

Министерство образования РФ  
Череповецкий государственный университет  
Факультет физики и математики  
Кафедра биологии и общей экологии

# Курсовая работа

*Изучение микрофлоры почвы мето-  
дом прямого счета по С.Н. Вино-  
градскому*

Выполнил студент группы

9Б-31: Курашев А.С.

Проверил преподаватель ка-

федры БиОЭ: Иевлева Т.В.

Череповец, 2004 год

# Содержание

Содержание.....	1
Введение.....	3
Глава 1. Почва как компонент биосферы .....	5
1.1 Почва – среда обитания микроорганизмов .....	5
1.2 Участие микроорганизмов почвы в круговороте веществ и их сукцессии .....	6
1.3.1 Распределение микроорганизмов по горизонтам почвы. Микробный состав и тип почвы .....	6
1.3.3 Механические свойства почвы и условия увлажнения, как факторы, определяющие количественный состав микрофлоры .....	8
1.3.4 Динамика численности микроорганизмов в зависимости от сезона года .....	9
1.4 Причины снижения плодородия почвы и способы его повышения.....	9
Глава 2. Материалы и методика исследования .....	11
2.1 Особенности сбора почвенных образцов .....	11
2.2 Методы исследования микрофлоры почвы .....	11
Глава 3. Результаты исследования .....	14
Глава 4. Обсуждение результатов, полученных при исследовании .....	16

Глава 5. Выводы .....	18
Глава 6. Практическое значение полученных результатов .....	19
Глава 7. Использование материалов курсовой работы в средней школе.....	20
Список литературы .....	21

## Введение

*Актуальность.* Почва – это элемент любого биогеоценоза, естественно, он влияет на всех его составляющих организмов. Прямое влияние оказывается на обитающих в ней животных, для них почва – это среда обитания. Взаимоотношения почвы и микроорганизмов двусторонни – почва благоприятная среда для микроорганизмов, которые в свою очередь влияют на плодородие, химический состав почв. Учет микрофлоры необходимо проводить, так как при такого рода исследованиях возможно выявить патогенные организмы (что важно для людей часто работающих с почвой), сделать выводы о плодородии почвы, его изменения, а соответственно и влияние на рост высших растений.

Изучение не только химического и физического состава почв, но и изучение ее микрофлоры, взаимосвязей микроорганизмов, позволит в дальнейшем предотвратить проблемы связанные с разрушением плодородного слоя, почвенного слоя планеты. Сейчас ввиду сильного антропогенного влияния, усиленного загрязнения проблема охраны почв стоит наряду с такими глобальными экологическими проблемами как уничтожение лесов, загрязнение воздуха и исчерпание ресурсов Земли.

*Практическое значение.* Изучение микрофлоры почвы, ее видового, количественного состава позволяет сделать выводы о химических процессах происходящих в почве с помощью микроорганизмов, понять их участие в круговороте веществ. Важным фактором является плодородие почв, оно во многом зависит от состава микрофлоры. Бактерии обеспечивают перевод сложных органических веществ в более простые, доступных в дальнейшем растениям. Важная проблема в сельском хозяйстве – это снижение урожайности при применении монокультуры. Именно исследования ризосферы растений позволили выдвинуть предположение, о том, что плодородие снижается из-за

обеднения видового состава и соответственно накопление продуктов азотистого обмена (Вальтер, 1982).

Исходя из вышесказанного, в *задачи* нашего исследования входит:

- выяснить свойства почвы, как среды обитания микроорганизмов;
- выяснить методы определения микробного состава почвы и взаимоотношений в почве;
- проследить корреляции количественного микробного состава и показателей (тип почвы, глубина, время года, условия увлажнения);
- провести исследование количества микроорганизмов методом прямого счета по С.Н. Виноградскому.

*Цель* нашего исследования изучить микрофлору почвы методом прямого счета С.Н. Виноградского.

