

Т.С. Кириленко

**Определитель почвенных
сумчатых грибов**

**Москва
«Книга по Требованию»**

УДК 631
ББК 4
Т11

Т11 **Т.С. Кириленко**
Определитель почвенных сумчатых грибов / Т.С. Кириленко – М.: Книга
по Требованию, 2021. – 264 с.

ISBN 978-5-458-27913-0

ISBN 978-5-458-27913-0

© Издание на русском языке, оформление
«YOYO Media», 2021

© Издание на русском языке, оцифровка,
«Книга по Требованию», 2021

Эта книга является репринтом оригинала, который мы создали специально для Вас, используя запатентованные технологии производства репринтных книг и печати по требованию.

Сначала мы отсканировали каждую страницу оригинала этой редкой книги на профессиональном оборудовании. Затем с помощью специально разработанных программ мы произвели очистку изображения от пятен, клякс, перегибов и попытались отбелить и выровнять каждую страницу книги. К сожалению, некоторые страницы нельзя вернуть в изначальное состояние, и если их было трудно читать в оригинале, то даже при цифровой реставрации их невозможно улучшить.

Разумеется, автоматизированная программная обработка репринтных книг – не самое лучшее решение для восстановления текста в его первозданном виде, однако, наша цель – вернуть читателю точную копию книги, которой может быть несколько веков.

Поэтому мы предупреждаем о возможных погрешностях восстановленного репринтного издания. В издании могут отсутствовать одна или несколько страниц текста, могут встретиться невыводимые пятна и кляксы, надписи на полях или подчеркивания в тексте, нечитаемые фрагменты текста или загибы страниц. Покупать или не покупать подобные издания – решать Вам, мы же делаем все возможное, чтобы редкие и ценные книги, еще недавно утраченные и несправедливо забытые, вновь стали доступными для всех читателей.



Серия Книжный Ренессанс

www.samizday.ru/reprint

ОБЩАЯ ЧАСТЬ

ОТБОР ОБРАЗЦОВ ПОЧВ

Познание законов, управляющих жизнью и развитием различных растительных сообществ, предусматривает в первую очередь изучение входящего в них состава организмов, как высших, так и низших. Грибы являются важнейшими компонентами любых растительных сообществ, они развиваются не только на поверхности почвы, но и в разных почвенных горизонтах.

Изучение грибов, обитающих в почвах, связано с отбором образцов. На исследуемом участке выкапывают по диагонали три или четыре ямы обычно глубиной до 50 см. Ножом, который, предварительно погрузив в банку со спиртом, обжигают, тщательно выравнивают одну из стенок ямы. Затем нож обжигают повторно и ту же стенку ямы зачищают и несколько углубляют. Только после этого обожженным в третий раз ножом почву насыпают в стерильные пробирки или бумажные пакеты из пергаментной бумаги в два слоя. Из каждого горизонта почвы от более глубоких, а затем ближе к поверхности (чаще через каждые 5 или 10 см) берут по две или три пробы: такой отбор предупреждает возможность перемешивания материала, что легко может случиться при осыпании частиц почвы.

Корни, остатки растений и экскременты животных, если их необходимо подвергнуть исследованию на состав грибов, помещают в стерильные бумажные пакеты. При этом корни растений, слегка отряхнув от почвы, разрезают простерилизованными ножницами на небольшие куски.

Необходимо помнить, что пробы почв следует тотчас подписать, указав дату и место отбора, а также кратко охарактеризовать участок, на котором проведен отбор. Дальнейшая работа проводится в лаборатории.

ВЫДЕЛЕНИЕ ГРИБОВ В ЧИСТЫЕ КУЛЬТУРЫ

Какую бы группу грибов, обитающих в почвах, мы ни изучали, вначале необходимо изолировать их в чистые культуры и получить обособленные таксоны. Это относится и к сумчатым грибам. Существует много методов выделения грибов из почв. Микологи часто

