

ИНСТРУМЕН-
ТАЛЬНЫЕ
МЕТОДЫ
В ПОЧВЕННОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ



АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ
им. Д. К. ЗАБОЛОТНОГО

ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ В ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Под общей редакцией
члена-корреспондента АН УССР
Е. И. АНДРЕЮК

УДК 578.088 : 631.46

Инструментальные методы в почвенной микробиологии / Под общ. ред. Е. И. Андреюк. — Киев : Наук. думка. 1982. — 176 с.

В книге рассматриваются теоретические основы и практическое применение некоторых современных физико-химических (инструментальных) методов — оптических, электрохимических, хроматографических и др. Приводится подробное описание методов, используемых при выполнении конкретных исследований в области почвенной микробиологии.

Для научных сотрудников, интересующихся вопросами систематики, экологии и физиологии почвенных микроорганизмов, а также проблемами биологии почв.

Ил. 49. Табл. 11. Библиогр.: с. 165—174.

Авторы Е. И. АНДРЕЮК, Е. В. ВАЛАГУРОВА, Н. Н. МАЛЫЦЕВА, С. А. ГОРДИЕНКО, А. Н. ДУЛЬГЕРОВ, Ж. П. КОПТЕВА, С. Б. ЯНОВЕР, А. Ф. АНТИПЧУК, И. А. КОЗЛОВА, Г. А. ИУТИНСКАЯ, Н. Н. СКОЧИНСКАЯ, В. В. ИЗЖЕУРОВА, В. Н. РАНГЕЛОВА, Е. А. МЯТЛИКОВА, С. И. ШЕВЧЕНКО, Н. Ф. НАУМЕНКО, В. Е. КОЗЫРИЦКАЯ, Н. Ф. КИГЕЛЬ, Н. И. ИВАНОВА, А. Н. МЕНДЕЛЕВ, В. В. ЗАНИНА

Рецензенты Ю. Р. МАЛАШЕНКО, И. И. ШЕВЦОВА

Редакция физиологической, биохимической и медицинской литературы

ВВЕДЕНИЕ

Достижения физики, химии и разработанные на их основе новые методы исследований находят все более широкое применение в биологии, в частности в микробиологии. Исследования, проводимые в настоящее время на клеточном и субклеточном уровнях, необходимы как средство познания процессов метаболизма и функций живого организма, требующее применения новых методов и соответствующего инструментального оформления.

Успехи современной общей и почвенной микробиологии невозможны без применения физических и физико-химических методов исследований, направленных на глубокое изучение строения микробной клетки, расшифровку сложных реакций, осуществляемых микроорганизмами (азотфиксация, фотосинтез, дыхания, синтеза биологически активных веществ), и выяснение сущности процессов превращения веществ в природе. Однако необходимых пособий для микробиологов нет, а имеющиеся методические работы разрознены и представлены в различных литературных источниках.

Настоящее методическое руководство является отражением многолетних исследований, проводимых в отделе общей и почвенной микробиологии. Коллектив авторов-составителей преследовал цель описать комплекс инструментальных методов, которые могут быть использованы для решения тех или иных вопросов физиологии, биохимии и экологии микроорганизмов. По традиции предлагаемое пособие начинается с описания микроскопических методов исследования. В этой главе изложен материал по использованию световых микроскопов, фазово-контрастной, люминесцентной и электронно-микроскопической техники в микробиологических исследованиях.

Методы, основанные на оптических свойствах анализируемых веществ, представлены в книге фотоколориметрией, нефелометрией, флюорометрией. В микробиологии эти методы широко применяются для определения активности ферментов, содержания витаминов, а также некоторых метаболитов микроорганизмов.

Из методов спектрального анализа рассматриваются спектрофотометрия и инфракрасная спектрофотометрия.

Электрохимические методы анализа описаны в главах «Потенциометрия», «Потенциометрическое титрование» и «Полярография». Этими методами пользуются для оценки функциональных групп метаболитов, характеристики их активности и взаимодействия с другими соединениями.

Наиболее распространенным методом разделения сложных смесей веществ является хроматография. В соответствующих главах книги дано описание некоторых хроматографических методов, широко используемых для разделения и анализа аминокислот, пептидов, белков, липидов и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. Представлена методика хроматографического разделения на бумаге, в тонком слое сорбента, а также газовая хроматография, позволяющая максимально сократить продолжительность анализа. Описан метод фракционирования белков и пептидов на ионообменниках и широко распространенный в настоящее время сравнительно молодой хроматографический метод — гельфильтрация на нейтральных носителях.

В книге рассматриваются масс-спектрометрический метод применительно к изучению вопросов биологической фиксации азота, а также метод электронного парамагнитного резонанса, весьма перспективный для установления структуры сложных органических соединений — продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Кроме перечисленных выше книга включает некоторые методы, связанные с экологией почвенных микроорганизмов, а также математической обработкой данных и составлением программ для электронно-вычислительной техники.

Глава 1

МИКРОСКОПИЯ

Разнообразие форм микроорганизмов оставалось неизвестным до появления микроскопа, открывшего человеку «царство» мельчайших невидимых простым глазом существ.

В древности для получения увеличенных изображений люди пользовались простыми линзами или большими увеличительными стеклами. Такая оптика была использована в первых конструкциях микроскопов. Голландский натуралист Антони Левенгук (1632—1723 гг.) с помощью короткофокусной линзы сконструировал прибор, увеличивающий изображение в 50—300 раз. На смену микроскопам с одной линзой пришли микроскопы с двумя линзами, а затем и системой линз — объективом и окуляром. Однако первые конструкции этих сложных приборов имели существенные недостатки и нередко в эффективности уступали простым инструментам Левенгука.

В результате постоянного усовершенствования конструкции в период с 1820 по 1870 гг. были созданы приборы, по качеству приближавшиеся к современным. В настоящее время световые микроскопы позволяют получать увеличение до 3000 раз, а электронные — до 300 000. Усовершенствование микроскопической техники и широкое применение инструментального метода в микробиологии вообще и в почвенной микробиологии в частности помогло узнать о новых морфо-функциональных особенностях микробных клеток, что способствовало пересмотру некоторых положений таксономии и экологии почвенных микроорганизмов.

В настоящее время в почвенной микробиологии эффективно используется свето-оптическая микроскопия и микроскопия в темном поле; все чаще исследователи применяют фазово-контрастную и люминесцентную микроскопии. возрос интерес к электронной микроскопии.

МИКРОСКОПИЯ В СВЕТАЛОМ ПОЛЕ

Изучение морфологии микроорганизмов, размер которых измеряется микрометрами ($1 \text{ мкм} = 0,001 \text{ мм}$), возможно только с помощью микроскопов.

Микроскоп (греческие *micros* — малый и *scopos* — смотрю) — оптический прибор, предназначенный для исследования не видимых невооруженным глазом объектов. Описание микроскопов дано во многих руководствах и учебниках (Роскин, Левинсон, 1957; Аппельт, 1959; Фробишер, 1965; Стейнер и др., 1979). Мы остановимся лишь на основных принципах строения современных микроскопов и тех особенностях метода микроскопии, которые необходимо знать каждому исследователю, работающему с микроскопом, а также на возможностях применения этого метода в почвенной микробиологии.

Наиболее распространенными моделями современных микроскопов, предназначенных для биологических исследований в светлом поле, являются микроскопы типа МБИ-2; МБИ-3; МБИ-6; МБИ-10.

Строение микроскопа. Каждый микроскоп состоит из механической и оптической частей. Механическая часть включает штатив, предметный столик и тубус (рис. 1). Для устойчивого положения микроскопа нижняя часть штатива делается более массивной. На штативе устанавливается подвижный предметный столик, на котором закрепляется препарат. Столик приводится в движение двумя боковыми винтами. С помощью этих винтов препарат вместе со столиком передвигается в различных направлениях. На крестообразных столиках препараты перемещаются в двух взаимно перпендикулярных направлениях. В середине столика находится отверстие, через которое объект освещается лучами света, отраженными зеркалом микроскопа.

Оправа, в которую заключены основные элементы оптической части микроскопа, называется тубусом. На нижней части тубуса находится специальное приспособление — револьвер, в котором закрепляются объективы. Окуляры вставляются в верхнюю часть тубуса. Грубая предварительная настройка микроскопа осуществляется макровинтом, тонкая фокусировка — микрометрическим винтом. При вращении этих винтов по часовой стрелке тубусодержатель опускается, при вращении против часовой стрелки — поднимается. Один оборот микрометрического винта соответствует перемещению тубуса на $0,1 \text{ мм}$.

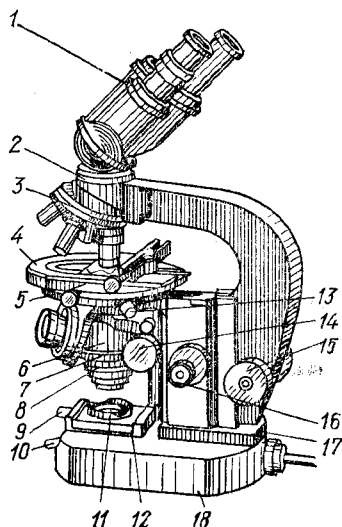
Оптическая часть микроскопа состоит из зеркала и трех раздельных систем линз: конденсора, объектива и окуляра. Зеркало отражает падающий на его поверхность свет в конденсор. Конденсор собирает отраженный свет и направляет его на плоскость исследуемого препарата. В конденсоре имеется ирисовая диафрагма, которая при необходимости может задерживать излишний свет и уменьшать апертуру (светособирательную способность) конденсора. Для получения четкого изображения исследуемого объекта очень важно отрегулировать положение конденсора. Во многих

современных микроскопах зеркало и конденсор заменены вмонтированным в прибор регулируемым источником света.

Наиболее важной частью оптического узла микроскопа является объектив (многолинзовая короткофокусная система), дающий действительное увеличение и обратное изображение. Простым линзам объективов присущи два оптических дефекта. Они не могут сфокусировать одновременно все поле зрения микроскопа (сферическая aberrация) и создают окрашенную кайму вокруг изображения (хроматическая aberrация). Эти дефекты почти полностью ус-

Рис. 1. Общий вид микроскопа биологического МБИ-2:

1 — косо поставленный бинокулярный тубус, 2 — съемное основание тубуса, 3 — съемный револьвер для четырех объективов, 4 — подвижный крестообразный столик микроскопа, 5 — основание подвижного столика микроскопа, 6 — часть конденсорного револьвера, 7 — кольцо для установки апертуры конденсора, 8 — апертурная шкала, 9 — винт для установки апертурной диафрагмы, 10 — винт для центрирования светового поля, 11 — кольцо апертурной диафрагмы, 12 — вращающаяся апертурная диафрагма, 13 — винт для центрирования крестообразного столика, 14 — винт для движения конденсорного устройства, 15 — и 16 — макро- и микрометрические винты микроскопа, 17 — патрон осветительной лампочки, 18 — основание («ножка») штатива микроскопа.



транены в современных микроскопах путем использования так называемых коррекционных объективов (ахроматов, апохроматов, planoхроматов).

Достоинство объектива определяется показателями апертуры, увеличения и исправления aberrации. По значению числовой апертуры и увеличению различают слабые объективы (апертура 0,02—0,25 и увеличение $\times 1$ — $\times 10$), средние (апертура 0,3—0,65 и увеличение $\times 10$ — $\times 40$) и сильные (апертура 0,7—1,6 и увеличение $\times 40$ — $\times 120$). По способу применения различают сухие и иммерсионные объективы. При работе с сухим объективом между объектом исследования и фронтальной линзой объектива остается воздушное пространство. Иммерсионные объективы осторожно погружаются в капельку жидкости или иммерсионного масла, предвременно нанесенного непосредственно на препарат или покровное стекло. Так как угол преломления света для стекла и масла примерно одинаков, то таким образом устраняется возможность рассеивания лучей — улучшается видимость. Иммерсионные объективы имеют черную круговую нарезку и обозначения (I — immersion, HI — homogen immersion, OI — oil immersion, MI — масляная иммерсия).

Увеличение объектива определяется по формуле

$$V = \frac{l}{f},$$

где l — оптическая длина тубуса, для разных объективов она колеблется между 128 и 180 мм; f — фокусное расстояние объектива; слабые объективы имеют фокусное расстояние 50—60 мм, сильные — 1,3 мм. Значение увеличения объектива наносится на его оправу.

Одной из существенных характеристик объективов является их разрешающая способность, зависящая от числовой апертуры объектива и длины волны света, при которой ведется наблюдение, и выражающаяся формулой

$$d = \frac{\lambda}{A},$$

где λ — длина волны, воспринимаемая человеческим глазом, A — числовая апертура объектива (произведение синуса половины угла, под которым свет падает в объектив, и показателя преломления среды, находящейся между фронтальной линзой объектива и покровным стеклом).

Окуляр состоит из двух линз: собирающей и глазной. Собирающая линза концентрирует лучи, идущие от объектива. Глазная линза окуляра увеличивает действительное изображение, полученное от объектива. Общее увеличение окуляра повышается с уменьшением фокусного расстояния линз. Компенсационными окулярами пользуются для устранения хроматической аберрации объектива. Окуляры дают увеличение в 5, 7, 10, 15, 20 раз, что обычно указывается на оправе.

Увеличение D , которое дает микроскоп, определяется произведением увеличения K объектива на увеличение V окуляра: $D = KV$. Теоретически световой микроскоп может дать увеличение в 2000 раз. Пределы же полезного увеличения не превышают $\times 1400$. Превышение этого увеличения приводит к дифракции и оптическим ошибкам.

Предельное разрешение d — наименьшее расстояние между двумя точками, при котором они еще воспринимаются глазом раздельно, — рассчитывают по формуле

$$d = \frac{0,61 \cdot \lambda}{A_1 + A_2},$$

где λ — длина волны света; A_1 — апертура объектива; A_2 — апертура конденсора; 0,61 — числовой коэффициент.

Разрешающая способность микроскопа тем выше, чем меньше ее абсолютное значение.

Наименьшие частицы, которые удастся увидеть в современные световые микроскопы, должны иметь размер больше $\frac{1}{3}$ длины волны света. Следовательно, при использовании видимой части дневного света, имеющей длину волны 0,0004—0,0007 мм, в микроскопе могут быть обнаружены частицы размером не менее 0,0002 мм (0,2 мкм).

Основные правила работы с микроскопом. При работе, требующей малого увеличения (объектив $\times 8$), рекомендуется использо-

вать зеркало с вогнутой поверхностью. Конденсор при этом опущен, передвижение тубуса осуществляется макровинтом. При работе с иммерсионными объективами конденсор поднимают до упора, зеркало устанавливают плоской стороной к свету. На препарат наносят каплю иммерсионного масла и макровинтом осторожно опускают тубус до прикосновения фронтальной линзы к иммерсионной жидкости. Затем проводят тонкую фокусировку микро- винтом.

Для получения четкого изображения очень важно установить правильное освещение препарата. С этой целью при работе с микроскопами, не имеющими осветительной системы, освещение по Келеру осуществляется с помощью осветителей (ОИ-7, ОИ-9, ОИ-18, ОИ-19). Осветитель устанавливают на соединительной планке на расстоянии 25—30 см от микроскопа. При этом используют плоское зеркало и объектив $\times 8$. Фокусировку проводят при открытых диафрагмах осветителя и конденсора. Затем диафрагму осветителя закрывают, подносят к зеркалу микроскопа белый лист бумаги и находят резкое изображение спирали осветителя на бумаге. Далее движением зеркала находят свет, фокусируют его на препарат, опускают конденсор, пока изображение краев полевой диафрагмы осветителя в плоскости препарата не станет четким; центрируют движением зеркала изображение отверстия диафрагмы и, наблюдая в микроскоп, открывают нулевую диафрагму осветителя. Никаких изменений в положении осветителя, зеркала и конденсора микроскопа в дальнейшем производить не рекомендуется.

Установку света по Келеру используют как при обычной в проходящем свете, так и при фазово-контрастной и темнопольной микроскопии.

Микроскопические исследования микробной клетки. Метод светопольной микроскопии широко используется при идентификации почвенных микроорганизмов. Изучение морфологических признаков (формы и размера клеток, образования спор и капсул), способов движения и некоторых цитохимических особенностей микробной клетки невозможно без микроскопа.

Традиционными объектами исследований отдела общей и почвенной микробиологии Института микробиологии и вирусологии АН УССР являются почвенные бактерии и актиномицеты.

Р а з м е р. Определяют в живых препаратах с помощью окулярмикрометра — круглой стеклянной пластинки со специальной линейной шкалой. Окулярмикрометр помещают на диафрагму окуляра под окулярную линзу шкалой вверх. Микрокопируя препарат, записывают число делений окулярной линейки, помещающихся по длине и ширине клеток. Для определения истинных размеров клетки цену деления окулярмикрометра узнают с помощью объект- микрометра. Объектмикрометр представляет собой предметное стекло, в центре которого находится покровное стекло с линейкой, каждое деление которой равно 10 мкм. Шкалу объектмикрометра совмещают со шкалой окулярмикрометра и вычисляют цену делений

последнего по формуле

$$n = \frac{10A}{B} \text{ мкм,}$$

где A — число делений объектмикрометра; B — число делений окулярмикрометра; 10 — цена делений объектмикрометра. Таким образом, истинную длину (l) клетки можно выразить так:

$$l = na \text{ мкм,}$$

где a — число делений окулярмикрометра, помещающееся по длине клетки; n — цена деления окулярмикрометра.

Ф о р м а. Чаще исследуют с помощью фиксированных окрашенных препаратов. На чистое обезжиренное предметное стекло наносят каплю водопроводной воды, в нее бактериологической петлей вносят культуру микроорганизма и тщательно растирают по стеклу. Мазок высушивают на воздухе при комнатной температуре либо высоко над пламенем горелки. Высушенный мазок фиксируют, проводя препарат тыльной стороной 3—4 раза над пламенем горелки. Препарат можно также фиксировать 96-градусным спиртом, жидкостью Никифорова (смесь равных объемов спирта и эфира); хромовыми соединениями, осмиевой кислотой, ацетоном, формалином. Фиксация способствует прочному прикреплению к стеклу и лучшему прокрашиванию клеток, не изменяя их формы. Для окрашивания препарата на мазок наносят несколько капель красителя. При простой окраске используется один из красителей: метиленовый синий, фуксин или генциан фиолетовый. Через 1—3 мин препарат промывают водой, удаляют оставшуюся влагу фильтровальной бумагой, подсушивают и микроскопируют.

П о д в и ж н о с т ь. Исследуют с помощью метода раздавленной капли. В каплю воды, помещенную на чистое предметное стекло, петлей вносят культуру и тщательно перемешивают с водой, накрывают покровным стеклом, избыток воды удаляют фильтровальной бумагой, после чего препарат микроскопируют. При использовании иммерсионной системы на покровное стекло наносят каплю иммерсионного масла. Подвижность бактерий изучают также методом висячей капли. В качестве прижизненных красителей используют метиленовый синий в концентрации 0,001—0,0001 %.

С т р о е н и е. При идентификации почвенных микроорганизмов наряду с описанием формы и размера, изучением культуральных и биохимических свойств исследуются морфо-функциональные особенности клеток — их способность образовывать споры и капсулы, накапливать запасные питательные вещества, изучаются особенности химического строения клеточных оболочек и ряд других признаков.

Изучение внутреннего строения микробной клетки проводится с помощью цитохимических методов, основанных на дифференцированном окрашивании отдельных веществ, микроструктур и оргanelл клетки. Заключительным этапом исследований является мик-

роскопирование. Рецепты реактивов и красителей, используемых при окраске препаратов, приведены в руководствах «Большой практикум по микробиологии» (1962) и Теппер, Шильникова, Переверзева (1979).

Окраска клеток микроорганизмов по Граму. Метод дифференцированной окраски, основанный на различии в химическом составе клеточных оболочек. Клетки одних микроорганизмов при окрашивании образуют нерастворимое в спирте соединение йода с генцианвиолетом, других — растворимое в спирте соединение, вымываемое затем из клетки. Первые окрашиваются в темно-фиолетовый цвет и называются грамположительными, вторые — в красный и называются грамотрицательными. Окраска по Граму — один из диагностических признаков, широко используемых при идентификации бактериальных культур. Окраска препаратов производится следующим образом.

Высушенный препарат фиксируют над пламенем горелки и в течение 1—2 мин окрашивают карболовым раствором генцианвиолета. Затем сливают краситель и в течение 1 мин обрабатывают мазок раствором Люголя. После этого в течение 15—20 с обрабатывают препарат 96-градусным спиртом до появления фиолетовых струек несвязавшейся краски. Препарат промывают дистиллированной водой и дополнительно окрашивают разведенным фуксином Пфейффера, после чего промывают водой, высушивают и микроскопируют.

Окраска спор. При микроскопировании препаратов живых спорообразующих бактерий споры видны как образования, более сильно преломляющие свет. Так как споры имеют плотную оболочку, слабо проницаемую для красителей, то при простой окраске они остаются бесцветными. Поэтому все методы окраски спор предусматривают предварительное их протравливание химическими веществами (хромовой, соляной, серной, уксусной кислотами, едким натром или перекисью водорода), в результате которого изменяются физико-химические свойства оболочки. После протравливания клетку со спорой окрашивают при нагревании, затем обесцвечивают цитоплазму и дополнительно окрашивают последнюю контрастным красителем. Техника окраски заключается в следующем.

На фиксированный в пламени мазок наносят карболовый фуксин и подогревают до появления паров. Процедуру повторяют трижды. Важно, чтобы все стекло было равномерно покрыто красителем. После охлаждения окрашивающий раствор сливают и препарат обрабатывают в течение 30—60 с 5%-ным раствором серной кислоты. Дополнительно фиксируют каплями спирта, после чего обильно промывают дистиллированной водой. Затем в течение 1—3 мин докрашивают метиленовым синим. Препарат промывают водой и высушивают. При микроскопировании споры имеют красную окраску, цитоплазма клетки — голубую.

Кроме описанного метода существуют и другие методы окраски спор (метод Мюллера, Ожешко).

Окраска капсул. При обычных методах окраски бактерий капсулы остаются бесцветными, на чем основан негативный метод их окраски (метод Бури). Капли туши смешивают на предметном стекле с каплей бактериальной культуры, предметным стеклом распределяют каплю по поверхности стекла, высушивают и микроскопируют с использованием иммерсионной системы. На темно-сером фоне видны неокрашенные капсулы и клетки бактерий.

Применение красящих растворов основывается на различиях химического состава бактериальной протоплазмы и капсулы. Большинство капсул содержат полисахариды. Благодаря различному сродству белков цитоплазмы и углеводов капсулы к красителям можно дифференцировать эти составные части клетки. Метод Гинса основан на том, что коллоидные растворы (например, тушь) не проникают в бактериальную клетку, создавая темный фон, на котором хорошо видны бактерии, окрашенные сильными основными красителями. Техника окраски следующая.

На предметном обезжиренном стекле смешивают каплю бактериальной культуры с каплей туши. Мазок фиксируют 2—3 мин 7%-ным водным раствором сулемы, после чего препарат промывают водой, окрашивают в течение 5 мин карболовым раствором фуксина, затем снова промывают водой и высушивают.

При микроскопировании препаратов в иммерсионной системе на темном фоне видны бактерии, окрашенные в интенсивно красный цвет, окруженные бесцветными капсулами.

Окраска жгутиков. В основе всех методов изучения жгутиков (толщина 0,02—0,04 мкм) лежит обработка их протравителями, позволяющими увеличить объем жгутиков и усилить их сродство к красителям.

По методу Леффлера, суспензию клеток молодой (12—18-часовой) культуры наносят на предметное стекло, подсушивают и быстро проводят через пламя горелки. На фиксированный препарат наносят по каплям протравитель на 10—15 мин, после чего его сливают и препарат дважды промывают дистиллированной водой. Затем окрашивают препарат разбавленным в 2 раза водным раствором карболового фуксина в течение 3—4 мин, после чего промывают водой, высушивают и микроскопируют в иммерсионной системе.

Протравитель состоит из следующих компонентов: I — насыщенный спиртовой раствор основного фуксина (несколько кристаллов фуксина, растворенных в 10 мл 90-градусного спирта, выдерживают в течение 1—2 ч в термостате при 50°С); II — 20-процентный водный раствор танина; III — насыщенный на холоду водный раствор сернистого закисного аммиачного железа $[\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$. Реактив получают, смешивая 1 мл раствора I с 10 мл раствора II, после чего прибавляют 5,5 мл раствора III. Смесь выдерживают перед использованием 2—3 сут. Протравитель будет более эффективным, если на 10 мл его прибавить по 0,1—0,2 мл нормального раствора NaOH.

Окраска липопротсиновых телец. По методу Имшенецкого, препа-

рат на предметном стекле обрабатывают насыщенным раствором пикриновой кислоты в течение 5 мин. После промывания водой препарат окрашивают карболовым фуксином, разведенным водой (1 : 100) в течение 1—2 мин, заключают в смесь глицерина с желатином, подкрашенную лихтгрюном. Липопротеиновые тельца окрашиваются в красный цвет.

Окраска гликогена. Фиксированный в пламени препарат обрабатывают раствором Люголя в течение 2—3 мин. Зернышки коричневого цвета указывают на гликогенные скопления.

Окраска волютина. Волютин является запасным веществом клетки, содержащим фосфор и азот. При окраске волютина по методу Нейссера на фиксированный препарат наносят раствор Нейссера I и выдерживают в течение 1—2 мин. После этого краситель сливают и препарат окрашивают в течение 1—2 мин раствором Нейссера III.

Цитоплазма окрашивается в желтый, а волютин — в темно-синий, почти в черный цвет.

МИКРОСКОПИЯ В ТЕМНОМ ПОЛЕ

В основе микроскопии в темном поле лежит освещение объекта косыми лучами. Если осветить препарат сбоку, то свет не попадает в глаз наблюдателя и поле зрения выглядит темным. Косые лучи, проходя через препарат и встречаясь с более плотными частицами — объектами исследования, огибают их и образуют волны дифрагированного света. Микробные клетки препарата отражают часть лучей дифракции, которые попадают в систему линз объектива, и экспериментатор видит на черном фоне светящиеся объекты. Любой светоптический микроскоп может быть преобразован в темнопольный. Для этого достаточно заменить обычный конденсор на темнопольный и усилить источник света. Заменяв конденсор и установив источник света по Келеру, препарат несколько сдвигают в сторону, на верхнюю линзу конденсора наносят каплю иммерсионного масла и, опустив конденсор, устанавливают препарат на прежнее место. Затем поднимают конденсор вверх до соприкосновения масляной капли с предметным стеклом и фокусируют микроскоп на объект. После этого центрируют конденсор по отношению к оптической оси объекта, что осуществляется двумя винтами конденсора и специальными ключами. В поле зрения должно появиться светлое кольцо с темным пятном посередине или только светлое пятно. Подъемом конденсора устанавливают только светлое пятно, винтами выводят светлое пятно на середину поля зрения, после чего переходят к наблюдению при нужном увеличении.

Величина объектов, видимых при темнопольной микроскопии, измеряется сотыми долями микрометра, т. е. разрешающая способность микроскопа при использовании темнопольного конденсора увеличивается в 10 раз. Данный метод микроскопии используется для исследования живых клеток микроорганизмов. Особенно ценен

он для изучения крупных объектов, например, дрожжей. Цитоплазма дрожжевых клеток слабо опалесцирует и на ее фоне хорошо видны черные вакуоли, блестящие гранулы жира. У мелких объектов видны только их контуры.

ФАЗОВО-КОНТРАСТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Большинство живых клеток микроорганизмов, размеры которых лежат в пределах разрешающей способности микроскопа, по прозрачности (плотности) мало отличаются от окружающей среды. Световая волна, проходя через клетки этих микроорганизмов, выходит лишь с небольшим отставанием по фазе относительно волн, прошедших через окружающую среду. Амплитуда световой волны при этом почти не изменяется, поэтому объекты плохо различимы или даже невидимы в обычный светлорольный микроскоп.

Не давая никакого выигрыша с точки зрения разрешающей способности прибора, микроскоп с фазово-контрастным устройством позволяет наблюдать живые объекты, не прибегая к их фиксации и окрашиванию. Это достигается превращением различий в фазе световых лучей, проходящих через прозрачные клетки, в амплитудные, в результате чего объекты становятся контрастными.

Фазово-контрастное приспособление к микроскопу состоит из фазовых объектов с фазовыми пластинками, конденсора с набором кольцевых диафрагм и вспомогательного микроскопа. Каждая из кольцевых диафрагм соответствует

фазовой пластинке определенного объектива. С помощью вспомогательного микроскопа увеличивается изображение кольцевой диафрагмы и фазовой пластинки при совмещении. Все фазовые объекты обозначены буквой «Ф».

Подготовка микроскопа к фазово-контрастной микроскопии заключается в следующем: обычные объективы и конденсор заменяются на фазовые, поворотом диска вводится нулевая диафрагма. На препарате «раздавленная капля», пользуясь малым увеличением (объектив $\times 8$), устанавливают источник света по Келеру, затем — объектив $\times 40\Phi$. Заменяют окуляр на вспомогательный микроскоп и, перемещая его тубус, фокусируют фазовую пластинку объектива (темное кольцо). Поворачивая диск револьвера фазового устройства, включают кольцевую диафрагму, соответствующую объективу $\times 40\Phi$, при этом будут видны два кольца: темное — фазовое кольцо и светлое — кольцевая диафрагма конденсора. Вращением центрировочных винтов добиваются совмещения колец (рис. 2).

Микроскопия с фазовым контрастом расширяет возможности ис-

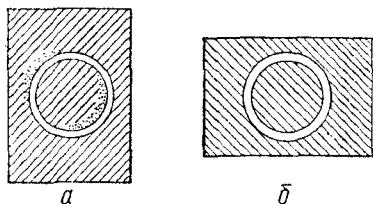


Рис. 2. Центровка кольцевой диафрагмы конденсора и фазовой пластинки объектива:

а — неправильное положение, б — правильное положение.

следования живых клеток, а также способствует получению более четких очертаний бактериальных клеток, спор, нередко жгутиков. У дрожжевых клеток видны отдельные органеллы и различные включения.

ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Некоторые биологические объекты обладают способностью светиться под влиянием падающего на них света. Это явление получило название люминесценции, или флюоресценции. В основе этого явления лежит свойство биологических объектов поглощать часть энергии падающего света и испускать лучи, менее богатые энергией, т. е. лучи с более длинной волной. Если осветить объект коротковолновой частью видимого света: синими, фиолетовыми лучами (длина волны около 460 нм) или ультрафиолетовыми лучами (длина волны 300—400 нм), то возникает люминесценция в цветной гамме видимого спектра, и объект светится желто-зеленым или оранжевым светом. Это так называемая собственная, или первичная люминесценция.

Большинство микроорганизмов обладают слабой собственной люминесценцией (представители рода *Pseudomonas*, некоторые виды рода *Bacterium*). В люминесцентной микроскопии чаще используется так называемая наведенная, или вторичная люминесценция, когда свечение нелюминесцирующих объектов вызывается обработкой их специальными флюорохромами (акридином желтым, акридином оранжевым, конго красным, примулином, аурином, берберином и др.). Применяют сильно разведенные водные растворы флюорохромов (0,0001—0,00001%). Так как эти растворы слабо токсичны, создается возможность изучать живую неповрежденную клетку. Флюорохромами окрашивают как всю клетку, так и отдельные клеточные структуры, вызывая их свечение.

Люминесценцию можно вызвать двумя способами: освещением объекта ультрафиолетовыми лучами или коротковолновой частью видимого света. Микроскопия в ультрафиолетовых лучах не получила широкого распространения, так как требует применения специальной дорогостоящей кварцевой оптики и специального освещения кварцевой лампой. Более доступной и применяемой в почвенной микробиологии является микроскопия в коротковолновой части видимого света. При этом наряду со специально люминесцентными микроскопами (МЛ-2; МЛ-4) может быть использован обычный микроскоп с желтым светофильтром, помещенным на окуляр микроскопа. Источником света служит обычная низковольтная лампа с синим светофильтром. Излишние синие лучи, попадающие в поле зрения, убираются желтым светофильтром микроскопа, и исследователь видит на черном фоне люминесцирующие объекты.

Люминесцентная микроскопия, дающая цветное изображение и значительно большую, по сравнению с обычной микроскопией, контрастность объектов, широко используется для изучения

клеточных микроструктур. Кроме того этот метод очень удобен для подсчета живых и мертвых клеток, которые по-разному адсорбируют флюорохромы.

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Использование электронного микроскопа — одного из крупнейших достижений прикладной физики XX века — позволило получить изображение частиц в 1000 раз меньше тех, которые можно увидеть в оптическом микроскопе.

Схема строения этого прибора почти не отличается от схемы светового, однако освещение объекта в электронном микроскопе обеспечивается пучком электронов, источником которых является вольфрамовая нить, нагретая электрическим током. Вместо стеклянных линз здесь используются электромагнитные катушки. Создаваемое ими электромагнитное поле влияет на поток электронов так, как стеклянные линзы светового микроскопа действуют на луч света.

Как известно, разрешающая способность оптических микроскопов ограничена длиной волны используемого света (λ составляет 350—600 нм). Увеличить разрешение удалось путем замены световых лучей потоком электронов. Электронный луч обладает свойствами электромагнитного излучения с очень малой длиной волны. Для пучка электронов высокой энергии (60 000 В) длина волны составляет всего 0,04 нм, т. е. примерно в 10 000 раз меньше, чем видимого света. Соответственно и предельное разрешение электронного микроскопа будет на несколько порядков выше, чем светового. В современных микроскопах оно исчисляется 0,4 и даже 0,2 нм. Рабочее увеличение достигает 200 000 раз.

В биологических исследованиях применяют электронные микроскопы просвечивающего типа.

Независимо от конструкции, каждый электронный микроскоп имеет электронную пушку (источник электронов), три электромагнитные катушки, выполняющие роль конденсорной, объективной и проекционной линз, предметный столик, экран для изображения и окуляр. Для обеспечения работы микроскопа необходимы источник электрического питания и вакуумный насос, так как движение электронов в колонке происходит в высоком вакууме. Путь электронов в трансмиссионном электронном микроскопе аналогичен пути света в световом микроскопе. Пучок электронов, выходящий из электронной пушки (вольфрамовой нити, нагретой электрическим током), проходит через несколько электромагнитных линз: «конденсорную», собирающую пучок электронов на наблюдаемом объекте; «объективную», дающую первое изображение, которое можно наблюдать на промежуточном экране; часть электронов, пройдя через диафрагму «объективной линзы», попадает на «проекционную линзу». Увеличенное изображение, которое дает эта линза, принимает флюоресцирующий экран. Если заменить экран фотографи-

ческой пластинкой, то изображение объекта можно сфотографировать.

Препараты для исследования в электронном микроскопе помещают на специальные сеточки, покрытые тонкой коллодиевой пленкой; толщина препарата не должна превышать 2500 нм. Для исследования ультраструктур клеток делают их срезы (толщина 800—900 нм). Чтобы повысить контрастность исследуемого объекта, препараты «окрашивают» солями тяжелых металлов (свинца, урана, вольфрама). Если соли металлов фиксируются на самом объекте, то такое контрастирование называется позитивным, если повышают электронную плотность поля — негативное контрастирование. Нередко при исследовании биологических объектов применяют и другие методы подготовки препаратов: напыление металлом и замораживание — травление. В первом случае на высушенный препарат под острым углом направляют поток ионов тяжелого металла (платины, палладия, золота).

В микробиологической практике стали применять сканирующий электронный микроскоп, который дает возможность получить трехмерное изображение объекта. Глубина фокуса у этого прибора достигает нескольких миллиметров, а рабочее увеличение может меняться от 20 до 10 000 раз.

Техника подготовки препаратов для электронного микроскопа резко отличается от таковой при использовании светооптического микроскопа. Объекты исследования размещаются не на предметном стекле, а на специальных сетках (обычно медных), покрытых тонкими пленками-подложками. Такие пленки изготавливаются из коллодия, формвара, угля, кварца. Способы получения пленок подробно описаны в книге В. И. Бирюзовой и соавт. (1963). На пленки наносится водная суспензия микроорганизмов или почвы, и после испарения воды препарат может быть рассмотрен в микроскопе. При рассмотрении объекта в электронном микроскопе и выявлении тонких деталей его строения важны два основных фактора: разрешающая способность микроскопа и контрастность объекта. Некоторые биологические структуры рассеивают электроны почти так же, как и пленка-подложка, вследствие чего контрастность их изображения может быть настолько малой, что даже при достигнутой разрешающей способности микроскопа изображение объекта не будет различимо. Поэтому объекты исследования чаще дополнительно обрабатывают — контрастируют металлом. Контрастирование производится следующим образом.

Препарат помещают под колпак, из которого выкачивают воздух. В вакууме под колпаком находится испаритель, часто в виде U-образно свернутой нити вольфрамовой проволоки. В «корзиночку», образуемую спиралью нити, помещают испаряемое вещество в виде порошка или гранул. Таким веществом может быть хром, платина, уран и др. После достижения вакуума (давление около 0,0133 Па) нить нагревают пропусканием через нее электрического тока, и металл испаряется. Так как ~~пучок электронов по-разному~~

поглощается объектом (в зависимости от толщины его разных участков), то, во-первых, при этом на экране строится изображение разной степени тональности и, во-вторых, оттенение металлом повышает контрастность изображения.

Для приготовления препаратов спор актиномицеты выращивали при температуре 28° С в течение 7—10 сут. Затем на поверхность культуры наносили каплю дистиллированной воды и осторожно передвигали ее по поверхности путем изменения наклона чашки. К выпуклой поверхности капли со смываемыми спорами прикасались

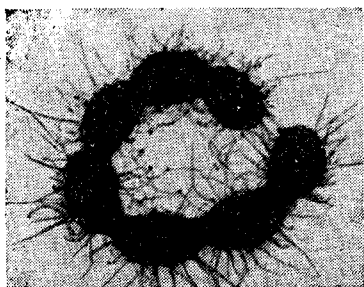
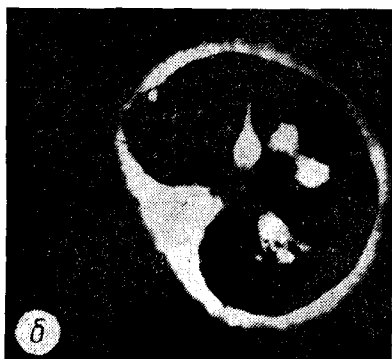
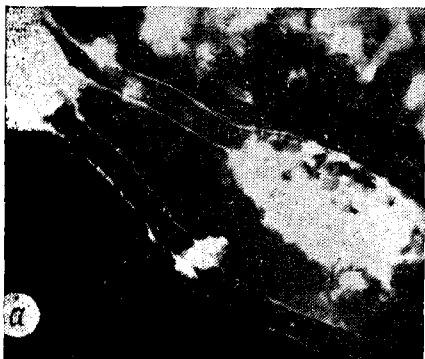


Рис. 3. Характер строения поверхности спор *Act. olivaceus*. $\times 10\,000$.

металлическими сетками, покрытыми подложкой (формваровой или углеродной). Такой прием позволяет получать препараты для электронной микроскопии с чистым фоном. Если спорообразование не было обильным, споровый материал осторожно снимали петлей с поверхности культуры, суспендировали в капле воды и помещали на электронно-микроскопическую сеточку. Препараты высушивали на воздухе, контрастировали 3%-ным водным раствором уранил-

ацетата и просматривали в электронном микроскопе JEM-7 при 80 кВ и инструментальном увеличении 10; 15; 20 тыс. (рис. 3). Контрастирование же бактериальных препаратов проводили 2%-ным раствором ФВК (фосфорно-вольфрамовая кислота, pH 6,4). При электронно-микроскопическом изучении почв (Никитин, Макарьева, 1970) образцы суспендируют в стерильной воде. Для получения гомогенных суспензий навески почв в соотношении 1 : 2 (почва : вода) перемешивают на магнитной мешалке. После 5-минутного отстаивания верхний слой жидкости используют для приготовления электронно-микроскопических препаратов. Суспензию почвы очищают от растворимых веществ путем диализа на коллоидной



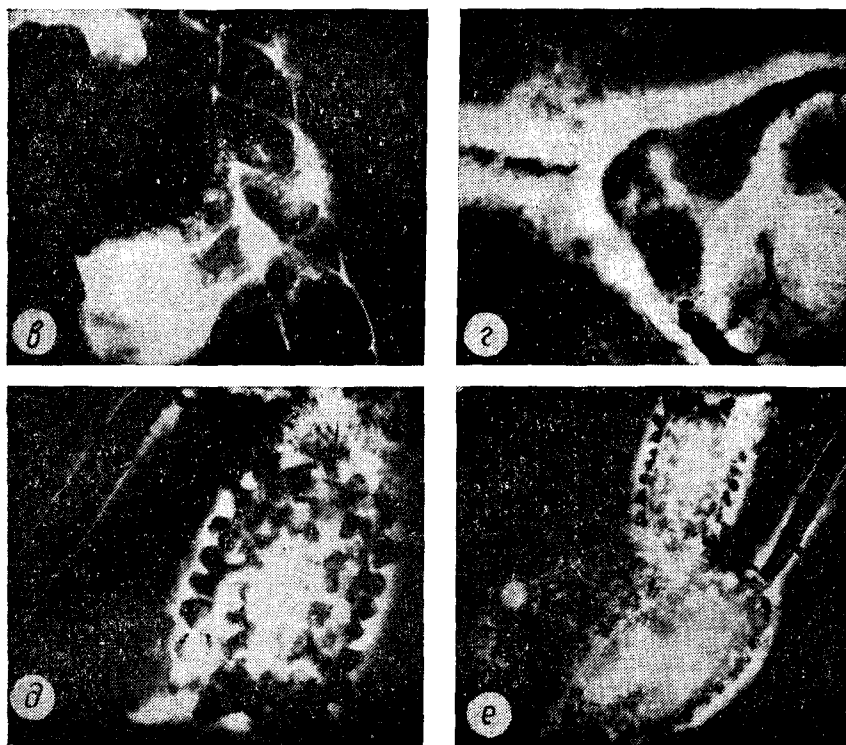


Рис. 4. Редкие формы почвенных микроорганизмов. $\times 20\,000$:

a — *Caulobacter*, *b* — *Rhizobacter*, *c* — *Seliberia*, *d* — *Hyphomicrobium*, *e* — *Prostecocomicrobium*.

пленке. Для этого капли суспензии наносят на коллоидную пленку, находящуюся на поверхности воды, налитой в чашку Петри. После 3—24-часового диализа воду из чашки удаляют, и пленка вместе с каплями суспензии микробов оседает на ранее помещенные на дне чашки предметные сетки. После подсушивания на воздухе сетки с препаратами напыляют обычно хромом и просматривают в электронном микроскопе (рис. 4).

ПРЯМЫЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ НАБЛЮДЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПОЧВЕ

Использование микроскопической техники лежит в основе так называемых прямых микроскопических методов, наиболее полно выявляющих «общее» количество микроорганизмов в почвенных суспензиях.

Последние годы чрезвычайно возрос интерес исследователей к изучению микробных ассоциаций непосредственно в почве. Суще-

вующие микроскопические методы позволяют наблюдать за естественным распределением микроорганизмов в их естественной среде обитания.

Метод стекол обрастания Холодного. Метод Холодного и его модификации широко применяются в почвенной микробиологии. Детально этот метод описан в руководствах (Теппер и соавт., 1979; Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1980). Чистые предметные стекла закладывают в почву вертикально и оставляют на месяц и более. Затем осторожно, так чтобы не повредить микробную ассоциацию, которая будет подвергаться микрофотографированию, стекла извлекают из почвы и готовят к микроскопическому исследованию. Изучение пейзажей на стеклах обрастания можно проводить после окраски эритрозином с помощью светооптического микроскопа, пользуясь иммерсионной системой. Хорошие результаты дает люминесцентная микроскопия.

Слегка подсохшие на воздухе стекла с микробными ассоциациями помещают вертикально в пеналы с прорезями. Для фиксации препаратов под крышку пенала помещают небольшой комочек ваты, смоченный формалином. В таких пеналах стекла обрастания могут храниться длительное время.

Перед изучением полученных препаратов под микроскопом их следует окрасить. Предварительно перед окраской влажным ватным тампоном со стекол снимают обрастания, прикрепившиеся к их нижней поверхности. Обрастания, находящиеся на верхней (маркированной) поверхности, прикрепляются к стеклам так же, как обычные бактериологические мазки. Для этого стекла 3—4 раза нижней стороной проводят над языком пламени горелки. Окрашивают стекла карболовым эритрозином, фуксином или метиленовой синью. При использовании 5%-ного карболового эритрозина продолжительность окраски составляет 30—40 мин. Применение более слабых красителей увеличивает время окраски от нескольких часов до одних суток. Отмывают стекла проведением их через ряд сосудов с дистиллированной водой. Следует рационально применять и методы дифференциальной окраски. Так, для обнаружения железобактерий перед окраской эритрозином стекла помещают на 2—3 мин в 5%-ный раствор желтой кровяной соли, а затем на 1—2 мин в 5%-ный раствор соляной кислоты. При такой комбинированной окраске железобактерии окрашиваются в красный цвет, а их железистые футляры — в синий.

Пользуясь методом дифференциальной окраски по Пешкову и методом люминесцентной микроскопии, в микробных ценозах можно выявлять живые и мертвые клетки, т. е. определять состояние микроорганизмов в сообществах. Для окраски по способу Пешкова необходимо иметь следующие реактивы: фиксатор, состоящий из 60 мл этилового спирта (96-градусного), 30 мл ледяной уксусной кислоты и 10 мл хлороформа; краску Гимза: азур II (разведение 1 : 1000), эозин (разведение 1 : 1000); водный раствор краски лихтгрюн (0,25%-ный).

При окраске пластинку обрастания следует в течение 20 мин обработать фиксатором, просушить на воздухе в течение 1 ч и на 4 ч погрузить в краску Гимза при температуре 37° С или выдержать в той же краске при комнатной температуре в течение суток. После этого стекла обрастания следует промыть нейтральной дистиллированной водой (рН 7,1) и в течение 20 с докрашивать лихтгрюном. После окраски стекла промывают водой, подсушивают и микроскопируют. При таком способе окраски микроорганизмы, бывшие живыми до фиксации, окрашиваются в фиолетовый цвет, а отмершие еще до фиксации — в зеленый.

Выявление в микробных ценозах живых и мертвых клеток можно осуществить и с помощью люминесцентной микроскопии. Для

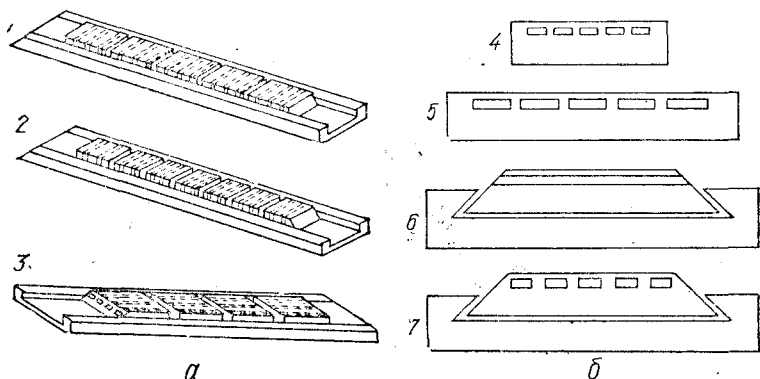


Рис. 5. Общий вид (а) и разрез (б) капиллярного педескопа:

1, 2, 4, 5, 6 — педескоп с капиллярами, ориентированными перпендикулярно оси держателя; 3, 7 — педескоп с продольно ориентированными капиллярами.

одновременного обнаружения тех и других клеток при флюорохромировании используют смесь растворов примулина (1 : 40 000) и акридина оранжевого (1 : 100 000) в соотношении 1 : 2. Живые клетки микроорганизмов при этом светятся зеленым, а мертвые — желтым цветом.

Для выявления мертвых бактерий наилучшими флюорохромами являются примулин, тиазоловый желтый и бриллиант-дианиловый зеленый. При флюорохромировании этими красителями в разведении 1 : 100 000 мертвые клетки ярко люминесцируют, а живые — почти не светятся.

Изучаются стекла обрастания под микроскопом. Для обнаружения характерных особенностей микробных ценозов препараты просматривают вначале при малом увеличении, а затем детально, переходя от одного поля зрения к другому, под иммерсией. После тщательного изучения и описания микробных пейзажей наиболее характерные фрагменты фотографируют. Хорошие результаты получаются при использовании фотопленки «Микрат» или репродукционных штриховых пластинок.

Метод капиллярной педоскопии (упрощенный вариант капиллярного педоскопа). Наиболее четкое представление о развитии микроорганизмов непосредственно в почве дает метод капиллярной педоскопии, разработанный Б. В. Перфильевым и Д. Р. Габе (1961). Для изучения микробных пейзажей был сконструирован прибор, имитирующий капиллярные каналы почвы — капиллярный педоскоп

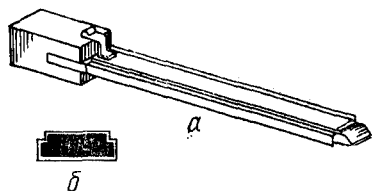


Рис. 6. Металлический пробойник педоскопа в футляре:

а — общий вид, б — поперечный разрез.

тинку пробойника вынимают из футляра и в освободившуюся щель вводят педоскоп, ориентируя его таким образом, чтобы капиллярные каналы были направлены вертикально или наклонно. Для микрофотографирования педоскопические ячейки, вынутые из держателя и окрашенные, укрепляют канадским бальзамом на тонкой стеклянной пластине (от 0,2 до 0,3 мм толщиной), заменяющей предметное стекло.

При исследовании микробных ценозов почв мы (Мятликова, 1976) пользовались упрощенным педоскопом, в котором капиллярное пространство представлено щелью в 30—40 мкм между двумя параллельными плоскостями (рис. 7).

Основой прибора служит обычное предметное стекло, на которое наклеивают два или три покровных стеклышка (25 × 25 мм). Между предметным и покровным стеклами по краю прокладывают узкие полоски кальки, что обеспечивает нужную глубину капиллярной камеры. Для склеивания удобнее всего применять клей типа БФ или эпоксидную смолу. Педоскопы рабочей плоскостью прикладывают к гладкой поверхности почвенного разреза и плотно прижимают почвой. Место закладки отмечают колышками. По истечении одного — двух месяцев педоскопы осторожно извлекают из почвы и, если необходимо исследовать живой препарат, помещают во влажную камеру. В лаборатории капиллярные педоскопы очищают влажным тампоном от приставших снаружи почвенных частиц и микрофотографируют неокрашенными. Затем препарат подсушивают, фиксируют над пламенем горелки и окрашивают карболовым эритрозином (дистиллированной воды — 100 мл, карболовой кислоты — 5 г, эритрозина — 1—5 г) в течение суток.

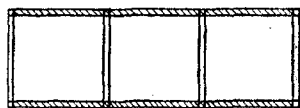


Рис. 7. Упрощенный педоскоп натурального размера (фронтальная плоскость).

Описанный капиллярный педоскоп имеет следующие преимущества: он очень прост по конструкции, не требует специальной стеклотехники и может быть изготовлен в любой лаборатории. Он также очень удобен в работе: закладка в почву и микроскопирование производятся без каких-либо приспособлений. Кроме того, в капиллярных каналах Перфильева и Габе пространственное расположение

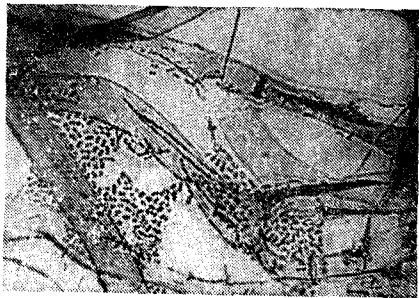


Рис. 8. Микробная ассоциация чернозема Хомутовской степи.

микроорганизмов воспроизводится преимущественно по вертикали (ширина канала не превышает двух-трех полей зрения микроскопа); в упрощенном педоскопе рабочая площадь значительно больше (23×23 мм), что дает возможность наблюдать развернутую картину расселения микроорганизмов, взаимного расположения отдельных групп, их взаимоотношений в данной микрозоне (рис. 8).

ПРЯМЫЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ УЧЕТА МИКРООРГАНИЗМОВ В ПОЧВЕ

Метод Виноградского. Основан на подсчете клеток микроорганизмов в проходящем свете. Почвенную болтушку в разведении 1 : 10 диспергируют каким-либо из известных способов (растиранием почвы в ступке резиновым пестиком, обработкой с помощью пропеллерной мешалки, действием ультразвука, применением химических средств диспергирования и др.). Наиболее хорошие результаты дает обработка почвенной суспензии ультразвуком низкой частоты и мощности (Звягинцев, 1969). По нашим наблюдениям, оптимальный режим обработки на установке УЗДН-1 таков: время — 30 с, сила тока — 0,40 А, частота — 15 кГц.

При работе с богатыми почвами из полученной суспензии готовят второе разведение 1 : 100. После энергичного встряхивания и отстаивания в течение нескольких секунд (для осаждения наиболее крупных почвенных частиц) стерильной микропипеткой наносят 0,01 мл суспензии на чистое обезжиренное предметное стекло и равномерно распределяют на прямоугольнике площадью 8 см², ширина которого равна ширине предметного стекла. Из одной пробирки готовят не менее трех препаратов. Препарат подсушивают, фиксируют над пламенем газовой горелки и помещают в стаканчики с карболовым эритрозином. Стекла выдерживают в эритрозине от часа до суток в зависимости от качества краски. Окрашенные препараты осторожно промывают в воде, высушивают и просматривают под иммерсией в световом микроскопе.

При равномерном распределении микроорганизмов на площади мазка достаточно на каждом препарате подсчитать 20 полей зрения.

Подсчет облегчается использованием окулярной сетки. Зная площадь поля зрения микроскопа (ее определяют с помощью объект-микрометра), среднее число микроорганизмов на этой площади, можно подсчитать число микроорганизмов, приходящееся на 1 г сухой почвы. Например, в случае, если для анализа взято 0,01 мл суспензии в разведении 1 : 10, число клеток в 1 г почвы можно вычислить по формуле

$$\frac{10(P + 100)av}{0,01},$$

где a — среднее число клеток в одном поле зрения; v — число полей зрения на площади 8 см²; P — влажность почвы (%).

Для определения биомассы микроорганизмов при микроскопировании мазков проводят дифференцированный подсчет бактерий различных морфологических групп. Чаще всего обращают внимание на число кокков, крупных и мелких палочек и дрожжеподобных клеток. Остальные клетки условно по размеру относят к той или иной группе. С помощью объект-микрометра определяют средние размеры клеток каждой из указанных групп и, учитывая их число, определяют суммарную биомассу, принимая удельную массу микробной клетки равной 1,10 г/см³.

Люминесцентный метод по Звягинцеву и Кожевину. Метод сводится к просматриванию препаратов почвенной суспензии, окрашенных флюорохромом, в падающем свете (Методы почвенной микробиологии, 1980). Диспергированную почвенную суспензию, разведенную в 10 раз, переносят в мерный цилиндр на 100 мл. После 2-минутного отстаивания пипеткой отбирают 2 мл суспензии из средней фракции и переносят в колбу с 18 мл воды. Колбу энергично встряхивают и наносят микропипеткой 0,01 мл на обезжиренное предметное стекло, распределяя равномерно на площади 4 см² (2 × 2 см). При такой площади на каждом стекле можно приготовить три препарата. Удобно для распределения мазков подкладывать под стеклышко трафарет, начерченный на бумаге. Препараты подсушивают и фиксируют над пламенем горелки, а затем окрашивают в течение 2—4 мин водным раствором акридина оранжевого (разведение 1 : 10000). Для промывки препараты погружают на 10 мин в водопроводную воду. Окрашенные препараты высушивают при комнатной температуре.

Для микроскопирования на препарат наносят каплю воды и pokrывают обезжиренным покровным стеклом. Лишнюю воду удаляют фильтровальной бумагой. Препараты просматривают на люминесцентном микроскопе МЛ-2 или МЛ-4 (фильтры ФС-1-2, ЖЗС-19ЖС-18, объектив × 90 Л, окуляры × 4 или × 5). Микробные клетки имеют яркое зеленое свечение, почвенные частицы — красное.

Число микробных клеток в 1 г почвы вычисляют по формуле

$$\frac{4an}{P} \cdot 10^{10},$$

где a — среднее число клеток в поле зрения; P — площадь поля зрения (мкм^2); n — показатель разведения (в данном случае n равно 100); желательно подобрать разведение таким образом, чтобы среднее число клеток в поле зрения составляло 5—10.

Для подсчета рекомендуется из каждого почвенного образца готовить два препарата и на каждом из них подсчитывать по пять полей зрения. При постановке продолжительных опытов нужно иметь в виду, что по мере эксплуатации источников света снижается яркость свечения клеток, что может привести к занижению результатов. Поэтому желательно периодически проводить контрольный подсчет на другом микроскопе и использовать другие способы контроля. Исходный 0,1%-ный раствор флюорохрома рекомендуется готовить сразу в количестве, достаточном для проведения всей серии опытов, и хранить при 4°C в закрытой посуде из темного стекла. Рабочие растворы (1 : 1000) не хранят.

Люминесцентный метод обеспечивает более точный подсчет микроорганизмов по сравнению с методом Виноградского, а также позволяет учитывать и адсорбированные клетки, невидимые в проходящем свете.