# Глава 1. Почва как компонент биосферы

## 1.1 Почва – среда обитания микроорганизмов

Микрофлора – совокупность различных видов микроорганизмов, населяющих определенную среду обитания (Биология, 2003).

Этой средой может быть и воздух, и почва, и вода, и живой организм. В нашем исследовании мы коснемся почвы, как одного из важных компонентов биогеоценозов.

Почва – это среда обитания для макро – и микроорганизмов. Для первых это гомогенная, целостная среда обитания. А для микроорганизмов, ввиду их размеров (почти совпадают с частицами почвы, клетками корневых волосков), это гетерогенная среда, с очень различными условиями в каждом отдельном локусе. Различны условия на поверхности агрегата и внутри его – рН, температура, влажность, аэрация. Что касается расположения организмов, они в подавляющем большинстве (80-90%) находятся в адсорбированном состоянии на почвенных агрегатах, корнях растений, а 10-20% находятся в почвенном растворе.

Масса вегетирующих особей во много раз меньше, находящихся в виде эндоспор, микроцист, покоящихся вегетативных клеток. Вся масса (активные и неактивные) составляют микробный запас (пул). Роль микробного пула заключается в поддержании гомеостаза данного микролокуса по содержанию органических и минеральных веществ, гумуса, разлагающихся минералов. В свою очередь микробный состав почвы зависит от поступления в нее продуктов органического опада, корневых выделений растений (Лукомская, 1987). Не маловажную роль имеет неактивная составляющая микробного пула. При обильном поступлении органических веществ в почву эта часть микроорганизмов может активизироваться, и процесс разложения будет идти лучше.

Содержание воздуха в почве зависит от ее структуры и влажности. Газовый состав почвенного воздуха существенно отличается от атмосферного. Содержание  $\text{CO}_2$  и  $\text{O}_2$  в почве (кислорода намного меньше чем в надпочвенной среде) определяет соотношение аэробных и анаэробных форм микроорганизмов в структуре микробоценоза (Лукомская, 1987).

## **1.2 Участие микроорганизмов почвы в круговороте веществ и их сукцессии**

Цепи разложения веществ в почве начинаются с гнилостных бактерий, разлагающих белковые вещества, или с микроскопических грибов и кокков, расщепляющих соединения, бедные азотом. Далее действуют микроорганизмы, осуществляющие минерализацию легко разлагаемых гуминовых веществ, образовавшихся на предыдущих этапах. Среди них – аэробные азотфиксирующие и нитрифицирующие бактерии, а также бактерии, которые разлагают соединения фосфора. Менее многочисленна группа организмов, окисляющих стойкие гуматы кальция. Минерализация соединений фосфора осуществляется по схеме: нуклеопротеиды → нуклеины → нуклеиновые кислоты → фосфаты или лецитин → глицерофосфаты → фосфаты. Для плодородия почвы полная минерализация не является оптимальным условием, так как именно в гуминовых веществах и содержатся в основном компоненты питания. Например, бедные гумусом тропические почвы не плодородны (Вальтер, 1982).

### **1.3.1 Распределение микроорганизмов по горизонтам почвы. Микробный состав и тип почвы**

Если рассматривать изменение численности микроорганизмов в почве по мере продвижения с севера на юг, то она существенно возрастает. Высокая

численность микроорганизмов в почвах южной зоны объясняется спецификой благоприятных климатических условий, характером растительности и более высоким содержанием веществ органического опада и гумуса в почве. Распределение микроорганизмов по почвенному профилю соответствует содержанию в нем органических веществ. Основная масса организмов сосредоточена в верхних, богатых органикой и хорошо проветриваемых горизонтах почвы. Вглубь по почвенному профилю численность микроорганизмов заметно снижается, причем более или менее резко в зависимости от типа почвы. Например, в черноземах высокобиогенный слой почвы более мощный, нежели в подзолах. На распределение микроорганизмов по почвенному профилю большое влияние оказывает ризосфера растений, служащего для них одним из источников питательного субстрата (Лукомская, 1987).