пользуются методом почвенных разведений с последующим посевом на питательные среды (Waksman, 1916). С поверхности корней, разных растительных остатков грибы, как правило, изолируют методом водных смывов (Литвинов, 1969; Методы экспериментальной микологии, 1973). Однако указанные методы применяют для изолирования быстрорастущих и обильноспороносящих грибов (виды *Penicillium* Link ex Fr., *Aspergillus* Mich. ex Fr., *Mucogales*). Сумчатые грибы на питательных средах обычно растут медленно и поэтому угнетаются быстрорастущей флорой. Специальных методов, предусматривающих выделение из почв только сумчатых грибов, в настоящее время нет. Тем не менее некоторые методы дают возможность выделять и учитывать довольно большое количество видов аскомицетов. К таким методам относится *метод пластинок* — обрастания грибами простерилизованного хлопчатобумажного полотна, фильтровальной бумаги и т. п. Суть его заключается в следующем. Указанные выше стерильные субстраты, прикрепленные к стеклянным пластинкам, погружают в природных условиях в исследуемую почву. После определенного периода инкубации (от нескольких суток до нескольких месяцев) пластинки просматривают и появившуюся грибницу или спороношение грибов отсевают в пробирки на агаризованную питательную среду.

Для выделения из почв видов *Gymnoascaceae*, *Sordariaceae* и других семейств широко используют *метод приманки*. Последним может служить простерилизованный кроличий, крысиный или мышиный помет, крылья насекомых, волосы, различные субстраты растительного происхождения. Исследуемую почву слегка увлажняют, рассыпают по дну стерильной чашки Петри и сверху раскладывают простерилизованный кроличий помет либо другие субстраты-приманки. Затем чашки помещают во влажную камеру и появившиеся спустя 10—15 суток грибы отсевают в пробирки на питательную среду (Литвинов, 1969).

Удобным и простым является *метод выделения грибов на растительные остатки*, предложенный Т. Н. Шкляр (цит. по Литвинову, 1969). Измельченные растительные субстраты (стерня злаков, головки цветков клевера и т. п.) помещают в чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу и стерилизуют. Затем на них засевают исследуемую почву и чашки Петри ставят для инкубации в термостат. Сумчатые грибы, по данным Т. Н. Шкляр, появляются на растительных остатках через месяц и больше.

Применяют и *метод прямых отпечатков* почвенной пробы на агаризованную питательную среду (Tresner, Hayes, 1970). Край пенополиуретанового цилиндра длиной 40 мм и диаметром 15 мм увлажняют агаризованной питательной средой, прикоснувшись к ее поверхности. Затем увлажненный край цилиндра прижимают к подсушенному почвенному образцу и этим же краем делают 10 последовательных отпечатков на поверхности агаризованной питательной среды в чашках Петри. Последние ставят для инкубации в термостат.

Ю. Е. Конев и О. П. Камышко (1969) предложили *электростатический метод* выделения грибов. Из фторопласта изготавливают круглые пластинки диаметром 4 см. Их обрабатывают антисептиком — метиловым спиртом, избыток которого удаляют стерильной фильтровальной бумагой. Подсушенные пластинки электризуют трением о стерильную фильтровальную бумагу (авторами установлено, что величина заряда пластинки всегда относительно постоянна — примерно 100 э). Наэлектризованные пластинки подносят к почвенному образцу, рассыпанному ровным слоем, не ближе чем на 2—3 см, чтобы избежать притяжения крупных частиц. Притянутые к пластинкам мельчайшие частицы почвы отпечатывают на агаризованных средах в чашках Петри, которые затем инкубируют при температуре 26° пять — семь суток. Электростатический метод дает возможность изолировать большое количество видов сумчатых грибов.

Дж. Уоркап (Warcup, 1952), Р. Венсли (Wensley, 1953) предложили *метод фумигации почв*. Авторы применяли формалин, метилбромид, хлорпикрин и другие вещества, обладающие значительной летучестью и токсичностью. Пары указанных ядохимикатов легко диффундируют в исследуемые образцы и вместе с тем быстро могут быть удалены проветриванием. Почву, из которой нужно изолировать сумчатые грибы, просеивают через сито с отверстиями диаметром 4 мм и помещают в стеклянную трубку, в стенках которой имеется несколько отверстий. Затем в эту трубку вводят нужную дозу ядохимиката, все отверстия закрывают резиновыми пробками, а после нескольких часов экспозиции резиновые пробки заменяют ватными. Обработанную таким способом почву высевают непосредственно на агаризованную питательную среду или посев делают методом почвенных разведений. При фумигации почвы ядохимикатами в определенной дозе не гибнут сумкоспоры некоторых видов *Thielavia*, *Chaetomium*, *Sordaria*, *Gelasinospora*. Дозировку ядохимикатов и экспозицию подбирают соответственно типу почвы. Они неодинаковы и при изолировании разных видов. Так, например, виды *Sordaria* и *Thielavia* лучше всего выделяются из песчаной почвы при обработке ее метилбромидом в концентрации 0,6 мл на 1000 мг почвы с экспозицией 4 часа, а *Chaetomium* — при концентрации 0,6 и 0,8 мл.

