетки плеоморфные (0,2-0,3x4-6 мкм), клюшковидной формы, с возрастом укорачиваются, иногда и до кокков; VII тип клеточной стенки (ДАМК, глицин), менахиноны МК-9; аэробы; не растут при 37°C; многие виды фитопатогены	<i>Clavibacter</i> ⁴
BBB	клетки палочковидные, короткие (0,2-1x0,5-3 мкм); аэробы, медленно и слабо подкисляют среды с углеводами; VIII тип клеточной стенки (орнитин)	д
д	содержат гликолилмуравовую кислоту, основные менахиноны МК-12,13,14; многие виды не растут без специфических факторов роста	<i>Aureobacterium</i>
дд	содержат ацетилмуравовую кислоту, основной изопренолог менахинонов – МК-9; предпочтительный источник углерода – ксилоза; многие виды фитопатогены	<i>Curtobacterium</i> ⁵
	Колонии от бледно-розовых и кораллово-розовых до красных; от желто-оранжевых до красно-оранжевых	
A	Цикл развития четко выражен	
a	аэробы; клетки умеренно полиморфные, на некоторых средах ветвящиеся; плохо и медленно используют углеводы, предпочтительный источник углерода – органические кислоты; III тип клеточной стенки (мезо-ДАПК), арабинозы нет; окраска культур меняется на свету от кремовой и желтой до ярко-оранжевой; обитатели сыров и молочных продуктов	<i>Brevibacterium</i>
б	IV тип клеточной стенки (ДАР, арабиноза), имеются миколовые кислоты; аэробы; способны усваивать углеводороды и ароматические соединения	в

в	деление клеток осуществляется по раскалывающемуся (snapping) типу, в культуре доминируют V-формы, клетки с четкими контурами; как правило, некислотоустойчивы, не обладают арилсульфатазной активностью, присутствует липид LCN-A, миколовые кислоты C ₃₂₋₆₆	<i>Rhodococcus</i> ⁶
вв	тип деления клеток чаще всего простой с последующим скользящим ростом концов разделившихся клеток (иллюзия ветвления), характерно "склеивание" клеток; кислотоустойчивы, не содержат липид LCN-A, миколовые кислоты C ₆₀₋₉₀ , обладают арилсульфатазной активностью ⁷ ; у фотохромогенных видов окраска зависит от освещения	<i>Mycobacterium</i>
б	В цикле развития отсутствуют палочковидные формы, кокковидные клетки прорастают с образованием конусовидных, треугольных, в виде виноградного зернышка клеток, а затем дробятся на 2-5 кокковидных клеток; VI тип клеточной стенки (лизин, часто присутствует аспарагиновая кислота)	<i>Micrococcus</i> ⁸

¹ В настоящее время бациллы относятся не к одному, а более чем к 10 родам, большинство которых представляет собой бывшие виды бацилл, переведенные в ранг рода на основании типа пептидогликана и ряду физиолого-биохимических особенностей. Названия новых родов пока не включены в существующие издания Определителя Берги, но приводятся в Списках одобренных названий бактерий (List Validly Published Bacterial Names, Braunschweig, Germany, 2002).

² В настоящее время род стал морфологически гетерогенным, особенно после перевода вида *Arthrobacter simplex*, не образующего мицелий, в *Nocardioides simplex*. Только три вида этого рода (*N. albus*, *N. luteus* и *N. prauseri*) образуют мицелий.

³ Этот род описан в 1989 г. для организма, ранее известного как *Arthrobacter tumescens*, затем – *Pimelobacter tumescens*, на основании последовательностей рРНК, состава жирных кислот и полярных липидов.

⁴ Кроме этого рода были описаны в 90-е годы (Евтушенко, 2003) роды *Rathaybacter*, *Leifsonia*, *Plantibacter*, характеризующиеся тем же составом клеточной стенки, но отличающиеся типом менахинонов и ряду физиолого-биохимических признаков. Бактерии этих родов являются ассоциантами фитопатогенных нематод.

⁵ В настоящее время многие виды, входившие ранее в состав родов *Curtobacterium* и *Aureobacterium*, переведены в род *Microbacterium*. Этот род содержит 33 вида и включает бактерии с разными

типами пептидогликана, но образующими единый кластер на филогенетическом древе с высоким уровнем сходства нуклеотидных последовательностей 16S рДНК.

⁶ В настоящее время многие виды этого рода включены в состав других родов – *Gordona*, *Tsukamurella* и др. Однако большинство представителей этих родов выделены из организма больных людей и являются патогенами.

⁷ Патогенные представители этого рода не обладают арилсульфатазной активностью.

⁸ В настоящее время многие виды этого рода переведены в статус самостоятельных родов – *Nesterenkonia* (бывший *Micrococcus halobius*), *Kocuria* (бывшие *M.roseus*, *M.varians* и *M.kristinae*), *Kytococcus* (бывший *M.nishinomiyensis*), *Dermacoccus* (*M.sedentarius*). В роде *Micrococcus* предложено оставить лишь виды *M.luteus* и *M.lylae*. Однако названия этих родов пока не вошли в существующие издания Определителя Берги.

1.7. Методы и тесты, необходимые для проведения родовой идентификации

1.7.1. Изучение культуральных и морфологических свойств бактерий

Прежде чем начинать идентификацию культуры, необходимо убедиться в ее чистоте. Для этого производят рассев биомассы из колонии на подсушенную поверхность той агаризованной среды, на которой была выделена культура из субстрата.

Пигментация бактериальных культур. Внутриклеточные и внеклеточные пигменты – наиболее наглядный признак, позволяющий провести предварительную дифференциацию колоний на чашке. Внутриклеточные пигменты сообщают окраску самой колонии, внеклеточные – диффундируют в среду и окрашивают ее.

Наиболее распространен среди бактерий желтый внутриклеточный пигмент. Он свойственен целому ряду таксономически различных бактерий: псевдомонадам, ксантобактеру, эрвиниям, флавобактериям, многим представителям кориннеподобных бактерий. Оранжево-красные пигменты образуют бактерии группы *Flavobacterium-Cytophaga*, миксобактерии, кориннеподобные бактерии родов *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*.

Причем, некоторые культуры способны образовывать оранжевый пигмент (каротиноидный) только на свету – фотохромогенные микобактерии, другие – при изменении окислительно-восстановительных условий – пропионовокислые бактерии, у третьих – наблюдается постепенное появление оранжевой окраски по мере развития культуры – бревибактерии. Розово-красные оттенки пигментации свойственны бактериям родов *Serratia*, *Rhodococcus* и *Micrococcus*. Коричневый или черный пигмент образуется многими видами бацилл и азотобактером (при старении культуры). Внутриклеточный фиолетовый пигмент характерен для культур рода *Chromobacterium*, *Janthinobacterium*, одного из видов миксобактерий. Образование внеклеточных флюоресцирующих пигментов служит важным диагностическим признаком при разделении рода *Pseudomonas* на секции. Внеклеточные желто-зеленые флюоресцирующие пигменты могут также выделяться спириллами и азотобактером. Описание условий, в которых выявляются различные пигменты псевдомонад, дано в руководстве И. Н. Скворцовой (1983).

Форма, поверхность и консистенция колоний. Культуральные признаки имеют разную таксономическую значимость в разных группах бактерий. Так, в группе грамтрицательных атипичных бактерий форма, размер и консистенция колоний практически не отличаются у представителей разных родов и имеют, следовательно, низкую диагностическую ценность. В группе спорообразующих бактерий, возможно, провести предварительную дифференциацию даже на видовом уровне, на основании формы и характера поверхности колонии (Скворцова, 1981). Колонии в виде башен из плотной слизи со складчатой поверхностью, характерные для представителей родов *Beijerinckia* и *Derxia*, сразу привлекают внимание исследователя. Специфические колонии образуют миксобактерии: либо плоские и тонкие с большим числом концентрических складок или радиальных линий, широко распространяющиеся по поверхности среды, либо складчатые, из плотной слизи, имеющие неправильную форму и растущие в виде языков или отдельных скоплений и струй. Колонии многих видов миксобактерии эродировать агар.

В группе коринеподобных бактерий диагностическую ценность имеют вращение колонии в агар, благодаря образованию

субстратного мицелия – роды *Promicromonospora* и *Nocardioides*. Этим же бактериям свойственно образование воздушного мицелия на специфических средах.

Следует отметить так же, как общую закономерность, что колонии псевдомонад, как правило, плоские и прозрачные в проходящем свете, в то время как большинство колоний коринеподобных бактерий непрозрачные (плотные), выпуклой формы, гладкие или слегка шероховатые.

Дифференциация бактерий по Граму без окрашивания. Для разделения бактерий на грамположительные и грамотрицательные (что коррелирует с особенностями химического состава клеточной стенки этих двух групп бактерий), существует стандартная процедура окрашивания по Граму. Поскольку окраска по Граму имеется во всех микробиологических руководствах, мы опускаем это описание, но даем быстрый и простой метод для дифференциации по Граму без окрашивания.

Клетки культур (лучше 1–2-суточные) помещают петлей в каплю 3 % КОН на предметное стекло, размещивают круговыми движениями и через 5–8 секунд петлю резко поднимают. Суспензия грамотрицательных бактерий становится вязкой и тянется за петлей, образуя мукоидные тяжи. Грамположительные бактерии равномерно распределяются в капле щелочи (как в воде). Реакция считается отрицательной, если образования слизистых тяжей не наблюдается в течение 60 секунд.

Увеличение вязкости вызвано лизисом клеточных стенок грамотрицательных бактерий в растворе щелочи, освобождением ДНК, с последующим увеличением вязкости.

Несмотря на высокий процент корреляции между грампринадлежностью известных культур и таковой, определенной вышеописанным методом, бывают исключения. Так, культуры целлюломонад и эрсковий, имеющие строение клеточной стенки, типичное для грамположительных бактерий, проявляют себя в тесте с КОН как грамотрицательные бактерии (образуют тяжи), в то время как грамотрицательные бактерии рода *Flavobacterium*, наоборот, не образуют вязкой массы подобно грамположительным бактериям. Вероятно, имеются и другие примеры исключений, поэтому метод дифференциации бактерий по Граму без окрашивания следует использовать лишь для предварительной диагностики, либо подсчета

примерного соотношения колоний грамположительных и грамотрицательных бактерий на чашках.

Морфологические признаки бактерий. Размеры клеток определяют в «живых препаратах» при несильном обводнении, с помощью объектмикрометра. У кокков измеряют диаметр, у других форм – длину и ширину клетки. В окуляр микроскопа вставляют окулярную линейку, для чего вывинчивают линзу окуляра, помещают на его диафрагму окулярную линейку и вновь завинчивают. На столик микроскопа кладут препарат, фокусируют объект и определяют, скольким делениям линейки соответствуют длина и ширина клетки при данном увеличении микроскопа. Измеряют не менее 10–20 клеток. Необходимо определить цену деления окулярного микрометра для данного увеличения микроскопа с помощью объективного микрометра. Объектмикрометр – это металлическая пластинка с отверстием в центре, в которое вставлено стекло. На стекло нанесена линейка длиной 1 мм, которая разделена точно на 100 частей, так что одно ее деление соответствует 10 мкм. Определение цены деления окулярной линейки производят по прописям, помещенным в практических руководствах. Результаты измерений выражают в микрометрах. Подвижность клеток определяют, используя молодую 12–24-часовую культуру, лучше всего в препарате «висячая капля». Если клетки подвижны, то они перемещаются в поле зрения в разных направлениях в отличие от броуновского движения – пассивного перемещения клеток в токе воды в одном направлении. При добавлении к препарату 0,5 % водного раствора фенола собственное движение бактерий прекращается, броуновское – остается. По характеру движения можно предположительно судить о типе жгутикования.

Если жгутики расположены на полюсах клетки, то движение обычно очень быстрое, «ввинчивающееся», без покачивания из стороны в сторону, а при латеральном или перетрихиальном расположении жгутиков клетки двигаются плавно, совершая колебательные отклонения от оси движения. В световом микроскопе жгутики не видны, требуются специальные способы предварительного протравливания и окрашивания жгутиков, чтобы они стали видимыми под световым микроскопом. В настоящее время редко используют окрашивание, требующее специальных навыков, характер жгутикования смотрят под электронным микроскопом

в препаратах, предварительно напыленных металлом. Форма клеток должна быть описана с учетом изменений в цикле развития. Хотелось бы обратить внимание на то, что форма «кокко-видных» клеток не всегда бывает такой строго-шаровидной, как ее изображают в руководствах, а сочетания клеток в виде цепочек, гроздьев или пакетов кокков не являются признаками, коррелирующими с родовой принадлежностью кокков, как считали ранее. В одной и той же культуре можно обнаружить всевозможные сочетания клеток. В культурах рода *Micrococcus* часто встречаются клетки – «треугольники», или напоминающие по форме «виноградное зернышко» – одно из подтверждений их родства с коринеподобными бактериями.

У палочковидных клеток имеет диагностическое значение форма концов клетки – она может быть округлой, тупой, квадратной, заостренной. Так, например, миксобактерии делятся на группы родов на основании формы вегетативных клеток и микоспор (рис. 3, 4).

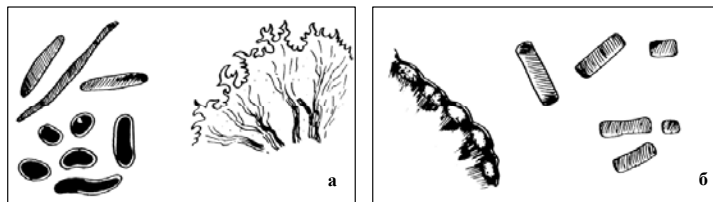


Рис. 3. Клетки, микоспоры и край колонии (шварм) миксобактерий:
а – подпорядок *Cystobacterinae*, б – подпорядок *Soranginae*

При видовой дифференциации бацилл форма концов клетки используется в качестве одного из таксономических признаков. Извитые формы подразделяются на слегка изогнутые – изгиб их меньше половины окружности (вибрионы) и с изгибом выше половины окружности (спириллы). В отличие от вибрионов клетки спирилл более длинные, толстые могут иметь один или несколько завитков в виде спирали. Тонкие, гибкие, спирально завитые бактерии с большим числом полных витков относятся к спирохетам.

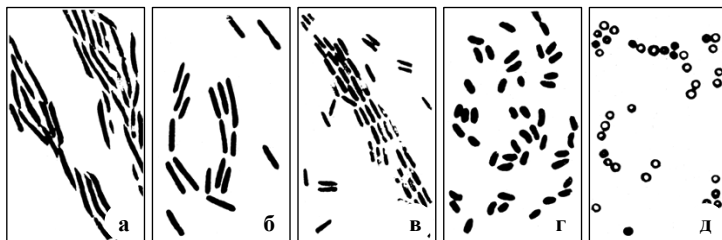


Рис. 4. Различные типы клеток миксобактерий. Вегетативные клетки: а – *Cystobacterinae*; б, в – *Soranginae*. Микроспоры: г – *Cystobacter*; д – *Myxococcus*

Следует знать, что большинство бактерий меняют свою форму в процессе развития. Наиболее четко выражен цикл развития у коринеподобных и нокардиоподобных бактерий – от ветвящегося мицелия к палочковидным (иногда подвижным) элементам и далее к кокковидным. Для представителей родов *Promicromonospora*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus* характерно доминирование кокков в старых культурах, в то время как у родов *Cellulomonas* и *Curtobacterium* обнаруживают лишь единичные кокки, большинство клеток имеют форму коротких палочек. Скорость прохождения цикла зависит как от скорости роста культуры, определяемой условиями выращивания, так и от таксономической принадлежности исследуемой бактерии.

Кокковидная форма клеток в стационарной фазе роста вовсе еще не свидетельствует о принадлежности организма к микрококкам или коринеподобным бактериям. В старых культурах кокки могут быть обнаружены у спирилл, миксобактерий, акинетобактера, алкалигенеса. В зависимости от состава среды и возраста культуры кокковидные клетки встречаются, либо доминируют у представителей родов *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum* (рис. 5, 6, 7, 8).