Следует сказать, что плодородные, возделываемые почвы с большим количеством органических веществ содержат значительно большее количество микроорганизмов, чем глинистые почвы и почвы пустынь (Бакулина, Краева, 1980).

По горизонтам почв, меньше всего микроорганизмов содержится обычно в самом поверхностном, толщиной в несколько миллиметров, слое почвы, где микроорганизмы подвергаются неблагоприятному воздействию солнечного света и высушиванию. Особенно обильно населен следующий слой почвы толщиной до 5 см. По мере углубления число микроорганизмов падает. На глубине 25 см количество их в 10-20 раз меньше, чем в поверхностном слое толщиной 1-2 см. С глубиной меняется не только численность, но и видовой состав микрофлоры. В верхних слоях почвы, содержащих много остатков животных и растений, а также подвергающихся хорошей аэрации, преобладают аэробные организмы, которые способны разлагать сложные органические соединения. Чем глубже почвенные горизонты, тем беднее они органическими веществами; доступ воздуха в них затруднен, поэтому здесь преобладают анаэробные бактерии (Мудрецова-Висс, Чистяков, 1971).



Особое значение в почве имеет ризосфера, т.е. ближайшее окружение корней растений, в котором обнаруживается наибольшее количество микроорганизмов. Например, в посадках клевера в 30 см от главного корня содержится всего бактерий – 16,2, а на поверхности корня – 3470. Обильнее всего микрофлора на корневых волосках. Такое богатство микробами в ризосфере обусловлено выделениями корней. Ризосфера имеет значения для питания и нормального состояния растений, так как микробы выделяют биологически важные вещества, такие как стимуляторы роста, антибиотики, которые в свою очередь поглощаются корнями. Для каждого вида растений, по-видимому, характерны определенные ассоциации микроорганизмов (Вальтер, 1982).

### **1.3.3 Механические свойства почвы и условия увлажнения, как факторы, определяющие количественный состав микрофлоры**

Механические свойства почвы – это косвенные факторы, влияющие на численность микроорганизмов. Механический состав влияет на аэрируемость почвы, ее увлажнение. На песках из-за того, что частицы крупные, между ними хорошо проходит вода, которая быстро вымывает питательные вещества. Соответственно на песчаных почвах микроорганизмов будет меньше. В глинистых и на возделываемых почвах находится очень много питательных веществ, к тому же возделываемые постоянно, активно рыхлятся, обитает очень много микроорганизмов.

Активность микроорганизмов в почве очень сильно зависит от влажности. Уже при гидратуре ниже 96% она прекращается. При слишком высоком содержании воды в почве аэробные организмы выходят из игры (Вальтер, 1982).

### **1.3.4 Динамика численности микроорганизмов в зависимости от сезона года**

От сезона года зависит как количественный, так и качественный состав микрофлоры почвы. Почти во всех типах почв резкое увеличение численности и физиологической активности микроорганизмов наблюдается в сезон весны, что связано с обогащением почвы за осенне-зимний период органическим опадом. В почвах южной зоны в сезон жаркого и засушливого лета численность микроорганизмов резко сокращается. Многие микроорганизмы переходят в состояние анабиоза и практически не принимают участия в процессах трансформации веществ. В почвах северной зоны в условиях достаточного увлажнения сезонные колебания численности микроорганизмов выражены менее резко. Максимальная численность микроорганизмов обычно приходится на летние месяцы, что обусловлено относительно хорошей прогреваемостью почвы.

На сезонную динамику численности микроорганизмов оказывают влияние не только влажность и температура, но и фаза развития растений, поступление в почву органического опада, накопление микробных метаболитов. Поэтому помимо сезонных колебаний численности, в почве наблюдаются изменения численности и структуры микробных группировок за относительно короткие промежутки времени – месяцы, недели и даже сутки (Лукомская, 1987).

