



МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра почвоведения,
агрохимии и точного земледелия

Б1.О.18 Почвенная микробиология
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
к выполнению лабораторных работ

Направление подготовки
35.03.03 Агрохимия и агропочвоведение

Профиль подготовки
Экологический мониторинг в агробизнесе

Квалификация выпускника
бакалавр

Уфа-2020

УДК 631.464
ББК 40.3
М 54

Рекомендовано к изданию методической комиссией факультета агротехнологий и лесного хозяйства 26 марта 2020 г. (протокол № 8)

Составитель: доцент Рахимова Г.М

Рецензент: доцент кафедры растениеводства, селекции растений и биотехнологии Ахияров Б.Г

Ответственный за выпуск: зав. кафедрой почвоведения, агрохимии и точного земледелия Д.Р.Исламгулов

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение. Правила работы и техника безопасности в микробиологической лаборатории	4
Лабораторная работа 1 Устройство светового микроскопа и правила работы с культурами микроорганизмов	5
Лабораторная работа 2 Исследование морфологии микроорганизмов	12
Лабораторная работа 3 Количественный учет микроорганизмов в почве	22
Лабораторная работа 4 Качественный учет микроорганизмов в почве	26
Лабораторная работа 5 Изучение возбудителей маслянокислого брожения и продуктов их жизнедеятельности	29
Лабораторная работа 6 Знакомство с микрофлорой силоса и определение его кислотности	32
Лабораторная работа 7 Изучение симбиотической и несимбиотической азотфиксации	34
Лабораторная работа 8 Эпифитная микрофлора	39
Библиографический список	40

ВВЕДЕНИЕ

Современная микробиологическая лаборатория представляет собой комплекс помещений, оборудования и приборов, позволяющих использовать различные приемы для выращивания бактерий, выделения их чистых культур, изучения морфолого-культуральных, физиолого-биохимических и молекулярных свойств

ПРАВИЛА РАБОТЫ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Специфика микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения порядка и чистоты.

За каждым студентом в лаборатории закрепляется постоянное место работы и микроскоп.

Перед началом работы необходимо надеть халат, а на голову белый колпачок или косынку.

В лаборатории категорически запрещается принимать пищу. Не допускается лишнее хождение, резкие движения, посторонние разговоры.

Никаких лишних предметов, не имеющих отношение к работе, на столе не должно быть. Стол должен иметь гладкое, химически устойчивое покрытие, которое легко поддается антимикробной обработке. Для протирания поверхности стола можно использовать 1-3%-ный раствор хлорамина, 70%-ный раствор изопропилового или этилового спирта. Стол необходимо протирать перед началом работы и после ее окончания.

Все предметы, использованные при работе с живыми культурами, должны быть обеззаражены либо обжиганием в пламени горелки (петли, иглы), либо погружены в дезинфицирующий раствор (предметные и покровные стекла, пипетки, шпатели).

В случае попадания исследуемого материала или культуры микроорганизмов на руки, халат или обувь необходимо немедленно сообщить об этом преподавателю и под его контролем провести дезинфекцию. Все открытые части тела обрабатывают дезраствором или 70%-ным спиртом; слизистые оболочки – 0,05%-ным раствором перманганата калия, глаза обрабатывают 1%-ным раствором борной кислоты или под струей воды, или вводят в глаза несколько капель 1%-ного раствора нитрата серебра, в нос – 1%-ный раствор протаргола, рот и горло дополнительно прополаскивают 70%-ным спиртом, или 0,05%-ным перманганатом калия, или 1%-ным раствором борной кислоты.

Все засеянные пробирки, чашки Петри помещают в термостат или сдают лаборанту. На пробирках, колбах, чашках Петри должна быть сделана надпись, содержащая родовое названия культуры, дату засева, фамилию студента и номер группы.

Отработанный материал (пробирки, чашки Петри) после занятия помещают в определенные емкости по указанию лаборанта для его обеззараживания.

В конце занятия студент должен привести в порядок рабочее место, вымыть руки. Необходимо иметь индивидуальное полотенце, салфетки для вытирания рук.

После окончания работы рабочее место должно быть приведено в полный порядок. Воздух лаборатории продезинфицирован ультрафиолетовыми лучами или простым проветриванием.