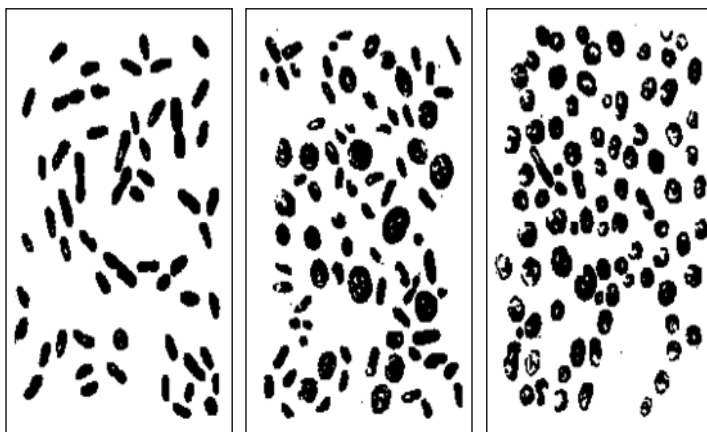


Рис. 5. Клетки разных штаммов *Azotobacter chroococcum* на безазотистой среде с глюкозой (возраст 72 часа)

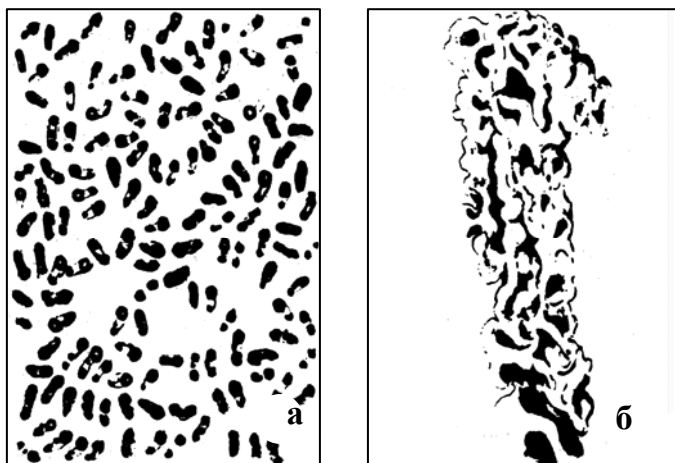


Рис. 6. Клетки *Beijerinckia indica* на безазотистой среде с глюкозой (а) и тип колонии, образуемый культурами этого рода (б)

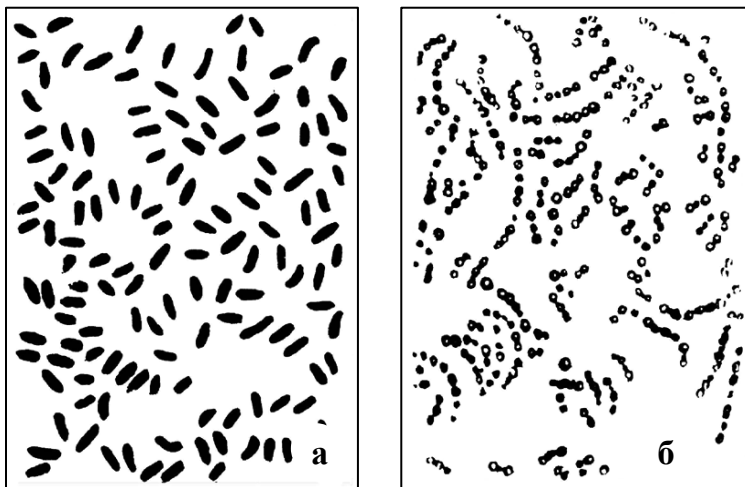


Рис. 7. Клетки культуры *Derxia gumosa* (36 часов): а – клетки на безазотистой среде с глюкозой; б – клетки на пептонном агаре с глюкозой

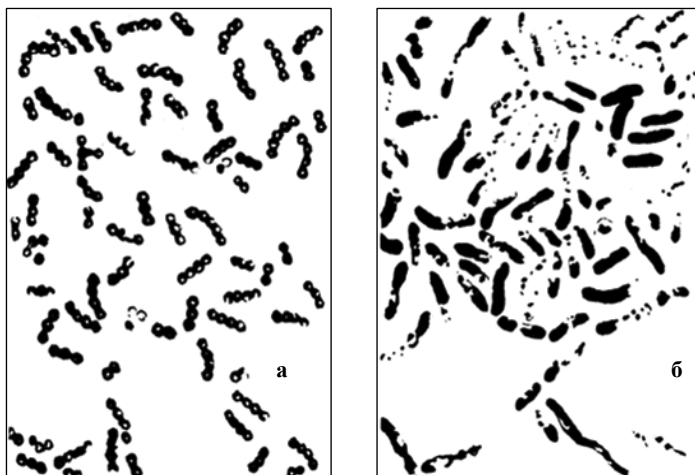


Рис. 8. Клетки *Azospirillum lipoferum* (36 часов): а – на среде с глюкозой и дрожжевым экстрактом, б – на пептонной среде

Даже псевдомонады, для которых характерны палочковидные, подвижные клетки, могут укорачиваться до кокковидных или яйцевидных форм, которые можно наблюдать в старых культурах или в хемостате при низких скоростях роста. Таким образом, необходимо последовательное микроскопическое наблюдение за культурами разного возраста: 6–24–48–72 ч, 5–7 суток – для выявления цикла развития и предварительной идентификации.

Способ деления и обособления дочерних клеток после деления имеют также диагностическое значение. У грамположительных бактерий, как правило, видна поперечная перегородка, в то время как у грамотрицательных бактерий образуется перетяжка, видимая под микроскопом. Известно три основных способа разъединения клеток после деления: простой, внезапное раскалывание клеток («snapping») и постепенное сгибание клеток («bending»). Для коринеподобных бактерий характерен 2-ой или 3-ий способ обособления клеток, приводящий к образованию V- или Y-форм (рис. 9, 10).

Такое расположение клеток наблюдается не только у коринеподобных бактерий, V-формы можно обнаружить также в культурах бацилл и флавобактерий. Этот факт является лишним подтверждением необходимости анализа всего комплекса признаков, характеризующих морфологические особенности культур, а не какого-либо одного.

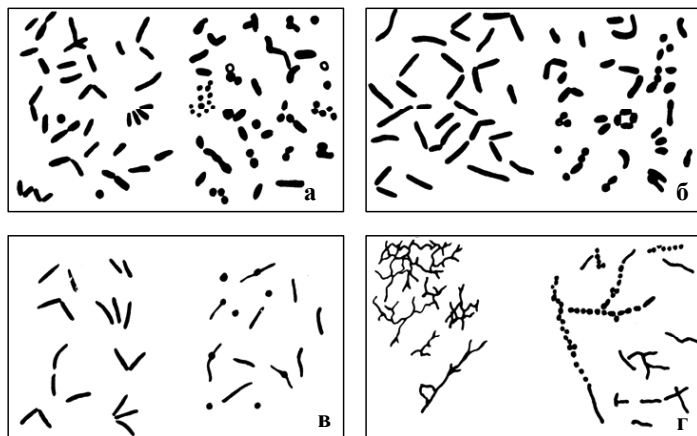


Рис. 9. Цикл развития коринеподобных бактерий: а – *Arthrobacter globiformis*, б – *Rhodococcus erythropolis*, в – *Cellulomonas sp.*, г – *Promicromonospora sp.*; на каждом из рисунков: слева – клетки через 24 часа роста, справа – через 72 часа

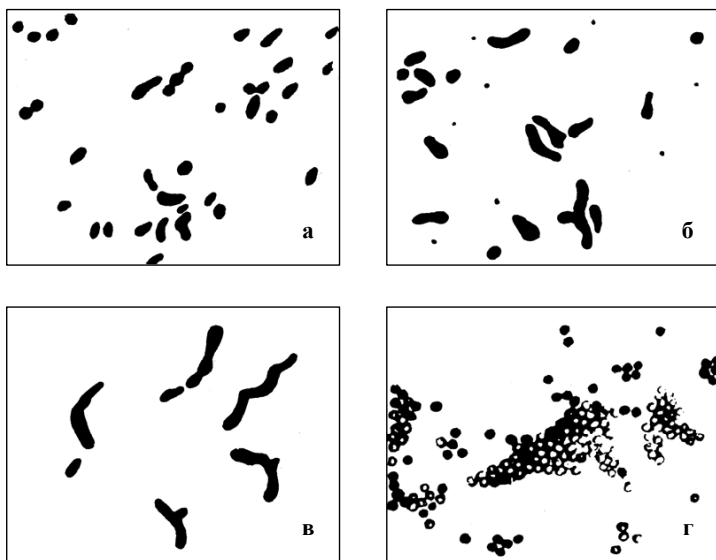


Рис. 10. Клетки *Arthrobacter globiformis* после инкубации на среде с глюкозой и дрожжевым экстрактом через: а – 6 часов; б – 12 часов; в – 24 часа; г – 72 часа

1.7.2. Проведение физиолого-биохимических тестов

Тест на оксидазу

Метод № 1. На отрезок фильтровальной бумаги наносят несколько капель 1% раствора дигидрохлорида тетраметил-п-фенилендиамина, приготовленного в тот же день.

Выросшую культуру снимают с поверхности агаровой среды платиновой петлей или стеклянной палочкой (обычные петли из нихромовой проволоки могут давать ложноположительную реакцию) и наносят ее на увлажненную бумагу. Положительная реакция: развитие фиолетовой или пурпурной окраски в течение 10 секунд. Положительный результат дает *Pseudomonas*, отрицательный – *Proteus*.

Метод № 2. Этот метод менее чувствительный, но более удобный. Несколько капель смеси (1:1 по объему) 1% раствора альфанафтола, растворенного в 95% этаноле, и свежеприготовленного 1% водного раствора оксалата диметил-п-фенилендиамина наносят на колонии в чашках с агаром. В другом варианте к жидкой

культуре добавляют 0,2 мл альфа-нафтола и 0,3 мл диметил-парафенилендиамина и энергично перемешивают. Положительная реакция – окрашивание колоний или бульонной культуры в фиолетово-синий цвет в течение 10-30 секунд.

Окислительно-ферментативный тест на использование глюкозы (тест Хью-Лейфсона)

Готовят основной раствор исследуемого углевода (обычно глюкозы), стерилизуют его путем фильтрования (или в автоклаве при 0,5 атм) и добавляют с соблюдением правил асептики при 45–50⁰С в автоклавированную полужидкую основную среду до конечной концентрации 0,5–1 %. Чаще всего используют основную среду Хью-Лейфсона:

пептон	2 г
NaCl	5 г
K ₂ HPO ₄	0,3г
бромтимоловый синий	0,03 г
агар	3 г
вода дистиллированная	1 литр

Если микроорганизмы не способны расти на этой среде из-за недостатка необходимых питательных веществ, добавляют дрожжевой экстракт (0,1 %) или сыворотку крови (2 %). Когда кислотообразование маскируется веществами щелочной природы, образующимися из пептона, можно использовать среду следующего состава:

NH ₄ H ₂ PO ₄	1 г
KCl	0,2 г
MgSO ₄	0,2 г
дрожжевой экстракт	1 г
бромтимоловый синий	0,03 г
агар	2 г
вода дистиллированная	1 литр

Если рост тестируемого организма ингибируется бромтимоловым синим, следует заменить его феноловым красным или бромкрезоловым пурпурным. Для осуществления теста пробирки с полужидкой средой, содержащей углеводы, помещают на несколько минут в кипящую водяную баню для удаления большей

части растворенного кислорода, затем их быстро охлаждают и столбики среды инокулируют микробиологической петлей. После инокуляции среду в одной из пробирок покрывают слоем 10 мм стерильного минерального масла (так называемая «анаэробная» пробирка). Среду во второй пробирке ничем не покрывают («аэробная» пробирка). Для выявления неспецифических реакций готовят контрольные пробы:

- 1) инокулируют такую же среду, не содержащую углеводов;
- 2) инкубируют стерильную среду с углеводом.

Результаты интерпретируют следующим образом.

- Если кислота образуется только в аэробной пробирке, то клетки катаболизируют углевод с использованием O_2 (реакция «О»). В этой пробирке рост должен быть заметным.
- Если подкисление происходит и в аэробной и в анаэробной пробирках, то клетки способны так же к брожению (реакция «F»). Рост должен быть замечен в обеих пробирках.
- Если кислота не образуется ни в одной из пробирок, то клетки не способны катаболизировать углевод. Если рост отсутствует, то, возможно, что в среде нет какого-либо питательного вещества, необходимого для роста изучаемого организма.

Примеры: Реакция «F» с глюкозой проявляется стафилококком (*Staphylococcus epidermidis*), реакция «О» с глюкозой – микрококком (*Micrococcus luteus*).

Тест на каталазу

Посев производят в пробирках на скошенный мясо-пептонный агар или другую среду, не содержащую крови. После инкубации вливают вниз по косяку 1 мл 3 % перекиси водорода. Сразу же и через 5 мин наблюдают за образованием пузырьков, что означает положительную реакцию.

Параллельно добавляют несколько капель 3 % перекиси водорода и к колониям на чашке или к зонам обильного роста, который может наблюдаться на поверхности полужидкой среды. В случае бульонной культуры к 0,5 мл культуры добавляют 0,5 мл 3 % перекиси водорода и наблюдают за постоянным образованием пузырьков. Некоторые бактерии, например молочнокислые, на средах с низкими концентрациями глюкозы или вообще без глюкозы образуют внегемовую «псевдокаталазу».

Образование псевдокаталазы можно предотвратить добавлением к среде глюкозы (1 %). При проверке анаэробов на каталазную активность важно перед добавлением перекиси водорода выдержать культуру на воздухе в течение 30 мин. Примеры: положительный результат агар – *Staphylococcus epidermidis*, отрицательный агар – *Streptococcus lactis*.

Тест на нуклеазы

Препарат ДНК или РНК растворяют в дистиллированной воде в концентрации, достаточной для получения 0,2 %-содержания в агаровой среде. ДНК легко растворяется в воде. Для растворения РНК в воду медленно добавляют 1 н NaOH, следя за тем, чтобы рН не был выше 5,0. В среду непосредственно, перед автоклавированием (121°C, 15 мин) добавляют раствор нуклеиновой кислоты. После охлаждения до 50°C среду разливают в чашки. Делают посев культуры штрихом на твердой среде.

После инкубации на поверхность агара наливают 1 н HCl. Положительная реакция: появление вокруг участка роста чистой зоны, что свидетельствует о наличии ДНК-азной или РНК-азной активности. Положительный результат дает *Serratia marcescens* (ДНК-аза), отрицательный (ДНК-аза) – *Enterobacter aerogenes*.

Тест на уреазу

Инокулируют скошенный агар Кристенсена с мочевиной:

пептон	1 г
глюкоза	1 г
KH ₂ PO ₄	2 г
феноловый красный	0,012 г
дрожжевой экстракт	0,1 г
агар	20 г
вода дистиллированная	1 литр.

Компоненты смешивают и доводят рН до 6,8–6,9. Смесь кипятят для растворения агара и стерилизуют автоклавированием при 0,5 атм. Охлаждают до 50°C. Добавляют с соблюдением правил асептики достаточное количество 20 % раствора мочевины (стерилизованного фильтрованием) до конечной концентрации 2 %. Перемешивают, и с соблюдением правил асептики разливают по 2–3 мл в небольшие стерильные пробирки. Охлаждают в наклон-

ном положении, при котором высота столбика равна 1,3 см, а длина скошенной части 2,5 см. Агар засевают и инкубируют. Положительный результат – появление красно-фиолетовой окраски. Положительная реакция – *Proteus vulgaris*, отрицательная – *E. coli*.

Тест на дезаминирование фенилаланина

Густо засевают скошенный агар с фенилаланином:

дрожжевой экстракт	3 г
L-фенилаланин	1 г
Na ₂ HPO ₄	1 г
NaCl	5 г
агар	12 г
вода дистиллированная	1 литр

После инкубации наносят сверху на косяк 4–5 капель 10 % раствора FeCl₂. Положительная реакция – появление зеленой окраски, свидетельствующей о появлении фенилпирувата. Положительный результат – *Proteus vulgaris*, отрицательный – *E. coli*.

Тест на аргининдегидрогеназу

Метод № 1. Инокулируют основной бульон Меллера:

пептический гидролизат животной ткани	5 г
экстракт из говяжьего мяса	5 г
бромкрезоловый красный (1,6%-ный раствор)	0,6 г
глюкоза	0,5 г
пиридоксаль	0,005 г
крезоловый красный (0,2% раствор)	2,5 г
вода дистиллированная	1 литр

Компоненты смешивают, доводят рН смеси до 6,0 или 6,5. Смесь разливают в пробирки размером 13x100 мм и стерилизуют автоклавированием при 0,5 атм. К этой среде добавляют 1 % моногидрохлорид L-аргинина (или 2 % DL-аргинин), а также контрольный бульон без аргинина. После инокуляции бульон заливают 10 мл стерильного минерального (вазелинового) масла. Пробу проверяют ежедневно в течение 4 дней. Положительная реакция – фиолетовая или красно-фиолетовая окраска. При слабой реакции образуется голубовато-серая окраска. Положительный результат – *Enterobacter cloacae*, отрицательный – *Proteus vulgaris*.