Электронно-микроскопический метод по Никитину. Учет микроорганизмов с помощью электронного микроскопа имеет то преимущество перед описанными методами, что позволяет обнаруживать мельчайшие микроорганизмы, размеры которых выходят за пределы разрешающей способности оптического микроскопа (Никитин, Марарева, 1970).

После предварительной обработки почвенную суспензию переносят в стерильный мешочек из синтетического полупроницаемого материала и подвергают диализу в стерильной дистиллированной воде в течение 3—12 ч. Мешочки для диализа, прикрепленные к стеклянному кольцу, закрывают ватной пробкой, а стакан — ватой, смоченной толуолом. После диализа суспензию хорошо перемешивают и наносят на пленки-подложки для электронного микроскопа. Следует учитывать, что мутность суспензии должна быть примерно в 10 раз больше применяемой при работе со световым микроскопом. Каплю наносят с помощью микропипетки объемом 0,1 мл с оттянутым до капилляра концом. Конец пипетки перед отбором суспензии покрывают тонким слоем стерильного вазелина, используя для этого простерилизованные полоски фильтровальной бумаги. Слой вазелина препятствует затеканию взвеси на нижнюю часть пипетки и образованию капель избыточного объема.

Для изготовления препаратов, предназначенных для количественного учета, отбирают (при просмотре в бинокулярном микроскопе) сетки с одинаковыми диаметрами полей зрения (диаметром 3 000—3 400 мкм и квадратными отверстиями со стороной квадрата, равной 30 мкм). На одну сетку наносят каплю и фиксируют точный объем капли. При нанесении капли пипетку следует держать под углом 30—40° к плоскости сетки. Расстояние кончика капилляра от пленки должно быть в пределах 5—8 мм. Капля должна падать

на сетку, не выходя за ее края. В противном случае сетка бракуется. После высыхания капель препараты оттеняют хромом или окисью вольфрама и просматривают в электронном микроскопе при увеличении 8000. Сетки одной партии с коллодиевыми пленками перед нанесением капель удобно располагать рядами на доньшке чашки Петри, к которой снизу прикреплен лист бумаги с пронумерованными квадратами. Для каждого варианта опыта подготавливают 10—20 сеток. Во всех пригодных для учета сетках (10—15 шт.) производят подсчет микробных клеток в возможно большем числе полей зрения. Просмотр препарата на сетке и учет клеток в пределах каждого поля зрения целесообразно проводить по определенному порядку. Например, поля и объекты в каждом поле следует просматривать, начиная слева по часовой стрелке (точнее по спирали) до центра сетки. Число микробных клеток без особых затруднений удастся учитывать в среднем в 10—30 полях зрения (из 100) на каждой сетке.

Расчет производят по формуле

$$M = \frac{n\pi R^2}{a^2 V p},$$

где M — число клеток микроорганизмов в 1 мл суспензии; n — число микроорганизмов в просчитанном квадратице (среднее арифметическое); R — радиус сетки, мкм; a — сторона квадрата поля зрения, мкм; V — объем капли, мл; p — разведение суспензии. Затем рассчитывают число клеток, приходящееся на 1 г почвы, на 1 га и т. д. С помощью описанного метода удастся подсчитать наибольшее по сравнению с другими методами число микроорганизмов.

Глава 2

ФОТОКОЛОРИМЕТРИЯ

Современные исследования в микробиологии связаны с использованием высокочувствительных методов анализа, позволяющих определять малое содержание (до $10^{-7}\%$) различных веществ. Достижения аналитической химии дают возможность использовать для этой цели методы, основанные на взаимодействии света с анализируемым веществом. По характеру взаимодействия световой энергии и способу ее измерения различают три группы методов. Принцип первой группы методов (абсорбционный анализ) лежит во взаимодействии света с однородными системами. К этой группе относятся методы спектрофотометрии и колориметрии. Принцип второй группы методов лежит во взаимодействии излучения с дисперсными системами и включает в себя нефелометрический и турбидиметрический методы. При использовании первого производят измерение рассеянного света, при использовании второго — прохо-

дящего света. Методы третьей группы основаны на измерении собственного свечения веществ, возникающего под действием ультрафиолетовых лучей — люминесцентный анализ. Все эти методы, хотя и основаны на различных принципах, объединяются в одну группу фотометрических методов анализа.

В практике массовых анализов в почвенной микробиологии наибольшее распространение получили абсорбционные методы и в первую очередь, фотоколориметрический. Он исключает фактор субъективности при оценке полученных данных и путем определения оптической плотности изучаемых растворов позволяет определить их концентрацию. Применение этого метода создает возможность в ряде случаев автоматизировать процесс анализа, а при использовании определенных фотоэлементов — вести измерения в невидимых участках спектра (в ультрафиолетовых и инфракрасных областях).

Фотоколориметрический метод определения концентрации вещества основан на измерении интенсивности светового потока, прошедшего через окрашенный раствор. В фотоколориметрии степень поглощения света окрашенным раствором определяется с помощью специальных оптических приборов — колориметров (фотоколориметров) с фотоэлементами.

Фотоэлемент преобразует световую энергию, прошедшую через раствор, в электрическую, которая улавливается чувствительным гальванометром. В основе работы фотоэлемента лежит явление фотоэффекта, открытое А. Г. Столетовым в 1888 г. Сущность фотоэффекта заключается в вырывании электронов с поверхности различных тел под действием световой энергии. Каждое вещество способно поглощать или пропускать световой поток определенной длины волны, называемый «порогом» фотоэффекта, при котором начинает наблюдаться (или исчезать) фотоэффект. Сила возникающего фототока зависит от длины волны падающего на фотоэлемент света и от температур. Согласно законам фотоэффекта, сила возникающего фототока (электрического тока) прямо пропорциональна интенсивности падающего на фотоэлемент света. Следовательно, отношение интенсивности световых потоков, используемое в выражении основного закона светопоглощения, может быть заменено на равное ему отношение сил фототоков. Это и используется в фотоколориметрии, где фактически сравнивают не светопоглощение растворов, а силу фототоков (электрических токов).

Колориметрический метод анализа был предложен русским ученым В. М. Севергиным еще в 1795 г. и описан в руководствах Булатова, Калинкина (1976), Пешковой, Громовой (1965) и других.

В колориметрическом и фотоколориметрическом методах анализа используются химические реакции, при которых определяемое вещество переходит в окрашенное соединение, изменяющее окраску анализируемого раствора. Измеряя светопоглощение такого окрашенного раствора (фотоколориметрический анализ) или сравнивая интенсивность полученной окраски с окраской раствора известной

концентрации (колориметрический анализ), определяют содержание окрашенного вещества в испытуемом растворе.

Существует зависимость между интенсивностью окраски раствора и содержанием в этом растворе окрашенного вещества. Эта зависимость, называемая законом Бугера — Ламберта — Бера, выражается уравнением

$$I = I_0 10^{-\epsilon Cl},$$

где I — интенсивность светового потока, прошедшего через раствор, лм. с; I_0 — интенсивность падающего на раствор светового потока, лм. с; ϵ — молярный коэффициент поглощения светового потока (коэффициент поглощения, или экстинкция) — постоянная величина для каждого окрашенного вещества, зависящая от его природы; C — концентрация окрашенного вещества в растворе, моль/л; l — толщина слоя светопоглощающего раствора, см.

Физический смысл этого закона следующий: растворы одного и того же окрашенного вещества при одинаковой концентрации этого вещества и толщине слоя раствора поглощают равное количество световой энергии. Закон справедлив при работе с очень разведенными растворами.

Окрашенный раствор поглощает волны света различной длины не в равной мере, поэтому с целью увеличения точности и чувствительности используют поглощение не всего светового потока, а только той его части, которая наиболее сильно поглощается раствором. Для получения более точных результатов из видимой области спектра с помощью светофильтров выделяют пучок света с той длиной волны, которая максимально поглощается данным раствором. Светофильтрами могут служить жидкие или твердые тела, обладающие определенной прозрачностью для различных частей спектра: они поглощают все лучи, кроме узкого пучка лучей определенной области спектра. Обычно в фотоколориметрах в качестве светофильтров применяют цветные стекла. Применение правильно подобранного светофильтра способствует повышению чувствительности и точности метода. Подбор светофильтра производят по окраске анализируемого раствора:

Окраска анализируемого раствора	Окраска соответствующего светофильтра	Область пропускаемых длин волн, нм
Желто-зеленая	Фиолетовая	400—450
Желтая	Синяя	450—480
Оранжевая	Зелено-синяя	480—490
Красная	Сине-зеленая	490—500
Пурпурная	Зеленая	500—560
Фиолетовая	Желто-зеленая	560—575
Синяя	Желтая	575—590
Зелено-синяя	Оранжевая	590—625
Сине-зеленая	Красная	625—750

Если прологарифмировать уравнение закона Бугера — Ламберта — Бера и изменить знаки на обратные, то уравнение примет вид:

$$\lg(I_0/I) = \epsilon Cl.$$

Величина $\lg(I_0/I)$ называется оптической плотностью раствора и обозначается буквой D .

Следовательно, оптическая плотность раствора прямо пропорциональна концентрации окрашенного вещества и толщине слоя раствора.

Таким образом, чтобы определить концентрацию C окрашенного раствора, необходимо измерить его оптическую плотность D , а для этого следует измерить интенсивность светового потока, проходящего через него. Оптическая плотность изучаемых растворов определяется с помощью фотоколориметров. Независимо от модели, фотоколориметры обязательно имеют следующие элементы схемы: осветитель, светофильтры, фотоэлементы, систему регулируемых сопротивлений, гальванометр, кюветы. Часто к осветителю прилагается стабилизатор тока.

Различают два типа фотоколориметров: одноплечие фотоколориметры, или приборы с одним фотоэлементом, и двухплечие фотоколориметры, или приборы с двумя фотоэлементами. Одноплечие фотоколориметры практически не применяются. Двухплечие фотоколориметры иногда называют также дифференциальными. Оба фотоэлемента в двухплечих фотоколориметрах соединены по принципу противотока, так что гальванометр показывает разницу фототоков. Поэтому небольшие колебания света осветителя мало влияют на результаты. Компенсация фототоков в двухплечих фотоколориметрах бывает оптическая и электрическая.

Фотоэлектроколориметр ФЭК-М является двухплечим прибором. Один из фотоэлементов находится в «контрольном» световом потоке. Такая схема дает возможность автоматически компенсировать колебания тока в цепи осветителя. С помощью этого прибора измеряют оптическую плотность или пропускание окрашенных растворов (в процентах), а также мутность при нефелометрических исследованиях. Для уравнивания двух световых потоков в приборе ФЭК-М имеется щелевая диафрагма. Приемниками фототока служат селеновые фотоэлементы вентильного типа. В качестве нуль-индикатора служит гальванометр, который вмонтирован под панель прибора и, кроме того, может быть подключен снаружи к специально выведенным клеммам.

Оптическая схема и общий вид прибора представлены на рис. 9, 10. Свет от лампы 1 (см. рис. 9) с помощью конденсорных линз 2 направляется на зеркала 4; перед попаданием на зеркала световые потоки проходят через тепловые фильтры 3, которые поглощают инфракрасные лучи и предохраняют от нагревания раствор и фотоэлементы. Световые потоки, отраженные от зеркал, проходят через светофильтры 5, линзы 6 и попадают на кюветы 7. Затем с помощью линз 8 и поворотных призм 9 световые потоки направляются на фотоэлементы 10. Перед линзой 8 установлена щелевая (ножевая) диафрагма 11, которая связана с измерительными барабанами (на рисунке не показаны). Перед левым фотоэлементом установлены два нейтральных клина: большой плотности 12 для грубой наводки и малой 13

для тонкой наводки. Поэтому световой поток справа перед фотоэлементом проходит через ножевую диафрагму, а слева — через нейтральный клин. Фотоэлементы подключены по дифференциальной схеме к гальванометру 14. На рис. 10 два измерительных барабана (левый и правый) 9 закреплены на одной оси, которая связана со щелевой диафрагмой. Щелевая диафрагма представляет собой прямо-

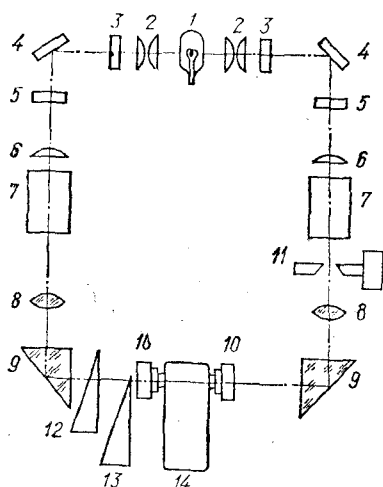


Рис. 9. Оптическая схема фотоэлектронного колориметра ФЭК-М:

1 — осветитель (лампа), 2 — конденсорные линзы, 3 — тепловые фильтры, 4 — зеркала, 5 — светофильтры, 6 и 8 — линзы, 7 — кюветы, 9 — поворотные призмы, 10 — фотоэлементы, 11 — щелевая (ножевая) диафрагма, 12 — нейтральный клин большой плотности, 13 — нейтральный клин малой плотности, 14 — гальванометр.

угольник, состоящий из двух отдельных пластинок с прямоугольными вырезами, которые могут передвигаться навстречу друг другу. При этом площадь выреза может изменяться до нуля. На обоих барабанах нанесены две шкалы: шкала оптической плотности D (красная) и коэффициента светопропускания τ (черная). Зависимость величин D и τ выражается следующей формулой:

$$D = \lg \frac{1}{\tau}.$$

Шкала правого барабана проградуирована так, что максимальное светопропускание (100%-ное) соответствует минимальному раскрытию щели, а 30%-ное — максимальному ее раскрытию. Эта шкала коэффициентов пропускания неравномерная и в области измерений от 70 до 30 % дает большую точность по сравнению со шкалой левого барабана. Шкала левого барабана равномерная и проградуирована

так, что 100%-ное светопропускание соответствует максимальному раскрытию щели, а при полном ее закрытии светопропускание равно нулю. Абсолютная погрешность по шкале светопропускания соответствует 1%. В прибор вмонтированы два набора светофильтров, которые можно передвигать по кругу с помощью рукоятки 16 (см. рис. 10, а) на передней стенке корпуса. Номер на рукоятке соответствует номеру светофильтра: I — нейтральный, II — зеленый, III — синий, IV — красный. Набор кювет состоит из шести пар со следующей рабочей длиной: 5,0 см; 3,0 см; 1,0 см; 0,5 см; 0,3 см; 0,1 см.

Прибор питается от сети 220 В через феррорезонансный стабилизатор напряжения СТН-35М. Для стабилизации напряжения прибор включают в сеть за 10—15 мин до начала работы. Перед измерением проверяют правильность установки осветителя. Для этого поворотом винта 2 (см. рис. 10) открывают шторки фотоэлементов и накладывают на окошки линз папиросную бумагу. При правильной установке

осветителя изображение нити лампы накаливания будет четким и расположенным в центре. Если осветитель установлен неправильно, то поворотом винтов 3, 4, 5 (см. рис. 10) изменяют положение лампы. После этого папиросную бумагу снимают.

Измерение оптической плотности растворов проводят с помощью левого или правого барабанов. Рекомендуется всегда придерживаться одного и того же приема измерения как при построении калибровочного графика, так и при измерении оптической плотности раствора анализируемого образца. Измерение с помощью правого бара-

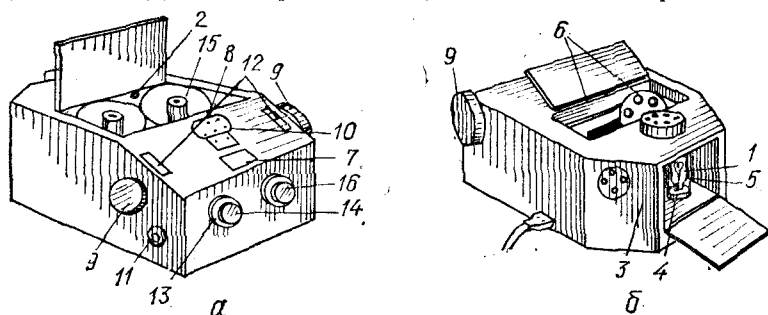


Рис. 10. Внешний вид спереди (а) и сзади (б) фотоэлектроколориметра ФЭК-М: 1 — осветитель (лампа накаливания), 2 — винт для открытия шторок фотоэлементов, 3, 4, 5 — винты для установки осветителя, 6 — светофильтры, 7 — гальванометр, 8 — механический корректор, 9 — измерительные барабаны, 10 — арретир гальванометра, 11 — переключатель чувствительности гальванометра, 12 — шкала отсчетных барабанов, 13 — фотометрический клин грубой наводки, 14 — фотометрический клин тонкой наводки, 15 — кюветодержатель, 16 — переключатель светофильтров.

бана проводят в тех случаях, когда оптическая плотность растворов не превышает 0,5 и требуется большая точность измерений. В этом случае поступают следующим образом. На пути световых потоков устанавливают кюветы, наполненные растворителем, а шкалу правого барабана устанавливают на нулевое положение. Затем включают гальванометр на первую чувствительность и с помощью клина 12 (см. рис. 9) выводят стрелку гальванометра на нулевое положение. После этого гальванометр переключают на вторую чувствительность и с помощью клина 12 для тонкой наводки устанавливают стрелку гальванометра на нуль. Отключают гальванометр и на пути правого светового потока вместо кюветы с растворителем устанавливают кювету с исследуемым раствором. Включают гальванометр на первую чувствительность и с помощью измерительного барабана возвращают стрелку гальванометра в нулевое положение. Затем гальванометр переключают на вторую чувствительность и уточняют измерение. Отсчеты проводят по шкале правого барабана. С помощью левого барабана можно измерять и высокие, и низкие оптические плотности. При оптической плотности менее 0,5 точность измерений на левом барабане ниже точности измерений правого барабана, но она вполне достаточна для проведения менее сложных анализов. При измерении с помощью левого барабана поступают следующим образом. На пути правого светового потока ставят кювету с исследуе-

мым раствором. Шкалу левого барабана устанавливают на нуль. Затем включают гальванометр на первую чувствительность и с помощью клина грубой наводки устанавливают гальванометр на нулевое положение. После этого переключают гальванометр на вторую чувствительность и с помощью клина тонкой наводки снова устанавливают гальванометр на нулевое положение. Гальванометр отключают и на пути правого светового потока вместо кюветы с раствором ставят кювету с раствором. Включают гальванометр на первую чувствительность и с помощью измерительного барабана возвращают

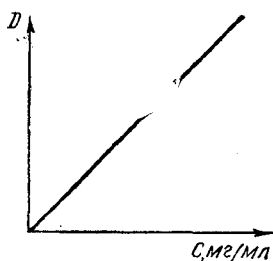


Рис. 11. Зависимость оптической плотности (D) раствора от концентрации (мг/мл) содержащегося в нем вещества.

стрелку гальванометра в нулевое положение. Затем переключают гальванометр на вторую чувствительность и измерение уточняют. Оптическую плотность, или коэффициент пропускания, в этом случае отсчитывают по шкале левого барабана.

Из других современных приборов, используемых для колориметрических анализов, следует указать на фотоколориметры-нефелометры ФЭК-57 и ФЭК-56-2.

При определении концентрации вещества путем колориметрии пользуются градуировочной кривой для данного вещества. Имея такую кривую, достаточно измерить светопоглощение испытуемого раствора и по калибровочной кривой найти значение концентрации вещества, соответствующее найденному светопоглощению.

Для построения калибровочной кривой необходимо приготовить серию эталонных растворов, содержащих разные количества определяемого вещества. Сначала готовят стандартный раствор, содержащий строго определенное количество исследуемого вещества. С помощью бюретки отбирают в мерные колбы емкостью 100 мл различные точно измеренные объемы этого стандартного раствора и соответствующих реактивов, вызывающих окраску анализируемого раствора. Затем содержимое каждой мерной колбы разбавляют дистиллированной водой, доводя объем раствора до метки. С помощью фотоколориметра измеряют оптическую плотность приготовленных эталонных растворов. На основании полученных результатов строят кривую зависимости оптической плотности раствора от его концентрации (рис. 11). Для ее построения на миллиметровой бумаге откладывают на оси абсцисс значения концентрации эталонных растворов, а на оси ординат — значения их оптической плотности. Затем из точек, найденных на осях, восстанавливают перпендикуляры и точки их пересечения соединяют. По градуировочной кривой, которую периодически проверяют, в дальнейшем определяют неизвестную концентрацию вещества в исследуемых растворах.

Метод фотоколориметрии широко используется в почвенной микробиологии при исследовании биохимической активности микроорганизмов, а также при изучении биологической активности самой почвы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЗЕИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЕННЫХ АКТИОМИЦЕТОВ

Для определения протеолитической активности микроорганизмов используют разнообразные методы: метод формольного титрования Серенсена, методы титрования свободных карбоксильных групп в 90%-ном этиловом спирте и в ацетоне, газометрический метод Ван-Сляйка, «медный» метод Поупа и Стивенсона и др. Относительная ошибка определений при использовании методов титрования в различных системах составляет не менее $\pm 10\%$. Более точные результаты удастся получить при использовании «медного» способа определения аминного азота.

В последние 20 лет большое распространение получили спектрофотометрические и фотоэлектроколориметрические методы определения низкомолекулярных продуктов протеолиза. Они менее трудоемки и более точны: ошибка определений не превышает $\pm (3-4)\%$. Наибольшей популярностью пользуются метод определения тирозина по оптической плотности прозрачных гидролизатов при длине волны 275—280 мкм и колориметрический метод определения тирозина по Ансону.

Последний метод и его различные модификации характеризуются простотой выполнения, хорошей воспроизводимостью при точном соблюдении всех условий протеолиза и относительно высокой точностью $\pm (2-4)\%$. Мы избрали метод Ансона в модификации И. С. Петровой и М. М. Винцюнайте (1966), обладающий всеми указанными достоинствами. Метод заключается в определении тирозина, образующегося в результате ферментативного гидролиза белка. Тирозин определяют по интенсивности окраски, которую эта аминокислота дает с реактивом Фолина. Для осаждения молекул белка, не затронутых протеолизом, используют 5%-ную трихлоруксусную кислоту. Этим методом было исследовано 209 штаммов актиномицетов — представителей различных групп (Андреюк, Владимирова, Коган, 1974). Актиномицеты выращивали в условиях глубинного культивирования в течение 5 суток при температуре 28° С на среде следующего состава (г/л): 0,5 K_2HPO_4 ; 0,5 $MgSO_4$; 0,5 $NaCl$; 0,8 пентона; 20,0 глюкозы; 1,0 $CaCO_3$.

Выросшую культуру отделяли от культуральной жидкости путем фильтрации; фильтрат хранили в холодильнике не более суток. Реагируемую смесь, содержащую 2 мл культуральной жидкости и 1 мл 2%-ного раствора казеина, приготовленного на фосфатном буфере (рН равен 8,4), инкубировали в ультратермостате ТЛ-150 в течение 1 ч при 37° С. Непереваренный казеин осаждали 5 мл трихлоруксусной кислоты. В надосадочной жидкости определяли содержание тирозина: к 1 мл надосадочной жидкости добавляли 4 мл 6%-ного карбоната натрия и 1 мл реактива Фолина. Немедленно перемешивали и оставляли для развития окраски на 30 мин при комнатной температуре. Интенсивность окраски определяли на фотоэлектроколориметре ФЭК-57 при длине волны 630 нм, в кюветах с расстоянием

5 или 10 мм в зависимости от интенсивности окраски. Параллельно проверяли содержание тирозина в культуральной жидкости: 2 мл культуральной жидкости соединяли с 5 мл трихлоруксусной кислоты, а затем добавляли 2 мл 2%-ного раствора казеина, перемешивали и фильтровали. Определение тирозина проводили так же, как и в опытных образцах.

Для работы строили две калибровочные кривые — для кювет с шириной 5 и 10 мм. Для этого 10 мг тирозина растворяли в 5 мл 0,1 н. щелочи в мерной колбе емкостью 25 мл и доводили водой до метки. Из этого раствора, содержащего 400 мкг тирозина в 1 мл, готовили растворы меньшей концентрации (от 20 до 120 мкг тирозина в 1 мл), отбирали по 1 мл, добавляли по 4 мл 6%-ного раствора карбоната натрия и по 1 мл готового реактива Фолина. Затем с ними поступали так же, как и с опытными образцами. На основании полученных данных строили калибровочные кривые.

Реактив Фолина готовили следующим образом. 100 г вольфрамо-кислого натрия и 25 г молибденовокислого натрия вносили в двухлитровую круглодонную колбу с пришлифованным обратным холодильником. Добавляли 700 мл воды, 50 мл 80%-ной ортофосфорной кислоты (удельная масса 1,689) и 100 мл концентрированной соляной кислоты. Раствор кипятили в течение 10 часов. После охлаждения добавляли 150 г сернистого лития, 50 мл воды и несколько (5—6) капель бромной воды. Открытую колбу нагревали до улетучивания избытка брома. Раствор должен иметь желтую окраску. Если раствор зеленый, то обработку бромной водой производили вторично. Охлажденный раствор доводили водой до 1 л. Реактив должен быть 2 н. по кислоте. Концентрацию кислот проверяли титрованием разбавленного в 10 раз реактива Фолина 0,1 н. раствором NaOH по фенолфталеину. Приготовленный реактив хранили в темной посуде. Рабочий раствор готовили перед определением активности, доводя его до необходимой кислотности.

Для приготовления 2%-ного раствора казеина 2 г вещества помещали в мерную колбу и заливали небольшим количеством 6%-ного раствора карбоната натрия. После набухания добавляли буферный раствор и помещали на водяную баню до полного растворения. После охлаждения раствор доводили буфером до объема 100 мл, рН раствора должен быть 8,4.

Протеолитическую активность культур, обозначенную нами как «казеиназная», выражали в единицах, под которыми подразумевали количество фермента, способное образовать в течение 1 мин неосаждаемые трихлоруксусной кислотой продукты протеолиза, содержащие 1 моль⁻³ тирозина. Тогда число единиц фермента в 1 мл исследуемого раствора будет

$$E = \frac{8a}{181 \cdot 60},$$

где E — единица фермента $\left(\frac{n \text{ моль}^{-3}}{\text{мл} \cdot \text{мин}}\right)$; a — масса тирозина (мкг), найденная по калибровочной кривой для разности между оптически

ми плотностями опытной и контрольной проб; 181 — молекулярная масса тирозина (мкг); 60 — продолжительность протеолиза (мин); 8 — множитель для пересчета массы тирозина на весь объем фильтрата, полученного после осаждения трихлоруксусной кислотой.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

Суть метода заключается в восстановлении солей тетразолиев водородом, активированным дегидрогеназой бактерий (Шмидт, 1964). Соли тетразолиев, которые сами по себе бесцветны либо слабо окрашены, легко восстанавливаются, образуя ярко окрашенные формазаны, не растворимые в воде, но хорошо растворимые в некоторых органических растворителях (например, в смеси толуола с ледяной уксусной кислотой). Фотоколориметрируя окрашенные растворы формазана, можно определить количество восстановленного дегидрогеназой тетразолия, а отсюда количество водорода перенесенного на акцептор, т. е. дегидрогеназную активность.

Определение активности дегидрогеназ проводят в анаэробных условиях в пробирках Тунберга (рис. 12), куда помещают 1 мл суспензии испытуемых клеток или фракций бесклеточных экстрактов, 1,5 мл фосфатного буфера pH 7,6 и 1 мл 0,1 М свежеприготовленного раствора субстрата. В боковой отрезок пробирки Тунберга помещают 0,5 мл 0,5%-ного свежеприготовленного водного раствора трифенилтетразолия хлорида (ТТХ). После откачивания воздуха ТТХ выливают в пробирку, взбалтывают и ставят в термостат при 28°С на 20 ч. Затем извлекают образовавшийся трифенилформазан из бактериальных клеток 5 мл ледяной уксусной кислотой. Далее формазан экстрагируют 5 мл толуола при сильном встряхивании. Закрытые пробирки выдерживают в течение 18 ч в темном месте, после чего приступают к фотоколориметрированию окрашенного толуолового слоя, используя кюветы вместимостью 5,0 мл и зеленый светофильтр.

Существует прямая зависимость между активностью дегидрогеназ и количеством восстановленного (мобилизованного) водорода. Для расчета активности дегидрогеназ необходимо знать показания ФЭКа и содержание (мг) формазана в испытуемом растворе, определяемое графически. На основании этих данных рассчитывается масса восстановленного водорода (H^+) в испытуемой взвеси. При этом следует помнить, что для образования 1 мг трифенилформазана (ТФФ) из ТТХ требуется 6,709 мкг H^+ . Следовательно, зная массу

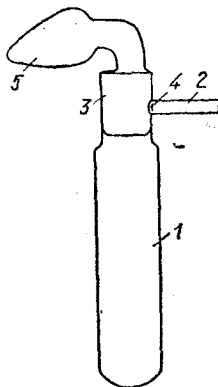


Рис. 12. Пробирка Тунберга:

1 — собственно пробирка, 2 — патрубок для откачки воздуха, 3 — шейка пробирки, 4 — отверстие в шейке затвора, 5 — боковой отрезок затвора. Шейка пробирки и шейка затвора соединяются с помощью шлифа.

образованного формазана и умножив ее на пересчетный коэффициент 6,709, рассчитываем массу H^+ , восстановленного испытуемой культурой.

Активность дегидрогеназ обычно выражают в миллиграммах H^+ в пересчете на 1 мг белка:

$$x = \frac{1 \text{ мг белка} \cdot n \text{ мкг } H^+}{y \text{ мг белка}},$$

где y — содержание белка в испытуемой взвеси или материале, определяемое по методу Лоури (Lowry et al., 1951), n — содержание H^+ , в мкг, определяемое на ФЕКе.

Описанный метод был использован при определении дегидрогеназной активности клубеньковых бактерий люпина (Скочинская и др., 1975, 1978).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВ И ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ

Предлагаемый метод разработан Гофманом и Тейчером (Hoffman, Teicher, 1957). Он основан на колориметрическом определении содержания аминокислот, образуемых ферментативным путем при добавлении к испытуемым образцам в качестве субстрата желатина. Аминокислоты, образуемые почвенной микрофлорой при разложении желатина, в ацетатном буфере образуют с $Cu(NO_3)_2$ комплексное соединение голубого цвета.

Для анализа подготовленных почвенных образцов берут навески по 10 г каждая и помещают их в эрленмейеровские колбы вместимостью 50 мл. В каждую колбу кроме почвенных образцов вносят 1,5 мл ацетатного буфера pH 5,6 и через 15 мин — 10 мл 5%-ного раствора желатина (можно вносить 15 мл 3%-ного или 20 мл 2%-ного раствора желатина). Для каждой серии опытов готовят «слепой» контроль среды (вода с желатином без почвы), а для каждого опытного образца — контроль почвы (образец почвы с водой без желатина). Во все опытные и контрольные сосуды необходимо добавить по 0,5 г $CaCO_3$ и 1,5 мл толуола. После этого их следует закрыть ватными пробками и инкубировать 24 ч при температуре 37—40° С. После инкубации каждую колбу доливают дистиллированной водой до 50 мл, после чего содержимое хорошо взбалтывают и фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

При определении протеолитической активности к 50 мл фильтрата приливают 50 мл дистиллированной воды и 10 мл «голубого» реактива. Все тщательно взбалтывают и после перемешивания колориметрируют при красном световом фильтре. Для приготовления «голубого» реактива в мерной колбе на 1 л растворяют 10 г $Cu(NO_3)_2$ в 700 мл дистиллированной воды и добавляют 250 г ацетата натрия. Все тщательно перемешивают, доливают водой до метки и оставляют на 8 дней в темноте. После фильтрования реактив готов. Пользоваться им можно в течение месяца при условии хранения в прохладном затемненном месте.

Рассчитывают протеазную активность, пользуясь калибровочной кривой. Для ее получения растворяют 267,9 мг гликокола в 1 л дистиллированной воды. В 1 мл такого раствора содержится 50 мкг аммиачного азота. Для построения кривой в мерные колбы на 100 мл последовательно вносят 10, 20, 30, 40, 60 и 70 мл раствора гликокола, доводят до метки и смешивают с 10 мл «голубого» реактива. При колориметрии интенсивность окраски стандартных растворов сравнивают с интенсивностью окраски 100 мл дистиллированной воды, смешанной с 10 мл «голубого» реактива. Результаты колориметрии, используют для построения кривой.

При расчете протеазной активности почвы от значения, полученного для каждого опытного образца, следует вычесть сумму результатов, полученных при определении протеазной активности «слепого» контроля среды и контроля почвы. При проведении подсчетов следует помнить, что 50 мл взятого для колориметрии фильтрата соответствует 5 г почвы. Если определение покажет, что 5 г почвы отщепляют 50 мкг аминокислот, то в 10 г — в два раза больше, т. е. 100 мкг. Таким образом,

$$X = [A - 2(K_c + K_n)],$$

где X — протеолитическая активность 10 г почвы; A — результат колориметрии опытного образца; K_c — «слепой» контроль среды; K_n — контроль почвы; 2 — коэффициент перевода результатов, полученных для 50 мл фильтрата, соответствующих 5 г почвы, на всю взятую навеску.

Если окажется, что полученные фильтраты настолько окрашены, что не поддаются колориметрированию, определение следует повторить, предварительно разведя их в 5 или 10 раз. При расчетах необходимо учесть разведение:

$$X = [nA - 2(K_c + K_n)],$$

где n — коэффициент разведения.

В зависимости от полученных результатов протеолитическая активность выражается в микрограммах или миллиграммах аминокислот, приходящихся на 10 г почвы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИЛОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ

При изучении амилазной активности, характеризующей скорость минерализации крахмала в почве, хорошие результаты дает сравнительно простой в исполнении метод Зобелла и Майерса в модификации В. М. Багнюка и Д. А. Мельничук (1969). В основе метода лежит свойство углеводов, образуемых в результате ферментативного расщепления крахмала, растворяться в этиловом спирте определенной концентрации. Углеводы с антроновым реактивом дают цветную реакцию. Модификация метода позволяет определять

суммарную, а также α - и β -амилазную активность исследуемого материала.

5 г почвы помещают в колбы вместимостью 50 мл, добавляют по 2 мл толуола, 5 мл ацетатного буфера pH 5,7 и 5 мл 1%-ного раствора крахмала. Как и при определении протеазной активности, готовят контроль почвы (почва с дистиллированной водой без крахмала) и «слепой» контроль среды (дистиллированная вода с крахмалом без почвы). Закрытые пробками колбы инкубируют в термостате 24 ч при 35° С. После этого в каждую колбу добавляют 1,2% ко всей инкубируемой смеси 96-градусного этилового спирта, что прерывает реакцию гидролиза и приводит к осаждению неразложившегося субстрата. Содержимое колб взбалтывают и фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерные колбы на 50 мл. Оставшийся на фильтре осадок промывают 10 мл 50-градусного, а затем таким же объемом 70-градусного спирта. Полученный фильтрат взбалтывают, после чего из каждой колбы отбирают его по 2 мл в термостойкие пробирки на 40—50 мл и добавляют по 8 мл антронового реактива, приготовленного перед употреблением (5 мл дистиллированной воды, 100 мл концентрированной серной кислоты и 210 мг антрона). Через 20 мин раствор колориметрируют при зеленом светофильтре. По результатам колориметрии рассчитывают общую амилазную активность исследуемых образцов. Принцип расчетов такой же, как и при определении протеазной активности донных отложений.

Для определения α -амилазной активности 2 мг исследуемого материала необходимо прогреть при 80° С в течение 10 мин на водяной бане. При этом происходит разрушение β -амилазы. Так же как и при определении общей амилазной активности, к пробе добавляют 8 мл антронового реактива и спустя 20 мин колориметрируют. β -амилазная активность определяется по разнице между общей и α -амилазной активностями.

Концентрацию глюкозы, образовавшейся в результате гидролиза крахмала, рассчитывают с помощью специально откалиброванной кривой. При этом из результатов опытных образцов вычитают показания, полученные для обоих контролей.

Амилазная активность, как правило, выражается миллиграммами образуемой глюкозы в 10 г почвы. Можно выражать ее массой гидролизованного крахмала. В этом случае значение концентрации глюкозы следует умножить на 0,9.

НЕФЕЛОМЕТРИЯ

В основе нефелометрического метода анализа лежит явление рассеяния или поглощения света твердыми или коллоидными частицами.

Если через кювету, наполненную суспензией, пропускают свет, то часть его будет отражена, часть поглощена, а часть рассеяна во всех направлениях. Обычно рассеяние света наблюдают в направлении, перпендикулярном к направлению падающего пучка света. Интенсивность светового потока уменьшается вследствие поглощения и рассеяния.

Интенсивность потока рассеянного света описывается уравнением Рэлея:

$$I = I_0 \left[F \frac{NV^2}{\lambda^4 z^2} (1 + \cos^2 \beta) \right],$$

где I и I_0 — интенсивность соответственно рассеянного и падающего света; F — функция, зависящая от значений преломления частиц в растворе; N — общее число частиц в данном объеме; V — объем частиц; λ — длина волны падающего света; z — расстояние до наблюдателя; β — угол между направлениями падающего и рассеянного света.

Из приведенной формулы следует, что интенсивности рассеянного света каждого из двух растворов соотносятся, как количество частиц в суспензиях. Если выбрать одинаковые объемы одинаковым способом приготовленных суспензий, то соотношения интенсивностей рассеянного света становятся равны соотношениям концентраций определяемого вещества в исходных растворах. Этот вывод используется при нефелометрическом способе определения концентрации веществ.

Для измерения интенсивности рассеянного света пользуются специальными приборами — фотоколориметрами-нефелометрами (ФЭК-Н-57 и ФЭК-56-2).

Назначение ФЭК-Н-57, его оптическая схема и принцип измерений такие же, как и ФЭК-М. Однако этот прибор усовершенствован. Его основное преимущество в том, что он имеет большее число светофильтров. Кроме того, фотоэлементы включены через усилитель, что повышает чувствительность прибора.

Техника измерений отличается тем, что перед их выполнением необходимо проводить проверку «электрического нуля». Для этого включают прибор и пускают световые потоки на фотоэлементы в течение 20 мин. Затем световые потоки перекрывают шторкой и проверяют нулевое положение стрелки гальванометра в течение 1—2 мин. В том случае, если стрелка гальванометра не стоит на нуле, установка на нуль осуществляется вращением рукоятки потенциометра 3 (рис. 13). В качестве приемников лучистой энергии служат два

сурьмяно-цезиевых элемента (Ф-4) прибора, включенные по дифференциальной схеме через усилитель, который вмонтирован в нижней части корпуса. Узел светофильтров состоит из двух наборов светофильтров, вмонтированных на дисках так же, как и в приборе ФЭК-М. Каждый диск имеет по 12 отверстий, в которые вмонтированы один нейтральный фильтр и 11 светофильтров с различными областями пропускания:

Номер свето- фильтра	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Эффективная длина вол- ны λ , нм	Нейтральный фильтр	360	413	453	508	536	584	610	656

Светофильтры № 9 (синий), № 10 (зеленый) и № 11 (красный) имеют широкие полосы пропускания. При колориметрических измерениях обычно пользуются светофильтрами №№ 1—8, а при нефелометрических — вместо нейтрального фильтра вставляют кружки простого стекла, входящие в комплект прибора, и пользуются зеленым светофильтром (№ 10). При колориметрических измерениях ру-

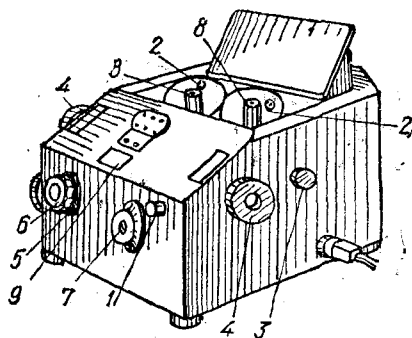


Рис. 13. Общий вид фотоэлектроколориметра ФЭК-Н-57:

1 — рукоятка для переключения на нефелометрические и колориметрические измерения, 2 — линзы, 3 — рукоятка потенциометра, 4 — измерительные барабаны, 5, 6 — фотометрические клинья грубой и тонкой наводки, 7 — переключатель светофильтров, 8 — кюветодержатели, 9 — шкала гальванометра.

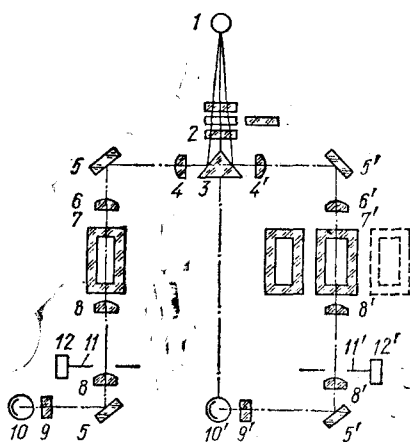


Рис. 14. Оптическая схема ФЭК-56-2:

1 — лампа накаливания, 2 — светофильтр, 3 — призма, 4, 4', 6, 6' и 8, 8' линзы, 5, 5' — зеркала, 7, 7' — кюветы, 9, 9' — матовые стекла, 10, 10' — сурьмяно-цезиевые фотоэлементы Ф-4, 11, 11' — щелевая диафрагма, 12, 12' — шкала барабана.

коятку 1 устанавливают на букву «К», при нефелометрических — на букву «Н». Кроме того, при нефелометрических измерениях надевают диафрагмы на линзы 2. Необходимо помнить, что диафрагмы имеют отверстия разных диаметров, и поэтому их нужно надевать в соответствии с надписями «ПР» (правая) и «ЛВ» (левая).

Гальванометр прибора имеет четыре переключения чувствительности. Поэтому при работе с ним нужно обращаться очень осторож-

но: большую чувствительность можно включать только после того, как при меньшей чувствительности стрелка гальванометра выведена на нуль.

Оптика колориметра-нефелометра ФЭК-56-2 дает возможность работать в ультрафиолетовой области с применением ртутно-кварцевой лампы СВД-120А. Световой поток от источника света 1 (рис. 14) проходит через светофильтр 2, попадает на призму 3, которая делит его на два равных потока — левый и правый. Затем свето-

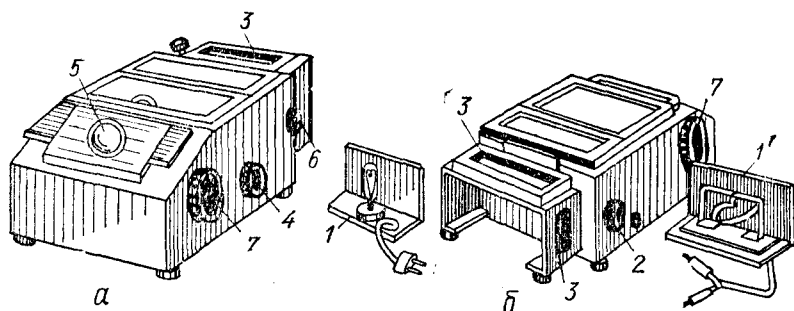


Рис. 15. Общий вид спереди (а) и сзади (б) фотоэлектроколориметра ФЭК-56-2: 1 — лампа накаливания, 1' — ртутно-кварцевая лампа, 2 — рукоятка переключения светофильтров, 3 — вентиляционные окна осветителя, 4 — рукоятка для перестановки кювет, 5 — окно для наблюдения за индикаторной лампой, 6 — рукоятка для перекрытия световых потоков, 7 — измерительные барабаны.

вые пучки проходят через конденсорные линзы 4 и попадают на поворотные зеркала 5 и после отражения проходят через линзы 6, далее попадают на кюветы 7 с раствором или растворителем. Затем световые потоки попадают на линзы 8, в фокусе которых помещены матовые стекла 9, а за ними сурмяно-цезиевые фотоэлементы Ф-4 10. На пути правого потока расположена щелевая диафрагма 11, которая связана со шкалой правого барабана 12 и является, таким образом, измерительной диафрагмой. Такая же диафрагма 11 установлена на пути левого светового потока; эта диафрагма служит для ослабления светового потока, падающего на левый фотоэлемент.

В наборе к этому прибору имеется 9 фильтров. Ниже представлена эффективная длина волны светофильтров ФЭК-56-2:

Номер фильтра	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Эффективная длина волны									
λ , нм	315	364	400	440	490	540	582	610	630

Максимумы пропускания света через светофильтры приблизительно совпадают со спектральными линиями ртути, и поэтому светофильтры можно использовать при работе с ртутной лампой. Установка светофильтра на пути потока света производится с помощью рукоятки 2 (рис. 15). Если наблюдается нестабильная работа прибора (периодическое или беспорядочное размыкание и смыкание спектра

индикаторной лампы), устанавливают в световые потоки еще добавочные нейтральные фильтры, которые уменьшают освещенность фотоэлементов. На барабанах ФЭК-56-2 нанесены две шкалы: черная — светопропускание (%) и красная — оптическая плотность (десятичный логарифм величины, обратной коэффициенту пропускания).

В прибор вмонтирована усилительная схема. Нуль-инструментом служит индикаторная лампа, сектор освещенности которой, наблюдаемый в окошке 5, смыкается и размыкается. При равенстве фототоков сектор индикаторной лампы смыкается. Порядок работы на ФЭК-56-2 такой же, как и на ФЭК-М, только для компенсации фототоков служат не клинья, а диафрагмы, связанные с градуированными барабанами, которые установлены на отдельных осях. Таким образом, при использовании лампы СП-98 измерения начинают через 20 мин после включения прибора, а при работе ртутной лампой включают ее за 5—7 мин до начала измерений, но перед этим электросхему прогревают в течение 20—30 мин.

Для проведения измерений при перекрытых световых потоках (шторка 2, см. рис. 14, а, 15) помещают на пути левого пучка света кювету с растворителем, а на пути правого пучка света — кювету с испытуемым раствором и индекс правого барабана устанавливают на полное пропускание (100%). Вращая левый измерительный барабан, добиваются смыкания сектора индикаторной лампы. Затем с помощью рукоятки 4 (рис. 15) на пути правого светового потока ставят кювету с растворителем и вращением правого барабана снова добиваются смыкания сектора индикаторной лампы. Оптическую плотность отсчитывают по шкале правого барабана.

Нефелометрический метод с успехом применяется в микробиологии, в том числе и в почвенной, для определения биологически активных веществ (витаминов, ферментов), синтезируемых как чистыми культурами микроорганизмов, так и их сообществами непосредственно в почвах разного типа.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖЕЛАТИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЕННЫХ АКТИНОМИЦЕТОВ

Протеолитическую активность микроорганизмов, в частности актиномицетов, очень часто определяют по увеличению количества аминных и карбоксильных групп у аминокислот или пептидов, образующихся в результате разрушения субстрата, либо по наличию в продуктах гидролиза тех или иных свободных аминокислот. В качестве субстрата при определении протеолитической активности микроорганизмов используют белки животного происхождения — казеин, гемоглобин, желатин, коллаген, кератин, яичный и сывороточный альбумины, эдестин, глиадин и др. Учитывая физиологические особенности изучаемого объекта, обычно стараются выбрать наиболее оптимальные условия для проявления протеолитической активности, а именно: состав среды, возраст культуры, температуру,

азрацию и др. В дальнейшем тщательно подбирают состав реагируемой смеси (количество испытуемого материала и субстрата, качество буферного раствора и его pH), время гидролиза и температуру. Исследуя протеолитическую активность почвенных актиномицетов по отношению к субстратам различной сложности (Андреюк, Владимирова, Коган, 1974), мы обратили внимание на нефелометрический метод, предложенный И. Д. Ивановым (1960). Желатин, рекомендуемый в качестве субстрата, является относительно простым белком — его молекулы нитевидны и без определенной внутренней структуры.

Суть нефелометрического метода определения протеолитической активности состоит в том, что субстрат (0,10 %-ный раствор желатина) после инкубации с источником фермента в течение 10 мин осаждают 20 %-ным раствором трихлоруксусной кислоты, а затем нефелометрируют.

Условия выращивания актиномицетов и число исследованных штаммов приведены в главе «Фотоколориметрия».

При определении протеолитической (желатиназной) активности культуральные жидкости микроорганизмов по 0,2 мл разливали по пробиркам в двухкратной повторности и помещали в водяную баню ультратермостата ТЛ-150 с температурой 37° С. Через 5 мин, соблюдая равный интервал, в пробирки поочередно добавляли раствор желатина. Через 10 мин в реагируемые смеси добавляли по 4 мл 20 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты, выставляя их в штатив на лабораторный стол. Через 30 мин растворы нефелометрировали (все так же стараясь соблюдать строгий интервал!) с помощью фотоэлектроколориметра ФЭК-Н-57, используя зеленый светофильтр и кюветы шириной 3—5 мм в зависимости от мутности раствора. Содержимое пробирок не перемешивали, так как иначе размеры осажденных частиц уменьшались, а светопроницаемость жидкости увеличивалась.

Контролем служили такие же смеси, однако порядок их составления был другим. К культуральной жидкости добавляли вначале трихлоруксусную кислоту, а затем столько же субстрата. По разнице между контролем и опытом, выраженной с помощью калибровочной кривой в микрограммах, судили о массе разложившегося белка.

Для построения калибровочной кривой брали 0,1 %-ный раствор желатина и наливали его в 10 пробирок по восходящему ряду (0,1—1,0 мл). Дистиллированной водой доводили до 1 мл, после чего добавляли по 4 мл 20 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Через 30 мин нефелометрировали. Параллельно определяли азот по методу Кьельдаля

Раствор желатина готовили следующим образом: 100 мг вещества высыпали в мерную колбу, заливали небольшим количеством подогретого фосфатного буфера и оставляли для набухания на некоторое время, периодически помешивая. Затем, наливая порциями фосфатный буфер, нагревали на водяной бане до полного растворения. Перед инкубацией раствор желатина нагревали до температуры 37° С.

Желатиназную активность выражали в единицах, под которыми подразумевали такое содержание энзима в 1 мл исследуемого раствора, которое за 60 мин при температуре 37° С катализирует гидролиз 1 мг субстрата.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

Метод нефелометрии был использован при изучении синтеза витаминов группы В у актиномицетов (Андреюк, Коган, 1967, 1972), микобактерий (Козлова, 1970), цианобактерий или синезеленых водорослей (Коптева, 1970) и клубеньковых бактерий (Скочинська, Канцелярук, Долгополова, 1975; Скочинська, Канцелярук, Рангелова, 1975). Для определения витаминов клетки микроорганизмов (за исключением цианобактерий) получали путем глубинного выращивания на круговых качалках (140/60 с⁻¹) в течение 5 сут при 28° С. Цианобактерии культивировали в люминостатах с круглосуточным освещением (освещенность составляла 2—2,5 тыс. лк) в течение 15 сут. Затем клетки отмывали от среды физиологическим раствором, переносили в чашки Петри и высушивали до постоянной массы при 60° С. Сухие клетки тщательно растирали в ступке и сохраняли в закрытых пробирках в рефрижераторе. Культуральные жидкости после отделения клеток фильтровали или центрифугировали, стерилизовали кипячением на водяной бане в течение 30 мин и сохраняли в холодильнике.

Микробиологические методы определения витаминов основаны на оценке энергии роста бактериальных или дрожжевых тест-культур, для которых один или несколько изучаемых витаминов являются существенным фактором роста. При постановке опытов особое внимание следует уделять подготовке посуды, питательных сред, выбору тест-культуры, приготовлению стандартных растворов витаминов, извлечению их из исследуемых субстратов и выбору необходимого для исследований количества материала.

При микробиологическом анализе обычно используют три вида сред: для поддержания тест-культуры, для приготовления инокулята (посевного материала) и для непосредственного анализа. Для избежания испарения жидкости и резкого повышения вследствие этого концентрации питательных сред и рабочих растворов витаминов при стерилизации на ватно-марлевые пробки надевали резиновые или бумажные колпачки. Среду для определения витаминов разливали по 5 мл в пробирки одинакового диаметра и добавляли 0,1—0,3 мл гидролизата клеток либо культуральной жидкости микроорганизмов в зависимости от биосинтетической способности культур. Для правильной оценки полученных результатов очень важно во все пробирки контрольного и опытного вариантов внести равное количество посевного материала (тест-культуры).

Определение витаминов чаще всего проводили в среде Ридер следующего состава (в г на 1 л): реактив I — 3 г (NH₄)₂SO₄, 0,7 г

MgSO₄, 0,5 г NaCl; реактив II — 1 г KН₂РO₄, 0,1 г K₂НРO₄; реактив III — 20 г (или 4 ампулы 40%-ного раствора) глюкозы. При подогреве соли аммония, магния и натрия растворяют в 800 мл воды, одно- и двузамещенные фосфаты — в 100 мл; глюкозу — в 100 мл воды.

По рекомендации Е. Н. Одинцовой (1959), все пробирки засеивали соответствующей индикаторной культурой (0,1 мл суспензии). При внесении испытуемого материала или стандартных растворов витаминов пользуются градуированными пипетками на 1 мл. Стандартные растворы вносят в порядке возрастающей концентрации. Засеянные пробирки помещают в термостат и выдерживают в течение 48 ч при 28° С в наклонном положении для увеличения поверхности среды, соприкасающейся с воздухом. К каждому опыту готовят стандартные растворы витаминов путем разбавления основных растворов, концентрацией 500 мкг/мл, которые можно хранить в холодильнике не более месяца.

Содержание витаминов в образцах определяли с помощью полупологарифмических стандартных кривых, которые строили на основе показаний фотоэлектрического колориметра-нефелометра ФЭК-56 при длине волны 540 нм, отражающих интенсивность роста индикаторной культуры в зависимости от концентрации соответствующего витамина в среде, и пересчитывали на 1 г массы абсолютно сухих клеток микроорганизмов.

Витамин В₁ (тиамин). Тесно связан с углеводным обменом. В тканях почти весь тиамин переходит в кокарбоксилазу, которая, являясь коферментом карбоксилазы, расщепляет пировиноградную кислоту на ацетальдегид и СО₂. Этот процесс носит название декарбоксилирования. В результате декарбоксилирования микроорганизмы освобождаются от пировиноградной кислоты, которая накапливается в клетках при недостатке витамина В₁.

При микробиологическом методе определения тиамин (Одинцова, 1959) в качестве индикаторной культуры использовали *Debaryomyces disporus* (Beijerinck) Dekker, который выращивали на сусле-агаре в термостате при температуре 27—28° С в течение 48 ч. Для лучшего роста культуры добавляли 0,1 мкг пиридоксина и 1,0 мкг инозита на миллилитр среды Ридер.

Гидролизат клеток готовится следующим образом: к 20 мг высушенных клеток клубеньковых бактерий добавить 2,5 мл 0,1 н. Н₂SO₄ и кипятить 45 мин на водяной бане. Затем нейтрализовать 1 н. NaOH до значения pH, равного 7,0, и довести водой до 5 мл, после чего отфильтровать и снова кипятить.

Витамин В₃ (пантотеновая кислота). В виде кофермента А входит в ферментные системы, катализирующие реакции ацетилирования. Для определения пантотеновой кислоты использовали индикаторную культуру *Saccharomyces ludwigii* КМ (Помощникова, 1955). Опыты ставили на среде Ридер с добавлением всех необходимых для применяемой индикаторной культуры витаминов, за исключением определяемого. В среду вносили по 5 мкг/мл тиамин, пиридоксин,

никотиновой кислоты, 3 мкг/мл инозита и 0,002 мкг/мл биотина. Пантотеновая кислота является лабильной по отношению к кислотам и щелочам, поэтому для ее выделения из связанного состояния проводили ферментный гидролиз препаратом протеазы гриба *Aspergillus terricola* (Кіпріанова, 1965).

К 0,1 мл исследуемого гидролизата или культуральной жидкости добавляли по 1 мл дистиллированной воды (рН 7) и кипятили на водяной бане в течение 20 мин. Затем добавляли 2 мл фермента, приготовленного на фосфатном буфере, и три капли толуола. Гидролизовали в течение 18 ч при 45° С. Объем доводили до 5 мл и фильтровали.

Витамин В₅ (никотиновая кислота). Амид никотиновой кислоты входит в молекулу кодегидраз, принимающих участие в окислительно-восстановительных процессах. Никотиновую кислоту определяли с помощью тест-культуры *Fabospora fragilis* (Одинцова, 1959). Для полноценного роста культуры в среду Ридер добавляли тиамин, пантотеновую кислоту (0,1 мкг/мл) и биотин (0,0001 мкг/мл). Для выделения никотиновой кислоты из сухих клеток актиномицетов и микобактерий навеску последних (20 мг) подвергали гидролизу 1 н. H₂SO₄ (2 мл) при 1 атмосфере на протяжении 20 мин. Полученные гидролизаты нейтрализовали 1 н. NaOH, доводили объем до 10 мл и фильтровали. Эти же гидролизаты могут быть использованы и для определения пиридоксина.

Витамин В₆ (пиридоксин). Витамин и его производные участвуют в превращении аминокислот. По методу Е. Н. Одинцовой (1959) для количественного определения пиридоксина чаще всего применяют дрожжевой организм *Debaryomyces disporus* (Beijerinck) Dekker. Для лучшего роста культуры в среду Ридер добавляют по 1 мкг/мл тиамина и инозита.

Витамин В₇ (биотин). Входит в состав простетической группы некоторых ферментов и принимает участие в процессах декарбоксилирования и карбоксилирования, а также дезаминирования аминокислот, благоприятствует синтезу ненасыщенных жирных кислот.

