

УДК 631.46

ЧИСЛЕННОСТЬ И МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИОФАГОВ В ПОЧВАХ

© 2022 г. М. Р. Чекин^а *, Л. В. Лысак^а, Е. В. Лапыгина^а^аМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

*e-mail: mrchekin@soil.msu.ru

Поступила в редакцию 23.06.2021 г.

После доработки 29.09.2021 г.

Принята к публикации 29.10.2021 г.

С помощью метода эпифлуоресцентной микроскопии выявлено присутствие бактериофагов во всех образцах исследуемых почв (чернозема (Haplic Chernozem, WRB); дерново-подзолистой (Albic Retisol (Cutanic, Siltic), WRB), каштановой (Haplic Kastanozem, WRB), аллювиально-дерновой (Fluvisol (Loamic, Humic, WRB)). Численность бактериофагов, подсчитанная с помощью красителя SYBR Green 1, достигала значительных величин (0.34–5.7 млрд/г почвы). С помощью метода просвечивающей электронной микроскопии определены икосаэдрические, хвостатые и нитчатые морфотипы бактериофагов. Сравнение численности бактериофагов и бактерий в исследуемых образцах показало, что численность фагов была несколько меньше численности бактерий (за исключением показателей в образцах чернозема и почвы Антарктиды, где численность фагов была незначительно больше численности бактерий). Соотношение показателей численности бактериофагов/бактерии составляло от 0.16 до 1.67. С помощью красителя L7005 определена численность грамотрицательных и грамположительных клеток бактерий, выполнено сравнение с численностью бактериофагов в образцах торфяной и каштановой почвы. Отмечено преобладание грамотрицательных клеток бактерий (61% от общей численности бактерий). Численность фагов в переувлажненном биотопе (торфяной почве) была в 3 раза больше по сравнению с сухим биотопом (каштановой почвой). Выявленные высокие величины численности и значительное морфологическое разнообразие фагов позволяют предположить определенную роль в регуляции численности бактерий в почвах.

Ключевые слова: SYBR Green 1, численность бактерий, просвечивающая электронная микроскопия, WRB

DOI: 10.31857/S0032180X22030042

ВВЕДЕНИЕ

Бактериофаги (фаги) присутствуют во всех микробосообществах нашей планеты. Фаги не имеют энергетического обмена, у них отсутствует аппарат трансляции, который является важным компонентом всех живых организмов [4, 17, 27].

В настоящий момент считается, что бактериофаги — наиболее многочисленные компоненты природных сообществ на Земле. Многими исследователями выделяется значимая роль бактериофагов в качестве регуляторов численности и структуры микробных сообществ в водных экосистемах [2, 19, 22, 28]. Известно об автолитической функции фагов, они участвуют в горизонтальном переносе генов бактерий [6, 14, 16, 30, 31, 32]. Значительно меньше сведений о роли бактериофагов в почве. Некоторые зарубежные авторы отмечают возможность выполнения фагами различных экологических функций в почве [18, 23, 26], так как их численность достаточно высока

(до 10^{10}) [20]. Фаги чаще всего становятся объектом медицинских исследований, однако в отечественной и зарубежной научной литературе имеется ряд публикаций о роли бактериофагов в почве [5, 6, 10, 15, 21, 25].

Продолжение исследований роли фагов в почвенных микробных сообществах — важная задача, которая стоит перед современными микробиологами [7]. Особенность бактериофагов в том, что они не проявляют признаков живого вне клетки [9]. Область распространения фагов в природе зависит от чувствительных к ним бактерий [3]. В богатом микроорганизмами субстрате встречается большее количество фагов, взаимодействующих с конкретными бактериями из среды обитания [1].