### **1.4 Причины снижения плодородия почвы и способы его повышения**

В этой главе мы рассмотрим не вообще плодородие, а влияние на плодородие почвы микроорганизмов, а также такое явление как утомление почвы.

На явление утомления почвы, т.е. того факта, что урожаи падают, когда на одних и тех же площадях многократно и без перерыва выращиваются одни и

теже растения, главное влияние оказывает специфичность флоры ризосферы. Считают, что в таких случаях со временем чрезмерно увеличиваются популяции определенных микроорганизмов в ризосфере; микрофлора обедняется в видовом отношении, так что могут накапливаться токсические продукты азотистого обмена. Поэтому частичная стерилизация почвы влияет большей частью благоприятно (Вальтер, 1982).

## **Глава 2. Материалы и методика исследования**

### **2.1 Особенности сбора почвенных образцов**

При сборе почвенных образцов мы пользовались некоторыми правилами. Отбор производился совком, который после каждого использования обрабатывался водой. При сборе общего образца почвы, т.е. требовалось получить образец с разных горизонтов, но исследовать вместе, то образцы брались с разной глубины, а потом перемешивались. При отборе горизонтальных проб, соответственно взятые пробы не перемешивались. Каждый почвенный образец был положен в бумажный пакет и этикирован (место сбора, глубина, тип почвы). До начала исследования почвенные образцы хранились в холодильнике с некоторым увлажнением не более суток при температуре 1-3 °С (Черкес, Богоявленская, Бельская, 1987).

### **2.2 Методы исследования микрофлоры почвы**

Исследование микрофлоры почвы довольно сложно. Причем эта сложность заключается в том, что при исследовании различными методами получаются разные результаты. Иногда цифровые данные отличаются на один, два и даже три порядка. Однако при работе одним и тем же методом получаются вполне сопоставимые данные, на основе которых можно сформулировать достоверные выводы (Лукомская, 1987).

Выделим основные методы исследования микрофлоры почвы:

- посев на твердые и жидкие питательные среды;
- метод электронной микроскопии;
- метод прямого счета С.Н. Виноградского;
- метод стекол обрастания, разработанный Холодным.

Посев на твердые и жидкие питательные среды дает, как правило, заниженные результаты и выявляет миллионы микроорганизмов на 1 г почвы.

Метод электронной микроскопии позволяет получить материал на три порядка выше по сравнению с посевом на твердые и жидкие питательные среды (Лукомская, 1987).

Интересен метод Холодного, который служит для выяснения конкурентных отношений между микробами почвы. Опишем кратко сущность этого метода. Предметные стекла, которые могут быть покрыты тонким слоем агара без питательных веществ, вставляют вертикально в подготовленные в почве ямки, плотно прижимают к стенке ямки и засыпают землей; через 1-3 недели стекла вынимают для исследования (после предварительной фиксации) поселившихся на них микробов. Таким путем стремятся учесть активную микрофлору, что при обычных методах разведения невозможно (Вальтер, 1982).

Наиболее оптимален метод С.Н. Виноградского. Он основан на прямом счете микроорганизмов после определенной фиксации. В нашей работе именно он и использован для определения численного содержания микроорганизмов в почве.

Рассмотрим последовательные стадии выделения и учета микроорганизмов по С.Н. Виноградскому. Небольшое количество почвенного образца растирали в течение 10 минут в стерильной ступке пестиком. Затем на стерильном часовом стекле отвесили 1 г почвы и перенесли ее в колбу с 9 мл стерильной дистиллированной воды, получая разведение 1:10. Встряхивали колбу 5 минут, отстояли 3-5 секунд и стерильной пипеткой перенесли 0,01 мл взвеси на обезжиренное предметное стекло. Распределили мазок по заранее вычерченному квадрату площадью 4 см<sup>2</sup> стерильной иглой. Мазок высушили, зафиксировали, прокрасили карболовым эритрозинном в течение 30 минут. Промыли и высушили препарат. Микроскопировали с полной иммерсионной системой, производя подсчет микроорганизмов. Подсчет проводили в 5 полях зрения. Расчеты проводили по формуле:

$$A = \frac{\alpha \cdot S \cdot 10}{S_1 \cdot 0.01 \cdot 1},$$

где  $\alpha$  – среднее количество микроорганизмов в поле зрения микроскопа,  $S$  – площадь мазка (400 мм<sup>2</sup>),  $S_1$  - площадь поля зрения ( $\Pi r^2$ ), 0,01 – капля суспензии для мазка (мл), 1 – навеска почвы (г). Площадь поля зрения определялась с помощью сеточного объектива.

### Глава 3. Результаты исследования

Исследования проводились в окрестностях города Череповца. Были взяты пробы из следующих типов местообитаний: обрабатываемая гряда, торфяное болото, хвойный лес, луг, ил канавы, местообитание без растений (вытоптанное). Мы получили следующие данные по вариантам подсчета (5):

Тип местообитания		Результаты учета особей				
Верховое болото		35	17	25	16	20
Хвойный лес		30	8	23	78	53
Луг		35	48	36	178	32
Отсутствие растительности		14	17	28	9	12
Канавы		34	73	12	45	24
Гряды	0 см	49	73	113	105	79
	10 см	305	150	230	100	75
	20 см	64	83	33	55	23
	30 см	250	130	110	73	156

Далее по учету особей:

Тип местообитания		Результаты учета особей				
Верховое болото		1573033707	764044943	1123595505	719101124	898876405
Хвойный лес		1348314607	359550562	1033707865	3505617978	2382022472
Луг		1573033708	2157303371	1617977528	8000000000	1438202247
Отсутствие растительности		629213483	764044944	1258426966	404494382	539325843
Канавы		1528089887	3280898876	539325842	2022471910	1078651685
Гряды	0 см	2202247191	3280898876	5078651685	4719101124	3550561798
	10 см	13707865169	6741573034	10337078652	4494382022	3370786517

	20 см	2876404494	3730337079	1483146067	2471910112	1033707865
	30 см	11235955056	5842696629	4943820224	3280898876	7011235955

Ив итоге среднее количество микроорганизмов в 1 г почвы составило:

Тип местообитания		Количество микроорганизмов в 1 г почвы
Верховое болото		1,015,730,336
Хвойный лес		1,725,842,696
Луг		2,957,303,370
Отсутствие растительности		719,101,123
Канавы		1,689,887,640
Гряды	0 см	3,766,292,134
	10 см	7,730,337,078
	20 см	2,319,101,123
	30 см	6,462,921,348

Для выяснения соотношения численности в различных типах почвы и большей наглядности мы построили диаграмму (рис. 1.).