Для выделения сумчатых грибов часто используют *метод тепловой обработки почв* (Warcup, Baker, 1963). Образцы почв прогревают паром при 60—65° С в течение 30 мин и затем высевают на агаризованную питательную среду.

Сумчатые грибы можно изолировать из почвы также *методом центрифугирования почвы* (Paden, 1967) или *методом перфузии* (Malik, Eggins, 1970), однако эти методы сложны, поэтому микологи пользуются ими редко. Описание указанных методов приведено в сборнике «Методы экспериментальной микологии» (1973).

Грибы поселяются в почвах на корнях растений, разных остатках растительного и животного происхождения. С поверхности

этих субстратов грибы выделяют чаще всего *методом накопления во влажных камерах*. В качестве влажных камер используют стерильные чашки Петри или чашки Коха. Дно чашек выстилают стерильной фильтровальной бумагой в два слоя. Влага в чашках держится дольше, если под фильтровальную бумагу подкладывают стерильную марлю. Слегка приоткрыв крышку чашки, фильтровальную бумагу с помощью пипетки увлажняют стерильной водой. Воды наливают столько, чтобы смочилась вся бумага, но избытка ее не было на поверхности. Исследуемые образцы длиной 3—5 см предварительно многократно (до пяти, но лучше до десяти раз) промывают стерильной водой и затем раскладывают в стерильные чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу. В каждую чашку помещают три-четыре образца. Раскладку исследуемых образцов производят над пламенем горелки стерильным пинцетом в условиях, обеспечивающих максимум стерильности. После этого чашки ставят в термостат для инкубации. Их периодически просматривают и появляющиеся плодоношения грибов иголкой стерильно переносят на питательную среду. В случае длительного опыта следят за увлажнением фильтровальной бумаги, не допуская высыхания ее или избыточного увлажнения.

Выделение в чистые культуры аскоспор сумчатых грибов, плодовые тела которых развиваются внутри корней или в других растительных и животных тканях, экскрементах животных либо на их поверхности, связано с большими трудностями, из-за сильного инфицирования образцов бактериями, быстрорастущими и обильно-спороносящими грибами и другими организмами. Стерилизация образцов химическими веществами или пламенем, как правило, часто убивает и исследуемые объекты, поэтому ею не всегда можно пользоваться. Многократная промывка образцов стерильной водой также часто не дает желаемых результатов.

Нами предложен *метод получения спор сухоспоровых аскомицетов* с активным спороотделением, плодовые тела которых снабжены отверстием, с последующим перенесением этих спор на питательные среды (Кириленко, 1977). Метод не пригоден для выделения грибов, споры которых погружены в слизь или плодовые тела лишены отверстия. Суть метода заключается в следующем. Готовят стерильные чашки Коха или чашки Петри диаметром 10—18 см, маленькие чашечки для тканевых культур диаметром 4—5 см, кружки или полоски стерильной фильтровальной бумаги, пипетку любых размеров, колбу со стерильной водопроводной водой, иглу и пинцет. Образцы для опыта необходимо брать свежие, со зрелыми плодовыми телами. Поверхность образцов осторожно очищают от растительных остатков и частичек почвы стерильным пинцетом. Затем на дно чашки диаметром 10—18 см раскладывают несколько маленьких чашечек диаметром 4 или 5 см, сняв предварительно с них крышки (крышки маленьких чашечек можно разложить в другие большие чашки). Маленьких чашечек ставят столько, сколько их может поместиться в больших. Исследуемые образцы с плодо-

ношениями грибов (корни, листья, стебли растений) кладут на края маленьких чашечек, чтобы они не касались дна, для предохранения от засорения. При этом плодовые тела аскомицетов обязательно должны располагаться отверстиями вниз. Экскременты животных следует раскладывать на стерильную сетку с крупными отверстиями — металлическую или лучше волосяную, положенную на чашечки. Разложенные над чашечками образцы накрывают кружками или полосками стерильной фильтровальной бумаги в несколько слоев (два — четыре), которые увлажняют стерильной водой из пипетки. После этого чашку Коха или Петри накрывают крышкой. Параллельно закладывают опыт без увлажнения фильтровальной бумаги, но для повышения относительной влажности воздуха в одну из чашечек наливают стерильную воду.