Цель работы — определение численности бактериофагов и их морфологического разнообразия в некоторых почвах России для понимания их экологических функций в почве.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили образцы некоторых зональных и интразональных почв. Анализировали верхние (0–10 см) слои почвы. Образцы отбирали летом и осенью 2016–2018 гг. Анализировали свежееотобранные почвы, при необходимости образцы хранили в морозильной камере бытового холодильника при температуре -18°C . Изучали следующие почвы (по классификации почв 2004 г.):

- дерново-подзолистую типичную (Albic Retisol (Cutanic, Siltic), WRB) (Московская область, УОПЭЦ “Чашниково”), pH 3.3–5.5, содержание гумуса 3–7%;

- чернозем миграционно-мицелярный (Haplic Chernozem, WRB) (Белгородская область, участок заповедника “Белогорье”, Ямская степь), pH 6.0–7.0, содержание гумуса 6–9%;

- каштановую типичную (Haplic Kastanozem, WRB) (Волгоградская область, с. Качалино), pH 7.0–7.5, содержание гумуса 1.2–1.8%;

- торфяную олиготрофную (Dystric Fibric Histosol, WRB) (Тверская область, Западновинский лесоболотный стационар ФГБУН Института лесоведения РАН), pH 2.5–4, содержание гумуса 1.2–1.5%;

- аллювиальную серогумусовую дерновую (Fluvisol (Loamic, Humic), WRB) (Московская область, Озерский район, агрохолдинг “Сосновка”), pH 4.5–7.0, содержание гумуса 1–2%;

- пелозем (Limnic Fluvisol, WRB) (о. Новая Земля, Арктика), переувлажненный биотоп, формируются в условиях холодного и умеренно-холодного гумидного и семигумидного климата. Характеризуется кислой или близкой к нейтральной реакцией, слабой насыщенностью основаниями;

- петрозем (Histic Leptosol, WRB) (о. Новая Земля, Арктика) – сухой биотоп. Формирование почвы происходит в условиях гумидного и семигумидного климата, pH почвы кислая или близкая к нейтральной;

- псаммозем (Albic, WRB) (Антарктида, ст. Молодежная).

Численность бактериофагов в почве определяли с помощью красителя SYBR Green 1 (Molecular Probes, США) методом эпифлуоресцентной микроскопии [8, 29]. Краситель характеризуется высокой чувствительностью к ДНК и позволяет выявить бактериофагов с двуцепочечной ДНК. Навеску почвы 1 г помещали в 100 мл стерильной деионизированной профильтрованной через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм (Millipore) воды. Для десорбции бактерий и фагов с поверхности почвенных частиц почвенную суспензию обрабатывали на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-1 (22 кГц, 0.44 А, 2 мин), надосадочную жидкость пропускали через вакуумную фильтра-

ционную систему Stericup (Millipore, размер пор 0.22 мкм). Для дальнейшего концентрирования фагов фильтрат (5 мл) концентрировали под вакуумом при небольшом разрежении (15–20 кПа) на мембранные диски из оксида алюминия Anodisk (Whatman, 25 мм) с диаметром пор 0.02 мкм. Затем диски высушивали на салфетке Kimwipe и переносили в пластиковую чашку Петри для окрашивания. Предварительно на дно чашки Петри для каждого диска наносили окрашивающий раствор: 2.5 мкл SYBR Green 1 (1 : 10) и 97.5 мкл профильтрованной через фильтр с диаметром пор 0.02 мкм стерильной деионизированной воды. Диски экспонировали 15 мин в темноте. Окрашенный диск помещали на предметное стекло, наносили на него антивыгорательный раствор ProLong Diamond Antifade Mountant (0.1%-ный раствор фенилендиамина) и накрывали покровным стеклом. Численности фагов считали с использованием люминесцентного микроскопа Zeiss Axioskop 2 plus (Германия) со светофильтром Filter set 09.

Общую численность бактерий в почвенной суспензии определяли по общепринятой методике с помощью красителя акридина оранжевого [11].

Численность грамположительных и грамотрицательных бактерий определяли с помощью красителя L 7005 (Live BacLight Bacterial Gram Stain Kit, Molecular Probes, USA) в соответствии с рекомендациями производителя.