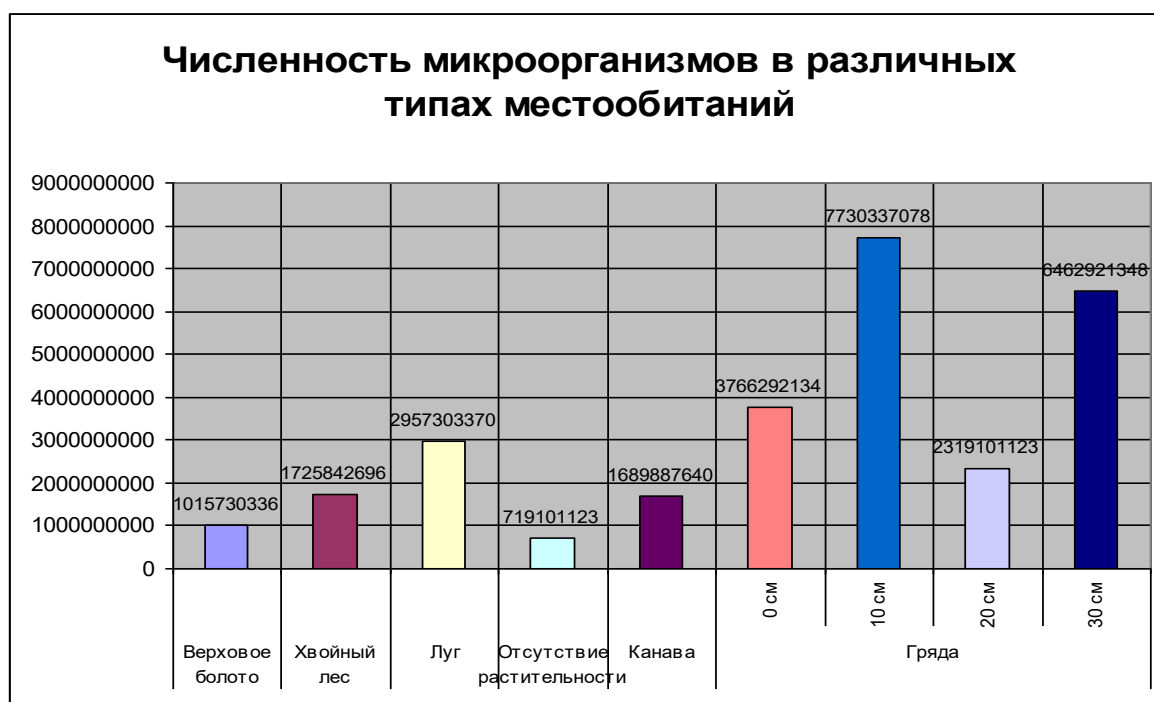


Рис. 1. Численность микроорганизмов в различных типах местообитаний.



## Глава 4. Обсуждение результатов, полученных при исследовании

При определении количественного состава микрофлоры мы использовали метод прямого счета. Полученные данные довольно хорошо отражают динамику численности микроорганизмов в почве при изменении типа местообитания. Следует учитывать, что исследование проводилось после выпada снега, поэтому результаты по сравнению с летними будут немного занижены. Особенно это будет сказываться при горизонтальном анализе.

Итак, рассмотрим численность микроорганизмов в исследуемых образцах. Местообитание «отсутствие растительности» характеризуется полным отсутствием растений на поверхности. Причина этому вытаптывание, которое еще сказывается на уплотнении почвы и соответственно сильном ухудшении аэрации. При наших исследованиях мы получили, что именно в этой почве обнаруживается наименьшее количество микроорганизмов. Главная же причина этому отсутствие корней высших растений, на которых и концентрируется основная масса микробов.

Следующий объект – болото. Условия в торфе очень не благоприятны для микроорганизмов: излишняя увлажненность, кислая среда, мало корней. Поэтому здесь также наблюдается маленькая концентрация микробов.

В почве канавы довольно много микроорганизмов. Это возможно, так как, несмотря на влажную среду, ил очень питателен для микроорганизмов. Возможно основная масса, обитающих в нем микробов – это анаэробы.

Хвойный лес имеет хорошо аэрируемую, нормально-окисленную и достаточно увлажненную почву. Эти условия благоприятны.

В почвах луга находится очень много корней, из-за этого почва благоприятна для развития ризосферы, к тому же корни разрыхляют почву и улучшается аэрация.

