

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

**Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова»**

Кафедра ботаники и микробиологии

Сдано на кафедру

«_____» _____ 2019 г.

Заведующий кафедрой

к.б.н., доцент

_____ Н.В. Шеховцова

(подпись)

Изучение бактерий штамма F-62, выделенных из почвы с признаками оглеения

(направление подготовки 06.03.01 Биология)

Научный руководитель

к.б.н., доцент

_____ Н.Ю. Пухова

(подпись)

«___» _____ 2019 г.

Студент группы Б-41 БО

_____ Ю.Ю. Хмарук

(подпись)

«___» _____ 2019 г.

Ярославль 2019 г.

РЕФЕРАТ

56 стр., 3 табл., 5 рис., 62 источника.

ШТАММ, МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА, ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ОГЛЕЕНИЕ, ЖЕЛЕЗОРЕДУКЦИЯ

Объект исследования – штамм F-62 хемоорганогетеротрофных бактерий. Цель работы: исследовать штамм F-62, выделенный из огленного горизонта дерново-слабоподзолистой глееватой почвы.

На основе стандартных микробиологических методов было выявлено, что бактерии штамма F-62 представляют собой грамположительные спорообразующие палочки, расположенные в мазке одиночно или собраны в небольшие группы по 2-4 клетки. Штамм F-62 использует 24 органических соединения в качестве единственного источника углерода и энергии, является каталазо- и оксидазоположительным, способен к азотфиксации, не обладает липолитической и протеолитической активностью. При использовании фотокolorиметрического метода определения концентрации ионов Fe^{2+} с α, α' -дипиридиллом обнаружено, что интенсивнее процесс Fe(III)-восстановления у исследованных бактерий протекает на среде Лавли с оксалатом К на всех источниках железа, процесс Fe(III)-восстановления бактериями штамма F-62 зависит от растворимости вносимого источника железа и снижается в ряду: Fe(III)-цитрат > Fe(OH)₃ > Fe₂O₃. Полученные данные говорят, что бактерии штамма F-62, обладая способностью к восстановлению различных Fe(III)-соединений, могут вносить вклад в процесс оглеения почвенного горизонта, из которого они были выделены.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1. Почва как среда обитания микроорганизмов.....	7
1.1.1. Твердая фаза почвы	8
1.1.2. Жидкая фаза почвы.....	9
1.1.3. Газовая фаза почвы.....	10
1.1.4. Концентрация ионов водорода (pH)	11
1.1.5. Окислительно-восстановительные условия (Eh).....	12
1.1.6. Температура.....	13
1.2. Биогенный цикл железа.....	15
1.3. Оглеение почв.....	17
1.4. Железоредукция	19
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	22
2.1. Изучение морфологических особенностей бактерий.....	22
2.1.1. Приготовление бактериального препарата – мазка.....	22
2.1.2. Простое окрашивание бактериального препарата	23
2.1.3. Дифференциальное окрашивание	24
2.1.3.1. Окраска по методу Грама.....	24
2.1.3.2. Окраска эндоспор и цитоплазмы по методу Пешкова.....	25
2.2. Питательные среды и условия культивирования	26
2.2.1. Мясопептонный бульон	26
2.2.2. Мясопептонный агар	26
2.2.3. Мясо-пептонная желатина	27

2.2.4. Молочный агар	27
2.2.5. Среда для изучения липолитической активности	28
2.2.6. Среда Эшби для азотфиксаторов	29
2.2.7. Среда для установления спектра используемых бактериями источников углерода и энергии.....	29
2.2.8. Среда для определения амилалитической активности	30
2.2.9. Среда Лавли.....	31
2.3. Культуральные свойства	32
2.3.1. Рост на жидких питательных средах	32
2.3.2. Рост на плотных питательных средах.....	32
2.4. Физиолого-биохимические свойства	34
2.4.1. Изучение спектра используемых бактериями источников углерода и энергии	34
2.4.2. Тест на каталазу	35
2.4.3. Тест на оксидазу.....	35
2.4.4. Тест на амилалитическую активность.....	36
2.4.5. Протеолитическая активность	36
2.4.6. Липолитическая активность	37
2.4.7. Способность к азотфиксации.....	37
2.4.8. Fe(III)-редуктазная активность.....	38
2.5. Фотоколориметрический метод	39
2.6. Световая микроскопия.....	39
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	40
3.1. Морфология исследуемых бактерий.....	40
3.2. Культуральные свойства бактерий.....	40

3.3. Физиолого-биохимические свойства	42
3.3.1. Ферментативная активность бактерий штамма F-62	42
3.3.2. Изучение спектра источников углерода штамма F-62.....	43
3.4. Восстановление Fe(III)-соединений бактериями штамма F-62 на среде с различными источниками углерода и энергии	45
3.4.1. Восстановление Fe(III)-цитрата бактериями штамма F-62	45
3.4.2. Восстановление Fe ₂ O ₃ бактериями штамма F-62 на среде.....	47
3.4.3. Восстановление Fe(III)-гидроксида бактериями штамма F-62	48
3.4.4. Закономерности восстановления Fe(III)-соединений бактериями штамма F-62 на различных источниках углерода и энергии	49
ВЫВОДЫ.....	51
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	52

ВВЕДЕНИЕ

Объектом исследования был штамм F-62 хемоорганогетеротрофных бактерий. Исследуемый штамм был выделен из огленного горизонта дерново-слабоподзолистой глееватой почвы. Такой горизонт в почвах формируется в процессе оглеения с участием микроорганизмов и сопровождается Fe(III)-восстановлением.

Возможно, исследуемый нами штамм является Fe(III)-редуктором и вносит свой вклад в процесс оглеения. Актуальность данной работы состоит в изучении видового разнообразия бактерий, обитающих в оглеенных почвах.

Культура F-62 была предоставлена научным руководителем Пуховой Н.Ю., хранится в музее микроорганизмов ЯрГУ им. П.Г. Демидова.

Цель работы: исследовать штамм F-62, выделенный из огленного горизонта дерново-слабоподзолистой глееватой почвы.

Для достижения данной цели решали следующие задачи:

- 1) описать морфологические особенности штамма F-62;
- 2) изучить культуральные свойства бактерий штамма F-62;
- 3) исследовать некоторые физиолого-биохимические свойства бактерий штамма F-62;
- 4) изучить особенности процесса восстановления различных Fe(III)-соединений бактериями штамма F-62.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Почва как среда обитания микроорганизмов

Специфическая структура почвы как среды обитания микроорганизмов связана с ее гетерогенностью, которая характеризуется трехфазным состоянием. Почвенные микроорганизмы обитают в разных пространственных масштабах. Трехфазная структура представлена твердой поверхностью, которая соседствует с газообразной и жидкой. Твердая фаза – это минеральные и органические частицы, жидкая – почвенная вода, а газообразная – почвенный воздух. С помощью совокупности фаз создаются резко отличающиеся друг от друга условия обитания. Почва является комплексом абсолютно непохожих друг на друга различных микросред. По данным микробиологических исследований, в каждой почвенной зоне оказывается колоссальное количество разнообразных микроорганизмов, приспособившихся использовать разные питательные среды в разных условиях (при различных значениях рН, окислительно-восстановительного потенциала, температуре, влажности и т.д.). В целом можно охарактеризовать почву как чрезвычайно гетерогенную среду обитания, в которой существует разнообразная и обильная микробиота. Почвенные микроорганизмы являются основным фактором почвообразовательного процесса и участвуют в преобразовании почвы определенного состава [26].

Главная и отличительная особенность почвы, как среды обитания состоит в том, что в ней постоянно изменяются условия жизнедеятельности в зависимости от окружающих факторов. Так, например, после дождя или обильного полива почва испытывает переувлажнение, что соответственно, может сказываться на жизнедеятельности почвенных организмов. То же можно сказать и при чрезмерном высушивании почвы. Считается, что подобные стрессовые ситуации снижают разнообразие почвенных микрооргани-

мов. Есть предположения, что характеристики почвы варьируют не только в пространстве, но и во времени, то есть почва является еще и гетерохронной средой обитания [26, 43].

1.1.1. Твердая фаза почвы

Твердая фаза почвы включает минеральную и органическую части. Минеральная часть составляет около 90%, где источником являются горные породы, а источником органической части являются отмершие остатки животного и растительного происхождения [17, 26].

Наличие в твердой фазе минеральных и органических частей делает почву средой, резко отличающейся от других сред, в частности от водной среды, где не хватает минеральных элементов для нормального развития организмов, в первую очередь дефицит фосфора и железа. Микроорганизмы в твердой фазе располагаются преимущественно на поверхности частиц при помощи адгезии. Адгезия – слипание поверхностей двух разнородных твердых частиц. Без адгезии микроорганизмы не могли бы благоприятно существовать в почве. Благодаря данному явлению клетки удерживаются в почвенной толще и не вымываются, оставаясь на различных питательных субстратах, таких как лигнин, целлюлоза и хитин. Адгезия играет важную роль в экологии почвенных микроорганизмов [12].

Адгезия микроорганизмов зависит от ряда причин. Во-первых, от особенностей самих микроорганизмов; во-вторых, от особенностей адсорбента и, в-третьих, от состава жидкой среды (рН, концентрация ионов). Около 80-90% клеток находятся в адгезированном состоянии, остальная же часть попадает с растворами органических веществ при внедрении их в почву. Такими растворами могут быть сахара и органические кислоты, но каждый микроорганизм имеет как прикрепленную стадию, предназначенную для жизнедеятельности и деления, а также и расселительную стадию, предназначенную для свободного перемещения. Таким образом, микробы, используя первую

стадию, находятся в адгезированном состоянии, а вторую, располагаясь в растворе органических кислот, свободно перемещаясь в нем. Целесообразно они могут менять свое положение, переходя от одного состояния к другому. Это будет зависеть от собственной выгоды микроорганизма [6].

1.1.2. Жидкая фаза почвы

Жидкая фаза почвы – почвенный раствор, является активным компонентом почвенной среды обитания, образуя пленки разной толщины или располагаясь в капиллярах. Жидкая фаза является неотъемлемой частью, так как она обеспечивает приток воды и минеральных веществ к организмам, обитающим в почве, а также осуществляет перемещение веществ внутри почвы. Чаще всего жидкая фаза переносит питательные вещества с раствором на твердую фазу, где происходит концентрирование. Для жидкой фазы характерно наличие разных микрзон с разными значениями рН, температуры, концентрации газов, органических соединений и др. Значение рН в почвенном растворе может варьировать в широких пределах: от 4-5 в кислых почвах, до 11 – в солонцах. Концентрация различных соединений почвенного раствора во много раз меньше концентрации обычных микробиологических питательных сред. Вследствие этого, развитие микроорганизмов в жидкой фазе происходит сравнительно редко [26].