Метод № 2. Этот метод пригоден для широкого круга факультативных аэробов. Инокулируют полужидкую среду Торнли, содержащую аргинин, а также контрольную среду без аргинина. Среда Торнли:

пептон	1 г
NaCl	5 г
K ₂ HPO ₄	0,3 г
феноловый красный	0,01 г
L-аргинин HCl	10 г
агар	3 г
вода дистиллированная	1 литр.

Компоненты смешивают и доводят рН смеси до 7,2. Смесь кипятят для растворения агара и стерилизуют автоклавированием при 1 атм. После посева в столбик уколом среду герметично покрывают слоем стерильного минерального масла и инкубируют. Положительная реакция – изменение окраски от желто-оранжевой до красной в течение 7 дней.

Тест на декарбоксилазы аминокислот

Смотрят метод №1 выявления аргининдезимины. Вместо аргинина используют 1 % раствор дигидрохлорида L-орнитина, или 2 % раствор DL-формы (или лизина). Положительная реакция – *Enterobacter aerogenes*, отрицательная – *Proteus vulgaris*.

Тест на использование фумарата в анаэробных условиях

Определение потребности в формиате и фумарате применяют для выявления некоторых анаэробов, которые окисляют формиат и попутно восстанавливают фумарат в сукцинат. Готовят основной формиатно-фумаратный раствор (формиат натрия – 3 г, фумаровая кислота – 3 г, дистиллированная вода – 50 мл). Компоненты смешивают. Добавляют 20 гранул NaOH, размешивают до растворения этих гранул и фумаровой кислоты. Доводят рН смеси до 7, добавляя 10–15 капель 4 н NaOH, и стерилизуют фильтрованием. Добавляют 1 каплю раствора на 1 мл предварительно восстановленного пептонно-дрожжевого бульона:

пептон	5 г
триптиказа	5 г
дрожжевой экстракт	10 г
резазурин 0,25% раствор	4 мл

солевой раствор (см. ниже)	40 мл
раствор гемина (см. ниже)	10 мл
раствор витамина К ₁ (см. ниже)	0,2 мл
цистеин-НСl	0,5 г
вода дистиллированная	1 литр.

Автоклавируют при 0,5 атм.

Солевой раствор:

безводный CaCl ₂	0,2 г
MgSO ₄	0,5 г
K ₂ HPO ₄	1 г
KH ₂ PO ₄	1 г
NaHCO ₃	10 г
NaCl	2 г

CaCl₂ и MgSO₄ растворяют в 300 мл дистиллированной воды. Вливают 500 мл дистиллированной воды и, помешивая, добавляют остальные соли. После растворения солей добавляют ещё 200 мл дистиллированной воды.

Раствор гемина: 0,05 г гемина растворяют в 1 мл 1 н NaOH. Объем доводят дистиллированной водой до 100 мл. Автоклавируют при 0,5 атм.

Раствор витамина К₁: 0.15 мл витамина К₁ растворяют в 30 мл 95 % этанола в момент его инокуляции в атмосфере очищенной от кислорода двуокиси углерода.

Сравнивают рост на этой среде с ростом на среде без формиатно-фумаратного раствора. Положительная реакция – рост сильно стимулируется формиатно-фумаратным раствором. В некоторых случаях в отсутствие добавок вообще не наблюдается роста. Примеры: положительный результат – *Bacteroides corrolens*, отрицательный – *Bacteroides orales*.

Реакция Вогес-Проскауэра

Инокулируют две пробирки со следующей средой:

мясо-пептонный бульон	1 литр
K ₂ HPO ₄ *	5 г
глюкоза	5 г

*При испытании бактерий рода *Bacillus* в реакции Вогес-Проскауэра фосфат заменяют 5 г NaCl.

Автоклавируют при 0,5 атм. Одну пробирку инкубируют при 37°C, другую – при 25°C. Через 46 ч 1 мл культуры переносят в другую пробирку, добавляют 0,6 мл 5 % альфа-нафтола, растворенного в абсолютном этаноле и тщательно перемешивают. Затем добавляют 0,2 мл 40 % водного раствора КОН. Вновь перемешивают и инкубируют, установив пробирку наклонно для увеличения площади поверхности среды (реакция зависит от доступа кислорода). Пробирку рассматривают через 15 и 60 мин. Положительный тест – окрашивание поверхности среды в интенсивно красный цвет. Примеры: положительный результат – *Enterobacter aerogenes*, отрицательный – *E.coli*.

Тест на липазу

Метод № 1. Желточный агар в чашке Петри засевают штрихом. Желточный агар:

пептон	20 г
Na ₂ HPO ₄	2,5 г
NaCl	1 г
MgSO ₄ (0,5 % раствор)	1 мл
глюкоза	1 г
агар	12,5 г
вода дистиллированная	500 мл

Компоненты смешивают, рН смеси доводят до 7,3–7,4. Смесь кипятят до растворения агара, стерилизуют автоклавированием при 0,5 атм и охлаждают до 60°C. Скорлупу яйца дезинфицируют спиртом и дают ей обсохнуть. Яйцо разбивают и отделяют желток от белка. Желток с соблюдением правил асептики переносят в расплавленный агар и перемешивают до получения однородной суспензии. Разливают в чашки и оставляют для затвердевания.

После инкубации снимают крышку чашки и внимательно просматривают поверхность при косом освещении. Положительный результат – образование маслянистого блестящего с переливами или перламутрового слоя над колонией и вокруг нее на поверхности агара. Положительный пример – *Clostridium sporogenes*, отрицательный – *Clostridium butyricum*.

Метод № 2. Этот метод применяют для эфиров пальмитиновой, стеариновой и олеиновой кислот. Используют агаризованную среду (например, мясо-пептонный агар) с добавлением 0,01%

CaCl₂. Стерилизуют твин-40 (эфир пальмитиновой кислоты), твин-60 (эфир стеариновой кислоты) или твин-60 (эфир олеиновой кислоты) автоклавированием при 1 атм., добавляют стерильный твин в расплавленную агаризованную среду при 45–50°C до конечной концентрации 1% (по объему). Среду встряхивают до полного растворения твина, разливают по чашкам Петри, оставляют до затвердевания и засевают штрихом. Положительный результат – появление мутного ореола вокруг колоний. Примеры: положительный результат – *Pseudomonas aeruginosa*, отрицательный – *Pseudomonas putida*.

Тесты на протеиназы

К числу диагностически значимых ферментов этого класса относят желатиназу и казеиназу.

Гидролиз желатины

Метод № 1. Используют мясо-пептонный бульон, содержащий 12% желатины.

А) Пробы инкубируют при 20–22°C 6 недель. Положительная реакция – разжижение, по крайней мере, части среды. При длительной инкубации следует предотвратить испарение среды. Положительный пример – *Proteus vulgaris*, отрицательный – *E.coli*.

Б) Если температура 22°C слишком низка для роста, культуру инкубируют при оптимальной температуре, а затем охлаждают в холодильнике вместе с неинокулированной контрольной пробой. Если среда не затвердевает, то это свидетельствует о гидролизе желатины. Если среда затвердевает, то ее переносят вместе с контрольной пробой в помещение с комнатной температурой или в термостат с температурой 30°C и инкубируют в наклонном положении около 30 мин. Если среда в опытной пробе разжижается раньше, чем в контрольной, то этот результат расценивается как слабая положительная реакция.

В) Так же, как в варианте Б, но с 4 % желатины. Этот вариант более чувствителен, чем вариант Б.

Метод № 2. Это чувствительный метод, дающий возможность быстро получить результат. Бактерии выращивают в пробирке с мясо-пептонным бульоном, содержащим диски с активированным углем и желатиной. Положительная реакция – освободившиеся при гидролизе желатины частицы угля могут распределяться по всему объему среды.

Приготовление угольно-желатиновых дисков: 15 г пищевой желатины смешивают со 100 мл водопроводной воды, и смесь нагревают до растворения желатины; добавляют 3–5 г мелко измельченного активированного угля. Рекомендуется перед разливом желатины смазывать дно чашки очень тонким слоем минерального масла. После того как смесь затвердеет, ее вынимают из чашки и помещают в 10 % раствор формалина на 24 ч. Затем вырезают из затвердевшей желатины диски диаметром 1 см. Диски промывают в водопроводной воде 24 ч. Затем их кладут в бутылки с завинчивающимися крышками, заливают водой и стерилизуют 30 мин паром или повторным нагреванием в течение 20 мин на водяной бане при 90–110°C. После стерилизации сливают воду и помещают диски с соблюдением правил асептики в стерильные среды (по одному диску в пробирку). Среды инкубируют для проверки на стерильность, после чего они готовы для инокулирования.

Тест на гидролиз казеина

Стерильное (автоклавированное при 0,5 атм) снятое молоко смешивают при 50°C с равным объемом 4 % расплавленного водного агар. Чашки с инокулированной штрихом средой инкубируют до 14 дней и проверяют, не образуется ли просветления вокруг зон роста. Результат проверяют с помощью заливки среды 10 % HCl.

Примечание: образование кислоты из лактозы может подавлять гидролиз казеина, поэтому снятое молоко предварительно нужно диализовать. Положительный пример – *Bacillus polymyxa*, отрицательный – *Bacillus macerans*.

Тест на диастазу

Наличие фермента диастазы (амилазы), расщепляющего крахмал, выявляют при росте культуры на крахмало-аммиачном агаре, в котором неразложенный крахмал выявляется с помощью раствора Люголя (йод в йодистом калии). Чашки с выросшими культурами заливают раствором Люголя. Зоны вокруг колоний окрасятся либо в красно-бурый цвет – гидролиз дошел до стадии декстринов, либо они останутся бесцветными – гидролиз прошел до стадии сахаров. Наилучшие результаты в опытах по разложению крахмала получаются при работе с растворимым крахмалом. Среда, содержащая крахмал, не должна содержать глюкозы, так как в ее присутствии

гидролиз крахмала ингибируется. Положительный пример – *Bacillus subtilis*, отрицательный – *E.coli*.

Тест на наличие целлюлазы

В качестве источника углерода используют микрокристаллическую целлюлозу, либо обойный клей на основе карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). Обойный клей следует оставить в холодной воде на 2–3 часа, затем добавить минеральную основу (среда Гетчинсона) и стерилизовать при 1 атмосфере. Посев культур проводят, нанося биомассу петлей в виде штриха или мазков в виде шаровидных колоний. О наличии целлюлолитической активности судят по появлению прозрачных зон вокруг колоний. Более четкие результаты получаются после заливки чашек с выросшими культурами раствором Конго красного (0,01 % водный раствор), через 5–10 минут раствор сливают и наблюдают за появлением прозрачных зон вокруг штрихов на фоне красной среды.

Среда Гетчинсона:

K_2HPO_4	1 г
$CaCl_2$	0,1 г
$MgSO_4$	0,3 г
$NaCl$	0,1 г
$FeCl_3$	0,01 г
$NaNO_3$	2,5 г
вода дистиллированная	1 литр

pH = 7,2 – 7,3.

Тест на наличие пектиназной активности

Состав среды:

$(NH_4)_2SO_4$	2 г
KH_2PO_4	3 г
K_2HPO_4	4,5 г
дрожжевой экстракт	1,5 г
пектин	5 г
$MgSO_4$	0,3 г
агар	15 г
вода водопроводная	1 литр.

pH = 7,4.

Среду разливают по чашкам и засевают штрихом биомассу чистых культур. Инкубируют в течение 10–12 дней при комнатной температуре или 28°C. Заливают поверхность пектинового агара 2 % раствором гексадецилтриметиламмоний бромид (цетавлона), который осаждает негидролизированный пектин. Вокруг колоний бактерий, разлагающих пектин, образуются прозрачные зоны.

Тест на наличие хитиназы

Состав среды:

K_2HPO_4	0,7 г
KH_2PO_4	0,3 г
$MgSO_4$	0,5 г
$FeSO_4$	0,01 г
$ZnSO_4$	0,001 г
$MnCl_2$	0,001 г
хитин (порошок)	10 г
агар	20 г
вода дистиллированная	1 литр.

Доводят pH среды после автоклавирования до 8 стерильным 5 н раствором NaOH. Посев проводят, нанося биомассу чистых культур штрихом. Через 7–10 дней наблюдают появление прозрачных зон гидролиза хитина вокруг штрихов культур, обладающих хитиназной активностью.

Тест на использование углеводов и органических кислот

Стерилизуют 10 % растворы испытуемых веществ в воде при 0,5 атм и добавляют к основной минеральной среде Смита до конечной концентрации 0,5–1 %. Минеральная основа среды Смита содержит:

$(NH_4)_2HPO_4$	1 г
KCl	0,2 г
$MgSO_4$	0,2 г
дрожжевой экстракт	0,2 г
агар	15 г.

Перед стерилизацией устанавливают pH=7. До стерилизации вносят индикатор – бромтимоловый пурпурный в количестве 25 мл 0,04 % спиртового раствора на 1 л среды. Об использовании сахаров или кислот, а также других субстратов судят по подкисле-

нию среды, выявляемому по изменению цвета индикатора до желтого, при изменении рН в интервале 6,8–6,2. При образовании газа из субстратов наблюдаются разрывы столбика агара.

1.7.3. Методы хемотаксономического анализа.

Определение типа клеточной стенки

Выявление изомеров диаминопимелиновой кислоты (ДАПК)

(Hasegawa, Takisawa, Tanida, 1983)

Обнаружение изомеров ДАПК проводят в гидролизатах целых клеток. Биомасса изучаемой культуры в количестве одной микробиологической петли помещается в маленькую пробирку и заливается 0,1 мл 6 н НСl. Пробирка запаивается и полученная ампула автоклавируется 15 мин при 121⁰С. После охлаждения до комнатной температуры ампулу вскрывают и 10–15 мкл гидролизата наносят на хроматографическую бумагу (Ленинградская быстрая, FH-6), в качестве стандарта используется 0,1 М раствор мезо-ДАПК или гидролизат коллекционной культуры с IV типом клеточной стенки.

Для разделения аминокислот используют следующую систему растворителей: метанол: дистиллированная вода: 6 н НСl: пиридин (80:26:4:10). Разделение проходит в течение 12–14 ч. Аминокислоты проявляют опрыскиванием 0,5 %-ным раствором нингидрина в ацетоне. Хроматограммы высушивают и прогревают в течение 2 мин при 100⁰С.

Пятна ДАПК окрашены в оливково – желтый цвет, пятна других аминокислот – в пурпурный (рис. 11).

Пятна мезо ДАПК расположены ближе к линии нанесения, LL-ДАПК – дальше. В рекомендуемой системе Rf мезо-ДАПК: DL-ДАПК = 0,8.

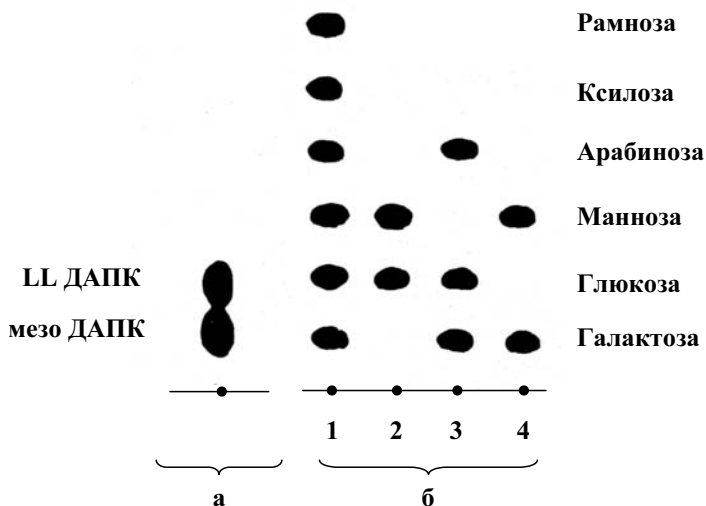


Рис. 11. Расположение на хроматограмме пятен: а - аминокислот, б - сахаров (1 - стандартная смесь, 2 - *Arthrobacter globiformis*, 3 - *Rhodococcus erythropolis*, 4 - *Brevibacterium linens*)

Выявление сахаров

(Hasegawa, Takisawa, Tanida, 1983)

Обнаружение сахаров проводят в гидролизатах целых клеток. Биомасса изучаемой культуры в количестве двух микробиологических петель помещается в маленькую пробирку и заливается 0,2 мл 0,25 н HCl. Пробирка запаивается и полученная ампула автоклавируется 15 мин при 121⁰С. После охлаждения до комнатной температуры ампула вскрывают и 20–40 мкл гидролизата наносят на хроматографическую бумагу (Ленинградская медленная, FH-6); в качестве стандарта используется раствор, содержащий галактозу, глюкозу, арабинозу, ксилозу, рамнозу в 1 % концентрации.