Каждый студент должен вести лабораторный журнал, являющийся документом, позволяющим контролировать правильность полученных данных. Записи проводятся в определенной последовательности и должны содержать следующее:

- 1 номер работы, ее название, дату постановки и окончания опыта;
- 2 объект исследования;
- 3 условия проведения опыта, включая методы анализов;
- 4 полученные результаты и выводы из них.

При изучении морфологии культур делаются их зарисовки при определенных увеличениях микроскопа, что указывается в тетради; цифровые данные обобщают в таблицах, графиках, диаграммах.

Лабораторная работа 1

Устройство светового микроскопа и правила работы с культурами микроорганизмов

1 Устройство светового микроскопа и правила работы с ним

Цель занятия: изучить устройство светового микроскопа, познакомиться с правилами работы с культурами микроорганизмов.

Материалы и оборудование. Микроскоп; микробиологическая петля; предметные и покровные стекла; стерильные пипетки на 1-2мл; капельница с водой; хлопчатобумажная салфетка, фильтровальная бумага; спиртовка; красители (метиленовый синий (1:10), фуксин Циля), капельница с 96% спиртом, иммерсионное масло, культуры микроорганизмов; дезинфицирующий раствор, ПК с выходом в интернет, программное обеспечение (скайп) для связи с производством НВП «БашИнком» (время видеозвонка по согласованию).

Общие сведения. Микроскоп – это оптический прибор, предназначенный для изучения микроорганизмов. Микробиологические лаборатории чаще всего оснащены световыми микроскопами типа Биолам Р-1, МБР-1, МБР-3 и др.

Световой микроскоп способен давать увеличение объектов более чем в тысячу раз. Он состоит из двух основных систем: механической и оптической.

К механической системе относится штатив с подковообразной или прямоугольной ножкой. К нему прикреплен подвижный столик, который может перемещаться в разных направлениях при помощи двух винтов, расположенных по бокам штатива. К верхней его части прикреплена трубка – тубус, которая передвигается вверх или вниз при помощи винтов. Для грубой наводки служит макрометрический винт, для более точной – микрометрический. Полный оборот микровинта перемещает тубус на 0,1 мм. В нижней части штатива расположено револьверное устройство с гнездами для ввинчивания объективов.

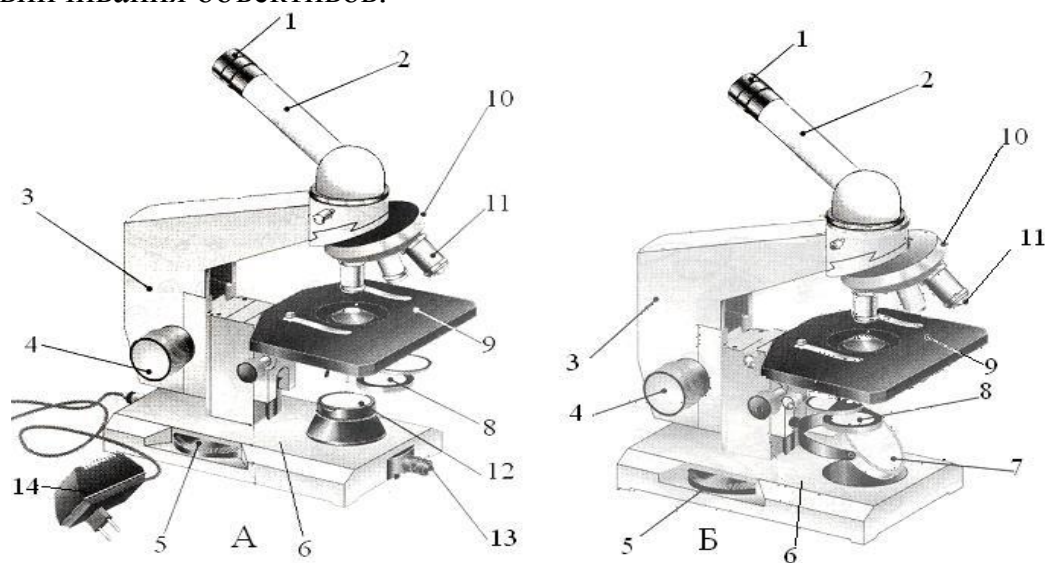


Рисунок Устройство световых микроскопов: А - МИКМЕД-1;
Б – БИОЛАМ:

1 - окуляр, 2 - тубус, 3 - тубусодержатель, 4 - винт грубой наводки, 5 - микрометрический винт, 6 - подставка, 7 - зеркало, 8 - конденсор, ирисовая диафрагма и светофильтр, 9 - предметный столик, 10 - револьверное устройство, 11 - объектив, 12 - корпус коллекторной линзы, 13 - патрон с лампой, 14 - источник электропитания.