Биотин определяли с использованием индикаторной культуры (*Candida tropicalis* СК-4) (Коротченко, 1963). Из витаминов для роста этой культуры необходим только биотин. Сухие клетки (20 мг) гидролизовали 6 н. H₂SO₄ (2 мл) в течение 20 мин при 1 атмосфере. Затем нейтрализовали 6 н. NaOH, объем доводили дистиллированной водой до 10 мл и фильтровали.

Витамин В₁₂ (цианкобаламин). Способствует синтезу аминокислот, нуклеиновых кислот, участвует в обмене углеводов и жиров. Микробиологический способ определения В₁₂ разработан Л. С. Куцовой (1955) и предусматривает использование в качестве тест-культуры *E. coli* штамм 113-3. Поддерживающая среда — глюкозо-пептонный агар следующего состава: вода 100 мл, 1 г пептона, 4 г глюкозы (или 1 ампула 40%-ного раствора, объем 10 мл), 3 г агара.

Среда для определения В₁₂ (рН составляет 6,8—7,0) готовится на дистиллированной воде с добавлением следующих солей (г/л):

7 K_2HPO_4 ; 3 KH_2PO_4 ; 0,5 Na лимоннокислый; 0,1 $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; 1 $(NH_4)_2 SO_4$; 2 глюкоза; 1 NaCl; следы $NaNO_2$.

Для приготовления гидролизата клеток клубеньковых бактерий и мицелия актиномицетов 20 мг сухого материала заливают 2,5 мл дистиллированной воды, pH доводят 2%-ным раствором H_2SO_4 до 3, а потом 5%-ным раствором $NaNO_2$ до 4—5 (общий объем гидролизата должен составлять 5 мл), кипятят на водяной бане в течение 20—30 мин и хранят в холодильнике. Перед постановкой опыта pH раствора гидролизата доводят 0,1 н. NaOH до 6,8—7,0; фильтруют, кипятят.

В связи с тем что в испытуемом образце может находиться метионин, к которому чувствителен штамм *E. coli* 113-3, ставят контрольный опыт с предварительно разрушенным витамином B_{12} . Для этого 5 мл экстракта смешивают с 5 мл 0,2 н. NaOH и кипятят в течение 20 мин. После охлаждения раствор нейтрализуют добавлением 1 н. раствора HCl и разводят водой аналогично опыту с неразрушенным витамином. В итоге от полученного значения количества витамина B_{12} вычитают значение обнаруженного метионина.

Глава 4

ФЛЮОРОМЕТРИЯ

Люминесцентное (от *lumen* — свет) свечение издавна привлекало внимание исследователей. Выдающийся английский физик Стокс еще в 1852 г. опубликовал монографию, в которой описал флюоресценцию хинина, хлорофилла и других веществ растительного происхождения. Он обратил внимание на возможность использования люминесценции для обнаружения органических веществ. В СССР систематические исследования в этом направлении начали проводиться с 30-х годов. В результате исследований С. И. Вавилова и его школы была вскрыта сущность люминесценции, дана классификация разновидностей этого явления.

Известно, что непосредственно глазом человека воспринимается очень небольшая часть электромагнитных колебаний: область видимых лучей охватывает интервал приблизительно от 400 до 760 нм.

С одной стороны к ней примыкает длинноволновая инфракрасная область (760—2000 нм), а с другой — коротковолновая ультрафиолетовая ближняя (примерно от 400 до 315 нм), средняя (примерно от 315 до 280 нм) и дальняя (менее 280 нм). Для длин волн около 185 нм начинается вакуумная ультрафиолетовая область. Указанные между областями границы носят условный характер.

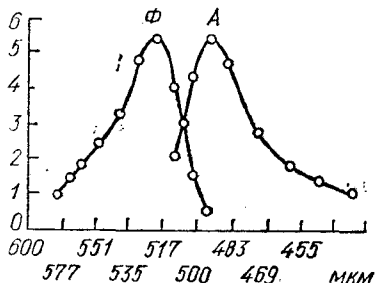
Для возникновения люминесценции необходимо поглощение света. Вещество поглощает и испускает свет отдельными порциями — квантами. Кванты света, соответствующие лучам различной длины волны, неодинаковы по своей энергии. Например, энергия квантов

синего света больше, чем красного. Длина волны света обратно пропорциональна энергии кванта. Размер кванта (ϵ) вычисляется по следующей формуле: $\epsilon = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$, где h — универсальная постоянная Планка; ν — частота колебания света; λ — соответствующая длина волны; c — скорость света.

Если обозначить энергию атома до поглощения им света через E_1 , а после поглощения через E_2 , то разность ($E_2 - E_1$) равна энергии поглощенного кванта света: $E_2 - E_1 = h\nu$.

При поглощении световой энергии изменяется электронное состояние энергетического уровня молекул и атомов. Их энергетический запас возрастает на размер поглощенного кванта, при этом молекулы и атомы приходят в возбужденное состояние. Возбужденные атомы и молекулы обычно очень быстро, за время, измеряемое миллиардными долями секунды, теряют свою избыточную энергию и переходят в невозбужденное состояние. Такой переход может осуществляться либо безызлучательно, путем передачи энергии в виде тепла окружающим частицам, либо с излучением, которое называется люминесценцией.

Рис. 16. Сравнение спектров абсорбции (А) и флуоресценции (Ф) щелочного раствора флюоресцина. По оси ординат — интенсивность фотовозбуждения, усл. ед.; по оси абсцисс — длина волны, мкм.



Таким образом, люминесценция — это свечение атомов, молекул, ионов и других более сложных комплексов, возникающее в результате перехода в них электронов из возбужденного состояния в нормальное. В научных исследованиях и в практике применяется несколько способов возбуждения люминесценции, в зависимости от которых люминесценция делится на несколько видов. Различают хемилюминесценцию, катодолюминесценцию, электролюминесценцию, радиолюминесценцию, триболюминесценцию и фотолюминесценцию (флуоресценцию), которая пользуется особенно широкой популярностью у биологов и химиков. Этот вид свечения возникает под действием видимых и ультрафиолетовых лучей.

При излучении фотолюминесценции растворов первой установленной закономерностью было соблюдение правила Стокса, согласно которому спектр люминесценции растворов по сравнению со спектром абсорбции смещается в сторону больших длин волн (рис. 16). Это значит, что вещества, поглощающие ультрафиолетовый свет, могут флуоресцировать любым светом, но вещества, флуоресценция которых возбуждается синим светом ($\lambda = 420 - 490$ нм), могут светиться зеленым ($\lambda = 500 - 550$ нм), желтым ($\lambda = 575 - 590$ нм), красным ($\lambda = 620 - 760$ нм), т. е. таким светом, который соответствует большим длинам волн. Согласно квантовым представлениям,

правило Стокса обозначает, что энергия кванта, излучаемого флюоресцирующим веществом, всегда меньше поглощаемого кванта света, возбуждающего свечение (Люминесцентный анализ, 1961).

Для многих веществ со сложным строением молекул спектр абсорбции и спектр флюоресценции зеркально симметричны (правило Левшина). Однако зеркальная симметрия спектров может осуществляться только у молекул с одинаковым строением систем энергетических уровней ее нормального и возбужденного состояний (Левшин В. Л., Левшин Л. В., 1972).

Для количественной характеристики флюоресценции используется понятие — энергетический и квантовый выход. Квантовый выход — отношение числа квантов флюоресценции к числу поглощенных квантов возбужденного света. Энергетический выход — отношение излучаемой энергии флюоресценции к энергии, поглощенной веществом. С. И. Вавиловым установлен закон, согласно которому квантовый выход флюоресценции не зависит от длины волны возбуждающего света вплоть до некоторой предельной длины волны λ_0 , т. е. возбуждая свечение светом, длина волны которого больше λ_0 , доля молекул, отдающих в виде флюоресценции излучаемую энергию, резко снижается. Теоретически все молекулы, поглощающие свет, должны флюоресцировать. Однако в обычных условиях при использовании современной аппаратуры не удается обнаружить флюоресценцию многих поглощающих веществ.

Уменьшение выхода флюоресценции — так называемое «тушение» — вызывают различные причины, мешающие сохранению возбужденного электронного состояния молекул. В большинстве случаев — это безызлучательные конкурирующие электронные переходы, происходящие внутри возбужденной молекулы и не приводящие к квантовому выходу. Установлено, что интенсивность флюоресценции пропорциональна концентрации флюоресцирующего вещества при очень малом его содержании в растворе (10^{-4} — 10^{-5} г/мл или меньше). При больших его концентрациях интенсивность свечения растворов возрастает медленно, а при дальнейшем увеличении содержания флюоресцирующего вещества начинает снижаться, т. е. возникает концентрационное тушение. Изучение концентрационного тушения показало, что оно вызывается образованием в растворах сложных частичек — «ассоциантов», состоящих из двух и более молекул люминесцентного вещества. В концентрированных растворах число ассоциированных молекул увеличивается. Поэтому с возрастанием концентрации раствора наблюдается увеличение тушения флюоресценции (рис. 17).

Исследователю часто приходится иметь дело с растворами, концентрация которых неизвестна. Для того чтобы знать, насколько надо разбавить изучаемую жидкость, в открытый стаканчик с растворителем, освещенный сверху ультрафиолетовым светом, по каплям прибавляют исследуемую жидкость. В момент попадания в растворитель первых капель они ярко разгораются, а затем, благодаря диффузии, становится видимым только более слабое равномерное

свечение по всему сосудику. Разгорание прекращается, когда достигнута концентрация, отвечающая максимальной яркости свечения. После этого, осторожно разбавляя раствор, необходимо убедиться в неизменяемости цвета флюоресценции при уменьшении концентрации.

В некоторых случаях при нормальном разведении раствора флюоресценция ослабляется из-за присутствия в веществе люминесцирующих примесей. Некоторые вещества, внесенные в растворы, вызывают тушение флюоресценции. К ним относятся йодистый калий

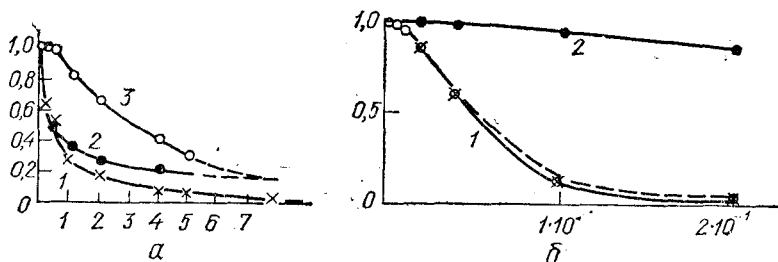


Рис. 17. Люминесценция растворов родамина 6Ж в воде (а) и уранина в глицерине (б) в зависимости от увеличения их концентрации:

1 — полное тушение, 2 — тушение вследствие неактивного поглощения, 3 — тушение вследствие миграции энергии на ассоциаты. По оси ординат — интенсивность люминесценции, усл. ед.; по оси абсцисс — концентрация веществ, моль·л⁻¹.

и другие соли галогенов, многие органические вещества — анилин, фенол, резорцин, а также часто кислород. При этом вещество, вызывающее сильное тушение одного флюоресцирующего раствора, не всегда является тушителем другого.

На процесс флюоресценции оказывает влияние и температура. При повышении температуры у многих флюоресцирующих растворов наблюдается тушение. Температурное тушение происходит вследствие того, что с повышением температуры увеличивается безызлучательная потеря энергии возбужденными молекулами. Растворы некоторых веществ могут давать яркую флюоресценцию только при охлаждении.

Одним из факторов, влияющих на флюоресценцию растворов, является реакция среды. Большинство соединений в водных растворах в зависимости от pH может диссоциировать в большей или меньшей степени. В свою очередь существует зависимость между диссоциацией молекул и флюоресценцией: если молекула хотя бы в слабой степени обладает кислотными или основными свойствами, то флюоресценция ее изменяется с изменением pH раствора. То же относится к недиссоциированному основанию и его иону (рис. 18). У органических веществ, обладающих кислотными или основными свойствами, в зависимости от pH среды могут изменяться их абсорбционные и люминесцентные свойства, поэтому такие вещества используют как pH-индикаторы. Чтобы избежать возможной ошибки, исследователю необходимо работать с растворами, обладающими

достаточной кислотностью (щелочностью), или применять буферные растворы.

Для количественного определения веществ в растворе с помощью люминесцентного метода применяют фотоэлектрические флуорометры и спектрофлуорометры. В большинстве приборов в качестве источника возбуждения флуоресценции используются различной мощности ртутные лампы, выполненные в колбах из плавленого кварца или хорошего увиолевого стекла. При разряде в парах ртути излучается много линий как в ультрафиолетовой, так и в видимой областях спектра. Однако такие лампы плохо подходят для спектральных измерений, так как у них энергия распределена не непрерывно, а сконцентрирована в основном в нескольких характеристических линиях ртутной дуги.

Для ряда спектрофотометрических задач бывает нужен сплошной спектр в ультрафиолетовой области. Таким спектром на протяжении ультрафиолетовой и большей части видимой областей обладают водородные лампы. Интенсивность этих ламп невелика, особенно в области длин волн свыше 300 нм. Водородные лампы большей мощности могли бы быть использованы для флуоресцентных исследований, но для них необходимо специальное охлаждение. Сплошной спектр в ультрафиолетовой области дают также ксеноновые лампы. Они, как и ртутные, отличаются высокой яркостью, но интенсивность их излучения падает с уменьшением длины волны.

До недавнего времени в большинстве флуорометров наиболее употребляемыми приемниками излучения были фотоэлементы с запирающим слоем (главным образом селеновые).

В настоящее время для превращения относительно слабого света флуоресценции в измерительный сигнал используют фотоэлектронные умножители, которые обладают гораздо большей чувствительностью, чем фотоэлементы. Фотоумножитель представляет собой вакуумную трубку с большим числом светочувствительных электродов. Последние расположены таким образом, что электроны, выбитые из первого электрода (фотокатода) под влиянием падающего на него света (фотоэффект), попадают через весь длинный ряд электродов на анод. При этом число электронов увеличивается. Фотоумножитель совмещает в себе фотоприемник и усилитель.

Выделение необходимой спектральной области для возбуждения флуоресценции и устранения рассеянного света производится с по-

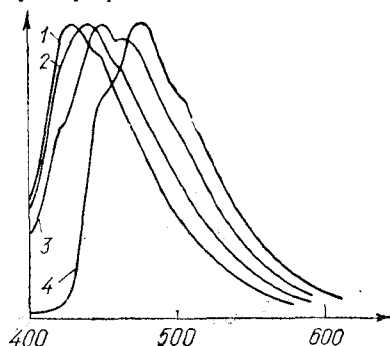


Рис. 18. Изменение спектра флуоресценции раствора акридина в зависимости от pH:

1 — pH 7, 2 — pH 6, 3 — pH 5, 4 — pH 4.

Концентрация акридина во всех растворах составляла $4 \cdot 10^{-6}$ г/мл; по оси ординат — интенсивность флуоресценции, усл. ед.; по оси абсцисс — длина волны, нм.

мощью фильтров и различного типа монохроматоров. Фильтры могут быть первичные, предназначенные для выделения необходимой спектральной области источника света, и вторичные, предназначенные для отсекаания всего рассеянного возбуждающего света и пропускающие весь свет флюоресценции. Вторичные фильтры часто представляют собой комбинацию нескольких фильтров.

Кроме того, для исследуемых растворов применяют специальные кюветы, изготовленные из различных сортов кварца, которые обладают собственной флюоресценцией. Чем выше чувствительность прибора, тем тщательнее надо подходить к выбору кювет.

В настоящее время наша промышленность выпускает лабораторный электронный флюорометр ЭФ-3МА (улучшенный вариант прибора ЭФ-3), предназначенный для количественного анализа витаминов В₁, В₂, фолиевой кислоты, гетероауксина и других флюоресцирующих в растворах веществ.

Рис. 19. Схема флюорометра ЭФ-3-МА:

1 — осветитель, 2 — диафрагма, 3 — заслонка, 4, 8 — светофильтры, 5, 7 — кварцевая оптика, 6 — испытуемый раствор, 9 — фотоэлементы

Принцип действия флюорометра (рис. 19) заключается в том, что свет от кварцевой лампы 1, проходя через отверстие диафрагмы 2, первичный фильтр 4, кварцевую оптику 5, попадает на пробирку с исследуемым раствором 6. Раствор, облученный коротковолновой частью спектра (при определении витамина В₂ — 350—480 нм), начинает светиться. Свет флюоресценции попадает в оптику 7, расположенную с двух сторон кюветы. Далее сфокусированный пучок света проходит через вторичные светофильтры 8 и попадает на фотоэлементы 9. Полоса пропускания вторичных светофильтров для витамина В₂ — 510—650 нм. Фотоэлемент, преобразовывая световую энергию флюоресценции в электрическую, подает ее на вход электрического усилителя. К анодной цепи электронного усилителя подключен микроамперметр, показания которого прямо пропорциональны концентрации раствора.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИБОФЛАВИНА В КУЛЬТУРАХ РАЗЛИЧНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Метод флюорометрии мы использовали для изучения способности почвенных микроорганизмов — микобактерий (Козлова, 1970), клубеньковых бактерий (Скочинська та ін., 1975), актиномицетов (Андріюк, Коган, 1972) и синезеленых водорослей (Коптева, 1970) — синтезировать рибофлавин. Рибофлавин определяли по методу Н. Л. Поволоцкой и соавт. (1955) с помощью флюорометра марки ЭФ-3.

Молекула рибофлавина представляет собой систему конденсированных колец с большим числом сопряженных связей. Она обладает собственной флюоресценцией. Однако для определения витамина В₂ необходимо разделить связь моно- и динуклеотидов рибофлавина с белком. Это обычно достигается кислотным гидролизом.

Подготовку образцов для определения рибофлавина проводили следующим образом: к сухим клеткам (навеска равна 20 мг) прибавляли 2 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты и кипятили 10 мин. В остывшие образцы добавляли $\frac{1}{4}$ объема K_2HPO_4 , при этом pH смеси должно быть равным 5,5—6,0. Объем доводили до 10 мл и фильтровали, 5 мл фильтрата окисляли 4%-ным раствором $KMnO_4$ до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 5 мин. Затем по каплям прибавляли 3%-ный раствор H_2O_2 до исчезновения окраски. После этого объем доводили до 10 мл и флюорометрировали. В случае выпадения осадка пробы предварительно фильтровали.

В пигментированной культуральной жидкости микроорганизмов определение рибофлавина проводили следующим образом: к 4 мл культуральной жидкости прибавляли 1 мл K_2HPO_4 (pH смеси равно 6), несколько капель 4%-ного $KMnO_4$, спустя 5 мин несколько капель 3%-ной H_2O_2 , затем объем доводили до 10 мл, фильтровали и флюорометрировали. После измерения гасили флюоресценцию рибофлавина прибавлением небольшого количества (на кончике ланцета) соды ($NaHCO_3$) и гидросульфита натрия ($Na_2S_2O_4$). Истинную флюоресценцию рибофлавина определяли по разности между первым и вторым определением.

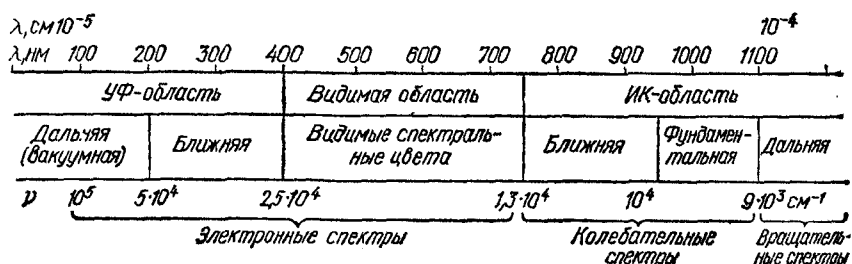
Основной раствор рибофлавина концентрацией 40 мкг/мл готовили, растворяя 10 мг витамина В₂ в 250 мл дистиллированной воды. Раствор хранили в темной склянке в холодильнике. Он сохранял стойкость в течение месяца. Непосредственно перед определением готовили рабочий стандартный раствор, содержащий 0,4 мкг рибофлавина в 1 мл. Расчет содержания рибофлавина производили по формуле

$$p_c = \frac{0,4v(A-B)}{Cp} \text{ мкг/г вещества,}$$

где A — показания флюорометра для исследуемого раствора;
 B — показания флюорометра для исследуемого раствора после гашения;
 C — показатель флюорометра для стандартного раствора;
 p — навеска биомассы, г; v — общее разведение, мл.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ

Спектрофотометрический анализ основан на определении спектра поглощения или измерении светопоглощения при строго определенной длине волны, которая соответствует максимуму кривой поглощения данного исследуемого вещества. Аналитическая адсорбционная спектрофотометрия основана на тех же законах светопоглощения, что и фотоколориметрия (см. главу «Фотоколориметрия»), однако, в отличие от последней, в спектрофотометрии используется поглощение монохроматического света, т. е. света определенной длины волны:



Абсолютный спектр поглощения вещества представляет собой зависимость количества поглощенного света от длины волны. Спектры поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях отражают энергетические переходы связанных и несвязанных внешних электронов в молекулах; обычно эти электроны делокализованы (Бэррин, 1978). Указанный принцип используется в спектрофотометрии в видимой и ультрафиолетовой областях. Спектры поглощения в инфракрасной (ИК) области отражают колебания атомов в молекулах и изучаются методом ИК-спектроскопии.

Молекулы веществ имеют квантованные энергетические уровни, а их энергия состоит из энергий электронного, колебательного и вращательного состояний:

$$E = E_{\text{эл}} + E_{\text{кол}} + E_{\text{вр.}}$$

Поглощение излучений вызывает изменение в энергии этих состояний, в результате чего возникают электронные, колебательные и вращательные спектры. Вращательным спектрам соответствует энергия перехода, равная 10^{-2} — 10^{-3} ккал/моль, и они находятся в далекой инфракрасной и микроволновой областях. Колебательные спектры связаны с изменением колебательной энергии и для большинства молекул проявляются в средней и ближней инфракрасной областях (1—40 мк). Соответствующая энергия переходов составляет 1—10 ккал/моль. Колебательные уровни, между которыми проис-

ходят переходы, принадлежат к основному электронному состоянию. Электронные спектры возникают в результате переходов между электронными состояниями и наблюдаются в ультрафиолетовой и ближней инфракрасной областях (120—1000 нм). Энергии переходов составляют более 100 ккал/моль. При поглощении такой энергии одновременно происходит изменение в колебательных и вращательных состояниях. Поэтому электронные спектры состоят из широких полос, на которых иногда видна колебательная структура. Последняя принадлежит к колебательным переходам в возбужденном электронном состоянии.

В результате многочисленных исследований достоверно установлено, какой группе веществ и какому типу колебаний соответствует каждая полоса в спектре. Спектры полос существуют в виде таблиц, которые также отражают влияние химического окружения, типа атомов, входящих в группу, типа связи и других факторов на частоту колебаний, а также случаи перекрывания полос. С этими таблицами и сравнивают полученные спектры изучаемых веществ. Этого достаточно для того, чтобы предсказать тип исследуемого соединения.

Поглощение в видимой, ультрафиолетовой и инфракрасной областях можно регистрировать глазом в первом случае или фотографированием во всех случаях.

Используемые приборы носят название спектроскопов, спектрографов и спектрофотометров.

В спектрофотометрах индикатором служит фотоэлемент, ток в котором пропорционален интенсивности падающего на него света. В качестве источников света в зависимости от области исследования применяют лампы накаливания, водородные или дейтериевые лампы. Характеристика современных спектрофотометров (отечественных и зарубежных), а также порядок работы на некоторых из них приводятся в книге «Физико-химические методы исследования почв» (1980).

Выпускаемые промышленностью спектрофотометры работают как в широком диапазоне волн, так и в более узкой области спектра (видимой, инфракрасной или ультрафиолетовой):

Прибор	Рабочий диапазон прибора, нм	Прибор	Рабочий диапазон прибора, нм
СФ-4	760—1100	СФ-14	400—760
СФ-4А	220—1100	СФ-16	110—1100
СФ-5	380—1100	СФ-18	760—2500
СФД-2	220—1000	СФ-26	185—1100
СФ-8	760—2500	«Specord — WVVIS»	
СФ-9	760—2500	(ГДР)	170—800
СФ-10	400—750	«Спектромом-203» (ВНР)	190—1100

Вследствие особенностей аппаратуры спектрофотометрические методы анализа имеют следующие преимущества по сравнению с обычными фотоколориметрическими методами:

1) позволяют работать в узкой области оптимального светопоглощения, а это значительно увеличивает чувствительность и точность количественного определения;

2) применимы как для анализа одного вещества, так и для анализа систем, содержащих несколько поглощающих и химически не взаимодействующих друг с другом компонентов;

3) дифференциальный спектрофотометрический метод и метод спектрофотометрического титрования позволяют определять большие количества отдельных компонентов в смеси благодаря возможности измерения оптической плотности с большой точностью.

Спектрофотометрические методы давно и с успехом используются химиками в целях контроля над химическими и физическими процессами, для исследования структуры неорганических комплексов, межмолекулярных водородных связей, симметрии молекул, взаимодействия между растворителем и растворенным веществом. Метод спектрального анализа обладает ценным, с точки зрения биологов, качеством: вещество в процессе исследования не разрушается. Кроме того, методику исследований легко модифицировать и автоматизировать. С помощью спектрофотометрии в биологии изучают химическую структуру и превращение веществ — белков, нуклеиновых кислот, токсинов, пигментов различного происхождения, моно-, ди- и полисахаридов; структуру и состав клеток и клеточных стенок микроорганизмов с целью их идентификации.

В общей и почвенной микробиологии спектрофотометрию используют для изучения пигментов актиномицетов (Андреюк, Козырицкая, 1979), токсинов синезеленых водорослей (Андріюк та інші, 1977), полисахаридов олигонитрофильных бактерий (Косенко и др., 1980), а также в экологии, например, для определения содержания некоторых элементов в почвах и породах.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ ОЛИГОНИТРОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Метод ИК-спектроскопии был успешно использован Н. Н. Мальцевой при изучении препаратов экзополисахаридов группы олигонитрофильных бактерий (Косенко и др., 1980). Препараты исследовали в двух вариантах — в виде спрессованных с KBr таблеток, которые готовили из расчета 3 мг сухого образца на 1000 мг KBr, а также в виде суспензий в вазелиновом масле. ИК-спектры снимали на спектрофотометре UR-10. Спектральные характеристики исследуемых препаратов анализировали в областях следующих частот поглощения: $3600\text{--}3200\text{ см}^{-1}$, $3200\text{--}2600\text{ см}^{-1}$, $1880\text{--}1500\text{ см}^{-1}$, $1500\text{--}1200\text{ см}^{-1}$, $1100\text{--}1000\text{ см}^{-1}$, $960\text{--}730\text{ см}^{-1}$.

В ИК-спектрах исследуемых образцов обнаружены характеристические полосы поглощения, обусловленные валентными колебаниями гидроксильных групп. Полосы поглощения несколько смещены в область более низких частот, что вызывается обычно валент-

ными колебаниями ОН-групп, ассоциированных водородными связями. На полученных спектрограммах особенно характерными оказались пики с максимумами поглощения от 1600 до 1630 см^{-1} , которые можно объяснить наличием аминогрупп. На основании ИК-спектрометрического анализа сделан вывод о цикличности структуры полимера (наличие широкой полосы в области 1170 см^{-1} и монотонность спектра), а также о наличии α -гликозидных связей (940—910 см^{-1}). Следует также отметить, что ИК-спектры препаратов экзополисахаридов изучаемых олигонитрофильных бактерий, несмотря на большое сходство, имели небольшие, но вполне определенные различия. Их характер и своеобразие при сопоставлении с данными, полученными другими методами, позволяют разделить исследуемые микроорганизмы на три таксономические группы.

Таким образом, ИК-спектроскопия полисахаридов олигонитрофильных бактерий может служить дополнительным критерием в таксономическом анализе.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУЛЬФАТОВ В ВОДНЫХ ВЫТЯЖКАХ ПОЧВ

Существующие методы определения сульфатов в водных вытяжках почв — весовой (Аринушкина, 1970), комплексометрический метод Фритца и Фриланда в модификации Г. В. Заварова (1957), не дают надежных, четко воспроизводимых результатов и имеют недостатки.

Применение весового метода определения сульфатов связано с длительной операцией отстаивания осадка BaSO_4 (до 24 ч). При использовании комплексометрического метода (всех его разновидностей) проводят косвенное титрование Mg, образующим с комплексом III более прочные комплексы, чем Ba. Метод, предложенный Заваровым, при наличии в водной вытяжке примесей дает ухудшение перехода окраски индикатора.

Предложенный советскими учеными Н. Н. Басаргиным и А. А. Ногиной (1967) объемный метод определения сульфатов в растворах с применением металлоиндикатора на Ba — реагента нитхромазо — дает непосредственную чувствительную и контрастную реакцию на Ba. Однако вследствие того, что катионы Ca^{2+} , K^+ , Na^+ и NH_4^+ также реагируют с нитхромазо, этот метод может быть безоговорочно применен в исследованиях почвенных вытяжек.

Ввиду явного несовершенства существующих объемного и весового методов определения SO_4^{2-} в почвенных вытяжках, мы опробовали на почвенных объектах спектрофотометрический метод определения сульфатов по ГОСТ 20422-75, применяемый для анализа водных вытяжек из конденсаторной бумаги. Чувствительность этого метода составляет 0,5 мкг SO_4^{2-} в 20 мл водной вытяжки из почвы (1 : 10). Применение спектрофотометра исключает субъективные ошибки при титровании. Метод основан на осаждении BaSO_4 из водной вытяжки специальным осаждающим реактивом и фото-

метрировании полученного мутного раствора с помощью спектрофотометра СФ-16 при длине волны 434 нм в видимой области спектра. Сульфат-ионы осаждают из водных вытяжек реактивом, который состоит из трех объемов 96%-ного C_2H_5OH , трех объемов глицерина и одного объема 5%-ного $BaCl_2$; pH осаждающего реактива доводят 0,1 н. HCl до 3. Раствором можно пользоваться только через 5—7 сут после приготовления.

Для построения калибровочного графика из стандартного раствора K_2SO_4 , содержащего 20 мкг SO_4^{2-} в 1 мл, готовят серию из 10 образцовых растворов с содержанием сульфат-ионов от 0,5 до 5,0 мкг в 1 мл. Для этого в мерные колбы на 100 мл помещают от 2,5 до 25 мл стандартного раствора K_2SO_4 . В конические колбы вместимостью 50 мл помещают по 20 мл образцового раствора, подкисляют двумя-тремя каплями 0,01 н. HCl и добавляют 5 мл осаждающего раствора. Раствор тщательно перемешивают. Одновременно таким же способом готовят холостую пробу, в которой образцовый раствор заменен водой. Через 10 мин проводят фотометрирование при длине волны 434 нм. На основании полученных данных строят калибровочную кривую. В том случае, если водная вытяжка окрашена, из полученных результатов вычитают значение оптической плотности водной вытяжки, заменив осаждающий реактив дистиллированной водой.

По полученным значениям оптической плотности образцов, пользуясь калибровочной кривой, находят содержание SO_4^{2-} в 1 мл исследуемой пробы. Перед осаждением сульфат-ионов желательно знать их приблизительное содержание в водной вытяжке с целью разбавления последней. В противном случае спектрофотометр будет давать неверные показания. Содержание SO_4^{2-} в водной вытяжке определяют качественной реакцией: к 5 мл исследуемой воды прибавляют одну-две капли HCl (1 : 1), три—пять капель 5%-ного $BaCl_2$ и нагревают. Примерное содержание SO_4^{2-} -ионов определяют по образующейся мути или осадку, согласно следующим результатам наблюдений:

Характеристика пробы	Концентрация SO_4^{2-} , мг/л
Слабая муть, проявляющаяся через несколько минут	1—10
Слабая муть, проявляющаяся сразу	10—100
Сильная муть	100—500

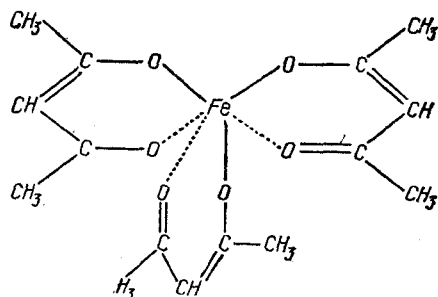
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРЕХВАЛЕНТНОГО ЖЕЛЕЗА В ПОЧВАХ И ПОРОДАХ

Одним из важных критериев окислительно-восстановительных условий почвы и pH является соотношение ферри : ферро. Поэтому исследователю важно знать содержание подвижных форм же-

леза в почве. Американскими авторами введен термин «свободные окиси железа» для всех природных аморфных и кристаллических соединений железа с кислородом и гидроксильным ионом. Существует много методов выделения «свободных окисей железа» из почв (табл. 1). Необходимо отметить, что почти для всех этих методов характерно сохранение возможности природной окисленности железа. После извлечения железа из почв одним из указанных в таблице методов проводят его спектрофотометрическое определение. Существует около 40 различных спектрофотометрических методов определения железа. Наиболее распространенные из них представлены в табл. 2.

Каждый из этих методов имеет свои недостатки. Так, при определении Fe (III) роданидным методом основным недостатком является слабая устойчивость роданидного комплекса железа (константа К нестойкости равна $1,07 \cdot 10^{-3}$). Очень часто при спектрофотометрическом определении Fe приходится устранять мешающее действие разных ионов, особенно Ca, Mg, Mn, Al, которые в большом количестве находятся в почвах и, обладая значительной комплексообразующей способностью, переходят в почвенные вытяжки.

В почвенной микробиологии пользуются ацетилацетоновым методом определения Fe (III) в почвах и породах вследствие его высокой избирательности и достаточной простоты исполнения. Этот метод основан на измерении поглощения ацетилацетоната Fe (III) в видимой области спектра при λ , равной 440 нм. Ацетилацетон является одновременно экстрагентом и индикатором Fe(III). Реагируя с катионами Fe (III), ацетилацетон образует достаточно устойчивые хелатные соединения:



В растворе, который может содержать до 1 г железа, устанавливают рН 1 (для предотвращения гидролиза солей железа) концентрированной HCl (одна-две капли) и встряхивают 3 мин с несколькими порциями 50%-ного раствора (соотношение объемов 1 : 1) ацетилацетона в хлороформе для увеличения процента енольной формы ацетилацетона. За одну экстракцию извлекается приблизительно 96% железа. Повторяют ее дважды. Измеряют светопоглощение экстракта при длине волны 440 нм на спектрофотометре СФ-16 (лампа накаливания).

8 Таблица 1. Способы извлечения свободного железа из почв

Автор метода	Экстрагирующий реагент	Соотношение почва — экстрагент	pH	Режим экстракции	Примечание
Тамм (Jackson, 1958)	Оксалатный буфер $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$	1 : 20 1 : 50	13,2 3,3 (3,9)	Двукратная последовательная обработка почвы оксалатным буфером (30 мин при нагревании и 2 ч на ротаторе при комнатной температуре)	Оглеенные, болотные оподзоленные почвы (аморфные формы железа)
Дроздов (Drosdoff, 1941)	$\text{H}_2\text{S} + \text{H}_2\text{O}_2$ и H_2SO_4	1 : 50	8,0	Пропускание H_2S через почвенную суспензию при 80° С (25 мин). Сульфиды растворяются в H_2O_2 и H_2SO_4	
Дроздов и Труог (Фирсов, 1956)	H_2S	1 : 50	8,0	То же. Образовавшиеся сульфиды растворяются в 0,05 н. HCl при 80—90° С	
Джефрейс (Антипов-Каратаев, 1961)	H_2 ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 + \text{Al}$)	1 : 20	8,0	Кипячение почвенной суспензии с $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ и Al -палочкой в течение 20 мин, добавление H_2O_2 и HCl и кипячение еще 5 мин для растворения сульфидов	Глинистые почвы
Дайон (Dion, 1944)	H_2 (в результате взаимодействия Na и Al)	1 : 20	8,0	Нагревание почвы с водой при 40° С в течение 20 мин с тартратом Na , 15 мин — с Al -палочкой и 3 мин с 0,05 н. HCl (для растворения образовавшихся сульфидов)	

4—5%-ный раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (дигидрит или гидросульфит)	1 : 20	2,9—3,5	Нагревание почвенной суспензии с раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ в течение 30 мин при 40—45° С, затем с 0,02 н. HCl — 5 мин при комнатной температуре	Красноземы, латериты (хорошо окисленные формы Fe)
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0,3 М цитрата $\text{Na} + \text{ЭДТА}$)	1 : 20	7,3	Нагревание навески почвы с 0,3 М раствором цитрата Na (можно с добавлением ЭДТА) при 90° С в течение 5 мин и с 1 г $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ — 10 мин	Определение несликатного железа
4%-ный раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ в 0,3%-ном растворе NaOH	1 : 10	5,8—6,0	Двукратная последовательная обработка почвенной суспензии раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ при 40—45° С в течение 15 мин с промежуточной и конечной обработкой навески 0,05 н. HCl — 3 мин при комнатной температуре	
0,1 н. раствор трилона Б в 1 н. KCl	1 : 10	4,0—4,2	Кипячение почвы с реагентом в течение 3 мин, фильтрование и пятикратное промывание проб на воронке 1 н. KCl	Генетические исследования почв (минералы со слоистым типом решетки)
1 н. H_2SO_4	1 : 10	1,0	1—20 г промывают на воронках 1 н. H_2SO_4 до прекращения в фильтрате реакции на Fe	Изучение сезонной динамики почвообразовательного процесса
0,1 н. H_2SO_4	1 : 10	0,74	Взбалтывание 5 мин	

Агилера и Джексон
(Aguilera, Jackson, 1966)

Митчелл и Маккензи
(Mitchell, Mackenzie, 1964)

Штефанович
(Mehta, Jackson, 1960)

Цюрупа (1961)

Цюрупа (Келлерман, Цюрупа, 1965)

Автор метода	Экстрагирующий реагент	Соотноше- ние поч- ва — экст- рагент	pH	Режим экстракции	Примечание
Кирсанов (Цюрупа, 1961) Морган (Jackson, 1958)	0,2 н. HCl 0,5 М CH_3COOH 0,75М CH_3COOH	1:5 1:10	0,74 4,8	Взбалтывание 5 мин Двукратная последовательная обработка почвы ацетатным буфером в течение 30 мин	Карбонатные почвы
Джексон (Jackson, 1958)	1 н. CH_3COONa 1 н. CH_3COOH	1:10	5,0		» »

Таблица 2. Спектрометрические методы определения железа

Метод	Литература	pH	λ , нм	Формула комп- лекса	Константа нес- тойкости комп- лекса (K)	Мешающие ионы
Роданидный	Сендел, 1964	1	480	$[\text{Fe}(\text{SCN}_6)]^{3-}$	$1,07 \cdot 10^{-3}$	Cu, Bi, Co, Ag, Mn, Zn, Ca, Sb и др., Cl^- , SO_4^{2-}
С салициловой кислотой	Бабко, Пилипенко, 1968	6—11	520	$[\text{FeL}_2]^{2-}$ $[\text{FeL}_3]^{3-}$	$3,55 \cdot 10^{-6}$ $3,02 \cdot 10^{-16}$	Co, Ni, Pb, Bi, Hg (I), U, Ag Au, Cd

Комплексометрический (с трилоном Б)	Пришбил, 1960	366	$[\text{FeHL}]^-$ $[\text{FeL}]^{2-}$	$7,24 \cdot 10^{-6}$ $2,14 \cdot 10^{-14}$	Ca, Mg, Cu, Zn
С о-фенантролином	Булатов, Калинин, 1976	508	$[\text{FeL}_2]^{2+}$ $[\text{FeL}_3]^{3+}$	$7,08 \cdot 10^{-5}$ $3,16 \cdot 10^{-6}$ $2,51 \cdot 10^{-11}$ $3,16 \cdot 10^{-23}$	Al, Mn, Cu, SO_4^{2-} , Cl^-
С 8-оксихинолином	Стары, 1966	470	$[\text{FeL}_2]^{4-}$ $[\text{FeL}_3]^{6-}$	$1,10 \cdot 10^{-15}$ $3,98 \cdot 10^{-23}$	Ca, Mg, Al
С ульфасалициловой кислотой (аммиачный вариант)	Бабко, Пилипенко, 1968	420	$[\text{FeL}_3]^{6-}$	$1,05 \cdot 10^{-15}$ $5,75 \cdot 10^{-25}$	Al, Ca, Mg, Mn (II)
Ацетилацетоновый	Стары, 1966	440	$[\text{FeL}_3]$ $[\text{FeL}_2]^+$ $[\text{FeL}]^{++}$	$6,3 \cdot 10^{-10}$ $1,0 \cdot 10^{-10}$ $1,58 \cdot 10^{-9}$	U, Th, Pu (в количествах)

Для построения калибровочного графика из стандартного раствора железоммонийных квасцов — $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, содержащего 0,05 мг Fe (III) в 1 мл, готовят серию из 10 разведений образцовых растворов, содержащих от 0,5 до 10 мкг/мл. Растворы разбавляют дистиллированной водой и далее проводят все операции, как изложено выше. По полученным значениям оптических плотностей образцовых растворов строят график, по которому находят концентрацию железа в испытуемом растворе и рассчитывают его содержание в почве.

Глава 6

ПОТЕНЦИОМЕТРИЯ

Потенциометрия — метод количественного химического анализа, основанный на измерении электрохимического потенциала. Различают прямую потенциометрию и косвенную — потенциометрическое титрование (Крешков, 1976). Первый метод заключается в измерении абсолютного и точного значения электродного потенциала (точнее электродвижущей силы гальванического элемента), с помощью которого можно установить активность потенциалопределяющего иона в растворе. Потенциометрическое титрование преследует чисто прикладную цель количественного определения данного вещества в растворе путем его титрования стандартным раствором соответствующего реагента.

Связь между электродвижущей силой любого обратимого гальванического элемента и протекающей в нем химической реакцией была установлена в 1886 г. Вант-Гоффом. Дальнейшим развитием теории гальванических цепей явилась теория Нернста о возникновении тока, позволившая разложить э. д. с. элемента на составляющие ее отдельные потенциалы. Первые экспериментальные работы, основанные на теории Вант-Гоффа, были сделаны в лаборатории В. Оствальда, который впервые связал процессы окисления и восстановления с переносом электрических зарядов. Сущность окислительно-восстановительных реакций была раскрыта Л. В. Писсаржевским в 1914 г.

Интенсивное изучение окислительно-восстановительных потенциалов (ОВП) биологических систем началось в 20—30-х годах XX столетия после появления работ Н. И. Некрасова и М. Кларка. ОВП — это потенциал, возникающий на инертном электроде, погруженном в раствор, содержащий окислительно-восстановительные системы. Ввиду того что нет способов определения абсолютного потенциала электрода, определяют потенциал электрода по отношению к нормальному водородному электроду, потенциал которого условно принят за нуль. Этот относительный потенциал обозначают черточкой E_h .

Количественная зависимость между концентрацией (активностью) компонентов обратимой окислительно-восстановительной *Red/Ox* системы и размером электродного потенциала выражается уравнением Нернста:

$$Eh = E_0 + RT/nF \ln a_{Ox}/a_{Red}$$

или

$$Eh = E_0 + RT/nF \ln [Ox]/[Red],$$

где $[Ox]$ и $[Red]$ — концентрации окисленной и восстановленной форм, выраженные в г/ион в литре; E_0 — нормальный потенциал данной системы, определяемый условием $a_{Ox}/a_{Red} = 1$; n — число электронов; R — газовая постоянная; T — абсолютная температура; F — число Фарадея.

В качестве инертного электрода в настоящее время применяют платиновые, платинированные, реже — графитовые электроды. В качестве электродов сравнения — каломельные, хлорсеребряные, хингидронные, т. е. электроды, потенциалы которых по отношению к нормальному водородному электроду известны.

Размер ОВП вычисляют из уравнения:

$$E_{цели} = E_{кал} - Eh$$

(при условии, что каломельный полуэлемент соединен с клеммой «+» потенциометра). Отсюда

$$Eh = E_{кал} - E_{цели}.$$

Если в раствор, содержащий окисленную и восстановленную формы, опустить электрод благородного металла, электрод приобретает потенциал, характерный для данных ионов. Возникновение потенциала у индифферентного платинового электрода в этом случае может быть объяснено следующим. Ионы, находящиеся в растворе, попадая на индифферентный электрод, способны отдавать ему или принимать от него электроны. На поверхности электрода создается двойной электрический слой, и индифферентный электрод при этом заряжается положительно или отрицательно. Если окисленная форма вещества получает от индифферентного электрода электроны, то электрод при этом заряжается положительно относительно водородного электрода (так, $F^{3+} \rightarrow F^{2+}$, $S^{3+} \rightarrow S^{2+}$). Если электрод поместить в раствор, содержащий ионы Cr^{3+} , Cr^{2+} , то восстановленная форма вещества (ионы Cr^{2+}) передаст электроны платиновому электроду, окисляясь при этом до Cr^{3+} , электрод приобретает относительно водородного электрода отрицательный заряд. В зависимости от интенсивности процесса отдачи и приема электронов индифферентным электродом последний заряжается до большего или меньшего потенциала.

Каждая окислительно-восстановительная система характеризуется определенным значением потенциала, который возникает на электроде из индифферентного металла, погруженного в раствор,

содержащий окисленную и восстановленную формы вещества. Размер окислительно-восстановительного потенциала зависит не только от установления термодинамического равновесия между электродом и раствором, но и от состояния равновесия раствор — твердая фаза (минералы почв, илов и пород). В гетерогенных системах указанное равновесие в приэлектродном слое устанавливается довольно медленно: в силу структурной и текстурной неоднородности различные участки системы могут иметь разные E_h , а также разные условия диффузии. Скорость установления потенциала зависит от ряда факторов: от окислительно-восстановительной емкости среды и электродов, от материала, от формы и размеров электродов, от проникновения кислорода воздуха под кристаллическую решетку платины.

При измерении E_h окисленных систем потенциал устанавливается быстро (Фрумкин и др., 1952). Особые сложности встречаются при измерении ОВП систем, находящихся в восстановленном состоянии. Для различных природных объектов продолжительность установления потенциала в восстановленных средах различна: в природных водах — 4 ч (E_h равно 400 мВ); в донных осадках — 2—3 ч (ZoBell, 1946); в почвах — до 15—18 ч (E_h равно 350—600 мВ); в породах — 7—15 сут (Соломин, 1964). С целью ускорения установления потенциалов в системах и устранения расхождения в потенциалах отдельных электродов был и предложен ряд способов специальной их обработки: хранение в 20%-ном растворе NaOH и промывание раствором HCl и морской водой перед употреблением; погружение в горячую HNO_3 и промывание водой; хранение в 12%-ном растворе NaOH, попеременная промывка 40%-ным раствором NaOH и 40%-ной H_2SO_4 , промывка дистиллированной водой перед работой; выдерживание в растворах восстановителей; насыщение водородом — H_2 (12 ч в разбавленной серной кислоте); разноименная поляризация; отжиг в водороде; ограниченная катодная поляризация и другие (Соломин, 1959; Фрейман, Макаров, Брыскин, 1972).

При измерении ОВП в природных средах существуют трудности, вызванные неравновесностью этих систем по отношению к воздуху. Почти невозможно ввести в систему электрод и при этом воспрепятствовать проникновению туда воздуха. Для того чтобы избежать влияния кислорода воздуха при определении ОВП почв, были предложены различные конструкции специальных пробоотборников и устройств для введения электродов в почву: так называемый колумбийский прут и специальный зонд Старки и Уайта, который раскрывался после введения в почву (Starkey, White, 1945) шупа Вайнбаума (Захарьевский, 1944) и другие.

Следовательно, при соблюдении необходимых мер по изоляции измеряемой системы от кислорода воздуха при измерении ОВП, при правильной подготовке электродов (ограниченная катодная поляризация), пользуясь потенциометрическим методом, можно получать достаточно надежные и воспроизводимые результаты измерений.

Потенциометрический метод по сравнению с другими методами

измерения окислительно-восстановительных потенциалов (колориметрическим, полярографическим, методом поляризационных кривых) обладает многими преимуществами. Потенциометрическим методом можно производить измерение ОВП в любых средах (включая, например, сложные производственные среды, бактериальные культуры и т. п.), состав которых неизвестен. Метод также позволяет осуществлять непрерывные измерения без отбора проб, что особенно важно при изучении биологических процессов, и проводить дистанционные измерения. Отличается относительной простотой измерений по сравнению с полярографическим методом и методом поляризационных кривых, а также более высокой точностью и более широким диапазоном измерений, чем колориметрический метод. Относительная простота измерений дает возможность исследовать необходимые системы непосредственно в природных условиях (созданы портативные приборы).

ИЗМЕРЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА (ОВП) ПОЧВ

Почва — сложная гетерогенная неравновесная система, состоящая из трех фаз — твердой, жидкой и газообразной. Окислительно-восстановительное (ОВ) состояние ее определяется, в основном, жизнедеятельностью микроорганизмов и высших растений и связано с восстановлением кислорода органическими веществами в присутствии ферментов. Эти изменения сопровождаются восстановлением некоторых минеральных акцепторов электронов по мере истощения кислорода: Fe^{3+} , Mn^{4+} , N^{5+} , S^{6+} . Следовательно, общая направленность процессов в почве, напряженность окислительно-восстановительного взаимодействия и размер ОВП почв зависят от интенсивности развития в почве биологических процессов и концентрации O_2 в почве. В нормально аэрируемой почве ОВП варьирует в пределах 500—650 мВ.

Согласно М. М. Кононовой (1963), ОВП является чувствительным индикатором биохимических процессов почвы. Характерной особенностью почвенных условий является необратимость большинства реакций окисления-восстановления органических веществ, хотя в процессе дыхания ферменты могут облегчить перенос электронов и в результате происходит приближение к равновесным условиям. Перенос электронов в почве происходит от донора — органического вещества почвы — к акцептору электронов — O_2 , а в анаэробных системах, когда диффузия кислорода ограничена, акцепторами электронов являются соединения Fe^{3+} , Mn^{4+} , N^{5+} , S^{6+} и H_2O .

Известно, что почвы обладают буферностью в отношении рН, что обусловлено обязательным присутствием в почве хотя бы одной обратимой ОВ системы ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ или $\text{Mn}^{4+}/\text{Mn}^{2+}$). Кроме того, почва должна обладать достаточной емкостью по ОВП, т. е. концентрация веществ, образующих окислительно-восстановительную

По некоторым данным (Breeten, 1969), соотношение ферри : ферро является определяющим для ОВП почвы. Железо в почвенных условиях легко образует как двух-, так и трехвалентные соединения. Это обусловлено тем, что нормальный потенциал системы Fe^{3+}/Fe^{2+} равен 0,77 В, т. е. близок к значению реальных почвенных условий.

Изменение рН и наличие комплексобразования в почвах может резко изменить соотношение Fe^{3+}/Fe^{2+} даже при высоких значениях Eh . Перепад потенциалов от 350 мВ до 450 мВ служит обычно показателем зоны, в которой совершаются переходы $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$.

Влияние влажности почв на ОВП заключается в том, что кривые изменения ОВП являются зеркальным отражением кривых влаж-

Таблица 3. Влияние ОВП на равновесие потенциалопределяющих систем в почве при рН, равном 6 (по Sh. Aomine, 1962 и W. Patric, 1961)

Система элемента	Содержание элемента в почве %	Окислительно-восстановительный потенциал, мВ									
		Окислительные условия (аэробные процессы)					Восстановительные условия (анаэробные процессы)				
		750	600	500	480	340	300	200	0	-150	-200
O_2	18,0	O_2 исчезает					O_2 отсутствует				
N_2	0,4—0,02	Нитраты NO_3^-					Восстановление нитратов- $NO_3^- \rightarrow NO_2^-$				
Mn	0,1	Mn^{4+} , MnO_2 (пиролонзит)					Восстановление $Mn^{4+} \rightarrow$ $\rightarrow Mn^{3+} \rightarrow$ $\rightarrow Mn^{2+}$ $Fe^{3+} \rightarrow$ $\rightarrow Fe^{2+}$				
Fe	10—0,5	Fe^{3+}					Fe^{2+} , FeS, $FeCO_3$				
S	2,0—0,01	Сульфаты SO_4^{2-}					Сульфиды S^{2-}				

ности, в особенности в верхней части горизонта (Aomine, 1962; Сердобольский, 1965). В связи с сильной зависимостью ОВП почв от влажности в качестве физико-химической характеристики почв были предложены профильные кривые ОВП (Благовидов и др., 1957; Сель-Бекман и др., 1960). По мнению авторов, они различны для почв разного генезиса и являются характерными (или специфичными) для каждой данной почвы. Профильные кривые, полученные для почв с переменным водным режимом, позволяют судить о развитии восстановительных процессов в тех случаях, когда на основании морфологических наблюдений установить проявление этих процессов еще невозможно.

Высокая влажность почв является одним из неперенных обстоятельств, обеспечивающих анаэробные условия в почве. Развитие восстановительных процессов наблюдается при значениях gH_2 от

22 до 25 *. Рубежом перехода от аэробных процессов к анаэробным считается значение gH_2 , равное 27. В хорошо аэрируемых почвах gH_2 обычно принимает значения от 28 до 34 (окислительные условия), в оглеенных почвах значение gH_2 меньше 20 (Сердобольский, 1965).

Характер изменений ОВП почв зависит не только от динамики жидкой и газообразной фаз и температуры, но и от свойств, химического состава твердой фазы почв (табл. 3), специфики ее микрофлоры. В связи с этим измерение ОВП почвы должно сопровождаться химическими и микробиологическими анализами. Как осуществляется измерение ОВП почв, какие существуют конструкции раз-

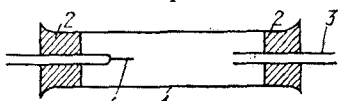


Рис. 20. Сосуд Кузнецова и Романенко для определения gH_2 в донных отложениях водоемов:

1 — стеклянная трубка, 2 — резиновые пробки, 3 — трубочка для отвода воздуха и части проб, 4 — платиновый электрод.

личного рода электродов и потенциометров, подробно описано в ряде руководств (Оксредметрия, 1975; Орлов, 1975; Лайтинен, Харрис, 1979; Физико-химические методы исследования почв, 1980, и др.).

При определении gH_2 в почвах можно использовать специальный сосуд Кузнецова и Романенко, предложенный для изучения окислительно-восстановительного потенциала донных отложений водоемов. Сосуд состоит (рис. 20) из стеклянной трубки диаметром 8—10 см, оба конца которой закрыты резиновыми пробками, причем в одну из них вставлена стеклянная трубка с впаянным в нее платиновым электродом, а в другую — стеклянная трубочка диаметром 2—3 мм. Перед использованием сосуда пробку 2 с электродом 4 следует вынуть и трубку заполнить исследуемым образцом до пробки 2 на противоположном конце. Образцы можно отбирать шупом соответствующего диаметра. Затем пробку 2 вынуть и вставить пробку 2 с платиновым электродом. При этом испытуемый образец несколько продвинется к противоположному концу трубки, который следует закрыть пробкой 2 так, чтобы между нею и испытуемым образцом не оставалось пузырьков воздуха. Избыток материала при этом выступает через трубку 3 в пробке и служит для контакта с электродом и соединительным сосудом с насыщенным раствором KCl.

А. Г. Родина (1965) предлагает помещать отобранную колонку в специальный пенал из органического стекла с таким же диаметром, как у прибора для отбора проб. Через специальные отверстия в крышке пенала в монолит следует ввести несколько платиновых электродов и один палочковидный каломельный электрод конструкции Крюкова (1955). После 15-минутной выдержки первый платиновый и каломельный электроды подключают к потенциометру и производят измерения. Так же поступают со вторым, третьим и

* gH_2 — отрицательный логарифм парциального давления газообразного водорода. Показатель введен М. Кларком в 1923 г. Несмотря на то, что эта величина не имеет строгого физического смысла, биологи пользуются ею для характеристики аэробности среды.

остальными платиновыми электродами. Измерения необходимо повторить через 1,5—2,0 ч. К этому времени потенциал приобретает устойчивость. Для вычисления E_h грунтов необходимо измерить их температуру, а для расчета pH_2 — предварительно определить значение pH , опустив стеклянный электрод в исследуемый образец.

Глава 7

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ

Метод потенциометрического титрования используют для количественного определения данного вещества в растворе путем его титрования стандартным раствором соответствующего реагента. При потенциометрическом титровании необходимо иметь в исследуемом растворе два электрода. Один из электродов указывает на концентрацию титруемого иона; этот электрод называется индикаторным. Другой электрод, являющийся индифферентным по отношению к титруемым ионам, служит только для определения потенциала первого электрода; этот электрод называется электродом сравнения.

Титрованием называется постепенное прибавление какого-либо реагента в раствор исследуемого вещества и изучение идущей при этом реакции путем измерения физической величины, зависящей от степени полноты реакции. Метод титрования используется для определения значений констант диссоциации и количества кислотных или основных групп, для оценки включения ионогенных групп в различные внутримолекулярные структуры и решения других задач.

Одним из вариантов титрования является потенциометрическое титрование — изучение зависимости ионизации молекул от концентрации водородных ионов в растворе. Всякая молекула, содержащая ионизационную группу, диссоциирует:



Если рассматриваемая группа кислотная, то состояние HR соответствует незаряженной группе, а состояние R — заряженной отрицательно. Если группа основная, то незаряженным является состояние R , а состояние HR отвечает положительно заряженной группе.