Для разделения сахаров используют следующую систему растворителей - бутанол:пиридин:дистиллированная вода (6:4:3). Разделение проходит в течение 36–48 ч. Сахара обнаруживают опрыскиванием хроматограммы кислым анилинфталатом: 2 мл анилина и 3,3 г фталевой кислоты растворяют в водонасыщенном бутаноле (85 мл бутанола и 15 мл воды) с последующим высушиванием

и прогреванием в течение 4 мин при 100⁰С. Пятна гексоз окрашены в буро-коричневый цвет, пентоз – в розово-коричневый. Расположение пятен представлено на рисунке 11.

Определение аминокислотного состава пептидогликана клеточной стенки

Получение препаратов клеточных стенок (Стрешинская и др., 2003). Сырую биомассу, отмытую холодной дистиллированной водой, разводят водой в соотношении 1:1 и разрушают клетки с помощью ультразвука на приборе УЗДН в течение 4–6 мин (2–3 раза по 2 мин при частоте колебаний 16–20 кГц), охлаждая суспензию во льду в промежутках между импульсами. Неразрушенные клетки отделяют центрифугированием при 2500 оборотов/мин. Осадок отбрасывают. Из супернатанта при 16000 оборотов/мин осаждают клеточную стенку. Осадок разделяется на 2 слоя: нижняя часть – неразрушенные клетки, верхняя – светлый, рыхлый слой – собственно клеточные стенки. Собирают верхний, рыхлый слой и лиофильно высушивают.

Получение и очистка пептидогликана. Пептидогликан получают по методу Эллиота, модифицированному Стрешинской с соавторами (1979). К препарату нативной клеточной стенки добавляют 10 % раствор трихлоруксусной кислоты (в соотношении 1:10) и полученную взвесь перемешивают при 4⁰ С в течение 24 ч. Осадок отделяют, подсушивают ацетоном. К 40 мг остатка клеточной стенки добавляют 10 мл раствора трипсина (1 мг/мл) в трис-НСl-буфере (рН 7,85). Смесь инкубируют 20 ч при 37⁰ С при перемешивании; фермент отмывают тем же буфером. К остаткам стенки добавляют 2 % раствор додецилсульфата натрия (DDS) и нагревают 5 мин при 100⁰С, DDS многократно отмывают дистиллированной водой. Отмытый препарат пептидогликана лиофильно высушивают.

Аминокислотный состав пептидогликана определяют на аминокислотном анализаторе после гидролиза 3–6 мг препарата пептидогликана 6N HCl в течение 18 ч при 105⁰ С по общепринятой методике (Стрешинская и др., 1979).

Тип пептидогликана определяют на основании анализа количественного соотношения аминокислот пептидной части пептидогликана по методу Шлайфера и Кандлера (Schleifer, Kandler, 1972).

Выявление ацетильных и гликолильных групп пептидогликана клеточной стенки

(Uchida, Aida, 1977)

10 мг сухой (лучше лиофилизированной) биомассы гидролизуют с 0,1 мл 4 н HCl при 100⁰ С в течение 20 ч в маленьких запаянных ампулах. Гидролизат смешивают с 0,3 мл воды, которой обмывают внутренние стенки ампулы. Полученный раствор наносят на микроколону с Dowex 50w8 (H+форма, рабочий объем 5x50 мм). Промывают колонку 1 мл дистиллированной воды и собирают на выходе из колонки промывные воды. Аликвоту (0,1 мл) анализируют на содержание гликолевой кислоты, для чего 0,1 мл исследуемого раствора осторожно смешивают с 2-мя мл 0,02% раствора 2,7-дигидроксинафталина в концентрированной H₂SO₄ и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Охлаждают и разводят 1,9 мл 2 н H₂SO₄ с охлаждением. Определяют интенсивность появившейся пурпурно-красной окраски при 530 нм. Содержание гликолевой кислоты определяют с помощью калибровочного графика.

Бактерии, имеющие в составе биомассы большие количества гликолевой кислоты (от 30 до 70 наномол/мг сухой биомассы), относятся к гликолильному типу; не содержащие или содержащие гликолевую кислоту в следовых количествах – к ацетильному типу.

Обнаружение миколовых кислот

(Minnikin et al., 1975)

Сухую (высушенную на воздухе или лиофилизированную) биомассу в количестве 100 мг смешивают с безводным метанолом (5 мл), толуолом (5 мл) и концентрированной H₂SO₄ (0,2 мл) в 20 мл пробирках с притертыми пробками. Содержимое пробирок перемешивают. Метанолиз проводят в течение 12–16 ч при 75⁰ С в сушильном шкафу.

Смесь охлаждают до комнатной температуры, добавляют 2 мл гексана, встряхивают и дают отстояться. Из верхнего гексанового слоя наносят образцы по 50–60 мкл на пластинки силикагеля – Merk silica gel H (0,5 мм) или «Silufol», и хроматографируют в системе растворителей петролейный эфир (температура кипения 60–80⁰ С):диэтиловый эфир (85:15).

Положение отдельных компонентов определяют после нагревания пластинок, обработанных раствором бихромата калия (5 г $K_2Cr_2O_7$ растворяют в 5 мл H_2O , доводят объем до 100 мл концентрированной H_2SO_4 , затем разбавляют раствор в 10 раз дистиллированной водой) при 150–200° С.

В качестве проявителя может быть также использован раствор фосфорно-молибденовой кислоты (5 % раствор фосфорно-молибденового натрия в этаноле). Расположение пятен метиловых эфиров миколовых кислот представлено на рисунке 12.

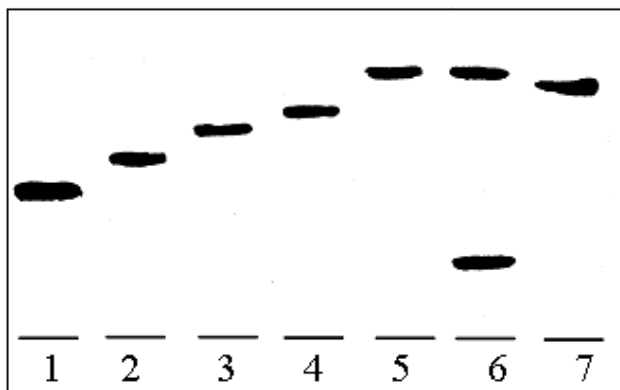


Рис. 12. Хроматограмма эфиров миколовых кислот; расположение пятен:
1 – *Corynebacterium glutamicum*, 2 – *Rhodococcus erythropolis*, 3 – *Nocardia flava*,
4 – *Nocardia asteroides*, 5 – *Mycobacterium fortuitum*, 6 – *Mycobacterium phlei*,
7 – *Mycobacterium smegmatis*

Обнаружение менахинонов

(Collins, Jones, 1981)

К 0,5–1 г лиофилизированной биомассы добавляют смесь хлороформ:метанол (2:1), суспензию перемешивают в течение 2 часов. Биомассу после экстракции удаляют с помощью стеклянных фильтров. Для препаративного выделения менахинонов хлороформ-метанольный экстракт упаривают при пониженном давлении на роторном испарителе, перерастворяют и наносят на тонкослойную пластинку «Kieselgel 60 (Merk)». Разделяют в системе растворителей: гексан:диэтиловый эфир (85:15). В качестве хроматографического стандарта используют витамин К. Менахиноны

обнаруживают при просмотре хроматографических пластинок в УФ-свете как голубые и синие пятна на желто-зеленом фоне. Менахиноны элюируют хлороформом. Длину изопrenoидной цепи и степень гидратированности устанавливают с помощью масс-спектрометрического анализа на масс-спектрометре.

Определение тейхоевых кислот

(Стрешинская и др., 2003)

Биомассу отделяют от культуральной жидкости центрифугированием, отмывают от среды и используют для получения клеточных стенок.

Клеточные стенки получают при озвучивании клеток в 0,5 % водном растворе SDS на приборе УДЗН-1 6–8 раз по 2 мин при 22 кГц с последующим нагреванием гомогената в течение 5 мин при 100°C и дальнейшим дифференциальным центрифугированием. Фракцию клеточных стенок отмывают дистиллированной водой и лиофилизируют.

Экстракцию тейхоевых кислот проводят из фракции клеточных стенок 10 % трихлоруксусной кислотой в течение 48 часов при 4°C. Экстракт отделяют от остатков клеточных стенок, диализуют против дистиллированной воды, недиализуемый остаток лиофилизируют (препарат тейхоевых кислот).

Гидролиз препаратов полимеров и клеточных стенок проводят 2 М HCl 3 часа при 100°C. Образовавшиеся продукты исследуют методами электрофореза и хроматографии на бумаге. HF-гидролиз препаратов полимеров и клеточных стенок осуществляют 40 % HF в течение 24 часов при 4°C. HF удаляют на колонке с Дауэкс 2x6 (CO₃-форма). Элюат лиофилизируют и сухой остаток используют для выделения гликозидов и полиолов методом хроматографии.

Щелочную деградацию препаратов тейхоевых кислот проводят 1М NaOH в течение 3 часов при 100°C, затем гидролизат наносят на колонку с Дауэкс 50x8 (H-форма). Элюат лиофилизируют и образовавшиеся продукты исследуют методами и электрофореза и хроматографии.

Хроматографию на бумаге проводят в следующих системах растворителей: бутанол:пиридин:бензол:вода (5:3:1:3) для разделения глюкозы, полиолов, гликозида; бутанол:уксусная кислота:вода (4:1:5) для разделения лизина и его производных.

Электрофорез на бумаге выполняют в ацетатно-пиридиновом буфере, $\text{pH} = 5,5\text{--}5,6$ для разделения фосфорных эфиров полиолов, а также лизина и его производных. Фосфорные эфиры обнаруживают реактивом Ишервуда, лизин и его амид – нингидрином, глюкозу – анилинфталатом, полиолы, гликозид и глюкозу – 5 % FeCl_3 в 0,1 М HCl . Аммонолиз, гидроксиламинолиз, установление абсолютной конфигурации лизина, распад по Смитту, структуры фосфорных эфиров рибита и гликозилрибита, а также определение мольных отношений компонентов проводят, как описано Стрешинской с соавторами (2003).

1.8. Среды и методы для выделения и учета блока аэробных и факультативно-анаэробных гетеротрофных бактерий в почвах и сопряженных субстратах

Прежде чем приводить состав сред, следует напомнить, что в 50–80-е годы XX столетия для характеристики бактериальных почвенных сообществ использовался набор сред и индексов, позволяющих оценить соотношение разных эколого-трофических групп бактерий. Посев для анализа почвенных бактерий проводили на мясо-пептонный агар для учета аммонификаторов, на крахмало-аммиачный агар – для учета бактерий, использующих минеральные формы азота. Соотношение численности бактерий, выросших на этих средах, предлагалось рассматривать как коэффициент минерализации (Мишустин, Рунов, 1957). Численность олигонитрофилов и олиготрофов определяли на среде Эшби и голодном агаре. В качестве показателя олиготрофности или педотрофности использовали соотношение количества бактерий, выросших на богатой (МПА) и бедной (почвенный или голодный агар) средах (Никитин, Никитина, 1978). Несмотря на то, что эти среды и показатели еще иногда используются в некоторых работах по почвенной микробиологии, большинство микробиологов не применяют их не только потому, что они уже устарели к настоящему времени. Многолетний опыт посева и учета почвенных бактериальных комплексов на кафедре биологии почв ф-та почвоведения МГУ позволил прийти к следующим выводам:

- Посев на МПА (состав среды взят из медицинской микробиологии) не имеет смысла для учета почвенных бактерий, так как

на ней вырастают, прежде всего, бациллы или другие быстро растущие формы, которые занимают всю поверхность чашки, не давая возможности расти другим бактериям.

- Рассуждать об учете бактерий, которые используют минеральные формы азота (на среде Чапека или др.) не совсем корректно, так как практически все бактерии используют минеральный азот, особенно его аммиачные формы, служащие основным кирпичиком для построения аминокислот.
- Поскольку те бактерии, которые выросли на МПА, способны использовать не только органический, но и минеральный азот, входящий в состав «минеральных» сред, сопоставление численности бактерий на этих средах не имеет смысла.
- Что касается индекса олиготрофности или педотрофности (Никитин, Никитина, 1978), то он тоже представляется очень условным, так как многие бактерии, выросшие на «богатых» средах, способны расти и на «бедных». Примером могут служить артробактер, спириллы, родококки, миксобактерии и др.

На основании вышесказанного мы начали работать над созданием «универсальной» среды, на которой можно было бы учитывать представителей разных эколого-трофических групп гетеротрофного комплекса бактерий-гидролитиков, копиотрофов и олиготрофов. В качестве такой среды был предложен глюкозо-пептонно-дрожжевой агар, состав которого будет дан ниже. Главное преимущество этой среды – низкие концентрации источников углерода и азота (1 г/л) и расчет на вероятность учета бактерий, использующих глюкозу, аминокислоты (гидролизат казеина), пептон, а также добавки витаминов, содержащихся в дрожжевом экстракте. При этом на данной среде вырастают и типичные олиготрофы (каулобактер), и такие гидролитики как цитофаги и миксобактерии, и такие копиотрофы как псевдомонады и энтеробактерии. В результате нам удалось выделить на этой среде представителей 50 родов бактерий, при этом доминанты бактерий были разные в различных типах почв (таблицы с перечнем родов бактерий, выделенных из почв, приведены в настоящем пособии).

Универсальные среды

Это – среды для учета общей численности аэробных или факультативно-анаэробных сапротрофных бактерий, а также дифференцированного учета следующих групп бактерий: грамотрица-

тельные неспорозные бактерии, спорообразующие и коринеподобные.

Среды для выделения бактерий из почв, растений, растительных субстратов, кишечника и экскрементов почвенных беспозвоночных:

А)

пептон	1 г
глюкоза	1 г
дрожжевой экстракт	1 г
гидролизат казеина	1 г
кальций углекислый	5 г
агар	20 г
вода водопроводная	1 литр

Б)

растворимый крахмал	10 г
казеин	1 г
Na_2HPO_4	0,5 г
дрожжевой экстракт	1 г
агар	20 г
вода водопроводная	1 литр

Поскольку бактерии, выделяемые из сфагновых болот, обитают в кислой среде, для их выделения рекомендуется также использовать ацетатный агар:

В)

ацетат натрия	0,5 г
KNO_3	0,2 г
KH_2PO_4	0,1 г
Mg SO_4	0,05 г
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 г
агар	20 г
вода водопроводная	1 литр

Фосфорной кислотой (0,1 н) рН доводится до 5,5.

Дифференцированный учет бактерий на этих средах по группам проводится на основании культуральных особенностей (диаметр, форма, консистенция, рисунок колоний, пигменты внутриклеточные и внеклеточные), теста с 3 % КОН (для разделения

на грамположительные и грамотрицательные) и микроскопии основных типов колоний.

На приведенных выше средах возможен рост, а, следовательно, и выделение практически всех родов бактерий, входящих в предложенный нами ключ. Однако часто бывают ситуации, когда учет той или иной группы бактерий невозможен в связи с доминированием в анализируемом субстрате быстрорастущих или широко распространяющихся по чашке колоний, препятствующих росту медленно растущих форм бактерий. В таких случаях необходимо использовать приемы селективного ингибирования одних групп бактерий с целью учета других.

Методы селективного ингибирования

Ингибирование спорообразующих бактерий

В некоторых типах почв или горизонтах спорообразующие бактерии мешают выделению и учету как грамотрицательных неспороносных, так и коринеподобных бактерий. Это верхние горизонты лесных и луговых почв, удобряемых почв агроценозов, торфяники.