Оптическая часть микроскопа включает осветительное устройство, объективы и окуляры. К осветительному устройству относятся зеркало и конденсор, находящиеся под предметным столиком. Одна сторона зеркала плоская, другая вогнутая. Плоским зеркалом пользуются при естественном, а вогнутом – при искусственном освещении и в отсутствии конденсора. Объектив представляет собой систему линз, заключенных в металлическую оправу и определяют оптическую мощность микроскопа. Все объективы по способу употребления делят на сухие (когда между объективом и препаратом находится воздух) и иммерсионные или погруженные (между объективом и препаратом находится иммерсионное масло). В качестве иммерсионного масла используют в основном кедровое масло. Сухие объективы (x4, x8, x10,

x15, x20, x40) используют при увеличении от 40 до 640 раз для рассмотрения макрообъектов (гиф грибов, дрожжей и др.). При работе с иммерсионным объективом (x90, x100) на препарат предварительно наносят каплю иммерсионного масла, затем опускают тубус и погружают в масло объектив. Между предметным стеклом и линзой объектива устанавливается гомогенная среда, устраняющая возможность рассеивания лучей, что обеспечивает хорошую видимость изучаемых микроорганизмов.

Окуляр находится в верхней части тубуса и состоит из двух линз. Линза, обращенная к глазу, называется глазной, к объективу – собирательной. Окуляры (в зависимости от увеличения) обозначаются x10, x16. Общее увеличение микроскопа равно показанию увеличения объектива, умноженному на показание увеличения окуляра.

Практическая часть (порядок работы с микроскопом). Освещение поля зрения устанавливают при малом увеличении микроскопа с помощью зеркала и конденсора (при отсутствии зеркала – включением электрического освещения с помощью переключателя, расположенного в ножке микроскопа), а также регулированием открытия диафрагмы. Настроив освещение, на предметный столик микроскопа помещают предметное стекло (препарат должен быть расположен со стороны объектива), закрепляют его зажимами и приступают к изучению. Исследование всякого объекта следует начинать с объектива сухой системы, дающего малое увеличение. При этом находят наиболее покрашенный, четкий участок препарата. Объективами с малой увеличительной способностью (x4, x8, x10, x15, x20, x40) пользуются при рассмотрении дрожжевых клеток и плесневых грибов. При микроскопировании более мелких объектов (бактерий и их структур) обычно используют иммерсионный объектив с увеличением в 90 или 100 раз. При работе с иммерсионной системой поднимают объектив; на препарат, закрепленный на предметном столике двумя зажимами, капают каплю кедрового масла и, глядя сбоку, опускают макровинтом объектив в масло до соприкосновения с ним. Затем, наблюдая в микроскоп, макровинтом медленно поднимают или опускают объектив до появления в поле зрения изучаемого объекта. В дальнейшем более точную наводку на резкость осуществляют микрометрическим винтом. По окончании работы поднимают тубус, убирают препарат и снимают масло с объектива сначала сухой марлей, а затем марлей, смоченной в спирте. На предметный столик помещают сухую марлю, переводят микроскоп на объектив с малым увеличением и опускают тубус до соприкосновения его с марлей, затем микроскоп накрывают чехлом.

2 Правила работы с культурами микроорганизмов

2.1 Правила работы при пересевах микроорганизмов.

В лабораторных условиях микроорганизмы обычно выращивают в пробирках, колбах, чашках Петри, в жидких питательных средах. Хранят чистые культуры преимущественно в пробирках.

Пробирки с культурами закрыты ватными пробками, которые предохраняют от попадания посторонних микроорганизмов из окружающего воздуха. Эти культуры называют чистыми. Чтобы посторонние микроорганизмы не попадали в пробирку с чистой культурой при приготовлении препаратов и при пересевах, необходимо строго соблюдать правила и порядок работы. Все работы с культурами микроорганизмов и при выделении их из любого материала проводят в зоне пламени горелки.

Из пробирки с твердой питательной средой микроорганизмы берутся бактериологической петлей, сделанной из металлической проволоки и укрепленной в держателе. Петля должна быть предварительно обожжена в пламени горелки для того, чтобы не занести с ней в пробирку посторонние микроорганизмы.

