

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 574.583+581.526.325.2

К вопросу о методиках определения почвенных водорослей

Ю. М. БАЧУРА, О. М. ХРАМЧЕНКОВА

На начальном этапе изучения почвенных водорослей важен выбор методов, с помощью которых будет проводиться почвенно-альгологическое исследование. Для получения достоверных результатов необходимо придерживаться одинаковых методов сбора и обработки материала.

В работах исследователей ряда стран постсоветского пространства чаще всего используются методы, обзор которых изложен в М. М. Голлербахом и Э. А. Штиной [1, 2]. Однако в последнее время появляются модификации представленных методов, вызывающие интерес у специалистов-альгологов.

Целью настоящей работы был анализ классических и современных методов почвенно-альгологических исследований; подбор методов изучения качественного состава почвенных водорослей для проведения собственных исследований.

Процесс исследования почвенных водорослей состоит из следующих этапов: сбор почвенного материала; определение видового состава и количества почвенных водорослей (качественный и количественный учет); изучение морфологии, биохимии, физиологии водорослей и т. д. (при необходимости).

При сборе образцов почвы считается общепринятым соблюдение правил микробиологического исследования: стерильность инструментов, правильность этикетирования и хранения образцов, сопутствующие анализы почвы и растительного покрова [3].

Пробы почвы отбирают в бумажные конверты, предварительно простерилизованные в сушильном шкафу при температуре 130-150°C в течение 1 часа. Пробы отбирают ножом, лопаткой или совком, которые стерилизуются непосредственно в поле погружением инструмента в спирт с последующим поджиганием его либо многократным втыканием ножа (совка, лопатки) в исследуемую почву. Отобранные пробы почвы обрабатывают либо в свежем состоянии на протяжении 1-2 дней с момента сбора, либо высушивают в темном месте до воздушно-сухого состояния и хранят для дальнейшей обработки обычно от 6 месяцев до года. Размер, число и глубина взятия почвенных образцов определяются задачами исследования. При этом различают индивидуальные (отбираются при макроскопических разрастаниях водорослей на глубину 1-2 мм) и объединенные пробы (используются при проведении флористических или ценологических исследованиях, включают 5-50 индивидуальных проб, площадь каждой из которых – 1-25 см², глубина – от 2 до 5 см).

Методы, используемые для определения качественного и количественного состава почвенных водорослей, можно разделить на две группы: прямое микроскопирование свежесобранных образцов и культуральные методы обработки. **Прямое микроскопирование** [1, 2, 3, 4, 5] используется для изучения макроскопических разрастаний водорослей на поверхности почвы, а также для определения количественных характеристик водорослей (численности и биомассы). Наибольшее распространение получил прямой метод Виноградского, видоизмененный Э.А. Штиной [3]. Навеску почвы в 1 г взбалтывают 3 минуты с 4 мл дистиллированной воды, взвесь отстаивают 30 секунд и сливают в центрифужную пробирку. Опе-

рацию повторяют еще 2 раза, добавляя к осадку по 3 мл воды. Все взвеси сливают вместе. Осадок выбрасывают, а взвесь центрифугируют в течение 1 минуты при 500 об/сек. Из суспензии берут каплю жидкости и помещают ее на счетную пластинку микроскопа. Найденное число клеток умножают на коэффициент, получающийся от перемножения количества капель в 1 мл на объем всей суспензии. Повторность 5-8-кратная. Данный метод оптимален при исследовании почвенной альгофлоры, находящейся в активном состоянии, выявлении жизненных форм доминирующих видов и описании их морфологии. Недостаток прямого микроскопирования заключается в невозможности определения тех видов, которые находятся в стадии размножения или в покоящихся стадиях. По мнению И.Ю. Костикова и его коллег [4], метод позволяет исследователю правильно определить не более 20 % общего количества видов.

Культуральные методы, применяемые в почвенной альгологии, можно свести к 4 видам культур: почвенные, водные, агаровые и чистые культуры. Наиболее простым методом является **метод почвенных культур** [1, 3, 6]. Преимущества метода заключаются в его простоте, максимальном приближении к природным условиям, быстроте роста. Исследуемые пробы почвы помещают в стерильные чашки Петри и в увлажненном состоянии (до 60-100 % полной влагоемкости) выдерживают на свету. Затем производят микроскопирование почвы и определяют виды водорослей. В почвенной альгологии удачно используется модификация данного метода – **почвенные культуры со стеклами обрастания**, предложенная Ландом для выявления диатомовых водорослей [6]. В чашки Петри на поверхность увлажненной почвы на 2-3 день после посева помещают покровные стекла (до 5-6), слегка прижимая их к почве стеклянной палочкой или пинцетом до образования так называемых влажных камер (воздушных полостей, ограниченных со всех сторон прижатой к стеклу почвой). Почвенные культуры со стеклами обрастания используются для оценки видового состава водорослей, позволяют определять большинство представителей отделов *Cyanophyta*, *Bacillariophyta*, *Xanthophyta*, а также все гидрофильные водоросли, способные развиваться во влажных камерах.