Самое большое количество микроорганизмов на единицу объема приходится на гряде. Эта почва ежегодно обрабатывается, вносятся удобрения. Поэтому в ней находится много питательных веществ, хорошие механические свойства, структура, а также достаточное, но не превышенное увлажнение. Рассмотрим погоризонтно микробный состав. На глубине 0 см, т.е. на поверхности наименьшее количество микробов. Это объясняется не высушиванием и действием солнечных лучей как летом, а присутствием снегового покрова, из-за которого произошло понижение температуры верхних слоев. Точнее говоря, они замерзли. Возможно, они там вообще не были бы обнаружены, но пробы хранились некоторое время в холодильнике, поэтому произошло размножение микробов. Это явление относится также и к остальным пробам. На глубине 10 см количество микроорганизмов повышается почти вдвое. Этот факт показателен, так как летом организмы сосредоточены именно в этом горизонте, и зимой отчасти из-за летних ограничений и отчасти из-за понижения температуры. Нечем объяснить соотношение на 20 и 30 см, так как теоретически оно должно быть противоположным. Возможно здесь была нарушена методика исследования.

В результате исследования мы получили данные, которые практически соответствуют теоретическим. Количество микроорганизмов зависит от увлажнения, кислотности, механической структуры почвы, а также наличия или отсутствия высших растений. Для микроорганизмов наиболее благоприятны следующие условия: нормальная кислотность, среднее увлажнение, даже лучше небольшое увлажнение (организмы способны использовать воду, недоступную высшим растениям), хорошая аэрируемость почвы, наличие хорошо развитой корневой системы высших растений. Наиболее неблагоприятными условиями являются: сильно увлажнение, отсутствие высших растений, сильная уплотненность, кислая среда (торф).

## Глава 5. Выводы

Выяснили основные свойства почвы, как среды обитания микроорганизмов. При этом оказалось, что почва – это гетерогенная среда, в которой имеются различные локусы с различными условиями, и соответственно микробы выбирают такие места, где им условия наиболее подходят. Определили методы исследования количественного и качественного состава микрофлоры почвы. Также выяснилось, что есть методы, позволяющие выяснить характер взаимоотношений в сообществах микроорганизмов. Проследили основные факторы, которые оказывают влияние на количество микроорганизмов в единице объема. Значительные колебания численности наблюдаются при изменении типа почвы, глубины, времени года, степени увлажнения, наличия высших растений. Провели исследование основных типов местообитаний, в которых имеются различные по различным характеристикам типы почв.

В ходе нашего исследования подтвердились теоретические данные по динамике численности микроорганизмов. Выявили основные, наиболее обогащенные микробами местообитания: луг, обрабатываемая почва; и наименее обогащенные: болото и местообитание с отсутствием высших растений.

## **Глава 6. Практическое значение полученных результатов**

Практического значения данные исследования имеют, но очень маленькое, ввиду того, что затрагивают очень узкую тему. Также наши данные имеют плохую достоверность, поэтому даже в изучении динамики численности микроорганизмов в почве имеют небольшое значение.

Полученные результаты можно использовать в качестве дополнительной информации для студентов при изучении курса микробиология.

## **Глава 7. Использование материалов курсовой работы в средней школе**

Материалы курсовой работы могут быть применены в школе в качестве дополнительного материала при изучении биологии в средней школе в 6 классе, в разделе: бактерии, грибы, лишайники; в параграфах –

- 1) Бактерии, их строение и жизнедеятельность;
- 2) Роль бактерий в природе и жизни человека;
- 3) Болезнетворные бактерии (Корчагина, 1988).

Данные будут интересны тем, что исследование проводилось в окрестностях города.

## Список литературы

1. Бакулина Н.А., Краева Э.Л. Микробиология. — М.: Медицина, 1980.
2. Биология: Энциклопедия / Под ред. Гилярова М.С. — М.: Большая Российская энциклопедия, 2003.
3. Вальтер Г. Общая геоботаника. — М.: Мир, 1982.
4. Корчагина В.А. Биология: растения, бактерии, грибы, лишайники. — М.: Просвещение, 1992.
5. Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии. — М.: Просвещение, 1987.
6. Мудрецова-Висс К.А., Чистяков Ф.М. Микробиология. — М.: Экономика, 1971.
7. Черкес Ф.К., Богоявленская Л.Б., Бельская Н.А. Микробиология. — М.: Медицина, 1987.