Порядок работы должен быть таким:

- 1) Зажечь спиртовку или газовую горелку.
- 2) Взять пробирку с культурой и поместить ее так, чтобы она находилась между большим и указательным пальцем левой руки, поддерживалась средним пальцем и находилась в наклонном положении.
- 3) Взяв правой рукой держатель петли, прокалить петлю в пламени спиртовки. Обжечь следует и часть держателя.
- 4) Правой рукой, плотно зажав ватную пробку между мизинцем и ладонью, вращательным движением повернуть пробку, вынуть ее из пробирки и держать в таком положении, следя за тем, чтобы она не касалась окружающих предметов.
- 5) Обжечь края пробирки.
- 6) Внести остывшую петлю в пробирку и взять немного микробной массы с плотного бактериального газона. Если культура выращивается в жидкой питательной среде, то культуру также берут бактериальной петлей.
- 7) Снова обжечь в пламени горелки края пробирки и часть ватной пробки и закрыть пробирку пробкой. Если пробка загорится, немедленно ее внести внутрь пробирки и потушить, закрыв рукой.
- 8) Взятый петлей материал использовать для приготовления препарата, для посева и т.д.
- 9) Снова обжечь петлю в пламени, чтобы уничтожить оставшиеся на ней микроорганизмы.

Иногда материал и культуры в жидкой среде берутся пипеткой. В этих случаях пользуются стерильными пипетками, заранее приготовленными в бумажных пакетах или металлических футлярах. Вата, вложенная в открытый конец пипетки, предохраняет от попадания в нее посторонних микроорганизмов. Пробирку с жидкой культурой не следует сильно наклонять, чтобы не смочить ее края и пробку. Пробирку с культурой берут

в левую руку, а пипетку захватывают большим и средним пальцем правой руки, зажав ее верхнее отверстие указательным пальцем. Вынимают пробку из пробирки, как указывалось выше, обжигают края пробирки, опускают пипетку в пробирку и снимают указательный палец. Если жидкости, вошедшей при этом в пипетку, недостаточно, то можно затянуть ее осторожно ртом. Затем закрывают указательным пальцем верхнее отверстие пипетки, вынимают ее из пробирки, закрывают пробирку, обжигая, как обычно, ее края и пробку, и только тогда используют взятый материал по назначению. После употребления пипетку необходимо погрузить в стакан с дезинфицирующим раствором.

Не рекомендуется производить резких движений, ходить и т.д. около работающего с чистой культурой, т.к. движение воздуха увеличивает вероятность случайного загрязнения культуры.

2.2 Приготовление препаратов микроорганизмов.

Для просмотра микроорганизмов в оптических микроскопах готовят препараты живых и фиксированных (убитых) клеток.

Препараты готовят на предметных стеклах, толщиной не более 1,2-1,4 мм. Применение более толстых стекол резко снижает четкость изображения, особенно при работе с иммерсионными объективами.

Поверхность стекла должна быть тщательно обезжирена, чтобы капля жидкости (взвесь микроорганизмов) равномерно расплывалась по стеклу.

Лучший способ обезжиривания – обработка хромовой смесью. В повседневной работе можно стекло (сухое) тщательно натереть мылом и вытереть хлопчатобумажной салфеткой.

Покровные стекла должны быть тщательно вымыты и высушены, их толщина не должна превышать 0,15-0,17 мм.

2.2.1 Прижизненные препараты.

Прижизненные наблюдения осуществляются в основном в «раздавленной» или «висячей» капле.

Приготовление препарата для наблюдения в «раздавленной» капле.

Если микроорганизмы выращены в жидкой питательной среде, то для микроскопирования на предметное стекло помещается капля этой жидкости петлей или пипеткой. Если они выращены на твердой питательной среде, то на предметное стекло помещается капля воды из капельницы и в нее вносят петлей микроорганизмы. Если при этом получается очень густая взвесь, то ее следует разбавить: перенести петлю этой взвеси в другую каплю воды на отдельном стекле.

Капля с микроорганизмами накрывается покровным стеклом, и препарат готов для микроскопирования. Нередко под стеклом остаются пузырьки воздуха. Одиночные небольшие пузырьки не мешают наблюдению, но если их много, то препарат надо переделать.