Для ингибирования бацилл рекомендуется вносить в среду краситель метиловый красный (MR) – 150 мкг/мл среды. Краситель вносится в горячую расплавленную среду и размешивается взбалтыванием среды в колбе. В качестве среды для выделения грамотрицательных и коринеподобных бактерий могут быть использованы МПА, «универсальные» среды, либо среда с MR, предложенная Хагедорном и Хольтом, для выделения из почв артробактера (%):

триптоно-соевый агар	0,4
дрожжевой экстракт ...	0,2
NaCl	2,0
циклогексимид	0,01
метиловый красный	150 мкг/мл
агар	1,5.

Циклогексимид или нистатин – антибиотики, ингибирующие рост грибов, их добавление в среду необходимо особенно, когда посев проводят из субстратов, содержащих значительное количество грибных зачатков.

Ингибирование грамотрицательных неспороносных бактерий

В биотопах, где доминируют грамотрицательные неспороносные бактерии – филлоплана и ризоплана растений, лесные и степные подстилки, луговая дернина – затруднены учет и выделение коринеподобных бактерий, уступающих по скорости роста псевдомонадам и другим грамотрицательным формам бактерий. Для элиминирования последних нами разработаны следующие методы.

- Предварительное прогревание сухих измельченных навесок растительных субстратов в сушильном шкафу при температуре 80°C в течение 30 мин. Далее проводятся десорбция клеток с помощью обработки ультразвуком суспензий прогретых навесок и посев из разведения (от 10^{-3} до 10^{-6}).
- Обработка суспензий навесок растительных субстратов щелочью: 0,2 н раствором КОН в течение 15 мин (либо 0,3 н раствором в течение 5 мин). Для этого 1 мл суспензии того разведения, из которого будет произведен посев, переносится в пробирку с 9 мл щелочи указанной выше концентрации, пробирка встряхивается и выдерживается в течение 5 (или 15 мин) в зависимости от используемой концентрации, далее производится высеивание из этих пробирок на чашки обычным методом посева из разведений.

В обоих случаях (подсушивание, либо обработка щелочью) резко снижается число грамотрицательных неспороносных бактерий, чувствительных как к высушиванию, так и действию щелочей. При этом становится возможным учет всех медленно растущих форм: актиномицетов, нокардий, коринеподобных бактерий.

Ингибирование вегетативных клеток бактерий

Оно осуществляется с целью учета в почвах спорообразующих бактерий, эндоспоры которых устойчивы к нагреванию. Существует общепринятый метод прогрева почвенных суспензий перед посевом при 80°C в течение 10 мин, при этом погибают все вегетативные клетки, а оставшиеся жизнеспособными споры бацилл, прорастают при высеве прогретых суспензий на питательные среды.

При использовании такого приема учитываются лишь те клетки спорообразующих бактерий, которые находятся в субстрате в виде спор, в то время как бациллы могут находиться

в почве и в активном состоянии – т.е. в вегетативной форме; поэтому численность спорообразующих бактерий, определяемая методом прогрева суспензий, как правило, занижена.

Поскольку спорообразующие бактерии имеют специфические культуральные и микроскопические особенности, их можно «узнавать» и подсчитывать на чашках. Поэтому рекомендуем проводить выделение и учет бацилл без прогревания на общепринятых средах: МПА, МПА + сусло (1:1) и других.

Специальные среды

Это среды для выделения и идентификации бактерий, принадлежащих к различным семействам или родам. Если при первичном выделении из биотопов на «универсальные» среды вырастает значительное количество бактерий, принадлежащих к различным родам, то при их изолировании в чистую культуру на ту же среду многие из них не перевиваются. Следовательно, необходим подбор специальных для рода или семейства сред для изучения чистых культур бактерий и их дальнейшей идентификации.

Если микробиолог преследует цель выделить бактерии определенного рода из разных субстратов, он должен воспользоваться как специальными средами (список которых дается ниже), так и приемами селективного ингибирования посторонних группировок. Состав сред дается по «Prokaryotes» 1981, и «Каталог культур микроорганизмов» (Пушино-Москва, 1992, под редакцией член-корр. РАН Л. В. Калакуцкого), в случае других источников (см. ссылки на авторов). Рекомендуется так же: «Методы общей бактериологии» (под редакцией Герхардта и др., Т.1), где содержатся прописи сред для бактерий разных эколого-трофических групп.

Среды для выделения грамотрицательных бактерий

Род *Pseudomonas*

Все псевдомонады хорошо растут на мясо-пептонном агаре (МПА), к которому рекомендуется добавлять глицерин (1–7 %), способствующий выявлению флюоресцирующих пигментов. Флюоресцирующий пигмент у колоний, выращенных на этой среде, может быть обнаружен только при просмотре чашек в проходящем ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм). Среды для выявления других типов пигментов псевдомонад можно найти в пособии И.Н. Скворцовой (1983).

Род *Xanthomonas*

Фитопатогенные бактерии, для которых селективной является среда с целлюбиозой в качестве источника углерода:

целлюбиоза	10 г
K ₂ HPO ₄	3 г
NaH ₂ PO ₄	1 г
NH ₄ Cl	1 г
MgSO ₄	0,3 г
агар	15 г
дистиллированная вода	1 литр

или картофельный агар (см. далее) с 1 % глюкозы.

Среда для выделения клубеньковых бактерий (*Rhizobium* и др.):

горох	50 г
сахароза	10 г
K ₂ HPO ₄	1 г
MgSO ₄	0,3 г
агар	15 г
вода водопроводная	1 литр

Горох замачивается на 12 часов в воде, затем варится 10–15 минут, фильтруется через вату. Объем полученной жидкости доводят до 1 литра. Соли добавляются в полученный отвар.

Род *Gluconobacter*:

пептон	3 г
манит	25 г
дрожжевой экстракт	5 г
агар	15 г
вода водопроводная	1 литр

Род *Alcaligenes* (картофельный агар):

очищенный картофель	200 г
глицерин или глюкоза	10-20 г
агар	20 г
вода водопроводная ...	1 литр

Картофель нарезать ломтиками, кипятить 30 мин, отфильтровать, довести объем до 1 литра.

Селективный агар для выделения представителей семейства *Enterobacteriaceae*:

пептон	10 г
NaCl	5 г
дрожжевой экстракт	5 г
агар	15 г
вода дистиллированная	1 литр

Довести рН среды до 8. К среде после автоклавирования добавляется 5 %-ный раствор додецилбензосульфата – 1 мл, 50 %-ный раствор тиосульфата – 2 мл, 1 % бромтимолблеу – 10 мл, 33 % раствор лактозы – 27 мл, 33 % раствор глюкозы – 1,2 мл рН 7,7–7,8.

Среда для идентификации бактерий рода *Plesiomonas* (семейство *Vibrionaceae*):

пептон	10 г
мясной экстракт	5 г
NaCl	5 г
соли желчных кислот	8,5 г
бриллиантовая зелень	0,0003 г
нейтральный красный	0,025 г
агар	15 г
вода водопроводная	1 литр

Довести рН среды до 7,2. Компоненты растворяются нагреванием (но не автоклавированием), среда разливается по чашкам; через 48 ч инкубации появляются белые колонии *Plesiomonas* с розовым ободком (зоной вокруг колонии).

Среда для идентификации рода *Aeromonas*:

пептон	5 г
дрожжевой экстракт	3 г
триптон	10 г
L-орнитин солянокислый	5 г
манит	1 г
инозит	10 г
Na-тиосульфат	0,4
цитрат железа	0,5
бромкрезол пурпурный	0,02

агар	3 г
вода дистиллированная	1 литр

Среда разливается в пробирки по 5 мл; инкубация при 35⁰С в течение 18–24 ч; в этой среде культуры *Aeromonas* образуют желтый осадок с пурпурным кольцом сверху.

Среда для идентификации рода *Serratia*:

тетратионат К	5 г
бромтимолбля (0,2% раствор)	25 мл
пептон	10 г
NaCl	5 г
вода дистиллированная	1 литр

Довести рН среды до 7,4. Среда разливается в пробирки по 1 мл, инокулируется, заливается слоем стерильного вазелинового масла. Через 1–2 дня в результате редукции тетратионата появляется желтый цвет, в контрольных пробирках цвет остается зеленым или становится голубым.

Среда для выделения бактерий рода *Caulobacter*:

пептон	2 г
дрожжевой экстракт	1 г
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 г
агар	10 г
вода водопроводная	1 литр

Среда для выделения бактерий родов *Aquaspirillum* и *Spirillum*:

пептон	10 г
янтарная кислота	1 г
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 г
MgSO ₄	1 г
FeCl ₃ x 6H ₂ O	0,002 г
MnSO ₄	0,002 г
агар	15 г
вода водопроводная	1 литр

рН=6,8.

Среда для выделения бактерий рода *Azospirillum*:

малат Са	10 г
K ₂ HPO ₄	1 г
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 г
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,02 г
агар	15 г
вода водопроводная	1 литр

pH =6,5.

Среда для метилотрофных бактерий:

KH ₂ PO ₄	0,8 г
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	3 г
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,8 г
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,1 г
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,002 г
метанол	5 г
метиламин	3 г
агар	15 г
вода дистиллированная	1 литр

pH=7.

Среда для выделения группы *Cytophaga – Flavobacterium* (и наблюдения за скользящим движением цитофаг):

пептонизированное молоко	1 г
дрожжевой экстракт	0,2 г
ацетат Na	0,02 г
агар	15 г
вода водопроводная	1 литр

Среды для выделения культур семейства *Azotobacteriaceae*

Основой может служить среда Федорова-Калининской, в которой меняют или прибавляют некоторые компоненты в зависимости от того, какой род необходимо выделить.

Среда Федорова-Калининской:

глюкоза	10 г
дрожжевой автолизат	100 мл
раствор микроэлементов	1 мл
KH ₂ PO ₄	0,9 г

K_2HPO_4	1,74 г
$MgSO_4$	0,3 г
$CaCl_2$	0,1 г
$NaCl$	0,5 г
$FeCl_3 \times 6H_2O$	0,01 г
агар	15 г
вода дистиллированная	1 литр

При выделении бактерий рода *Azotobacter* глюкозу заменяют маннитом; для культивирования бактерий рода *Beijerinckia* и *Derxia* обязателен молибден. При культивировании *Azospirillum* глюкозу заменяют малатом Са.

Среды для выделения миксобактерий

Целлюлозоразрушающие миксобактерии

Двуслойный целлюлозный агар.

Нижний слой: пекарские дрожжи – 0,2 %; $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0,01%; витамин B_{12} – 0,5 мкг/мл; агар – 1,5 %; рН=7,2. Эта среда разливается по чашкам и, после застывания, сверху заливается тонким слоем среды Гетчинсона (см. тест на целлюлазу), содержащей 0,4 % целлюлозы и 1,5 % агара. Двуслойный агар обеспечивает наличие четких зон лизиса вокруг выросших колоний в результате тесного контакта культур с частицами целлюлозы, так как при однослойном агаре частицы целлюлозы будут оседать на дно и, следовательно, не соприкасаться с клетками бактерий.

Навозный агар.

100 г кроличьего навоза отваривают в 1 л водопроводной воды, к полученному отвару после фильтрации через марлю добавляют 5 г крахмала, 20 г агара и стерилизуют при 0,5 атм. в течение 30 мин.

Крахмальный агар:

растворимый крахмал	20 г
K_2HPO_4	1 г
$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,1 г
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,6 г
$NaCl$	1 г
$FeCl_3$	0,01 г
NaN_3	0,25 г

агар	15 г
вода дистиллированная	1 литр

pH=7,2.

Бактериолитические миксобактерии

Отмытые клетки *E.coli* или *Micr.luteus* – 100 мг сухого веса на 100 мл питательной среды следующего состава (%):

MgSO ₄ x 7H ₂ O...	0,05
NaCl	0,6
агар	1,5

Вокруг бактериолитических колоний миксобактерий видны зоны лизиса клеток микрококков.

Дрожжелитические миксобактерии

Для выделения необходима питательная среда следующего состава (%):

пекарские дрожжи	0,5
кобаламин (витамин B ₁₂)	0,5 мкг/мл среды
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,1
агар	1,5

pH=7,2.

«Голодная» среда, стимулирующая образование плодовых тел у миксобактерий и позволяющая наблюдать за «скольжением» клеток (%):

CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,1
циклогексимид	2,5 мг/100 мл среды
агар	1,5

Циклогексимид добавляется в среду после автоклавирования.

Среды для выделения грамположительных бактерий

Среды для выделения бацилл:

Кроме МПА и (МПА+сусло) существует ряд сред для выделения видов бацилл, требовательных к источникам питания.

Среда для энтомопатогенных бацилл:

триптон	5 г
дрожжевой экстракт	15 г
глюкоза	2 г

K ₂ HPO ₄	3 г
агар	15 г
вода дистиллированная	1 литр

Среды, стимулирующие спорообразование у бактерий:

А)

пептон	5 г
мясной экстракт	3 г
MnSO ₄	0,005 г
агар	15 г
вода дистиллированная	1 литр

Б) картофельный агар.

Среды для выделения коринеподобных бактерий:

Почти все коринеподобные бактерии растут на среде с глюкозой, пептоном и дрожжевым экстрактом. Для коринеподобных бактерий, ассоциированных с растениями, оптимальной является коринебактериальная среда (КБС):

казеин-пептон	10 г
глюкоза	5 г
дрожжевой экстракт	5 г
NaCl	5 г
агар	15 г
вода дистиллированная	1 литр

pH=7,0.

При выделении бактерий рода *Cellulomonas* в этой среде глюкозу заменяют карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ), в качестве источника КМЦ удобно использовать обойный клей, который предварительно замачивают в холодной воде на 3–4 часа. Существуют селективные среды и методы выделения коринеподобных бактерий, основанные на способности многих представителей коринеформ усваивать углеводороды, спирты, ароматические соединения, нефть; среды, содержащие антибиотики, подавляющие рост других групп бактерий.

Среда Бушнелла-Хааса для выделения углеводородокисляющих коринеподобных бактерий:

NH ₄ NO ₃	1 г
K ₂ HPO ₄	1 г
KH ₂ PO ₄	1 г
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,2 г
CaCl ₂	0,02 г
FeCl ₃	Следы
агар	15 г
вода водопроводная	1 литр

В среду добавляют 2 % смеси н-алканов C₁₂–C₂₃.

Среда, содержащая спирты:

(NH ₄) ₂ HPO ₄	2 г
KH ₂ PO ₄	0,5 г
NaCl	0,5 г
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,7 г
агар	15 г
вода водопроводная	1 литр

Спирты: метанол, этанол, н-пропанол, н-бутанол – 0,5–2 % (объемная доля).

Селективная среда с антибиотиками для выделения коринеформных бактерий):

дрожжевой экстракт	2 г
мясной экстракт	1 г
гидролизат казеина	5 г
NaCl	5 г
налидиксовая кислота	20 мг/л
полимиксин В (сульфат)	40 мг/л
циклогексимид	100 мг/л
агар	15 г
вода водопроводная	1 литр.

Среда Левенштейна-Иенсена для выделения и культивирования рода *Mycobacterium*:

K ₂ HPO ₄	1,2 г
MgSO ₄	0,12 г

цитрат Mg	0,3 г
аспарагин	1,8 г
глицерин	40 мл
картофельная мука	15 г
свежие яйца	10 штук
малахитовая зелень (2 % раствор)	10 мл
вода водопроводная	1 литр.

Яйца выдерживают в спирте 30 мин и выливают в стерильную посуду, размешивают и вливают в стерильную среду, затем добавляют раствор малахитовой зелени. Среду разливают в стерильные пробирки, устанавливают в наклонном положении и коагулируют на водяной бане при 85⁰С в течение 50 мин.

Овсяный агар для стимуляции роста воздушного мицелия (Гаузе и др.,–1983). Крупу “Геркулес” (50 г) замочить на ночь в 1 л воды, кипятить 20 мин, профильтровать, остудить, довести до 1 л, добавить агар (20 г). Довести рН до 7,2.

Картофельный агар (для стимуляции роста воздушного мицелия актиномицетов и спорообразования у бацилл). 500 г очищенного и измельченного картофеля заливают 500 мл водопроводной воды и кипятят 30 мин. Затем объем картофельного отвара доводят до 1 л, фильтруют через марлю и добавляют 20 г агара и 20 г глюкозы.

ГЛАВА 2. АКТИНОМИЦЕТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ТОРФЯНИКОВ

2.1. Разнообразие актиномицетов в торфяниках

Термин «актиномицеты» объединяет широкий круг грамположительных бактерий (более 100 родов) (Звягинцев, Зенова, 2001). Большинство из них способно к формированию ветвящегося мицелия, подобного грибному, но в 5–7 раз более тонкому. Актиномицеты способны более успешно, по сравнению с другими бактериями, осваивать пространство, преодолевая зоны, в которых отсутствуют питательные вещества.