Размер константы диссоциации K (или pK) определяет способность электролита к диссоциации в водном растворе. При растворении в воде кислоты pH раствора уменьшается (концентрация водородных ионов возрастает). Ионизация a слабой кислоты в воде $a = \sqrt{\frac{K}{C}}$, где C — концентрация кислоты, моль/л. Кислота тем сильнее диссоциирует в воде, чем больше ее константа диссоциации или

меньше рН раствора. Истинная константа диссоциации K получается из K^1 (кажущейся константы диссоциации) экстраполяцией к нулевым ионным силам. Отличие между pK и pK' для одноосновных электролитов невелико даже при больших ионных силах и составляет 0,1—0,2 единицы рН; им пренебрегают при сравнительных исследованиях.

Процесс титрования раствора слабой кислоты (основания) сильным основанием (кислотой) можно описать уравнением

$$pH = pK \pm \lg \frac{\alpha}{1-\alpha},$$

где знаки $\pm$ относятся соответственно к кислоте и основанию; α — критерий ионизации, соответствующий соотношению $\frac{[R]}{[R] + [HR]}$

в случае кислоты и $\frac{[HR]}{[R] + [HR]}$ в случае основания. При этом критерий ионизации определяется отношением числа молей (x) добавленного в раствор сильного электролита к числу содержащихся в растворе молей титруемого электролита (C), т. е. $\alpha = \frac{x}{C}$.

Таким образом, при добавлении сильного основания к раствору слабой кислоты (т. е. при росте x) способность кислоты к диссоциации возрастает и одновременно возрастает рН, т. е. убывает концентрация водородных ионов в растворе.

Следовательно, кривые титрования одноосновных и многоосновных кислот, если все группы различны, имеют одинаковую форму и сдвинуты лишь по шкале рН в соответствии со значением pK .

Если молекула содержит как кислотные, так и основные группы, то при некотором значении рН число заряженных кислотных групп становится равным числу заряженных основных групп, так что молекула в целом становится электрически нейтральной.

Кривые титрования полиэлектролитов отличаются от кривых титрования одноосновных электролитов тем, что при ионизации каждой группы молекулы полиэлектролита совершается дополнительная работа за счет сил электростатического взаимодействия с другими ионизованными группами молекулы. Соответственно константа диссоциации оказывается зависящей от степени ионизации, убывая (для кислых групп) с ростом ионизации.

Электростатические взаимодействия в молекулах полиэлектролитов обуславливают, во-первых, сдвиг кривых титрования за счет изменения состояния ионизации групп одного типа на общем фоне полностью заряженных или полностью незаряженных остальных групп, во-вторых, «уширение» кривых титрования.

Титрование можно проводить двояким способом: непрерывно, когда измеряется сдвиг рН в одном и том же растворе при добавлении в него кислоты или щелочи, или путем измерения рН в серии растворов, к которым заранее было добавлено разное количество кислоты или щелочи. Для растворимых веществ пригоден первый способ, для нерастворимых — второй.

При потенциометрическом титровании могут быть использованы реакции нейтрализации, осаждения, комплекссообразования, окисления — восстановления и применены почти все стандартные растворы, которые известны для визуальных титрометрических методов анализа; используют те же типы электродов и конструкции потенциометров, что и при методе прямой потенциометрии.

Потенциометрическое титрование имеет преимущества по сравнению с визуальными титрометрическими методами анализа: более чувствительно, исключает субъективную ошибку в определении конечной точки титрования, дает возможность определять вещества в мутных и сильно окрашенных растворах, разделять титровать компоненты смеси веществ в одной и той же порции раствора и, наконец, автоматизировать процесс титрования.

Метод потенциометрического титрования находит широкое применение при изучении биохимических свойств биополимеров различного происхождения.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

Гуминовые кислоты почв, торфов, бурых углей, представляющие собой органические полиоксикарбоновые кислоты, могут быть отнесены к биополимерам и могут быть изучены электрохимическими методами. Электрохимические свойства гуминовых кислот изучались как советскими (Гороховский, Максютова, 1957; Орлов, Нестеренко, 1960; Агапов, 1966), так и зарубежными (van Dijk, 1960; Khanna, Stevenson, 1962) учеными. Эти исследования были направлены на изучение основности кислот, их диссоциации, кислотности, определение константы диссоциации и молекулярной массы.

Мы определяли эквивалентную массу и константу диссоциации гумусовых кислот на основании данных потенциометрического титрования в водных и неводных средах (Глушенко, 1971). Метод потенциометрического титрования в неводных средах был применен впервые для этих объектов.

Пользовались потенциометрами ЛПУ-01 и ЛПМ-60-М. Исследовали гуминовые кислоты, гематомелановые и фульвокислоты из почв, торфов и углей, пересаживаемые и тщательно диализованные для уменьшения зольности.

Растворы препаратов готовили следующим образом: навеску растворяли в смеси 0,1 н. КОН и 0,1 н. KCl (рН 6,5), затем раствор доводили до рН 3—4 0,01 н. HCl и объем раствора до 100 мл доводили 0,1 н. KCl. Титровали гумусовые кислоты в атмосфере азота растворами, концентрация которых составляла 1 мг/мл, ионная сила — 0,2 в трех- или четырехкратной повторности при температуре 20° С; объем титруемого раствора — 10 мл.

При титровании гумусовых кислот щелочью происходит постепенное изменение потенциала, а в точке, называемой концом титрования, когда все ионы H^+ связаны, происходит резкий скачок

потенциала, который хорошо виден на кривых зависимости потенциал — концентрация и дифференциальных кривых, где четкие максимумы отвечают точкам эквивалентности. По этим точкам рассчитывали эквивалентную массу гуминовых, фульво- и гиматомелановых кислот: $\mathcal{E}_{\text{к-ты}} = \frac{g}{n}$, где g — навеска, г; n — n моль кислоты, который равен n молям щелочи, вычисленным по кривым титрования $n_{\text{щелочи}} = \frac{V_{\text{щ}} N_{\text{щ}}}{1000}$ n моль. Молекулярная масса гумусовых кис-

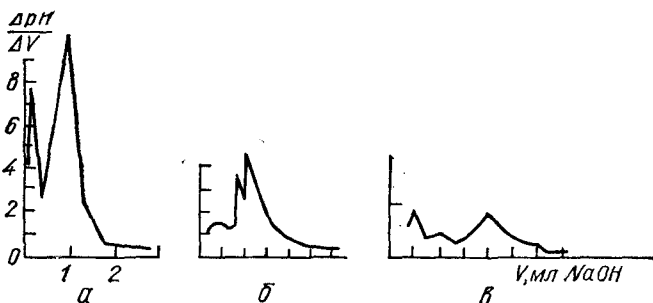


Рис. 21. Дифференциальные кривые титрования различных кислот:

а — гуминовая и б — гиматомелановая кислоты сумского торфа,
в — гуминовая кислота коростышевского угля.

лот рассчитывается, исходя из данных эквивалентной массы и количества основных групп, найденных на графике.

Кривые титрования гуминовых кислот, например торфов, имеют характер двухосновных слабых кислот, что особенно хорошо видно на дифференциальной кривой. Первый пик в кислой области соответствует сильной группе COOH , а второй пик в щелочной области — фенольному гидроксилу, который в щелочной среде проявляет слабокислотные свойства. Фульво- и гиматомелановые кислоты — трехосновные кислоты, дают на дифференциальных кривых три скачка потенциала, что соответствует двум карбоксильным и одной гидроксильной группам (рис. 21).

Кривые титрования гуминовых кислот бурых углей имеют характер слабых многоосновных кислот, т. е. скачок pH на кривой становится мало заметным, а при pK , равном 9, скачок исчезает совсем и уловить его можно только на дифференциальных кривых. Кривые титрования гиматомелановых кислот близки по характеру к кривым титрования гуминовых кислот.

Гумусовые кислоты, как многоосновные кислоты, диссоциируют в разбавленных растворах ступенчато, из-за неоднородности функциональных групп. Соответственно нейтрализация этих кислот протекает также ступенчато, в связи с чем кривые титрования гумусовых кислот имеют несколько точек эквивалентности. Первая точка отвечает образованию однозамещенной кислой соли, вторая — двухзамещенной и т. д. Зная положение каждой точки эквивалентности,

т. е. рН каждой точки на кривой титрования, можно определить константу диссоциации каждой ступени по уравнению Гендерсона — Хассельбаха.

Первая константа диссоциации для гуминовых, гиматомелановых кислот и фульвокислот торфов и других почв, лежащая в области значений 1—5, относится к карбоксильным группам COOH^- , вторая и третья константы, лежащие в области значений 8—10, относятся к слабокислотным группам, которыми являются фенольные гидроксилы.

Для титрования замаскированных функциональных групп применяют титрование кислот в неводных растворах. При этом создаются такие условия, при которых слабые кислотные группы проявляют себя как сильные и легко оттитровываются сильными щелочами.

Гуминовые кислоты растворяли в диметилформамиде, добавляли смесь растворителей (ацетон и третичный спирт) и вели титрование 0,05—0,1 н. раствором КОН в бензольно-метаноловом растворе. Гуминовые кислоты торфов при неводном титровании проявляют трехосновность, а гуминовые кислоты бурых углей — шестиосновность. Метод потенциометрического титрования может быть применен и для исследования трансформации гуминовых кислот микроорганизмами.

Глава 8

ПОЛЯРОГРАФИЯ

Полярографический метод был предложен в 1922 г. чешским ученым Я. Гейровским. В основе этого метода лежат явления, происходящие на ртутном (капельном) катоде, а название связано с процессами поляризации, возникающими при пропускании электрического тока через растворы электролитов. Различают поляризацию электрохимическую и концентрационную. Первая связана с возникновением разности потенциалов между погруженными в раствор индифферентными электродами под влиянием процесса электролиза, вторая — с появлением в растворе дополнительной разности потенциалов на поверхности раздела растворов разных концентраций или на поверхности приэлектродного слоя в связи с его обеднением. Значение концентрационной поляризации зависит от плотности проходящего тока. При малой скорости тока скорость диффузии ионов достаточно велика для пополнения приэлектродного слоя. В этом случае концентрация приэлектродного слоя будет оставаться равной концентрации во всем объеме раствора — концентрационная диффузия будет отсутствовать. По мере увеличения плотности тока выделение вещества на электроде увеличивается и

приэлектродный слой не успевает пополняться за счет диффузии — возникает концентрационная поляризация. При дальнейшем повышении плотности тока концентрация приэлектродного слоя становится равной нулю, т. е. все ионы, поступающие в приэлектродный слой, моментально разряжаются на электроде. С этого момента дальнейшее повышение плотности тока перестает влиять на величину концентрационной поляризации. Эта плотность тока называется предельной плотностью тока данного иона.

Для поляризационного анализа применяют специальные приборы — полярографы. В зависимости от различных приспособлений приборы делятся на визуальные, с фотографической записью полярографических волн, самопишущие и осциллографические.

При качественном полярографическом анализе снимают полярограмму, т. е. определяют вольт-амперную кривую в интервале от нуля до 2 В. В этом интервале происходит восстановление почти всех катионов. Вычислив потенциалы полуволн и пользуясь таблицами или спектрами, можно определить природу восстанавливающихся ионов (Бабко, Пилипенко, 1968). В основе полярографического количественного определения лежит зависимость силы тока от концентрации вещества. При диффузионных процессах иногда эта зависимость имеет пропорциональный характер:

$$I = KC,$$

где I — сила тока, мкА, K — константа пропорциональности, зависящая от характеристики капилляра (периода капания и массы вытекающей ртути) и диффузионного коэффициента, C — концентрация определяемого иона, ммоль/л.

Для определения концентрации восстанавливающегося иона применяют способ калибровочных кривых. Метод калибровочных графиков не требует соблюдения прямой пропорциональности и может быть применен в сравнительно широком интервале концентраций. Однако следует соблюдать условия строгой стандартизации проведения измерений, а в случае изменения условий определения необходимо строить новый график.

К явлениям, искажающим полярограммы и затрудняющим полярографирование, относятся:

пропускание через ячейку конденсаторного тока (его возникновение даже в отсутствие восстанавливающихся на катоде веществ связано с тем, что некоторое количество электричества расходуется на заряджение двойного электрического слоя поверхности каждой отрывающейся капли ртути; чем больше потенциал, тем больше сила конденсаторного тока, а полярограммы получаются нечеткими);

присутствие кислорода в растворах (имея потенциал полуволны $E_{1/2} = 0,2$ В, кислород восстанавливается значительно раньше многих других катионов, мешая их определению; его удаляют из растворов длительным продуванием азота или водорода);

присутствие в растворах других катионов (их выводят из раст-

воров путем осаждения, связывания в комплекс или другим способом);

возникновение максимумов на полярографических кривых (причиной их возникновения является движение поверхности ртутной капли, которое вызывается дополнительным перемешиванием раствора; это движение увеличивает доставку восстанавливаемого вещества к катоду, а следовательно, увеличивает силу диффузного тока).

Полярографический анализ подробно описан в руководстве «Физико-химические методы исследования почв» (1980). Там же приведена характеристика нескольких конструкций полярографов: ЛП-60, ЛП-7Е, ЦЛА и ППТ-1. Из новейших широко применяющихся приборов с автоматической записью можно также назвать чехословацкие полярографы LP-55, LP-55A. Советский полярограф СГМ-8 снабжен визуальной шкалой длиной 40 см. Поэтому в отличие от полярографа LP-55 на нем можно проводить автоматические и визуальные записи полярограмм.

К автоматическим полярографам относятся и электронные интегро-дифференцирующие полярографы типа 7-77-4 (Венгрия), ЭП-312 (СССР) и LP-60 (Чехословакия). Эти приборы снабжены электронным усилителем и отличаются от автофоторегистрирующих полярографов отсутствием зеркального гальванометра и нечувствительностью к механическим сотрясениям.

Очень удачной конструкцией интегро-дифференциального полярографа является поляриметр РО-4 датской фирмы «Радиометр». Прибор отличается слаженностью работы механизмов и тремя скоростями записи полярограмм. Чувствительность прибора разделена на мелкие диапазоны, что важно при работе с белками. Максимальная чувствительность прибора $8 \cdot 10^{-11}$ А/мм и записи волн ведутся в области напряжения от +0,5 до -3,0 В. Прибор прост в обращении и отличается хорошей воспроизводимостью результатов. Поляриметр РО-4 снабжен блоком для работы со стандартной каплей ртути.

Из современных полярографов самой высокой чувствительностью при работе с обычными капиллярами обладает импульсный полярограф Баркера английской фирмы «Саузерн аналитикал лимитед». Этот прибор является усовершенствованной моделью полярографа прямоугольных волн, в котором на каплю ртути накладывается прямоугольное напряжение. В импульсном полярографе кроме постоянного напряжения предусмотрен механизм для наложения прямоугольного напряжения к концу «жизни» капли ртути — так называемые импульсы. Импульсы подаются через 2 с после отрыва предыдущей капли. Таким путем наложение напряжения происходит на определенную, периодически точно повторяющуюся поверхность ртутной капли, что повышает воспроизводимость результатов. Подача импульсов синхронизируется периодом каплеобразования с помощью специального устройства (регулятора капли). Период каплеобразования составляет 3—6 с. Амплитуда

импульсов равна 7 и 35 мВ: при работе с импульсами в 7 мВ разрешающая способность записи полярোগрамм в смеси веществ выше, чем при работе с импульсами в 35 мВ. Одинаковые волны можно различить на протяжении импульсов в 40 мВ, но чувствительность снижается в пять раз. Длительность импульса равна 40 мс.

С помощью импульсного поляроеграфа определяют концентрации обратимо и необратимо восстанавливающихся ионов в пределах $4 \cdot 10^{-8}$ М и $5 \cdot 10^{-8}$ М соответственно. Применяют индифферентный электролит, который в 10—100 раз более разведен, чем в обычной поляроеграфии. Импульсные поляроеграфы имеют некоторые технические преимущества по сравнению с обычными поляроеграфами. Они содержат вмонтированное устройство (электролизер) для электролитического получения водорода, необходимого для вытеснения кислорода из ячейки. Устройство снабжено термостатируемой ванной и механизмом, с помощью которого подымается капилляр.

Метод поляроеграфии с успехом используется при исследовании структуры и функции ферментов, коферментов, акцепторов, субстратов, ингибиторов, фермент-субстратных комплексов, влияния малых ионов на конформацию молекул биополимеров, процессов термической и лучевой денатурации и комплексообразующих свойств биополимеров (Майрановский и др. 1975; Иванов, Рахлеева, 1968; Шевченко, Городынский, 1964; Ляликов, 1974 и др.). Этот метод стали применять и в почвоведении с целью изучения минеральных и органических компонентов почв, их структур, свойств и т. д. (Воробьева, Орлов, 1972).

Поляроеграфию успешно сочетают с применяющимися при исследовании белков и аминокислот методами хроматографии и электрофореза. Установлено преимущество осциллополяроеграфии по отношению к спектрофотометрии, заключающееся в возможности обнаружения некоторых производных пуринов и пиримидинов в смеси с помощью определенного электролита.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

Поляроеграфический метод применяли при исследовании взаимодействий металлов с гуминовыми кислотами почв, бурых углей и торфов.

Использован был чешский поляроеграф LP-60.

При исследовании комплексообразования поляроеграфическим методом используют следующую формулу:

$$E_{1/2} = E + \left(\frac{0,058}{n} \lg K_n - p \frac{0,058}{n} \lg C_x \right),$$

где $E_{1/2}$ — потенциал полуволны комплексного соединения металла, E — потенциал электрода, n — число электронов, 0,058 — обратная величина углового коэффициента для одноэлектронной электрохимической реакции, K_n — константа нестойкости комплекс-

ного иона, p — координационное число, C_x — концентрация анионов комплексообразующего реагента.

Для экспериментального определения числа p готовили серию растворов с постоянной концентрацией соли металла и переменной концентрацией комплексообразующего реагента; во всех этих растворах концентрация C_x должна быть значительно больше общей концентрации катиона металла. Затем полярографировали растворы и вычерчивали полярографические волны. По полярограммам измеряли потенциалы полуволн комплекса при различных концентрациях комплексообразующего реагента. Используя измеренные значения $E_{1/2}$, вычисляли константы нестойкости комплексного соединения. При ступенчатом комплексообразовании для вычисления констант диссоциации и определения состава комплексов можно пользоваться методом Дефорда и Юма, которые установили, что функция Фронеуса или, как ее еще называют, закомплексованность связана со смещением потенциала полуволны уравнением

$$\lg \Phi = 0,435 \frac{nE}{RT} \Delta E_{1/2},$$

где E — число Фарадея, R — универсальная газовая постоянная, Φ — закомплексованность, T — абсолютная температура.

Подставив постоянные величины, получим уравнение

$$\lg \Phi = 17,0n\Delta E_{1/2}.$$

Это уравнение дает возможность вычислить закомплексованность, используя значение $E_{1/2}$. Зная закомплексованность Φ , можно определить число p , а затем константу нестойкости по уравнению полярографической волны.

Глава 9

ХРОМАТОГРАФИЯ НА БУМАГЕ

Хроматографический метод, предложенный русским ученым М. С. Цветом в 1903 г., основан на использовании сорбционных процессов в динамических условиях. Главная особенность метода заключается в том, что при движении хроматографируемой смеси через сорбент происходит многократное повторение процессов, обуславливающих разделение компонентов смеси. В настоящее время имеется несколько разновидностей хроматографического метода, различающихся по агрегатному состоянию системы, в которой проводится разделение смеси на компоненты (газовая, жидкостная и газо-жидкостная хроматографии), механизму разделения (адсорбционная, распределительная, ионнообменная, осадочная, окислительно-восстановительная, адсорбционно-комплексобразовательная хроматографии) и форме проведения процесса (колоночная,

капиллярная, плоскостная хроматографии). В некоторых случаях разделение оказывается результатом одновременно протекающих процессов с различными механизмами. Это приводит к образованию хроматограммы смешанного типа, однако один из процессов всегда является доминирующим.

Важным преимуществом хроматографического метода перед другими методами разделения веществ является то, что при его применении вещества не подвергаются химическим изменениям. Метод широко применяется в биохимии, физиологии и микробиологии, давая возможность разделять и анализировать сложные смеси веществ, очищать вещества от примесей, концентрировать и идентифицировать их, требуя очень мало веществ — десятки доли миллиграмма и даже микрограмма.

В биологических исследованиях наиболее часто применяется относительно простая распределительная хроматография, основанная на распределении растворенных веществ между двумя несмешивающимися растворителями. Следовательно, в распределительной хроматографии используются различия в коэффициенте распределения хроматографируемых веществ между двумя несмешивающимися жидкими фазами: подвижным и неподвижным растворителями. Различие коэффициентов распределения определяет неодинаковую скорость движения компонентов смеси, поэтому в конечном итоге образуется хроматограмма, состоящая из отдельных зон компонентов смеси.

Бумажная хроматография является разновидностью распределительной хроматографии, в которой в качестве носителя неподвижной фазы применяется бумага. Согласно общим сведениям о распределительной хроматографии на бумаге, в герметически закрытой хроматографической камере присутствуют три фазы: движущаяся жидкая, стационарная на поверхности целлюлозных волокон и паровая, которая может находиться (но не всегда) в равновесии с жидкой. Скорость миграции движущейся жидкой фазы зависит главным образом от физических свойств растворителя. Большое значение имеют вязкость, поверхностное натяжение и плотность жидкой фазы, т. е. свойства, зависящие от температуры. Скорость миграции зависит также от размера пор бумаги. Среда, имеющая очень узкие каналы, или капилляры, с большей силой «присасывает» жидкость, чем среда, в которой преобладают широкие каналы. Бумага в распределительной хроматографии должна быть инертной по отношению к хроматографируемым веществам и подвижному растворителю. В зависимости от способа разделения веществ различают следующие распределительные хроматограммы на бумаге: одномерные и двумерные (восходящие и нисходящие), круговые и электрофоретические.

Нанесенные на бумагу хроматографируемые вещества переходят в подвижную фазу и, перемещаясь с различной скоростью по капиллярам бумаги, разделяются, концентрируясь в различных участках. Для количественной оценки способности разделения ве-

ществ на бумаге введен коэффициент R_f , представляющий отношение значения смещения зоны вещества x к значению смещения фронта растворителя x_1 :

$$R_f = \frac{x}{x_1}.$$

Коэффициент R_f и коэффициент распределения K связаны следующим отношением:

$$K = \frac{A_{\text{подв}}}{A_{\text{неподв}}} \left(\frac{1}{R} - 1 \right),$$

где $A_{\text{подв}}$ и $A_{\text{неподв}}$ — соответственно поперечное сечение бумаги, удерживающей подвижный и неподвижный растворители. Исходя из массы абсолютно сухой бумаги и бумаги, пропитанной подвижным растворителем, можно определить отношение $A_{\text{подв}}/A_{\text{неподв}}$.

На значение R_f влияют многие факторы: природа хроматографируемых веществ и растворителей, условия проведения эксперимента и т. д. Однако для веществ, близких по свойствам, при постоянных условиях значение R_f является относительно постоянным и служит показателем, позволяющим идентифицировать, а в ряде случаев и количественно определять, вещества. Коэффициенты R_f разделяемых компонентов должны быть не очень большими и не очень малыми. При больших значениях R_f вещества не успевают разделиться, а при малых — процесс разделения происходит слишком медленно.

В качестве хроматографических камер можно использовать сосуды различных форм и размеров, сделанные из материалов, с которыми растворитель не реагирует. Камеры должны герметически закрываться для того, чтобы в них поддерживалась насыщенная парами растворителя атмосфера, что предотвращает испарение растворителя с листов хроматографической бумаги. Наиболее удобны стеклянные камеры, так как в них можно следить за движением растворителя. Размер, форма и конструкция хроматографических камер зависят от специфики исследования. Для одномерной восходящей хроматографии часто применяют стеклянные колпаки, для нисходящей хроматографии — высокие стеклянные банки с прилифованной стеклянной крышкой, в круговой хроматографии — эксикаторы, кристаллизаторы или чашки Петри. При нисходящей хроматографии подвижный растворитель наливают в хроматографическую кювету или лодочку, представляющую собой трубку из стекла или нержавеющей стали диаметром 2—4 см, запаивающую с двух концов. По всей длине лодочки имеется щель, в которую вставляют бумагу. Полосы бумаги перебрасывают через специальную оправу из стеклянных палочек, которую также вставляют в лодочку.

Для точного нанесения на бумагу исследуемой пробы используют пипетки типа автоматической пипетки Мура и Стейна. Объем пипетки должен быть не более 2—5 мкл. Калибровку пипетки начинают с заполнения ее водой. На маленький кусочек взвешенной

плотной фильтровальной бумаги выдувают содержимое пипетки. Бумагу тотчас же снова взвешивают на крутильных микровесах или аналитических весах. Определение повторяют пять-шесть раз. За истинный объем пипетки принимают среднее арифметическое.

Для более четкого разделения смеси веществ, нанесенной на бумагу, рекомендуется многократное пропускание растворителя. В этом случае после каждого пропускания хроматограммы высушивают в вытяжном шкафу.

Для анализа используют специальную хроматографическую бумагу, чаще всего марки «Ленинградская Б № 2». Более точное количественное разделение веществ на хроматограммах требует предварительного промывания бумаги (для удаления катионов металлов) следующими растворителями: 0,15%-ным раствором 8-оксихинолина, приготовленным на смеси бутанол — уксусная кислота — вода (40 : 5 : 15), и смесью бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). Промывание бумаги проводят в хроматографической камере нисходящим методом. Вначале листы хроматографической бумаги выдерживают 1—2 мин в 0,15%-ном растворе 8-оксихинолина в смеси *n*-бутилового спирта, ледяной уксусной кислоты и воды (40 : 5 : 15). Затем бумагу высушивают на воздухе и помещают в хроматографическую камеру для удаления избытка 8-оксихинолина и полученного комплексного соединения 8-оксихинолина с металлами. С этой целью через бумагу в течение 36—48 ч пропускают смесь *n*-бутилового спирта, уксусной кислоты и воды в соотношении 4 : 1 : 5. Промытую бумагу высушивают на воздухе в вытяжном шкафу.

Для получения хроматограммы на листе бумаги, соответствующем размеру камеры, отмечают карандашом стартовую линию, вдоль которой на расстоянии 2—3 см наносят капли (по 0,01 мл) исследуемой смеси и растворов «свидетелей» («метчиков»). Операцию производят микропипеткой в два-три приема по 2—5 мкл в одно и то же место после высушивания предыдущей капли. Конец подсушенной бумаги, на которую нанесены капли растворов, опускают в кювету с подвижным растворителем так, чтобы пятна исследуемых растворов не были погружены в растворитель. Раствор из кюветы впитывается бумажной полоской и опускается по ней вниз, смывая при этом пятна нанесенных смесей веществ. Дальнейшее движение вниз вызывает разделение пятен на отдельные фракции, движущиеся с различной скоростью соответственно коэффициентам распределения этих фракций между компонентами системы растворителей. Через 18—20 ч бумагу вынимают из камеры, высушивают и опрыскивают раствором вещества, дающего цветную реакцию с пятнами, полученными на бумаге, чаще всего невидимыми. Хроматограмма, в конечном итоге, будет представлять собой полоску бумаги, на которой сверху вниз расположены на различных расстояниях цветные пятна неправильной формы.

Для четкого разделения веществ нужно нанести на хроматографическую бумагу столько анализируемого раствора, чтобы было до-

статочно для появления четкой окраски и при проявлении не была перегруженной хроматограмма. При серийных анализах различных объектов удобно пользоваться следующим практическим приемом: на хроматограмму наносят различные количества анализируемого раствора, начиная от 0,001 мл. Бумагу высушивают в токе теплого воздуха, проявляют красящим раствором и получают шкалу различных концентраций. По интенсивности окрашивания можно довольно точно определить, какое количество раствора нужно для получения качественной хроматограммы. При идентификации веществ, входящих в состав исследуемой смеси, измеряют и сравнивают расстояния, пройденные неизвестными веществами и «метчиками» веществ, которые предполагалось обнаружить в анализируемой смеси.

С целью количественного определения вырезают отдельные пятна, вещества элюируют каким-либо растворителем и определяют их количество с помощью фотоэлектроколориметра или спектрофотометра.

В настоящее время распределительную хроматографию на бумаге широко применяют для разделения аминокислот, аминов, белков, углеводов, алифатических кислот, стероидов, пуринов, фенолов, антибиотиков, витаминов, неорганических соединений и других веществ.

Применение этого метода для хроматографии некоторых биологических объектов (белковых гидролизатов, крови, мочи, экстрактов тканей, почвенных вытяжек и т. д.) описано в ряде руководств (Зайцева, Тюленева, 1958; Пасхина, 1964; Кармолиев, 1971; Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1980). Анализ культур некоторых почвенных микроорганизмов данным методом имеет особенности, связанные в основном с процессом подготовки материала к анализу.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В КУЛЬТУРАХ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

Специфика определения способности клубеньковых бактерий образовывать свободные аминокислоты связана со свойствами данных микроорганизмов продуцировать слизи (Рангелова, Войтенко, 1979). Поэтому особое внимание следует уделять получению из клеток клубеньковых бактерий и их культуральных жидкостей экстрактов свободных аминокислот и подготовке их к дальнейшему хроматографическому разделению.

Культуру *Rhizobium* выращивают на круговых качалках в течение 2—5 сут в конических колбах Эрленмейера вместимостью 500 мл. В зависимости от поставленных задач используют бобовую среду Мазе или синтетические среды. Клетки и культуральную жидкость исследуют отдельно. Их разделяют центрифугированием с охлаждением при $5500/60\text{ с}^{-1}$ в течение 30 мин. Затем клетки два-три раза отмывают фосфатным буфером (рН равно 7,6) по Серенсену.

Часть суспензии отливают в стеклянные бюксы для определения массы сухих клеток, необходимого для последующих пересчетов.

Для лучшего разделения аминокислот на хроматограмме из исследуемого материала необходимо удалить различные органические и неорганические примеси: белки, липиды, нуклеиновые кислоты, углеводы, ионы тяжелых металлов и др. С этой целью анализируемый материал в каждом конкретном случае подвергают соответствующей обработке. При анализе слизистых культур микроорганизмов, таких, как *Rhizobium* и *Pseudomonas*, обязательно удаляют слизь центрифугированием. Окончательную очистку от примесей, мешающих хроматографии, лучше проводить на колонках с ионообменными смолами. Суспензию клеток клубеньковых бактерий подогревают на водяной бане при температуре $+80^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин и оставляют на ночь в термостате при температуре $+55^{\circ}\text{C}$ для извлечения интрацеллюлярных свободных аминокислот. Утром клетки удаляют центрифугированием, а надосадочную жидкость используют для дальнейшего определения свободных аминокислот. Жидкость упаривают до объема 10—20 мл и осаждают белки тремя объемами подкисленного спирта (на 100 мл 96%-ного этанола добавляют несколько капель ледяной уксусной кислоты). Полученный осадок удаляют центрифугированием, а жидкость пропускают через колонки с ионообменной смолой КУ-2 для дальнейшей очистки экстракта аминокислот от сахаров, органических кислот и других примесей. Адсорбированные на катионите КУ-2 аминокислоты после промывания колонки дистиллированной водой, подкисленной 0,01 н. раствором уксусной кислоты, элюируют концентрированным аммиаком. Полученный элюат выпаривают в фарфоровых чашках на водяной бане досуха. Остаток растворяют в 3 мл 10%-ного изопропилового спирта, затем разделяют имеющиеся в растворе аминокислоты хроматографическим методом.

Отделенную от клеток культуральную жидкость обрабатывают следующим образом: 100 мл этой жидкости упаривают до 10—20 мл, осаждают белки 30—50 мл подкисленного спирта и все дальнейшие операции проводят так же, как и при анализе содержимого клеток.

Хроматографическую бумагу режут на полосы шириной 18 см и длиной 65 см. По ширине полосы размечают 5 точек, в которые последовательно автоматической микропипеткой наносят испытуемые экстракты и смеси аминокислот — «свидетелей». Перед нанесением каждой следующей пробы пипетки ополаскивают дистиллированной водой, а затем испытуемым раствором. В каждую хроматографическую камеру помещают две полосы бумаги с нанесенными образцами. При этом можно рекомендовать на каждую из полос бумаги наносить по три одинаковых испытуемых раствора и по две смеси разных аминокислот — «свидетелей». Такой способ нанесения образцов и дальнейшего хроматографического разделения аминокислот в параллельных пробах способствует повышению точности опыта и экономии хроматографической бумаги.

В качестве подвижных растворителей используют высшие спир-

ты — бутиловый, амиловый и их смеси с низшими спиртами — метиловым, этиловым, пропиловым и другими. Значение R_f для аминокислот в высших спиртах можно увеличить добавлением к этим растворителям воды, низших спиртов, муравьиной и уксусной кислот, пиридина и других веществ.

Растворители, наиболее часто используемые для хроматографического разделения аминокислот, следующие:

Смесь *n*-бутилового спирта, уксусной кислоты и воды (4 : 1 : 5). Для этого в мерном цилиндре смешивают 40 мл *n*-бутанола, 10 мл ледяной уксусной кислоты (100%) и 50 мл дистиллированной воды. Смесь переносят в делительную воронку и тщательно встряхивают 1—2 мин. После расслаивания верхний слой используют в качестве подвижного растворителя, а нижний — для насыщения хроматографической камеры.

Смесь *n*-бутилового спирта, уксусной кислоты и воды (40 : 15 : 5). Для ее приготовления смешивают 40 мл *n*-бутанола, 15 мл ледяной уксусной кислоты и 5 мл воды. Смесь используют в качестве подвижного растворителя сразу после приготовления. Если она расслоилась (образовался бутилацетат), то следует заменить новой.

Для разгонки аминокислот применяют оба из указанных выше растворителя, пропуская их последовательно в течение 20 ч каждый.

Высушенные в вытяжном шкафу хроматограммы проявляют 0,5%-ным раствором нингидрина в 95%-ном ацетоне, содержащем 1% уксусной кислоты. Нингидрин рекомендуется перекристаллизовывать. Для этого 10 г препарата растворяют в 50 мл 2 н. HCl и добавляют 1 г активированного древесного угля. Раствор с углем нагревают до кипения и фильтруют через стеклянный фильтр (№ 2 или 3), оставляют для кристаллизации сначала на 4 ч при комнатной температуре, а затем на ночь в холодильнике. Кристаллы собирают на стеклянном фильтре, промывают 1 н. HCl (5 мл), затем высушивают в вакуум-эксикаторе над твердым KOH. Выход нингидрина составляет 90—94%. После испарения ацетона, хроматограммы прогревают 30 мин в термостате, в темноте при температуре +65° С. Из зон проявления пятен вырезают одинаковые участки бумаги, измельчают их, помещают в пробирки и заливают 5 мл метанола, содержащего в 500 мл 75%-ного спирта 0,2 мл насыщенного водного раствора азотнокислой меди. Содержимое пробирок закрывают пробками и тщательно встряхивают для полноты элюции окрашенного комплекса. Экстракцию проводят около 2 ч в темноте при комнатной температуре. Для контроля вырезают разные по размеру неокрашенные участки хроматограммы и обрабатывают так же, как окрашенные.

Интенсивность окраски измеряют с помощью фотоэлектроколориметра и зеленого светофильтра. Содержание аминокислот определяют по калибровочным графикам. Для построения калибровочных графиков готовят 0,01 М растворы аминокислот, содержащие в 1 мкл 0,01 мкМ каждой аминокислоты. Препараты аминокислот предварительно высушивают в течение 48 ч в вакуум-эксикаторе над

серной кислотой. Один стандартный раствор может содержать несколько аминокислот, что приближает условия построения калибровочных графиков к условиям анализа исследуемой пробы. Аминокислоты подбирают с таким расчетом, чтобы пятна их не перекрывались на хроматограмме при однократном пропускании растворителя. При использовании в качестве подвижного растворителя смесей бутилового спирта с уксусной или муравьиной кислотами для построения калибровочных графиков готовят смеси 0,01 М растворов аминокислот следующих составов: гистидин солянокислый, глицин, валин и изолейцин (или лейцин); аргинин солянокислый, глютаминовая кислота, аланин, метионин; лизин солянокислый, серин, тирозин, фенилаланин; цистин, аспарагиновая кислота, треонин, триптофан.

С помощью откалиброванной автоматической микропипетки наносят на бумагу 5; 10; 15 и 20 мкл 0,01 М стандартного раствора аминокислот порциями по 5 мкл с таким расчетом, чтобы каждая точка будущего калибровочного графика соответствовала 0,05; 0,10; 0,15 и 0,20 мкг аминокислоты. Растворитель пропускают через бумагу столько раз, сколько это необходимо для четкого разделения аминокислот на хроматограмме. После пропускания растворителя хроматограммы высушивают в вытяжном шкафу при комнатной температуре 1,5—2 ч. Это способствует более точному совпадению результатов при повторных определениях.

После окончания разделения хроматограмму высушивают на воздухе и проявляют 0,5%-ным раствором нингидрина путем погружения в него или опрыскивания из пульверизатора. Затем нагревают в течение 15—20 мин при 60° С в термостате или сушильном шкафу. Расположение аминокислот сверху вниз по направлению движения растворителя следующее: цистин, лизин, аргинин, гистидин, аспарагиновая кислота, серин (три последние аминокислоты располагаются в виде тесно сближенных пятен), глютаминовая кислота, треонин, аланин, пролин, тирозин, валин, метионин, триптофан, фенилаланин, лейцин, изолейцин (последние три аминокислоты также часто располагаются рядом). Следует придерживаться правила: разделение и проявление стандартных смесей аминокислот должно проводиться в тех же условиях и таким же методом, как и анализируемые пробы.

После экстракции и фотокolorиметрирования окрашенных комплексов аминокислот с нингидрином на основании полученных значений оптической плотности строят калибровочные графики. График выражает зависимость оптической плотности раствора от содержания в нем аминокислот: на оси абсцисс откладывают массовое содержание аминокислот (мкг), а на оси ординат — оптическую плотность растворов. В связи с тем, что многие аминокислоты имеют близкие значения оптической плотности, рекомендуется строить калибровочные графики для каждой аминокислоты в отдельности.

Абсолютное значение оптической плотности растворов аминокислот зависит от качества бумаги, кратности пропускания рас-

творителя и чувствительности фотоэлектроколориметра. Поэтому при изменении условий хроматографирования следует строить новый калибровочный график.

Описанный метод применим для количественного определения всех аминокислот, кроме пролина и оксипролина, так как эти аминокислоты иначе реагируют с нингидрином, образуя медное производное другого строения. Для определения пролина и оксипролина лучше пользоваться реакцией с изатином.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В КУЛЬТУРАХ АКТИНОМИЦЕТОВ

По количеству штаммов, активно синтезирующих аминокислоты, актиномицеты занимают одно из первых мест среди почвенных микроорганизмов. Определение способности актиномицетов синтезировать и выделять в среду аминокислоты существенно с точки зрения выяснения их роли в накоплении этих биологически активных веществ в почве и поиска их активных продуцентов. Наибольшее признание при работе с актиномицетами получили хроматографические методы определения аминокислот, характеризующиеся высокой чувствительностью, доступностью и быстротой определения.

Актиномицеты выращивают в течение 5—6 сут при 27—28° С в жидких средах на круговых качалках, вращающихся со скоростью 160—200/60 с⁻¹. При этом используют среды различного состава, содержащие различные источники углерода, азота, предшественники отдельных аминокислот. В исследованиях (Андреюк и др., 1968) мы использовали среду Асаи, состоящую из следующих компонентов (грамм на литр дистиллированной воды): глюкозы — 20,0; NH₄Cl — 7,0; KН₂РO₄ — 1,0; MgSO₄ — 0,5; СаСО₃ — 5,0.

Для определения аминокислот в культурах актиномицетов использовали хроматографическую бумагу марки «Ленинградская Б № 2». На полоски этой бумаги наносили в виде пятен 10 мкл культуральной жидкости, отделив ее предварительно от мицелия фильтрованием или центрифугированием. При небольшом содержании аминокислот в определяемом объеме (10—50 мл) культуральной жидкости ее упаривали на водяной бане, а затем наносили на хроматографическую бумагу. Отмытый дистиллированной водой мицелий (500 мг) заливали 5 мл 80%-ного этилового спирта и оставляли в закупоренных пробирках на 16 ч. Затем смесь отфильтровывали, фильтрат полностью упаривали на водяной бане и осадок растворяли 0,2 мл 10%-ного изопропилового спирта. Вытяжку (10 мкл) наносили на хроматографическую бумагу.

Для разделения аминокислот использовали систему бутанол: уксусная кислота: вода (4:1:5). Хроматограммы проявляли 0,5%-ным раствором нингидрина в ацетоне. Пятна элюировали спиртом с Cu (NO₃)₂ в течение 18 ч, после чего элюаты колориметрировали. Количественное содержание аминокислот рассчитывали

по предварительно составленным стандартным графикам чистых препаратов аминокислот (Пасхина, 1964). Продуктивность культур выражали в миллиграммах аминокислот, приходящихся на 1 г сухого мицелия в сутки.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ САХАРОВ ПОЧВЫ

Свободные сахара играют важную роль в плодородии почвы. Они входят в состав структурных единиц гумусовых веществ и используются микроорганизмами в качестве источника углеродного питания. Существующие методы определения свободных и связанных сахаров в почве (Hultman, 1959; Нойбергер, Маршалл, 1969) имеют недостатки. Жесткие условия гидролиза почвы концентрированной соляной кислотой при температуре 100°С приводят к разложению таких сахаров, как манноза и галактоза, а дальнейшее упаривание гидролизата может привести к взаимодействию сахаров с аминокислотами. В некоторых случаях упаривание приводит и к карамелизации моносахаров. В связи с этим для определения спектра свободных сахаров в почве мы предлагаем использовать метод А. Н. Бояркина (1955) в нашей модификации, заключающейся в замене кислотного гидролиза мягкой экстракцией 25%-ным этанолом. Количественное содержание сахаров в экстракте можно определять антроновым методом (Шкляр, 1969).

Для определения свободных сахаров почву отбирали в 10 точках по диагонали исследуемой территории на нужной глубине (масса смешанной пробы должна составлять 1 кг: по 100 г из каждой точки). Пробу почвы тщательно перемешивали и заливали 25%-ным этанолом в соотношении 1 : 2. Смесь взбалтывали на шюттель-аппарате в течение 20 мин и экстрагировали в течение 2 ч на водяной бане при 50—60°С. По окончании экстракции смесь фильтровали, затем центрифугировали при 6000/60 с⁻¹. В надосадочную жидкость добавляли кристаллы тимола (антисептика) и высушивали в вакуум-сушильном шкафу при 50°С. В качестве поглотителя влаги использовали КОН, который ежедневно меняли, так как, поглощая воду, он быстро переходит в жидкое состояние. Примерно на 7-е сутки процесс высушивания заканчивается. Сухой остаток растворяли в 5 мл 10%-ного изопропилового спирта, раствор пропускали через ионообменную смолу Дауэкс-50 для очистки от возможных примесей. После очистки жидкость упаривали до 2 мл, затем, пользуясь микропипеткой, наносили на хроматографическую бумагу марки «С». Разгонку осуществляли в системе растворителей бутиловый спирт: уксусная кислота : вода в соотношении 4 : 1 : 5. Первые 3 сут разгонку производили верхней фракцией системы; последующие две разгонки осуществляли теми же растворителями, но в соотношении 8 : 3 : 1. Перед каждой очередной разгонкой хроматограммы подсушивали.

Разделять сахара можно как радиальной хроматографией, так и восходящей. После высушивания хроматограммы обрабатывали

проявляющим раствором (спирт ректификат — 100 мл, орто-толуидин — 5 мл, салициловая кислота — 2 г), затем высушивали сначала в вытяжном шкафу в течение 12 ч, а потом в сушильном шкафу в течение 5 мин при 105° С. Этого времени достаточно для проявления окрашенных пятен моносахаров. Пятна вырезали, обрабатывали 25%-ным этанолом (10 мл на одно пятно) в течение 2 ч. Элюат (1 мл) смешивали с антроновым реактивом (4 мл): 200 мг антрона, 5 мл дистиллированной воды, 100 мл концентрированной серной кислоты. Растворы сахаров, вступая в реакцию с антроновым реактивом, выделяют тепло, поэтому пользоваться нужно пробирками, изготовленными из термостойкого стекла. Смесь перемешивали и охлаждали на льду. Спустя 15—20 мин раствор становился зеленым, после чего его колориметрировали при длине волны 625 нм (фильтр № 7). Антроновый реактив к каждому опыту готовили новый, так как под действием кислорода он через 2—3 ч темнеет и становится непригодным для работы.

Для определения содержания сахаров из основного раствора глюкозы (1000 мкг/глюкозы в 1 мл) готовили растворы с концентрацией от 100 до 900 мкг/мл, добавляли реактив на сахара и колориметрировали. По значениям экстинкции стандартных растворов строили калибровочный график и находили концентрацию сахаров в исследуемом образце.

Описанная модификация получения экстрактов почвы была апробирована при изучении содержания свободных сахаров в темно-каштановой почве Херсонской области в условиях орошения и удобрения (Дульгеров, Серая, 1978).

Глава 10

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) был впервые предложен советскими учеными Н. А. Измайловым и М. С. Шрайбером в 1938 г. Используя тонкий слой окиси алюминия, не закрепленного на стекле, они изучали фракционный состав вытяжек лекарственных растений. Несколько позднее Мейнгард и Холл (Meinhard, Holl, 1949) применили радиальную поверхностную хроматографию на закрепленном слое окиси алюминия для разделения смеси некоторых неорганических ионов. Метод хроматографии на закрепленных слоях сорбента совершенствовали и другие исследователи, в частности Штоль (Хроматография в тонких слоях, 1965). ТСХ — это разделение веществ в тонком слое пористого материала, нанесенного на стеклянную пластинку. Метод ТСХ заключается в том, что на одну сторону стеклянной пластинки наносят тонкий слой сорбента, отмечают стартовую линию, на которой размещают капли проб веществ и их смесей, затем край пластинки (ниже стартовой линии) погружают в систему растворителей, про-

двигающихся в пористом материале под действием сил тяжести (при нисходящем процессе) или за счет капиллярных сил (при восходящем процессе) и разделяющих нанесенные вещества и смеси; отмечают границу подъема жидкости или линию фронта, сушат пластинку и проводят идентификацию веществ.

Пластинки могут быть квадратные и прямоугольные любого качества (фотопластинки со смытой эмульсией, стекло зеркальное, пирекс, обычное оконное и др.) и размера. Обычно применяют стеклянные пластинки длиной 15—20 см и шириной 4—20 см. Для сравнительного разделения используют стекла шириной 30—40 см и длиной 40—50 см. Для микрохроматографического анализа годятся предметные стекла (2,5—7,6 см). При работе на незакрепленном слое удобно применять матовые стекла.

Эффективное разделение смесей веществ обуславливается выбором сорбента (нужного качества и активности); при этом исходят прежде всего из свойств разделяемых соединений; их растворимости (гидрофильность, гидрофобность), содержания и характера функциональных групп. Если исследуемое вещество обладает слабым сродством к сорбирующему соединению, то используют активные сорбенты и слабополярные растворители, стоящие в начале элюотропного ряда. В противном случае применяют слабоактивные сорбенты и сильнополярные растворители. В зависимости от характера исследуемых соединений ТСХ используются следующие сорбенты:

Сорбент	Исследуемые соединения
Силикагель	Аминокислоты, алкалоиды, сахара, жирные кислоты, липиды, эфирные масла, неорганические анионы и катионы, стероиды, терпеноиды
Оксид алюминия	Алкалоиды, пищевые красители, фенолы, стероиды, витамины, каротиноиды, аминокислоты
Кизельгур	Сахара, олигосахариды, двухосновные кислоты, жирные кислоты, триглицериды, аминокислоты, стероиды
Целит	Стероиды
Целлюлозный порошок	Аминокислоты, пищевые красители, алкалоиды, нуклеотиды
Ионнообменная целлюлоза	Нуклеотиды
Крахмал	Аминокислоты
Сефадекс	Аминокислоты, белки

Растворители, применяемые в ТСХ, должны быть чистыми. Очистка и сушка растворителей производятся методами, обычно применяемыми для других видов хроматографии. Разделение смесей веществ может производиться одним растворителем, но обычно применяют системы, состоящие из двух, трех и даже четырех растворителей (табл. 4). Для каждой новой пластинки систему растворителей следует готовить заново, так как соотношение в ней компонентов после хроматографирования изменяется. При выборе растворителя для адсорбционной ТСХ можно пользоваться любым из известных элюотропных рядов, составленных на основании элюи-

рующей способности растворителя. Примером может служить элюотропный ряд по Штолю: гексан, гептан, циклогексан, четыреххлористый углерод, бензол, хлороформ, эфир, этилацетат, пиридин, ацетон, этанол, метанол, вода.

Положение пятен, как и при хроматографии на бумаге, определяют по флюоресценции, путем измерения R_f и т. д. Многие фирменные адсорбенты для ТСХ содержат флюоресцирующие красители. После разделения пластинки просматривают в ультрафио-

Таблица 4. Некоторые системы растворителей, применяемые в тонкослойной хроматографии

Соединения	Адсорбенты	Система растворителей (соотношение объемов)
Аминокислоты	Силикагель	96%-ный этанол : вода (70 : 30) н-Бутанол : уксусная кислота : вода (80 : 20 : 20) Этилацетат : 1-пропанол (65 : 35)
Сахариды (моно- и ди-)	Кизельгур (ацетат натрия) Кизельгур (фосфат натрия, pH-5)	Бутанол : ацетон : фосфатный буфер, pH-5 (40 : 50 : 10)
Липиды (нейтральные)	Силикагель	Петролейный эфир : диэтиловый эфир : ацетон (90 : 10 : 1)
Фосфолипиды	»	Хлороформ : метанол : вода (65 : 25 : 1)
Эфиры (холестериновые)	»	Тетрахлорэтан : хлороформ (45 : 5)
Каротиноиды	Кизельгур	Петролейный эфир : 1-пропанол (99 : 1)

летовом свете, и отдельные компоненты проявляются на них в виде синих, зеленых или темных пятен. Эти пятна отмечают, соскабливают, а затем элюируют содержащиеся соединения, пользуясь соответствующими растворителями, не растворяющими краситель. Это особенно важно в тех случаях, когда разделяемые компоненты нужно исследовать дальше и определять их количество. Если адсорбенты не содержат красителей, то положение соединений на пластинке определяют другими методами. При опрыскивании пластинки 50%-ным раствором серной кислоты и последующем их нагревании большинство соединений обугливаются, в результате чего на пластинке в соответствующих местах проявляются коричневые пятна. Флюоресцирующие или поглощающие ультрафиолетовый свет соединения можно обнаружить, просматривая пластинки в ультрафиолетовом свете. Ненасыщенные соединения хорошо окрашиваются в присутствии паров йода. Опрыскивание пластинок особыми красящими агентами вызывает окрашивание определенных соединений (например, нингидрин применяется при идентификации аминокислот). При разделении радиоактивных веществ можно получать автордиограммы пластинок (местоположения компонентов

определяют по темным пятнам на рентгеновской пленке). Иногда пластинки просчитывают на счетчиках с помощью специальных сканирующих устройств.

По значению величины R_f не всегда можно идентифицировать соединения, так как эта величина не является постоянной и зависит от сорбента, системы растворителей, способа работы, положения стартовой линии. Поэтому, по возможности, пробу следует хроматографировать с известными соединениями (свидетелями).

С целью количественного определения вещества сорбент скабливают с хроматограммы и элюируют полученный порошок подходящим растворителем или системой растворителей.

Более подробно тонкослойная хроматография описана в монографии Ахрема и Кузнецова (1965) и в книге «Методы органической биохимии» (1978). Со времени открытия тонкослойной хроматографии она стала одним из наиболее популярных методов разделения и анализа веществ и широко применяется в химических, медицинских и биологических исследованиях. Экспериментальные данные позволяют заключить, что ТСХ — удобный метод для разделения небольшого количества веществ, входящих в многокомпонентные смеси, и имеет некоторые преимущества перед бумажной хроматографией: большую скорость разделения, большую разрешающую способность, более широкий выбор материалов для сорбентов и устойчивый по отношению к агрессивным проявителям и нагреванию слой, простой способ проявления пятен и выделения веществ с хроматограмм (Березкин, Бочков, 1980). В настоящее время происходит интенсивный процесс инструментализации и автоматизации метода тонкослойной хроматографии, что позволит не только существенно уменьшить трудоемкость, но и повысить воспроизводимость и точность получаемых результатов.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПИДОВ АКТИНОМИЦЕТОВ

Метод ТСХ мы использовали для изучения липидного состава — общих липидов и отдельных их фракций — клеток актиномицетов желтой группы (Козырицкая и др., 1979). Липиды экстрагировали из клеток смесью растворителей хлороформ : этанол (1 : 1) (Елинов и др., 1975) путем 5-6-кратного настаивания в свежих порциях растворителя при комнатной температуре. Для разделения липидов на компоненты применяли отечественный гранулированный силикагель марки КСК химического завода Воскресенский (одной серии изготовления). С целью очистки силикагель измельчали в шаровой фарфоровой мельнице и фракционировали по методу Питра и Стерба (Pitra, Sterba, 1963), основанному на различной скорости седиментации измельченных частиц силикагеля в воде. Полученные фракции с определенным числом меш высушивали и активировали в сушильном шкафу при 120°С в течение 20 ч; хранили их в стеклянных банках с притертыми пробками. Для работы использовали 32-минутную фракцию. В качестве фиксатора тонкого слоя

использовали продажный химически чистый гипс. Его также активировали при 120° С в течение 20 ч (в тех же условиях, что и силикагель).

Сорбционную массу (силикагель 6 г, гипс 5—7 мг, дистиллированная вода 18 или 20 мл) наносили на стеклянную пластинку размером 13 × 18 см, предварительно растирая силикагель и гипс с $\frac{2}{3}$ частями дистиллированной воды в фарфоровой ступке до получения однородной пасты, не содержащей пузырьков воздуха, затем при размешивании добавляли остальную $\frac{1}{3}$ часть воды. На приготовление сорбционной массы должно быть затрачено не более 1—2 мин! Сорбционную массу выливали на середину пластинки и равномерно пестиком распределяли по всей площади. Пластинку устанавливали на подставку, расположенную строго горизонтально или на ровном столе и оставляли на 24 ч на воздухе, затем помещали для активации в сушильный шкаф, где выдерживали ее в течение 1 ч при температуре 105° С. Готовую пластинку хранили в эксикаторе над безводным CaCl_2 .

В чистый взвешенный бюкс стеклянной палочкой вносили две-три капли смеси липидов, предварительно расплавленной в сушильном шкафу при 60° С. Затем бюкс взвешивали и определяли массу липидов (навеску). Растворяли липиды в бензоле так, чтобы получился 10%-ный раствор, и определяли их содержание в 1 мкл этого раствора. Пробу в виде пятна наносили на пластинку с помощью микропипетки на расстоянии приблизительно 2,5 см от нижнего края и примерно на таком же расстоянии от одной из боковых сторон (шесть точек). Затем пробу с помощью вентилятора подсушивали для удаления растворителя, чтобы на это же место можно было нанести новые порции образца. При этом тщательно следили за тем, чтобы слой сорбента в месте нанесения пробы не нарушался.

Разделение липидов проводили в стеклянной камере в двух системах растворителей (Донец и др., 1970): I система — гексан : серный эфир (9 : 1), II система — гексан : серный эфир : ледяная уксусная кислота (80 : 20 : 1). Для лучшего насыщения внутреннюю поверхность камеры покрывали фильтровальной бумагой. Приготовленную перед разделением систему I заливали в камеру, смачивали бумагу, закрывали стеклянной крышкой и в течение 1 ч насыщали камеру парами растворителей в целях избежания испарения растворителя при подъеме вверх по пластинке и влияния на качество разделения. После достижения равновесия снимали крышку и в камеру помещали хроматографическую пластинку. Ее устанавливали вертикально так, чтобы место нанесения пробы было несколько выше уровня растворителя. Затем камеру закрывали, система растворителей поднималась вверх по пластинке и, таким образом, происходило разделение. После разделения систему сливали (вторично использовать ее нельзя), пластинку вынимали, высушивали на воздухе 5—6 мин (пока она не станет сухой с обратной стороны), в камеру заливали систему растворителей II, помещали пластинку и проводили вторичное разделение. Температура в камере

в течение всего процесса разделения должна быть постоянной. Высушенную после разделения хроматограмму (показателем служило полное исчезновение запаха растворителей) просматривали в УФ-лучах, светящиеся пятна очерчивали; липиды проявляли непосредственно на хроматограммах, обрабатывая их 10%-ным спиртовым раствором фосфомолибденовой кислоты с последующим помещением в сушильный шкаф при 110°С на 15 мин.

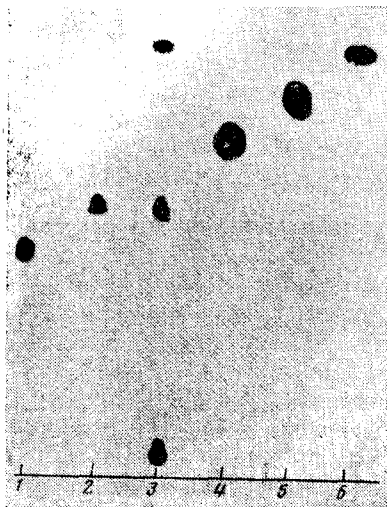


Рис. 22. Тонкослойная хроматограмма «метчиков» липидов:

1 — эргостерина, 2 — пальмитиновой кислоты, 3 — смеси: фосфотидилэтаноламин + пальмитиновая кислота + гексадекан, 4 — триглицеридов оливкового масла, 5 — ацетилэргостерина, 6 — гексадекана.