При опускании покровного стекла на каплю следует прикоснуться его ребром к краю капли и, постепенно наклоняя, опустить стекло. Если имеется избыток жидкости, то его следует удалить фильтровальной бумагой.

Препарат «раздавленная» капля позволяет установить форму клеток микроорганизмов, их размеры, взаимное расположение, способ спорообразования, способность к движению.

Приготовление препарата методом «висячей» капли.

Для приготовления препарата методом «висячей» капли используется предметное стекло со специальным углублением, с лункой.

Порядок работы должен быть следующим:

- 1) края покровного стекла обмазать аккуратно вазелином, пользуясь стеклянной палочкой;
- 2) поместить в центр этого стекла небольшую каплю жидкости с микроорганизмами;
- 3) покровное стекло поместить на предметное таким образом, чтобы капля висела над углублением, не прикасаясь к предметному стеклу.

Вазелин должен предохранять каплю от высыхания.

Препарат «висячая» капля используется для выявления подвижности у микроорганизмов, для наблюдения за размножением, образованием и прорастанием спор, отношением микроорганизмов к различным раздражителям.

Прижизненная окраска.

Микроорганизмы можно наблюдать в неокрашенном виде и с прижизненной окраской.

Для прижизненного (витального) окрашивания используются следующие красители: нейтральный фиолетовый, метиленовый синий, зеленый янус, эозин и эритрозин, нейтральный красный в концентрациях от 0,001 до 0,0001 %. При приготовлении прижизненного препарата микроорганизмы вносятся в каплю краски на предметном стекле, после чего капля накрывается покровным стеклом.

Можно поступить и таким образом: поместить каплю краски у края покровного стекла, заранее приготовленного прижизненного препарата (без окраски) и поднести к противоположному краю покровного стекла полоску фильтровальной бумаги. Краска при этом проникает в препарат и микроорганизмы окрашиваются.

2.2.2 Приготовление препаратов фиксированных клеток.

Фиксированные препараты используются для выявления морфологических особенностей и количественного учета микроорганизмов, для проверки чистоты культуры. Под фиксацией подразумевают такую обработку живого объекта, которая дает возможность быстро прервать течение жизненных процессов в нем, сохраняя тонкую структуру. В результате фиксации клетки прочно прикрепляются к стеклу и лучше прокрашиваются. Фиксация необходима в случае работы с патогенными микроорганизмами для безопасности.

Приготовление фиксированных окрашенных препаратов включает следующие этапы: приготовление мазка, фиксацию, окраску.

Приготовление мазка.

На чистое обезжиренное предметное стекло наносят каплю водопроводной воды. Прокаленной бактериологической иглой из пробирки с культурой берут небольшое количество микробной массы и вносят в каплю. Каплю тщательно размазывают по стеклу на площади приблизительно 4 см^2

Густую суспензию сначала разводят водой. Стерильной петлей берут немного суспензии и переносят в каплю воды на другое предметное стекло. Суспензию нормальной густоты размазывают тонким слоем по стеклу, затем мазок сушат на воздухе при комнатной температуре или слабом нагревании, держа препарат высоко над пламенем горелки. Сильное нагревание препарата при сушке не рекомендуется, так как белки коагулируют, искажая структуру и форму клеток. Высушенный препарат фиксируют.

Фиксация мазка

Фиксацию мазка проводят над пламенем горелки при исследовании формы клеток или при помощи химических соединений для исследования внутренней структуры клеток. В первом случае препарат три-четыре раза проводят нижней стороной через верхнюю часть пламени горелки, держа предметное стекло мазком вверх. Во втором, используют хромовые соединения, формалин, осмиевую кислоту, ацетон.

Один из распространенных приемов фиксации – обработка препарата 96%-м спиртом или смесью равных объемов этилового спирта и эфира (жидкость Никифорова). Для этого препараты погружают на некоторое время в фиксирующую жидкость.

Окрашивание препарата.

Существует много различных способов окраски микроорганизмов, простых и специальных, которые применяются в зависимости от задач исследования.

При простой окраске для наблюдений за формой микроорганизмов используются спирто-водные растворы какого-либо одного красителя. Например, метиленовый синий или метиленовый фиолетовый, фуксин в щелочных или карболовых растворах. При этом прокрашивается вся клетка. При дифференциальной окраске отдельные структуры клетки окрашиваются разными красителями. Таковы методы окраски по Граму, окраска спор и др.