Актиномицеты представляют собой единое звено в трофической цепи экосистемы, осуществляя функции микробов-редуцентов. Основная роль мицелиальных прокариот (актиномицетов) состоит в разложении сложных полимеров – лигнина, хитина, ксилана, целлюлозы, гумусовых соединений (Звягинцев, Зенова, 2001; Зенова, Звягинцев, 2002). Актиномицеты разлагают сельскохозяйственные и городские органические остатки.

В почве и связанных с нею растительных субстратах актиномицеты распространены широко. В настоящее время представители почти всех известных родов актиномицетов обнаружены в почве (The Prokaryotes, 1991), а для некоторых родов установлены закономерности распределения в наземных экосистемах (Звягинцев, Зенова, 2001).

Функциональная роль мицелиальных прокариот состоит как в снабжении растений элементами минерального питания, так и в пополнении пула гидролитических ферментов почвы (Звягинцев, 1987). Мицелиальная организация и функциональное сходство с грибами дает основание для выделения группы актиномицетов среди прочих бактерий сапротрофного блока и для отдельного рассмотрения экологии этих организмов в биогеоценозах.

Актиномицеты образуют темноокрашенные пигменты – меланины, являющиеся предшественниками гумусовых веществ в почве, принимая участие в формировании почвенного плодородия. Актиномицеты участвуют в накоплении в почве биологически активных веществ и формировании азотного баланса почв.

Торфяные болотные целинные и освоенные почвы широко распространены в различных природных зонах. Торфяные почвы формируются в условиях особого органно-аккумулятивного почвообразования. Специфичность местообитания оказывает влияние на микроорганизмы торфяников. В торфах обнаружена высокая численность актиномицетов, способных утилизировать труднодоступные для других бактерий субстраты (Звягинцев, Зенова, 2001; Добровольская, 2002)

Для почв верхового типа характерна низкая степень гумификации органического вещества, что неблагоприятно сказывается на развитии актиномицетов, как организмов, доминирующих на поздних стадиях сукцессии. Интенсификация гумификационного процесса активизирует развитие актиномицетов, и поэтому их численность в торфяных почвах низинного типа, где растительные остатки находятся в более разложившемся состоянии, на 2–3 порядка выше, чем в почвах верхового типа (Звягинцев и др., 1991).

Состояние органического вещества почв разных типов определяет различие в качественном составе актиномицетов, поэтому для почв олиготрофного типа характерны актиномицеты, лучше развивающиеся на органических средах и разлагающие целлюлозу. Виды, встречающиеся в почвах низинного типа, значительно активнее по своим гидролитическим свойствам, энергичнее осуществляют разложение крахмала, интенсивно гидролизуют казеин, разжижают желатину. Окультуривание торфяников влечет за собой возрастание численности актиномицетов, особенно обладающих способностью разлагать целлюлозу и лигнин (Звягинцев и др., 1995).

Традиционно в торфяных почвах регистрировали численность актиномицетов, вырастающих на крахмало-аммиачном агаре, в основном представителей рода *Streptomyces*. Применение нетрадиционных селективных приемов для выделения из почвы актиномицетов, позволило провести более полный учет представителей порядка *Actinomycetales* в низинных торфяных почвах. В результате было показано, что численность актиномицетов, принадлежащих к различным родам, достигает в верхнем горизонте величин 10^4 – 10^6 КОЕ г⁻¹, что сопоставимо с численностью актиномицетов в верхнем пахотном горизонте черноземов. При изучении микробного пула в глубоких торфах (5,5 и 7,0 м) с применением люминесцентной микроскопии было установлено, что актиномицетный

мицелий встречается на всех глубинах. Равномерное распределение представителей мицелиальных прокариот по профилю торфяных почв определяет одну из специфических черт торфяников, отличая его от почв других регионов. Для почв верхового типа длина актиномицетного мицелия колебалась от 1164 до 6938 м г⁻¹, для почв низинного типа – от 996 до 2555 м г⁻¹ (Головченко и др., 1993). В прокариотном комплексе торфяных почв актиномицетный мицелий составляет 7–25 % от биомассы бактерий. Поскольку в торфяных почвах болотных экосистем растительные остатки характерны для всей толщи торфа, присутствие там актиномицетов связано с их гидролитической деятельностью и участием в процессах минерализации органического вещества.

Использование методов селективного выделения актиномицетов (прогревание почвы перед посевом при 100°C в течение 1 ч, использование среды с пропионатом натрия и антибиотиками, длительный срок инкубации), позволило выделить из торфяных почв, помимо традиционно выделяющихся представителей рода *Streptomyces*, актиномицеты родов *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Streptoverticillium*, *Saccharomonospora* и *Saccharopolyspora*.

Специфической особенностью торфяных почв является численное преобладание (на один – два порядка) микромоноспоровых актиномицетов над стрептомицетами, что характерно как для верхних, так и для нижних слоев торфа. Зональные типы почв в этом отношении в значительной степени отличаются от торфяников, так как в них стрептомицеты всегда численно доминируют над представителями других родов (Зенова, Звягинцев, 2002). Очевидно, численное доминирование микромоноспор можно отнести за счет постоянно избыточного увлажнения торфяных почв. Микромоноспоры в торфяниках представлены необычным разнообразием видов. Здесь обнаружены виды, принадлежащие к 6 цветковым группам: *Aurantiaca*, *Cinnamomea*, *Cinnamomea vinacea*, *Cinnamomea olivacea*, *Brunnea*, *Nigra*.

Специфичность торфяных почв как среды обитания – появление анаэробных зон в связи с сезонным изменением уровня грунтовых вод и способностью удерживать большие запасы влаги – предполагают наличие в торфяных почвах микроорганизмов, в том числе и актиномицетов, способных существовать в условиях пониженного содержания кислорода в почвенном воздухе.

Подавляющее большинство ныне известных почвенных актиномицетов являются аэробными микроорганизмами с окислительным типом обмена и развитыми системами переноса электронов на кислород. В актиномицетном комплексе торфяных почв выявлено присутствие микроаэрофильных актиномицетов, численность которых меньше количества аэробных форм. Представители родов *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Actinotadura*, *Microbispora* и *Microtetraspora* оказались способными расти и выделять CO₂ при содержании кислорода в воздухе 2 %. Присутствие в торфяных почвах аэробных и микроаэрофильных актиномицетов связано, очевидно, с постоянными изменениями водно-воздушного режима, обусловленными колебаниями уровня грунтовых вод в этих почвах как в разные по влагообеспеченности годы, так и в разные сезоны. Уровень грунтовых вод на торфяных почвах является важным показателем, отражающим водный режим почв и режим минерального питания растений.

2.2. Ключ для определения родов почвенных актиномицетов, наиболее распространённых в почвах и сопряжённых с ней субстратах

КЛЮЧ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСНОВНЫХ РОДОВ АКТИНОМИЦЕТОВ

1	Споры в цепочках	2
	Споры преимущественно одиночные, иногда в парах	12
2	Споры в цепочках	
А	Цепочки короткие (четыре споры)	<i>Microtetraspora</i>
Б	Цепочки длинные	3
	Споры в парах только на воздушном мицелии	<i>Microbispora</i>
3	Клеточная стенка типа I	
А	Субстратный мицелий не образуется	<i>Sporichthya</i>
Б	Субстратный мицелий образуется	4
	Клеточная стенка иного типа	5
4	Споры на воздушном мицелии. Мицелий редко распадается на фрагменты	
А	Спороносы расположены моноподиально	<i>Streptomyces</i>
Б	Спороносы расположены мутовчато	<i>Streptovercillium</i>
	Гифы воздушного и субстратного мицелия распадаются на фрагменты	<i>Nocardioides</i>
5	Клеточная стенка типа III.	6

	Клеточная стенка иного типа	10
6	Сахара вариабельны в гидролизатах целых клеток. Эндосимбионты растений	<i>Frankia</i>
	Сахара в гидролизатах целых клеток типа В или С.	7
7	Сахара типа В. Мицелий не фрагментируется	
А	Спорангии не образуются	<i>Actinomadura</i>
Б	Спорангии образуются	8
	Сахара типа С. Мицелий может фрагментироваться	9
8	Споры подвижны. Палочковидные или извитые	<i>Spirillospora</i>
	Споры неподвижны. Спорангии на воздушном мицелии.	<i>Streptosporangium</i>
9	Споры в цепочках на воздушном мицелии, неподвижны	
	Первичный мицелий может фрагментироваться	<i>Nocardiosis</i>
	Споры подвижны. Рудиментарный мицелий делится во взаимно перпендикулярных направлениях	<i>Geodermatophilus</i>
10	Клеточная стенка типа IV. Мицелий фрагментируется	11
	Клеточная стенка типа II	
А	Спорангии отсутствуют. Короткие цепочки спор на воздушном или субстратном мицелии. Мицелий не фрагментируется	<i>Glycomyces</i>
Б	Спорангии образуются на субстратном мицелии. Споры подвижны	<i>Actinoplanes,</i> <i>Ampullariella,</i> <i>Dactylosporangium</i> <i>Pilimelia</i>
11	В клеточной стенке присутствуют миколовые кислоты.	<i>Nocardia</i>
	Миколовые кислоты отсутствуют в клеточной стенке	<i>Amycolata,</i> <i>Amycolatopsis,</i> <i>Pseudonocardia,</i> <i>Saccharopolyspora</i>
12	Спорангии отсутствуют	13
	Спорангии образуются	14
13	Термоустойчивые эндоспоры. Мицелий хорошо развит. Споры на воздушном и субстратном мицелии. Термофилы.	<i>Thermoactinomyces</i>
	Эндоспоры отсутствуют. Споры (экзоспоры) слаботермоустойчивы	15
14	По одной споре в спорангиях, расположенных на воздушном мицелии. Споры подвижны	<i>Planomonospora</i>
	Пары спор в спорангиях на воздушном мицелии. Споры подвижны	<i>Planobispora</i>
15	Клеточная стенка типа III. Мицелий хорошо развит. Одиночные споры на воздушном и субстратном (реже) мицелии	<i>Thermomonospora</i>
	Клеточная стенка иного типа	
А	Клеточная стенка типа IV. Споры преимущественно одиночные (реже в парах и коротких цепочках) на воздушном (реже субстратном) мицелии	<i>Saccharomonospora</i>
Б	Клеточная стенка типа II. Одиночные споры на субстратном мицелии	<i>Micromonospora</i>

2.3. Методологические аспекты оценки актиномицетного разнообразия в наземных экосистемах

2.3.1. Выделение актиномицетов из почв и растительных субстратов

Метод посева из разведений почвенных суспензий на плотные питательные среды является традиционно широко используемым методом для выявления и учета актиномицетов (Методы почвенной микробиологии, 1991). Преимуществом этого метода перед другими является возможность выделения чистой культуры и последующая ее идентификация.

Выделить представителей всех известных в настоящее время родов актиномицетов при посеве из разведений почвенных суспензий на какую-либо определенную питательную среду не представляется возможным, поскольку для выявления многих представителей актиномицетов требуются специальные методы, включающие ряд селективных приемов, связанных со свойствами как спор, так и мицелия этих организмов, имеющих сложные жизненные циклы. Для сравнительных экологических исследований целесообразно использовать среду и способ выделения, наиболее просто осуществимые и пригодные для выделения постоянно встречающихся в почве родов и видов актиномицетов. Для этого используют традиционный метод поверхностного посева из разведений на плотные питательные среды казеин-глицериновый агар и среду с пропионатом натрия.

Казеин-глицериновый агар:

K_2HPO_4	2 г
KNO_3	2 г
NaCl	2 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 г
$CaCO_3$	0,02 г
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 г
глицерин	10 мл
гидролизат казеина с дрожжевым экстрактом	0,3 г
агар	20 г
вода дистиллированная	1 литр

Среда с пропионатом натрия:

KH_2PO_4	0,5 г
NaH_2PO_4	0,7 г
KNO_3	0,1 г
NaCl	0,3 г
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 г
CaCO_3	0,02 г
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,0002 г
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,0002 г
$\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,00002 г
пропионат натрия	0,2 г
тиамин	0,000004 г
agar	20 г
вода дистиллированная	1 литр

В отдельных случаях для выделения традиционно называемых редкими родов актиномицетов применяют селективные приемы:

- предпосевное прогревание почвенных образцов ($100\text{--}120^\circ\text{C}$ в течение 1 ч);
- предпосевное прогревание почвенных суспензий (700°C в течение 10 мин);
- добавление в питательные среды антибиотиков: налидиксовой кислоты ($1\text{--}10$ мкг мл^{-1}) для подавления роста стелющихся бактерий; рубомицина ($1,5$ мкг мл^{-1}) для подавления роста стрептомицетов; нистатина (50 мкг мл^{-1}) для подавления роста микроскопических грибов.

В качестве селективных способов выделения стрептоспорангиев при проведении метода посева из почв и растительных субстратов можно использовать комбинацию следующих приемов: предобработка почвы раствором додецилсульфата натрия; тепловая предобработка воздушно-сухой почвы (120°C , 1 ч); питательные среды с пропионатом натрия и с гороховой мукой; добавление в среды антибиотиков: налидиксовой кислоты (1 мкг мл^{-1} среды), нистатина (50 мкг мл^{-1}) и рубомицина ($1,5$ мкг мл^{-1}); использование длительных сроков инкубации посевов (3–4 недели).

Для направленного выделения из почвы олигоспоровых актиномицетов родов *Microbispora*, *Microtetraspora* и *Actinomadura* следует применить предобработку почвы растворами хлорамина Б.

Для оценки положения представителей рода *Actinomadura* в комплексе почвенных актиномицетов применяют посев почвенных суспензий на среду с пропионатом натрия с добавлением комплекса антибиотиков (рубомидина – 1,5 мкг мл⁻¹; налидиксовой кислоты – 1,5 мкг мл⁻¹, нистатина – 50 мкг мл⁻¹) (Зенова, Звягинцев, 2002). В случае увеличения концентрации налидиксовой кислоты до 10 мкг мл⁻¹ и предобработки почвенной суспензии при 60° С в течение 10 мин происходит расширение родового спектра актиномицетов не столько за счет уменьшения «стрептомицетных» форм, сколько благодаря элиминированию немиецелиальных бактерий.

Инкубирование посевов проводят при 28–30° С в течение 2–3 недель. Подсчитывают общее число выросших колоний актиномицетов и проводят их дифференцированный учет по морфологическим типам.

2.3.2. Дифференцированный учет и идентификация актиномицетов

Для выявления на чашках с питательной средой представителей актиномицетов, относящихся к различным родам, их дифференцированного учета необходимо микроскопировать колонии в оптическом микроскопе (x 400), отмечая присутствие воздушного, субстратного мицелия, форму и тип ветвления спораносцев, наличие одиночных, двойных или цепочек спор на воздушном и/или субстратном мицелии, наличие спорангиев. Выделяют несколько морфотипов, просчитывают число колоний, относящихся к определенному морфотипу, выделяют в чистую культуру представителей каждого из обозначенных морфотипов. Для выделения актиномицетов в чистую культуру и дальнейшего культивирования используют как овсяный агар, так и органический агар 2 (Гаузе и др., 1983). Каждый выделенный штамм нумеруют, и в дальнейшем проводят идентификацию его, используя морфологические и хемотаксономические признаки.

Овсяный агар:

овсяная мука	20–65 г
агар	20 г
вода водопроводная .	1 литр

РН=7,2

Органический агар 2:

бульон Хоттингера	30 мл
пептон	5 г
NaCl	5 г
глюкоза	10 г
агар	30 г
вода водопроводная ...	1 литр

РН=7–7,2

Морфологические признаки актиноциетов определяют, выращивая культуру по методу «желобка» (Прокофьева-Бельговская, 1963) или с использованием культуры на предметном стекле, выращенной во влажной камере (Определитель бактерий Берджи, 1997). Предметные стекла с ростом мицелия микроскопируют в оптическом микроскопе.

Хемотаксономические признаки (изомеры диаминопимелиновой кислоты (ДАПк) и анализ дифференцирующих сахаров в гидролизатах целых клеток) определяют с помощью методов восходящей тонкослойной хроматографии в целлюлозном слое. Для определения ДАПк культуры актиноциетов выращивают в пробирках со скошенным агаром Гаузе 2 в течение 7 суток при 28°C. Одну или две колонии помещают в аппулу и добавляют 0,1 мл 6 н HCl. Аппулы запаивают и помещают для проведения гидролиза в сушильный шкаф при температуре 105⁰ С на 18 ч.