Через определенный промежуток времени (3—48 часов, в зависимости от поставленной цели) крышку чашки Коха или Петри снимают и маленькие чашечки вынимают. Под эти же образцы можно помещать другие маленькие чашечки, повторяя процесс несколько раз, если нас интересует продолжительность высыпания спор из плодовых тел. Вынутые маленькие чашечки ставят на столик микроскопа и под малым увеличением находят места с одиночными спорами.

Для перенесения спор на питательные среды иглу прокалывают над огнем и охлаждают погружением в питательную среду для увлажнения кончика ее. Под контролем микроскопа, коснувшись увлажненным кончиком иглы поверхности споры, переносят ее на питательную среду в пробирку или в чашку Петри. Вокруг спор часто бывают капли воды, их необходимо удалить, потому что взять спору на кончик иглы с капли воды трудно. Для этого чашки со спорами на несколько минут оставляют открытыми под стеклянным колпаком.

Если маленьких чашечек для тканевых культур нет, можно использовать стерильные предметные стекла. В этом случае на дно больших чашек кладут предметные стекла с двумя палочками по бокам, на которые раскладывают исследуемые образцы. Палочки лучше использовать стеклянные.

Наносить на дно маленьких чашечек или поверхность предметных стекол тонкий слой питательной среды нежелательно, потому что на нее могут попасть споры быстрорастущих грибов, которые засоряют поверхность.

Приведенный метод прост, удобен и не требует сложного оборудования. Этим методом можно получать также споры некоторых пикнидиальных грибов и базидиальных грибов с открытым гименофором, его можно использовать и для получения односпоровых культур гифальных грибов, у которых конидии опадают пассивно, особенно видов *Penicillium*, *Aspergillus* и др.

В заключение следует отметить, что для выделения большего количества видов сумчатых грибов лучше пользоваться не одним, а несколькими методами параллельно.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Поскольку в ассоциациях почвенных грибов встречаются представители различных систематических и экологических групп, для выделения их необходимо применять разные питательные среды. Так, например, для изолирования грибов, разрушающих целлюлозу, используют питательные среды, содержащие целлюлозу. Для выделения из почв грибов, разлагающих хитин, применяют приманки, имеющие хитин, а для выделения кератинофильных грибов — приманки, содержащие роговые вещества. Грибы, растущие в условиях дефицита органических веществ, изолируют с помощью голодного агара. Для грибов, разлагающих вещества гумуса, используют почвенный агар.

Питательные среды, которыми пользуются в микологии, можно разделить на природные, искусственные (получаемые обработкой природных субстратов) и среды определенного состава. Ниже приводим наиболее часто употребляемые среды и способы приготовления некоторых из них. Более полные сведения содержатся в работах Н. М. Пидопличко (1953), Т. В. Аристовской и др. (Большой практикум по микробиологии, 1962), И. В. Асеевой и соавт. (Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов, 1966), М. А. Литвинова (1969).

Среды природные

Овощи (картофель, морковь, свекла и др.) предварительно моют, очищают, нарезают цилиндриками, кладут в пробирки и затем стерилизуют без добавления воды текучим паром по одному часу два дня подряд или при $112,5^{\circ}$ (0,5 атм.) в течение 30 мин.

Зерна (ячмень, овес, рис и др.) помещают в пробирки и заливают водой 1 : 1, для риса 1 : 2. Стерилизацию проводят три дня при 121° (1 атм.) в течение 20 мин.

Листья, стебли и корни растений очищают, моют, нарезают кусочками и помещают в пробирки. Пробирки наливают водой так, чтобы покрылась нижняя часть кусочков растений, и стерилизуют текучим паром по 1 часу два дня подряд.