Электронно-микроскопические исследования морфологического разнообразия бактериофагов проводили на электронном микроскопе JEM-100CX II. Фильтрат почвенной суспензии концентрировали центрифугированием (50000 гpm на центрифуге MiniSpin Plus 5). Надосадочную жидкость сливали, остаток наносили на сетки. Сетки просматривали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-100CX II при увеличении 500 и 1000 мкм.

Статистическую обработку данных количественного учета микроорганизмов проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Численность бактериофагов и бактерий определяли в наиболее отличающихся между собой условиях, выбраны несколько типов зональных и интразональных почв. С помощью метода эпифлуоресцентной микроскопии (краситель SYBR Green 1) фаги были обнаружены во всех проанализированных образцах верхних слоев (0–10 см) исследованных почв. Полученная численность бактериофагов составляла 0.3–5.7 млрд ед./г почвы, сходные значения численности отмечаются другими авторами в донных отложениях [24] (рис. 1).

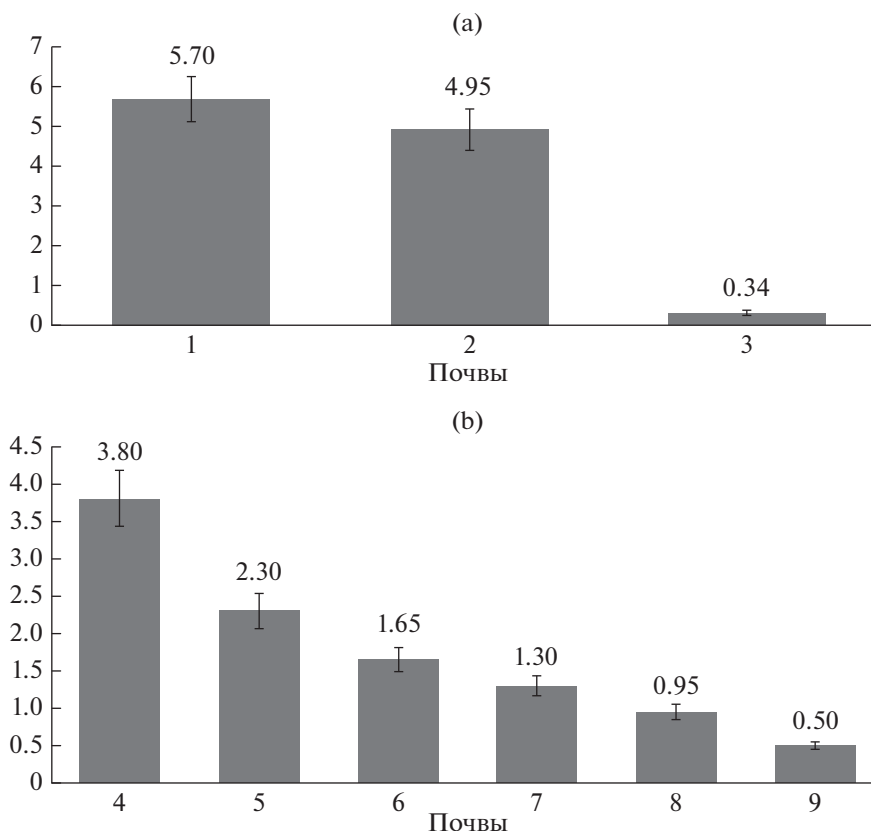


Рис. 1. Численность бактериофагов (краситель SYBR Green 1) в верхних слоях (0–10 см) исследуемых зональных (а) и интразональных (б) почв (млрд ед./г почвы). Почвы здесь и далее на рисунках: 1 – дерново-подзолистая типичная почва (Albic Retisol (Cutanic, Siltic), WRB); 2 – чернозем миграционно-мицелярный (Haplic Chernozem, WRB); 3 – каштановая типичная почва (Haplic Kastanozem, WRB); 4 – аллювиальная серогумусовая дерновая почва (целина) (Fluvisol (Loamic, Humic, WRB)); 5 – аллювиальная серогумусовая дерновая почва (пашня) (Fluvisol (Loamic, Humic, WRB)); 6 – торфяная олиготрофная почва (Dystic Fibric Histosol, WRB); 7 – пелозем (Limnic Fluvisol, WRB); 8 – петрозем (Histic Leptosol, WRB); 9 – псаммозем (Albic, WRB).