Вода в почве может находиться в разных состояниях, которые отличаются свойствами и функциями. Различают:

- 1) парообразную воду; используется почвенными организмами в условиях резко пониженной доступности;
- 2) сорбированную воду; это вода, физически связанная с поверхностью твердых частиц;
- 3) химически связанную воду; это вода, входящая в состав твердой фазы, не способна самостоятельно перемещаться;

4) свободную воду; это вода, способная перемещаться самостоятельно; разделяется на 2 категории: капиллярная вода, которая удерживается в почвенных капиллярах и гравитационная вода, стекающая в почве под действием гравитационных сил;

5) лед; образуется при температурах ниже 0 °С, в результате замерзания воды в почве происходит закупорка пор, что неблагоприятно влияет на жизнеспособность организмов, обитающих в почве [5].

Жизнедеятельность почвенной микробиоты находится в тесной связи с составом почвенного раствора и концентрациями содержащихся в нем различных веществ [26].

1.1.3. Газовая фаза почвы

Газовая фаза – почвенный воздух, располагается в многочисленном числе пор (10-60 % объема), частично заполненных газом и водой. Количество и состав почвенного воздуха непостоянны и зависят от множества химических и биохимических процессов, протекающих в почве, а также от поступления газов из атмосферы [26].

Газовая фаза поставляет кислород, необходимый для дыхания почвенной биоты. Чем ближе химический состав воздуха почвы к атмосферному, тем лучше условия для развития организмов. Но всем известно, что по газовому составу почвенный воздух в десятки и даже в сотни раз отличается от атмосферного воздуха, такие различия наблюдаются, не смотря на то, что они быстро обмениваются газами. Содержание азота в почве резко отличается от атмосферного. Кроме того, почвенный воздух содержит пары воды, микрогазы, летучие органические вещества. Из-за быстрого круговорота данные вещества могут играть большую роль в балансе веществ в экосистеме, хотя и находятся в незначительных количествах. Газы и летучие органические вещества в основном образуются в самой почве, редко поступают извне. Интересным является то, что сами микроорганизмы могут образовы-

вать газообразные вещества в почве: CO_2 , N_2 , NH_3 , H_2 , CH_4 и др. Кроме того, растения так же могут принимать участие в образовании газообразных веществ, которые могут служить источниками углерода для микроорганизмов, создавая благоприятные условия для их жизнедеятельности [6].

Газы в почве находятся в различных состояниях:

1) адсорбированный воздух, представляет собой адсорбированные газы на твердых почвенных частицах;

2) растворенный воздух, представляет собой растворенные в почве газы; такой воздух участвует в физических и химических процессах и обеспечивает физиологические процессы микроорганизмов и других живых систем;

3) свободный почвенный воздух, представляет собой смесь газов, которая занимает все свободное пространство; свободный воздух участвует в газообмене и аэрации почвы [5].

1.1.4. Концентрация ионов водорода (рН)

Очень сильное влияние на жизнедеятельность микроорганизмов оказывает концентрация ионов водорода в почве. В большинстве случаев микроорганизмы даже не развиваются в силу того, что значение рН для них не пригоден даже для деления. Для каждого отдельного вида микроорганизмов устанавливаются свои определенные значения рН, в которых они могут расти и делиться [8].

Различают кислые и щелочные почвы. К первой группе относятся почвы, содержащие в своем составе минеральные и органические кислоты, рН кислой почвы составляет около 7 и ниже. При низких значениях рН угнетается активность многих микроорганизмов, в результате чего замедляются процессы разложения растительных и животных остатков, тем самым уменьшается высвобождение азота, фосфора, серы и других биогенных элементов. В условиях кислых реакций снижается емкость катионного обмена почв, ухудшаются водно-физические характеристики [47].

Щелочные почвы содержат в своем составе щелочные соли. При этом выделяют слабощелочные почвы, рН которых колеблется в пределах 7,0-7,3; щелочные почвы с диапазоном рН 7,3-8,6 и сильнощелочные почвы со значениями рН выше 8,6. Щелочность снижает плодородие почв в большей степени, чем кислотность. Теряются водно-физические свойства почвы из-за наличия коллоидов [14].

По отношению к концентрации ионов водорода микроорганизмы делятся на ацидофилов (приспособлены к низким значениям рН), нейтрофилов (обитают в диапазоне рН 4-9), алкалофилов (приспособлены к высоким значениям рН). Когда рН снижается, то и снижается способность некоторых ионов растворяться, что приводит к их накоплению и увеличению токсичных свойств веществ. Наоборот, при высоких рН растворимость ряда катионов снижается и железо, кальций, магний и марганец выпадают в осадок и становятся недоступными для организмов. К наиболее кислым из природных сред, вероятно, относятся горячие кислые источники и окружающие их горячие кислые почвы, рН которых может достигать 1. Встречаются щелочные почвы, где рН достигает 10. Оптимальные значения рН для роста подавляющего большинства нейтрофилов – область около 7. Предельные обнаруженные границы значений рН для роста представителей мира прокариот – от 1 до 12 [16].

1.1.5. Окислительно-восстановительные условия (Eh)

Важную роль в функционировании и развитии микроорганизмов играют окислительно-восстановительные условия. Каждый вид микроорганизмов имеет свое собственное оптимальное значение Eh для своего развития. В почве обитают различные группы микроорганизмов по отношению к этому показателю. Всегда соседствуют друг с другом анаэробы и аэробы. Замечена тенденция, что число аэробов возрастает тогда, когда возрастает число анаэробов, что обуславливает устанавливающиеся между ними метабиотические

взаимодействия. Аэробы, потребляя кислород, создают благоприятные условия для развития анаэробов. На поверхности почвы чаще живут аэробы, а в глубине – анаэробы. Но бывает несколько другая картина, где микроорганизмы находятся в стадии анабиоза и тогда кислород поступает в центральную часть агрегата. Анаэробные зоны могут возникать в результате аэробных процессов. Поэтому у корня растения вероятнее всего будут обитать микроорганизмы, относящиеся к анаэробам. Там они могут осуществлять процессы азотфиксации и денитрификации. На поверхности корня растения создаются восстановительные условия, необходимые для процессов, указанных выше [26].

1.1.6. Температура

Температура почв колеблется от -30 до $+30$ °С. Температурные колебания в почве менее выражены, по сравнению с наземно-воздушной средой. В почвах теплых и холодных зон встречаются микроорганизмы всех температурных групп: мезофилы, термофилы, психрофилы [16].

Большинство известных видов прокариот относится к мезофилам, для них оптимальные температуры роста лежат в пределах $+20-42$ °С. Типичным представителем мезофилов является *Escherichia coli*, с оптимальной температурой роста $+37$ °С [36].

Микроорганизмы, способные нормально расти при низких температурах (от 0 до $+20$ °С), называют психрофильными, они делятся на облигатные и факультативные. Основное различие между ними заключается в том, что облигатные психрофилы не способны к росту при температуре выше $+20$ °С, а верхняя температурная граница роста факультативных психрофилов намного выше. Облигатные психрофилы – узкоспециализированные микроорганизмы, обитающие в постоянно холодной среде; их температурный оптимум ниже $+15$ °С, максимум – около $+20$ °С; при $+30$ °С они погибают. Облигатные психрофилы обитают в холодных почвах, морях Арктики и Антарктики,

в вечных снегах высокогорных районов. Эти бактерии играют существенную роль в круговороте веществ в регионах с постоянно низкими температурами. Факультативные психрофилы распространены значительно шире и встречаются в почвах и водах не только холодной, но и умеренной зоны. Оптимум для роста факультативных психрофилов соответствует +25-30 °С, т. е. они способны расти в условиях, благоприятных для мезофильных организмов. К этой группе относятся некоторые виды бактерий родов *Pseudomonas*, *Arthro-bacter* и др. [37].

К термофильным относят микроорганизмы, которые растут при температуре выше +50 °С. Группу термофилов делят на четыре подгруппы:

1) Термотолерантные – растут при температурах от +10 до +55-60 °С, оптимальная область находится в пределах +35-40 °С (как у мезофилов). Основное их отличие от мезофилов – способность расти при повышенных температурах. Примером термотолерантных бактерий являются бактерии вида *Methylococcus capsulatus*.

2) Факультативные термофилы имеют температурный максимум +50-65 °С и минимум менее +20 °С, оптимум приходится на область температур, близких к верхней границе роста. Примером факультативных термофилов являются бактерии рода *Lactobacillus*. Они обитают на поверхности многих растений.

3) Облигатные термофилы способны расти при температурах до +70 °С и не растут при температуре ниже +40 °С. Оптимальная температурная область облигатных термофилов примыкает к их верхней температурной границе роста (+65-70 °С). Представители облигатных термофилов – бактерии вида *Bacillus stearothermophilus* и др.

4) Экстремальные термофилы имеют следующие температурные параметры: оптимум в области +70-75 °С, минимальная граница роста около +40 °С и выше, максимальная – около +90 °С. Эти микроорганизмы распространены в горячих источниках, особенно в районах активной вулканической де-

ятельности. Представители – бактерии родов *Thermus*, *Thermomicrobium*, *Thermoplasma* и др. [1, 19, 36, 37].

Считается, что в почве практически невозможно существование микрозон, резко отличающихся по температуре, в отличие от значений pH и окислительно-восстановительных условий. Температурные изменения происходят во времени. Изменение температуры даже на 1 °C приводит к существенным изменениям в скорости процессов, протекающих в организмах, и, как следствие, к изменению протекания метаболизма [26].

Есть еще факторы, которые оказывают непосредственное воздействие на почвенные микроорганизмы. К ним относятся: осмотическое давление, концентрация солей, наличие и концентрация биогенных элементов (азота, фосфора, калия, железа, кальция, магния и др.), тяжелых металлов и т.п. [26].

Таким образом, почва – это крупнейшая естественная среда и резервуар для огромного количества микроорганизмов, которые принимают участие в очищении почвы, а также в круговороте веществ в природе. Известно, что в 1 г песчаных почв содержится до 10^5 клеток микроорганизмов, в глинистых почвах – до 2×10^8 клеток, в чернозёме – до 5×10^9 клеток. Однако, микроорганизмы распределены в почвенных горизонтах неравномерно. Их меньше всего в поверхностном слое толщиной в несколько миллиметров, здесь микроорганизмы подвергаются неблагоприятному воздействию солнечных лучей. Обильно населен слой почвы до глубины 10 см, от 25 см количество микроорганизмов снижается, а на глубине 5 м они практически исчезают, из-за высокой поглотительной способности почвы [41].

1.2. Биогенный цикл железа

Среди металлов, которые вовлечены в биологические процессы, железо играет важную роль в биологических и физиологических процессах. Организмы разнообразно и широко используют железо в процессе жизнедеятель-

ности. Такое широкое применение обуславливается химическими особенностями металла и его широким распространением на Земле [2, 18].