Для окрашивания микроорганизмов применяют кислые и основные красители. Первые вступают в реакцию с веществами основной, вторые – кислой природы.

При окрашивании мазка препарат помещают на препаратодержатель. На мазок наносят несколько капель красителя. В зависимости от вида красителя и цели исследования продолжительность окрашивания меняется от 1 до 5 мин., в отдельных случаях до 3 мин и дольше. По окончании окрашивания препарат промывают водой, фильтровальной бумагой удаляют воду, подсушивают на воздухе и микроскопируют.

Красители можно разделить на позитивные и негативные. Позитивные красители окрашивают клетки при комнатной температуре в течение 30...60с); негативные – пространство, окружающее микроорганизмы. В результате клетки выглядят силуэтами на фоне красителя.

Задания:

- 1) Изучить теорию вопроса.
- 2) Приготовить препараты пекарских дрожжей и микроорганизмов из молочной сыворотки. Просмотреть препараты при малых и средних увеличениях, с иммерсией, сделать зарисовки всех встречающихся форм бактерий, а также дрожжей.
- 3) Познакомиться с препаратами микроорганизмов, приготовленными в лаборатории микробиологии НВП «БашИнком»

Вопросы для самоконтроля

1. Какие части микроскопа относятся к механической системе?
2. Что относится к оптической системе?
3. Что такое иммерсионная система и для чего используют иммерсионное масло?
4. У каких систем микроскопа разрешающая способность выше?
5. Основные способы приготовления прижизненных и фиксированных препаратов микроорганизмов.

Лабораторная работа 2

Исследование морфологии микроорганизмов

Цель занятия: ознакомиться с основными группами микроорганизмов.

Материалы и оборудование. Природные субстраты с ассоциациями микроорганизмов (молочная сыворотка, навозная жижа, суспензия дрожжей и др.), предметные и покровные стекла, бактериологические петли (иглы), препаровальные иглы, красители, микроскоп, ПК с выходом в интернет, программное обеспечение (скайп) для связи с производством НВП «БашИнком» (время видеозвонка по согласованию).

Общие сведения

Бактерии. Под общим понятием «бактерии» описано свыше 1600 видов микроорганизмов – прокариот, не имеющих настоящего сложноорганизованного ядра. Большинство представителей бактерий – одноклеточные организмы, различающиеся размерами и физиологическими свойствами. По форме все бактерии можно разделить на шаровидные, палочковидные, извитые и нитчатые.

С основными формами бактерий можно познакомиться на примере следующих представителей (рисунок 1).

Бактерии шаровидные, или кокки (от греч. *coccus* – зерно, шарик).

Среди них выделяют следующие группы:

– микрококки, встречающиеся в природе в виде одиночных шаровидных клеток; к ним относят *Micrococcus agilis* (от лат. *micro* – маленький, *agilis* – подвижный);

– диплококки (от лат. *diploos* – двойной) – шаровидные бактерии, соединенные по две клетки; к ним относят *Azotobacter chroococcum*; родовое название вида отражает способность этих бактерий фиксировать азот атмосферы, видовое – продуцировать коричневый пигмент (лат. *chroo* – коричневеющий);

– стрептококки (от лат. *Streptos* – цепь) – шаровидные клетки, образующие в результате деления в одной плоскости разнообразной длины цепочки; с этими бактериями знакомятся при изучении молочнокислого брожения на примере *Streptococcus lactis*; родовое название отражает характер расположения шаровидных клеток в виде цепочки, видовое – причастность стрептококка к молочнокислому брожению (от лат. *lactis* – молочный);

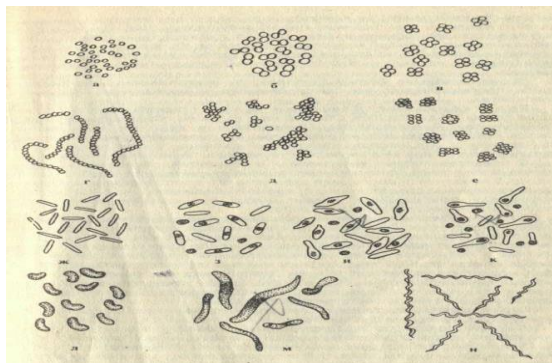


Рисунок 1 Форма бактерий: ♦шаровидная: а – микрококки; б – диплококки; в – тетракокки; г – стрептококки; д – стафилококки; е – сарцины; ♦палочковидная: ж – не образующие спор, з, и, к – спорообразующие (з – бациллярного, и – клостридиального, к – плектридиального типов спороношения); ♦извитая: л – вибрионы; м – спириллы; н – спирохеты