В зональных почвах (дерново-подзолистой, черноземе, каштановой) численность фаговых частиц составляла 0.34–5.7 млрд ед./г почвы. Максимальные значения численности отмечены в дерново-подзолистой почве (5.7 млрд ед./г почвы), в черноземе (5.0 млрд ед./г почвы), минимальная численность зафиксирована в каштановой почве (0.34 млрд ед./г).

В интразональных почвах (торфяной, аллювиальной дерновой, петроземе, пелоземе, псаммоземе) численность фагов варьировала от 0.5 до 3.8 млрд ед./г: максимальная численность отмечена в почвах Арктики (в пелоземе 3.8, в петроземе – 2.3 млрд ед./г почвы), численность фагов в целинной аллювиальной почве и ее окультуренном аналоге (пашне) составляла 1.65 и 0.95 млрд ед./г почвы, в торфяной почве – 1.3 млрд ед./г почвы, минимальная численность наблюдалась в почве Антарктиды – псаммоземе (0.5 млрд ед./г почвы). Следует отметить, что в арктических почвах численность фагов в переувлажненном биотопе (пелоземе) в 1.5 раз больше, чем в сухом биотопе (петроземе).

Таким образом, бактериофаги обнаружены во всех исследованных образцах верхних горизонтов почв. Численность бактериофагов, подсчитанная с помощью красителя SYBR Green 1, достигала значительных величин (0.34–5.7 млрд ед./г почвы). Подсчитанная численность фагов сравнима с их численностью в донных отложениях [24], лесных почвах штата Делавер [33] и на 2–3 порядка больше, чем в пустынных почвах [23]. При этом результаты численности фагов в почве можно сравнить с результатами исследования Шах Махмуд [15].

Морфологическое разнообразие бактериофагов. С помощью ПЭМ обнаружены следующие морфотипы бактериофагов: хвостатые, икосаэдрические и нитчатые. Наличие нитчатых фагов отмечено в почвах полярных областей (рис. 2) и экосистем [12–14].

Сравнение численности бактериофагов с общей численностью бактерий и численностью грамположительных/грамотрицательных бактерий. Известно, что численность бактериофагов связана с чис-