Геохимический цикл железа в решающей степени зависит от условий увлажнения, реакции среды, аэрированности почвы, условий разложения органического вещества. Миграция железа зависит в первую очередь от окислительно-восстановительных реакций, потому что металл обладает переменной валентностью. В то же время, миграция зависит от pH среды. В нейтральных условиях железо почти не мигрирует. Самая высокая подвижность этого металла наблюдается в сильноокислых условиях, таких как вулканические районы [28].

Соединения железа с промывным типом водного режима мигрируют в вертикальном направлении, образуя так называемые иллювиальные горизонты [7]. В болотах, луговых и глеевых почвах, в мелководных озерах и лагунах соединения железа мигрируют с боковым почвенным током. Осаждение железа в таких ландшафтах происходит в виде бурого осадка карбонатов железа. В щелочной среде в степях и пустынях металл мигрирует слабо [3]. Миграция железа возможна и в составе живого вещества. После отмирания организмов происходит минерализация, одна часть остается в почве, другая попадает в сток воды. Возвращаясь в почву, они начинают новый биогеохимический цикл [33, 40].

Железо активно вовлекается в биологический круговорот веществ. Металл входит в состав многих ферментов, участвует в образовании хлорофилла, его недостаток негативно влияет на скорость и продуктивность фотосинтеза [33]. Биогенный цикл железа связан с циклами углерода и кислорода, фосфора, серы через минералы, образующиеся при жизнедеятельности микроорганизмов [28].

На сегодняшний момент специалистами в области микробиологии описан полный биогенный цикл железа, осуществляемый микроорганизмами разных физиологических групп [3].

1.3. Оглеение почв

Оглеение – элементарный почвенный процесс, развитие которого происходит на фоне постоянного переувлажнения почвенной массы, и, как следствие, возникает недостаток кислорода и преобладание восстановительных условий [9, 13, 20, 22]. В химическом отношении оглеение – это несбалансированный вынос или перераспределение железа из почвенного мелкозема или из его глинистой фракции [6].

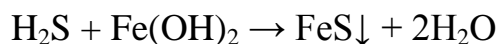
Переувлажнение почв происходит в двух разных условиях. Во-первых, оно может возникать в минеральной массе почв и почвообразующих пород, не содержащих органическое вещество. В этом случае наблюдаются их набухание и гидратация минеральных коллоидов в период затопления, и усадка с образованием латеральных и вертикальных разрывов в сухую фазу [34]. При таком варианте переувлажнения развития процесса глееобразования не наблюдается. Таким образом, не всегда избыточное переувлажнение сопровождается развитием процесса глееобразования [23].

Во-вторых, переувлажнение происходит при наличии органического вещества. Происходит изменение окислительно-восстановительного режима, сопровождаемое падением E_h , накоплением фульвокислот, низкомолекулярных органических кислот, неорганических восстановителей и специфичных хелатообразующих соединений [30]. Вышеперечисленные соединения способствуют понижению валентности железа и марганца и их миграции. В этом случае на кислых, нейтральных и выщелоченных субстратах переувлажнение всегда инициирует развитие процесса глееобразования [15].

Таким образом, для процесса глееобразования необходимо наличие трех факторов: наличие легкоразлагаемого органического вещества, переувлажнение; анаэробные условия.

Однако, глееобразование широко распространено также и в засушливой зоне. Главным фактором здесь является гидротехническое строительство и избыточное увлажнение в сельском хозяйстве. Глееобразование может воз-

В восстановительной среде выделяющийся сероводород вступает во взаимодействие с ионами двухвалентного железа, образуя нерастворимый сульфид железа [6]:



Таким образом, железо не выносится, несмотря на переход из двухвалентной формы в трехвалентную. При этом цвет почвы становится черным из-за минерала гидротроилита $\text{Fe}(\text{HS})_2 \times n\text{H}_2\text{O}$ [40]. Процесс глееобразования в таких условиях сменяется процессом сульфатредукции [23]. Процессы глееобразования смогли повторить в искусственных условиях (в лаборатории) [45, 50, 60].

На основании всех данных, собранных более чем за 100 лет, можно дать полное определение глееобразования, предложенное Зайдельманом [24]: “Глееобразование – биогеохимический почвообразовательный процесс, возникающий в анаэробной среде на кислых, нейтральных или выщелоченных породах, не содержащих сульфатов, при участии гетеротрофной микрофлоры и наличии органического вещества, способного к ферментации в условиях постоянного или периодического обводнения горизонтов или всего профиля. Глееобразование сопровождается формированием холодной окраски горизонтов почвенного профиля” [24].

1.4. Железоредакция

Железовосстанавливающие бактерии – бактерии, способные к восстановлению соединений железа при окислении большого разнообразия органических субстратов, в том числе аминокислоты, органические кислоты и сахара [48].

Микроорганизмы, которые способны восстанавливать Fe(III)-соединения, возможно, могли играть роль при формировании биосферы [46, 57], восстановление железа разнообразными бактериями, скорее всего, было первым и основным процессом, сопряженным с окислением органического

углерода [62] и, следовательно, первым возникшим типом метаболизма [54]. Еще с начала XX века известно, что в процессе восстановления железа большую роль играют микроорганизмы [52, 55].

Железоредукторы бывают двух типов. Во-первых, микроорганизмы, которые энергию для роста получают только исключительно за счет восстановления ионов трехвалентного железа. Это «специфические железоредукторы», например, представители рода *Shewanella*. В процессе «железного дыхания» при восстановлении ионов Fe^{3+} в качестве донора электронов бактерии могут использовать органические кислоты, которые могут окисляться до CO_2 и H_2O (например, бактерии рода *Geobacter*) или до ацетата (например, бактерии рода *Shewanella*). К использованию ацетата способны так же железоредукторы родов *Geopsychrobacter*, *Pantoea*, *Ferribacterium*, *Desulfuromusa*, *Geovibrio*, *Rhodoferax*, *Geothrix* [57]. Во-вторых, существуют микроорганизмы, которые не получают энергию при восстановлении Fe(III)-соединений; поскольку для этой группы бактерий данный процесс – побочный и происходит за счет выделения органических кислот, которые химически восстанавливают ионы Fe^{3+} .

Железо в различных формах в комплексе с различными органическими соединениями может широко распространяться в различных типах почв [10, 11]. При восстановлении Fe(III)-соединений бактерии играют важную роль, изменяя физические и химические свойства почвы. Например, при восстановлении Fe_2O_3 на почвенных частицах происходит адсорбция различных соединений (сульфаты, фосфаты), что, в свою очередь, оказывает влияние на плодородие почв [57].

Fe(III)-восстанавливающие бактерии, обитающие в почвах умеренной зоны, сбраживают различные органические соединения. Их максимальное количество наблюдается в верхних горизонтах и составляет 10^4 - 10^5 кл/см³ [29, 61]. Есть сообщения о чрезмерно высокой численности железовосстанавливающих бактерий, наблюдавшейся в летний период в дерново-глеевой тяжёлосуглинистой почве Ленинградской области – 10^7 - 10^8 кл/г [58].

Микробная железоредукция оказывает влияние на хозяйственную деятельность человека, принимает участие в процессах биокоррозии металлов, оглеении почв, удалении органических загрязнителей, восстановлении токсичных и радиоактивных химических элементов (As(V), Cr(VI), V(V), Tc(VII), U(VI)) при этом образуются малорастворимые соединения, что может быть использовано при разработке технологий биоремедиации. Минералы, формирующиеся при микробном восстановлении металлов, могут найти применение в современных нанотехнологиях, а также как носители в высокочувствительных методах анализа [51, 53, 57].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Изучение морфологических особенностей бактерий

2.1.1. Приготовление бактериального препарата – мазка

Приготовление бактериального препарата – мазка включает следующие этапы: 1) приготовление препарата, 2) высушивание, 3) фиксация и 4) окраска.

Для работы используют предметное стекло (78×26 мм). Стекло должно быть чистым, обезжиренным. Чтобы обезжирить стекло, натирают одну из его поверхностей хозяйственным мылом, потом удаляют его следы сухой ватой. Приготовление препарата начинается с нанесения на обезжиренную поверхность стекла маленькой капли дистиллированной воды. Стекло кладётся на стеклянную рейку, помещённую над кюветой. Небольшое количество культуры, выросшей на поверхности твёрдой питательной среды, извлекается из пробирки или чашки при помощи бактериологической петли с соблюдением правил стерильности. Бактериологические петли делают, используя тонкую проволоку из платины или хрома, которую закрепляют в металлическом держателе или впаивают в стеклянную палочку. Диаметр бактериологической петли 4-5 мм. Петлю перед взятием клеток микроорганизмов стерилизуют. Для этого проволоку накаливают докрасна в пламени спиртовки и одновременно обжигают примыкавшую к петле часть держателя, которая будет вводиться внутрь сосуда, содержащего микроорганизмы. Петлю рекомендуется держать в пламени спиртовки почти вертикально, чтобы проволока была равномерно раскалена на всём протяжении. При прокаливании необходимо помнить, что максимальная температура развивается в верхней и периферической частях пламени, поэтому не следует опускать петлю непосредственно к спиртовке. Сразу же после стерилизации петлю вводят в пробирку с микроорганизмами. Чтобы не повредить клетки, петлю охлаждают, прикасаясь ею

к внутренней поверхности пробирки, чашки или к питательной среде, свободной от клеток микроорганизмов, и только после этого захватывают небольшое количество микробной массы. Закрывают чашку, а извлечённый материал используют для приготовления препарата. Для этого равномерно эмульгируют его в капле воды.

Приготовленные мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре или в термостате при температуре 28 °С. Нельзя подогрывать, так как при интенсивной потере влаги происходит быстрое свёртывание белков, и клетка теряет естественную форму.

Мазки фиксируют после полного их высыхания с целью закрепления на стекле. Кроме того, убитые микробы лучше воспринимают окраску. Способ фиксации – в пламени спиртовки. Стекло берут пинцетом и проводят через верхнюю часть пламени 2-3 раза. После фиксации мазку следует дать остыть. Длительная фиксация может изменить структуру клетки, а недостаточно зафиксированный мазок смывается со стекла при последующей обработке.

Для окрашивания микробов имеются простые и сложные методы. При простом методе фиксированный мазок окрашивают каким-либо одним красителем, например, водным раствором фуксина (1-2 мин) или метиленовым синим (3-5 мин), промывают водой, высушивают и микроскопируют. Сложные методы окрашивания предполагают использование нескольких красителей. Это позволяет выявить определенные структуры клеток и дифференцировать одни виды микроорганизмов от других.

2.1.2. Простое окрашивание бактериального препарата

Для простого окрашивания клеток микроорганизмов чаще всего пользуются фуксином, генциановым фиолетовым, метиленовым синим. Фиксированный препарат помещают на стеклянную рейку, расположенную над лотком, наносят на него раствор красителя и выдерживают 1-3 мин при окраске

фуксином или 3-5 мин при окраске синих красителей. Следят за тем, чтобы во время окрашивания краситель на мазке не подсыхал, и в случае необходимости добавляют новую порцию красителя.

