



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(11) 889702

(61) Дополнительное к авт. свид-ву -

(22) Заявлено 17.04.80 (21) 2913236/30-15

с присоединением заявки № -

(23) Приоритет -

Опубликовано 15.12.81. Бюллетень № 46

Дата опубликования описания 15.12.81

(51) М. Кл.³

С 12 N 1/02

(53) УДК 576.851.155
(088.8)

(72) Авторы
изобретения

Д. Г. Звягинцев, П. А. Кожевин и Г. А. Кочкина

(71) Заявитель

Московский ордена Ленина и ордена Трудового
Знамени государственный университет им. М. В. Ломоносова

СССРОЮЗНАРО

1981

13

СВЕДЕНИЯ

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СКОРОСТИ РОСТА
КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ В ПОЧВЕ

1

Изобретение относится к микробиологии и касается вопросов, связанных со скоростью роста микроорганизмов в почве.

Известен способ определения скорости роста бактерий в естественной (водной) среде обитания на стеклах обрастания. Для определения времени генерации подсчитывается общее количество микроорганизмов на стеклах в начальный момент и через определенное время. Причем в этом способе учитывается, что клетки, образующие колонии, могут вновь прикрепляться к стеклу из среды в течение опыта. Таким образом, этот способ позволяет рассчитывать скорость роста бактерий с учетом того, что не все бактерии, попавшие на стекло, способны размножиться и что во время опыта постоянно идет приток бактерий извне [1].

Однако способ не применим для почвы, так как в этом случае исключается типичная для воды свободная миграция клеток.

Известен также способ определения скорости роста бактерий, например клубеньковых, в почве путем учета морфологических особенностей кле-

2

ток, при этом исходят из количества двойных клеток, присутствующих в среде в момент исследования. Доля двойных клеток имеет обратную коррелятивную связь с временем генерации [2].

Недостатком такого способа является то, что в почве микроорганизмы развиваются на поверхности твердых частиц в виде микроколоний, причем микроколонии длительно сохраняются после снижения скорости роста. Поэтому корреляция между временем генерации и процентом двойных клеток в почве в общем случае оказывается слабой или несущественной.

Цель изобретения - повышение чувствительности способа.

Поставленная цель достигается тем, что в качестве морфологических особенностей клеток учитывают их кокковидную форму, при этом в почву закладывают предметные стекла, инкубируют их, просматривают с помощью иммунолюминесцентной микроскопии и по доле кокковидных форм от общего числа клеток определяют скорость роста бактерий в почве.

Сущность изобретения заключается в том, что морфология клеток являет-

30

ся индикатором скорости их размножения в почве, что следует из установленного факта о том, что старые культуры клубеньковых бактерий имеют кокковидную форму, а молодые представлены палочками.

Пример. Берут 4 пробы по 80 г почвы-чернозема типичного. Культуры клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* (штаммы Эк и 115) и *Rhizobium trifolii* (штаммы Т37 и 0403) вносят в почвенные пробы в расчете 10^9 клеток на 1 г почвы (каждый штамм в отдельную пробу). Почву тщательно перемешивают, увлажняют до 60% от общей влагоемкости и насыпают в стерильные чашки Петри по 40 г в каждую. Внутрь почвенного слоя закладывают предметные стекла - по два в каждую чашку, так что для каждого штамма бактерий исследуют по четыре стекла. Стекла вынимают спустя 2, 3, 7 и 14 суток после помещения их в чашки (по одному для каждого штамма в каждый срок).

После выемки стекло помещают в стоячую воду на 3 мин, затем вынимают, высушивают и фиксируют. В итоге имеют по 4 стекла для каждого штамма в разные сроки развития популяции клубеньковых бактерий в почве. Затем проводят иммунолюминесцентную окраску стекол. Для каждого штамма используется специфическая кроличья сыворотка и общая для всех штаммов антикроличья сыворотка (разведения сывороток подбираются предварительно). После проведения стандартной процедуры окрашивания под люминесцентным микроскопом просматривают 200 полей зрения на каждом стекле для установления общего количества клубеньковых бактерий каждого штамма и количества кокковидных клеток. Клубеньковые идентифицируют по наличию ярко-зеленого ободка вокруг клетки при просмотре ее под люминесцентным микроскопом. Далее устанавливают долю кокковидных форм от общего числа клеток. Время генерации определяют обычным способом, используя данные об общем количестве бактерий в разные сроки наблюдения. В результате проведенного корреляционного анализа для пар "удельная скорость роста - доля кокковидных клеток" устанавливают наличие сильной и существенной корреляции для этих величин. Формула корреляции:

$\mu = 0,016 - 0,00025 \cdot \% \text{ кокков (ч}^{-1}\text{)}$,
где μ - удельная скорость роста.
Зная удельную скорость роста, по стандартным формулам можно вычислить время генерации клеток клубеньковых бактерий в почве.

5
Время генерации $\frac{0,693}{\text{удельная скорость роста}}$

10 В дальнейшем при работе с внесенной популяцией клубеньковых бактерий определяют долю кокковидных форм от общего числа клеток и используют полученную формулу (или составленную гранулировочную шкалу) для определения времени генерации и скорости роста исследуемой популяции в почве.
15 Например, если доля кокков 10%, то удельная скорость роста составляет $0,0135 \text{ ч}^{-1}$, а время генерации 51,3 ч;
20 если доля кокков 20%, то удельная скорость роста составляет $0,011 \text{ ч}^{-1}$, а время генерации 63 ч. Чем больше количество кокковидных форм, тем медленнее происходит удвоение бактерий.
25 Таким образом, применение способа определения скорости роста клубеньковых бактерий в почве повышает скорость определения и чувствительности метода.

30
Формула изобретения

35 Способ определения скорости роста клубеньковых бактерий в почве путем учета морфологических особенностей клеток, отличающийся тем, что, с целью повышения чувствительности способа, в качестве морфологических особенностей клеток учитывают их кокковидную форму, при этом в почву закладывают предметные стекла, инкубируют их, просматривают с помощью иммунолюминесцентной микроскопии и по доле кокковидных форм от общего
40 числа клеток определяют скорость роста бактерий в почве.
45

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе
50 1. Иерусалимский Н.Д. Вычисление скорости роста водных микроорганизмов на стеклах обрастания. Микробиология, т. XXIII, вып. 5, 1954, с. 561.
2. Applied and environmental microbiology. 1979, v. 37, 5, p. 805.

Составитель Т. Роденкова
Редактор М. Петрова Техред Т. Маточка Корректор М. Демчик

Заказ 10898/44 Тираж 531 Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

филиал ИПИ "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4