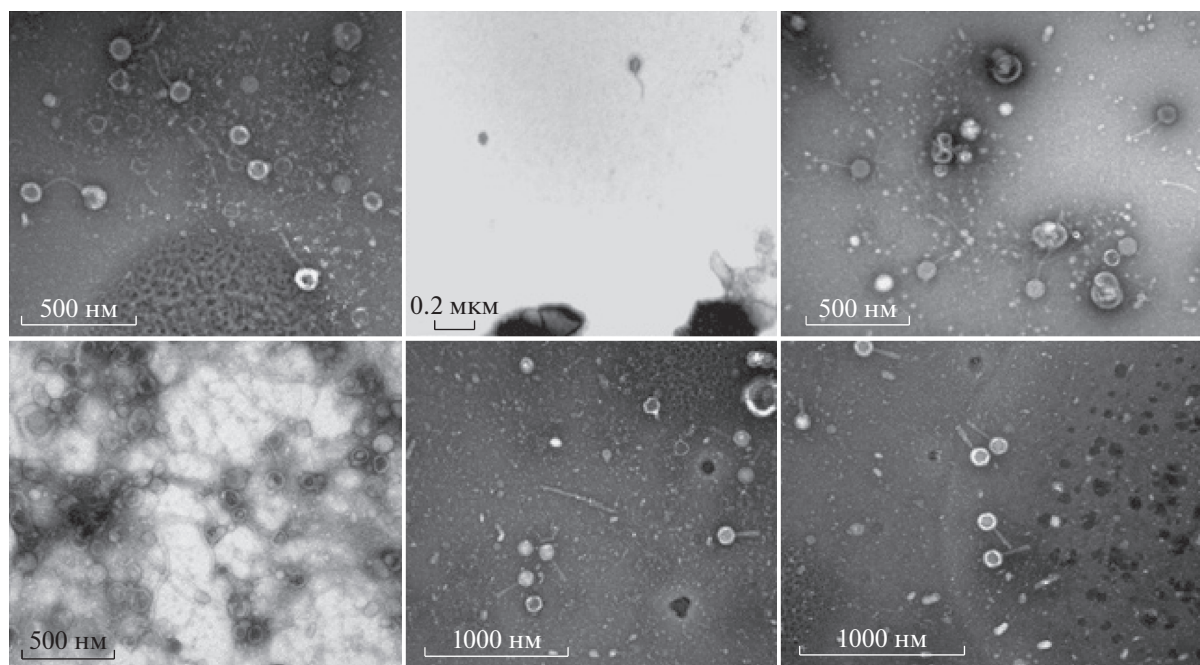


Рис. 2. Микрофотографии морфологического разнообразия бактериофагов.

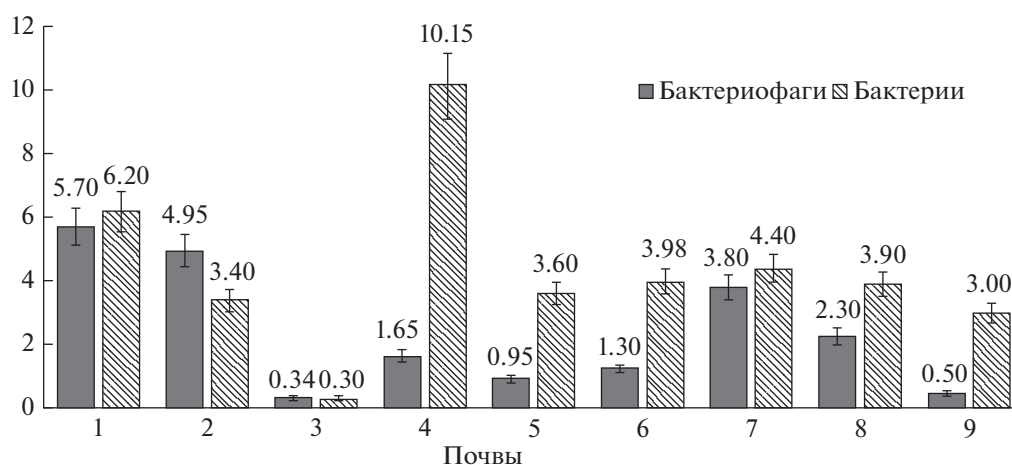


Рис. 3. Численность бактериофагов (краситель SYBR Green 1) (млрд ед./г почвы) и бактерий (краситель АО) (млрд кл./г почвы) в верхних горизонтах исследуемых почв.

ленностью бактерий в водных экосистемах [19]. В нашем исследовании было проведено сопоставление численности фагов с численностью бактерий. Данные, полученные при помощи эпифлуоресцентной микроскопии (краситель АО), показали, что практически во всех образцах почв численность бактерий была выше аналогичного показателя бактериофагов (за исключением чернозема и образца почвы Антарктиды). Максимальные значения численности бактерий получены для целинной аллювиальной почвы (10.15 млрд кл./г почвы), меньшим значением показателя характеризовались образцы пелозема и

дерново-подзолистой почвы (4.4 и 6.2 млрд кл./г почвы соответственно). В остальных образцах значения не превышали 4 млрд кл./г почвы. Минимальные значения были получены для псаммозема (Антарктида) (0.3 млрд кл./г почвы). Близкие значения показателя (от 0.16 до 1.67 млрд кл./г почвы) отмечают другие авторы [33]. В донных отложениях соотношение численности бактериофагов к бактериям составляет 20–80 [24] (рис. 3).