Для идентификации классов липидов использовали химически чистые свидетели — фосфатидилэтаноламины, эргостерин, пальмитиновую кислоту, триглицериды оливкового масла, ацетилэргостерин, гексадекан. Остальные классы идентифицировали по принципу разделения липидных соединений на силикагельном тонком слое, в зависимости от степени полярности их функциональных групп (Верещагин, 1972).

Количественное содержание отдельных классов липидов определяли, используя метод препаративной ТСХ, на том же сорбенте, в тех же системах растворителей. На пластинках размером 10 × 20 см. Для приготовления сорбционной массы использовали: силикагель — 11,94 г, гипс — 0,960 г, дистиллированная вода — 38 или 40 мл. Липиды (250 мг) растворяли в бензоле и наносили полоской на стартовую линию. После проведения разделения пластинку вынимали и высушивали, а затем устанавливали на подставке в горизонтальном положении в кристаллизаторе, на дно которого насыпали кристаллы йода, и закрывали крышкой. На хроматограмме появлялись бурые полосы. Пластинку вынимали, очерчивали пятна и оставляли до следующего дня на воздухе для исчезновения окраски. Затем с очерченных участков соскабливали силикагель и многократно пять-шесть раз экстрагировали липиды при легком встряхивании с небольшими порциями следующих растворителей: для фосфолипидов — хлороформ : этанол (1 : 1); для моно- и ди-глицеридов — серный эфир : гексан (2 : 1), для стеринов — хлороформ, для свободных жирных кислот и триглицеридов — серный эфир : гексан (1 : 1), для эфиров жирных кислот — серный эфир : гексан (1 : 2), для углеводов — гексан. Экстракты соединяли и доводили до постоянной массы. Содержание отдельных классов липидов определяли весовым методом (рис. 22).

ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЯ

Гель-хроматография, или эксклюзионная хроматография, представляет собой разновидность жидкостной хроматографии. Она подразделяется на гель-проникающую и гель-фильтрационную хроматографии. При использовании сефадексов — полимеров типа полисахароз или декстранов, которые набухают в воде, — говорят о гель-фильтрационной хроматографии. Термин «гель-проникающая хроматография» был введен при разделении веществ на полимерах, набухающих в органических растворителях. Механизм разделения веществ при применении этих хроматографий одинаков (Основы жидкостной хроматографии, 1973).

Начало использования гель-хроматографии относится к 1950 г. Созданию метода гель-фильтрации предшествовали наблюдения, которые показали, что структура носителя в хроматографической колонке способствует разделению веществ по размерам молекул. Наибольший успех этого метода был достигнут с промышленным выпуском гель-декстрана — сефадекса.

В отличие от других видов хроматографии разделение веществ методом гель-хроматографии основано на эффекте молекулярных сит, т. е. на разделении веществ по размерам молекул. В процессе разделения небольшие молекулы попадают в сетку полимера и удерживаются в ней, большие же молекулы не могут проникнуть в полимерную сетку и вымываются из колонки. Вначале из колонки выходят самые большие молекулы, затем средние и, наконец, небольшие молекулы. Для разделения веществ по молекулярной массе важны скорость седиментации и занимаемый объем молекул. Термином «молекулярные сита» обозначают некоторые кристаллические алюмосиликаты (так называемые цеолиты). Они встречаются в природе, их получают также синтетическим путем. Понятие «молекулярное сито» можно отнести к полупроницаемым мембранам и гелям. Гели состоят главным образом из двух компонентов: диспергированного вещества (соединения, из которого сформирован гель) и диспергирующего агента (растворителя). В геле оба компонента взаимно проникают друг в друга и образуют устойчивую однородную структуру.

Ситовый эффект был подробно исследован Дьюэлом (цит. по Дертман, 1970), который первый синтезировал незаряженный гель (сшитый галактоманнан) и применил его для обессоливания коллоидов. Позже Линдквист и Шторгардс изучили свойства гранул крахмала как молекулярных сит. В 1956 г. Лэйт и Рутвен показали, что крахмал можно использовать для разделения веществ с молекулярной массой от 100 до 1000 Д. С помощью гранул крахмала, набухшего в теплой воде, оказалось возможным разделить белки и полисахариды с молекулярной массой до 150000 Д. С другим природным

полимером — гелем агара — работал Полсон. Он также отметил, что способность молекул белка проникать в гель зависит от размера молекул и концентрации геля. Однако в дальнейшем крахмал и агар не были применены для разделения веществ из-за многих их недостатков. В 1959 г. Флодин и Порат получили универсальный гель (продукт взаимодействия растворимого декстрана с эпихлоргидрином), который начали вырабатывать в промышленных масштабах

Таблица 5. Физико-химическая характеристика различных типов сефадексов

Тип сефадекса	Молекулярная масса веществ, разделяемых на данном типе сефадекса. Д	Поглощение воды, г H ₂ O/г сухого сефадекса	Объем набухания сефадекса см ³ /г
G-10	до 700 *	1,0	2
G-15	до 1500 *	1,5	3
G-25	100—5000 *	2,5	5
	1000—5000 **		
G-50	500—10 000 *	5,0	10
	1500—30 000 **		
G-75	1000—50 000 *	7,5	12—15
	3000—80 000 **		
G-100	1000—100 000 *	10,0	15—20
	4000—150 000 **		
G-150	1000—150 000 *	15,0	20—30
	5000—300 000 **		
G-200	1000—200 000 *	20,0	30—40
	5000—600 000 **		

Примечание. Цифры с одной звездочкой обозначают молекулярную массу полисахаридов с произвольной пространственной структурой; цифры с двумя звездочками — молекулярную массу пептидов и глобулярных белков.

и выпускать в продажу под торговым названием «сефадекс». В результате этого открытия хроматографический метод разделения по молекулярной массе получил широкое распространение. Гель декстрана (сефадекс) выпускается в продажу в виде гранул определенных размеров. Сефадекс в настоящее время является наиболее широко распространенным носителем для гель-хроматографии. Промышленность выпускает восемь типов сефадекса, которые различаются степенью набухания (табл. 5). Каждый тип сефадекса подразделяется на несколько фракций. Сверхтонкая фракция применяется главным образом для тонкослойной хроматографии, однако ее можно использовать и для хроматографии на колонке (для очень тонкого разделения). Средняя и тонкая фракции предназначаются в основном для обычного препаративного разделения. Сефадексы G-25 и G-50 выпускают также в виде грубой фракции, которая также применяется на препаративных колонках.

Сефадексы нерастворимы и стабильны в воде, солевых растворах и органических растворителях, а также в щелочных и слабощелочных растворах. Перед заполнением колонки гель должен полностью набухнуть. Для этого гель выдерживают в воде или, лучше, в слабом солевом растворе. Время набухания сефадексов приведено

в табл. 6. Во влажном состоянии сефадекс можно стерилизовать в автоклаве при температуре 100° С в течение 40 мин: свойства геля не меняются. Сефадекс можно хранить в набухшем состоянии, его также можно вновь высушить. Для этого гель промывают вначале водой для удаления солей, а затем обрабатывают 50%-ным этиловым спиртом, в результате чего объем геля уменьшается вдвое. Остатки воды удаляют следующим образом: гель встряхивают в течение получаса в двух объемах абсолютного спирта, а затем фильтруют. После этого гель высушивают при 60—80° С. Сефадексы типа G

Таблица 6. Время набухания сефадексов разных типов, ч, при разных температурах

Тип сефадекса	Комнатной	Кипения воды	Тип сефадекса	Комнатной	Кипения воды
G-10	3	1	G-75	24	3
G-15	3	1	G-100	72	5
G-25	3	1	G-150	72	5
G-50	3	1	G-200	72	5

набухают также в диметилсульфоксиде, формамиде и гликоле, причем степень набухания в этих растворителях другая, чем в воде. Сефадексы G-10 и G-15 набухают также в диметилформамиде.

Способность молекул исследуемого вещества проникать в растворитель, поглощенный частицами набухшего геля, зависит от степени пористости частиц геля и от размера молекул анализируемого соединения. Распределение вещества на колонке, заполненной набухшим гелем, зависит от общего объема растворителя внутри и снаружи частиц геля. Распределение исследуемого вещества в растворителе внутри и снаружи частиц геля определяется коэффициентом распределения Kd , который зависит от размера молекул вещества. Если молекулы крупные, они не будут задерживаться внутри частиц геля и значение Kd в этом случае будет равно нулю. Если молекулы вещества небольшие и могут проникать внутрь частиц геля, значение Kd будет равно единице. Так как размер пор геля варьирует, молекулы среднего размера частично будут проникать в растворитель, находящийся в порах. В этом случае значение Kd будет лежать между нулем и единицей (Методы органической биохимии, 1978).

Содержимое колонки, заполненной гелем, состоит из двух фаз: «связанного» растворителя в гранулах геля и «свободного» растворителя между гранулами. Объем выхода (т. е. объем элюата, собранного с момента нанесения вещества на колонку до момента выхода его из колонки) V_e складывается из трех величин: объема растворителя между гранулами — внешний объем V_0 , коэффициента распределения вещества Kd и объема растворителя внутри гранул V_i :

$$V_e = V_0 + Kd + V_i. \quad (1)$$

Внутренний объем можно рассчитать, зная сухую массу геля a и количество поглощенной воды ω по формуле

$$V_i = a\omega. \quad (2)$$

Численное значение V_e для данного вещества варьирует в зависимости от размера колонки. Коэффициент распределения Kd — величина постоянная и не зависит от размера колонки.

Если два вещества имеют различные молекулярную массу и коэффициент распределения Kd' и Kd'' , то разность объемов выхода V_s будет выражена следующим уравнением:

$$V_s = V_e^1 - V_e'' = (V_0 + Kd'V_i) - (V_0 + Kd''V_i),$$

$$V_s = (Kd' - Kd'') V_i. \quad (3)$$

Таким образом, для полного разделения двух веществ необходимо, чтобы объем исследуемого соединения не превышал величину V_s . Для расчета оптимального объема столбика геля пользуются уравнениями (1) и (2).

Гель-хроматографический метод анализа используется для очистки высокомолекулярных биологических соединений: белков, ферментов, гормонов, нуклеиновых кислот и полисахаридов. Этим методом можно разделять смеси низкомолекулярных соединений, фракционировать пептиды, отделять аминокислоты от пептидов, определять молекулярную массу неизвестных соединений, концентрировать растворы высокомолекулярных соединений путем добавления к ним сухого сефадекса G-25 (грубого), а также проводить обессоливание растворов высокомолекулярных соединений. Обессоливание используется, например, для удаления фенола из растворов нуклеиновых кислот, сульфата аммония из растворов белка и др.

С успехом используются такие модификации сефадексов, как ионообменные смолы: ДЕАЕ-сефадекс (слабоосновный), КМ-сефадекс (слабокислый) и SE-сефадекс (сульфоэтил, сильнокислый). Разделение веществ с их помощью основано на ионном обмене и гель-фильтрации.

РАЗДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ЦИАНОБАКТЕРИЙ (СИНЕЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ)

Гель-хроматографический метод исследования мы применяли для разделения и очистки токсических веществ некоторых синезеленых водорослей (Андріюк та ін., 1977). Материалом для исследования служили природные популяции синезеленых водорослей и лабораторные культуры. Для выделения токсических веществ из синезеленых водорослей (Bishop et al., 1959) 10 г измельченных сухих водорослей экстрагировали 75 мл 0,1 н. Na_2CO_3 на холоду в течение 24 ч. Через сутки смесь центрифугировали в течение 30 мин при 5000/60 с⁻¹. Надосадочную жидкость сливали, а осадок

снова экстрагировали 60 мл 0,1 н. Na_2CO_3 с последующим центрифугированием. Полученный осадок экстрагировали еще три раза 60 мл 0,02 н. NaHCO_3 и центрифугировали. Надосадочные жидкости собирали вместе и полученный светло-голубой раствор концентрировали в вакуум-сушильном шкафу при температуре 35°C . Затем проводили экстракцию *n*-бутанолом в течение 4—6 ч и центрифугировали для отделения бутаноловой фазы, которую высушивали в вакууме. Осадок растворяли в 15—20 мл дистиллированной воды и отмывали этил-ацетатом для удаления окрашенных примесей с помощью центрифугирования. Водную фазу диализировали на холоду при температуре 4°C против дистиллированной воды при перемешивании на магнитной мешалке. Длительность первого диализа 40 ч. Диализат сливали и хранили в холодильнике. Затем проводили второй диализ против свежей порции воды в течение 50 ч. Объединенные диализаты экстрагировали в 100 мл *n*-бутанола. Полученную смесь встряхивали на шутель-аппарате в течение часа, затем центрифугировали 30 мин при $5000/60\text{ с}^{-1}$. Бутаноловую фазу высушивали под вакуумом. Осадок растворяли в воде и лиофилизировали.

Гель-фильтрацию полученного вещества проводили на колонке размером $20 \times 400\text{ мм}$, заполненной сефадексом G-25. Сефадекс (38 г) заливали дистиллированной водой и кипятили на водяной бане в течение 1 ч. Колонку заполняли набухшим гелем так, чтобы плотность его была одинаковой и не содержалось пузырьков воздуха. Перед нанесением образца из колонки удаляли избыток дистиллированной воды. Затем осторожно пипеткой вносили 5 мл исследуемого раствора (4 мг лиофилизированного порошка растворяли в 8 мл дистиллированной воды и полученный раствор фильтровали). После впитывания раствора поверхность геля дважды промывали равными объемами дистиллированной воды. Затем колонку заполняли растворителем — дистиллированной водой — и элюировали со скоростью 65 мл/ч. Элюаты собирали по 4 мл и спектрофотометрировали на СФ-4А при длине волны 230 нм. Токсический агент можно очищать также на сефадексе-анионообменнике ДЕАЕ-сефадекс марки А-25, а элюировать — 0,1—0,3 М растворами NH_4HCO_3 .

ТОНКОСЛОЙНАЯ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

Метод тонкослойной гель-фильтрации (ТСГФ) широко применяется при определении молекулярной массы мономерных форм белков, при фракционировании высокомолекулярных белков и других соединений, а также при изучении гуминовых соединений. Степаненко и сотр. (1962) попытались разделить фракции гуминовых кислот в тонком слое геля, заменив воду диметилсульфоксидом (ДМСО), в котором эти кислоты достаточно растворимы, а сефадексы набухают так же, как и при замачивании в воде.

Характер распределения концентраций вещества в хроматографической зоне зависит от нелинейности изотермы сорбции, вихревой диффузии, стеночного эффекта и прочих факторов. Вследствие этого хроматографическая кривая может быть асимметричной, отклоняющейся от гауссовской кривой (рис. 24). Последняя характеризует распределение концентраций вещества вдоль слоя адсорбента с учетом фактора размывания и при условии линейной изотермы сорбции.

В качестве газов-носителей используют гелий, азот, водород, аргон, двуокись углерода, реже воздух, неон, криптон, метан и некоторые другие газы, а в последнее время водяные пары.

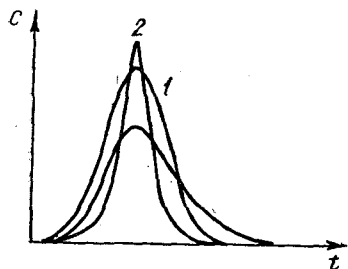


Рис. 24. Кривые, характеризующие различные типы распределения концентраций вещества в хроматографической зоне:

1 — гауссовское, 2 — симметричное, но не гауссовское, 3 — асимметричное. C — концентрация вещества, t — время.

При выборе оптимальной неподвижной фазы в газ-жидкостной хроматографии исследователи должны руководствоваться данными о характеристиках удерживания веществ и коэффициентах селективности неподвижных фаз. Для разделения смеси двух веществ необходимо выбрать неподвижную фазу, подобную химической природой и свойствами одному из компонентов разделяемой смеси — по «правилу подобия». Например, если необходимо разделить смесь различных по свойствам, но близкородственных соединений, таких, как спирт

и парафиновый углеводород, следует в качестве неподвижной фазы выбрать вещество, либо обладающее функциональной группой, присутствующей в молекуле спирта, либо являющееся парафиновым углеводородом. В первой жидкости лучше растворится спирт и, следовательно, он будет вымываться из хроматографической колонки последним. Во второй жидкости картина будет обратной.

Для разделения смеси близких по структуре веществ, например пространственных изомеров, необходимо учитывать специфическое взаимодействие межмолекулярных сил: образование водородных связей, донорно-акцепторное взаимодействие, комплексообразование и другие виды нестойких образований.

Чтобы оценить удерживающую способность неподвижных фаз в настоящее время пользуются так называемой условной хроматографической полярностью. Приводим наиболее часто применяемые в газо-жидкостной хроматографии неподвижные жидкие фазы и их относительную полярность (Айвазов, 1977):

Фазы	Полярность	Фазы	Полярность
Гексадекан	—2	Силиконовое масло-510	9
Сквалан	0	Силиконовое масло-550	20
Алиезон	7	Дидодецилфталат	20

Диоктилсебацинат	22	Этиленгликольсебацинат	56
Диизодецилфталат	24	Тритон X-305	57
Дионилфталат	26	Диметилфталат	58
Дифенилметан	26	Диэтилформамид	62
Силиконовое масло-710	26	Этиленгликоля суццинат	72
Диоктилфталат	28	Ацетонилацетон	73
Трибутилфосфат	34	Полиэтиленгликоль 600	78
Дибутилфталат	38	Триэтиленгликоль	78
Бензилдифенил	40	Диэтиленгликоля адипат	80
Бензиловый эфир	43	Диметилформамид	80
Бензилбензоат	45	Триэтаноламин	87
7,8-Бензохиолин	45	β , β' -Тиодипропионитрил	96
Триэтиленгликольбутират	50	1, 2, 3-трис (Цианэто- кси)-пропан	98
Трикрезилфосфат	51	β , β' -Оксидипропионитрил	100
Пентаэритриттетрабензоат	51		
Дифенилфталат	53		

Для разделения сложных смесей применяют колонки, заполняемые не одной, а несколькими неподвижными фазами, что позволяет более тонко регулировать селективность фаз и достигать более полного разделения смесей. Количество наносимой неподвижной фазы должно устанавливаться в зависимости от конкретных задач эксперимента и может колебаться от 2—5 до 30—50% массы носителя.

Твердый носитель в насадочных колонках в газо-жидкостной хроматографии служит для закрепления на его поверхности определенного количества неподвижной жидкой фазы. В качестве твердых чаще всего применяют носители, приготовленные на основе кизельгура или диатомита и силикагеля. Из твердых носителей на органической основе следует назвать тефлон (политетрафторэтилен) и политрифторхлорэтилен (экафлутин, гель- F , хостафлон- C_2 , галопорт- K).

Четкость хроматографического разделения зависит от плотности набивки: с увеличением плотности повышается эффективность.

В газо-адсорбционной хроматографии основным показателем, обеспечивающим разделение смеси различных веществ, является адсорбционная активность твердой фазы. В данном случае применяют главным образом полярные силикагели различных марок и активированную окись алюминия. Из неполярных адсорбентов — активированные угли и графитированные сажи. Для разделения смеси веществ, молекулы которых обладают различными геометрическими размерами, в частности смеси соединений нормального и изостроения, часто применяют молекулярные сита — цеолиты. Наряду с ними все шире используются в качестве адсорбентов пористые стекла и пористые полимеры.

Разделение смеси веществ можно проводить при постоянной температуре как на протяжении всего опыта, так и по всей длине колонки (изотермический процесс). Для обеспечения последнего колонки помещают в термостат. Однако этот процесс не позволяет произвести анализ смесей веществ, кипящих при различных температурах, достаточно качественно. И исследователь оказывается перед

Разделение веществ этим методом осуществляют на колонках, заполненных ионообменными смолами, которые называются ионитами, или ионообменниками. Иониты — высокомолекулярные вещества, в воде не растворяются, а только набухают, так как содержат гидрофильные группы в макромолекуле ионитов. Существуют два типа ионообменных смол — катионообменники (катиониты) и анионообменники (аниониты).

Катиониты обладают свойствами кислот, так как содержат кислотные функциональные группы и могут обмениваться с раствором катионами. Активными функциональными группами в молекуле катионитов являются сульфогруппа ($-\text{SO}_3\text{H}$), карбоксильная ($-\text{COOH}$) и сульфгидрильная ($-\text{SH}$) и др. В зависимости от характера ионогенных функциональных групп катиониты могут быть сильно- и слабокислотными. Сильнокислотные катиониты содержат сульфогруппы или сульфогруппы в сочетании с гидроксильными группами. Слабокислотные катиониты содержат карбоксильные группы.

Катионообменный цикл протекает следующим образом:



где R — радикал, образующий вместе с ионогенной группой элементарную ячейку ионита.

Аниониты обладают свойствами оснований, вследствие чего они могут обменивать анионы. Они содержат функциональные группы основного характера — аминные ($-\text{NH}_2$), иминные ($=\text{NH}$) и др. Аниониты также могут быть сильно- и слабоосновными. Сильноосновные аниониты содержат атомы азота в составе четвертичных аммонийных солей ($-\text{NR}_3^+$), а слабоосновные — аминные или иминные группы.

Анионообменный цикл протекает следующим образом:



Некоторые иониты являются полифункциональными, так как содержат несколько видов функциональных групп в макромолекуле. Качественная характеристика ионообмена зависит от природы ионита, исследуемого вещества, растворителя и условий опыта (температуры, среды и других факторов).

Перед тем как приступить к анализу, необходимо из ионообменных смол удалить низкомолекулярные органические и неорганические примеси.

Для обработки катионитов 200 г технического ионита помещают в насыщенный раствор NaCl и оставляют до полного набухания. Затем набухший ионит переносят в большую делительную воронку и приливают 5%-ный раствор NaOH . Раствор щелочи сливают через 3-4 ч и наливают новый. Ионит промывают таким образом до тех пор, пока надосадочная жидкость в делительной воронке не станет бесцветной (на 1 объем ионита обычно идет 15 объемов щелочи). Затем

ионит промывают 10 объемами дистиллированной воды, 5 объемами 5%-ной и 15%-ной HCl до получения отрицательной реакции на ионы Fe (III) с роданидом аммония. После этого смолу промывают 5%-ным раствором H_2O_2 , а затем этиловым спиртом до исчезновения окраски. Приготовленный таким образом ионит (Н-форма) высушивают на воздухе и сохраняют в стеклянной банке в воздушно-сухом состоянии.

Таким же способом обрабатывают и аниониты. Отличие состоит в следующем: анионит сначала обрабатывают 2%-ной HCl до получения бесцветной надосадочной жидкости и отрицательной реакции на катион Fe (III) . Затем смолу промывают 5%-ным и 10%-ным растворами NaOH до получения отрицательной реакции на анионы хлора. После этого анионит промывают дистиллированной водой до слабощелочной реакции. Таким образом получают анионит в OH- форме.

Ионообменную хроматографию проводят в стеклянных колонках, заполненных ионитом. Колонка представляет собой суженную книзу стеклянную трубку. В зависимости от целей исследований размеры колонки могут быть различными. Для аналитических целей используют колонки с внутренним диаметром 0,9; 0,7—0,5 см. Так, например, для анализа пептидов пользуются колонками длиной до двух метров и диаметром 1 см. Для препаративных целей, особенно при разделении веществ, обладающих различными химическими свойствами, применяют колонки с большим диаметром (до 2—5 см) и меньшей высотой (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1980). Колонка должна быть устроена таким образом, чтобы неподвижная фаза доходила до ее дна, иначе разделившиеся частицы будут скапливаться на дне и перемешиваться. Для этого в основание колонки впаивают пористую стеклянную пластинку, на которую накладывают съемную сетку из нейлона, а затем наносят ионит. Более простой способ состоит в том, что на дно колонки помещают стеклянную вату с небольшим количеством кварцевого песка или мелких стеклянных шариков. Сверху колонки ионит слегка прижимают перфорированным пластмассовым диском.

Во время наполнения колонки следят за равномерным распределением ионита. Ионит в виде суспензии в воде (или в буферном растворе) вносят в колонку при закрытом кране. Верхний слой суспензии перемешивают, а стенки колонки слегка простукивают для удаления пузырьков воздуха и равномерного ее заполнения. Колонку заполняют смолой до нужной высоты, а затем открывают кран и пропускают растворитель. По мере вытекания растворителя содержимое колонки постепенно уплотняется. После заполнения колонки ионитом ее промывают несколькими объемами исходного буферного раствора, а затем наносят исследуемый раствор. Для этого избыток растворителя отсасывают из верхней части колонки, приливают исследуемый образец и дают ему впитаться в ионит. Остатки образца смывают со стенок колонки небольшим количеством растворителя и начинают элюировать, прибавляя растворитель по каплям.

Скорость протекания раствора через колонку должна быть постоянной.

Температуру необходимо регулировать с точностью $\pm 3^\circ \text{C}$, а иногда и $\pm 0,5^\circ$, так как для ионнообменных процессов, т. е. для более эффективного разделения веществ, она имеет существенное значение.

Жидкость, выходящую из колонки, собирают по фракциям. Для этих целей применяют автоматический коллектор. Полученные фракции фотометрируют на спектрофотометре при определенной длине волны.

Ионообменные смолы находят широкое применение в быту, в технике, в науке. Иониты применяют для разделения и очистки витаминов от нежелательных примесей, а также для синтеза витаминов в качестве катализатора. Например, витамины B_1 и B_6 хорошо разделяются на катионитах. Витамин B_6 хорошо извлекается карбоксильными катионитами. Для извлечения витамина С из различного сырья применяются аниониты. Методом ионообменной хроматографии можно разделить биохимически важные вещества, а именно: аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, нуклеотиды, сахара и их производные, карбоновые кислоты и белки. Применение ионообменной хроматографии, можно провести групповое и индивидуальное разделение аминокислот, содержащихся, например, в белковом гидролизате. Разделение аминокислот основывается на различии в их изoeлектрических точках. Основные аминокислоты, несущие положительный заряд, задерживаются на Н-катионитах, содержащих сульфо- и карбоксильные группы. Аминокислоты кислого характера адсорбируются основными ОН-анионитами. Нейтральные аминокислоты практически не задерживаются ни катионитами, ни анионитами. Аминокислоты, адсорбированные ионитами, элюируют специально подобранными растворителями (например, 1 н. раствором соляной кислоты). Сильноосновные аминокислоты элюируют ацетатным буфером рН 4, а слабоосновные — 0,1 н. раствором уксусной кислоты. Смесь аминокислот, адсорбированных на катионите, элюируют растворами соляной кислоты различной концентрации. Например, серин, аспарагиновую и глутаминовую кислоты элюируют 1,5 н. раствором соляной кислоты; аланин, валин, пролин, глицин и лейцин — 2,5 н. раствором; гистидин и аргинин — 4 н. раствором.

Для разделения высокомолекулярных соединений (белков и нуклеопротеидов) применяют модифицированную целлюлозу (Горяченкова, 1959). Обычные смолы с большим числом поперечных связей для этой цели не подходят, так как они непроницаемы для крупных молекул. Целлюлоза является хорошим ионообменником прежде всего потому, что имеет волокнистую структуру; кроме того, большинство функциональных групп у нее расположено на поверхности волокон, в результате чего они легко доступны для макромолекул. Особенно эффективным катионообменником является карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза), анионообменником — диэтил-аминоэтилцеллюлоза (ДЕАЕ-целлюлоза).

ОЧИСТКА ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ЦИАНОБАКТЕРИЙ (СИНЕЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ)

Метод ионообменной хроматографии мы применяли для очистки токсических веществ некоторых синезеленых водорослей (Андріюк та ін., 1977).

Токсические вещества выделяли из лабораторных культур и природных популяций синезеленых водорослей с доминированием *Aphanizomenon flos-aquae* методом Алама (Alam et al., 1973). Для этого свежесобранные водоросли замораживали на протяжении 18 ч, затем давали им возможность оттаять при комнатной температуре и подкисляли 6 н. HCl до pH 3. Полученную смесь нагревали до 80—90° С, охлаждали на ледяной бане и центрифугировали. Осадок реэкстрагировали дважды. Надосадочные жидкости высушивали и экстрагировали подогретым 95%-ным этанолом. Этаноловый экстракт высушивали, растворяли в воде и экстрагировали хлороформом. Водную фазу, содержащую токсин, лиофилизировали.

Для очистки токсических веществ из *Aphanizomenon flos-aquae* использовали сильнокислотные и слабокислотные катиониты: амберлит IRC-50 (H⁺), дауэкс 50-W × 1 (H⁺), вофатит ES (H⁺) (производство США) и КУ-2 (H⁺) (отечественная марка). Вначале ионообменные смолы отмывали водой от мелких взвешенных частиц пыли до тех пор, пока оставались крупные, быстро оседающие частицы, и заполняли колонки размером 20 × 200 мм. Затем последовательно промывали 1М NaOH (три колоночных объема), 1н. HCl (шесть колоночных объемов), 95%-ным этиловым спиртом (три колоночных объема) и водой до нейтральной реакции фильтрата.

Лиофилизированное токсическое вещество растворяли в воде и 2 мл наносили на колонку с катионитами. Элюцию проводили последовательно дистиллированной водой (180 мл), 1М раствором CH₃COOH (360 мл) и 0,1 н. раствором HCl (360 мл). Элюаты собирали по 20 мл и спектрофотометрировали на СФ-4А при длине волны 230 нм. Каждую фракцию высушивали и исследовали на токсичность.

Глава 13

ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Газовая хроматография — сравнительно молодой метод, возникший на основе классической хроматографии. В 1941 году Мартин и Синдж предложили метод распределительной хроматографии в жидкостно-газовом варианте. Однако лишь в 1952 г., когда Джеймс и Мартин создали теорию процесса и разработали конкретную методику анализа жирных кислот, этот метод был признан.

В СССР первая работа с применением газовой хроматографии была выполнена в 1949 г. Н. М. Туркельтаубом. Через два года А. А. Жуховицкий и сотрудниками был предложен метод хроматографии, а впоследствии разработаны различные модификации этого метода, предусматривающие применение температурного поля. Новый скачок в развитии газовой хроматографии связан с работами Голея, предложившего в 1957 г. использовать в качестве колонок длинные капилляры. Приблизительно в то же время были изобретены высокочувствительные ионизационный и пламенно-ионизационный детекторы.

Газовая хроматография — один из наиболее перспективных физико-химических методов исследования, бурно развивающихся в настоящее время. Он может быть полезен для качественного и количественного анализа смесей, препаративного выделения веществ, а также для определения физико-химических характеристик. Возможность анализа небольшого количества вещества обуславливает применение метода в биологии, медицине, физической химии, геохимии, космохимии, криминалистике и т. д. Метод газовой хроматографии можно применять в сочетании с такими современными методами, как масс-спектрометрия, ИК-, ЯМР-, ЭПР-спектроскопии. Это делает данный метод исключительно важным и практически универсальным средством исследования свойств различных веществ.

Газовой хроматографией называется хроматографический метод, в котором в качестве подвижной фазы применяется газ или пар. Метод имеет две разновидности: газо-адсорбционную (газо-твердую) и газо-жидкостную хроматографии. В первой — неподвижной фазой служит твердое вещество — адсорбент, во второй — жидкость, распределенная тонким слоем по поверхности какого-либо твердого носителя. В основе газовой хроматографии лежат процессы сорбции (адсорбция и абсорбция) и обратный им процесс десорбции. Адсорбция — процесс концентрирования растворенного или парообразного вещества (адсорбата) на поверхности какого-либо твердого тела или жидкости (адсорбента). Явление адсорбции обусловлено наличием силового поля у атомов или молекул адсорбента, находящихся на поверхности и связанных лишь частично с подобными себе атомами или молекулами в кристалле или жидкости. В зависимости от интенсивности этого поля на поверхности адсорбента могут образовываться мономолекулярные, бимолекулярные или полимолекулярные слои адсорбатов. Абсорбция (от латинского *absorbe* — поглощать) — физико-химический процесс поглощения вещества (абсорбата) из раствора или смеси газов твердым телом или жидкостью (абсорбентом). Растворимый в жидкости компонент газообразной смеси поступает во внутренние слои абсорбента путем диффузии. Для осуществления последней необходимо, чтобы концентрация растворенного компонента в газообразной смеси превосходила его равновесную концентрацию над жидкостью. Если концентрация растворимого компонента в газообразной смеси меньше его концент-

рации над жидкостью, диффузия происходит в обратном направлении, т. е. наблюдается процесс десорбции.

Газохроматографическое разделение исследуемой смеси веществ осуществляют на специальных приборах, называемых газовыми хроматографами. Принципиальная схема такого прибора изображена на рис. 23. Газ-носитель из баллона 1 непрерывно в течение всего опыта пропускается через всю систему: дозатор 2, колонку 3, детектор 4, измеритель скорости 6. Дозатор служит для ввода в хроматографическую колонку газообразной, жидкой или твердой пробы анализируемой смеси. В двух последних случаях смесь должна быть переведена в парообразное состояние.

Разделение смеси на индивидуальные компоненты происходит в хроматографической колонке. Непосредственно

при выходе газа из колонки устанавливается детектор, фиксирующий изменение концентрации вещества по мере его вымывания из колонки (дифференциальный детектор) или же общее количество вымываемых компонентов (интегральный детектор). Современные детекторы снабжены самописцами 5 для автоматической записи результатов анализа. На выходе из детектора газ-носитель с компонентами разделяемой смеси поступает в измеритель скорости потока. В некоторых случаях этот прибор устанавливается до колонки.

Хроматографические колонки чаще всего изготавливают из меди, нержавеющей стали, алюминия, латуни, стекла, кварца и тефлона. Материал для изготовления колонки нужно выбирать с учетом природы анализируемых веществ и условий эксперимента. Из возможных форм колонок наиболее удобной считают спиральную. Однако перед заполнением сорбентом спиральные колонки следует распрямлять для получения однородной плотности упаковки. На практике чаще пользуются колонками длиной 1—3 м и внутренним диаметром 3—6 мм. Объем вводимой пробы анализируемых веществ составляет 0,0005—0,1 мл для жидких смесей и 0,5—20 мл для газов.

В процессе хроматографирования вещество распределяется между подвижной газообразной фазой и твердой или жидкой неподвижной. Вследствие движения подвижной фазы вдоль слоя сорбента вещество, находящееся в газообразной фазе, переносится и вступает в контакт с новым участком сорбента. В то же время сорбированное предыдущим участком сорбента вещество вступает в контакт с новой порцией газа. В результате часть сорбированного вещества десорбируется и уносится потоком газа-носителя. Таким образом, в процессе хроматографирования происходит перенос вещества из одной фазы в другую и обратно (сорбция — десорбция), а также движение вещества вдоль слоя сорбента.

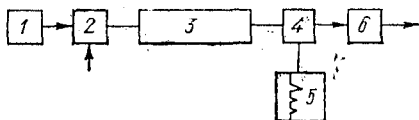


Рис. 23. Блок-схема газового хроматографа:

1 — баллон газа-носителя, 2 — дозатор, 3 — хроматографическая колонка, 4 — детектор, 5 — самопишущий регистратор, 6 — измеритель скорости потока.

Мы использовали метод гель-фильтрации для изучения гуминовых кислот различного происхождения (Гордиенко и др., 1973). Гуминовые кислоты извлекали из декальцированного и освобожденного от битумов (с помощью бензола) материала 1%-ным КОН на водяной бане в атмосфере азота и очищали их от растворимых веществ переосаждением и длительным диализом. Гуминовые кислоты почв и торфов дополнительно гидролизovali 6 н. HCl в течение 3 ч, а затем лиофилизировали для облегчения последующего растворения в ДМСО.

Сефадекс («сверхтонкий») перед нанесением на пластинки замачивали на сутки в растворителе (вода, ДМСО). Нанесение суспензии осуществляли с помощью обычных приспособлений, используемых в тонкослойной хроматографии, после чего пластинки слегка подсушивали до затвердения слоя сефадекса (толщина 0,8—1,0 мм). Вследствие высокой гигроскопичности ДМСО работа с безводными растворителями неудобна. Использовали растворитель, приведенный в равновесие с атмосферной влагой. Небольшие изменения содержания воды в ДМСО не влияли на результаты гель-фильтрации. Пластинки с нанесенным слоем геля хранили в камере, насыщенной парами растворителя. Гуминовые кислоты в виде 1%-ного раствора наносили на пластинки на расстоянии 10—12 мм от края в виде штриха длиной 5—8 мм с помощью полиэтиленового капилляра.

Гель-хроматография проводилась в специальных камерах, снабженных бумажным фитилем для подачи растворителя. Растворитель продвигался за счет отсасывания его валиком из фильтровальной бумаги, помещенным на конец пластинки, противоположный стартовому. Время развития хроматограммы (9 × 12 см) при использовании воды составляло 45—60 мин, а при использовании ДМСО — 60—90 мин. Результаты разделения, т. е. положение окрашенных зон гуминовых кислот, фиксировали фотографированием контактным способом на стеклянную фотопластинку или на фотобумагу. Первый способ фиксации удобен тем, что с помощью регистрирующего микрофотометра (МФ-4) можно получить денситометрические кривые для разделенного вещества непосредственно с фотопластинки.

Фракции, полученные разделением кислот растворителями (спирт, диоксан), исследовали методом ТСГФ; экстракцию проводили при температуре кипения растворителя в атмосфере азота. Была получена серия фракций гуминовых кислот последовательным извлечением из образцов углей и почв небольшими порциями 1%-ного раствора щелочи (при соотношении твердое вещество : жидкость, равно 1 : 10) на кипящей водяной бане.

В части щелочных экстрактов определяли содержание органического углерода (окислением перманганатом калия); после удаления избытка щелочи катионитом экстракты доводили до равного содержания углерода (3 мг/мл) и в таком виде наносили на пластинку с влажным сефадексом марки Q-50. В остальной части экстрак-

тов гуминовые кислоты осаждали соляной кислотой, промытый гель лиофильно высушивали и 1%-ный раствор полученных фракций в ДМСО также наносили на пластинку, покрытую слоем сефадекса, растворенного в ДМСО. Развитие гель-хроматограмм проводилось соответственно в воде и ДМСО. Пробы бурых и окисленных каменных углей подвергались экстракции различными щелочными агентами: 1%-ным раствором КОН, 2%-ным аммиаком и щелочным раствором пирогосфата натрия по Кононовой и Бельчиковой. Полученные экстракты также изучались методом ТСГФ.

Для сравнительной характеристики разделяющей способности сефадексов при элюировании водой и ДМСО были использованы образцы эталонных декстранов молекулярной массой $(15-20) \cdot 10^3$ и $(60-90) \cdot 10^3$ D. Размеры R_f устанавливались методом «отпечатков» — перенесением пятен со слоя геля на бумагу (Ватман № 3) и проявлением сначала раствором периодата, а затем реактивом Шиффа. При этом пятна декстрана с молекулярной массой $(15-20) \cdot 10^3$ D окрашивались в розовый, а декстрана молекулярной массой $(60-90) \cdot 10^3$ D — в красно-фиолетовый цвет.

Глава 12

ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Ионообменная хроматография основана на обратимом стехиометрическом обмене ионов, содержащихся в исследуемом растворе, на ионы, входящие в состав ионообменника (Ольшанова и др., 1970). Первые сообщения об использовании в аналитической практике приемов, характерных для ионообменного синтеза, начали появляться в 1910—1920 г. Однако необходимые условия для осуществления препаративного и промышленного ионообменного синтеза возникли лишь к концу 1930 г., когда появились синтетические иониты с высокой обменной емкостью и способностью к электролитической диссоциации в любых ионных формах (Везлих, 1973). Искусственные органические ионообменные смолы получили широкое применение в 40-х годах. К этому времени Германия выпускала в промышленном масштабе шесть марок катионообменных и две марки анионообменных смол. С 1939 г. широкие исследования по синтезу ионообменных смол проводятся в США. В СССР научно-исследовательские работы по ионообменному синтезу стали развиваться в 1950 г. Ионообменник представляет собой твердый носитель, химически соединенный с заряженными группами, способными связывать ионы за счет электростатического взаимодействия. Он способен обменивать эти ионы на ионы, содержащиеся в водном растворе. Ионообменники используются в колоночной хроматографии для разделения молекул в соответствии с их зарядом (Фрайфелдер, 1980).

Таблица 7. Основные характеристики некоторых типов детекторов

Тип детектора	Пороговая чувствительность	Определяемое вещество	Линейный диапазон
Катарометр	$10^{-3} - 10^{-5}$ мг/см ³	Любые	10^{-4}
Термохимический	$10^{-3} - 10^{-6}$ мг/см ³	Горючие	10^4
Пламенно-ионизационный	$10^{-9} - 10^{-10}$ мг/с	Органические	10^7
Аргоновый	$10^{-8} - 10^{-11}$ мг/с	»	10^3
Термоионный (фосфорный)	$10^{-8} - 10^{-9}$	»	10^4
Плотномер	Зависит от чувствительности элементов	Любые	10^3
Ультразвуковой	Зависит от молекулярной массы	»	10^6
Титрометрический	10^{-6} мг	Хорошо титрующиеся	10^4
Объемный	10^{-1} мг	Не реагирующие со щелочью	10^4

Примечание. Т — температура, град.; q — скорость потока на выходе из колонки,

необходимостью изменять температуру колонки. Наиболее удачным оказался способ изменения температуры колонки во времени по определенной программе (способ газовой хроматографии с программированием температуры). В настоящее время существуют более совершенные методы, позволяющие программировать изменение температуры не только во времени, но и по длине слоя сорбента — хроматография и термодинамический метод хроматермографии. Воздействие температурой на хроматографический процесс позволяет улучшать условия разделения смесей веществ, повышать концентрацию, ускорять время анализа, определять микропримеси.

Одним из важнейших узлов хроматографической установки является детектор. Он предназначен для непрерывной фиксации концентрации, потока или количества веществ на выходе из колонки в зависимости от времени. Существуют разнообразные по принципу действия, чувствительности и практическому назначению детекторы. Основные типы детекторов и некоторые их характеристики приведены в табл. 7 (Айвазов, 1977). Рассмотрим подробнее принципы действия детекторов, наиболее часто применяемых в биологических исследованиях.

Пламенно-ионизационный детектор (ПИД) является дифференциальным потоковым детектором, т. е. фиксирует произведение концентрации вещества на скорость потока. Его работа основана на том, что органические вещества, попадая в пламя водородной горелки, подвергаются ионизации, вследствие чего в камере детектора,

Постоянная времени, с	Стабильность показаний	Рабочая температура, °С	Газ-носитель	Зависимость от параметров опыта	Особенности детектора
1—2	++	450	Предпочтительно гелий	T, ω	Прост в обращении, но недостаточно чувствителен
1	++	450	Воздух, кислород	ω	Требует применения платины
10^{-3}	+	400	Гелий, азот	Нет	Требует применения водорода
10^{-3}	+	400	Аргон	P	Требует радиоактивного вещества
10^{-3}	+	300	Гелий, азот	Нет	Селективен к фосфору
1	++	150	Двуокись азота, аргон	T, ω	—
1	++	250	Любой	T	—
—	++	—	»	Нет	Интегральный
—	++	—	Двуокись углерода	T, ω	»

см³/мин. ++ — хорошая. + — средняя. — — плохая стабильность показания.

являющейся одновременно ионизационной камерой, возникает ток ионизации, сила которого пропорциональна количеству заряженных частиц. Благодаря высокой чувствительности ПИД — один из самых распространенных детекторов для работы с капиллярными колонками и для определения микропримесей. Однако следует иметь в виду, что ПИД регистрирует все соединения, образующие при термическом распаде углеводородные радикалы. В случае связи атомов углерода не с атомами водорода, а, например, с атомами галогенов, аминок группами или гидроксилами, чувствительность детектора резко снижается. На наличие карбоксильных или карбонильных групп в молекулах ПИД практически не реагирует.

Термоионный детектор. Принцип его действия заключается в том, что соли щелочных металлов, испаряясь в пламени горелки, селективно реагируют с соединениями, содержащими галогены или фосфор. Так как термоионный детектор обладает наивысшей чувствительностью к фосфорсодержащим соединениям, он получил название фосфорного. Применяется этот детектор главным образом для анализа фосфорорганических пестицидов, инсектицидов и ряда биологически активных соединений. Существуют также термоионный азотный, термоионный галоидный детекторы и другие.

Микрокулонометрический детектор относится к интегральным детекторам, которые суммируют количество вещества за определенный промежуток времени. Он обладает высокой чувствительностью и селективностью к веществам, содержащим хлор, серу, азот или

фосфор. Принцип действия этого детектора заключается в следующем. Компонент смеси, выходящей из колонки в потоке газа-носителя (азота), смешивается с потоком газа (кислорода в окислительном варианте и водорода в восстановительном), в атмосфере которого в конверсионной печи при высокой температуре превращается в соответствующий продукт конверсии. Последний поступает в кулонометрическую ячейку. Ионы определяемого элемента изменяют концентрацию титранта. Возникающий дисбаланс электрического моста регистрируется с помощью индикаторных электродов.

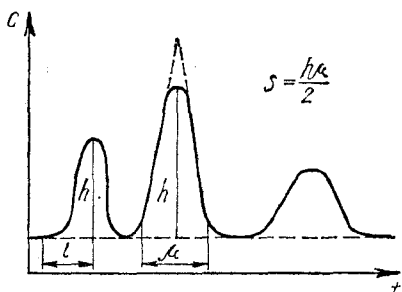


Рис. 25. Общий вид дифференциальной хроматограммы, отражающей зависимость изменения концентрации вещества (C) от времени (t):

h — высота пика, μ — ширина пика у основания, S — площадь пика, l — расстояние от момента выхода несорбирующегося вещества до проекции точки максимальной концентрации на нулевую линию (измеряют по хроматограмме).

составляет 10^{-6} мг для серусодержащих соединений и 10^{-7} — 10^{-8} мг для фосфорсодержащих веществ. Линейный диапазон $5 \cdot 10^4$.

Функция хроматографической колонки сводится лишь к разделению смеси на индивидуальные компоненты. Вымываемые из хроматографической колонки компоненты смеси могут быть проанализированы одним из химических или физических методов. Чаще всего это инфракрасная (ИК) спектроскопия и масс-спектрометрия. В последнем случае масс-спектрометр может быть использован в качестве детектора. Сочетание хроматографической колонки и масс-спектрометра получило название метода хромато-масс-спектрометрии. Разделенные компоненты смеси, проходя через детектор, фиксируются в виде хроматограммы, которая является основой качественного и количественного анализа смеси.

В газохроматографическом анализе почти всегда применяются дифференциальные детекторы, поэтому и хроматограммы носят название дифференциальных. Дифференциальная хроматограмма (рис. 25) состоит из ряда последовательно расположенных пиков, число которых соответствует числу компонентов анализируемой смеси. Идеальным результатом считается тот, когда форма пиков на хроматограмме симметрична, т. е. максимально приближена к гаус-

В пламенно-фотометрическом детекторе компонент смеси, выходящий из колонки, после смешения с кислородом или воздухом сгорает в пламени, обогащенном водородом. Для регистрации продуктов сгорания применяется фотометрия пламенной эмиссии фосфор- и серусодержащих соединений при длине волны соответственно 526 и 394 нм. Специфичность достигается за счет применения оптических фильтров и такого расположения горелки, которое позволяет экранировать фотоумножитель от первичного пламени. Его чувствительность

совской кривой распределения. Для количественной характеристики состава анализируемой смеси служат высота пика h , его площадь S или же произведение lh . Наиболее простым является измерение высоты пика. Однако для размытых и не имеющих острой вершины пиков измерение высоты может привести к значительным погрешностям. Площадь пика определяют планиметром либо взвешиванием на аналитических весах вырезанного из ленты самописца хроматографического пика с последующей нормализацией пиков по массам. Измерение высоты пиков — более быстрый метод, чем расчет площадей. Однако диапазон линейной связи высоты пика с количеством вводимой пробы по сравнению с диапазоном такой связи для площади пика меньше. Поэтому измерения по высотам пиков производят в тех случаях, когда количество вводимой пробы не превышает 100 мкг для насадочных колонок и 0,1 мкг для капиллярных. Площади пиков в меньшей степени зависят от условий эксперимента, кроме того, измерение площадей дает большую точность.

Возможность определения небольшого количества веществ делает метод газовой хроматографии особенно ценным для анализа микробиологических объектов (Митрука, 1978): компонентного состава микробных клеток, продуктов их метаболизма, а также соединений, образующихся в результате воздействия микроорганизмов на различные субстраты. Так, например, микроорганизмы, как и другие биологические объекты, при пиролизе дают газообразные продукты термической деградации, которые можно проанализировать на газовом хроматографе. Было сделано предположение, что уникальные профили пиков каждого микроорганизма могут оказать помощь в дифференциации родов, видов или даже различных штаммов микроорганизмов. Ойяма, Рейнер, Кон и Винсент и другие исследователи (цит. по Митрука, 1978) достигли определенных успехов в дифференциации видов *Azotobacter*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Aspergillus*. Фонтэйдж, напротив, пришел к выводу, что данный метод очень ненадежен в связи с тем, что результаты пиролиза-газожидкостной хроматографии в большой степени зависят от состава среды, температуры, возраста культуры, используемой аппаратуры и т. д. И лишь в тщательно контролируемых условиях опыта можно добиться определенных успехов.

Газохроматографическими методами можно анализировать также различные специфические классы соединений, продуцируемых микроорганизмами: жирные кислоты, промежуточные продукты метаболического цикла Кребса, спирты, сахара, аминокислоты, амины; гликопротеидные и гликолипидные компоненты клеточной стенки, капсул или цитоплазмы микроорганизмов, а также продукты микробного катаболизма субстратов, таких, как глюкоза, аминокислоты или другие соединения.

АЦЕТИЛЕН-ЭТИЛЕНОВЫЙ МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ
АКТИВНОСТИ ПРОЦЕССА ФИКСАЦИИ
МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА АТМОСФЕРЫ

Для изучения азотфиксирующей способности микроорганизмов в настоящее время широко применяется ацетилен-этиленовый метод. Он основан на способности азотфиксирующих микроорганизмов специфически восстанавливать ацетилен до этилена. Эта реакция катализируется ферментным комплексом — нитрогеназой. Количественное определение этилена проводится на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором.

Шеллхорн, Буррис (Schöllhorn, Burris, 1966) и Дильворс (Dilworth, 1966) независимо друг от друга обнаружили интересное явление: в бесклеточных экстрактах *Clostridium pasteurianum* ацетилен оказывал ингибирующее действие на процесс азотфиксации. Несколько позже (Schöllhorn, Burris, 1967) была установлена конкурентная природа этого подавления: реакция восстановления C_2H_2 до C_2H_4 аналогична восстановлению N_2 до NH_3 и катализируется теми же ферментами. Оказалось, что ацетилен является сильным ингибитором реакции ферментативного связывания молекулярного азота. Если в газовой фазе среды присутствуют N_2 и ацетилен, нитрогеназа, в первую очередь восстанавливает ацетилен, что объясняется большим электронным сродством азотфиксирующих ферментов по отношению к ацетилену, чем к элементарному азоту. Харди и другие исследователи (Hardy, Knight, 1967; Hardy et al., 1968) предложили использовать указанную реакцию как чувствительный тест для определения и изучения азотфиксирующей системы микроорганизмов и разработали основные методические приемы использования данного метода. Сущность их сводится к следующему: испытываемые микроорганизмы выращивают глубинным методом или в стационарных условиях на безазотной среде, содержащей минимальные («стартовые») дозы азотных соединений; определения ведутся как на целых клетках, так и в бесклеточных экстрактах, содержащих нитрогеназу. Клетки культур, находящихся в ранней фазе логарифмического роста, осаждают центрифугированием, промывают фосфатным буфером (рН 7,2) и суспендируют. Реакцию восстановления C_2H_2 проводят в специальных сосудах вместимостью 40 мл, закрытых притертыми пробками. Инкубационная смесь состоит из клеток, внесенных стерильно в соответствующую среду, и газовой фазы. Объем жидкости составляет 5 мл (1 мл бактериальной суспензии добавляется к 4 мл среды), объем газа — 35 мл (10, 13 кПа C_2H_2 , 20,26 кПа O_2 , 70,91 кПа Ar для аэробов; 10,13 кПа C_2H_2 и 91,17 кПа He для анаэробов). Число клеток приблизительно равно $200 \cdot 10^6$. При использовании ферментных препаратов клетки разрушают, нитрогеназный комплекс разделяют на отдельные фракции, очищают.

Некоторые исследователи убедительно доказывают, что процесс восстановления ацетилена связан с расходом энергии и без АТФ

не происходит (Moustafa, Mortenson, 1967). Необходимо присутствие и других компонентов, в связи с чем инкубационная система должна содержать: АТФ — 5,0; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ — 20,0; креатинфосфат — 56,0; MgCl_2 — 5,0 (моль/мл); а также (мг белков) прогретый экстракт азотфиксирующей бактерии, выращенной в условиях азотфиксации, — 4,0 и креатинкиназу — 0,2.

Препараты нитрогеназы помещают в главное отделение сосуда, источник энергии и редуктанты — в боковое. Из сосудов эвакуируется воздух, содержимое бокового отделения выливается в центральную часть сосуда и вводится газовая смесь. Испытуемая культура или реакционная смесь инкубируются в течение 2—3 ч (или более длительное время в зависимости от особенностей бактерий) при 30° С, затем реакцию останавливают, добавляя в сосуд 0,5 мл 6 н. H_2SO_4 . Образцы газовой фазы после разделения на газовом хроматографе анализируют с помощью пламенно-ионизационного детектора, используя в качестве стандарта исходную (до инкубации) газовую смесь. Появление этилена, образовавшегося при восстановлении ацетилен, свидетельствует о наличии нитрогеназы у микроорганизмов.

В опытах Милехиной и соавт. (1971, 1976) восстановление ацетилен клетками *Az. vinelandii* изучалось при использовании реакционной смеси, содержащей сахарозу (2%-ный раствор) — 0,5 мл, фосфатный буфер (0,025 М, рН 7,2) — 0,5 мл, суспензию клеток — 1,0 мл. Газовая фаза состояла из аргона (88%), кислорода (10%) и ацетилен (2%). Реакционную смесь (2,0—2,5 мл) помещали в 10-миллилитровые шприцы английской фирмы «Chirana LLT». Если опыты проводили в атмосфере аргона и ацетилен, реакционную смесь трижды продували аргоном. Шприцы заполняли газовой смесью, содержащей 2% ацетилен. После инкубации на качалке при 30° С реакцию останавливали, добавляя 0,2 мл 40%-ного раствора NaOH . Газовые смеси (аргон с ацетиленом или аргон с ацетиленом и кислородом) готовят в специальных газовых смесителях, причем диффузия газов в них должна проходить в течение не менее 24 ч. Образование максимального количества этилена отмечалось в суточной культуре азотобактера при парциальном давлении ацетилен, равном 6,06 кПа, и использовании числа клеток в пробе, соответствующем 6,87 мг белка.

На рис. 26, а представлена типичная хроматограмма стандартной смеси ацетилен (C_2H_2 — 10, 13 кПа) и этилен (C_2H_4 — 0,025 кПа). Рисунок 26, б демонстрирует хроматограмму ацетилен и этилен, образовавшихся под воздействием *Cl. pasteurianum* (Hardy et al., 1968). Обращает на себя внимание симметрия пиков C_2H_2 и C_2H_4 и отсутствие других соединений в газовой смеси. При восстановлении ацетилен никакие продукты, кроме этилен, не образуются. C_2H_4 не метаболизируется в отличие от метаболических превращений минеральных и органических форм азота. В отсутствие C_2H_2 образование этилен не происходит. Уменьшение ацетилен в течение реакции происходит пропорционально увеличению этилен.

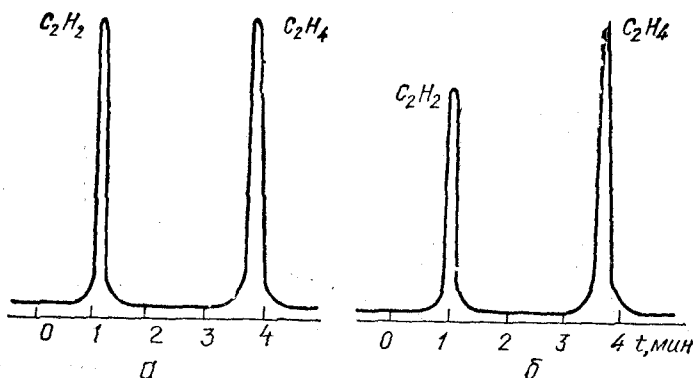


Рис. 26. Типичные газовые хроматограммы, полученные за определенное время удерживания а — стандартной смеси и б — той же смеси после инкубации с *Clostridium pasteurianum* (Hardy et al., 1968).

Таким образом, реакция, катализируемая нитрогеназой, специфична для восстановления ацетилена только до этилена.

Количественное содержание этилена может быть рассчитано по стандартной кривой, отражающей линейную зависимость высоты пика от содержания C_2H_4 или C_2H_2 испытуемого образца (рис. 27).