После охлаждения приблизительно 2 мкл гидролизата наносят на целлюлозную пластинку «Merk». В качестве стандарта на тот же лист наносят 1 мкл 0,01 М раствора ДАПк, который содержит LL- и мезо-ДАПк. Восходящая хроматография выполняется в системе растворителей – метанол : дистиллированная вода : 6н HCl : пиридин (80:26:4:10) в течение 3–5 часов.

После высушивания лист обрабатывают нингидриновым реагентом «Merk» (раствором нингидрина в ацетоне (0,1 % w/v) и нагревают в течение 2-х мин при температуре 100⁰ С для проявления пятен. Пятна обеих конфигураций ДАПк имеют оливково-зеленый цвет, быстро желтеют на воздухе. Другие аминокислоты в гидролизате образуют фиолетовые пятна и имеют другие значения Rf (быстрее двигаются на хроматограмме). Rf мезо-ДАПк меньше, чем LL-ДАПк.

Для определения дифференцирующих сахаров в гидролизатах целых клеток культуры актиномицетов выращивают в колбах с жидкой органической средой Гаузе 2 на качалке при 28° С в течение 1–4 суток в зависимости от скорости роста актиномицета. Мицелий отфильтровывают, промывают дистиллированной водой, этанолом, после чего высушивают при 28° С. Сухой мицелий растирают в ступке, 50 мг мицелия помещают в ампулу с 1 мл 1н H₂SO₄, ампулу запаивают. Гидролиз мицелия проводят в течение 1 часа на кипящей водяной бане. К гидролизату приливают насыщенный раствор Ba(OH)₂ и доводят pH раствора до 5,0–5,5. Осадок отделяют центрифугированием при 3000 оборотов мин⁻¹ в течение 5 мин. К надосадочной жидкости приливают 5 мл хлороформа и упаривают содержимое при температуре 28–37° С. Сухой остаток растворяют в 0,4 мл дистиллированной воды и 20 мкл гидролизата наносят на целлюлозную пластинку «Merk». В качестве контроля используют по 10 мкл смеси сахаров галактозы, глюкозы, маннозы, арабинозы, ксилозы (к 5 мл дисциллированной воды добавляют по 10 мкг каждого сахара). Разделение дифференцирующих сахаров проводят в системе – бензол : n-бутанол : пиридин : вода (10:50:30:30).

После высушивания хроматограммы сахара проявляют кислотным анилин-фталатом (3,25 г фталевой кислоты растворяют в 100 мл водонасыщенного бутанола и добавляют 2 мл анилина) и нагревают при температуре 100°С 3–4 мин. На хроматограмме сахара располагаются в следующем порядке от стартовой линии: галактоза, глюкоза, манноза, арабиноза, малуроza, ксилоза. Пятна гексоз на хроматограмме имеют бурую окраску, пентоз – красную.

Предварительную родовую идентификацию актиномицетов проводят по определителю Берджи (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1989; Bergey's Manual Determinative Bacteriology, 1994; Определитель бактерий Берджи, 1997). Окончательная идентификация актиномицетов до рода требует определения таких хемотаксономических показателей, как содержание в клетках менахинов, жирных кислот, фосфолипидов.

Для видовой идентификации стрептомицетов используют определитель актиномицетов (Гаузе и др., 1983). Видовую идентификацию других постоянно выделяющихся из почвы родов актиномицетов проводят по существующим ключам и «Определителю бактерий Берджи»(1997).

Родовую принадлежность культур актиномицетов мы определяли по Определителю бактерий Берджи (1997).

Культуры относили к роду *Streptomyces* по следующим показателям: наличие вегетативных гиф (диаметром 0,5–2,0 мкм), образующих обильно разветвленный воздушный мицелий, редко распадающийся на фрагменты; воздушный мицелий несет цепочки из 3–50 неподвижных спор (рис 13, 14); спороносцы прямые или спиральные, располагающиеся моноподиально или мутовчато; гидролизаты целых клеток содержат LL-диаминопимелиновую кислоту (ДАПк) и не содержат дифференцирующих сахаров (хемотип I клеточной стенки).

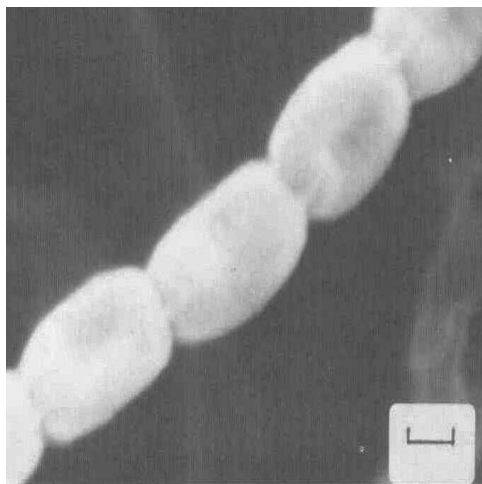


Рис. 13. Цепочка спор с гладкой поверхностью у представителей рода *Streptomyces* (шкала на фотографии соответствует 0,25 мкм) (по Bergey's Manual, 1989)

О принадлежности культур к роду *Micromonospora* предварительно судили по следующим показателям: наличие хорошо развитого, ветвящегося субстратного мицелия (диаметр 0,5 мкм); воздушный мицелий отсутствует или в виде слабого налета, стерильный; неподвижные одиночные споры сидячие или на спороносцах, часто собранные в пучки (рис. 15); гидролизаты целых клеток содержат мезо-ДАПк, ксилозу и арабинозу (хемотип II клеточной стенки).

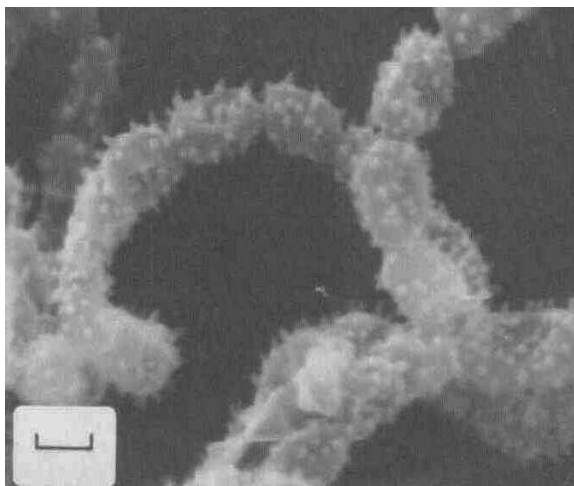


Рис. 14. Цепочки спор, имеющих на поверхности шипы у представителей рода *Streptomyces* (шкала на фотографии соответствует 0,5 мкм) (по Bergey's Manual, 1989)

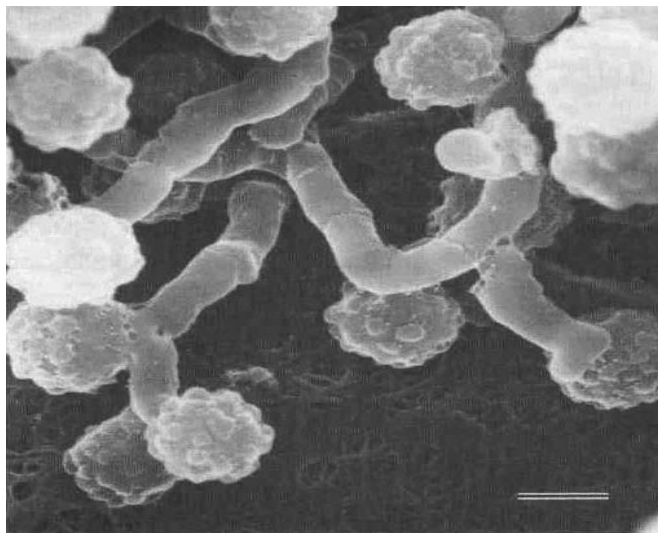


Рис. 15. Споры у *Micromonospora carbonacea* subsp. *carbonacea* (шкала на фотографии соответствует 0,5 мкм) (по Bergey's Manual, 1989)

Для представителей рода *Dactylosporangium* характерно образование пальчатых или булавовидных спорангиев с подвижными спорами на субстратном мицелии. На субстратном мицелии могут образовываться и крупные шаровидные споры, при этом настоящий воздушный мицелий отсутствует. В гидролизатах целых клеток отмечено присутствие мезо-ДАПК, ксилозы, арабинозы (хемотип II клеточной стенки).

Культуры предварительно относили к роду *Actinomadura*, если они имели: нефрагментирующийся субстратный мицелий; слабо развитый воздушный мицелий с короткими цепочками спор в виде крючков или неправильных спиралей (1–4 оборота) (рис. 16); диаметр спор, превышающий диаметр гиф и гидролизаты целых клеток содержали мезо-ДАПК, мадуросу, галактозу, глюкозу, маннозу, рибозу (хемотип III клеточной стенки).

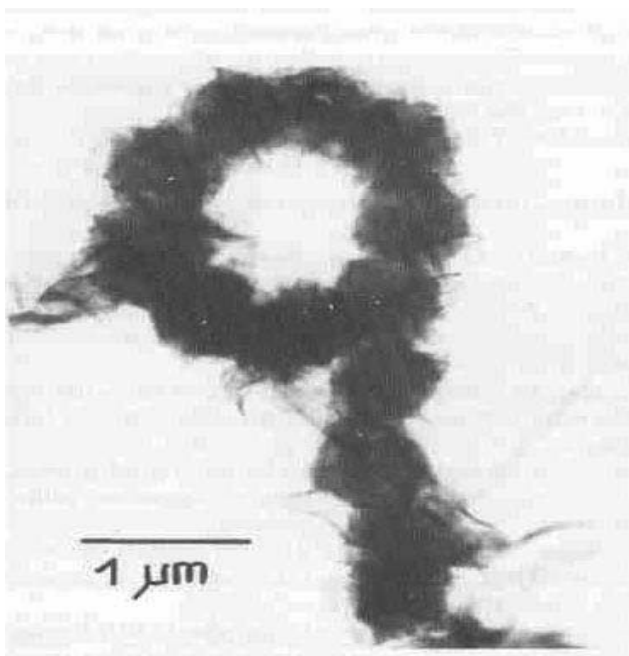


Рис. 16. Цепочка спор у представителей рода *Actinomadura*
(no Bergey's Manual, 1989)

У представителей рода *Microbispora* был отмечен не распадающийся на фрагменты разветвленный мицелий; воздушный мицелий имел характерные продольно расположенные пары спор; на субстратном мицелии споры, как правило, отсутствовали. Споры на воздушном мицелии – сидячие или на коротких спороносцах, неподвижные, обычно диаметром 1,2–1,6 мкм (рис. 17). В гидролизатах целых клеток присутствуют мезо-ДАПк и мадуроса (хемотип III клеточной стенки).

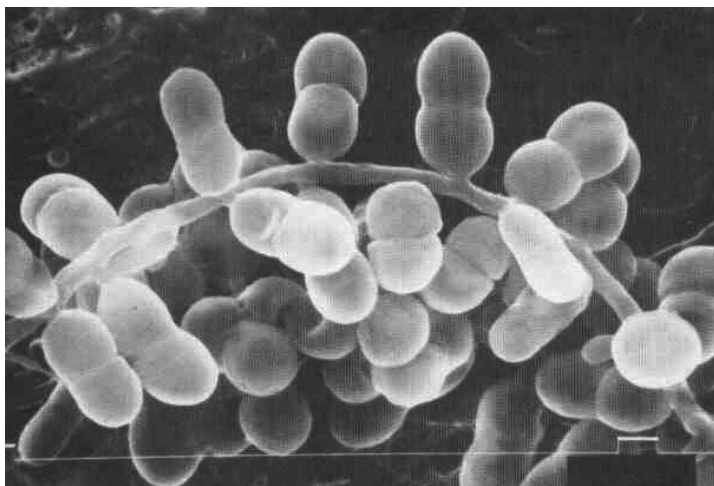


Рис. 17. Споры на гифах у представителей рода *Microbispora* (шкала на фотографии соответствует 10 мкм) (по Bergey's Manual, 1989)

Для представителей рода *Microtetraspora* характерно образование не распадающегося на фрагменты, обильно разветвленного вегетативного мицелия. Воздушные гифы обычно несут 4 неподвижные споры в цепочках. Цепочки могут быть как прямыми и крючкообразными, так и закрученными в тугую спираль (рис. 18). Воздушный мицелий может быть сине-серого, кремового, серого, розового, фиолетового, желтого или белого цвета. Гидролизаты целых клеток содержат мезо-ДАПк, глюкозу, рибозу и мадуросу, хотя последнюю иногда трудно обнаружить (хемотип III клеточной стенки).

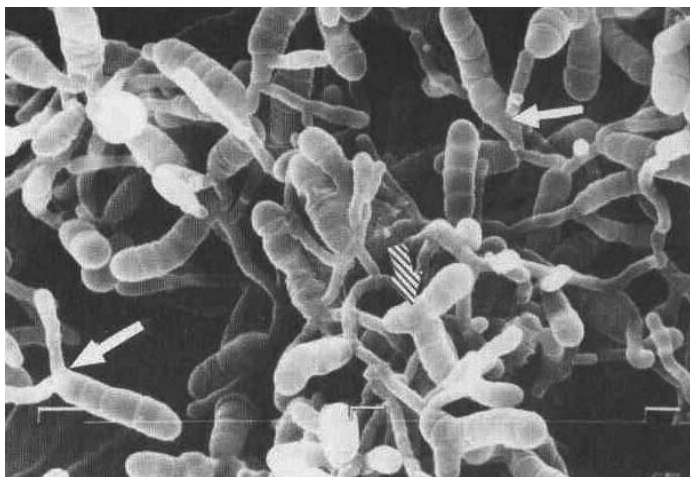


Рис. 18. Споры у *Microtetraspora niveoalba* (шкала на фотографии соответствует 10 мкм) (по Bergey's Manual, 1989)

Принадлежность к роду *Streptosporangium* предварительно определяли по следующим признакам: наличие нефрагментированного субстратного мицелия; шаровидных спорангиев (диаметром до 10 мкм) и спиральных спороносцев с неподвижными спорами, расположенных на воздушном мицелии (рис. 19). Гидролизаты целых клеток содержат мезо-ДАПК мадуросу (хемотип III клеточной стенки).

Для представителей рода *Nocardia* характерно наличие вегетативных гиф от рудиментарных до обильно ветвящихся (диаметром 0,5–1,2 мкм), растущих на поверхности агара или проникающих внутрь него. Гифы часто распадаются *in situ* на бактериоидные элементы разнообразной формы. Почти всегда образуются воздушные гифы. На гифах мицелия могут иногда присутствовать цепочки спор (рис. 20). Колонии имеют меловую, пленчатую или бархатистую поверхность коричневого, рыжеватого, розового, оранжевого, красного, серого или белого цвета. Культуры способны образовывать коричневый или желтый растворимый пигмент. В гидролизатах целых клеток присутствуют мезо-ДАПК, арабиноза и галактоза (хемотип IV клеточной стенки).