В исследованных образцах почв показатель численности был больше у бактерий (за исключением показателей в образцах чернозема и псам-

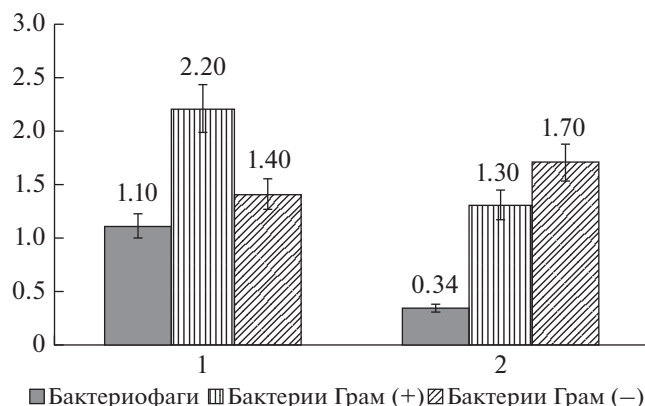


Рис. 4. Численность бактериофагов (млрд ед./г почвы), грамположительных и грамотрицательных бактерий (млрд кл./г почвы) в торфяной (1) и каштановой (2) почвах.

мозема). Отношение численности бактериофагов к бактериям варьировало от 0.16 до 1.67.

С помощью современного красителя L 7005 определяли численность и долю грамотрицательных и грамположительных клеток бактерий (рис. 4). Исследовали торфяную и каштановую почвы в качестве примеров влажного и сухого биотопа. В торфяной почве численность клеток грамотрицательных бактерий составляла 2.2 млрд кл./г почвы (61% от общей численности бактерий), численность грамположительных клеток — 1.4 млрд кл./г почвы (39% от общей численности бактерий), в каштановой почве наблюдалось обратное соотношение и преобладание грамположительных клеток, их численность оказалась равной 1.7 млрд кл./г почвы (57% от общей численности бактерий), численность грамотрицательных клеток равнялась 1.3 млрд/г каштановой почвы (43% от общей численности бактерий).

При этом численность фагов во влажном биотопе (торфяной почве) в 3 раза больше, чем в сухом (каштановой почве). Учитывая характерное для переувлажненных местообитаний преобладание грамотрицательных клеток бактерий, а также высокую численность фагов во влажных биотопах, можно предположить зависимость численности фагов от грамотрицательных клеток бактерий, что, в свою очередь, зависит от влажности почвы. В переувлажненном биотопе (торфяной почве) отмечено преобладание грамотрицательных клеток бактерий (61% от общей численности бактерий).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование нового высокочувствительного красителя SYBR Green 1 позволило выявить в исследованных почвах присутствие значительного количества бактериофагов. Значения численности