Ацетилен-этиленовый метод в настоящее время успешно используется в микробиологических исследованиях. Его постоянно совершенствуют: существуют несколько модификаций этого метода применительно к определенным задачам (Калининская и др., 1973; Рао, 1973; Федорова и др., 1979; Умаров, 1976; Алисова, 1979). Получили признание методические приемы, предложенные Т. А. Калининской и соавт. (1973) для изучения активности

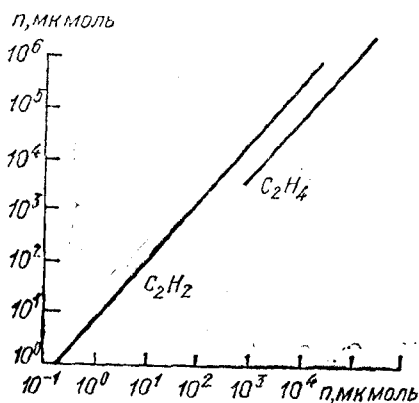


Рис. 27. Стандартная кривая линейной зависимости высоты пика от содержания газов в испытуемом образце (по Hardy et al., 1968).

несимбиотической фиксации азота в почве. Они предусматривают следующие этапы работы.

Образцы почвы массой 5 г, отобранные на глубине пахотного горизонта, увлажняют до 60% полной влагоемкости, помещают в стеклянные пенициллиновые флаконы. Их закрывают резиновыми пробками, которые закрепляют специальными металлическими зажимами. Из флаконов дважды откачивают вакуумным насосом воздух и заполняют им газовой смесью, состоящей из аргона (80%) и кислорода (20%). Для создания в реакционных сосудах анаэробных условий га-

зовое пространство заполняют гелием или аргоном высокой чистоты. Ацетилен вводят в сосуды с помощью шприца (10% общего объема газовой смеси). Инкубируют почвенные образцы в течение 24 ч при 26—28° С в темноте, чтобы исключить развитие фотосинтезирующих микроорганизмов. Наличие образовавшегося этилена определяют в пробах вместимостью 0,5 мл на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором. Для разделения газов используют сорбент силикагель АСК (60—80 меш), помещенный в металлическую колонку диаметром 3 мм и длиной 200 см. Температура колонки 50°, газ-носитель — аргон при постоянном потоке 60—70 мл/мин. Количество образовавшегося этилена определяют по высоте пиков этого газа с помощью стандартной кривой. Расчет активности азотфиксации проводят, используя следующую пропорцию: $C_2H_2 : N_2 = 3 : 1$ (Hardy et al., 1968). Эта пропорция вытекает из уравнений реакций восстановления азота и ацетилена, согласно которым 1 молю фиксированного азота соответствует 3 моля восстановленного ацетилена. Для определения количества фиксированного азота может быть использована такая формула (Зубко, 1975):

$$\frac{(C_2 - C_1) NV}{1000 \eta m},$$

где C_2 — количество восстановленного этилена (наномоли в 1 мл газовой фазы реакционного сосуда); C_1 — количество фонового этилена в тех же единицах); N — молекулярная масса азота, г; V — объем газовой фазы реакционного сосуда, мл; m — масса опытного образца почвы, г; η — отношение восстановленного этилена к азоту; 1000 — коэффициент для пересчета продуктивности азотфиксации, мг N/kg почвы.

Ацетилен-этиленовый метод с газохроматографическим окончанием может быть полезен при определении продуктивности фиксации молекулярного азота в естественных средах, при изучении физиолого-биохимических свойств азотфиксирующих микроорганизмов (свободноживущих и симбиотических), в расшифровке тонких механизмов процесса азотфиксации и в решении ряда вопросов генетической инженерии (Калининская, 1980; Калининская и др., 1973, 1978; Рао, 1973; Зубко, Чундерова, 1976; Маличенко и др., 1979; Ничик, 1979).

Глава 14

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Метод электрофореза основан на одном из электрокинетических явлений—движении заряженных частиц в жидкости под действием электрического поля. Наличие электрического заряда у большинства биологических полимеров и коллоидных частиц (или гранул) обуславливает их движение в постоянном электрическом поле.

Впервые явление электрофореза было обнаружено в начале 80-х годов XIX столетия профессором Московского университета Д. Рейсом. В конце XIX и в начале XX века были заложены основы учения об электрокинетических явлениях, в частности об электрофорезе. Это работы известных ученых Гельмгольца, Смолуховского, Гуи, а позднее — Дебая, Гюккеля, Генри и других. В это время электрофорез изучали с помощью микроскопа главным образом непосредственным наблюдением за движением достаточно крупных частиц. Статус стандартного метода электрофорез получил в 1937 г., когда Тизелиусом был сконструирован удобный прибор для электрофореза. Принципы, положенные в основу конструкции прибора, не изменились и до настоящего времени. Дальнейшее усовершенствование коснулось лишь деталей (Троицкий, 1962; Саминский, 1966).

Суть теории электрофореза заключается в следующем. Если частица с зарядом q суспендирована в непроводящей среде и находится в электрическом поле E , она будет двигаться с постоянной скоростью u , определяемой соотношением между электрической силой Eq и сопротивлением вязкой среды fv , где f — коэффициент трения. Отсюда

$$Eq = fv.$$

Подвижность u определяется как скорость на единицу поля:

$$u = v/E = q/f.$$

Поскольку подвижность зависит от коэффициента трения, который является функцией некоторых физических параметров молекул, значение u дает информацию о размере и форме молекулы. В связи с тем, что среда, в которой происходит движение, обычно является электролитом, состоящим из заряженных ионов, затрудняется движение частиц. Хотя заряженная частица, находящаяся в электролите, притягивает ионы и окружает себя таким образом ионной атмосферой, экранирующей ее от приложенного электрического поля, все же эта ионная атмосфера частично нарушается как полем, так и движением частицы сквозь среду. В настоящее время теория электрофореза не объясняет ни эти, ни другие процессы, а потому не дает возможности получить информацию о макромолекулярной структуре (Фрайфелдер, 1980).

Метод электрофореза в настоящее время широко применяется в аналитических и препаративных целях. Используют следующие разновидности электрофореза: метод движущейся границы (фронтальный электрофорез); зональный электрофорез в градиенте плотности; зональный электрофорез в пористой поддерживающей среде; электрофорез в геле; диск-электрофорез. Микроскопический метод, с которого по сути началось зарождение электрофореза, сейчас имеет в основном историческое значение (Abramson et al., 1942).

Фронтальный электрофорез (метод движущейся границы) также является одним из «старых» методов. Наиболее широкое применение он нашел после изобретения Тизелиусом специального прибора (Саминский, 1966). Современный аппарат для фронтального электрофо-

реза является сложным и дорогим устройством, включающим точную оптику, механические устройства для создания границы раздела, для фотографирования и т. д. (Троицкий, 1962). Суть метода фронтального электрофореза сводится к следующему. В U-образной трубке под буфер подслаивается раствор вещества так, что между обеими жидкостями создается граница раздела. В оба колена трубки помещаются электроды, соединенные с источником постоянного электрического тока. При прохождении тока частицы коллоида начинают перемещаться единым фронтом (отсюда название — фронтальный электрофорез), в результате чего граница раздела начинает менять свое положение. За перемещением границы наблюдают с помощью оптического устройства. В приборе могут применяться любые электроды, например, платиновые или угольные. Чаще всего применяются серебряные электроды, покрытые слоем хлористого серебра и погруженные в насыщенный раствор NaCl, помещенный в нижнюю часть электродных сосудов. Сосуды конструируются таким образом, чтобы возникающими конвекционными потоками продукты электролиза не заносились в измерительную ячейку.

Фронтальный электрофорез является единственным методом, позволяющим определить подвижность и изоэлектрическую точку белка с высокой точностью. Данные фронтального электрофореза часто помогают правильно выбрать условия и идентифицировать белковые компоненты при разделении смесей в зональном электрофорезе.

Для препаративного разделения метод фронтального электрофореза малопродуктивен. Это связано с тем, что существуют трудности в отделении фракций друг от друга. Кроме того, этот метод неприменим для анализа смесей низкомолекулярных веществ.

Указанные недостатки отсутствуют у метода зонального электрофореза, который в историческом плане — самый молодой.

Зональный электрофорез с применением градиента плотности проводится в трубке с буферным раствором, плотность которого возрастает с глубиной. Это достигается добавлением какого-либо тяжелого недиссоциирующего вещества (сахарозы) с переменной концентрацией. Вводить исследуемое вещество в ячейку можно через капилляр. Если образец растворен, необходимо довести плотность раствора до плотности буфера. Метод вполне пригоден для разделения низкомолекулярных веществ.

При зональном электрофорезе используют нейтральный носитель: различные гели, порошки, бумагу и т. д. На носитель наносят исследуемое вещество в виде пятна или тонкого слоя и помещают в постоянное электрическое поле, в результате чего молекулы перемещаются по капиллярам материала-носителя. Для полноты разделения необходимо использовать небольшое количество вещества. Носитель иногда может адсорбировать молекулы различного типа или действовать в качестве молекулярного сита, приводя к хроматографическим эффектам. Это свойство может ухудшать или улучшать разделение. Одним из наиболее используемых методов зональ-

ного электрофореза является метод электрофореза на бумаге. Различают низковольтный (20 В/см) и высоковольтный (200 В/см) электрофорезы на бумаге. Низковольтный электрофорез малоэффективен для разделения веществ с малым размером молекул (аминокислот, нуклеотидов и т. д.), поскольку из-за малого заряда они обладают низкой подвижностью и, следовательно, очень медленно разделяются. Малый размер молекул способствует значительному размыванию зон за счет диффузии. Этот метод чаще всего используют для анализа смесей белков, которые плохо разделяются хроматографическими методами. Для низкомолекулярных веществ более эффективен высоковольтный электрофорез.

При применении этого метода образец наносят в виде пятна, как при хроматографии на бумаге, но обычно ближе к середине листа. Бумагу насыщают буфером, после чего оба ее конца погружают в

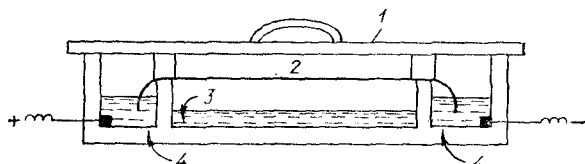


Рис. 28. Аппарат для низковольтного электрофореза на бумаге (Фрайфелдер, 1980):

1 — крышка с ручкой, 2 — бумага, 3 — вода для поддержания влажности, 4 — буфер.

сосуд с буфером для осуществления электрического контакта с электродами (рис. 28). Систему закрывают для предотвращения высыхания бумаги. После истечения определенного времени бумагу вынимают и высушивают. Разделенное вещество может быть обнаружено по его окраске, по флюоресценции или при окрашивании различными красителями. Для количественного определения вещество можно элюировать и определять спектрофотометрически.

Стабильность электрического режима достигается применением стабилизированных источников электрического тока и больших электродных сосудов, снабженных лабиринтом для защиты бумаги от продуктов электролиза. Несмотря на эти меры, электрохимические процессы в самой бумаге создают неоднородность на всем протяжении пути, по которому идет вещество, что приводит к известному рода ошибкам.

Смещение зоны вещества в носителе может происходить под влиянием не только электрофореза, но и течения буферного раствора через бумагу, которое может происходить под влиянием эндоосмоса; силы тяжести из-за разности уровней в электродных сосудах; испарения. Если полоска бумаги находится в открытом пространстве, вода с ее поверхности непрерывно испаряется, а взамен из электродных сосудов поступают новые порции буфера. В результате — от обоих электродов к центру течет жидкость, которая смещает зону вещества. Это явление носит название неофореза. Кроме такого продольного тока существует течение жидкости поперек полосы, так как

испарение по ее краям выражено больше. Испарение воды приводит к увеличению концентрации солей буфера, пропитывающего бумагу, и создает неравномерное распределение электропроводности. Испарение может быть уменьшено в результате охлаждения электрофоретического аппарата. Однако при использовании невысокого градиента напряжения охлаждение нецелесообразно, так как оно удорожает конструкцию. При использовании высокого напряжения охлаждение бумаги необходимо. Его производят либо за счет погружения разделяющейся смеси в объем несмешивающейся и электроизоляционной жидкости или прижимают к охлаждающей поверхности.

Метод электрофоретического разделения веществ имеет ряд преимуществ по сравнению с другими физико-химическими методами. Этот метод позволяет разделить смесь веществ, близких по их химической природе, тогда как обычными химическими методами можно разделить смесь веществ только на группы, значительно различающиеся по своим свойствам. Особое значение метод электрофореза имеет для разделения веществ, растворяющихся только в воде. В этом случае отступает на второй план даже ставший классическим метод распределительной хроматографии, для которого необходимо наличие системы двух или более растворителей. Кроме того, электрофорез является одним из немногих методов, которые пригодны для разделения крайне неустойчивых коллоидов.

Зональный электрофорез применим для разделения любых ионов как сложных органических, так и неорганических. Биохимики широко используют этот метод для анализа белков (ферментов, гормонов и др.), кислот, в частности, нуклеиновых; микробиологи — для анализа продуктов метаболизма микроорганизмов; почвоведы — для исследования различных фракций гумусовых веществ, а также комплексообразования гуминовых кислот с медью и железом (Кононова, 1963).

ИССЛЕДОВАНИЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

Электрофорез применялся многими исследователями для разделения гуминовых кислот различного происхождения на отдельные фракции. Наличие многочисленных хелатных групп в молекуле гуминовой кислоты является предпосылкой взаимодействия гуминовых кислот с другими соединениями (металлами, минералами) в почве, что в свою очередь делает возможным исследовать гуминовые кислоты электрофоретически (Поспичил, 1962; Дьяконова, 1962; Кононова, 1963).

С помощью метода зонального электрофореза мы исследовали гуминовые кислоты почв, бурых углей, а также их взаимодействие с металлами (Гордиенко, Ивахно, 1971).

Для фракционирования гумусовых веществ применяли приборы типа ЭФ-2 и другие; уменьшения испарения буфера достигали с помощью дырчатой пластинки, которая укладывалась в ванну, на

нее клали фильтровальную бумагу, смоченную водой, и прибор плотно закрывали крышкой.

Гуминовые кислоты в щелочных буферах (рН равно 8,68) при напряжении 400 В и силе тока 20 мА разделялись на три-четыре фракции (рис. 29). На старте оставалась фракция сероокрашенных веществ, более подвижной оказывалась бурая фракция, а на переднем плане электрофореграммы обнаруживалась желтоокрашенная фракция, состоящая, вероятно, из низкомолекулярных веществ. Торфяные гуминовые кислоты также различались по подвижности и зависели от вида торфа. Электрофореграммы фульвокислот и гуминовых кислот замглайского торфа отличались более подвижной однородной фракцией фульвокислот и менее подвижной многокомпонентной фракцией гуминовых кислот.

Метод электрофореза позволяет изучать связь некоторых металлов с гуминовыми кислотами. Так, метод встречного электрофореза был применен для исследования взаимодействия гуминовых кислот с медью, а метод зонального — для изучения искусственно приготовленных комплексов гуминовых кислот с медью.

В первом случае на бумагу наносили на определенном расстоянии друг от друга капли гуминовой кислоты и раствора соли меди в двух различных концентрациях. Ионы меди двигались навстречу молекулам гуминовой кислоты и, подойдя, вступали во взаимодействие с ними. Во втором случае предварительно приготовленный комплекс гуминовой кислоты с медью был растворен в щелочном буфере и помещен в электрофоретическую камеру. Комплекс распределяется в электрическом поле на фракции в соответствии с различным содержанием меди в них.

Метод электрофореза можно также использовать при изучении степени доступности микроорганизмами металлов из комплексных соединений.

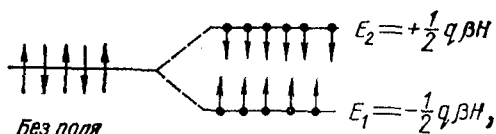
Глава 15

ЭЛЕКТРОННЫЙ ПАРАМАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС

Открытие явления электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), сделанное в 1944 г. Е. К. Завойским, стало началом новой области науки — магнитной радиоспектроскопии. Спустя 10 лет

методом ЭПР-спектроскопии были проанализированы первые биологические объекты — зеленые листья. В настоящее время метод ЭПР успешно применяется при изучении биологических повреждений, возникающих под действием излучений, фотосинтетических процессов, ферментов, металлоорганических соединений.

Сущность метода ЭПР заключается в том, что в присутствии внешнего магнитного поля и при подаче электромагнитного излучения электроны разбиваются на две группы, каждая из которых обладает своим энергетическим уровнем. Схематически это можно выразить следующим образом:



где g -фактор — константа спектроскопического расщепления; β — магнетон Бора (внутренний магнитный момент, связанный со спином свободного электрона); H — напряженность магнитного поля. При $\Delta E = h\nu = g\beta H$ ориентированные в магнитном поле электроны находятся в резонансе с переменным полем: они могут получать от него или отдавать ему энергию. Поглощая квант энергии, одни неспаренные электроны переходят с более низкого энергетического уровня E_1 на верхний E_2 . В то же время электроны с верхнего уровня переходят на нижний, теряя при этом квант энергии. Обычно на нижнем энергетическом уровне всегда больше неспаренных электронов, поэтому поглощение энергии преобладает над ее излучением. Резонансное поглощение энергии возможно только для соединений, содержащих неспаренные электроны (например, для свободных радикалов). Свободные радикалы обнаружены в таких важных соединениях, как витамины (B_2 , К и С), нуклеиновые кислоты, аминокислоты и белки. Благодаря высокой энергии неспаренных электронов свободные радикалы играют важную роль в химических или биологических процессах. Обнаружение радикалов в биологических системах позволяет судить о реакционной способности субстратов и природе реакций.

Вещества, содержащие неспаренные электроны, можно разделить на две группы. К первой группе относятся вещества, в которых неспаренный электрон связан со всей молекулой или с большей ее частью. В этих веществах неспаренные электроны перемещаются по сильно делокализованным молекулярным орбиталям и обуславливают разнообразную активность атомных группировок, входящих в состав молекулы. Изучение делокализованных неспаренных электронов веществ первой группы важно для понимания механизма таких процессов, как радиационные повреждения клетки, образование различных промежуточных продуктов при катализе. Ко второй группе относятся вещества, в которых неспаренный электрон связан только с одним атомом, обычно переходной группы — Fe, Co, Ni;

число таких электронов в атоме, как и их энергия, широко изменяется с изменением валентности того атома, которому они принадлежат. Изучение таких биологических систем дает нужные сведения о характере связей исследуемого атома и степени его окисления. Процессы окисления атомов переходных металлов исследуются при изучении процессов почвообразования и деятельности микроорганизмов в почве.

Изучение спектров ЭПР различных объектов проводится на специальных приборах — спектрометрах ЭПР. На рис. 30 изображена

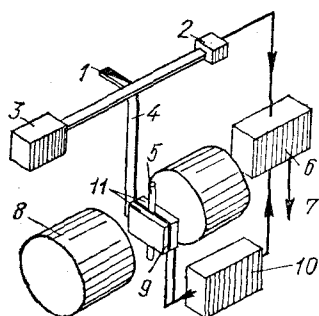


Рис. 30. Схема спектрометра ЭПР с двойным Т-мостом (Маклочан, 1976):

1 — нагрузка, 2 — кристаллический детектор, 3 — клистрон, 4 — волновод, 5 — ампула с образцом, 6 — фазово-чувствительный детектор, 7 — выходной сигнал, 8 — магнит, 9 — резонатор, 10 — блок модуляции, 11 — катушки модуляции.

схема спектрометра ЭПР с двойным Т-образным мостом (Маклочан, 1976). Основными блоками спектрометра являются: резонатор, сильный магнит, источник микроволнового излучения (клистрон), детектор. «Сердцем» спектрометра ЭПР является резонатор, расположенный между полюсами. На образец, помещенный в резонатор, подается от клистрона микроволновое излучение частотой от 9000 МГц (X-диапазон) до 36 000 МГц (Q-диапазон). Одновременно с помощью магнита создается стабильное постоянное магнитное поле. Обычно при длине волны 3,2 см (X-диапазон) напряженность магнитного поля составляет от 238 732,5 до 318 310 А/м; при длине волны 8 мм и меньше (Q-диапазон) напряженность повышается до 1 034 507,5 А/м и более. Микроволновой сигнал из резонатора поступает на детектор, в котором

преобразуется в низкочастотный сигнал. Наблюдение за спектрами и их запись производится с помощью электронного устройства.

Линии спектра (рис. 31) характеризуются интенсивностью, шириной, формой и q -фактором. Интенсивность линии поглощения спектра определяется разницей заселенности электронами двух энергетических уровней и позволяет судить о концентрации неспаренных электронов в образце. С помощью этого параметра, кроме того, можно следить за изменением концентрации свободных радикалов. Уширение резонансной линии, ее «размазывание», обусловливается разбросом энергетических уровней и свидетельствует о различных взаимодействиях неспаренного электрона. Тип взаимодействия не только вызывает уширение линий, но и влияет на их форму. Так, спин-спиновое взаимодействие, в результате которого спины обмениваются энергией между собой, характеризуется линией поглощения гауссовой формы (рис. 31, а). Спин-решеточное взаимодействие, в результате которого энергия, поглощенная неспаренным электроном, возвращается либо решетке, либо всей молекулярной системе в целом, приводит к лоренцовой форме линии (рис. 31, б); она

уже в центре и имеет, в отличие от гауссовой линии, длинные «крылья».

q -Фактор (константа спектроскопического расщепления) определяет значение магнитного поля, соответствующее резонансу, дает сведения о локализации неспаренного электрона. Измерение q -фактора позволяет получить информацию о тонких деталях электронной структуры парамагнитного центра. q -Фактор свободного, т. е. не обладающего угловым моментом, электрона равен 2,0023. Приближение к этому значению указывает на слабую связь спинового и

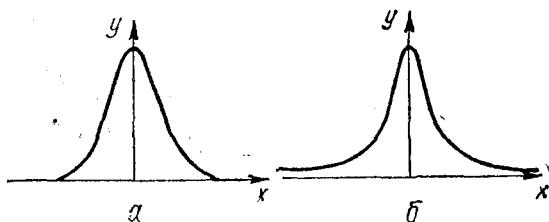


Рис. 31. Гауссова (а) и лоренцова (б) формы линий поглощения в спектре ЭПР (Ингрэм, 1972):

y — интенсивность поглощения, x — частота или напряженность магнитного поля.

орбитального моментов, на существование сильно делокализованной молекулярной орбитали. Отличие q -фактора от 2,0023 характеризует тип связей исследуемого атома или молекулы.

В микробиологических исследованиях ЭПР-спектроскопия может быть использована при изучении биологической активности веществ; механизмов окислительно-восстановительных реакций; процессов фотосинтеза. Метод ЭПР широко используется при изучении веществ меланиновой природы. Однако ЭПР-спектроскопия не получила должного применения в биологических исследованиях. По-видимому, это можно объяснить наличием в большинстве биологических объектов короткоживущих свободных радикалов, изучение которых требует специальных приемов и дополнительных приспособлений. Кроме того, сигнал ЭПР ослабляется в присутствии воды, обладающей высокой диэлектрической проницаемостью, вследствие чего наблюдаются большие диэлектрические потери.

Для «продления жизни» короткоживущим свободным радикалам реакционную смесь (образец) в максимально короткий срок вводят в охлажденную жидкость (жидкий азот или гексан). Время замораживания не превышает 10 мкс. Короткоживущие радикалы после такой обработки сохраняются в течение 50 мкс и более. Этого срока бывает достаточно для снятия спектра. Замораживание клеточного материала позволило обнаружить свободные радикалы у *Arthrobacter* sp. в спорах и вегетативных клетках *Bacillus subtilis*.

В некоторых случаях прибегают к удалению воды из клеток микроорганизмов путем лиофилизации либо высушивания в сушильном шкафу вначале при 45—50° С, затем при ~40° С в течение часа.

Влажность клеток после высушивания обычно составляет 7—8%. Определенное количество материала (70 мг клеток) помещают в стеклянный капилляр и снимают спектры ЭПР. Так были получены спектры *Saccharomyces cerevisiae* при изучении процессов их роста и клеточного деления (Самойлова, Блюменфельд, 1961).

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА ФОТОСИНТЕЗА У ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Изучение спектра ЭПР фотосинтезирующих бактерий позволяет судить о функциональном значении отдельных пигментов или их форм в процессе образования первичных продуктов. Спектры ЭПР были получены при исследовании клеток пурпурных и зеленых бактерий (Рихирева и др., 1964; Рихирева и др., 1967; Тимофеев, Рубин, 1972). «Бактериальный» тип ЭПР характеризовался синглетным спектром, большой скоростью образования и затухания сигналов (при включении и выключении света) как при комнатной, так и при низких (77° К) температурах, отсутствием стабилизации фотоиндуцированных парамагнитных центров при низкой температуре.

Для измерения спектров ЭПР образцы подготавливали следующим образом (Рихирева и др., 1964): трехкратно отмытые водопроводной водой клетки центрифугировали в течение 10 мин при ускорении, равном 8000/60 с⁻¹. Исследуемую суспензию клеток помещали в тонкостенные кварцевые трубки диаметром 2,5—3,5 мм. Спектры ЭПР влажных образцов измеряли при температуре жидкого азота (—196° С), поместив в полость резонатора кварцевый сосуд Дьюара с жидким азотом. Для измерений при комнатной температуре бактериальные клетки высушивали с помощью формвакуумного насоса при комнатной температуре в течение 1,5—2 ч. Измерения проводили в ЭПР-спектрометре с высокочастотной модуляцией (465 кГц). В качестве источника света использовали лампу накаливания (340 Вт, 24 В), фильтр КС-10. Свет в резонаторе фокусировали с помощью системы из двух линз. В зависимости от поставленной цели, измерение ЭПР проводили в присутствии воздуха или в вакуумированных (10⁻² мм рт. ст.) запаянных трубках.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЛАНИНОВ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Слово «melaninos» в переводе с греческого означает «черный». Меланины рассматривают как высокомолекулярные полимеры, образующиеся при ферментативном окислении фенолов (пирокатехина, 3,4-диоксифенилаланина — ДОФА, 5,6-диоксииндола) и других «меланиногенных» субстратов.

По определению С. П. Лях и Е. А. Рубан (1968), бактериальные меланины — это черные или коричневые, иногда красновато-коричневые пигменты, обычно не растворимые в органических раствори-

телях и растворимые в щелочи (иногда и в воде), обладающие неспецифическими спектральными характеристиками.

Меланиногенез — явление общебиологическое. Известны меланины животного и растительного происхождения. Меланинами и меланиноподобными пигментами обладают многие почвенные, главным образом аэробные микроорганизмы. Коричневые и черные пигменты обнаружены у представителей родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Actinomyces*.

Особенно широко меланинсинтезирующая способность проявляется у микроскопических грибов.

Физиологические функции меланинов разнообразны. В бактериальных клетках образование меланинов связано с «деградационным» метаболизмом, со старением культуры. В некоторых случаях синтез меланина можно рассматривать как реакцию детоксикации фенолов. У грибов меланины выполняют защитную функцию, предохраняя клетки от поражающего действия электромагнитных излучений. Кроме того, с присутствием меланинов связывают устойчивость темноцветных организмов к биологической деградации. Физиологические функции меланинов во многом объясняются наличием в них стабильных свободных радикалов в высоких концентрациях — 10^{17} — 10^{19} парамагнитных частиц на 1 г сухого вещества (Рубан и др., 1968; Жданова, Походенко, 1970).

Использование метода ЭПР-спектроскопии для изучения меланинов позволяет раскрыть полупроводниковые свойства этих пигментов, объяснить механизм миграции энергии в системах, фото- и радиозащитную функции. Изучение методом ЭПР меланиногенеза *in vitro* позволяет приблизиться к выяснению синтеза меланина *in vivo*.

Из микробных меланинов методом ЭПР-спектроскопии были изучены меланины черных дрожжей *Nadsoniella nigra* (Рубан и др., 1968) и 13 видов почвенных гифомицетов (Жданова, Походенко, 1970). При изучении спектров ЭПР меланина экзо- и эндопигменты получают по методам, описанным Лях и Рубан (1972). Полученные меланины помещают в ампулу из кварцевого стекла. Спектры ЭПР снимают на радиоспектрометре при комнатной температуре. Внутренним стандартом служат ионы Mn^{2+} в кристаллической решетке MgO . Концентрацию парамагнитных частиц в пигментах вычисляют путем сравнения спектров со стандартным образцом дифенилпикрилгидразина (Рубан и др., 1968). Для изучения спектров ЭПР в пленке грибов р. *Cladosporium* (Жданова, Походенко, 1970) грибы

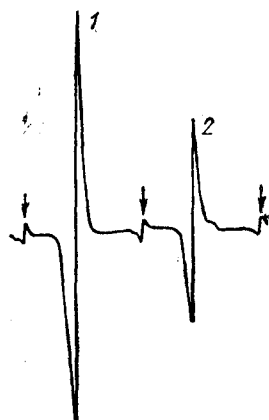


Рис. 32. Спектры клеточных меланинов микроорганизмов (Рубан, Фомин, Лях, 1968):

1 — штамм 365 и 2 — штамм 1—365.

Стрелками показаны сигналы внутреннего стандарта.

выращивали в жидкой среде — сусле. По истечении 10 сут культуру снимали со среды, высушивали до постоянной массы, измельчали пленку, помещали в стеклянные ампулы и измеряли сигнал ЭПР на спектрометре.

Спектры ЭПР меланинов микробного происхождения представляют собой слегка асимметричные сигналы синглетного характера (рис. 32) без сверхтонкой структуры со значением g -фактора, близким к значению свободного электрона, и с расстоянием между точками максимального наклона около 497,465 А/м, что свидетельствует о присутствии в их молекулах стабильных парамагнитных структур. Линия спектра имеет форму, среднюю между лоренцевой и гауссовой.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА ПОЧВЫ

Гуминовые кислоты содержат относительно высокую концентрацию устойчивых свободных радикалов, которые оказывают большое влияние на многие реакции, встречающиеся в почвах.

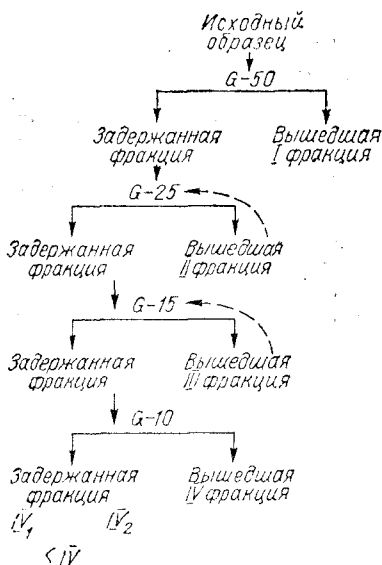


Рис. 33. Схема фракционирования фульвокислот.

Природа свободных радикалов в этих веществах еще не ясна. Есть предположение о том, что хинонные группы в гуминовых кислотах действуют как акцепторы электрона, а амины или фенольные гидроксилы — как доноры, образуя радикалы семихинонного типа. Парамагнетизм гуминовых соединений может возникать от целого ряда источников, таких, как семихинонный полимер, адсорбирующий комплекс, оксихинон, полиядерный углеводород или «пойманный» радикал. Было установлено, что в лигнине свободные радикальные участки могут становиться неустойчивыми в том случае, когда содержат внутри основы комплексной структуры сетку, так называемые клеточные радикалы. Специфическая устойчивость свободного радикала в гуминовых кислотах продемонстрирована удерживанием сигнала после кипячения препаратов гуминовых кислот с 6 н. HCl или с 4 н. NaOH.

Методом ЭПР можно исследовать сравнительное содержание парамагнитных центров в гуминовых кислотах различного происхождения, исследовать гуминоподобные вещества, меланины, меланоидины, синтезированные микроорганизмами, изучать влияние на

содержание свободных радикалов химических воздействий, взаимодействие между собой свободных радикалов и определять среднюю молекулярную массу различных гуминовых фракций, а также исследовать спектроскопические свойства этих соединений.

Фракционирование гуминовых кислот в процессе исследования их ЭПР-спектров проводят на колонках с различными сефадексами. Процедура деления на фракции повторяется до тех пор, пока не будет достигнуто полного разделения и все вещество элюируется в «пустом объеме» (рис. 33).

Для снятия ЭПР-спектров образцы измельчают, высушивают в вакуум-экзикаторе над P_2O_5 и помещают в специальные стандартные трубочки. Магнитное поле калибруют с помощью дифенилпикрилгидразина.

Участие гуминовых кислот в реакциях комплексообразования также можно изучать методом ЭПР, поскольку этот метод является наиболее надежным для определения концентрации образующихся металлоорганических комплексов (Браташевский, Гайдаров, Гордиенко, 1971). На рис. 34 изображен типичный спектр ЭПР, полученный с помощью трехсантиметрового радиоспектроскопа на приготовленных образцах гуминовой кислоты с различным содержанием марганца. Часть спектра, состоящая из шести компонент, характерна для двухвалентного марганца в кристаллическом поле кубической симметрии. Изотропный характер и относительно высокое значение сверхтонкого расщепления дают основание сделать некоторые выводы относительно природы химической связи и симметрии окружения иона. Наблюдаемое падение концентрации свободных радикалов по мере увеличения содержания марганца, введенного в гуминовую кислоту, свидетельствует о возникновении химической связи марганец — свободный радикал, сопровождающейся спариванием электронов свободных радикалов, проявляющихся до этого в спектре ЭПР. Эта зависимость в полулогарифмическом масштабе хорошо укладывается на прямую. Таким образом, концентрация свободных радикалов, как функция концентрации атомов марганца, введенного в гуминовую кислоту, может быть описана формулой $n_{ср} = n_0 C^e$, где $n_{ср}$ — концентрация свободных радикалов, n_0 — начальная концентрация свободных радикалов в отсутствие ионов марганца, C — характеристическая константа процесса, имеющая размерность концентрации. По физическому смыслу константа C является концентрацией ионов марганца, соответствующей уменьшению концентрации свободных радикалов в e раз.

При начальной концентрации свободных радикалов $n_0 = 10^{20-1}$ г константа C оказалась равной $2 \cdot 10^{19-1}$ г. Таким образом, на



Рис. 34. Спектры ЭПР в порошках гуминовой кислоты юрковского бурого угля с различным содержанием марганца:

а — 1,01; б — 6,3; в — 18,05 мг/л.

$2 \cdot 10^{19}$ ионов марганца в одном грамме гуминовой кислоты приходится $n_0 (1 - e) = 7,7 \cdot 10^{19}$ свободных радикалов, вступивших в соединение с марганцем. Отсюда на один ион марганца приходится

$$m = \frac{7,7 \cdot 10^{19-1} \Gamma}{2 \cdot 10^{19-1} \Gamma} = 3,8 \approx 4 \text{ свободных радикала.}$$

Полученное значение можно, по-видимому, считать координационным числом образующихся марганцеорганических комплексов гуминовой кислоты.

Глава 16

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АЗОТФИКСИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

В основе масс-спектрометрического метода лежит разделение ионов анализируемого вещества электрическим и магнитным полями по различным отношениям массы m к заряду e .

Частица с массой m и зарядом e , попадая в магнитное поле H , испытывает действие силы Лоренца:

$$F = evH, \quad (1)$$

где v — скорость частицы. Под действием этой силы при условии постоянства v и H частица движется по окружности радиусом r . Приравняв силу Лоренца центробежной силе, получим равенство

$$evH = mv^2/r.$$

Отсюда радиус траектории (2)

$$r = mv/eH.$$

Так как энергия частицы, ускоренной разностью потенциалов, будет

$$\frac{mv^2}{2} = eU, \quad (3)$$

то, используя (2) и (3), получаем

$$r = \sqrt{2 \frac{m}{e} U/H}. \quad (4)$$

Выражение (4) является основным уравнением масс-спектрометрии. Из него следует, что при постоянных значениях ускоряющего потенциала U и напряженности магнитного поля радиус является функцией отношения m/e . Это означает, что частицы с одинаковым зарядом, но с различной массой, будут двигаться по различным траекториям (Бейнон, 1964; Шеховцов, 1971).

Испытуемое вещество вводится в масс-спектрометр и подвергается ионизации. Ионы с различной массой разделяются под действием электрического и магнитного полей и попадают на собирающий электрод-коллектор. Путем изменения ионных токов определяют отношение концентрации изотопов. В результате получают данные о составе исследуемого вещества. Блок-схема масс-спектрометра подробно описана у Шеховцова (1971).

Современные масс-спектрометры позволяют выполнять не только качественные, но и количественные определения, что очень важно в аналитических исследованиях. Они используются для решения основных задач, связанных с выяснением изотопного состава веществ, с точным определением масс и проведением химических анализов веществ. Работа может выполняться с использованием веществ, содержащих изотопы различных элементов, таких, как углерод (^{13}C), кислород (^{18}O), азот (^{15}N), дейтерий (^2H).

Масс-спектрометрический метод приобретает все большее значение в различных областях науки и практики (в химии, геологии, биологии, в металлургической, нефтяной и химической промышленности, в медицине и сельском хозяйстве). В настоящее время этот метод получил широкое применение в микробиологии, в частности при исследовании вопросов биологической фиксации молекулярного азота атмосферы с помощью азота, меченного изотопом ^{15}N .

Изотопная техника определения азота в органических соединениях была разработана Риттенбергом и соавт. (Rittenberg et al., 1939) и введена в микробиологическую практику Буррисом (Burris, 1941; Burris et al., 1942; Burris et al., 1943). Благодаря высокой чувствительности, превосходящей в тысячу раз чувствительность метода Къельдаля, этот метод широко и успешно применяется для изучения азотфиксирующей способности микроорганизмов и для расшифровки механизма процесса биологической фиксации азота. Он оказывает большую помощь микробиологам в поисках в природе новых форм азотфиксаторов, список которых значительно расширился, и включает в настоящее время многочисленные микроорганизмы, различающиеся по систематическому положению и физиологическим свойствам.

Использование масс-спектрометрического анализа особенно необходимо при изучении слабых азотфиксаторов, у которых увеличение азота нередко находится на грани погрешности определения.

Имеется ряд работ, содержащих сведения методического характера об определении способности свободноживущих азотфиксаторов использовать ^{15}N (Hamilton et al., 1953; San-Pietro, 1957; Зайцева и др., 1961; Львов, Любимов, 1965; Применение стабильного изотопа ^{15}N в исследованиях по земледелию, 1973; Методы применения изотопа азота ^{15}N в агрохимии, 1977). Однако данные о режиме работы масс-спектрометра, о подготовке и проведении анализов образцов и условиях, которые при этом должны соблюдаться, неполны.

В настоящей главе обобщен накопленный в отделе общей и почвенной микробиологии Института микробиологии и вирусологии

АН УССР опыт применения изотопного метода для изучения азотфиксирующей способности олигонитрофильных микроорганизмов, характеризующихся своеобразными физиологическими особенностями и требующих специальных методических подходов при их исследовании. Основные методические приемы, которыми мы пользовались при выполнении анализов на масс-спектрометре, описаны в специальном сообщении (Мальцева, Юрченко, 1971).

Как и при изучении процесса азотфиксации у других микроорганизмов, нами применялся тяжелый изотоп азота ^{15}N . Отсутствие изотопного эффекта делает метод, основанный на использовании этого меченого элемента, особенно ценным в работе с живыми микробиологическими объектами (клетками и культурами). Кроме того, постоянство стабильного изотопа азота дает возможность применять его в длительных опытах, которые совершенно необходимы при исследованиях (например, при выяснении интенсивности протекающего непосредственно в биосфере процесса фиксации элементарного азота).

Процесс азотфиксации у микроорганизмов можно измерять также по включению в клетки радиоактивного изотопа ^{13}N (Nicholas et al., 1961; Campbell et al., 1967). Этот метод достаточно чувствителен, однако в связи с коротким периодом полураспада радиоактивного изотопа азота (10 мин), влиянием радиоактивности на физиологические процессы в клетке и некоторыми техническими трудностями его применение ограничено.

Испытуемые олигонитрофилы высевали на безазотные среды и среды, содержащие низкие дозы связанного азота (5—15 мг/л), а также в почву (нестерильную и простерилизованную) с внесением органического вещества и без него. Использовали жидкие среды, разлитые по 25 мл в колбы Эрленмейера вместимостью 100 мл, и плотные (агаризованные или гелевые) пластинки, пропитанные средой в чашках Петри. Почву по 5—10 г, влажность которой предварительно доводили до 60% общей влагоемкости, помещали слоем 0,5 см в чашки Петри (диаметр чашек 4,5—6,0 см) и заражали чистыми и ассоциативными культурами олигонитрофилов. Для изучения интенсивности процесса азотфиксации, протекающего непосредственно в почве, почвенные образцы специально не заражали культурами олигонитрофилов.

Бактерии выращивали при 28° С в вакуумных эксикаторах, из которых вначале выкачивали воздух до остаточного давления 1333,22—3999,66 Па, затем их заполняли до 101,325 кПа из газометра предварительно приготовленной газовой смесью, по составу близкой к составу воздуха: азот — 79,0%, кислород — 20,9%, углекислый газ — 0,1%. Вместо ^{14}N вводили газообразный азот, обогащенный изотопом ^{15}N . Степень обогащения азота атмосферы изотопом ^{15}N в опытах варьировала от 9 до 90 ат. %.

В связи с медленным развитием олигонитрофилов культуры выращивали в течение 6—10 сут и более, а образцы почвы инкубировали в атмосфере меченого азота 28—30 сут. Выделявшаяся углекисло-

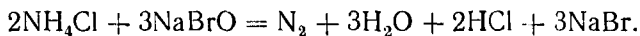
та поглощалась 0,1 н. NaOH, благодаря чему сохранялся постоянным уровень концентрации кислорода. На протяжении инкубации кислород, использованный бактериями, пополняли. По окончании выращивания клетки и среды (раздельно и суммарно) анализировали на содержание общего азота по микрометоду Къельдаля.

Наряду с изучением азотфиксирующей активности развивающихся культур олигонитрофилов, определяли их способность ассимилировать ^{15}N при использовании суспензии отмытых клеток в кратковременном опыте (4—5 ч) (Любимов и др., 1965). Олигонитрофилы выращивали в жидкой среде в колбах большого объема для накопления достаточного количества клеток (5—10 млрд) и взвесь их в безазотной среде Федорова помещали в колбы Эрленмейера объемом 50 мл, герметически закрывающиеся пробками со шлифами и снабженные боковым отростком для откачивания воздуха и введения газовой смеси, содержащей ^{15}N . Эти опыты позволили за непродолжительное время выяснить влияние ряда факторов на азотфиксирующую способность олигонитрофилов (различных форм и концентраций связанного азота, аэрации, микроэлементов, биологически активных веществ и др.).

Для перевода азота органических соединений в минеральную форму образцы сжигали путем нагревания в окислительной смеси: концентрированная серная кислота (3—10 мл), 1 мл 10%-ного CuSO_4 и 1 г K_2SO_4 . Если органическое вещество трудно минерализуется, положительные результаты дает замена CuSO_4 или K_2SO_4 на HgSO_4 (Верховская и др., 1955). При сжигании образцов, богатых органическим веществом, весьма эффективным оказалось в наших опытах добавление к минерализуемой смеси нескольких капель хлорной кислоты (HClO_4), как рекомендуют Гинзбург и соавт. (1963). Могут быть использованы и другие катализаторы: Se, H_2O_2 , а также смешанный катализатор Se—HgSO_4 (Кралева и др., 1967).

В результате минерализации органические соединения азота превращались в сульфат аммония. При добавлении к нему в избытке щелочи в аппарате Къельдаля выделялся аммиак, который отгоняли парами воды и улавливали 0,10—0,01 н. HCl . После титрования дистиллят слегка подкисляли, чтобы не произошли потери азота при нагревании, и упаривали на водяной бане для удаления растворенных газов.

Азот, находящийся в образце в связанном состоянии в виде хлористого аммония, переводили в элементарную форму. Этот прием выполняли в специальной стеклянной системе напуска газа, в которой аммиак окисляли в вакууме с помощью гипобромита натрия по следующему уравнению (Риттенберг, 1948):



Раствор гипобромита (1 мл) окисляет 10—12 мг аммиака до элементарного азота. Для приготовления гипобромита 200 г NaOH растворяют в 300 см³ воды. Половину этого раствора охлаждают льдом и добавляют при сильном перемешивании около 60 см³ брома. Добав-

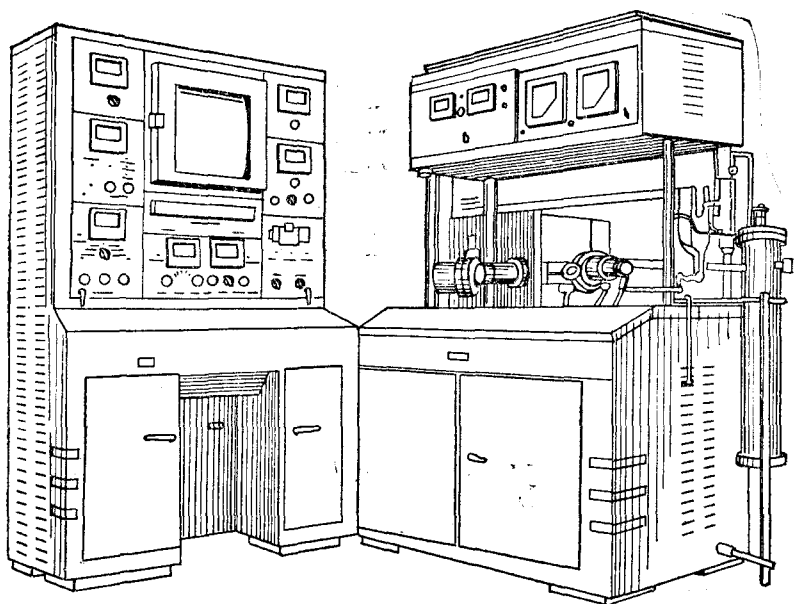


Рис. 35. Масс-спектрометр МИ-1305 (общий вид).

ление брома проводится небольшими порциями в течение 10 мин, затем приливают оставшийся раствор щелочи. Гипобромит сохраняет свою активность в течение нескольких месяцев, если его держать на холоду в темной склянке. После приготовления раствора гипобромита выпадает обильный осадок NaBr , который отфильтровывают. Непосредственно перед употреблением реактив разбавляют равным объемом воды.

Изотопный состав азота определяли на отечественном масс-спектрометре марки МИ-1305 (рис. 35). Это один из самых распространенных серийных приборов для изотопного анализа. Он представляет собой универсальный аппарат, предназначенный для анализа газообразных, твердых веществ и паров легколетучих веществ, и позволяет измерять массы в диапазоне от 1 до 400 ат. %.

Прибор состоит из двух частей — аналитической (вакуумной) и измерительной (электронной). В первой размещены: камера анализатора с источником и приемником ионов, электромагнит, детали газонапускной системы, вакуумные насосы и коммуникации. В электронной стойке расположены следующие основные блоки: стабилизированных источников питания, электрометрических схем, стабилизаторов тока эмиссии и ускоряющего напряжения, питания электромагнита и ионизационных манометров. Кроме того, в этой системе имеется автоматический индикатор массовых чисел, самописец и другие измерительные и вспомогательные устройства. Для очистки от газов высоковакуумных частей прибора предусмотрен электроподогрев камеры анализатора, ловушек лампы ПМ-2 и дру-

гих деталей. Чехословацкие исследователи (Кралова и др., 1967) предложили некоторые конструкционные изменения прибора для облегчения и улучшения работы по проведению анализов стабильных изотопов азота в растительном материале: была переделана коллекторная система (ширина щелей увеличена от 0,35 мм до 0,533 мм; расстояние между ними стало 5,1 мм), мембраны низковакуумных и высоковакуумных вентилей заменены сильфонами. Основные параметры прибора, которые мы старались соблюдать в наших опытах, описаны Бронниковым (1968).

Специфика выделения молекулярного азота из азотных соединений анализируемых образцов потребовала создания автономной системы напуска газа. В связи с тем, что заводская система напуска не удовлетворяет исследователей по ряду причин (необходимость перевода образца в специальные ампулы и др.), в лабораториях создаются специальные системы напуска газа, предназначенные для определенных изотопных анализов. Для измерения изотопного состава азота на масс-спектрометре МИ-1305

целесообразно использовать систему напуска с автономным вакуумным устройством и непосредственным переводом образцов в газообразный азот на приборе. Используемая нами система напуска, в основе которой лежит схема Риттенберга, показана на рис. 36.

Анализируемый образец помещали в одно из колен колбы Риттенберга KP , в другом находился гипобромит. Воздух из системы откачивали последовательно форвакуумным и диффузионным насосами. Насос ДРН-10 с охлаждаемой ловушкой позволял достичь вакуума 10^{-5} мм Hg и выше. Чтобы быстрее добиться эвакуации воздуха из колбы Риттенберга, параллельно проводились охлаждение гипобромита жидким азотом ($-196^{\circ}C$) и замораживание образца. Последнее способствовало высушиванию и очистке газа. В качестве замораживающей смеси успешно может использоваться также смесь спирта и CO_2 . Затем диффузионный насос отключали, и образец подогревали теплой водой. Ловушку L_1 погружали в жидкий азот и поворотом колбы KP переводили гипобромит в колено с образцом. С помощью крана K_3 молекулярный азот вводился в ловушку L_1 и затем через дозирующий вентиль $ВД$ поступал в ионизирующую камеру масс-спектрометра. Измеряли массы, которые являются характерными для изотопов азота: 28 ($^{14}N \cdot ^{14}N$), 29 ($^{14}N \cdot ^{15}N$) и 30 ($^{15}N \cdot ^{15}N$). Кроме того, определяли интенсивность линий 32 и 40, соответствующих ионам кислорода и аргона. Последние величины важны для контроля за попаданием воздуха из атмосферы.

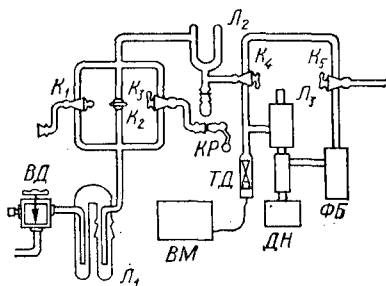


Рис. 36. Схема системы напуска газа:

$ВД$ — дозирующий вентиль, L_1 — L_2 — ловушки, K_1 — K_4 — вакуумные краны, KP — колбы Риттенберга, $ТД$ — термопарный датчик $ЛТ-1$, $ВМ$ — вакуумметр ВИТ-1А, $ДН$ — диффузионный насос ДРН-10, $ФБ$ — форбаллон.

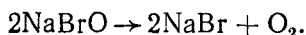
Необходимым условием для нормальной работы масс-спектрометра является высокий вакуум в камере анализатора, который достигался с помощью форвакуумного и диффузионного насосов. Перед напуском испытуемого образца давление не должно превышать $266,6 \cdot 10^{-7}$ Па.

Важной характеристикой является также остаточный масс-спектр. Необходимо, чтобы величины фоновых пиков составляли не более 1% величин пиков при напуске образца. Допустимым можно считать следующий остаточный спектр:

$$28m/e < 250mv; 29m/e < 10mv; 32m/e < 3mv.$$

Возрастание пика, соответствующего кислороду, говорит о наличии течи в приборе. Поправка, вносимая на попадание азота из воздуха, делается из расчета, что отношение пиков 28 : 32 равно шести и принимается во внимание при выполнении расчетов. Дополнительным контролем нарушения герметичности является пик 40m/e, соответствующий аргону.

Важно отметить, что точность выполнения анализов на масс-спектрометре во многом зависит от того, насколько полно удастся освободиться от примесей посторонних газов, которые могут выделяться при окислении аммиака образца в вакуумной системе. При использовании CuSO_4 в качестве катализатора происходит частичное освобождение кислорода из гипобромита, что мешает контролировать возможное поступление воздуха. Даже следы Cu^{2+} катализируют разложение гипобромита по схеме



Этот процесс крайне нежелателен и может быть легко предотвращен путем добавления к гипобромиту 0,1% йодита калия. Последний, по-видимому, образует комплекс с катализатором (Sims, Cocking, 1958). Минимальное содержание азота в анализируемом образце должно составлять 0,5—0,6 мг, оптимальное — 1,0 мг.

Обогащение азота изотопом ^{15}N определяли по следующей формуле:

$$P (\text{ат. \% } ^{15}\text{N}) = \frac{100}{2R + 1},$$

где R — отношение интенсивности тока с массами 28 и 29,

$$R = \frac{[^{14}\text{N}^{14}\text{N}]}{[^{14}\text{N}^{15}\text{N}]}.$$

Для повышенной концентрации ^{15}N (более 10 ат. % ^{15}N) используют следующую формулу для вычисления ат. % ^{15}N :

$$\text{ат. \% } ^{15}\text{N} = \frac{100}{r - 1},$$

где r = интенсивность массы 28/интенсивность массы 30.

При нестабильности ионного тока можно воспользоваться следующим способом усреднения. По общепринятому методу поочередно измеряют пики $28m/e$ и $29m/e$ (желательно через одинаковые промежутки времени). Затем каждое значение $28m/e$ делится на среднее арифметическое между двумя соседними значениями пика $29m/e$ для нахождения величины R . Полученный ряд значений R и P статистически обрабатывают (Шеховцов, 1971).

Достоверным обогащением, свидетельствующим о наличии азотфиксирующей способности у исследуемых микроорганизмов, считается обогащение, которое превышает содержание ^{15}N в естественной смеси изотопов азота (воздух, соли и др.) на 0,015 ат. % избытка ^{15}N в природном азоте (0,365—0,370 ат. %). В качестве эталона могут быть использованы соль — $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и лабораторный воздух при комнатной температуре. Как известно, в слое атмосферы Земли до 45 км соотношение изотопов ^{15}N и ^{14}N является постоянным и может быть принято в качестве константы для масс-спектрометра (Кралова и др., 1967). Кроме того, для калибровки прибора применяют аммоний (сернокислый или хлористый) с различным содержанием изотопа азота (от 0,365 до 50 ат. % и выше), что позволяет составить набор стандартов, с помощью которых определяется относительная погрешность результатов опытов, вычисляемая на основании математических расчетов (стандартного отклонения и др.) из значений, полученных при многократном анализе одних и тех же образцов, контролируемых соответствующими стандартами.

В качестве положительного контроля в опытах пользуются азотобактером. Отрицательным контролем являются культуры *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* и другие сапрофитные бактерии.

Массу фиксированного азота определяют по формуле изотопного разведения (Jansson, 1963):

$$x = \frac{C_t N_t}{C_0},$$

где x — масса связанного за определенное время азота, мкг; C_t — избыток ат. % ^{15}N в азоте исследуемого образца; N_t — масса азота в образце в конце эксперимента, мкг; C_0 — избыток ат. % ^{15}N в азоте атмосферы в камере, где выдерживались культуры или клетки.

Относительная погрешность значений образцов, анализируемых на масс-спектрометре МИ-1305, составляет $\pm 1,0\%$ при однолучевом методе измерения и $\pm 0,1\%$ — при двухлучевом (Бейнон, 1964). Если в испытуемом материале содержится 1 мг N, а избыточное содержание $^{15}\text{N}_2$ в атмосфере 20—30 ат. %, можно обнаружить фиксацию порядка 0,001 мг N (Вильсон, 1954).

При использовании масс-спектрометрического метода мы описали новые формы азотфиксирующих микроорганизмов, у которых наличие азотфиксирующей функции не могло быть выявлено химическими методами (Мальцева, Изжеурова, Диденко, 1972).

МЕТОД ПРОТОЧНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Культивирование микроорганизмов может быть осуществлено периодически или непрерывными методами.

При периодическом процессе культура представляет собой систему в ограниченном жизненном пространстве, в котором на протяжении всего времени инкубирования питательный субстрат не поступает извне, а продукты метаболизма не удаляются. Микроорганизмы,

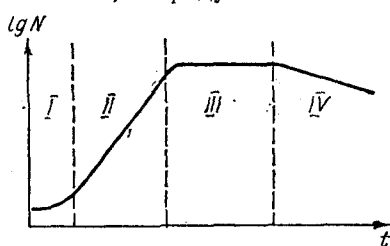


Рис. 37. Кривая зависимости логарифмов числа клеток (N) от времени (t):

I — начальная (лаг) фаза, II — экспоненциальная (лог) фаза, III — стационарная фаза, IV — фаза отмирания.

развиваясь в условиях «закрытой» системы, подвергаются действию многих факторов: вначале — избытка питательных веществ, затем — недостатка отдельных компонентов среды и, наконец, — накопления продуктов обмена. Рост такой статической культуры представляет собой S-образную кривую с несколькими периодами, или фазами (рис. 37). После исчерпания питательных веществ или в результате накопления продуктов метаболизма в живой системе обмен энергии

прекращается. Скорость роста биомассы падает и в конечном итоге приближается к нулю. Процесс прекращается. Периодическое культивирование, несмотря на широкое использование микробиологами, также имеет недостатки: одновременное изменение большого числа параметров, неуправляемость популяцией, невозможность установить количественную зависимость между факторами среды и жизнедеятельностью микроорганизмов. Устранить эти недостатки позволяет непрерывное культивирование.

Непрерывный процесс культивирования микроорганизмов известен давно. Им пользовались еще в прошлом веке при получении спиртового уксуса, в пивоварении. В почвенной микробиологии непрерывно-проточное культивирование в лабораторных условиях впервые было использовано С. Н. Виноградским в опытах по выращиванию серобактерий. Непрерывный процесс культивирования микроорганизмов получил теоретическое обоснование в 1950 г. в классических работах Моно (Monod, 1950) и Новика и Сциларда (Novick, Scilard, 1950). Значительный вклад в разработку теории непрерывного культивирования внесли Н. Д. Иерусалимский, Малек и сотр., И. Л. Работнова и Н. С. Печурский.