Указанные природные субстраты часто используют для выделения сумчатых грибов. Кроме того, на этих субстратах многие сумчатые грибы образуют плодовые тела лучше, чем на агаризованных средах.

Среды искусственные, получаемые путем обработки природных субстратов

Сусловый агар

Пшенице сусло	1 л
Агар-агар	15—20 г

Пивное сусло отфильтровывают от осадка, затем определяют в нем содержание сахара и разбавляют водой настолько, чтобы сахара было от 6 до 8 град. по Баллингу. (Градусы по ареометру Баллинга приблизительно соответствуют содержанию сахара в процентах.) Затем к 1 л пивного сусла добавляют 15—20 г агар-агара, хорошо перемешивают и кипятят 15—20 мин. Полученный раствор быстро, пока не остыл, фильтруют, разливают в стерильную посуду, помещают в автоклав и стерилизуют при 112,5° (0,5 атм.) в течение 30 мин.

Мальц-агар

Мальц-экстракт	20—40 г
Вода	1 л

Эти среды применяют для выделения, выращивания и идентификации многих грибов.

Картофельный агар

Картофель	200 г
Агар-агар	15—20 г
Вода	1 л

Картофель предварительно моют, очищают, заливают водой и варят 30 мин, после чего фильтруют через несколько слоев марли или вату, добавляют воды до прежнего объема, смешивают с агар-агаром, кипятят 15—30 мин, разливают в стерильную посуду и стерилизуют.

Картофельно-морковный агар

Картофель	100 г
Морковь	100 г
Агар-агар	15—20 г
Вода	1 л

Картофельно-декстрозный агар

Картофель	200 г
Декстроза	20 г
Агар-агар	15—20 г
Вода	1 л

Декстрозу можно заменить глюкозой, такая среда будет картофельно-глюкозной.

Указанные питательные среды широко используют для выращивания многих сумчатых грибов, так как плодовые тела на них часто образуются интенсивнее, чем на агаризованном пивном сусле.

Среды, приготовленные из экстрактов проросших зерен ячменя, овса и других злаковых

Зерно	100 г
Агар-агар	15—20 г
Вода	1 л

Нужное количество зерен раскладывают в чашки Коха на увлажненную стерильную фильтровальную бумагу. Проросшие зерна (обычно они прорастают на 2—3-и сутки) переносят в колбу, добавляют необходимое количество воды, помещают в автоклав и кипятят при 112,5° (0,5 атм.) в течение 20 мин. После этого раствор отфильтровывают от зерен, восстанавливают прежний объем жидкости, добавляют соли среды Чапека, кроме источника углерода, и после растворения их — агар-агар, кипятят 25—30 мин, разливают в посуду и стерилизуют.

Мучной агар (пшеничная, кукурузная и другая мука)

Мука	40 г
Агар-агар	15—20 г
Вода	1 л

Эти среды можно применять для выделения и выращивания многих грибов

Водный (голодный) агар

Агар-агар	15—20 г
Вода	1 л

Вытяжка из почвы с агаром

Почва	500 г
Агар-агар	15—20 г
Вода	1 л

Необходимое количество воздушно-сухой измельченной почвы заливают водой, настаивают сутки, периодически взбалтывая, затем кипятят 30 мин и фильтруют через 1—2 слоя фильтровальной бумаги, после чего восстанавливают прежний объем жидкости, устанавливают нужный рН с помощью однозамещенного фосфорнокислого калия, добавляют агар-агар, кипятят 15—30 мин, разливают в посуду и стерилизуют.

Эти среды используют для выделения и выращивания грибов, а также для идентификации таксонов, которые не дают спороношения на обогащенных средах.

Иногда для лучшего роста грибов к указанным выше средам перед посевом добавляют экстракт или автолизат дрожжей из расчета 5 мл на 100 мл среды.

Дрожжевой экстракт готовят следующим способом: 100 г прессованных дрожжей размельчают, добавляют 1 л воды и кипятят 5 мин при постоянном перемешивании, затем фильтруют через 1—2 слоя фильтровальной бумаги и стерилизуют в автоклаве при 102,5° (0,1 атм.) в течение 10 мин.