бактериофагов достигало нескольких млрд ед./г почвы. Примененный метод определения численности фагов учитывает лишь двуцепочечные ДНК-содержащие фаги. Полученные нами величины не учитывают одноцепочечных ДНК- и РНК-содержащих фагов и фагов, находящихся внутри бактериальных клеток, поэтому общая численность фагов значительно больше. Выявленные высокие значения численности и значительное морфологическое разнообразие фагов позволяют предположить, что они играют определенную роль в регуляции численности бактерий в почвах. Очевидно, в почве присутствуют бактериофаги с разным воздействием на бактерии. Полученные данные требуют дальнейшего осмысления и продолжения исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-34-00658 и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 075-15-2021-1396.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воронина М.В., Бугаева Е.Н., Васильев Д.М., Кабанова А.П., Баранник А.П., Шнейдер М.М., Мирошников К.А. Характеристика бактериофага *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* pp 16, перспективного для биоконтроля мягкой гнили картофеля // Микробиология. 2019. Т. 88. № 4. С. 458–469. <https://doi.org/10.1134/S0026365619040116>
2. Дрюккер В.В., Дутова Н.В. Бактериофаги как новое трофическое звено в экосистеме глубоководного озера Байкал // Доклады АН. 2009. Т. 427. № 2. С. 277–281.
3. Кадников В.В., Марданов А.В., Ивасенко Д.А., Анциферов Д.В., Белецкий А.В., Карначук О.В., Равин Н.В. Новый бактериофаг порядка *Caudovirales*, обнаруженный в метагеноме грунта в районе подземного горения угля // Микробиология. 2019. Т. 88. № 2. С. 240–244. <https://doi.org/10.1134/S0026365619020150>
4. Каттер Э., Сулаквелидзе А. Бактериофаги: биология и практическое применение. М.: Научный мир, 2012. 640 с.
5. Конбаева Г.М., Еспембетов Б.А., Сырым Н.С. Изучение биологических свойств бактериофагов активных в отношении атипичных микобактерий // Аграрная наука и образование на современном этапе развития. 2019. Т. 1. С. 251–256.
6. Копылов А.И., Косолапов Д.Б., Заботкина Е.А. Влияние вирусов на гетеротрофный бактериопланктон

- тон водохранилищ // Микробиология. 2011. Т. 80. № 2. С. 241–260.
7. Куликов Е.Е., Голомидова А.К., Морозова В.В., Козлова Ю.Н., Летаров А.В. Бактериофаги группы T5 как потенциальные агенты фаготерапии // Микробиология. 2019. Т. 88. № 6. С. 730–734. <https://doi.org/10.1134/S0026365619060065>
 8. Лапыгина Е.В., Лысак Л.В., Москвина М.И., Звягинцев Д.Г. Численность вирусов в аллювиально-дерновой почве (метод прямой эпифлуоресцентной микроскопии) // Микробиология. 2016. Т. 85. № 6. С. 748–751. <https://doi.org/10.7868/S0026365616060148>
 9. Летаров А.В. Современные концепции биологии бактериофагов. М.: ДеЛи, 2019. 384 с.
 10. Мартынова К.В., Феоктистова Н.А., Васильев Д.А. Биологические свойства бактериофагов *Bacillus coagulans* // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Ульяновск: УлГАУ, 2019. Т. I. УлГАУ, 2019.
 11. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 304 с.
 12. Сургучева Н.А., Филиппова С.Н., Куликов Е.Е., Брушков А.В., Рогов В.В. Фаговые частицы в подземных льдах Арктики // Микробиология. 2019. Т. 88. № 2. С. 224–229. <https://doi.org/10.1134/S0026365619020162>
 13. Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Куликов Е.Е., Сорокин В.В., Акимов В.Н., Бейдж А.К., Маккей Л., Андерсен Д., Гальченко В.Ф. Обнаружение фагов в популяции бактерий озера Унтерзее (Антарктида) // Микробиология. 2013. Т. 82. № 3. С. 366–369. <https://doi.org/10.7868/S0026365613030051>
 14. Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Сорокин В.В., Акимов В.Н., Карнышева Э.А., Брушков А.В., Гальченко В.Ф. Бактериофаги низкотемпературных систем Арктики и Антарктики // Микробиология. 2016. Т. 85. № 3. С. 337–346. <https://doi.org/10.7868/S0026365616030046>
 15. Шах Махмуд Р., Гарифулина К.И., Ульянова В.В., Евтюгин В.Г., Миндубаева Л.Н., Хазиева Л.Р., Дудкина Е.В., Вершинина В.И., Колтаков А.И., Ильинская О.Н. Бактериофаги почвенных бацилл: новый поливалентный фаг *Bacillus altitudinis* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2017. Т. 35. № 2. С. 59–64. <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2017-35-2-59-64>
 16. Шестаков С.В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий // Экологическая генетика. 2007. № 2. <https://cyberleninka.ru/article/n/kak-proishodit-i-chem-limitiruetsya-gorizontalnyy-perenos-genov-u-bakteriy>
 17. Brussow H., Kutter E. Phage ecology // Bacteriophages: Biol. Appl. 2005. V. 70. P. 129–163.
 18. Burroughs N.J., Marsh P., Wellington, E.M. Mathematical analysis of growth and interaction dynamics of streptomycetes and a bacteriophage in soil // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 9. P. 3868–3877. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3868-3877.2000>
 19. Danovaro R., Corinaldesi C., Filippini M., Fischer U.R., Gessner M.O., Jacquet S., Magagnini M., Velimirov B. Viriobenthos in freshwater and marine sediments: a review // Freshwater Biology. 2008. V. 53. № 6. P. 1196–1213. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.01961.x>
 20. Elford W.J., Andrewes C.H. The sizes of different bacteriophages // British J. Experimental Pathology. 1932. V. 13. № 5. P. 446.
 21. Farnell-Jackson E.A., Ward A.K. Seasonal patterns of viruses, bacteria and dissolved organic carbon in a riverine wetland // Freshwater Biology. 2003. V. 48. P. 841–851. <https://doi.org/10.1127/0003-9136/2004/0161-0225>
 22. Fuhrman J.A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects // Nature. 1999. V. 399. P. 541–548. <https://doi.org/10.1038/21119>
 23. Gonzales-Martin C., Teigell-Perez N., Lyles M., Valadares B., Griffin D.W. Epifluorescent direct counts of bacteria and viruses from topsoil of various desert dust storm regions // Res. Microbiol. 2013. V. 81. P. 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.08.009>
 24. Helton R.R., Liu L., Wommack K.E. Assessment of factors influencing direct enumeration of viruses within estuarine sediments // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 4767–4774. <https://doi.org/10.1128/AEM.00297-06>
 25. Kimura M., Jia Z.-J., Nakayama N., Asakawa S. Ecology of viruses in soils: past, present and future perspectives // Soil Sci. Plant Nutrition. 2008. V. 54. № 1. P. 1–32. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00197.x>