При использовании **метода водных культур** [1, 2, 3] определенное количество свежесобранной почвы помещают в колбу и заливают стерильной жидкой питательной средой или водой и выдерживают на свету. Через некоторое время на стенках колбы и на поверхности воды появляются макроскопические разрастания; полученный материал рассматривают под микроскопом и определяют имеющиеся виды. На данных культурах хорошо развиваются гетеротрофные зеленые и эвгленовые водоросли, многие виды диатомовых, сине-зеленых, некоторые представители желто-зеленых. Представляет интерес разновидность метода водных культур – **водно-агаровые культуры** [4], не так давно предложенный чешским альгологом А. Лукешевым. В пробирку с предварительно приготовленным 1,5-2 % агаровым косяком добавляется жидкая питательная среда с таким расчетом, чтобы половина косяка была погружена в жидкость. Затем в жидкость вносится небольшое количество почвы из почвенной культуры, в которой уже есть макроскопические разрастания водорослей. Через несколько дней на агаре начинают развиваться колонии водорослей: почвенные виды – на поверхности агара, а водные и гидрофильные формы – в жидкой части культуры. Изменяя угол наклона жидкости, можно создавать различные условия для колоний водорослей. С помощью такого метода можно качественно определять преобладающее большинство почвенных водорослей, а также достаточно легко получать альгологически чистые культуры.

Для выявления видового состава водорослей можно использовать **агаровые культуры** [1, 2, 3]: небольшое количество почвы из свежесобранного материала или почвенной культуры высевают на 1,5-2 % агаризированную среду, где через 2-4 недели развиваются колонии разных водорослей. Здесь, как и на стеклах обрастания, быстро появляются массовые формы водорослей. На агаре хорошо разрастаются диатомовые, зеленые и сине-зеленые, в том числе и спорообразующие формы, медленно растущие на стеклах. Применение агаровых культур позволяет исследователю изучать изолированные колонии водорослей, которые возникают вокруг почвенных частиц и содержат различные стадии развития одного и того же вида.

И. Ю. Костиков предлагает методику реплики [4], которую можно использовать как для определения видов, так и для оценки их относительной численности: необходимо помес-

тить стекло обростания на поверхность агара той стороной, которая была прижата к почве в почвенной культуре. На протяжении первых 3-7 дней развитие колоний под покровным стеклом контролируют с помощью бинокля или микроскопа и составляют схему расположения колоний. Затем стекло удаляют и на 14-18 день после посева начинают определение водорослей, оценку относительной численности проводят после результатов определения водорослей, которые образовали колонии, нанесенные на схему расположения под стеклом обростания.

Для определения критических в систематическом отношении видов обычно используют **альгологически чистые культуры**, которые легко получить отсевом изолированных колоний, развивающихся в агаровых накопительных средах. В случае необходимости дополнительного очищения культуры пересев проводят через несколько пассажей до получения желаемого результата.

Представленные культуральные методы достаточно широко используются для качественного, а в некоторых случаях и количественного учета почвенных водорослей. К преимуществам культуральных методов следует отнести возможность поддержания стандартных условий выращивания, приближенных к естественным, возможность изменений условий культивирования путем корректировки состава среды, светового, температурного и водного режимов.

Нами были апробированы следующие методы качественного учета почвенных водорослей: 1) почвенные культуры со стеклами обростания, 2) агаровые культуры с использованием 1,5 % агаризированной среды Болда с нормальным содержанием азота [7], 3) альгологически чистые культуры, выращиваемые на этой же среде.

Материалом для исследования послужили объединенные образцы почв, отобранные по общепринятой в почвенной альгологии методике [1] в июле 2004 года на окраинах города Гомеля: 1) в Советском районе вблизи остановки «Солнечная», в небольшом сосняке, расположенном в 8-10 метрах от дороги, пересеченном вытоптанными практически до минеральных слоев почвы тропинками; 2) в Железнодорожном районе по улице П. Бровки, на газоне, находящемся в двух метрах от дороги, также местами вытоптанном до минеральных слоев почвы.

Культивирование проводили при постоянных условиях: температура $20 \pm 3^\circ \text{C}$, периодическое освещение с интенсивностью 1700-2500 лк с 10/14-часовым чередованием световой и темновой фаз.

Идентификацию водорослей осуществляли с помощью микроскопа Eclipse 80i (объективы 4, 40). Все культуры изучали в живом состоянии. При проведении исследований изготовлены микрофотографии с помощью камеры Nikon, встроенной в микроскоп. В данной работе ограничились определением родовых названий наиболее массовых разрастаний почвенных водорослей, полученных в культурах [7, 8, 9].

Просмотр стекол обростания начинали через 7 дней культивирования, для этого покровное стекло снимали пинцетом с почвенной культуры и, предварительно удалив с него крупные частицы почвы, помещали в каплю воды. Изучение состава почвенных водорослей, выращенных на агаровых культурах, также начинали через 1 неделю. При наблюдении использовали препарат «раздавленная капля»: в каплю дистиллированной воды на предметное стекло с помощью стерильной петли вносили исследуемые колонии и покрывали покровным стеклом. В дальнейшем анализировали почвенные и агаровые культуры на протяжении месяца через 5-6 дней. На стеклах обростания первыми появлялись представители отдела *Bacillariophyta*, а на агаровых культурах – *Chlorophyta*.