По окончании окраски препарат промывают водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Затем препарат высушивают на воздухе или осторожно промокают фильтровальной бумагой, помещают на окрашенный мазок каплю иммерсионного масла и просматривают под микроскопом.

2.1.3. Дифференциальное окрашивание

2.1.3.1. Окраска по методу Грама

Окраска по Граму является важным диагностическим признаком, она коррелирует со многими другими свойствами бактерий. По способности окрашиваться красителями триметилфенолового ряда бактерии делятся на грамположительные и грамотрицательные. Грамположительные бактерии удерживают комплекс генцианового фиолетового с йодом при обработке препарата спиртом, поэтому окрашиваются в фиолетовый цвет. Грамотрицательные бактерии не обладают такой способностью и обесцвечиваются спиртом. При последующей обработке фуксином (или сафранином) они приобретают красную окраску.

Техника окрашивания:

1. Готовят бактериальный препарат, высушивают на воздухе, фиксируют в пламени спиртовки.
2. Фиксированный препарат красят через фильтровальную бумагу 2 мин карболовым генциановым или кристаллическим фиолетовым.
3. Снимают фильтровальную бумагу и, не промывая мазок водой, обрабатывают его 1-2 мин раствором Люголя до почернения.

4. Сливают раствор Люголя и на 0,5-1,0 мин наносят на препарат спирт с йодом (2 мл 10%-го спиртового раствора йода). Обработка спиртом производится до прекращения отхождения лиловых строк.

5. Быстро промывают бактериальный препарат водой. Высушивают между полосками фильтровальной бумаги.

6. Докрашивают мазок фуксином 2 мин через фильтровальную бумагу.

7. Смывают фуксин водой, бактериальный препарат сушат между полосками фильтровальной бумаги и изучают под микроскопом.

При правильном окрашивании грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый, грамотрицательные – розово-красный цвет.

2.1.3.2. Окраска эндоспор и цитоплазмы по методу Пешкова

Споры в клетках бактерий можно обнаружить различными способами, в том числе путём дифференциального окрашивания. В случае выявления у микроорганизма способности к образованию спор необходимо обратить внимание на тип спорообразования (бациллярный, клостридиальный, плектриальный), расположение спор в клетке (центральное, эксцентриальное или полярное), форму свободных спор (круглая, овальная или продолговатая) и определить их размеры. С этой целью просматривают клетки 2-3 суточной культуры, так как большинство спорообразующих бактерий проходят за этот период времени все стадии развития – от вегетативной клетки до свободной споры.

Техника окрашивания

1. Готовят бактериальный препарат, высушивают на воздухе, фиксируют в пламени спиртовки.

2. Фиксированный препарат заливают раствором метиленового синего по Леффлеру. Краситель доводят до кипения, держа предметное стекло пинцетом над пламенем спиртовки. По мере испарения красителя добавляют но-

вые порции. Продолжительность окраски, считая с момента закипания красителя, составляет приблизительно 10-20 сек.

3. Предметное стекло охлаждают на воздухе, препарат тщательно промывают водой.

4. Препарат докрасивают в течение 0,5 мин 0,5%-ным водным раствором нейтрального красного или сафранина.

5. Краситель сливают, препарат промывают водой и просматривают под микроскопом с иммерсионной системой.

При правильном окрашивании цитоплазма клеток бактерий окрашивается в красный цвет, а эндоспоры – в синий.

2.2. Питательные среды и условия культивирования

2.2.1. Мясопептонный бульон

Мясопептонный бульон (МПБ) готовят следующим образом: 20 г порошка растворяют в 1 дм³ дистиллированной воды, кипятят 1-2 минуты, профильтровывают, устанавливают рН (7,0-7,2), разливают во флаконы или пробирки, стерилизуют 20 минут при температуре +121 °С автоклавированием. Производится МПБ промышленным способом. Среда выпускается в сухом виде.

2.2.2. Мясопептонный агар

Мясопептонный агар (МПА) используется для выращивания широкого спектра хемоорганогетеротрофных бактерий, включает (в граммах на 100 мл дистиллированной воды):

мясной экстракт	1,0
пептон	1,0

NaCl	0,5
агар-агар	2,0

Способ приготовления среды:

38 г порошка размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 1-2 мин до полного расплавления агар-агара, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в стерильные флаконы и стерилизуют автоклавированием при температуре +121 °С в течение 15 мин. Среду охлаждают до температуры +45-50 °С, разливают в стерильные чашки Петри слоем 4-6 мм. После застывания среды чашки подсушить при температуре +37 °С в течение 40-60 мин. Производится МПА промышленным способом. Среда выпускается в сухом виде.

2.2.3. Мясо-пептонная желатина

Мясо-пептонная желатина (МПЖ) готовят следующим образом. К 100 мл МПБ добавляют 10-15 г желатины, оставляют на 20-30 минут, чтобы она набухла, затем смесь нагревают на водяной бане до полного растворения желатины и разливают полученную МПЖ в пробирки по 8-10 мл, стерилизуют 15 мин автоклавированием при 0,5 атм.

Посев культуры на МПЖ проводят уколом, культивирование 2-10 суток при комнатной температуре. По истечении времени культивирования регистрируют результаты.

2.2.4. Молочный агар

Молочный агар – среда, состоящая из равных частей стерильного обезжиренного молока и стерильного 3%-го водного агара. Как правило, перед приготовлением среды молоко обезжиривают центрифугированием в течение 15 мин при 650-1500 об/мин. Жиры, которые образуют на поверхности молока плотную пленку, удаляют, а молоко стерилизуют при 0,5 атм. После

стерилизации подогревают и добавляют при постоянном помешивании к стерильному расплавленному и остуженному до +50 °С водному агару. Полученную среду разливают в стерильные чашки Петри.

Посев культуры на молочный агар проводят штрихом, культивирование 2-10 суток в термостате при +28 °С. По истечении времени культивирования регистрируют результаты.

2.2.5. Среда для изучения липолитической активности

Для изучения липолитической активности использовали среду следующего состава (в г/л дистиллированной воды):

твин 80	10,0
пептон	10,0
NaCl	5,0
CaCl ₂ ×H ₂ O	0,1
агар-агар	20,0
pH среды	7,4

Готовят среду без твина и стерилизуют при 1,0 атм. Водный раствор твина соответствующей концентрации стерилизуют отдельно при 0,5 атм. И добавляют к стерильной основной среде. Среду разливают в стерильные чашки Петри. Когда агар-агар застынет, на поверхность агаровой пластинки высевают штрихом или уколом исследуемый микроорганизм.

Посев культуры на молочный агар проводят штрихом, культивирование 2-10 суток в термостате при +28 °С. По истечении времени культивирования регистрируют результаты.

2.2.6. Среда Эшби для азотфиксаторов

О способности аэробных микроорганизмов использовать молекулярный азот можно судить по их росту на безазотной среде Эшби, которая имеет следующий состав (в г/л водопроводной воды):

маннит	20,0
K ₂ HPO ₄	0,2
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,2
NaCl	0,2
K ₂ SO ₄	0,1
CaCO ₃	5,0
агар-агар	20,0

рН среды составляет 7,1-7,3. Среду стерилизуют при 1 атм, разливают в чашки Петри. Посев поверхностный, штрихом. Продолжительность культивирования составляет 7-10 суток. Необходимо отметить, что на среде Эшби могут расти микроорганизмы, не только фиксирующие азот, но и олигонитрофилы, т.е. микроорганизмы, способные усваивать ничтожные количества связанного азота, содержащегося в реактивах, воде и воздухе. Обильный рост на среде Эшби может свидетельствовать о принадлежности бактерий к азотофиксаторам.

2.2.7. Среда для установления спектра используемых бактериями источников углерода и энергии

Для установления использования соединений углерода культурой использовали следующую среду (в г/л дистиллированной воды):

пептон	5,0
K ₂ HPO ₄	1,0
агар-агар	20,0

pH среды составляет 7,1-7,3. В среду добавляют источник углерода и энергии. В нашей работе в качестве источников углерода и энергии использовали следующие соединения:

1) моносахариды: D – глюкоза, D – фруктоза, D – галактоза, D – манноза, L – арабиноза;

2) дисахариды: мальтоза, сахароза, лактоза, D – трегалоза;

3) органические кислоты (в виде солей): пропионат Na, пируват Na, ацетат Na, сукцинат Na, оксалат K, малат Na;

4) аминокислоты: D – аспарагиновая кислота, D – аланин, L – фенилаланин, глицин, L – лейцин, L – цистеин;

5) спирт: глицерин;

6) полимеры: крахмал, казеин, целлюлоза.

Среду стерилизуют при 1 атм, разливают в чашки Петри. Посев поверхностный, штрихом. Продолжительность культивирования составляет 7-10 суток.

2.2.8. Среда для определения амилалитической активности

Для выявления амилалитической активности используют среду следующего состава (г/л дистиллированной воды):

пептон	10,0
K ₂ HPO ₄	5,0
растворимый крахмал	2,0
агар-агар	15,0

pH среды составляет 6,8-7,0. Среду стерилизуют при 0,1 атм и разливают в стерильные чашки Петри. Когда среда застынет, исследуемые микроорганизмы высевают штрихом по диаметру чашки или уколом. Продолжительность культивирования 2-10 суток.

2.2.9. Среда Лавли

Для выявления способности к Fe(III)-восстановлению бактерий использовали среду Лавли следующего состава (в г/л дистиллированной воды):

ацетат Na (пируват Na, малат Na, оксалат K)	1,000
NaHCO ₃	2,500
CaCl ₂	1,000
KCl	0,100
NH ₄ Cl	1,500
NaH ₂ PO ₄	0,600
NaCl	0,100
MgCl ₂	0,100
NaMoO ₄	0,001
дрожжевой экстракт	0,050
MnCl ₂	0,5 мг

Соли NaHCO₃ и NaH₂PO₄, а также источники железа стерилизовали в отдельных пробирках и перед посевом вносили в основную среду.

В экспериментах по изучению процесса Fe(III)-восстановления у бактерий штамма F-62 среду Лавли модифицировали, изменяя источник углерода и энергии и источник железа. В среду Лавли в качестве источника углерода и энергии добавляли:

- 1) ацетат Na;
- 2) пируват Na;
- 3) малат Na;
- 4) оксалат K.

Источники углерода вносили в среду в концентрации 1,0 г/л среды.

Кроме того, в среде варьировал источник железа, мы использовали:

- 1) аморфный и практически нерастворимый гидроксид трехвалентного железа (Fe(OH)₃);
- 2) нерастворимый оксид железа (Fe₂O₃);

3) водорастворимый комплекс трехвалентного железа – Fe(III)-цитрат.

Таким образом, процесс Fe(III)-восстановления у бактерий штамма F-62 был исследован на 12 различных вариантах среды [56].