Метод непрерывного культивирования позволяет перейти от эм-

пирического к научному управлению процессом, выявить закономерность поведения микроорганизмов в зависимости от действия того или иного фактора. Он дает возможность задерживать развитие популяции на любой точке кривой роста. С его помощью в течение любого времени можно поддерживать заданное физиологическое состояние. Изменяя условия культивирования, можно регулировать содержание любого компонента клетки, любого продукта метаболизма.

Метод непрерывного культивирования используется в двух аспектах: как технологический прием, применяемый в микробиологической промышленности (при получении антибиотиков, ферментов, органических кислот; в производстве ацетона, бутанола; в виноделии; при получении хлебопекарных и кормовых дрожжей), и как научный метод при исследованиях закономерностей роста микробных популяций и влияния внешних факторов на физиологические и биохимические свойства микроорганизмов.

Принцип проточного культивирования состоит в постоянной подаче свежей питательной среды в сосуд с микроорганизмами и в одновременном отборе избыточной части культуры. Таким образом культура развивается в открытой системе, осуществляя непрерывный обмен с внешней средой. В основе метода лежит регулирование скорости роста микроорганизмов концентрацией субстрата (его недостатком или избытком), продуктами метаболизма или другими лимитирующими рост факторами. Управление непрерывными процессами в проточных культурах осуществляется с помощью хемостата либо турбидостата (рис. 38).

Рост бактериальной культуры в хемостате контролируется концентрацией субстрата. Повышая либо понижая скорость роста, культура как бы «подстраивается» к скорости потока питательной среды, результатом чего является стабилизация биомассы.

Математическая модель хемостата была разработана в 1950 г. Моно (Франция) и Новиком и Сцилардом (Америка) независимо друг от друга.

Зависимость плотности популяции X и концентрации субстрата S от скорости разбавления (протока) D характеризуется хемостатной кривой (рис. 39). В стационарном состоянии, когда все условия

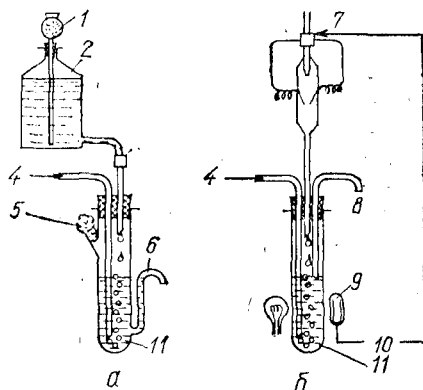


Рис. 38. Схема непрерывного культивирования микроорганизмов в хемостате (а) и турбидостате (б) (Шлегель, 1972):

1 — водной фильтр, 2 — сосуд с питательной средой, 3 — устройство, регулирующее скорость поступления среды, 4 — приток воздуха, 5 — выход воздуха, 6 — слив среды, 7 — фотоэлектрически регулируемый приток питательной среды, 8 — отсасывающее устройство для бактериальной суспензии, 9 — фотоэлемент, 10 — регулятор, 11 — культиватор.

постоянны, скорость разбавления равна удельной скорости роста μ . При $D = \mu$ плотность популяции постоянна и популяция находится в состоянии «динамического равновесия». Моно в 1942 г. на основе обработки большого экспериментального материала предложил формулу, отражающую зависимость удельной скорости роста бактерий μ от концентрации субстрата S :

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S},$$

где $\mu_{\max}$ — максимальная удельная скорость роста; K_s — константа, определяемая как концентрация субстрата, при которой $\mu = \frac{1}{2} \mu_{\max}$. Графически зависимость μ от S выражается кривой насыщения (рис. 40). Рост популяции в хемостате может быть огра-

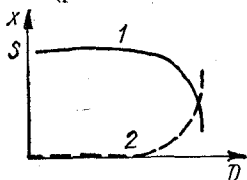


Рис. 39. Классическая хемостатная кривая (Работнова, Позмогова, 1979):

1 — зависимость плотности популяции X от скорости разбавления среды D , 2 — зависимость концентрации остаточного субстрата S от скорости разбавления среды D .

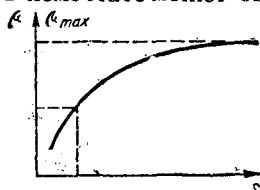


Рис. 40. Зависимость удельной скорости роста μ от концентрации субстрата S (Шлегель, 1972).

ничен также продуктами метаболизма или другим внешним ингибитором. Зависимость удельной

скорости роста от концентрации продуктов метаболизма представлена Н. Д. Иерусалимским (1963) в виде следующей формулы:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{K_p}{K_p + p},$$

где p — концентрация продукта, ингибирующего рост; K_p — константа ингибирования, численно равная концентрации продукта, при которой скорость роста достигает половины максимальной.

Наряду с указанными характеристиками, важнейшим параметром роста микроорганизмов является экономический коэффициент использования энергетического субстрата (γ): γ = количество образованной биомассы/количество потребленного субстрата.

Хемостат получил широкое распространение благодаря простоте аппаратного оформления и широким экспериментальным возможностям. Хемостатный метод культивирования позволяет воспроизвести фазу замедленного роста культуры и изучить влияние любого лимитирующего фактора.

Модификациями хемостата являются рН-стат и оксислат, в которых изменяющиеся параметры — рН среды и парциальное давление растворенного кислорода (Печуркин, Терсков, 1975).

Турбидостат был разработан Бризоном (Bryson, 1952), Нортро-

пом (Northrop, 1954) и Андерсоном (Anderson, 1953). За счет регулирования оптической плотности культуры концентрация клеток поддерживается на определенном уровне. При увеличении оптической плотности до определенной величины в систему дозирования подается сигнал и происходит долив свежей питательной среды и одновременно из культиватора сливается часть клеточной суспензии. Режим турбидостата дает возможность поддерживать культуру в фазе максимальной скорости роста. Рассматривая кривую роста микроорганизмов, можно на ней выделить области работы турбидостата и хемотата (рис. 41).

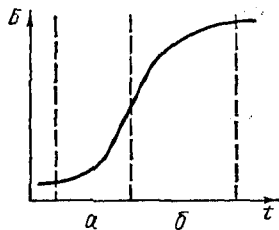


Рис. 41. Области работы турбидостата (а) и хемотата (б) на кривой роста популяции (по Печуркину, Терскову, 1975):

B — биомасса микроорганизмов, t — время выращивания.

Непрерывное культивирование представляет значительный интерес как метод экологических исследований. Особенно перспективными являются лабораторные экосистемы, изучение которых дает представление о процессах, происходящих в природных экосистемах. Первой моделью почвенных условий были капиллярные педоскопы, предложенные Перфильевым и Габее (1961). В педоскопах было использовано свойство почвы как проточной капиллярной системы. Развиваясь в капиллярах, микроорганизмы в качестве источников питания используют естественный субстрат, протекающий по капиллярам.

Вертикальное перемещение почвенного раствора лежит в основе метода перколяции. В перколяторах микроорганизмы развиваются в условиях проточного режима, однако продукты метаболизма не выводятся наружу, а снова вовлекаются в циркуляцию. Метод перколяции позволяет изучать превращение веществ, поступающих в почву, жизнедеятельность микроорганизмов в условиях, приближающихся к естественным. Его можно использовать для определения процессов нитрификации в почве, образования антибиотиков, токсинов и других метаболитов почвенной микрофлорой. Известны перколяторы Лиса, Кастла (рис. 42) и перколятор Аудуса (рис. 43). Метод перколяции целесообразно использовать в тех случаях, когда в условиях почвы нет проточного режима, т. е. когда питательный раствор, то опускаясь, то поднимаясь по капиллярам, многократно проходит через почву.

Недостатком метода перколяции является отсутствие выводящей системы для жидкости, прошедшей через почву, что затрудняет ее анализ. При включении водоструйного насоса в системе создается вакуум, который проталкивает жидкость по трубке вверх (рис. 42, 7, рис. 43, 4) в колонку с почвой (1). Просачиваясь сквозь почву, жидкость поступает в сосуд (рис. 42, 5, рис. 43, 3), из которого можно периодически брать образцы жидкости для анализа. Весь прибор укрепляется на штативе. Стрелками показано движение жидкости при включении водоструйного насоса.

Свойство почвы как открытой системы лежит в основе метода непрерывного культивирования, предложенного Макурой и Малеком для изучения микробиологических процессов в почве. Метод непрерывного культивирования по сравнению с другими методами почвенной микробиологии обеспечивает лучшую воспроизводимость естественных условий. Применять его целесообразно для изучения метаболической активности почвы при непрерывном добавлении определенного субстрата, превращений некоторых веществ, вопросов экологии поч-

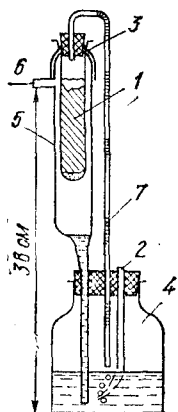


Рис. 42. Перколятор Лиса и Кастла (Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов, 1966):

1 — колонка с почвой (30–50 г), 2 — трубка для поступления воздуха, 3 — цапфы, 4 — сосуд с жидкостью, предназначенной для пропускания через почву (200 мл), 5 — резервуар, помещенный в сосуд с жидкостью, 6 — отвод для соединения с насосом, 7 — подъемная трубка, по которой жидкость и воздух поступают в колонку с почвой.

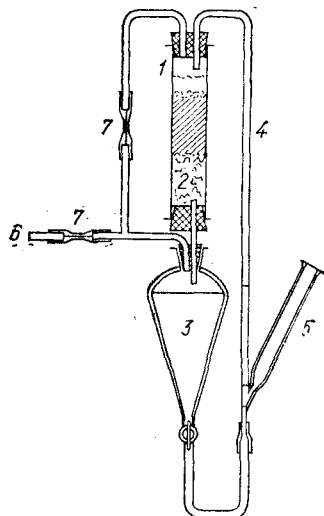


Рис. 43. Перколятор Аудуса (Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов, 1966):

1 — колонка с почвой, 2 — стеклянная вата, 3 — приемник (делительная воронка), 4 — подъемная трубка, 5 — боковой отвод для взятия образцов жидкости, 6 — трубка для присоединения насоса, 7 — капилляры.

венных микроорганизмов. Иногда метод непрерывного культивирования можно использовать в качестве модели для изучения микробиологических процессов в ризосфере, так как позволяет воспроизвести такие условия в почве (в зоне корневой системы), при которых происходит непрерывное обогащение среды питательными веществами.

Аппарат, применяемый для изучения непрерывным методом микробиологических процессов в почвах, состоит из питающего механизма, обеспечивающего питание и контролирующего приток питательных веществ, сосуда для культивирования почвенного образца, устройства для аэрации почвы воздухом, свободным от углекислоты, сборника вытекающей жидкости, поглотительной трубки с щелочным раствором для поглощения CO_2 . На рис. 44 представлена схема (по Маснга) прибора.

Почву (воздушносухую или свежую) просеивают для получения структурных образований диаметром 2—5 мм. В культиватор помещают от 50 г почвы. Перед началом опыта через почву в течение 3—5 мин пропускают стерильную дистиллированную воду. Непрерывный поток стерильной воды позволяет удалить растворимые питательные вещества из почвы и установить некоторое равновесие микробной популяции. После этого через почву пропускают питательный раствор, содержащий вещество, превращение которого микрофлорой почвы требуется изучить. Скорость потока выбирается таким образом, чтобы количество раствора, проходящего за 24 ч через образец почвы, равнялось приблизительно массе образца (для 50 г почвы — 50 мл раствора). Скорость потока составляет 2 мл/ч.

Интенсивность микробиологических процессов оценивают по выделению CO_2 , который адсорбируется в колонке с раствором щелочи определенной концентрации. Количество CO_2 определяется титрованием соляной кислотой в присутствии фенолфталеина. Разность концентраций вещества в исходном питательном растворе и в жидкости, прошедшей через почву, представляет собой массу вещества, использованного микрофлорой или задержанного почвой. Анализируя вытекающую жидкость, определяют конечные продукты обмена. Масса (мг) потребленного или задержанного почвой субстрата выражается следующим уравнением:

$$S = (S_R - S_E) v,$$

где S_R — исходная концентрация вещества; S_E — концентрация вещества после прохождения через почву; v — поток вещества, выраженный миллилитрами в час за время t .

Используя метод непрерывного культивирования, Мазура и со-трудники (Масига, 1961) получили данные о разложении глюкозы

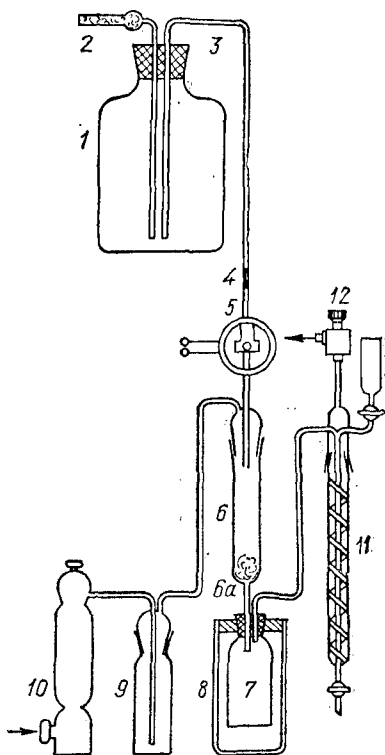


Рис. 44. Схема прибора для изучения микробиологических процессов в почвах непрерывным способом (Масига, 1961):

1 — сосуд для питательной среды, 2 — стеклянная трубка с натронной известью и с ватным фильтром и расширением для адсорбции CO_2 , 3 — трубка для подачи питательного раствора, 4 — капилляр для повышения постоянства потока, 5 — электромагнитный клапан, 6 — сосуд с образцом почвы, на слой стеклянной ваты, 7 — сборник для вытекающей жидкости, 8 — сосуд Дюара со льдом, 9 — сосуд с водой, 10 — абсорбционный сосуд с известью (содой), 11 — запирающий клапан.

в почве, биологической иммобилизации фосфора, влиянии сульфата аммония на интенсивность нитрификации в почве. Мы модифицировали систему проточного культивирования Мацурь и использовали этот метод определения активности разложения полисахаридов микрофлорой почвы. Аппарат для проточного культивирования состоит из следующих частей:

1) питающей системы, включающей два сосуда, один из которых заполняют испытуемым питательным раствором, другой — стерильной дистиллированной водой. Как питательный раствор, так и дистиллированная вода подаются по 5 мл в культиваторы с почвой ежедневно с помощью бюретки с двухходовым краном;

2) культивационной системы, в состав которой входит 10 культиваторов с почвой (по 120 г). Культиваторы представляют собой стеклянные сосуды, суженные книзу, с фильтром на дне из битого стекла. Для улучшения аэрации почвы в культиваторы вставляют вертикальные дренажи — капроновые трубочки диаметром 10 мм и длиной 110 мм. Культиваторы в специальном пластиковом штативе помещают в терморегулируемую камеру с постоянной температурой 28°С. Обогрев регулируют автоматически;

3) системы, обеспечивающей непрерывную аэрацию и очистку воздуха от CO_2 (пропускание воздуха через колонку с натронной известью и NaOH). Подачу воздуха контролируют ротаметром;

4) аналитической части, состоящей из приемника (цилиндра) для стока почвенных промывных вод и колбы с 0,01 н. раствором NaOH для поглощения CO_2 , продуцируемой микрофлорой почвы.

Используемый нами метод проточного культивирования почвенных образцов позволил оценить степень биологической трансформации полисахарида, интенсивность микробиологических процессов в почве, определить численность микроорганизмов различных физиологических групп.

Глава 18

ПРИБОР ДЛЯ ОТБОРА ПОЧВЕННОГО ВОЗДУХА

Состав почвенного воздуха отражает напряженность микробиологических процессов, протекающих в почве.

Для отбора воздуха почвы существует несколько приборов, большинство из которых не отвечают требованиям, предъявляемым к приборам данного назначения. Такие приборы, как штоковые зонды (Вершинин, Поясов, 1952), мобильный зонд Грейлиха и Климанек (Greilich, Klimanek, 1975), установка постоянных трубок (Ястребов, 1965), в процессе отбора проб нарушают структуру почвы. Приспособление Рульера и Столза (Roulier et al., 1974) — трубка из нержавеющей стали, — которым они отбирали воздух почвы с

глубины 1—1,2 м, малопригодно для массовых анализов и, особенно, для работы с тяжелыми почвами. Пористая пластиковая трубка Йоргенгена (Jorgengen, 1974) вместе с почвенным воздухом поглощает и атмосферный воздух. Цилиндры Рихтера (Richter, 1975) также не гарантируют непроникновения воздуха атмосферы в прибор. Спе-

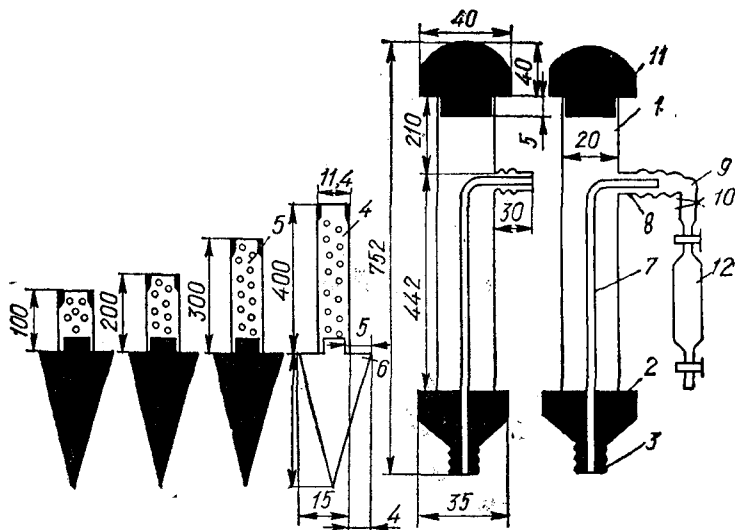


Рис. 45. Схема прибора для отбора проб почвенного воздуха:

1 — опорная труба, 2 — держатель, 3 — резьба держателя, 4, 5 — направляющие трубки, 6 — конусообразный наконечник, 7 — капиллярная трубка, 8 — патрубок, 9 — резиновый шланг, 10 — зажим, 11 — нажимная бобышка, 12 — пипетка Зигера.

циальная игла для отбора проб воздуха в грунтовых водах, сконструированная Ястребовым (1965), не обеспечивает отбора почвенного воздуха по всему профилю.

Предлагаемая конструкция прибора для отбора почвенного воздуха лишена недостатков, характерных для перечисленных приборов, и удобна в работе (Дульгеров, Прохоров, 1977). Прибор изготовлен из нержавеющей стали, легок в сборке, дает возможность отбирать большое количество проб по всему профилю почвы.

Принципиальная схема прибора представлена на рис. 45. К опорной трубе 1 приварен держатель конической формы 2, конец которого 3 имеет резьбу. К нему прикручиваются направляющие трубки 4, 5 и т. д. различной длины (10, 20, 30 и 40 см). Длина их зависит от того, с какой глубины необходимо отобрать пробы воздуха. Каждая такая трубка (внешний диаметр равен 11,4 мм, а внутренний — 9 мм) имеет на боковой поверхности до 20 отверстий с диаметром, равным 2 мм, для проникновения воздуха. К нижнему концу направляющей трубки приваривается конусообразный наконечник 6, который несколько шире, чем направляющая трубка. В середине держателя имеется отверстие диаметром 1 мм, к которому припаяна

капиллярная трубка 7 высотой 44,2 см с выходом в патрубок 8 на опорной трубе. На конец патрубка натягивается резиновый шланг 9 длиной 100 мм с зажимом 10. Верхняя часть опорной трубы закрыта нажимной бобышкой 11, при нажатии на которую прибор можно погрузить на нужную глубину.

Перед началом работы перекрывают зажимом резиновую трубку, прикрепляют к шлангу пипетку Зигера объемом 500 см³, заполненную насыщенным раствором NaCl. Такой объем дает возможность полностью промыть всю систему, удалив из нее таким образом воздух атмосферы (весь объем газозаборной части — направляющей и капиллярной трубок — не превышает 50 см³). Погружают прибор на нужную глубину, раскрывают зажим, а также верхний и нижний краны пипетки с целью промывки системы. После вытекания жидкости из пипетки перекрывают резиновый шланг, проводят замену пипетки Зигера пипеткой меньшего объема (100 см³) и набирают в нее воздух почвы для анализа. Отбор небольшого объема почвенного воздуха (100 см³) позволяет проводить анализ со многими повторностями.

Состав отобранного воздуха определяют с помощью газового хроматографа. Контрольный анализ смеси с целью обнаружения в ней воздуха атмосферы, попавшего в газосборную систему прибора, проводят по методу Ястребова (1965). Описанный прибор испытан при исследовании состава воздуха темно-каштановой почвы в условиях орошения и удобрения: предельная полевая влагемкость (ППВ) — 70%, N и P (действующее начало) — соответственно 420 и 200 кг/га совместно с 20 т/га навоза (Дульгеров, Прохоров, 1977; Дульгеров, 1977). Пробы почвенного воздуха анализировали на газовом хроматографе «Цвет-4».

Глава 19

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Значительная изменчивость, свойственная практически всем объектам микробиологии, существенно затрудняет их количественную оценку, мешает выявлению имеющихся закономерностей. Применение современной математической, или вариационной, статистики, основанной на признании и учете этой изменчивости, позволяет исследователю систематизировать и обобщить результаты эксперимента, отсеять случайное от существенного, по сведениям о части дать характеристику целого (с достаточной точностью). Кроме того, математическая статистика помогает отыскать, проанализировать и научно обосновать выявленные закономерности. Важное значение статистические методы имеют также для нахождения связей, сопряженности, соотношения или корреляции между изучаемыми показателя-

ми и для установления соответствия полученного экспериментального материала с теоретическими расчетами.

В процессе работы исследователь обнаруживает некоторые факты, явления, случаи, предметы, вообще говоря, условные единицы, обладающие индивидуальностью. Свойство условных единиц отличаться друг от друга даже в однородных совокупностях называется изменчивостью, или варьированием. В любом эксперименте данные опыта всегда будут варьировать в тех или других пределах. При микробиологических исследованиях практически невозможно охватить всю генеральную совокупность, т. е. всю подлежащую изучению группу объектов. Поэтому прибегают к изучению части ее, по которой делают общее заключение. Такой метод называется выборочным и считается основным при статистическом изучении совокупности. В результате таких выборочных наблюдений получают числа, которые сводятся в ряды, называемые вариационными.

Данные вариационных рядов для наглядности могут быть изображены графически. Графическое изображение вариационных рядов получило название вариационной кривой, или кривой распределения. Из всех видов статистических распределений можно выделить три основных, наиболее часто встречающихся в обычной практике: нормальное распределение, когда переменная величина изменяется непрерывно; биномиальное распределение, когда переменная величина может принимать только дискретные значения и при этом некоторое событие может только быть или не быть; распределение Пуассона, когда рассматриваются очень редкие, мало вероятные события.

Нормальное распределение имеет большинство признаков биологических объектов с непрерывным характером варьирования. Характерной особенностью нормального распределения является то, что чем больше отклоняется значение отдельной варианты от средней, тем реже эта варианта встречается, тем меньше ее вероятность появления в генеральной совокупности; и наоборот, чем ближе варианты к среднему значению ряда, тем чаще они встречаются, тем большая вероятность их появления. Эта закономерность в распределении вариант характеризуется плавной кривой, которая называется кривой нормального распределения, или кривой Гаусса (рис. 46). Она характеризует нормальное распределение двумя параметрами — средней величиной ($\bar{x}$) и квадратическим отклонением (σ), причем следует отметить, что максимальное и минимальное значения результатов измерений практически не удаляются от среднего значения более чем на 3σ . Вероятность встретить значение x , превосходящее $\bar{x}$ на $\pm 3\sigma$, составляет около 3% всех возможных наблюдений при большом числе повторностей, поэтому величину, равную $\pm 3\sigma$, принято называть предельной ошибкой отдельного наблюдения, а величину тройной ошибки средней величины $\pm 3m$ — предельной ошибкой выборочной средней.

В биологической практике считается возможным пользоваться вероятностями, которые соответствуют величинам $\pm 2\sigma$ и $\pm 3\sigma$.

Вероятность при $\pm 2\sigma$ выражается округленно значением 0,95 (95 %), при $\pm 3\sigma$ — 0,99 (99 %). Эти вероятности получили название доверительных вероятностей. Величины, показывающие вероятность случайных отклонений от установленных с определенной вероят-

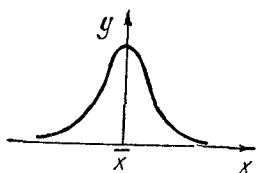


Рис. 46. Кривая нормального распределения:

x — значения признака (вариационный ряд), y — вероятность появления данного признака, $\bar{x}$ — средняя арифметическая вариационного ряда

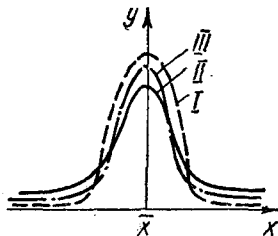


Рис. 47. Соотношения между нормальным распределением и t -распределением:

x — значения признака (вариационный ряд), y — вероятность появления признака, $\bar{x}$ — средняя арифметическая вариационного ряда. I — кривая нормального распределения при числе степеней свободы $\nu = \infty$, II и III — t -распределение при $\nu = 1$ и $\nu = 5$ (соответственно).

ностью результатов наблюдений, получили названия уровней значимости. Вероятности 0,95 (95 %) соответствует уровень значимости 0,05 (5 %), вероятности 0,99 (99 %) — 0,01 (1 %).

В математической статистике нормальное распределение имеет исключительно большое значение, однако его законы четко проявляются при большом числе наблюдений ($n > 20 \div 30$). Между тем

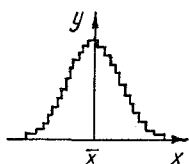


Рис. 48. Кривая биномиального распределения:

x — значения признака (вариационный ряд), y — вероятность появления признака, $\bar{x}$ — средняя арифметическая вариационного ряда.

экспериментатор часто получает ограниченное число измерений и делает выводы на малых выборках. В этом случае полагаться в своих выводах только на критерий нормального распределения нежелательно: необходимо обращаться к так называемой статистике малых выборок.

При работе с малыми выборками широкое применение нашло распределение Стьюдента, или t -распределение, которое зависит только от числа степеней свободы ($n - 1$), по которым определяется среднее квадратическое отклонение. Кривые распределения Стьюдента по своей форме напоминают кривые нормального распределения и при $n - 1 = 20$ уже довольно хорошо согласуются (рис. 47). Критерием Стьюдента можно пользоваться во всех случаях, когда генеральная совокупность подчиняется нормальному распределению и когда необходимо оценить достоверность полученных результатов.

Биномиальным распределением описывается совокупность объектов с двумя противоположными признаками, существенно дискретными, т. е. какой-либо изучаемый признак у объекта может быть или отсутствовать, появляться или не появляться. Вид кривой биноми-

ального распределения представлен на рис. 48. Биномиальным распределением часто пользуются в генетике.

Распределение Пуассона наблюдается в том случае, если в большом числе опытов n появление некоторого события имеет очень малую вероятность P и при этом произведение nP также является небольшим числом. Особенно большое значение распределение Пуассона имеет при оценке плотности суспензии по числу отдельных клеток в поле зрения в счетной камере.

ОБЩАЯ СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА

Количественные вариационные ряды имеют определенные статистические показатели, важнейшими из которых являются следующие:

средние значения: средняя арифметическая ($\bar{x}$), средняя квадратическая ($\bar{x}_s$); дисперсия (σ^2) и среднее квадратическое отклонение (σ); ошибка средней арифметической (m); коэффициент вариации (V) и точность опыта ($m\%$).

Наиболее важный, распространенный и универсальный показатель — средняя арифметическая величина. Она представляет собой обобщенную, абстрактную характеристику всей совокупности в целом. Для ее вычисления используют формулу

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n},$$

сумму всех значений признака делят на число измерений. Средняя арифметическая имеет ту же размерность, что и варьирующий признак. Основным свойством средней арифметической является то, что сумма отклонений отдельных измерений от среднего значения равна нулю:

$$\sum (x - \bar{x}) = 0.$$

При вычислении средних радиусов (диаметров) окружностей для определения их средней площади при изучении колоний микробов, размеров клеток микроскопических водорослей и т. д. используют среднюю квадратическую величину. Она вычисляется по формуле

$$\bar{x}_s = \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}},$$

т. е. равна корню квадратному из отношения суммы квадратов отдельных измерений к их числу.

Средние величины дают первое обобщенное представление о совокупности изучаемых объектов. В них снята всякая вариация, устранены все различия отдельных значений. Это — тот центр, около которого происходит варьирование изучаемого признака.

Наряду со средней величиной необходимо иметь и среднюю меру варьирования данного признака. Такой мерой вариации, рассеяния изучаемого признака или свойства служит дисперсия σ^2 и среднее квадратическое отклонение σ .

Дисперсия вычисляется по формуле

$$\sigma^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}$$

и характеризует разброс полученных данных. Корень квадратный из величины дисперсии называется средней квадратической ошибкой (стандартное отклонение) и имеет большое значение во всей теории ошибок. Среднее квадратическое отклонение σ равно:

$$\sigma = \sqrt{\sigma^2} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}},$$

где $\sum (x - \bar{x})^2$ — сумма квадратов отклонений от средней величины; $n - 1$ число степеней свободы.

Число степеней свободы — это число свободно варьирующих величин. Оно обозначается v и в случае одного вариационного ряда равно $n - 1$. Всякое число, полученное в результате измерений, определяется приблизительно, с некоторой ошибкой. Это в полной мере относится и к величинам, характеризующим средние значения. Методы математической статистики позволяют определить ошибку, с которой вычислены средние значения. Ошибка средней величины равна частному от деления среднего квадратического отклонения на корень квадратный из числа повторений:

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}.$$

Подставляем в формулу значение среднего квадратического отклонения и получаем

$$m = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n - 1)}}.$$

Ошибка выборочной средней приписывается к соответствующему среднему через знак $\pm$. Ошибка выборочной средней — это конкретная величина, полученная из имеющихся данных, характеризующая определенный вариационный ряд. Исследователя в большинстве случаев интересует величина, соответствующая генеральной средней, т. е. той, которая может быть получена при очень большом (бесконечном) числе наблюдений. Такие наблюдения практически невозможны. Математическая статистика, основываясь на теории вероятности, дает формулу определения средней генеральной совокупности:

$$A = \bar{x} \pm tm,$$

где A — средняя генеральной совокупности; $\bar{x}$ — средняя величина выборки; m — ошибка средней выборочной, t — критерий Стьюдента при $n - 1$ степеней свободы и при определенном уровне вероятности, tm — доверительный интервал; $\bar{x} + tm$ — верхняя граница варьирования средней генеральной совокупности (верхняя граница доверительного интервала); $\bar{x} - tm$ — нижняя граница. Стандартные

значения критерия для различных уровней вероятности представлены в табл. 8. Определив границы доверительного интервала, исследователь может с определенной достоверностью (95%; 99; 99,9%) характеризовать генеральную совокупность.

Для сравнения изменчивости любых выборочных средних очень удобна относительная величина, получаемая при делении ошибки

Таблица 8. Значения показателя t (критерия Стьюдента)

Число степеней свободы	Доверительный уровень, %			Число степеней свободы	Доверительный уровень, %		
	95	99	99,9		95	99	99,9
1	12,7	63,6	—	9	2,3	3,2	4,8
2	4,3	9,9	31,6	10	2,2	3,2	4,6
3	3,2	5,8	12,9	11—14	2,2	3,0	4,3
4	2,8	4,6	8,6	15—20	2,1	2,9	3,9
5	2,6	4,0	6,9	21—30	2,1	2,8	3,7
6	2,4	3,7	6,0	31—60	2,0	2,7	3,5
7	2,4	3,5	5,4	61—120	2,0	2,6	3,4
8	2,3	3,4	4,8	∞	1,96	2,58	3,29

средней величины на величину $\bar{x}$ и выражаемая в процентах. Эта величина называется точностью опыта и обозначается $m\%$,

$$m\% = \frac{\frac{m\bar{x}}{\bar{x}}}{x} \cdot 100.$$

Чем меньше значение $m\%$, тем точнее поставлен опыт. Для полевых опытов отличными показателями точности опыта принято считать $m\% \leq 1-2\%$; хорошим $m\% \leq 3$; вполне удовлетворительным $m\% = 3-5$; удовлетворительным $m\% = 5-8\%$.

В тех случаях, когда надо сравнить изменчивость различных вариационных рядов, вычисляют коэффициент вариации V .

$$V = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100,$$

где σ — среднее квадратическое отклонение; $\bar{x}$ — средняя величина выборки; 100 — перевод в проценты.

В экспериментальной работе часто приходится сравнивать два средних результата исследования, доказывать методом математической статистики достоверность различия вариантов опыта и на основании этого сравнения делать выводы. Разность между выборочными средними неизбежно случайна и в какой-то степени случайна, ошибочна. Поэтому возникает необходимость доказать достоверность выборочной разности и убедиться в том, что она не случайна, а закономерна и обусловлена действием изучаемого фактора, а не ошибками выборки.

Теорией математической статистики доказано, что ошибка выборочной разности m_d между двумя средними величинами $\bar{x}_1$ и $\bar{x}_2$ зависит от ошибок обеих средних и равна корню квадратному из суммы

квадратов этих ошибок:

$$m_d = \sqrt{m_1^2 + m_2^2}.$$

Определив ошибку разности между двумя выборочными средними, мы, используя методы математической статистики, можем определить, существенна, достоверна ли разность и с какой вероятностью. Отношение разности средних величин к их ошибке получило название критерия существенности, или достоверности разности,

$$t_d = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}} = \frac{d}{m_d} \text{ при } v = n - 2.$$

Разность считается достоверной, если t_d равно или превышает критерий Стьюдента. Если же $t_d < t_r$, то разность недостоверна,

$$t_d = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}} = \frac{d}{m_d}.$$

Это означает, что выводы, полученные при сравнении выборочных средних, правильны только для изученных групп, но им нельзя придавать общего значения. Недостоверная разность не подтверждает лишь разность генеральных средних, но не подтверждает отсутствия различия между выборочными средними.

КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

Рассмотренные выше методы статистики дают возможность изучать отдельные признаки и свойства независимо от других. Между тем на практике часто приходится изучать связи между различными признаками, выяснять, какова зависимость между двумя или более признаками, устанавливать их взаимосвязь.

При изучении живых организмов редко приходится встречаться с так называемой функциональной зависимостью, при которой каждому значению одной переменной соответствует одно, вполне определенное значение другой переменной. Микроорганизмы в процессе развития постоянно взаимодействуют с факторами внешней среды, изменяются под влиянием разнообразных условий существования. Поэтому у них связь между признаками проявляется в виде так называемой корреляционной зависимости, или корреляции. Эта форма связи характерна тем, что каждому значению одного признака соответствует несколько значений другого признака.

Корреляционная зависимость может быть прямолинейной и криволинейной, прямой и обратной, простой и сложной. Под прямолинейной корреляцией подразумевается такая зависимость, когда с увеличением или уменьшением среднего значения одного признака увеличивается (или уменьшается) среднее значение другого. В первом случае корреляция называется прямой, или положительной, во втором—обратной, или отрицательной. При криволинейной корреляции

результативный признак с увеличением факториального принимает значения, возрастающие до определенного предела, а затем убывающие, или наоборот. Корреляция называется простой, если исследуются два признака, и сложной, если три и более.

Для оценки тесноты связи между изучаемыми признаками используют либо коэффициент корреляции r , если связь прямолинейная, либо корреляционные отношения η , если связь криволинейная. Формула для вычисления коэффициента корреляции имеет следующий вид:

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{n \cdot \sigma_x \cdot \sigma_y}.$$

Подставляя в формулу значения σ , получаем рабочую формулу:

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \cdot \sum (y - \bar{y})^2}}.$$

Значения коэффициента корреляций всегда заключены между $+1$ и -1 . Если $r = +1$ или $r = -1$, то сравниваемые величины x и y связаны тесной прямолинейной зависимостью, если $r = 0$, то между x и y не может существовать прямолинейная корреляционная зависимость. Следует отметить, что в этом случае вполне возможно наличие криволинейной связи. Принято считать, что, если $r < 0,3$ — зависимость слабая, при $r = 0,3-0,7$ — средняя, при $r > 0,7$ — сильная.

Для оценки надежности коэффициента корреляции вычисляют его ошибку и по критерию Стьюдента определяют достоверность. Стандартная ошибка коэффициента корреляции определяется по формуле

$$S_r = \sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}},$$

где n — число пар. Критерий существенности, или достоверности, имеет следующий вид:

$$t_r = \frac{r}{S_r}.$$

Полученное значение t_r сравнивают с табличным значением t — критерием, найденным для числа степеней свободы $n - 2$.

Для определения множественной корреляции используют следующую формулу:

$$R = \sqrt{\frac{r_{1,3}^2 + r_{2,3}^2 - 2r_{1,3} \cdot r_{2,3} \cdot r_{1,2}}{1 - r_{1,2}^2}}.$$

R — совокупный коэффициент множественной корреляции; $r_{1,2}$; $r_{1,3}$; $r_{2,3}$ — простые, или общие, коэффициенты корреляции между признаками, номера которых указаны в индексах. Коэффициент R всегда положителен и находится между нулем и единицей.

Теория корреляции показывает, что степень сопряженности двух величин более точно измеряется квадратом коэффициента корреля-

ции. Этот показатель носит название коэффициента детерминации и обозначается d_{yx} . Коэффициент детерминации показывает в процентах долю тех изменений, которые в данном явлении зависят от изучаемого фактора. Коэффициент детерминации является более непосредственным и прямым способом выражения изменения одной величины в зависимости от другой и в этом отношении предпочтительнее коэффициента корреляции. В тех случаях, когда зависимость между двумя признаками имеет криволинейный характер, коэффициент не дает правильного представления о степени связи между признаками. В этих случаях вычисляют показатель криволинейной зависимости, — так называемое корреляционное отношение η , представляющее собой отношение двух дисперсий: дисперсии групповых средних и общей дисперсии. Иначе говоря, корреляционное отношение отвечает на вопрос, какую часть общей дисперсии результативного признака составляет дисперсия частных средних этого признака. При исследовании криволинейной зависимости можно вычислить два корреляционных отношения: $\eta_{y/x}$ и $\eta_{x/y}$. В первом случае результативным признаком будет Y , во втором X . Однако реальный смысл имеет, как правило, один из двух показателей. Корреляционное отношение вычисляют по формуле

$$\eta_{y/x} = \frac{\sigma_{\bar{y}x}}{\sigma_y},$$

где $\sigma_{\bar{y}x}$ — среднее квадратическое отклонение групповых средних; σ_y — среднее квадратическое отклонение признака y . Аналогичной будет формула для определения $\eta_{x/y}$.

Корреляционное отношение всегда имеет положительный знак и принимает значения от 0 до 1. Когда групповые средние $\bar{y}$ не отличаются друг от друга, $\eta = 0$, т. е. связь отсутствует.

Квадратическая ошибка корреляционного отношения может быть вычислена по формуле

$$S_\eta = \frac{1 - \eta^2}{\sqrt{n}}.$$

С достаточной определенностью можно считать корреляционное отношение существенным, когда оно превосходит свою ошибку в три раза и более, т. е. когда

$$\eta : S_\eta \geq 3.$$

Следует заметить, что корреляционная связь не ставит вопрос о причинной зависимости, а лишь устанавливает: сопутствуют или нет изменения одного признака изменениям другого.

ДИСПЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ

Дисперсионный анализ, или анализ рассеяния опытных данных, представляет собой наиболее совершенный метод статистической обработки разнообразного экспериментального материала. Диспер-

сионный анализ позволяет оценить методику и результаты опыта в целом, установить различия между вариантами. Основная задача дисперсионного анализа — определить долю влияния различных факторов в отдельности, а также и суммарное их воздействие на изменчивость изучаемого признака. Анализ рассеяния может быть применен для оценки результатов как однофакторных, так и сложных многофакторных опытов.

В результате дисперсионного анализа получают данные, характеризующие общее рассеяние, или дисперсию признака, обусловленную действием всех факторов; частную или факториальную дисперсию, вызванную влиянием организованных и учтенных исследователем факторов; и остаточную дисперсию, связанную с неизвестными экспериментатору, случайными, неорганизованными факторами.

Общее варьирование экспериментальных данных можно расчленить методом дисперсионного анализа на составные части, соответствующие важнейшим источникам изменчивости получаемых цифр. Общее варьирование в любом опыте обусловлено действием изучаемых факторов, т. е. вариантов опыта, повторениями, а также многими причинами случайного характера (техническими ошибками, неучтенными факторами и т. д.).

Таким образом, общее варьирование, которое обозначается C_y , можно расчленить на три части: варьирование вариантов C_v , варьирование повторений C_p и случайное (или остаточное) C_z и представить следующим выражением:

$$C_y = C_v + C_p + C_z.$$

Каждая составная часть общего варьирования характеризуется суммой квадратов отклонений соответствующих наблюдений от общей средней. Так, общее варьирование представляет собой сумму квадратов отклонений x от среднего по опыту $\bar{x}_0$:

$$C_y = \sum (x - \bar{x}_0)^2.$$

Варьирование повторений характеризуется суммой квадратов отклонений их средней $\bar{x}_p$ от $\bar{x}_0$:

$$C_p = \sum (\bar{x}_p - \bar{x}_0)^2.$$

Варьирование вариантов характеризуется суммой квадратов отклонений их средних $\bar{x}$ от $\bar{x}_0$:

$$C_v = \sum (\bar{x} - \bar{x}_0)^2.$$

Сумму квадратов случайного варьирования находят как некоторый остаток, исходя из уравнения

$$C_z = C_y (C_p + C_v).$$

Отношения частных варьирований к общему $\left(\frac{C_v}{C_y}, \frac{C_p}{C_y}, \frac{C_z}{C_y} \right)$ показывают долю участия отдельных факторов в общем варьировании

результативного признака. Эти отношения обозначаются соответственно η_v^2 ; η_p^2 ; η_z^2 и в сумме равны единице, или 100%.

Таким образом, используя метод дисперсионного анализа, исследователь может оценить (в процентах) долю влияния того или иного фактора на варьирование изучаемого признака, а именно:

влияние вариантов

$$\eta_v^2 = \frac{C_v}{C_y} 100,$$

влияние повторений

$$\eta_p^2 = \frac{C_p}{C_y} 100,$$

влияние случайных факторов

$$\eta_z^2 = \frac{C_z}{C_y} 100,$$

влияние всех факторов

$$\eta_y^2 = \eta_v^2 + \eta_p^2 + \eta_z^2.$$

Для установления существенности влияния факторов на изучаемый признак нельзя непосредственно сравнивать суммы квадратов, так как они зависят от числа наблюдений. Для этой цели необходим другой показатель, свободный от указанной зависимости и допускающий сравнение независимо от числа наблюдений. Таким показателем служит дисперсия, т. е. средняя арифметическая квадратов отклонений. Дисперсию вычисляют по известной формуле:

$$\sigma^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}.$$

Знаменатель в формуле дисперсии представляет собой число степеней свободы ν , или число независимых измерений, минус те связи, которые наложены на эти измерения при дальнейшей обработке материала. При определении общей дисперсии число степеней свободы $\nu_y = nl - 1$, где n — число повторений, а l — число вариантов.

При установлении дисперсии вариантов число степеней свободы $\nu_v = l - 1$, для дисперсии повторений $\nu_p = n - 1$ и для остаточной дисперсии

$$\nu_z = (nl - 1) - (l - 1) - (n - 1) = (l - 1)(n - 1).$$

Для того чтобы определить дисперсии σ^2 , т. е. дисперсии, приведенные к сравнимому виду, скорректированные на число степеней свободы ν , необходимо сначала узнать сумму квадратов отклонений для общей C_y и для частных дисперсий C_v , C_p и C_z , а затем сумму центральных отклонений для каждого вида варьирования разделить на соответствующее число степеней свободы:

общая дисперсия

$$\sigma_y^2 = \frac{C_y}{\nu_y} = \frac{\sum (x - \bar{x}_0)^2}{nl - 1},$$

дисперсия вариантов

$$\sigma_v^2 = \frac{C_v}{v_v} = \frac{\sum (\bar{x} - \bar{x}_0)^2}{l - 1},$$

дисперсия повторений

$$\sigma_p^2 = \frac{C_p}{v_p} = \frac{\sum (\bar{x}_p - \bar{x}_0)^2}{n - 1},$$

остаточная дисперсия (ошибки)

$$\sigma_z^2 = \frac{C_y - (C_v + C_p)}{(l - 1)(n - 1)}.$$

В приведенных формулах x — значение каждой даты в опыте; $\bar{x}$ — средняя по варианту; $\bar{x}_p$ — средняя по повторению; $\bar{x}_0$ — общая средняя по опыту; l — число вариантов; n — число повторностей.

В заключение дисперсионный анализ выясняет существенность влияния изучаемых факторов или их сочетаний на результативный признак. В качестве критерия достоверности принимают отношение дисперсии вариантов (факториальной дисперсии) к случайной или остаточной дисперсии. Оно обозначается буквой F и определяется равенствами:

$$F_v = \frac{\sigma_v^2}{\sigma_z^2}; \quad F_p = \frac{\sigma_p^2}{\sigma_z^2}.$$

Если это отношение равно или больше некоторого показателя, стандартного для принятого уровня вероятности, действие фактора (варианта) или ряда факторов на результативный признак считается существенным. Стандартные отношения дисперсий для принятой в исследовании доверительной вероятности $P = 0,95$ или $P = 0,99$ находят, пользуясь таблицами Фишера (Доспехов, 1979), с учетом числа степеней свободы для дисперсии вариантов и дисперсии ошибки. Итоговая таблица дисперсионного анализа (табл. 9) четко показывает всю схему вычисления.

Таблица 9. Схема дисперсионного анализа

Рассеяние	Сумма квадратов отклонений	Число степеней свободы	Средний квадрат (дисперсия)	Отношение дисперсий
Общее	C_y	$nl - 1$	—	—
Повторений	C_p	$n - 1$	$\sigma_p^2 = \frac{C_p}{n - 1}$	$\sigma_p^2 : \sigma_z^2$
Вариантов	C_v	$l - 1$	$\sigma_v^2 = \frac{C_v}{l - 1}$	$\sigma_v^2 : \sigma_z^2$
Остаточное	C_z	$(n - 1)(l - 1)$	$\sigma_z^2 = \frac{C_z}{(n - 1)(l - 1)}$	—

При анализе результатов многофакторного опыта дисперсия, характеризующая действие вариантов C_v , может быть расчленена на столько компонентов, сколько групп показателей входит в опыт. Если в комплексном опыте изучают действие двух факторов (А, Б) и их сочетания (АБ), то при анализе определяют дисперсию каждого из этих факторов в отдельности C_A и C_B и при их совместном применении C_{AB} . В этом случае дисперсию вариантов разлагают на три компонента:

$$C_y = C_A + C_B + C_{AB} + C_p + C_z.$$

Если в опыте изучают три фактора А, Б, В, дисперсия вариантов складывается из следующих компонентов:

$$C_v = C_A + C_B + C_V + C_{AB} + C_{AV} + C_{BV} + C_{ABV}.$$

Общая дисперсия в этом случае будет представлена выражением

$$C_y = C_A + C_B + C_V + C_{AB} + C_{AV} + C_{BV} + C_{ABV} + C_p + C_z.$$

Во всех этих случаях дисперсионный анализ начинают с определения общей дисперсии C_y , общей дисперсии вариантов C_v , дисперсии повторений C_p и ошибки C_z . На последующих этапах анализа дисперсию расчленяют на составные компоненты.

ПРОГРАММЫ ДЛЯ ЭВМ «МИР-2»

Последнее время в микробиологии для обработки экспериментального материала все шире применяют электронные вычислительные машины (ЭВМ). Это позволяет значительно увеличить темпы и эффективность научных исследований, поднять их на качественно новый уровень.

Работа вычислительной машины по решению задачи начинается с ввода в память ЭВМ всей необходимой информации. Эта информация состоит из двух частей — программы, т. е. перечня команд, составленного в соответствии с алгоритмом решения задачи, и числовой информации, содержащей исходные данные, закодированные в соответствии с требованиями используемого языка программирования. Такая информация называется информативной. Результаты вычислений выдаются на печать в виде таблицы или графика.

Мы предлагаем некоторые программы, позволяющие решать следующие задачи: вычисление основных статистических показателей; определение достоверности различий между вариантами опыта по t -критерию; проведение однофакторного дисперсионного анализа; проведение корреляционного анализа. Язык программ — «Аналитик».

Программа 1, используемая для определения основных статистических показателей, таких, как средняя арифметическая, среднее квадратическое отклонение, коэффициент варибельности, ошибка средней арифметической, верхняя и нижняя границы достоверного интервала, точность опыта, имеет следующий вид:

Программа 1

«ВЫП» «РАЗР» 2; «ФОРМ» 2; «ДЛЯ» I = 1 «ШАГ» 1 «ДО» N «ВЫПОЛНИТЬ» (CX = $\Sigma (J=1, M, E[I, J]) / M$; S = $\sqrt{(\Sigma (J=1, M, (E[I, J] - CX)^2) / (M - 1))}$; M1 = $S / \sqrt{M}$; V = $S \times 100 / CX$; P = $M1 \times 100 / CX$; NB = CX + TT $\times$ M1; NH = CX - TT $\times$ M1; «ВЫВОД» 34 «ТАБЛИЦА» 1, I, CX, S, V, M1, NB, NH, P) «КОН» $\diamond$

Исходные данные к этой программе оформляются в виде информативы, где N — число выборок; M — число замеров в каждой выборке; TT — табличное значение коэффициента Стьюдента для числа степеней свободы $f = M - 1$ при заданном доверительном уровне $1 - \alpha$; E [N, M] — матрица исходных данных. «Пусть» N = 3; M = 4; TT = 3.18; E [3, 4] = 1, 2, 3, 1, 3, 4, 4, 4, 2, 2, 2, 2 «КОН» $\diamond$

Результаты вычислений оформляются следующим образом:

I	CX	S	V	M1	NB	NH	P
1	17 ₁₀ —1	91 ₁₀ —2	45	45 ₁₀ —2	32 ₁₀ —1	20 ₁₀ —2	22
2	37 ₁₀ —1	50 ₁₀ —2	10	25 ₁₀ —2	45 ₁₀ —1	29 ₁₀ —1	50 ₁₀ —1
3	20 ₁₀ —1	0	0	0	20 ₁₀ —1	20 ₁₀ —1	0 $\diamond$

В первом столбце (I) приведен порядковый номер, во втором (CX) — средняя арифметическая выборки, затем идут: S — среднее квадратическое отклонение, V — коэффициент вариабельности, M1 — ошибка средней арифметической, NB — верхняя граница доверительного интервала, NH — нижняя граница доверительного интервала, P — точность опыта.

Для определения достоверности различия между вариантами опыта по *t*-критерию используется программа 2.

Программа 2

«ВЫП» «ДЛЯ» I = 1 «Ш» 1 «ДО» N «ВЫП» (XO[I] = A $\times$ O[I] / KO; XK[I] = A $\times$ K[I] / KK); XY = $\Sigma (I=1, N, XO[I]) / N$; XZ = $\Sigma (I=1, N, XK[I]) / N$; X1 = $\Sigma (I=1, N, (XO[I] - XY)^2)$; X2 = $\Sigma (I=1, N, (XK[I] - XZ)^2)$; D = ABS (XY - XZ); XC = (XY + XZ) / L; M = $\sqrt{((X1 \times X2) / N / L (N - 1))}$; MP = M / XC $\times$ 100; MDV / (2) $\times$ M; T = D / MD; «ВЫВ» XY, «ПРОБ» 5, XZ, «ПРОБ» 5 D, «СТРОК», M, «ПРОБ» 5, MP, «ПРОБ» 5, MD, «ПРОБ» 5, «СТРОК», T, «СТРОК»; «Е» T < TT[1] «ТО» «ВЫВ» РАЗНИЦА — НЕ — СУЩЕСТВ. «ИНАЧ» («Е» T $\geq$ TT[1] «И» T < TT[2] «ТО» «ВЫВ» РАЗНИЦА — СУЩЕСТВ. С ВЕР. 95' «ИНАЧ» («Е» T $\geq$ TT[2] «И» T < TT[3] «ТО» «В $\times$ В» РАЗНИЦА — СУЩЕСТВ. С ВЕР. 99 «ИНАЧ» «ВЫВ» РАЗНИЦА — СУЩЕСТВ. С ВЕР. 99.9')) «ГДЕ» N = 4; L = 2; TT[3] = 2.45, 3.71, 5.99; XO[4]; XK[4]; A = 1; KO = 1; KK = 1 «КОН» $\diamond$

В программе задаются: N — число повторностей, L — число вариантов, TT [3] — табличные значения коэффициента Стьюдента для принятых уровней вероятности (в микробиологии это — 0,95; 0,99; 0,999); XO [N], XK [N], A-I, KO-I, KK-I — рабочие массивы.

В качестве примера взято определение достоверности различий между численностью микроорганизмов в обработанной (опыт) и не-

обработанной (контроль) пестицидом почве. Число повторностей (N) равно четырем, вариантов (L) — двум.

Информатива к программе 2 следующая:

«ПУСТЬ»A=10↑3; KO=.8395; KK=.8166; O[4]=28,25,29,27; K[4]=4, 6,7,5«KON»◇,

где A — степень разведения почвенного образца (в примере 10↑3), KO — влажность обработанной почвы, KK — влажность необработанной почвы, O [4] и K [4] — число колоний, выросших на чашке Петри.

Результаты вычислений выдаются на печать в следующем виде:

O [I]	XO [I]	K [I]	XK [I]
28	333531 ₁₀ —1	4	489830 ₁₀ —2
25	297796 ₁₀ —1	6	734750 ₁₀ —2
29	345443 ₁₀ —1	7	857210 ₁₀ —2
27	321620 ₁₀ —1	5	612290 ₁₀ —2
XU=324597 ₁₀ —1	XZ=673520 ₁₀ —2	Д=257245 ₁₀ —1	
М=910896 ₁₀ —3	МР=464804 ₁₀ —5	МД=128819 ₁₀ —2	

РАЗНИЦА—СУЩЕСТВ. С ВЕР. 99.9◇

Первые два столбца — число микроорганизмов в опытных образцах (O [I] без учета влажности почвы, XO [I] — то же с учетом влажности); вторые два столбца аналогичны первым, только для контрольной почвы; XU — средняя арифметическая первого вариационного ряда, т. е. опыта; XZ — средняя арифметическая второго вариационного ряда, т. е. контроля; Д — разность между средними арифметическими вариационных рядов; МД — ошибка разности; МР — точность опыта; Т — фактическое значение критерия Стьюдента.

Программа 3 позволяет вычислить коэффициент корреляции, его ошибку и достоверность, а также коэффициент детерминации.

Программа 3

«ВЫП»XC=Σ(I=1,N,X[I])/N;YC=Σ(I=1,N,Y[I])/N;R=(Σ(I=1,N,X[I]×Y[I])—N×XC×YC)/√((Σ(I=1,N,X[I]↑2)—N×XC↑2)×(Σ(I=1,N,Y[I]↑2)—N×YC↑2));M=√((1—R↑2)/(N—2));RR=R↑2×100;T1=R/M;«ВЫВ»«СТРОК»,R,«ПРОБ»5,RR,«ПРОБ»5,М,«ПРОБ»5,T1,«СТРОК»1;«Е»T1<T[1]«ТО»«ВЫВ»ЗНАЧ. R НЕ СУЩ. «ИНАЧ»«Е»T1<T[2]«ТО»«ВЫВ»'R СУЩ. С ВЕР. 95'«ИНАЧ»«Е»T1<T[3]«ТО»«ВЫВ»'R СУЩ. С ВЕР. 99'«ИНАЧ»«ВЫВ»'R СУЩ. С ВЕР. 99.9'«ГДЕ»T[3]=2.45,3.71,5.96«KON»◇

В информативе к программе 3 задаются: X [N] и Y [N] — сравниваемые выборки, N — число элементов в выборке:

«ПУСТЬ»X[8]=2.9,.5,4,1.5,2,1.8,1.3,.6;Y[8]=105.4,31,59.4,94.5,132.8,595.3,29.6,81.1;N=8«KON»◇

Ответ на задачу следующий:

R=316738₁₀—6 RR=100322₁₀—4 М=387228₁₀—6
T1=817962₁₀—6 ЗНАЧ. R НЕ СУЩ. ◇

В ответе R — коэффициент корреляции, RR — коэффициент детерминации, M — ошибка коэффициента корреляции, T1 — фактическое значение критерия Стьюдента.

Для проведения однофакторного дисперсионного анализа используется программа 4.

Программа 4

«ВЫП»M=0;S=0;«ДЛ»I=1«Ш»1«ДО»K«ВЫП»(L[I]=Σ(J=1,N, X[I, J])/N;M=M+L[I];S=S+Σ(J=1,N,(X[I, J]—L[I])²);M=M/K; S=S/(K×(N—1));Q=0;F=0;«ДЛ»I=1«Ш»1«ДО»K«ВЫП»(Q=Q+(L[I]—M)²;F=F+Σ(J=1,N,(X[I, J]—M)²);Q=Q×N;D=Q/(K—1);Q=Q/F;F=«Е»D>S«ТО»(D/S)«ИНА»(S/D);«ВЫВ»F,«СТР»;MQ=(1—Q²)×(K—1)/(K×(N—1));S=MQ×Φ; Q1=Q—S; «Е»Q1<0«ТО»(Q1=0); Q2=Q+S;«Е»Q2>1«ТО»(Q2=1); «ВЫВ»Q, «ПРОБ», MQ, «ПРОБ», Q1, «ПРОБ», Q2«КОН»◇

В информативе к программе 4 задаются K — число градаций изучаемого фактора; N — число значений переменной в каждой градации; Φ — табличное значение критерия Фишера для $f_1 = K - 1$ и $f_2 = K(N - 1)$; X [K, N] — массив значений изучаемой переменной; L [K] — рабочий массив.