В результате проведенных исследований было обнаружено 12 массово представленных родов почвенных водорослей (табл.). Количество водорослей, выявленных с помощью методов почвенных культур со стеклами обростания, и агаровых культур одинаково в пробе №1, а в пробе №2 на агаризированной среде обнаружено на 2 рода больше (состав родов отличается в обоих случаях). Выращивая водоросли с использованием метода почвенных культур со стеклами обростания, удалось определить больше родов, относящихся к отделу *Bacil-*

lariophyta (*Pinnularia* Ehr. и *Hantzschia* Grun. в пробе №1, все представленные в таблице роды в пробе №2). При культивировании на агаризированной среде в культурах наблюдалось массовое развитие представителей отдела зеленые водоросли (*Chlorella* Beijer., *Chlorococcum* Meneg., *Stichococcus* Nägeli, *Chlamydomonas* Ehr. в обоих пробах).

Таблица.

Качественный состав водорослей в исследуемых почвах

Таксон	Проба №1		Проба №2	
	Почвенные культуры со стеклами об-растания	Агаровые культуры	Почвенные культуры со стеклами об-растания	Агаровые культуры
<i>CYANOPHYTA</i>				
<i>Oscillatoria</i> Vauch.*	+		+	+
<i>Phormidium</i> Vauch.*				+
<i>Nostoc</i> Kütz.*	+	+		+
<i>CHLOROPHYTA</i>				
<i>Chlorella</i> Beijer.**	+	+	+	+
<i>Chlorococcum</i> Me-neg.**	+	+	+	+
<i>Stichococcus</i> Nägeli**		+		+
<i>Chlamydomonas</i> Ehr.**		+		+
<i>Ulothrix</i> Kütz.**			+	
<i>BACILLARIOPHYTA</i>				
<i>Pinnularia</i> Ehr.**	+	+	+	+
<i>Navicula</i> Bory**			+	+
<i>Nitzschia</i> Hass.**			+	
<i>Hantzschia</i> Grun.**	+		+	+

Примечание: * – авторские знаки приведены по [9], ** – авторские знаки приведены по [7].

Колонии обнаруженных родов были направлены на получение альгологически чистых культур. Рост водорослей наблюдался после 1-2 недель культивирования. Полученные колонии повторно просматривали под микроскопом. На рисунках 1 и 2 представлены микрофотографии водорослей родов *Ulothrix* Kütz. и *Hantzschia* Grun. соответственно (увел. в 400 раз).



Рис. 1. *Ulothrix* Kütz. в альгологически чистой культуре (увел. в 400 раз.)



Рис. 2. *Hantzschia* Grun. в альгологически чистой культуре (увел. в 400 раз.)

Проведенные исследования указывают на возможность использования разных методов для определения почвенных водорослей. Так, прямое микроскопирование почвы удобно использовать для изучения макроскопических разрастаний, определения численности и биомассы водорослей. Различные варианты культуральных методов помогают с высокой достоверностью определять качественный состав альгофлоры. При апробировании методов на почвенных и агаровых культурах быстро появлялись наиболее массовые формы отделов *Vaccillariophyta*, *Chlorophyta*, *Cyanophyta*, которые занимают доминирующее положение в почве, а использование альгологически чистых культур позволило уточнить систематическое положение таксонов сложных для определения. В нашей республике проблемы качественного и количественного учета почвенных водорослей на протяжении последних трех десятилетий изучены в недостаточной степени, что указывает на необходимость проведения дальнейших исследований

Abstract. The paper presents the review of classical and modern methods of soil algae studies. It shows the results of soil algae cultivation with the use of the methods.

Литература

1. М. М. Голлербах, Э. А. Штина, *Почвенные водоросли*, Москва, Наука, 1969.
2. Э. А. Штина, М. М. Голлербах, *Экология почвенных водорослей*, Москва, Наука, 1976.
3. И. П. Бабьева, Г. М. Зенова, *Биология почв*, Москва, Изд-во МГУ, 1989.
4. И. Ю. Костиков, П. О. Романенко, Е. М. Демченко и др. *Водоросли почв Украины*, Киев, Фитосоциоцентр, 2001.
5. Э. А. Штина, *Методы учета почвенных водорослей как составной части почвенной микрофлоры*, Почвоведение, № 5 (1960).
6. J. W. G. Lund, *Observations on soil algae. 1. The ecology, size and taxonomy of British soil diatoms*, Ntw Phycologist, **44**, № 2 (1945), 196–219.
7. Ettl, Hanuš Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen / Hanuš Ettl; Georg Gärtner. – Stuttgart; Jena; New York: G. Fischer, 1995.
8. *Определитель низших растений* / Под общей ред. Курсанова Л. И., В 2 т., Москва. «Сов. наука», **1** (1953).
9. *Определитель низших растений* / Под общей ред. Курсанова Л. И., В 2 т., Москва. «Сов. наука», **2** (1953).