2.3. Культуральные свойства

2.3.1. Рост на жидких питательных средах

Рост микроорганизмов в жидких питательных средах более однообразен и сопровождается помутнением среды, образованием плёнки и осадка. Характеризуя рост микроорганизмов в жидкой среде, отмечают степень помутнения: слабая, умеренная или сильная; особенности плёнки: тонкая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая; а при образовании осадка указывают скудный он или обильный, плотный, рыхлый, слизистый или хлопьевидный.

Нередко рост микроорганизмов сопровождается появлением запаха, пигментацией среды, выделением газа. Последнее обнаруживают по образованию пены, пузырьков, а также с помощью «поплавок» – маленьких, запаянных с одного конца трубочек. Поплавок помещают в пробирку запаянным концом вверх перед стерилизацией среды и следят, чтобы он полностью был заполнен средой. В случае выделения газа он скапливается в поплавке в виде пузырька. Для описания характера роста микроорганизмов в жидких средах их выращивают на МПБ или на другой среде, обеспечивающей хороший рост.

2.3.2. Рост на плотных питательных средах

На поверхности плотных питательных сред в зависимости от посева микроорганизмы могут расти в виде колонии, штриха или сплошного газона. Колония – это изолированное скопление клеток одного вида, выросшее в

большинстве случаев из 1 колониобразующей единицы (КОЕ). В зависимости от того, где развивались клетки (на поверхности плотной питательной среды, в толще или на дне сосуда) различают поверхностные, глубинные и донные колонии. Образование поверхностных колоний – наиболее существенная особенность роста многих микроорганизмов на плотном субстрате. Эти колонии отличаются очень большим разнообразием. При описании данных колоний учитывают многие признаки:

- 1) *форму* – округлая, амёбовидная, неправильная, ризоидная и т.д;
- 2) *размер* (диаметр) – измеряют в миллиметрах, если размеры колоний не превышают 1мм, то их называют точечными;
- 3) *поверхность* – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная;
- 4) *профиль* – плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и т.д;
- 5) *блеск и прозрачность* – колония блестящая, матовая, тусклая, мучнистая, прозрачная;
- 6) *цвет* – бесцветная (грязно-белые колонии относят к бесцветным) или пигментированная – белая, желтая, золотистая, оранжевая, сиреневая, красная, черная и т.д; особо отмечают выделение в субстрат пигмента. При описании колонии актиномицетов отмечают пигментацию воздушного и субстратного мицелия, а также выделение пигментов в среду;
- 7) *край* – ровный, волнистый, зубчатый, бахромчатый и т.д;
- 8) *структура* – однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая. Край и структуру определяют с помощью лупы или при малом увеличении микроскопа. Для этого чашку Петри помещают на столик микроскопа крышкой вниз;
- 9) *консистенцию* определяют, прикасаясь к поверхности колоний петлей. Колония может легко сниматься с агара, быть плотной, мягкой или врастающей в агар, слизистой (то есть прилипает к петле), тягучей, иметь вид

пленки (снимается целиком), быть хрупкой (легко ломается при прикосновении петлей).

Глубинные колонии, напротив, довольно однообразны. Чаще всего они по виду похожи на более или менее сплюснутые чечевички, в проекции имеют форму овалов с заострёнными концами. Лишь у немногих бактерий глубинные колонии напоминают пучки ваты с нитевидными выростами в питательную среду. Образование глубинных колоний часто сопровождается разрывом плотной среды, если микроорганизмы выделяют CO_2 или другие газы. Донные колонии разных микроорганизмов обычно имеют вид тонких прозрачных плёнок, стелющихся по дну.

Размеры и многие другие особенности колонии могут изменяться с возрастом и зависят от состава среды. Поэтому при их описании указывают возраст культуры, состав среды и температуру культивирования.

При описании роста микроорганизмов по штриху отмечают следующие особенности: скудный, умеренный или обильный, сплошной с ровным или волнистым краем, четковидный, напоминающий цепочки изолированных колоний, диффузный, перистый, древовидный или ризоидный. Характеризуют оптические свойства налёта, его цвет, поверхность и консистенцию. Для описания колонии и роста по штриху многие микроорганизмы часто выращивают на МПА. Применяют также мясопептонную желатину. Для лучшего рассмотрения глубинных колоний среды с агаром или желатином рекомендуется осветлять [42].

2.4. Физиолого-биохимические свойства

2.4.1. Изучение спектра используемых бактериями источников углерода и энергии

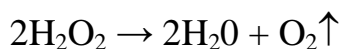
Микроорганизмы отличаются тем, что с разной способностью используют соединения углерода для процессов жизнедеятельности, а, именно, для

конструктивного и энергетического метаболизма. Способность организмов к росту за счёт тех или иных углеродсодержащих веществ проверяют, высевая их на синтетические среды, которые содержат в своем составе единственный источник углерода, которым может являться моно-, ди-, полисахарид, многоатомный спирт, органическая кислота, углеводород. Как правило, из углеводов и многоатомных спиртов используют такие соединения, как арабиноза, ксилоза, глюкоза, трегалоза, декстрин, сорбитол, глицерол, маннитол, салицин, лактоза, целлюлоза, мальтоза, дульцитол, галактоза, раффиноза, рамноза.

Готовят основной фон среды (см. п. 2.2.7). Углеводы и многоатомные спирты готовят в виде 10%-ных водных растворов и стерилизуют отдельно от основного фона среды. Раздельная стерилизация рекомендуется в связи с тем, что сахара в присутствии фосфатов и других компонентов среды частично разрушаются и образуют соединения, токсичные для микроорганизмов. Стерильные растворы добавляют к основному фону в таком количестве, чтобы концентрация сахара (спирта) в среде составляла 1 г на 100 мл среды.

2.4.2. Тест на каталазу

Каталаза катализирует разложение пероксида водорода на воду и кислород:



Для определения каталазной активности пероксид водорода капают на колонию исследуемых микроорганизмов и наблюдают. При положительной реакции на каталазу наблюдается выделение пузырьков газа (кислород).

2.4.3. Тест на оксидазу

Тест ставят с 1%-ным раствором диметил-парафенилендиамина гидрохлорида. Используют свежеприготовленный раствор. На 18-24 часовую

культуру на чашке Петри наливают несколько капель реактива, наклонив чашку, дают раствору стечь. Через 20-30 сек колонии микроорганизмов, обладающих оксидазой, приобретают пурпурную окраску.

2.4.4. Тест на амилолитическую активность

Для выявления амилолитической активности используют среду (см. п.2.2.8). Гидролиз крахмала обнаруживают после обработки агаровой пластинки раствором Люголя. Среда, содержащая крахмал, окрашивается в синий цвет, а зона гидролиза остается бесцветной или приобретает красную окраску, если крахмал гидролизовался до декстринов. Чем больше светлой зоны, тем выше амилолитическая активность.

2.4.5. Протеолитическая активность

Протеолитические ферменты катализируют расщепление белков на поли- и олигопептиды. Активность внеклеточных протеаз определяют, используя в качестве субстрата желатину, казеин и другие белки.

Для изучения протеолиза желатины микроорганизмы высевают в пробирки с МПЖ. Посев проводят уколом. Продолжительность культивирования 7-10 суток. при комнатной температуре. Разжижение желатины отмечают визуально. Если желатина разжижается, указывают интенсивность и форму разжижения: послойное, воронкообразное, мешковидное, пузыревидное и т.д.

Для выявления способности к протеолизу казеина используют молочный агар. Микроорганизмы высевают штрихом по диаметру чашки или уколом. Продолжительность культивирования 2-10 суток. Гидролиз казеина обнаруживают по зоне просветления среды вокруг колонии или выросших по штриху микроорганизмов. Чем больше светлой зоны, тем выше казеинолитическая активность бактерий.

2.4.6. Липолитическая активность

Липиды подвергаются гидролитическому разложению под действием липаз. Продуценты липаз обнаружены среди дрожжей, мицелиальных грибов, бактерий рода *Clostridium* и других микроорганизмов. Для выявления липолитической активности исследуемые микроорганизмы высевают на среду, содержащую соответствующий липид. Определенная трудность заключается при постановке таких опытов, а, именно: жиры не смешиваются с водой. Поэтому чаще всего вместо жиров в среду вводят твины – эфиры жирных кислот и сорбита. Твин-40 содержит пальмитиновую, твин-60 – стеариновую, а твин-80 – олеиновую кислоты. Твины хорошо растворимы в воде и имеют нейтральную реакцию.

Среду для изучения липолитической активности разливают в стерильные чашки Петри. Когда Агар-агар застынет, на поверхность агаровой пластинки высевают штрихом или уколом исследуемый микроорганизм. На наличие липазы указывает образование вокруг штриха или колонии непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот, освобожденных из твина.

2.4.7. Способность к азотфиксации

О способности аэробных микроорганизмов использовать молекулярный азот можно судить по их росту на безазотной среде Эшби. Необходимо отметить, что на среде Эшби могут расти микроорганизмы, не только фиксирующие азот, но и олигонитрофилы, т.е. микроорганизмы, способные усваивать ничтожные количества связанного азота, содержащегося в реактивах, воде и воздухе. Обильный рост на среде Эшби может свидетельствовать о принадлежности бактерий к азотофиксаторам [38].

2.4.8. Fe(III)-редуктазная активность

Штамм F-62 был исследован на способность к Fe(III)-восстановлению. Выращивание бактерий проводили на среде Лавли для железовосстанавливающих бактерий (см. п. 2.2.9.). В качестве единственного источника железа в среде мы использовали три Fe(III)-соединения:

- 1) аморфный и практически нерастворимый гидроксид трехвалентного железа ($\text{Fe}(\text{OH})_3$);
- 2) нерастворимый оксид железа (Fe_2O_3);
- 3) водорастворимый комплекс трехвалентного железа – Fe(III)-цитрат.

Так же в среде варьировали источники углерода и энергии. В качестве единственного источника углерода и энергии мы использовали:

- 1) ацетат Na;
- 2) пируват Na;
- 3) малат Na;
- 4) оксалат K.

Все вышеуказанные источники углерода и энергии используются штаммом F-62 в процессе метаболизма.

Таким образом, процесс Fe(III)-восстановления у бактерий штамма F-62 был исследован на 12 различных вариантах среды (источник железа + источник углерода и энергии): 1) Fe(III)-цитрат + ацетат Na, 2) Fe(III)-цитрат + пируват Na, 3) Fe(III)-цитрат + оксалат K, 4) Fe(III)-цитрат + малат Na; 5) Fe_2O_3 + ацетат Na, 6) Fe_2O_3 + пируват Na, 7) Fe_2O_3 + оксалат K, 8) Fe_2O_3 + малат Na; 9) $\text{Fe}(\text{OH})_3$ + ацетат Na, 10) $\text{Fe}(\text{OH})_3$ + пируват Na, 11) $\text{Fe}(\text{OH})_3$ + оксалат K и 12) $\text{Fe}(\text{OH})_3$ + малат Na.