Для приготовления дрожжевого автолизата берут 500 г прессованных дрожжей, смешивают с 500 мл воды и в банке с притертой пробкой настаивают 2—3 суток в термостате при 45° или сутки

при 55—58°, после чего фильтруют, остаток на фильтре промывают 1 л воды, добавляют воды до 2 л и стерилизуют 10 мин при 110° (0,4 атм.).

Среды определенного состава

Среда Чапека

Сахароза	30 г
Натрий азотнокислый	2 г
Калий фосфорнокислый однозамещенный	1 г
Магний сернокислый	0,5 г
Калий хлористый	0,5 г
Железо сернокислое (закисное)	0,01 г
Агар-агар	15—20 г
Вода дистиллированная	1 л

Чапека — Докса агар

Сахароза	30 г
Калий фосфорнокислый однозамещенный	1 г
Натрий азотнокислый	3 г
Магний сернокислый	0,5 г
Калий хлористый	0,5 г
Железо сернокислое (закисное)	0,01 г
Агар-агар	15—20 г
Вода дистиллированная	1 л

Эти среды обычно используют для идентификации сумчатых грибов, имеющих конидиальное спороношение типа *Penicillium* и *Aspergillus*.

Среда Гетчинсона

Калий фосфорнокислый двузамещенный	1 г
Кальций хлористый	0,1 г
Натрий хлористый	0,1 г
Магний сернокислый	0,3 г
Натрий азотнокислый	2,5 г
Железо хлорное	0,01 г
Агар-агар	15—20 г
Вода дистиллированная	1 л

У большинства сумчатых грибов на этой среде вегетативная грибница развивается слабо, ввиду чего, особенно у представителей рода *Chaetomium*, можно хорошо рассмотреть строение отростков плодовых тел, имеющих важное значение для идентификации грибов.

Глюкозо-пептонный агар Сабуро

Глюкоза	40 г
Пептон	10 г
Агар-агар	15—20 г
Вода дистиллированная	1 л

Мальтозо-пептонный агар Сабуро отличается от глюкозо-пептонного агара Сабуро лишь тем, что вместо глюкозы содержит такое же количество мальтозы. Эти среды применяют для выделения и выращивания кератинофильных грибов.

YpSs агар

Порошкообразный дрожжевой экстракт	1 г
Калий фосфорнокислый однозамещенный	1 г
Магний сернокислый	0,5 г
Растворимый крахмал	15 г
Агар-агар	20 г
Вода	1 л

Среда предложена в качестве стандартной при выделении термофильных грибов.

Целлюлозная среда

В качестве целлюлозы часто используют фильтровальную бумагу, которую нарезают полосками, складывают продольными складками и помещают в пробирки. Затем в каждую пробирку добавляют 2—3 мл жидкой среды Чапека или Гетчинсона без источника углерода и стерилизуют 30 мин при температуре 115°.

Эту среду используют для выращивания и идентификации видов рода *Chaetomium* и многих других сумчатых грибов.

Для предотвращения роста бактерий указанные выше питательные среды подкисляют соляной, серной, лимонной, фосфорной, молочной или другой кислотой. Кислоту к среде добавляют в небольшом количестве до тех пор, пока взятая пробная порция, 5 мл, будет иметь нужную величину рН, обычно от 4,2 до 4,5. (Для определения рН среды удобнее всего пользоваться потенциометром или универсальным индикатором.) Более высокая кислотность среды оказывает угнетающее действие на рост многих грибов. Среда обычно подкисляют перед добавлением агар-агара. Некоторые кислоты, например лимонную, добавляют в пробирки по окончании стерилизации, причем на каждые 5 мл среды добавляют 1 каплю 50%-ной кислоты. Однако известно, что кислоты могут подавлять или ограничивать рост некоторых грибов, поэтому некоторые исследователи (Martin, 1950, и др.) вместо кислоты используют бенгальскую розовую (кислотный ксантеновый краситель) в концентрации 1 : 15 000.

Для подавления роста бактерий вместо кислот к питательным средам можно добавлять антибиотики: пенициллин, стрептомицин и др. Э. Фейфер и др. (Медицинская микология и грибковые заболевания, 1966) предлагают следующие дозировки антибиотиков: 1000 000 ед. пенициллина растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды, к каждому литру питательной среды добавляют 2 мл полученного раствора; стрептомицин в количестве 1000 000 ед. растворяют в 10 мл дистиллированной воды, затем на 1 мл этого