

## 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 см<sup>2</sup>, 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 *Vaccinariophyta*, *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).