Жидкую среду Лавли со всеми компонентами разливали в пробирки, вносили изучаемые бактерии и закрывали резиновыми пробками. Культивировали в термостате при температуре +28 °C в течение 21 сут.

2.5. Фотоколориметрический метод

Для определения количества ионов Fe^{2+} к 1 мл культуральной среды добавляли 1 мл α,α' -дипиридила (0,2%-ный раствор α,α' -дипиридила в 10%-ной уксусной кислоте). Доводили смесь до 5 мл дистиллированной водой, выдерживали 20 мин. в темноте. Затем образцы фотоколориметрировали (при $\lambda = 540$ нм) и определяли концентрацию ионов Fe^{2+} в мг/л, используя калибровочный график [59].

2.6. Световая микроскопия

В своей исследовательской работе мы использовали световой микроскоп фирмы «Альтами» при увеличении $\times 1000$ с иммерсионным объективом.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Морфология исследуемых бактерий

Бактерии штамма F-62 представляют собой палочки, расположены в мазке одиночно или собраны в небольшие группы из 2-4 клеток (Рис.1). Бактерии грамположительные и спорообразующие (Рис. 2).

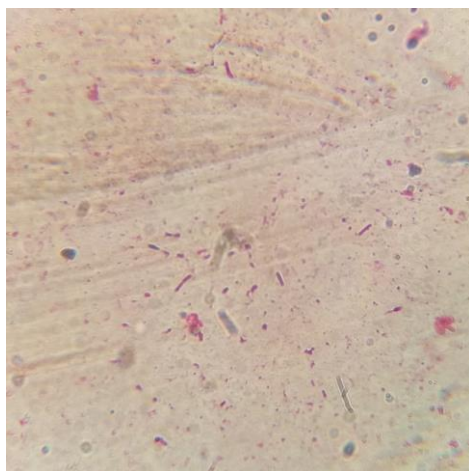


Рис. 1. Морфология бактерий штамма F-62. Окраска фуксином, суточная культура, увелич. 1000х (ориг.)

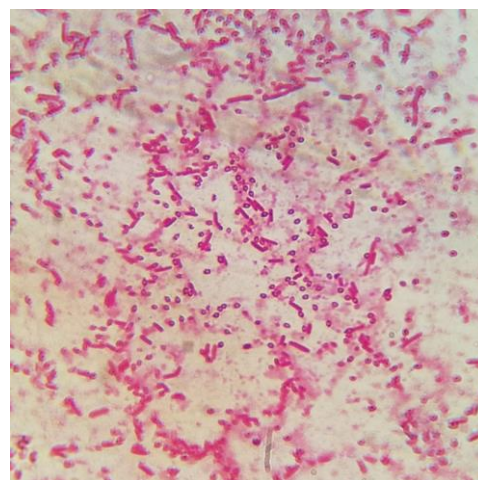


Рис. 2. Морфология бактерий штамма F-62, Окраска фуксином, 7-суточная культура, увелич. 1000х (ориг.)

Размеры клеток от 4 до 8 мкм в длину, от 1 до 1,5 мкм в ширину.

3.2. Культуральные свойства бактерий

Особенности роста штамма F-62 на твердой питательной среде изучали при выращивании бактерий на стандартной питательной среде – МПА. Нами были описаны колонии бактерий, результаты занесены в Таблицу 1, исследование включало следующие показатели: форма и диаметр колоний, их поверхность, профиль, блеск и прозрачность, цвет, а также характер края колонии, структура колонии и их консистенция.

Культуральные свойства штамма F-62 на среде МПА

№ п/п	Параметры описания	Описание колонии
1	форма колонии	круглая
2	поверхность колонии	гладкая
3	профиль колонии	плоский
4	блеск колонии	блестящий
5	прозрачность колонии	непрозрачный
6	цвет колонии	светло-бежевая
7	характер края колонии	волнистый
8	структура колонии	мелкозернистая
9	консистенция	вязкая
10	диаметр колонии, мм	3-5

Колония исследуемого штамма имеет следующие признаки: круглая с гладкой поверхностью и плоским профилем, блестящая и непрозрачная, светло-бежевого цвета, с волнистым краем. Структура колонии мелкозернистая, консистенция вязкая, диаметр колонии составляет от 3 до 5 мм.

Для определения культуральных свойств исследуемой культуры на жидкой питательной среде, мы использовали так же стандартную питательную среду – МПБ. При росте штамма F-62 на МПБ наблюдалось выпадение осадка плотной консистенции светло-желтого цвета, при этом плёнка не образовывалась, степень помутнения умеренного характера.

3.3. Физиолого-биохимические свойства

3.3.1. Ферментативная активность бактерий штамма F-62

Нами были изучены некоторые физиолого-биохимические особенности штамма F-62, а именно: гидролиз крахмала (амилолитическая активность), протеолиз казеина и разжижение желатины (протеолитическая активность), липолитическая активность, способность к фиксации молекулярного азота, отношение к молекулярному кислороду (наличие каталазы и оксидазы), результаты представлены в Таблице 2.

Таблица 2

Некоторые физиолого-биохимические свойства штамма F-62

№ п/п	Физиолого-биохимические свойства	Реакция штамма
1	гидролиз крахмала	+
2	протеолиз казеина	–
3	разжижение желатины	–
4	липолитическая активность	–
5	способность к азотфиксации	+
6	наличие каталазы	+
7	наличие оксидазы	+

Исследуемая культура бактерий штамма F-62 может осуществлять гидролиз крахмала, то есть образует фермент амилазу и использует продукты гидролиза крахмала (глюкозу) как источник углерода и энергии. О такой ферментативной активности свидетельствует наличие бесцветной зоны вокруг колоний бактерий после обработки раствором Люголя, при этом питательная среда окрашивается в синий цвет.

Штамм F-62 не растет на молочном агаре, следовательно, не использует казеин в качестве источника углерода и энергии. Кроме того, бактерии не

разжижают желатину, следовательно, данная культура микроорганизмов не обладает, по нашим данным, протеолитической активностью.

Бактерии не обладают также и липолитической активностью, о чем говорит отсутствие вокруг колоний зоны кальциевых солей жирных кислот при росте бактерий на среде с Твином-80.

Штамм F-62 способен к азотфиксации, об этом свидетельствует рост на среде Эшби для азотфиксаторов.

По отношению к молекулярному кислороду исследуемый штамм факультативно-анаэробный, может расти при ограниченном доступе кислорода (в высоком столбе среды под резиновыми пробками). Штамм F-62 каталазоположительный, об этом свидетельствует выделение пузырьков O_2 при обработке колоний бактерий пероксидом водорода. Тест на оксидазу положительный, об этом говорит появление пурпурной окраски колоний исследуемых бактерий при обработке их 1%-ным раствором диметилпарафенилендиамина гидрохлорида.

3.3.2. Изучение спектра источников углерода штамма F-62

В Таблице 3 представлен спектр источников углерода и энергии, используемых штаммом F-62. Было протестировано 25 источника углерода, среди которых моносахариды, дисахариды, органические кислоты в виде солей, аминокислоты, полимеры и спирт.

Таблица 3

Спектр используемых источников углерода

№ п/п	Источник углерода	Наличие роста
Моносахариды		
1	D – галактоза	+
2	D – фруктоза	+
3	D – глюкоза	+

4	D – манноза	+
5	L – арабиноза	+
Дисахариды		
6	лактоза	+
7	мальтоза	+
8	сахароза	+
9	D – трегалоза	+
Полимеры		
10	Крахмал	+
11	казеин	–
12	целлюлоза	+
Органические кислоты		
13	ацетат Na	+
14	малат Na	+
15	оксалат K	+
16	пируват Na	+
17	пропионат Na	+
18	сукцинат Na	+
Аминокислоты		
19	D – аспарагиновая кислота	+
20	глицин	+
21	L – цистеин	+
22	D – аланин	+
23	L – лейцин	+
24	L – фенилаланин	+
Спирты		
25	глицерин	+

Обнаружили, что исследуемый штамм F-62 использует 24 источника углерода, которые были ему предложены. Из них:

1) моносахариды: D – глюкоза, D – фруктоза, D – галактоза, D – манноза, L – арабиноза;

2) дисахариды: мальтоза, сахароза, лактоза, D – трегалоза;

3) органические кислоты (в виде солей): пропионат Na, пируват Na, ацетат Na, сукцинат Na, оксалат K, малат Na;

4) Аминокислоты: D – аспарагиновая кислота, D – аланин, L – фенилаланин, глицин, L – лейцин, L – цистеин;

5) спирт глицерин;

6) полимеры: крахмал, целлюлоза.

Таким образом, работе было исследовано 25 потенциальных источника углерода и энергии, из которых изучаемый штамм F-62 растет на 24 исследованных органических веществах.

3.4. Восстановление Fe(III)-соединений бактериями штамма F-62 на среде с различными источниками углерода и энергии

3.4.1. Восстановление Fe(III)-цитрата бактериями штамма F-62

Согласно полученным результатам, исследуемые бактерии восстанавливают Fe(III)-цитрат на всех предложенных источниках углерода и энергии: ацетат Na, пируват Na, оксалат K и малат Na (Рис. 3).

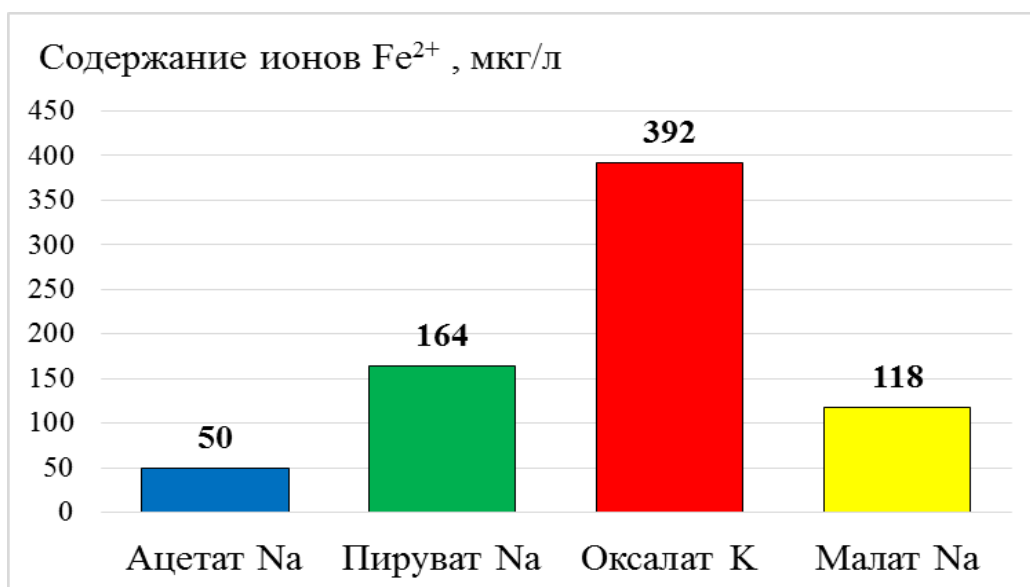


Рис. 3. Восстановление Fe(III)-цитрата бактериями штамма F-62 на среде с различными источниками углерода и энергии

Таким образом, мы использовали в этом эксперименте четыре варианта среды Лавли для железовосстанавливающих бактерий с заменой источника углерода и энергии. Fe(III)-цитрат – водорастворимое соединение железа [32], вносили в количестве 50 мг/л среды. Интенсивнее всего восстановление Fe(III)-цитрата происходит на среде оксалатом К в качестве единственного источника углерода и энергии, содержание ионов Fe²⁺ составляет 392 мкг/л среды. Скорость Fe(III)-восстановления ниже всего на «классической» Лавли среде с ацетатом Na в качестве единственного источника углерода и энергии, содержание ионов Fe²⁺ меньше 2-8 раза, чем на других вариантах культуральной среды и составляет 50 мкг Fe²⁺/л среды. Содержание ионов Fe²⁺ в культуральной среде с пируватом Na и малатом Na на 58% (164 мкг/л) и 70 % (118 мкг/л) ниже, чем на среде с оксалатом К, соответственно.