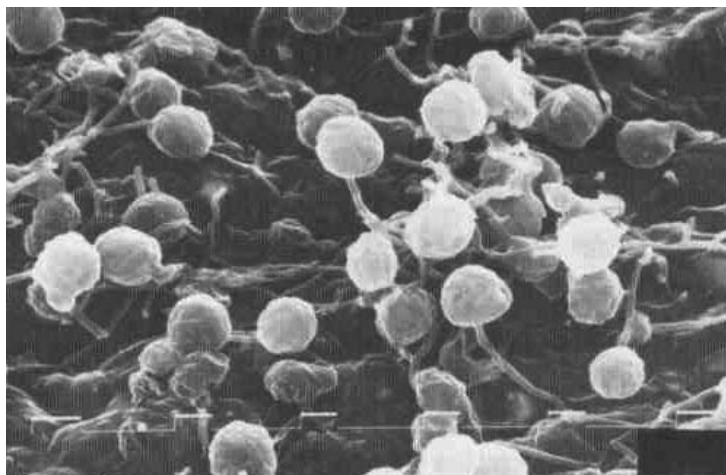


Рис. 19. Спорангии у *Streptosporangium album*. (шкала на фотографии соответствует 10 мкм (по Bergey's Manual, 1989)

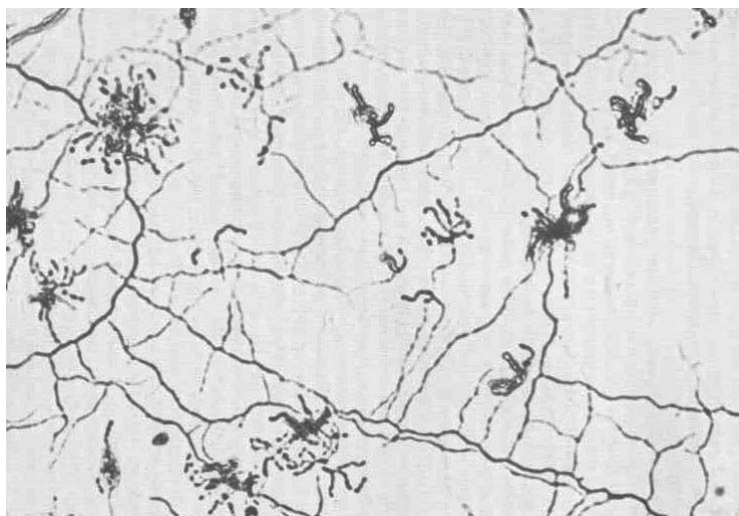


Рис. 20. Цепочки спор на воздушном и субстратном мицелии у *Nocardia asteroides* (x1250) (по Bergey's Manual, 1989)

О принадлежности к роду *Saccharomonospora* судили по наличию одиночных или, иногда, цепочек из 2–3 неподвижных сидячих алейроспор или спор на верхушках неразветвленных спороносец воздушного мицелия, иногда, спор и на субстратном мицелии, а также характерному расположению спор одна напротив другой. В гидролизатах целых клеток присутствует мезо-ДАПк и дифференцирующие сахара – арабиноза и галактоза (хемотип IV клеточной стенки).

К роду *Saccharopolyspora* предварительно относили культуры, если они имели цепочки спор на воздушных, и, иногда, субстратных гифах, которые часто распадались на палочковидные фрагменты. Гифы воздушного мицелия, прямые или спиральные, характерно сегментированы в виде бус – цепочек спор, обычно разделенных отрезками «пустых» гиф и остающихся в чехле. Цепочки спор на воздушном мицелии расположены перпендикулярно основным нитям гиф (рис. 21). В гидролизатах целых клеток присутствует мезо-ДАПк, галактоза и арабиноза (хемотип IV клеточной стенки).

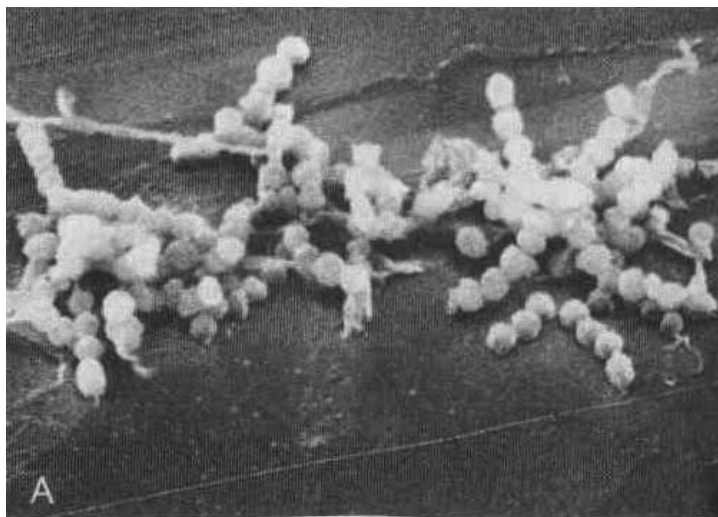


Рис. 21. Спороносящие гифы *Saccharopolyspora rectivirgula* (x3000)
(Bergey's Manual, 1989)

Для представителей рода *Kibdelosporangium* характерно наличие дихотомического ветвления гиф у субстратного мицелия, длинные цепочки спор и спорангиеподобные структуры на воздушном мицелии. В гидролизатах целых клеток присутствуют мезо-ДАПк, арабиноза, галактоза и следы мадуры (хемотип IV клеточной стенки).

У представителей рода *Thermomonospora* выявлены одиночные неподвижные артроспоры на воздушном мицелии, а иногда и на нефрагментирующемся субстратном мицелии. Споры могут быть сидячими, но часто объединены в пучки на верхушках неразветвленных и разветвленных спороносцев. В гидролизатах целых клеток присутствует мезо-ДАПк и отсутствуют дифференцирующие сахара (хемотип III клеточной стенки).

Род *Nocardiosis* отличается хорошо развитым субстратным мицелием с длинными и густоразветвленными гифами, которые могут фрагментироваться на кокковидные и палочковидные элементы. Воздушный мицелий, как правило, хорошо развитый и обильный; воздушные гифы полностью распадаются на споры. Клеточная стенка содержит мезо-ДАПк; характерные сахара отсутствуют (хемотип IV клеточной стенки).

Литература

1. Белова С. Е., Панкратов Т. А., Дедыш С. Н. Бактерии рода *Burkholderia* как типичный компонент микробного сообщества сфагновых болот // Микробиология. 2006. Т.75. № 1. С. 90–96.
2. Берестовская Ю. Ю., Лысенко А. М., Турова Т. П., Васильева Л. В. Психро-терантный *Caulobacter* из почвы заполярной тундры России // Микробиология. 2006. Т.75. № 3. С. 377–382.
3. Гаузе Г. Ф., Преображенская Т. П., Свешникова М. А., Терехова Л. П., Максимова Т. С. Определитель актиномицетов. М.: Наука. 1983. 245 с.
4. Головченко А. В., Полянская Л. М., Добровольская Т. Г., Васильева Л. В., Чернов И. Ю., Звягинцев Д. Г. Особенности пространственного распределения и структуры микробных комплексов болотно-лесных экосистем // Почвоведение. 1993. № 10. С. 78–88.
5. Гродницкая И. Д., Сорокин Н. Д. Почвенно-микробиологический мониторинг лесоболотных экосистем Западной Сибири // Почвоведение. 2004. № 8. С. 945–951.
6. Дедыш С. Н. Метанотрофные бактерии кислых сфагновых болот // Микробиология. 2002. Т. 71. № 6. С. 1–14.
7. Добровольская Т. Г., Лысак Л. В., Звягинцев Д. Г. Почвы и микробное разнообразие // Почвоведение. 1996. № 6. С. 699–704.
8. Добровольская Т. Г., Чернов И. Ю., Звягинцев Д. Г. О показателях структуры бактериальных сообществ // Микробиология. 1997. Т. 66. № 3. С. 408–414.
9. Добровольская Т. Г., Чернов И. Ю., Евтушенко Л. И., Звягинцев Д. Г. Разнообразие сапротрофных бактерий в пустынных биогеоценозах // Успехи современной биологии. 1999. Т. 119. № 2. С.151–164.
10. Добровольская Т. Г. Структура бактериальных сообществ почв. М.: Академкнига, 2002. 281 с.
11. Добровольский Г. В., Никитин Е. Д. Функции почв в биосфере и экосистемах. М.: Наука, 1990. 258 с.
12. Евтушенко Л. И. Актинобактерии: развитие систематики на примере семейств порядка Actinomycetales: Автореф. дис.... д.б.н. Пущино, 2003. 59 с.
13. Жукова Р. А. Об аэробных целлюлозных бактериях северных почв // Микробиология. 1962. Т. 31. С. 1054.
14. Заварзин Г. А., Колотилова Н. Н. Введение в природоведческую микробиологию. М.: Университет. Книжный дом, 2001. 255 с.
15. Звягинцев Д. Г. Почва и микроорганизмы. М.: МГУ, 1987. 255 с.
16. Звягинцев Д. Г., Добровольская Т. Г., Головченко А. В., Зенова Г. М., Смагина М. В. Структура сапротрофного комплекса микроорганизмов в торфяниках // Микробиология. 1991. Т.60. № 6. С.155–164.
17. Звягинцев Д. Г., Зенова Г. М., Широких И. Г., Лихачёва А. А., Грачёва Т. А. Экологическая оценка состояния актиномицетных комплексов биогеоценозов на осушенных торфяниках // Микробиология. 1995. Т. 64. № 1. С. 88–96.
18. Звягинцев Д. Г., Добровольская Т. Г., Бабьева И. П., Зенова Г. М., Лысак Л. В., Полянская Л. М., Чернов И. Ю. Структурно-функциональная организация микробных сообществ // Экология в России на рубеже XXI века (наземные экосистемы). М.: Научный мир, 1999. С.147–180.

19. Звягинцев Д. Г., Зенова Г. М. Экология актиномицетов. М.: Геос, 2001. 256 с.
20. Зенова Г. М. Почвенные актиномицеты редких родов. М.: МГУ, 2000. 81 с.
21. Зенова Г. М., Звягинцев Д. Г. Разнообразие актиномицетов в наземных экосистемах. М.: МГУ, 2002. 131 с.
22. Каталог культур микроорганизмов / Под редакцией чл.-кор. РАН Л. В. Калакуцкого. Пушкино–Москва, 1992.
23. Кожевин П. А., Полянская Л. М., Звягинцев Д. Г. Динамика развития различных микроорганизмов в почве // Микробиология. 1979. Т.48. № 4. С.490–494.
24. Куличевская И. С., Панкратов Т. А., Дедыш С. Н. Выявление представителей Planctomycetes в сфагновых болотах с использованием молекулярных и культуральных подходов // Микробиология. 2006. Т. 76. № 3. С. 329–335.
25. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхарда. М.: Мир, 1983. Т.I, II, III.
26. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д. Г. Звягинцева. М.: МГУ, 1991. 303 с.
27. Методы оценки бактериального разнообразия и идентификации почвенных бактерий. М.: МАКС Пресс, 2003. 120 с.
28. Мишустин Е. Н., Рунов Е. В. Успехи разработки принципов микробиологического диагностирования состояния почв // Успехи современной биологии. М.: АН СССР, 1957. Т. 44. С. 256–267.
29. Наплекова Н. Н. Аэробное разложение целлюлозы микроорганизмами в почвах Западной Сибири. Новосибирск: Наука, 1974. 250 с.
30. Никитин Д.И., Никитина В.С. Процессы самоочищения окружающей среды и паразиты бактерий. М.: Наука. 1978. 205 с.
31. Омельченко М. В., Васильева Л. В., Заварзин Г. А. Новый психрофильный метанотроф рода *Methylobacter* // Микробиология. 1996. Т. 65. № 3. С. 384–389.
32. Определитель бактерий Берджи. М.: Мир, 1997. Т.1. С.5–436 и Т.2. С. 437–799.
33. Панкратов Т. А., Белова С. Э., Дедыш С. Н. Оценка филогенетического разнообразия прокариотных микроорганизмов в сфагновых болотах с использованием метода FISH // Микробиология. 2005. Т. 74. № 6. С. 722–728.
34. Панкратов Т. А. Бактериальные сообщества сфагновых болот и их участие в деструкции природных полимеров. Автореф. дисс. ... к.б.н. М., 2007. 24 с.
35. Полянская Л. М. Микробная сукцессия в почве. Автореф. дисс...д.б.н. М., 1996. 96 с.
36. Прокофьева-Бельговская А. А. Строение и развитие актиномицетов. М.: АН СССР, 1963. 276 с.
37. Скворцова И. Н. Идентификация почвенных бактерий рода *Pseudomonas*. М.: МГУ, 1983. 63 с.
38. Скворцова И. Н. Методы выделения и идентификации почвенных бактерий рода *Bacillus*. М.: МГУ, 1981. 77 с.
39. Стрешинская Г. М., Козлова Ю. И., Шашков А. С., Евтушенко Л. И., Наумова И. Б. Тейхоевые кислоты клеточных стенок стрептомицетов кластера *Streptomyces suaneus* // Микробиология. 2003. Т. 72. № 4. С. 510–515.
40. Стрешинская И. Н., Наумова И. Б., Романов В. В., Шашков А. С. Структура рибитейхоевой кислоты клеточной стенки *Streptomyces azureus* 1009 // Биоорганическая химия. 1979. Т. 5. № 9. С. 1409–1418.
41. Чернов И. Ю. Микробное разнообразие: новые возможности старого метода

- // Микробиология. 1997. Т. 66. № 1. С. 107–113.
42. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // *Microbiol. Rev.* 1995. V. 59. № 1. P. 143–169.
 43. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Ed. S.T. Williams, M. Sharpe, J.A. Holt. Baltimore ets. Williams and Wilkins. Ninth Edition. 1989. V. 4. 2648 p.
 44. *Bergey's Manual Determinative Bacteriology Ninth Edition* / Ed. J. G. Holt, N.R. Krieg, Peter H.A. Smath, J.T. Stanley, S.T. Williams. Baltimore ets. Williams and Wilkins. 1994. 787 p.
 45. Collins M.D., Jones D. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications // *Microbiol. Rev.* 1981. vol. 45. p. 316–354.
 46. Dedysh S.N., Berestovskaja Y.Y., Vasilieva L.V. et al. *Methylocella tundrae* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic tundra peatlands // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004 a. V. 54. P. 151–156.
 47. Dedysh S.N., Pankratov T.A., Belova S.E., Kulichevskaya I.S. and Liesack W. Phylogenetic analysis and situ identification of Bacteria community composition in an acidic Sphagnum peat bog // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. № 3. P. 2110–2117.
 48. Dedysh S.N., Belova S.E., Bodelier P.L.E., Smirnova K.E. et al. *Methylocystis heyeri* sp. nov., a novel type 11 methanotrophic bacterium possessing signature fatty acids of type 1 methanotrophs // *IJSEM.* 2007. V. 57. P. 472–479.
 49. Gummadri S.N., Kummar D.S. Microbial pectic transeliminases // *Biotechnology Letters.* 2005. V. 27. P. 451–458.
 50. *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community.* 3rd edition. 2002. Springer-Verlag, New York. (www.prokaryotes.com).
 51. Hasegawa T., Takisawa M., Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes // *J. Gen. Microb.* 1983. V. 29. P. 319–322.
 52. Inagaki K., Nakahira K., Mukai K. et al. Gene cloning and characterization of an acidic xylanase from *Acidobacterium capsulatum* // *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 1998. P. 1061–1067.
 53. Kennedy A.C. and V.L. Gewin. Soil microbial diversity: present and future considerations // *Soil Sci.* 1997. V. 162. № 9. P. 607–617.
 54. Kotsyurbenko O.R., Friedrich M.W., Simankova M.V. et al. Shift from acetoclastic to H₂ – dependent methanogenesis in a West Siberian peat bog at a low pH and isolation of an acidophilic *Methanobacterium* strain // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. P. 2413.
 55. List Validly Published Bacterial Names, Braunschweig, Germany, 2002
 56. Minnikin D.E., Alshamaoni L., Goodfellow M. Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia* and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of cell methanolsates // *J. Gen. Microb.* 1975. V. 88. P. 200–204.
 57. Ogram A. Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future // *Soil Biol. Biochem.* 2000. V. 32. P. 1499–1504.
 58. Opelt K. and Berg G. Diversity and antagonistic potential of bacteria associated with bryophytes from nutrient-poor habitats of the Baltic sea coast // *Appl. And Environ. Microbiol.* 2004. P. 6569–6579.

59. Prokaryotes: A Handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Ed.M.P. Starr et al. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1981. vol. 1-2, pp. 1-1102, 1103-2281.
60. Rhondon M.R., Goodman R.M. and Handelsman J. The Earths bounty: assessing and accessing soil microbial diversity // Trends in Biotechnology. 1999. V. 17. P. 403-409.
61. Schleifer K.H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacteria cell walls and their taxonomic implication // Bacter. Rev. 1972. V. 36. P. 407-477.
62. Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov.// Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. V. 47. P. 479-491.
63. Torsvik V., Ovreas L. Microbial diversity and function in soil: from genus to ecosystems // Current Opinion in Microbiology. 2002. V. 5. P. 240-245.
64. Uchida K., Aida K. Acyl type of bacterial cell wall, its simple identification by colorimetric method // J.Gen. Appl. Microb. 1977. V. 23. P. 249-260.
65. Vandamme P., Pot B., Gillis M. et al. Polyphase taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics // Microbiol. Rev. 1996. Vol. 60. P. 407-438.
66. Vasilyeva L.V., Omelchenko M.V., Berestovskaya Y.Y., Lysenko A.M., Abraham W.R., Dedysh S.N., Zavarzin G.A. Asticcacaulis benevestitus sp.nov., a psychrotolerant, dimorphic, prosthecat bacterium from tundra wetland soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. P. 2083-2088.