Пусть массив исходных данных представлен так:

1, 1, 2, 2, 1
3, 3, 3, 4, 4
5, 6, 4, 6, 7
9, 8, 7, 7, 8

Тогда информатива будет иметь вид
«ПУСТЬ»K=4;N=5;Φ=3.2;X[4,5]=1,1,2,2,1,3,3,3,4,4,5,6,4,6,7,9,8,7,7,8;L[4]«КОН»◇

На печать выводится следующий ответ:

F=587435₁₀—4
Q=916766₁₀—6 MQ=299138₁₀—7 Q1=821041₁₀—6 Q2—1◇,
где F — вычисленное значение критерия Фишера; Q — показатель силы влияния; MQ — стандартная ошибка показателя Q; Q1 и Q2 — границы доверительного интервала показателя Q.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СХОДСТВА МЕЖДУ ОБЪЕКТАМИ МЕТОДОМ ТАКСОНОМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Математические методы обработки экспериментальных данных позволяют получить дополнительную информацию. Так, например, в почвенных микробиологических исследованиях выявление сходства и различия между микробными ценозами разных биотопов может явиться начальным этапом подбора соответствующих оптимальных условий их функционирования.

Для определения сходства и различия между биотопами по развивающимся в них микробным ценозам удобным оказалось использование одного из методов таксономического (или кластерного) ана-

лиза, основанного на вычислении коэффициента дивергенции (Дюран, Оделл, 1977):

$$D = \left\{ \frac{1}{p} \sum_{k=1}^p \left(\frac{x_{ki} - x_{kj}}{x_{ki} + x_{kj}} \right)^2 \right\}^{\frac{1}{2}},$$

где D — коэффициент дивергенции; p — общее количество признаков, по которым определяется сходство между объектами; k — индекс суммирования; x_{ki} , x_{kj} — количественные значения проявления каждого признака в i -м и j -м объектах. В анализ можно вводить численность микроорганизмов различных таксономических или функциональных групп, их активность и т. д.

Определение сходства между различными объектами выполняют в следующей последовательности: вычисляют треугольную матрицу попарного сходства, матрицу группового сходства, графически представляют результаты по методу средней связи в виде дендрограммы (Бейли, 1970, Sokal, Sneath, 1963).

Для вычисления треугольной матрицы попарного сходства между объектами по коэффициенту дивергенции нами была использована программа, написанная на языке «Аналитик» для ЭВМ «Мир-2».

Программа 5

«ВЫП»«ЭКРАН»«ОЧИ»; $R = N \times N - N$; $R = \epsilon(.5 + R/2)$; «ВЫВ»01
«ЗНАЧ»'«ПУСТЬ» $N = 'N, 'B[', R, 'I = ';$ Ж=0; J=1; V.J=J+1; I=0;
W.I=I+1; K=0; D=0; U.K=K+1; Q1=E[I, K]; Q2=E[J, K]; L=0; «E»
Q1+Q2>0«ТО»L=(Q1-Q2)/(Q1+Q2); D=D+(L+2); «E»K<M«ТО»
«НА»U; D=1-V/(D/M); D=ε(D×1000+.5); «ВЫВ»01«ЗНАЧ»D; «ЕС-
ЛИ»I=N-1«ТО»«ВЫВ»01, «КОН»'«ИНА»«ВЫВ»01, ';; Ж=Ж+1; «E»
Ж=450«ТО»(Ж=0; «СТОП»; «ЭКРАН»«ОЧИ»); «E»I<J-1«ТО»«НА»
W; «E»J<N«ТО»«НА»V«КОН» ◇

Исходные данные для вычисления по программе оформляются в виде информативы. Например:

«ПУСТЬ» $N = ...; M = ...; E[N, M] = ...$ «КОН»◇,

N — количество сравниваемых объектов,

M — количество признаков, по которым выполняется сравнение,

$E[N, M]$ — матрица исходных данных

Тогда информатива будет иметь, к примеру, следующий вид:

«ПУСТЬ» $N = 6; M = 10; E[6, 10] = 3159000, 3005, .3, 10270, 105400, 130400,$
 $156.6, 9.5, 43300, 2830, 6140000, 27500, .1, 992.7, 130000, 161200, 158.3, 5.$
 $6, 48700, 1890, 1214000, 15360, .6, 21834, 59300, 99100, 384, 5.7, 34700, 3220,$
 $1091400, 7320, .1, 10508.8, 39800, 23420, 244, 5.5, 31500, 3170, 6048100, 268$
 $60, 3, 2662.4, 107400, 117800, 132.2, 18.5, 33800, 1040, 1575400, 5570, .1, 105$
 $3.2, 16340, 36860, 149.3, 15.5, 12200, 2550$ «КОН» ◇

Результаты вычисления программы 5 оформляются в виде информативы для программы 6, по которой вычисляется обратная матрица группового сходства (Малашенко и др., 1980).

«ПУСТЬ»N = 6; B[15] = 575,647,516,613,500,649,542,609,506,422,517,
511,475,621,447 «КОН» ◇

Программа 6

«ПУСТЬ»«ПРОЦ»O(A,B,C,D,E)«ПУСТЬ»2.«E»A>C«ТО»D = ε(.5 + (A
—1) × (A—2)/2 + C) ИНАЧ»D = ε(.5 + (C—1) × (C—2)/2 + A); «E»B > C»
ТО»E = ε(.5 + (B—1) × (B—2)/2 + C) ИНАЧ»E = ε(.5 + (C—1) × (C—2) /
2 + B) «КОН» «КОН» ◇
«РАЗР»3.«ЭКРАН»«ОЧИ»; «ВЫВ»01 «ЗНАЧ»'«ПУСТЬ»N = ',N,','; A[',N,
']; B[',N,','3] = '; K=N; L.M = 0; R = —1; «ДЛЯ»I = 2 «ШАГ»1 «ДО»K
«ВЫП»«ДЛЯ»J = 1 «ШАГ»1 «ДО»I—1 «ВЫП»(M = M+1); «E»B[M]>R
«ТО»(R = B[M]; I1 = I; J1 = J)); «ВЫВ»01 «ЗНАЧ»I1,[,I,J1,[,I,R,[,I];
«ДЛЯ»I = 1 «ШАГ»1 «ДО»K—1 «ВЫП»(O(I1,K,I; X,Y); «E»I1 ≠ I «ТО»(R =
B[X]; B[X] = B[Y]; B[Y] = R)); O(J1,K—1,K; X,Y); B[X] = B[Y]; «СТЕР»
«ЗНАЧ»B[Y]; «ДЛЯ»I = 1 «ШАГ»1 «ДО»K—2 «ВЫП»(O(J1,K—1,I; X,Y);
«E»I ≠ J1 «ТО»(R = B[X]; B[X] = B[Y]; B[Y] = R); R = Y + K—2; B[Y] = ε(
5 + (B[Y] + B[R])/2); «СТЕРЕТЬ»«ЗНАЧ»B[R]; K = K—1; «E»K > 2 «ТО»
«НА»L; «ВЫВ»01 «ЗНАЧ»[1,2],B[1],[,1,1,],B[1]—20,[«КОН»] «КОН» ◇

Результат вычислений по программе 6 является промежуточным
этапом и используется как информатива к программе 7.

Программа 7

«ВЫП»«ЭКР»«ОЧИ»; «ВЫВ»01 «ЗНАЧ»'«ПУСТЬ»N = ',N,','; B[',N,','3] = ';
«ДЛЯ»I = 1 «Ш»1 «ДО»N «ВЫП»A[I] = 1; «ДЛЯ»I = 1 «Ш»1 «ДО»N—1 «ВЫ
П»(A1 = A[B[I,1]]; A2 = A[B[I,2]]; A3 = B[I,3]; «ВЫВ»01 «ЗНАЧ»A1,[,I,],
A2,[,I,],A3,[,I,]; A[B[I,1]] = A[N—I+1]; A[B[I,2]] = A[N—I]; A[N—I] = N+
+I; B[I,1] = A1; B[I,2] = A2); «ДЛЯ»I = 2 «Ш»1 «ДО»N «ВЫП»A[I] = 0;
A[I] = 2 × N—1; «ДЛЯ»K = 1 «Ш»1 «ДО»N—1 «ВЫП»(R = 0; J = 1; «ДЛЯ»I
= 1 «Ш»1 «ДО»N—1 «ВЫП»«ЕСЛИ»A[I] > R «ТО»(R = A[I]; J = I); «ДЛЯ
I = K «Ш»—1 «ДО»J + 1 «ВЫП»A[I + 1] = A[I]; A[J + 1] = B[R—N,2];
A[J] = B[R—N,1]); «ВЫВ»33, «МАСС»A; «ВЫВ»01 «ЗНАЧ»2 × N—1,',';
2 × N—1,','; A3—20,','; H = 10;'; «ВЫВ»01, «МАСС»A, '«КОН»'; «РАЗР»2;
«ДЛЯ»I = 1 «Ш»1 «ДО»N—1 «ВЫП»(BETB = I + N; «ВЫВ»«ТАБЛ»1,
B[I,1],B [I,2],B[I,3],BETB) «КОН» ◇

Программа 7 выдает таблицу группового сходства исследуемых
объектов, в которых содержатся также данные, необходимые для
построения дендрограммы:

B [I, 1]	B [I, 2]	B [I, 3]	BETB
4	3	649	7
7	1	630	8
5	2	609	9
8	6	533	10
9	10	501	11 ◇

A [6] = 5, 2, 4, 3, 1,6 ◇

где В [1, 3] — уровень сходства объектов в промилле; А [6] — массив порядка расположения объектов на дендрограмме; В [1, 1] и В [1, 2] — ветви дендрограммы, объединяемые в кластер.

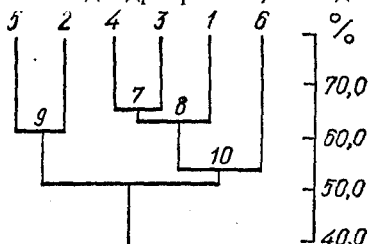


Рис. 49. Дендрограмма, иллюстрирующая групповое сходство между объектами:

1, 2, 3, 4, 5, 6 — исследуемые объекты;
7, 8, 9, 10 — нумерация ветвей, вводимая для удобства построения дендрограммы.

Для выполнения последнего этапа — графического представления группового сходства объектов (рис. 49) — на листе бумаги по горизонтали в удобном масштабе откладывается число отрезков, равное количеству объектов. Отрезки нумеруются в соответствии с их расположением в массиве А [6] (см. результаты вычислений по программе 7), справа или слева по вертикали вычерчивается шкала В [1, 3] (в процентах). Для построения дендрограммы используются данные, полученные в результате вычисления

по программе 7. Так, в первом столбце В [1, 1] указан номер объекта, который нужно соединить с объектом, номер которого указан в столбце В [1, 2]. Цифры в третьем столбце [1, 3] указывают уровень сходства в промилле.

Если количество изучаемых объектов в исходной матрице меньше 20, то построение дендрограмм можно выполнять с помощью ЭВМ, для этого используется программа 8.

Программа 8

```
«ВЫП»«Ф»2;«ВЫВ»«СТРО»;«ДЛЯ»I=1«ШАГ»1«ДО»N«ВЫП»(«ВЫВ»
«ЗНАЧ»A[I], «ПРОБ»; «Е»A[I]<10«ТО»«ВЫВ» «ПРОБ»); «СТОП»;
«ВЫВ»«СТРО»2;U=1;«ДЛЯ»K=1«ШАГ»1«ДО»N-1«ВЫП»«ДЛЯ»I=
1«ШАГ»1«ДО»2«ВЫП»(«ДЛЯ»J=1«ШАГ»1«ДО»N«ВЫП»«ЕСЛИ»B[K,
I]=A[J]«ТО»(B[K,I]=J;«НА»L3);L3.FFF=0);«ДЛЯ»K=2«ШАГ»1«Д
О»N-1«ВЫП»«ДЛЯ»I=1«ШАГ»1«ДО»2«ВЫП»(«Е»B[K,I]>N«ТО»(R
=B[K,I]-N;B[K,I]=e((B[R,1]+B[R,2])/2));UR=1000;K=1;L2.«Д
ЛЯ»K=K«ШАГ»1«ДО»N«ВЫП»(«Е»B[K,3]<UR«ТО»«НА»L;«ДЛЯ»I
=B[K,1]«ШАГ»ДО«B[K,2]-1«ВЫП»A[I]=-1;A[I]=-2;R=e((B[K
,I]+B[K,2])/2);A[R]=-3;L.«ВЫВ»«СТРО»;«ДЛЯ»I=1«ШАГ»1«ДО
»N«ВЫП»(«Е»A[I]>0«ТО»«ВЫВ»'1';«Е»A[I]=0«ТО»«ВЫВ»'
';«Е»A[I]=-2«ТО»(«ВЫВ»'—';A[I]=0);«Е»A[I]=-3«ТО»(«ВЫВ»'—
';A[I]=-1);«Е»A[I]=-1«ТО»(«ВЫВ»'—';A[I]=0));UR=UR-N;U=
U-1;«ВЫВ»'—';«Е»U=0«ТО»(U=5;«ВЫВ»«ЗНАЧ»'—',UR+N);«Е
»K≤N«ТО»«НА»L2«КОН» ◇
```

Информативной к программе 8 является результат вычисления по программе 7, выведенный на экран устройства отображения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Агапов А. И. Исследование комплексообразования Co^{++} с органическими соединениями почвы. Сообщение I.— Агрохимия, 1966, № 9, с. 88—95.
- Айвазов Б. В. Основы газовой хроматографии.— М.: Высшая школа, 1977.— 183 с.
- Алисова С. М. Использование ацетиленового метода для изучения некоторых вопросов симбиотической азотфиксации горохом и люцерной.— Автореф. дис. ... канд. биол. наук, Л., 1979 — 24 с.
- Андреюк Е. И., Владимирова Е. В., Коган С. Б. Актиномицеты почв юга европейской части СССР и их биологическая активность.— Киев : Наук. думка, 1974.— 143 с.
- Андреюк Е. И., Коган С. Б. Синтез витаминов группы В почвенными актиномицетами.— Микробиология, 1967, 36, вып. 2, с. 227—232.
- Андреюк Е. И., Коган С. Б., Владимирова Е. В. Биосинтез свободных аминокислот почвенными актиномицетами.— С.-х. биология, 1968, 3, № 2, с. 258—261.
- Андріюк К. І., Коган С. Б. Синтез вітамінів групи В актиноміцетами в умовах глибинного вирощування.— Мікробіол. журн., 1972, 34, № 6, с. 685—689.
- Андреюк Е. И., Козырицкая В. Е. Образование каротиноидных пигментов актиномицетами желтой группы в зависимости от состава среды и освещенности.— Микробиол. журн., 1979, 41, № 2, с. 125—128.
- Андріюк К. І., Коптева Ж. П., Гавриш М. та ін. Деякі методи виділення і очистки токсичних речовин синьозелених водоростей.— Мікробіол. журн., 1977, 39, № 5, с. 616—620.
- Антипов-Каратаев И. Н. О системах методов, применяемых в США при исследовании глинистых минералов.— Почвоведение, 1961, № 10, с. 110—113.
- Аппельт Г. Введение в методы микроскопического исследования.— М.: Медгиз, 1959.— 426 с.
- Аринишкина Е. А. Руководство по химическому анализу почв.— М.: Изд-во МГУ, 1970.— 487 с.
- Африкян Э. Г., Бабилян Р. А. Образование и распределение витамина B_{12} в почве.— В кн.: Микроорганизмы и эффективное плодородие почвы : Тр. Ин-та микробиологии АН СССР, 1961, вып. 11, с. 341—345.
- Ахрем А. А., Кузнецов А. И. Тонкослойная хроматография. М.: Наука, 1965.— 175 с.
- Бабко А. К., Пилипенко А. Т. Фотометрический анализ.— М.: Химия, 1968.— 387 с.
- Багнюк В. М., Мельничук Д. А. Применение модифицированного метода Зо Белла и Майерса для определения амилазной активности грунтов Киевского водохранилища.— В кн.: Республ. конф. молодых исследователей по физиологии и биохимии растений (Киев, 1969) : Тез. докл. Киев : Наук. думка, 1969, с. 40—41.

- Банковский Ю. А., Межараукс Г. Г. и др. Аналитическое применение 8-меркаптохинолина (тиооксина) и его производных.— Журн. аналитич. химии, 1962, 17, № 6, с. 721—734.
- Басаргин Н. Н., Ногина А. А. Определение сульфатов в природной и котловой воде в присутствии фосфатов прямым титрованием солями бария с использованием индикатора нитрохромазо и арсенатов.— Журн. аналитич. химии, 1967, 22, № 3, с. 394—399.
- Бейли Н. Математика в биологии и медицине.— М.: Мир, 1970.— 326 с.
- Бейнон Д. Масс-спектрометрия и ее применение в органической химии.— М.: Мир, 1964.— 701 с.
- Бейтс Р. Определение рН. Теория и практика.— Л.: Химия, 1968.— 398 с.
- Березкин В. Г., Бочков А. С. Количественная тонкослойная хроматография.— М.: Наука, 1980.— 183 с.
- Бирюзова В. И., Боровягин В. Л., Гилев В. П. и др. Электронномикроскопические методы исследования биологических объектов.— М.: Изд-во АН СССР, 1963.— 204 с.
- Благовидов Н. Л., Рабинович В. А., Сель-Бекман И. Я. О характере изменения окислительного потенциала по профилю некоторых почв Ленинградской области.— Почвоведение, 1957, № 6, с. 81—85.
- Бокрис Дж., Дамьянович А. Современные аспекты электрохимии.— М.: Мир, 1967.— 370 с.
- Большой практикум по микробиологии. / Под ред. Г. Л. Селибера — М.: Высшая школа, 1962.— 491 с.
- Бояркин А. Н. Хроматографическое разделение сахаров.— Физиология растений, 1955, 2, вып. 3, с. 298—303.
- Браташевский Ю. А., Гайдаров О. И., Гордиенко С. А. Электронный парамагнитный резонанс в гуминовых кислотах бурых углей с различным содержанием марганца.— Журн. физ. химии, 1971, 45, № 11, с. 2913—2916.
- Бронников В. И. Определение концентрации тяжелого изотопа азота ^{15}N на масс-спектрометре МИ-1305.— В кн.: Практикум по агрономической химии.— М., 1968, с. 447—453.
- Булатов М. И., Калинин И. П. Практическое руководство по фотоколориметрическим и спектрофотометрическим методам анализа.— Л.: Химия, 1976.— 376 с.
- Бэррин Д. Спектроскопические методы.— В кн.: Методы практической биохимии.— М.: Мир, 1978, с. 141—184.
- Везлих А. И. Ионообменный синтез.— М.: Химия, 1973.— 231 с.
- Верещагин А. Г. Биохимия триглицеридов.— М.: Наука, 1972.— 308 с.
- Верховская И. Н., Габелова Н. А., Зиновьева Е. Г. и др. Метод меченых атомов в биологии.— М.: Изд-во МГУ, 1955.— 452 с.
- Вершинин П. В., Поясов Н. П. Метод исследования почвенного воздуха.— В кн.: Сб. трудов по агроном. физике, 1952, вып. 5, с. 57—61.
- Вильсон П. Биологическая фиксация азота.— В кн.: Физиология бактерий.— М.: Изд-во иностр. лит., 1954, с. 368—387.
- Вознесенский В. Л. Первичная обработка экспериментальных данных.— Л.: Наука, 1969.— 80 с.
- Вольф В. Г. Статистическая обработка опытных данных.— М.: Колос, 1966.— 254 с.
- Воробьева Л. А., Орлов Д. С. Полярографические методы исследования почв.— М.: Изд-во МГУ, 1972.— 280 с.
- Галлер И. А. Вимірювання окисно-відновного потенціалу в мікробіологічних середовищах.— Мікробіол. журн., 1949, 2, № 2, с. 79—91.
- Гиллем А., Штерн Е. Электронные спектры поглощения органических соединений (иср. с англ.).— М.: Изд-во иностр. лит., 1957.— 387 с.
- Гинзбург К. Е., Щеглова Г. М., Вульфис Е. В. Ускоренный метод сжигания почв и растений.— Почвоведение, 1963, № 5, с. 89—96.
- Глуценко Т. Ф. Потенциометрическое титрование гуминовых кислот каустобилитов.— В кн.: Микробиологические и биохимические исследования почв.— Киев: Урожай, 1971, с. 205—211.

Гордиенко С. А., Гавриш И. Н., Ивахно Л. И. Сравнительное исследование торфяных гуминовых кислот методом гель-фильтрации на сефадексе. — Почвоведение, 1973, № 11, с. 138—142.

Гордиенко С. А., Ивахно Л. И. Электрофоретические исследования гуминовых кислот. — В кн.: Микробиологические и биохимические исследования почв. — Киев : Урожай, 1971, с. 211—214.

Гороховский В. М., Максимова Г. Г. Исследование состава комплексных соединений методом высокочастотного титрования. — Журн. прикл. химии, 1957, 30, № 3, с. 51—54.

Горяченкова Е. В. Метод разделения белков при помощи ионитов на целлюлозной основе. — Методические письма, 1959, вып. 11, с. 21—25.

ГОСТ 20422—75. Спектрофотометрическое определение сульфатов в водных вытяжках конденсаторной бумаги. — Введ. 01.01. 1975.

Детерман Г. Гель-хроматография. — М. : Мир, 1970. — 252 с.

Донец А. Т., Котелев В. В., Бехтерева М. А. Качественный состав и количественное содержание липидов у микобактерий. — Микробиология, 1970, 39, вып. 2, с. 300—304.

Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. — М. : Колос, 1979. — 416 с.

Дульгеров О. М. Динамика складу ґрунтового повітря в умовах зрошення. — Мікробіол. журн., 1977, 39, № 6, с. 719—721.

Дульгеров О. М., Прохоров Г. В. Газозбірник для відбору ґрунтового повітря в умовах зрошення. — Мікробіол. журн., 1977, 39, № 4, с. 462—466.

Дульгеров А. Н., Серая Л. И. Целлюлозоразрушающие микроорганизмы орошаемых почв юга Украины. — Микробиол. журн., 1978, 40, № 1, с. 7—11.

Дьяконова К. В. Железогумусовые комплексы и их роль в питании растений. Почвоведение, 1962, № 7, с. 19—26.

Дюран Б., Оделл П. Кластерный анализ. — М. : Статистика, 1977. — 127 с.

Елинов Н. П., Орлов Н. А., Ефимова Т. П. Липиды *Aureobasidium* (*Pullularia*) *pullulans*. — Микробиология, 1975, 44, вып. 6, с. 1051—1056.

Жданова Н. Н., Походенко В. Н. Спектры ЭПР и радиоустойчивость некоторых видов сем. Dematiaceae. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1970, № 1, с. 83—87.

Заваров Г. В. Некоторые улучшения метода прямого титрования сульфатов. — Зав. лаборатория, 1957, № 5, с. 541—542.

Зайдель А. Н. Элементарные оценки ошибок измерений. — М.; Л. : Наука, 1965. — 79 с.

Зайцева Г. Н., Агатова А. И., Белозерский А. Н. Некоторые данные по взаимосвязи азотфиксации с дыханием и окислительным фосфорилированием у *Azotobacter vinelandii*. — Биохимия, 1961, 26, вып. 2, с. 338—349.

Зайцева Г. Н., Тюленева Н. П. Количественное определение аминокислот на хроматограммах посредством образования медных производных с нингидрином. — Лаб. дело, 1958, 3, с. 24—30.

Захарьевский М. С. К методике определения окислительно-восстановительного потенциала бактериальных культур. — Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 1944, № 4—5, с. 78—85.

Захарьевский М. С. Определение окислительно-восстановительного потенциала биологических систем. — В кн.: Биологические антисептики. Л. : Медгиз, 1950, с. 65—69.

Звягинцев Д. Г. Методы подготовки почв к количественному учету микроорганизмов. — Биологические науки, 1969, № 3, с. 131—145.

Золотов Ю. А. Очерки аналитической химии. М. : Химия, 1977. — 239 с.

Зубко И. К. Изучение активности несимбиотической фиксации атмосферного азота в почвах ацетиленовым методом. — Автореф. дис. ... канд. биол. наук, Л., 1975. — 26 с.

Зубко И. К., Чундерова А. Н. О возможности применения ацетиленового метода для определения продуктивности несимбиотической азотфиксации в почве. — В кн.: Экология и физиология почвенных микроорганизмов. Л., 1976, с. 126—135.

Иванов И. Д. Нефелометрический метод определения активности протеиназы *Bacillus subtilis*. — Микробиология, 1960, 29, вып. 2, с. 289—292.

Иванов И. Д., Рахлеева Е. Е. Полярография структуры и фракции биополимеров. — М. : Наука, 1968. — 344 с.

Иерусалимский Н. Д. Основы физиологии микробов.—М.: Изд-во АН СССР, 1963.— 244 с.

Калининская Т. А., Рао В. Р. и др. Определение азотфиксирующей активности почвы, занятой под посевами риса при помощи ацетиленового метода.— Микробиология, 1973, 42, вып. 3, с. 481—485.

Калининская Т. А., Ипполитов Л. Т., Белов Ю. М. Применение газовой хроматографии в почвенно-микробиологических исследованиях.— В кн.: Микробиологические процессы в почвах и урожайность сельскохозяйственных культур: Материалы к республиканской конференции, Вильнюс, 6—7 июня 1978 г. Вильнюс: 1978, с. 130—131.

Калининская Т. А. Применение ацетиленового метода для определения численности и активности азотфиксирующих микроорганизмов.— В кн.: VI съезд Всесоюзного микробиологического общества «На главных путях научно-технического прогресса» (Рига, 25—29 марта 1980 г.): Тез. докл. Рига, 1980, 5, с. 36.

Кармолиев Р. Х. Современные биохимические методы исследования в ветеринарии и зоотехнии.— М.: Колос, 1971.— 288 с.

Келлерман В. В., Цюрупа И. Г. Источники подвижного железа в почве.— Почвоведение, 1965, № 10, с. 53—61.

Кіпріанова О. А. Синтез і споживання вітамінів групи В дизентерійними бактеріями.— Мікробіол. журн., 1965, 27, № 2, с. 32—39.

Княжева В. М., Суми́йко И. С. и др. Анодное поведение хромоникелевых стайел, стабилизированных титаном.— Защита металлов, 1966, 2, вып. 6, с. 629—635.

Коган С. Б. Утворення вітамінів групи В актиноміцетами, вилученими з ґрунтів півдня СРСР.— Мікробіол. журн., 1970, 32, № 6, с. 726—730.

Козлова Г. А. Біосинтез вітамінів групи В ґрунтовими мікобактеріями.— Мікробіол. журн., 1970, 32, № 1, с. 25—32.

Козырицкая В. Е., Лойко З. И., Андреюк Е. И. Липиды актиномицетов желтой группы.— Прикл. биохимия и микробиология, 1979, 15, с. 548—553.

Кононова М. М. К изучению процесса новообразования гумусовых веществ.— Почвоведение, 1944, № 10, с. 456—470.

Кононова М. М. Органическое вещество почвы.— М.: Изд-во АН СССР, 1963.— 314 с.

Коптева Ж. П. Біосинтез тіаміну, рибофлавіну й вітаміну В₁₂ деякими синьо-зеленими водоростями.— Мікробіол. журн., 1970, 32, № 4, с. 433—439.

Коптева Ж. П. Біосинтез біотину, піридоксину, нікотинової і пантотенової кислот деякими синьо-зеленими водоростями.— Мікробіол. журн., 1970, 32, № 5, с. 555—560.

Коротченко Н. И. Содержание и методы определения витаминов в кормовых дрожжах.— М.: Московская правда, 1963.— 38 с.

Косенко Л. В., Осадочная А. И. и др. Инфракрасные спектры экзополисахаридов олигонитрофильных бактерий.— Микробиол. журн., 1980, 42, № 2, с. 158—162.

Кралова М., Кисела Ф., Яноушек И. Масс-спектрометрический анализ в сельскохозяйственных исследованиях и практике.— Международный с.-х. журн., № 3, с. 64—67.

Крешков А. П. Основы аналитической химии. 4-е изд.— М.: Химия, 1976.— Кн. 2. 480 с.

Крюков П. А. Измерение величины рН со стеклянным электродом.— В кн.: Современные методы химического анализа природной воды.— М.: Изд-во АН СССР, 1955, с. 7—13.

Кузнецов Ю. Н. О специфике, законах и категории аналитической химии.— Зав. лаборатория, 1946, № 12, с. 1521—1522.

Куцева Л. С. Микробиологический метод определения витамина В₁₂.— В кн.: Витаминные ресурсы и их использование.— Изд-во АН СССР, 1955, с. 175—181.

Лайтинен Г. А., Харрис В. Е. Химический анализ. М.: Химия, 1979.— 624 с.

Латимер В. М. Окислительные состояния элементов и их потенциалы в водных растворах.— М.: Изд-во иностр. лит., 1954.— 400 с.

Левшин В. Л., Левшин Л. В. Люминесценция и ее применение.— М.: «Наука», 1972.— 183 с.

Львов Н. П., Любимов В. И. Изучение физиологии новой азотфиксирующей микобактерии *Mycobacterium azot-absorptum* sp. n. — Изв. СССР, сер. биол., 1965, № 2, с. 250—256.

Любимов В. М., Лосева Л. П., Львов Н. П. Об индуцированном характере ферментов азотфиксации у *Mycobacterium azot-absorptum* sp. n. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1965, № 3, с. 392—394.

Люминесцентный анализ. / Под ред. М. А. Константиновой-Шлезингер. — М.: Изд-во физико-математич. лит., 1961. — 399 с.

Ляликов Ю. С. Физико-химические методы анализа. — М.: Химия, 1974. — 536 с.

Лях С. П., Рубан Е. А. Фотопротекторное действие пигмента *Nadsoniella nigra*. — Микробиология, 1968, 37, вып. 5, с. 862—864.

Майрановский С. Г., Страдынь Я. П., Безуглый В. Д. Полярография в органической химии. — Л.: Химия, 1975. — 351 с.

Маклохан К. А. Магнитный резонанс. — М.: Химия, 1976. — 144 с.

Макура Я. Применение непрерывнопоточного метода в почвенной микробиологии. — В кн.: Непрерывное культивирование микроорганизмов. — М.: Пищевая промышленность, 1968, с. 377—408.

Малашенко Ю. Р., Мучник Ф. В. и др. Математические модели и ЭВМ в микробиологической практике. — Киев: Наук. думка, 1980. — 196 с.

Маличенко С. М., Лисова Н. Е., Старченков Е. П. Экспрессия оперона *Rhizobium japonicum* под влиянием цАМФ. — В кн.: Молекулярная биология. Киев: Наук. думка, 1979, вып. 24, с. 50—54.

Мальцева Н. Н., Изжеевская В. В., Диденко Т. Б. Новые формы азотфиксирующих олигонитрофилов. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1972, № 3, с. 347—354.

Мальцева Н. Н., Юрченко В. М. Досвід використання ізотопного методу для вивчення азотфіксуючої здатності олігонітрофільних бактерій. — Мікробіол. журн., 1971, 33, № 5, с. 650—654.

Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов. / Под ред. Н. А. Красильникова. — М.: Изд-во МГУ, 1966. — 212 с.

Методы органической биохимии. / Под ред. Б. Уильямс, К. Уилсон. — М.: Мир, 1978. — 265 с.

Методы почвенной микробиологии и биохимии. / Под ред. Д. Г. Звягинцева. — М.: Изд-во МГУ, 1980. — 223 с.

Методы применения изотопа азота ^{15}N в агрохимии. — М.: Колос, 1977. — 158 с.

Микробиологические методы определения витаминов, аминокислот и антибиотиков. — М.: Колос, 1968. — 159 с.

Милевский Е. И. Полисахарид *Bacillus utiliginosus* как средство защиты микроорганизмов от УФ-радиации. — Микробиология, 1966, 35, вып. 2, с. 307—311.

Милехина Е. И., Рахлеева Е. Е., Иванов И. Д. и др. Влияние разбавителей и ингибиторов окислительного фосфорилирования на азотфиксацию и восстановление ацетилена в клетках *Azotobacter vinelandii*. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1971, № 3, с. 415—422.

Милехина Е. И., Рахлеева Е. Е., Иванов И. Д. Влияние парциального давления кислорода и концентрации субстрата на восстановление ацетилена интактными клетками *Azotobacter vinelandii*. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1976, № 2, с. 255—260.

Митрука Б. М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине. — М.: Медицина, 1978. — 608 с.

Михайлов Н. Ф., Дьяков С. И. Люминесцентная микроскопия. — М.: Медгиз, 1961. — 223 с.

Мятликова К. О. Спрощена конструкція капілярного педоскопа для мікробіологічних досліджень. — Мікробіол. журн., 1976, 38, № 4, с. 513—514.

Некрасов Н. И. О неравновесном окислительно-восстановительном потенциале. — Журн. физ. химии, 1938, 11, вып. 1, с. 84—98.

Некрасов Н. И., Парфенова О. И. Кривые деполяризации электродов в водных средах как характеристика окислительно-восстановительных свойств последних. — Микробиология, 1938, 7, вып. 2, с. 164—185.

Никитин Д. И., Макарева Е. Д. Применение электронного микроскопа для

- количественного учета микроорганизмов в суспензии почв.— Почвоведение, 1970, № 10, с. 51—55.
- Ничик М. М. Создание *piz* - плазмид и перенос генов азотфиксации у микроорганизмов.— В кн.: Молекулярная биология.— Киев : Наук. думка, 1979, вып. 24, с. 46—50.
- Нойбергер А., Маршалл Р. Методы качественного и количественного анализа углеводных компонентов.— В кн.: Гликопротеины, М. : Мир, 1969, т. 1, с. 17—25.
- Одинцова Е. Н. Микробиологические методы определения витаминов.— М. : Изд-во АН СССР, 1959.— 379 с.
- Оксредметрия. / Под ред. акад. Б. Н. Никольского, докт. хим. наук. В. В. Пальчевского.— Л. : Химия., 1975.— 304 с.
- Ольшанова К. М., Потапова М. А., Морозова Н. М. Практикум по хроматографическому анализу.— М. : Высшая школа, 1970, с. 141—154.
- Орлов Д. С. Методы определения рН и окислительно-восстановительного потенциала.— В кн.: Агрохимические методы исследования почв.— М. : Наука, 1975.— 655 с.
- Орлов Д. С., Нестеренко Н. В. Образование гуматов кобальта, никеля, меди и цинка.— Научные доклады высшей школы, сер. биол. науки, 1960, № 3, с. 195—199.
- Основы жидкостной хроматографии. / Пер. с англ. Под ред. А. А. Жуковича.— М. : Мир, 1973.— 246 с.
- Пасхина Т. С. Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге.— В кн.: Современные методы в биохимии. М. : Медицина, 1964, т. 1, с. 162—180.
- Перфильев Б. В., Габе Д. Р. Капиллярные методы изучения микроорганизмов.— М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1961.— 534 с.
- Петрова И. С., Винцонайте М. М. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробиологического происхождения.— Прикл. биохимия и микробиология, 1966, 2, вып. 3, с. 322—327.
- Печуркин Н. С., Терсков И. А. Анализ кинетики роста и эволюции микробных популяций.— Новосибирск : Наука, 1975.— 215 с.
- Печуркин Н. С. Популяционная микробиология.— Новосибирск : Наука, 1978.— 273 с.
- Пешикова В. М., Громова М. И. Методы адсорбционной аналитической химии.— М. : Высшая школа. 1965.— 280 с.
- Пименова М. Н., Гречушкина Н. Н., Азова Л. Г. Руководство к практическим занятиям по микробиологии.— М. : Изд-во МГУ, 1971.— 221 с.
- Поволоцкая К. А., Зайцева Н. И., Скоробогатова Е. П. Флуорометрический метод определения рибофлавина.— В кн.: Витаминные ресурсы и их использование. М. : Изд-во АН СССР, 1955, с. 108—120.
- Помощникова Н. А. Микробиологический метод определения пантотеновой кислоты.— В кн.: Витаминные ресурсы и их использование. М. : Изд-во АН СССР, 1955, с. 152—157.
- Помощникова Н. А. Микробиологический метод определения пиридоксина (витамина В₆).— В кн.: Витаминные ресурсы и их использование. М., Изд-во АН СССР, 1955, с. 145—152.
- Поспишил Ф. Электрофорез гумусовых веществ и их комплексов с медью.— Почвоведение, 1962, № 12, с. 44—53.
- Практикум по микробиологии. / Под ред. Егорова Н. С.— М. : Изд-во МГУ, 1976.— 301 с.
- Применение стабильного изотопа азота ¹⁵N в исследованиях по земледелию.— М. : Колос, 1973.— 280 с.
- Пришибил Р. Комплексоны в химическом анализе.— М. : Изд-во иностр. лит., 1960.— 580 с.
- Работнова И. Л. Роль физико-химических условий (рН и гН₂) в жизнедеятельности микроорганизмов.— М. : Изд-во АН СССР, 1957.— 276 с.
- Работнова И. Л. Исследования физиологического состояния микроорганизмов при непрерывном хемостатном культивировании.— В кн.: Теория и практика непрерывного культивирования микроорганизмов : Итоги науки и техники. Сер. : Микробиология, 1975, 4, с. 5—51.

Роботнова И. Л., Позмогова И. Н. Хемостатное культивирование и ингибирование роста микроорганизмов.— М. : Наука, 1979.— 206 с.

Рангелова В. Н., Войтенко Л. Н. Свободные аминокислоты клубеньковых бактерий клевера в чистых культурах и в условиях симбиоза.— Микробиол. журн., 1979, 41, № 6, с. 613—619.

Рао В. Р. Несимбиотическая фиксация азота в почвах рисовых полей.— Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— М., 1973.— 27 с.

Риттенберг Д. Приготовление образцов газа для масс-спектрометрического изотопного анализа.— В кн.: Получение и определение меченых атомов.— М. : Изд-во иностр. лит., 1948.— с. 45—58.

Рихирева Г. Т., Каюшин Л. П. и др. Исследования спектров электронного парамагнитного резонанса фотосинтезирующих зеленых бактерий.— Биофизика, 1964, № 9, с. 390—392.

Рихирева Г. Т., Умрихина А. В. и др. Фотоиндуцированные свободнорадикальные состояния в фотосинтетических системах.— Биоэнергетика и биологическая спектроскопия.— М. : Наука, 1967, с. 113—118.

Родина А. Г. Методы водной микробиологии.— М. ; Л. : Наука, 1965.— 363 с.

Романенко В. И., Кузнецова С. И. Экология микроорганизмов пресных водоемов.— Л. : Наука, 1974.— 193 с.

Роскин Г. И., Левинсон Л. Б. Микроскопическая техника.— 3-е изд.— М. : Совет. наука, 1957.— 467 с.

Рубан Е. Л., Фомин Г. В., Лях С. П. Исследование меланинов *Nadsoniella nigra* методом ЭПР.— Докл. АН СССР, 1968, 182, № 5, с. 1219—1222.

Саминский Е. М. Электрофорез.— В кн.: Физико-химические методы изучения, анализа и фракционирования биополимеров.— М. ; Л. : Наука, 1966, с. 40—108.

Самойлова О. П., Блюменфельд Л. А. Изменение магнитных свойств культуры дрожжей в процессах роста и клеточного деления.— Биофизика, 1961, 6, вып. 1, с. 15—19.

Сель-Бекман И. Я., Рабинович В. А., Куровская О. В. Профильные кривые ОВП в связи с условиями почвообразования.— Почвоведение, 1960, № 6, с. 66—70.

Сендел Е. Б. Колориметрические методы определения следов металлов.— М. : Мир, 1964.— 559 с.

Сердобольский И. П. Методы определения рН и окислительно-восстановительного потенциала по агрохимическим исследованиям.— В кн.: Агрохимические методы исследования почв.— 4-е изд.— М. : Наука, 1965, с. 176—228.

Скочинська Н. М., Канцелярук Р. М., Долгополова Т. Т. Синтез тіаміну і рибофлавіну бульбочковими бактеріями конюшини і люпину.— Микробиол. журн., 1975, 37, № 3, с. 314—319.

Скочинська Н. М., Канцелярук Р. М. та ін. Активність дегідрогеназ бульбочкових бактерій люпину.— Микробиол. журн., 1975а, 37, № 4, с. 427—431.

Скочинська Н. М., Канцелярук Р. М., Рангелова В. М. Синтез піридоксину і кобаламіну бульбочковими бактеріями конюшини і люпину.— Микробиол. журн., 1975б, 37, № 4, с. 433—438.

Скочинская Н. Н., Канцелярук Р. М. и др. Дегидрогеназная активность клубеньковых бактерий люпина в условиях симбиоза.— Микробиол. журн., 1978, 40, № 5, с. 572—576.

Соломин Г. А. Предварительная обработка электродов при измерении окислительно-восстановительных потенциалов.— Гидрохимические материалы, 1959, 28, с. 222—229.

Соломин Г. А. К методике определения окислительно-восстановительного потенциала и рН осадочных пород.— М. : Наука, 1964.— 87 с.

Стары И. Экстракция хелатов. / Пер. с англ.— М. : Мир, 1966.— 294 с.

Стейнер Р., Эдельберг Э., Инерзм Дж. Мир микробов.— М. : Мир, 1979, т. 1.— 320 с.

Степаненко Л. С., Ребачук Н. М., Максимов О. Б. Методы фракционирования гуминовых кислот. (Разделение фракций на гелях).— Химия твердого топлива, 1962, № 2, с. 24—32.

- Теплер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по микробиологии. — М. : Колос, 1979. — 216 с.
- Тимофеев К. Н., Рубин А. Б. Изучение первичных процессов фотосинтеза методом ЭПР. — В кн.: Исследование свободнорадикальных состояний в связи с их ролью в регуляции биологических процессов: Тр. Междунар. симпозиума. Пушкино, май 1971. Пушкино, 1972, с. 132—146.
- Троицкий Г. В. Электрофорез белков. — Харьков: Изд-во Харьков. ун-та, 1962. — 323 с.
- Умаров М. М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях. — Почвоведение, 1976, № 11, с. 119—123.
- Федорова Р. И., Милехина Н. И. и др. К вопросу о применении ацетиленового метода для определения азотфиксирующей способности почв. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1979, № 1, с. 106—117.
- Физико-химические методы исследования почв. / Под ред. Н. Г. Зырина, Д. С. Орлова. — М. : Изд-во МГУ, 1980. — 381 с.
- Фирсова Е. С. Модификация метода Дроздова для определения свободной окиси Fe. — Почвоведение, 1956, № 11, с. 73—76.
- Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. — М. : Мир, 1980. — 582 с.
- Фрейман Л. И., Макаров В. А., Брыскин И. Е. Потенциостатические методы в коррозионных исследованиях и электрохимической защите. — Л. : Химия, 1972. — 237 с.
- Фритц Д. С., Фриланд М. Д. Прямое объемное определение сульфатов. — Химия и химическая технология, 1955, № 7, с. 3—5.
- Фробишер М. Основы микробиологии. — М. : Мир, 1965. — 678 с.
- Фрумкин А. Н., Багоцкий В. С. и др. Кинетика электродных процессов. — М. : Изд-во, МГУ, 1952. — 317 с.
- Хроматография в тонких слоях. / Под ред. Э. Штоля. — М. : Мир, 1965. — 508 с.
- Цюрупа И. Г. К вопросу выделения свободного (несиликатного) Fe и Al из почв и глин. — Почвоведение, 1961, № 4, с. 96—99.
- Шарло Г. Методы аналитической химии. — М. ; Л. : Химия, 1965. — 975 с.
- Шевченко И. Г., Горобыцкий В. Н. Полярография в онкологии. — Киев : Госмедиздат УССР, 1964. — 134 с.
- Шеховцов Н. А. Магнитные масс-спектрометры. — М. : Атомиздат, 1971. — 232 с.
- Шкляр В. Х. Микроскопические грибы *Trichoderma lignorum* T. koningi как продуценты целлюлолитических ферментов. — Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Минск, 1969. — 21 с.
- Шлегель Г. Общая микробиология. — М. : Мир, 1972. — 476 с.
- Шмидт Э. Ф. Дифференциация штаммов клубеньковых бактерий на основании данных по определению активности «бессубстратных» дегидраз. — Микробиология, 1964, 33, вып. 2, с. 284—291.
- Экспериментальная микробиология. / Под ред. Св. Быдарова — София : Медицина и физкультура, 1965. — 486 с.
- Юденфренд С. Ф. Флюоресцентный анализ в биологии и медицине. — М. : Мир, 1965. — 484 с.
- Ястребов М. Г. Игла для взятия проб почвенного воздуха в грунтовых водах поймы р. Вязьмы. — Почвоведение, 1965, № 4, с. 89—96.
- Abramson H. A., Moyer L. S., Gorin M. N. Electrophoresis of Proteins. — N. Y. : Reinhold Publ. Co., 1942. — 320 p.
- Aguilera N. H., Jackson M. Z. Iron oxide removal from soils and clays. — Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 1956, 17, N 4, — 531—532 p.
- Alam M., Ikawa M., Sasner I. I., Sawyer P. I. Purification of Aphaniizomenon Pos-aquae toxin and it's chemical and physiological properties. — Toxicon, 1973, 11, № 1, p. 65—72.
- Anderson P. A. Automatic recording of the growth rates of continuously cultured microorganisms. — J. of Gen. Physiol., 1953, 36, p. 733—735.
- Aomine Sh. A review research on redox potentials of paddy soils in Japan. — Soil Sci., 1962, 94, N 1, p. 6—13.
- Bishop C. T., Anel E. F., Gorham P. R. Isolation and identification of the Fact-

- Death factor in *M. aeruginosa* NRC — 1.— *Canad. J. Biochem. and Physiol.*, 1959, 37, N 3, p. 453—455.
- Breemen N. van. The effect of illdefined ferric oxides on the redox characteristics of flooded soils.— *Netherl. J. Agric. Sci.*, 1969, 17, N 4, p. 28—35.
- Bryson V. Microbial selection. P. II. The turbidostatic selector — a device for automatic isolation of bacterial variants.— *Science*, 1952, 116, p. 48—52.
- Burris R. H. Failure of barley to fix molecular ^{15}N .— *Science*, 1941, 94, N 2436, p. 238—239.
- Burris R. H., Eppling F. S., Wahlin H. B., Wilson P. W. Studies of biological nitrogen fixation with isotopic nitrogen.— *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1942, 7, p. 258—262.
- Burris R. H., Eppling E. J., Wahlin H. B., Wilson P. W. Detection of nitrogen fixation with isotopic nitrogen.— *J. Biol. Chem.*, 1943, 148, N 2, p. 349—357.
- Campbell N. E. R., Dular R., Lees H., Standing H. G. The production of $^{15}\text{N}_2$ by New protons for use in biological nitrogen fixation.— *Canad. J. Microbiol.*, 1967, 13, p. 587—599.
- Clark W. M. Oxidation-reduction of organic systems.— Baltimore: Williams and Wilkins, 1960.— 584 p.
- Debb B. C. The estimation of free iron oxides in soils and clays and their removal.— *J. Soil Sci.*, 1950, 1, N 1—2, p. 35—37.
- Dijk H. van Electrometric titration of humic acids.— *Scient. Proc. Roy., Dublin Soc., Ser. A*, 1960, 1, N 4, p. 163—164.
- Dilworth M. Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*.— *Biophys. Acta*, 1966, 127, p. 285—294.
- Dion H. G. Iron oxide removal from clays and its influence on base exchange properties and X-ray diffraction pattern of the clay. *Soil Sci.*, 1944, 58, N 6, p. 25—32.
- Drosdoff M. The determination of free oxides in soil colloids.— *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1941, 6, N 1, p. 135—138.
- Greilich J., Klimanek E. M. Über verschiedene Methoden der Bodenluftgewinnung und der Bodenluftanalyse.— *Arch. Acker. und Pflanzenbau und Boden*, 1975, 5, N 19, S. 347—353.
- Hamilton P. B., Magee W. F., Mortenson L. E. Nitrogen fixation by *Aerobacter aerogenes* and cell-free extracts of the *Azotobacter vinelandii*.— *Bact. Proc.*, 1953, p. 82—83.
- Hardy R. W. F., Holstem L. D., Jackson E. K., Burns R. C. The acetyleneethylene assay for N_2 fixation; laboratory and field evaluation.— *Plant Physiol.*, 1968, 43, N 8, p. 1185—1207.
- Hardy R. W. F., Knight. ATP-dependent reduction of azide and HCN by N_2 -fixing enzymes of *Az. vinelandii* and *Cl. pasteurianum*.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, 139, N 1, p. 69—90.
- Hlucas R. V., Evans H. I. An electron donor system for nitrogenase-dependent acetylene reduction by extracts of soybean nodules.— *Plant Physiol.*, 1968, 43, N 9, p. 1458—1460.
- Hoffman O., Teicher H. Die Protease aktivitat des Bodens.— *Zeit für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde*, 1957, 77, N 3, S. 243—247.
- Hultman E. Water-soluble carbohydrates in tissue plant materials and in a light fraction from soil.— *Nature*, 1959, 183, N 4684, p. 750—755.
- Jorgensen G. R. A simple apparatus for obtaining multiple soil atmosphere from a single bore hole.— *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1974, 3, p. 38—40.
- Jackson M. Z. Soil Chemistry Analysis (First course).— N.Y., 1958.— 350 p.
- Jansson S. I. Balance sheet and residual effects of fertilizer nitrogen in a 6-year study with ^{15}N .— *Soil Science*, 1963, 95, N 1, p. 31—37.
- Khanna S. S., Stevenson F. J. Metalloorganic complex in soil.— *Soil Science*, 1962, 92, N 5, p. 298—306.
- Kolthoff I. M., Tanaka N. Rotated and stationary platinum wire electrodes. Residual current - voltage curves and dissolution patterns in supporting electrolytes.— *Analyt. Chem.*, 1954, 26, N 4, p. 632—634.
- Lowry H., Nira I., Rosenrough A. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent.— *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, N 1, p. 265—275.

- Macura Y.* Continuous flow method in soil microbiology. I. Apparatus.— *Folia Microbiologica*, 1961, **6**, N 5, p. 328—334.
- Mehra O. P., Jackson M. Z.* Clay and Clay Minerals.— N.Y., 1960.—250 p.
- Meinhard J. E., Holl N. F.* Surface chromatography.— *Anal. Chem.*, 1949, **21**, p. 185—188.
- Mitchell B. D., Mackenzie R. C.* Removal of free iron oxides from clays.— *Soil Sci.*, 1954, **77**, N 3, p. 173—185.
- Monod Y.* La technique de culture continue. Theorie et applications.— *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, p. 390—410.
- Moustafa E., Mortenson L. E.* Acetylene reduction by nitrogen fixing extracts of *Clostridium pasteurianum*: ATP requirement and inhibition by ADP.— *Nature*, 1967, **216**, N 5126, p. 1241—1243.
- Nicholas D. S. D., Silvester D. I., Fowler I. P.* Use of radioactive nitrogen in studying nitrogen fixation in bacterial cells and their extracts.— *Nature*, 1961, **189**, p. 634—636.
- Northrop Y. H.* Apparatus for maintaining bacterial cultures in the steady state.— *J. of Gen. Physiol.*, 1954, **38**, p. 105—110.
- Nozick A., Szilard L.* Description of the chemostat.— *Science*, 1950, **112**, p. 715—718.
- Patric W. H.* Report on 7-th International Congress «Iron Transformation».— *Soil Sci.*, 1961, N 2, p. 494—500.
- Pitra J., Sterba J.* Trialemi cilikagelum pro chromatographi.— *Chem. listy*, 1963, **57**, 3, S. 389—390.
- Rittenberg D., Keston A. S., Rosenburg F., Schoenheimer R.* The determination of nitrogen isotopes in organic compounds.— *J. Biol. Chem.*, 1939, **127**, p. 291—299.
- Richter J.* Gasdiffusions-Koeffizienten als Strukturmasse für Boden.— В кн.: Докл. X Междунар. конгр. почвоведов, Москва, август 1974. М.: Наука, 1975, **12**, с. 39—46.
- Roulier M. H.* An improved procedure for sampling the atmosphere of field soils.— *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1974, **4**, N 38, p. 687—689.
- San-Pietro A.* The measurement of stable isotopes.— In: *Methods in Enzymology*.— N.Y.; Acad. Press, 1957, **4**, p. 473—489.
- Schöllhorn R., Burris R.* Study of intermediates in nitrogen fixation.— *Federation. Proc.*, 1966, **25**, p. 710—725.
- Schöllhorn R., Burris R. H.* Acetylene as a competitive inhibitor of N_2 fixation.— *Proc. Nation. Acad. Sci. U. S.*, 1967, **58**, p. 213—216.
- Sims A. P., Cocking E. C.* Assay of isotopic nitrogen by mass - spectrometer.— *Nature*, 1958, **181**, p. 474—475.
- Starkey R. L., Wight K. M.* Anaerobic corrosion of iron in soil with particular consideration of the soil redox potential as an indicator of corrosiveness.— N. Y.: Amer. Gas Association, 1945.— 108 p.
- Sokal R. R., Sneath P. H. A.* Principles of numerical taxonomy.— San Francisco; London: Freeman, 1963.— 359 p.
- Zobell C. E.* Redox potentials marine sediments.— *Bull. Amer. Assoc. Petrol. geologists*, 1946, **30**, N 4, p. 236—247.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Глава 1. Микроскопия	5
Микроскопия в светлом поле	6
Микроскопия в темном поле	13
Фазово-контрастная микроскопия	14
Люминесцентная микроскопия	15
Электронная микроскопия	16
Прямые микроскопические методы наблюдения микроорганизмов в почве	19
Прямые микроскопические методы учета микроорганизмов в почве	23
Глава 2. Фотоколориметрия	26
Определение казеинолитической активности почвенных актиномицетов	33
Определение дегидрогеназной активности клубеньковых бактерий	35
Определение протеолитической активности почв и донных отложений	36
Определение амилалитической активности почвы	37
Глава 3. Нефелометрия	39
Определение желатиназной активности почвенных актиномицетов	42
Определение витаминов группы В в микробиологических объектах	44
Глава 4. Флюорометрия	47
Определение рибофлавина в культурах различных микроорганизмов	52
Глава 5. Спектрофотометрия	54
Исследование экзополисахаридов олигонитрофильных бактерий	56
Определение сульфатов в водных вытяжках почв	57
Определение трехвалентного железа в почвах и породах	58
Глава 6. Потенциометрия	64
Измерение окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) почв	67
Глава 7. Потенциометрическое титрование	71
Исследование гуминовых кислот	73
Глава 8. Полярография	75
Исследование гуминовых кислот	78

Глава 9. Хроматография на бумаге	79
Определение свободных аминокислот в культурах клубеньковых бактерий	83
Определение свободных аминокислот в культурах актиномицетов	87
Определение свободных сахаров почвы	88
Глава 10. Тонкослойная хроматография	89
Исследование липидов актиномицетов	92
Глава 11. Гель-хроматография	95
Разделение и очистка токсических веществ цианобактерий (сине-зеленых водорослей)	98
Тонкослойная гель-фильтрация гуминовых кислот	99
Глава 12. Ионообменная хроматография	101
Очистка токсических веществ цианобактерий (синезеленых водорослей)	105
Глава 13. Газовая хроматография	105
Ацетилен-этиленовый метод изучения активности процесса фиксации молекулярного азота атмосферы	114
Глава 14. Электрофорез	117
Исследование гуминовых кислот	121
Глава 15. Электронный парамагнитный резонанс	122
Изучение процесса фотосинтеза у фотосинтезирующих бактерий	126
Исследование меланинов микробного происхождения	126
Исследование органического вещества почвы	128
Глава 16. Масс-спектрометрический метод и его использование для изучения азотфиксирующей способности микроорганизмов	130
Глава 17. Метод проточного культивирования микроорганизмов в почвенной микробиологии	138
Глава 18. Прибор для отбора почвенного воздуха	144
Глава 19. Математическая обработка результатов исследований	146
Общая статистическая обработка	149
Корреляционный анализ	152
Дисперсионный анализ	154
Программы для ЭВМ «Мир-2»	159
Определение сходства между объектами методом таксономического анализа	162
Список литературы	165

ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ В ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Утверждено к печати ученым советом Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного АН УССР

Редактор И. М. Акимова. Художественный редактор Р. И. Калыш. Технический редактор А. М. Капустина. Корректоры С. А. Евскаля, И. В. Точаненко, Л. М. Регета.

Информ. бланк № 4102

Сдано в набор 16.12.81. Подп. в печ. 30.06.82. БФ 01758. Формат 60×90/16. Бум. тип. № 1. Лит. гарн. Вис. печ. Усл. печ. л. 11,0. Усл. кр.-отт. 11,0. Уч.-изд. л. 12,19. Тираж 1150 экз. Зак. 1—2990. Цена 2 руб. 10 коп.

Издательство «Наукова думка». 252601, Киев, ГСП, Репина, 3.

Отпечатано с матриц Головного предприятия республиканского производственного объединения «Полиграфкнига» 252057 Киев, Довженко, 3 во Львовской областной книжной типографии, 290000, Львов, Стефаника, 11. Зак. 3728.