3.4.2. Восстановление Fe_2O_3 бактериями штамма F-62 на среде

Согласно полученным результатам, исследуемые нами бактерии восстанавливают Fe_2O_3 на всех предложенных источниках углерода и энергии: ацетат Na, пируват Na, оксалат К и малат Na (Рис. 4).

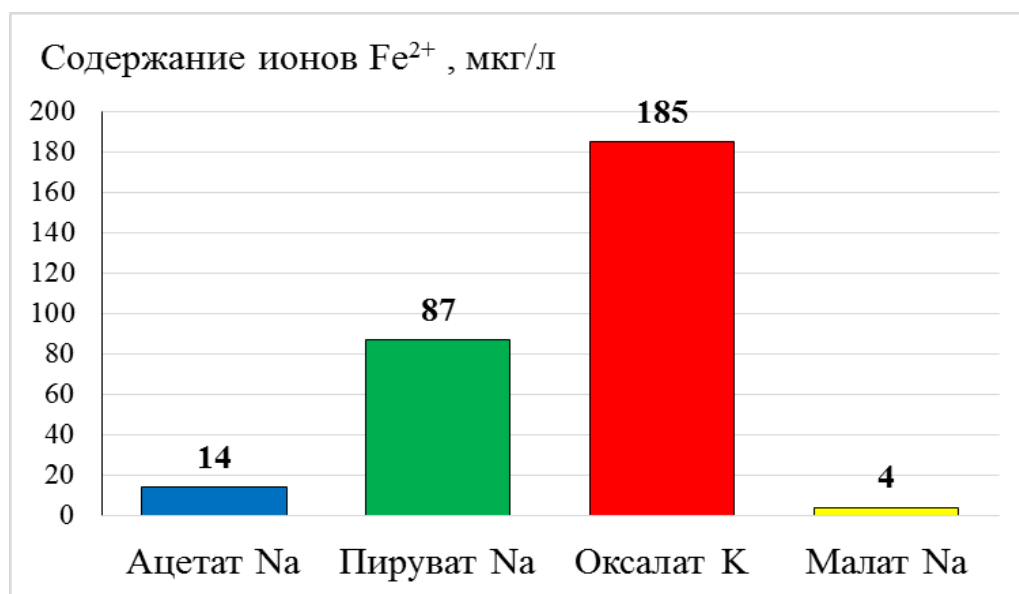


Рис. 4. Восстановление Fe_2O_3 бактериями штамма F-62 на среде с различными источниками углерода и энергии

Таким образом, мы использовали в этом эксперименте четыре варианта среды Лавли для железовосстанавливающих бактерий с заменой источника углерода и энергии. Оксид трехвалентного железа (Fe_2O_3) является нерастворимым в воде соединением [27, 35, 39]. Этот источник железа вносили в среду количестве 50 мг/л среды. Интенсивнее всего восстановление оксида трехвалентного железа происходит на среде оксалатом К в качестве единственного источника углерода и энергии, содержание ионов Fe^{2+} составляет 185 мкг/л среды. Скорость восстановления Fe_2O_3 ниже всего происходит на среде с малатом Na, содержание ионов Fe^{2+} меньше, чем в других вариантах и составляет 4 мкг Fe^{2+} /л среды. Содержание Fe^{2+} в культуральной среде с

пируватом Na и ацетатом Na на 53% (84 мкг/л) и 93 % (14 мкг/л) ниже, чем на среде с оксалатом K, соответственно.

3.4.3. Восстановление Fe(III)-гидроксида бактериями штамма F-62

Мы исследовали процесс Fe(III)-восстановления на среде Лавли с различными источниками углерода и энергии и с гидроксидом трехвалентного железа в качестве единственного источника железа в среде. Результаты представлены на рис. 5.

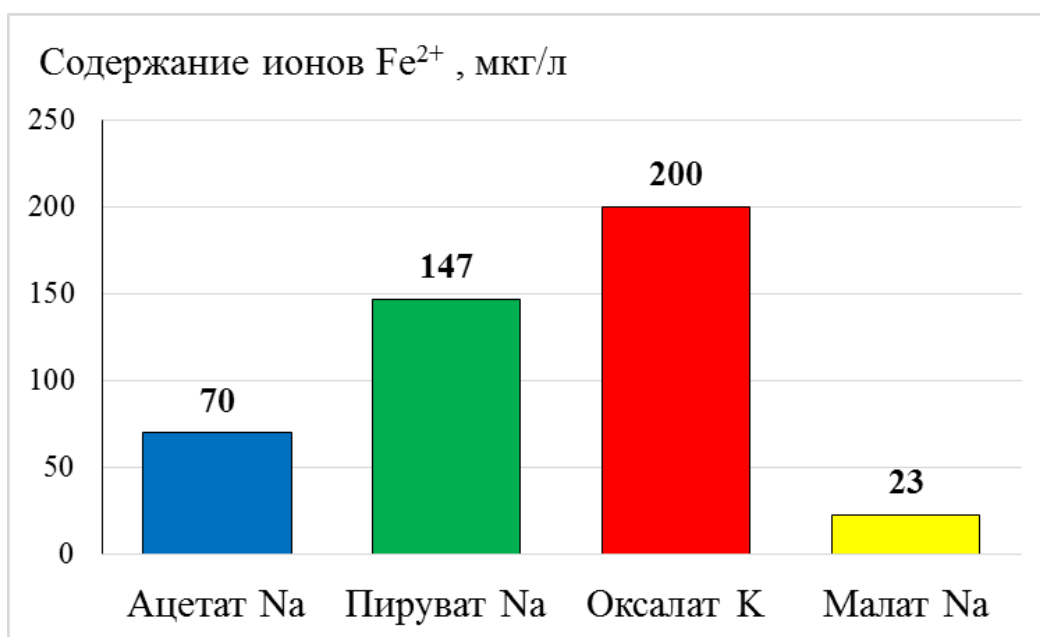


Рис. 5. Восстановление Fe(III)-гидроксида бактериями штамма F-62 на среде с различными источниками углерода и энергии

Согласно полученным результатам, исследуемые бактерии восстанавливают гидроксид трехвалентного железа на всех предложенных нами источниках углерода и энергии: ацетат Na, пируват Na, оксалат K и малат Na. Таким образом, мы использовали в этом эксперименте четыре варианта среды Лавли для Fe(III)-восстанавливающих бактерий с заменой источника углерода и энергии. Fe(III)-гидроксид – слабо окристаллизованное малорастворимое соединение железа [44], вносили в количестве 2 мл/л среды. Интен-

сивнее всего восстановление $\text{Fe}(\text{OH})_3$ происходит на среде оксалатом К в качестве единственного источника углерода и энергии, содержание ионов Fe^{2+} составляет 200 мкг/л среды. Скорость $\text{Fe}(\text{III})$ -восстановления меньше всего на среде с малатом Na, содержание ионов Fe^{2+} меньше, чем в других вариантах и составляет 23 мкг Fe^{2+} /л среды. Содержание ионов Fe^{2+} в культуральной среде с пируватом Na и ацетатом Na на 27% (147 мкг/л) и 59 % (70 мкг/л) ниже, чем на среде с оксалатом К, соответственно.

3.4.4. Закономерности восстановления $\text{Fe}(\text{III})$ -соединений бактериями штамма F-62 на различных источниках углерода и энергии

Сравнивая результаты исследования, представленные в главах 3.4.1. – 3.4.3., касающиеся процесса $\text{Fe}(\text{III})$ -восстановления исследуемыми бактериями штамма F62 на различных источниках углерода и энергии, можно увидеть следующие закономерности:

1) процесс $\text{Fe}(\text{III})$ -восстановления протекает на всех предложенных нами вариантах среды Лавли для железовосстанавливающих бактерий (12 вариантов среды (источник железа + источник углерода и энергии): $\text{Fe}(\text{III})$ -цитрат + ацетат Na, $\text{Fe}(\text{III})$ -цитрат + пируват Na, $\text{Fe}(\text{III})$ -цитрат + оксалат К, $\text{Fe}(\text{III})$ -цитрат + малат Na; Fe_2O_3 + ацетат Na, Fe_2O_3 + пируват Na, Fe_2O_3 + оксалат К, Fe_2O_3 + малат Na; $\text{Fe}(\text{OH})_3$ + ацетат Na, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ + пируват Na, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ + оксалат К, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ + малат Na);

2) интенсивнее процесс $\text{Fe}(\text{III})$ -восстановления протекает на среде Лавли с оксалатом К на всех источниках железа: концентрация ионов Fe^{2+} составляет 392 мкг/л на среде с $\text{Fe}(\text{III})$ -цитратом, 200 мкг/л на среде с $\text{Fe}(\text{OH})_3$ и 185 мкг/л на среде с Fe_2O_3 ;

3) менее интенсивно процесс железоредукции у исследуемых бактерий идет на среде с пируватом Na на всех источниках железа: концентрация ионов Fe^{2+} составляет 164 мкг/л на среде с $\text{Fe}(\text{III})$ -цитратом, 147 мкг/л на среде с $\text{Fe}(\text{OH})_3$ и 87 мкг/л на среде с Fe_2O_3 ;

4) лучше всего процесс Fe(III)-редукции протекает на среде Лавли с Fe(III)-цитратом в качестве источника железа; по-видимому, это связано с растворимостью данного соединения в воде и, следовательно, с доступностью его для метаболизма изучаемых бактерий;

5) на среде с Fe(III)-цитратом в качестве единственного источника железа в среде интенсивность процесса железоредукции снижается в ряду: оксалат K > пируват Na > малат Na > ацетат Na;

6) самые низкие концентрации ионов Fe²⁺ в культуральной среде отмечались на среде Лавли с Fe₂O₃; данное соединение железа не растворяется в воде и процесс железоредукции затруднен и зависит от непосредственного контакта бактерий с ним;

7) на вариантах среды Лавли с Fe₂O₃ и Fe(OH)₃ в качестве единственного источника железа в среде интенсивность процесса железоредукции снижается в ряду: оксалат K > пируват Na > ацетат Na > малат Na;

8) таким образом, процесс Fe(III)-восстановления бактериями штамма F62 зависит от растворимости вносимого источника железа и снижается в ряду: Fe(III)-цитрат > Fe(OH)₃ > Fe₂O₃.