The Quantity and Morphological Diversity of Bacteriophages in Soils

M. R. Chekin¹*, L. V. Lysak¹, and E. V. Lapygina¹

¹ Faculty of Soil Science, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: mrchekin@soil.msu.ru

Epifluorescence microscopy revealed the presence of bacteriophages in all samples of the studied soils (Haplic Chernozem, WRB; Albic Retisol (Cutanic, Siltic), WRB; Haplic Kastanozem, WRB; Fluvisol (Loamic, Humic), WRB). The number of bacteriophages calculated using the SYBR Green I dye reached significant values (0.34–5.7 billion per 1 g of soil). Transmission electron microscopy was used to determine the icosah-

hedral, caudate, and filamentous morphotypes of bacteriophages. Comparison of the number of bacteriophages and bacteria in the studied samples showed that the number of phages in the studied soil samples was slightly lower than the number of bacteria (with the exception of indicators in the samples of chernozem and the soil of Antarctica, where the number of phages was slightly higher than the number of bacteria). The ratio of the number of bacteriophages/bacteria was from 0.16 to 1.67. Using the dye L7005, the number of gram-negative and Gram-positive bacterial cells was determined and compared with the number of bacteriophages in samples of peat and chestnut soil. The predominance of gram-negative bacterial cells (61% of the total number of bacteria) was noted. The number of phages in the waterlogged biotope (peat soil) was 3 times higher than in the dry biotope (chestnut soil). The revealed high abundance values and significant morphological diversity of phages suggest a certain role in the regulation of the number of bacteria in soils.

Keywords: soils, SYBR Green 1, the quantity of bacteria, transmission electron microscopy, WRB