ВЫВОДЫ

1. Бактерии штамма F-62 представляют собой грамположительные спорообразующие палочки, расположенные одиночно или собраны в небольшие группы по 2-4 клетки.
2. Штамм F-62 использует 24 органических соединения в качестве единственного источника углерода и энергии, из них: 5 моносахаридов; 4 дисахарида, 6 органических и 6 аминокислот, спирт глицерин и два полимерных соединения – целлюлозу и крахмал.
3. Бактерии штамма F-62 являются каталазо- и оксидазоположительными, способны к азотфиксации, не обладают липолитической и протеолитической активностью.
4. Интенсивнее процесс Fe(III)-восстановления у исследованных бактерий протекает на среде Лавли с оксалатом К на всех источниках железа.
5. Процесс Fe(III)-восстановления бактериями штамма F-62 зависит от растворимости вносимого источника железа и снижается в ряду: Fe(III) цитрат > Fe(OH)₃ > Fe₂O₃.
6. Бактерии штамма F-62, обладая способностью к восстановлению различных Fe(III)-соединений, могут вносить вклад в процесс оглеения почвенного горизонта, из которого они были выделены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авраменко И.Ф. Микробиология : учеб. пособие. – М. : Колос, 1972. – 190 с.
2. Алексеев А.О., Алексеева Т.В. Оксидогенез железа в почвах степной зоны. М. : ГЕОС, 2012. – 204 с.
3. Алексеев А.О., Алексеева Т.В., Моргун Е.Г. Геохимические закономерности формирования состояния соединений железа в почвах сопряженных ландшафтов Центрального Предкавказья // Литология и полезные ископаемые. – 1996. – Т. 9. – № 1. – С. 22.
4. Антипов-Каратаев И.Н. Вопросы происхождения и географического распространения солонцов СССР. – М. : АН СССР, 1953. – 265 с.
5. Апарин Б.Ф. Почвоведение: учебник для образоват. учреждений сред. проф. образования. – М. : Издательский центр «Академия», 2012. – 256 с.
6. Аристовская Т.В. Микробиология процессов почвообразования. – М. : Наука, 1980. – 187 с.
7. Безуглова О.С., Орлов Д.С. Биогеохимия. Учебник для студентов высших учебных заведений. Серия «Учебники, учебные пособия». – Ростов Н/Д : «Феникс», 2000 – 320 с.
8. Белицина Г.Д., Васильевская В.Д., Гришина Л.А. Почва и почвообразование. – М. : Высш. шк., 1988. – 400 с.
9. Веригина К.В. К характеристике процессов оглеения почв // Труды Почв. ин-та им. В. В. Докучаева. – 1953. – Т. 9. – № 3. – С. 218
10. Водяницкий Ю.Н. Оксиды железа и их роль в плодородии почв. М. : Наука, 1989. – 265 с.
11. Водяницкий Ю.Н., Добровольский В.В. Железистые минералы и тяжёлые металлы в почвах. М. : Почвенный институт им. В.В. Докучаева, 1998. – 234 с.
12. Возбуцкая А.Е. Химия почвы. – М. : Высшая школа, 1968. – 428 с.
13. Высоцкий Г.Н. Глей // Почвоведение. – 1905. – № 7. – С. 310–312 с.
14. Ганжара Н.Ф. Почвоведение. – М. : Агроконсалт, 2001. – 392 с.

15. Глазовская М.А., Добровольская Н.Г. Геохимические функции микроорганизмов. – М. : Изд-во МГУ, 1984. – 152 с.
16. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – М. : Академия, 2004. – 448 с.
17. Дараган А.Ю. О микробиологии глеевого процесса // Почвоведение. – 1967. – № 2. – С. 65–76.
18. Добровольский В.В. Основы биогеохимии: учебник для студ. высш. учеб., – М. : Издательский центр «Академия», 2003. – 400 с.
19. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология – М. : Дрофа, 2005. – 445 с.
20. Завалишин А.А. Несколько наблюдений к познанию почв с близким глеевым горизонтом М. : Изд-во АН СССР, 1928. – 67 с.
21. Зайдельман Ф.Р. Естественное и антропогенное переувлажнение почв. СПб. : Гидрометеоиздат, 1992. – 288 с.
22. Зайдельман Ф.Р. Подзоло- и глееобразование. – М. : Наука, 1974. – 204 с.
23. Зайдельман Ф.Р. Процесс глееобразования и его роль в формировании почв. М. : Изд-во МГУ, 1998. – 316 с.
24. Зайдельман Ф.Р. Теория образования светлых кислых элювиальных горизонтов почв и ее прикладные аспекты. М. : КРАСНАД, 2010. – 248 с.
25. Зайдельман Ф.Р., Никифорова А.С. Генезис и диагностическое значение новообразований почв лесной и лесостепной зон. – М. : Изд-во МГУ, 2001. – 216 с.
26. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв: классический универсальный учебник. – М. : Издательство МГУ, 2005. – 445 с.
27. Зефирова Н.С. Справочник химика. – 3-е изд., испр. – М. : Химия, 1971. – М. : Т. 2. – 1168 с.
28. Зонн С.В. Железо в почвах. – М. : Наука, 1982. – 207 с.
29. Калакуцкий Л.В., Дуда В.И. О роли микроорганизмов в процессе восстановления железа в почве I. // Научный доклад высшей школы. Биологическое направление. – 1961. – № 1. – С. 172–176.
30. Кауричев И.С., Ноздрунова Е.М. Роль компонентов воднорастворимого органического вещества растительных остатков в образовании подвижных

- железоорганических соединений // Почвоведение. – 2000. – Т. 7. – № 5. – С. 16.
31. Кауричев И.С., Орлов Д.С. Окислительно-восстановительные процессы и их роль в генезисе и плодородии почв. – М. : Колос, 1982. – 247 с.
32. Кнунянц И.Л. Химический энциклопедический словарь. – М. : Советская энциклопедия, 1983. – 792 с.
33. Ковда В.А. Биогеохимия почвенного покрова. – М. : Наука, 1968. – 261 с.
34. Ковда В.А. Розанов Б.Г. Почвоведение. М. : Высшая школа, 1988. Ч. 1. 400 с.
35. Лидин Р.А. Химические свойства неорганических веществ: учеб. пособие. – 3-е изд., испр. – М. : Химия, 2000. – 480 с.
36. Лысак В.В. Микробиология: учеб. Пособие. – Минск : БГУ, 2007. – 430 с.
37. Нетрусов А.И. Экология микроорганизмов. – М. : Академия, 2004. – 272 с.
38. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии : учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. – М. : Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
39. Никольский Б.П. Справочник химика. – 2-е изд., испр. – М. : Химия, 1966. – Т. 1. – 1072 с.
40. Перельман А.И. Биокосные системы Земли. – М. : Наука, 1977. – 160 с.
41. Пилькевич Н.Б., Виноградов А.А., Боярчук Е.Д. Основы микробиологии: учеб. пособие для студентов высших учебных заведений. – Луганск : Альма-матер, 2008 – 192 с.
42. Пухова Н.Ю. Экология микроорганизмов: метод. указания. – Ярославль : ЯрГУ, 2008. – 55 с.
43. Пяткин К.Д., Кривошеин Ю.С. Микробиология. – М. : Медицина, 1981. – 512 с.
44. Рипан Р., Четяну И. Неорганическая химия. Химия металлов. – М. : Мир, 1972. – Т. 2. – 871 с.
45. Рунов Е.В. Восстановление окисных соединений железа биологическим путём // Вестник бактериолого-агрономической станции. – 1926. – № 24. – С. 75–82.

- 46.Слободкин А.И. Регуляция разложения органических веществ анаэробным сообществом микроорганизмов в системах биологической очистки : дис. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук / Институт микробиологии РАН. – Москва, 2005. – 234 с.
- 47.Соколова Т.А., Толпешта И.И., Трофимов С.Я. Почвенная кислотность. Кислотно-основная буферность почв. Соединения алюминия в твердой фазе почвы и в почвенном растворе. Изд. 2-е, испр. и доп. – Тула : Гриф, 2012. – 124 с.
- 48.Тарантул В.З. Толковый биотехнологический словарь. Русско-английский. – М. : Языки славянских культур, 2009. – 936 с.
- 49.Ярков С.П. Почвы лесолуговой зоны. – М. : Изд-во АН СССР, 1961. – 318 с.
- 50.Bloomfield C. Some observation on gleying // J. Soil Sci. – 1950. – V. 1. – P. 205–211.
- 51.Chernyh N.A., Gavrilov S.N., Sorokin V.V. Characterization of technetium (VII) reduction by cell suspensions of thermophilic Bacteria and Archaea // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. V. 76. – P. 467–472.
- 52.Ehrlich H.L. Geomicrobiology. New York // Basel. Marcel Dekker. – 2002. V. 3. – P. 27–34.
- 53.Lee A.K., Newman D.K. Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2003. V. 62. – P. 134–139.
- 54.Lovley D.R. (2005). Potential role of dissimilatory iron reduction in the early evolution of microbial respiration // In: Seckbach J. (ed.) Origins, Evolution and Biodiversity of Microbial Life. Kluwer. Netherlands. pp. – 2005. V. 45. – P, 301–313.
- 55.Lovley D.R. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction // Microbiol. Rev. – 1991. V. 55. – P. 259–287.
- 56.Lovley D.R. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron and manganese // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. V. 54. – P. 1472–1480.

57. Lovley D.R., Holmes D.E., Nevin K.P. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. // *Advances in Microbial Physiology*. – 2004. V. 49. – P. 219–286.
58. Lovley D.R., Kashefi K., Vargas M. Reduction of humic substances and Fe(III) by hyperthermophilic microorganisms // *Chemical Geology*. – 2000. V. 169. – P. 289–298.
59. Ottow J.C.G. Evaluation of iron-reducing bacteria in soil and the physiological mechanism of iron-reduction in *Aerobacter aerogenes* // *Allg. Mikrobiol.* – 1968. – V. 8. – P. 441–443.
60. Ottow J.C.G. Bacterial mechanism of gley formation in artificially submerged soil // *Nature*. – 1970. – V. 225. – P. 103.
61. Ottow J.C.G. The distribution and differentiation of iron-reducing bacteria in gley soils // *Zentrabl. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. II.* – 1969. – V. 123. – P. 600–615.
62. Walker J.C. Was the Archaean biosphere upside down? // *Nature*. – 1987. – V. 329. – P. 710–712.