– сарцины (от лат. *sarceo* – соединяют) – шаровидные бактерии, группирующиеся по восемь клеток; располагаются в виде куба (с каждой стороны по четыре клетки); такая форма возникает в результате деления клетки в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, отдельные виды сарцин формируют большие сарциноподобные кубообразные пакеты, но уже с каждой стороны находится не по четыре клетки (субъединицы сарцины), а по четыре сарцины; удобна для просмотра *Sarcina flava* (сарцина желтая) – наиболее обычный представитель микрофлоры воздуха.

Все шаровидные формы бактерий, за исключением *Streptococcus lactis*, просматривают на фиксированных и окрашенных фуксином препаратах.

Палочковидные бактерии. К ним относят формы, образующие споры (роды *Bacillus*, *Clostridium* и др.) и не образующие их (роды *Pseudomonas*,

Achromobacter, *Lactobacillus* и др.). При окрашивании клеток *Pseudomonas stutzeri* цитоплазма их прокрашивается равномерно, поскольку это неспорообразующая палочка, и под микроскопом клетки выглядят как тонкие, четко очерченные, прокрашенные палочки.

С представителями палочковидных бактерий, образующих споры, можно познакомиться на примере *Bacillus mycoides* или *Bacillus mesentericus*. В названии первого вида отражена его способность развиваться на питательных средах в виде ложногрибовидного налета (от лат. *mycoides* – грибовидный). Налет имеет вид сложнопереплетенных нитей, напоминающих мицелий грибов.

Поскольку *Bacillus mycoides* – спорообразующая палочка, цитоплазма клетки, приступившей к спорообразованию, красителем прокрашивается, а спорогенная зона не прокрашивается, и под микроскопом бацилла выглядит неравномерно окрашенной. Спорогенная зона, как более плотная и непрокрашенная, иначе преломляет свет, чем цитоплазма клетки. Клетки *Bacillus mycoides* относятся к стрептобациллам, так как обычно располагаются цепочками. Для просмотра лучше брать двух-трехсуточную культуру, так как в более позднем возрасте клетки переходят в стадию спорообразования. *Bacillus mesentericus* (картофельная палочка) также относится к стрептобациллам.

Палочковидные бактерии также просматривают на фиксированных и окрашенных фуксином препаратах.

Нитчатые формы. Представляют собой цепочки цилиндрических клеток, часто окруженные общим влагалищем, или чехлом. Нитчатые бактерии распространены в илах, почве и водоемах, особенно с высоким содержанием железа. В водоемах эти бактерии часто образуют охристые осадки. Для знакомства с нитчатыми бактериями рекомендуют брать пробу воды с охристыми отложениями из естественных водоемов.

Препарат готовят в раздавленной капле и просматривают с иммерсионной системой. Наиболее часто на нем встречаются железобактерии рода *Leptothrix*, окисляющие закисные формы железа в окисные. Гидрат окиси железа откладывается во влагалищах, отчего микроорганизмы приобретают желтовато-бурую (охристую) окраску. На препарате часто обнаруживаются остатки ожелезненных влагалищ в виде тонких трубок и другие ожелезненные структуры.

Для выявления вегетативных клеток железобактерий пробу берут непосредственно из охристых осадков, препарат фиксируют 96% спиртом, затем обрабатывают 1% раствором НСІ для обесцвечивания влагалищ и окрашивают в течение суток эритрозином. Влагалища клеток на таком препарате бесцветны, а вегетативные клетки и гонидии красные. Гонидии – образования овальной или округлой формы, в некоторых случаях имеющие жгутики. Формируются гонидии у тех нитчатых бактерий, которым свойственна дифференциация нити.

Извитые формы. Среди бактерий данной группы выделяют следующие

формы:

- ♦ вибрионы (от лат. *vibrio* – трепещущий, вибрирующий) – слегка изогнутые клетки; изгиб их меньше половины окружности;
- ♦ спириллы (от лат. *spiro* – штопор) – в отличие от вибрионов их клетки более длинные, толстые и извитые; извитость или равна, или больше половины окружности; спириллы могут иметь один завиток в виде русской буквы С, два завитка в виде латинской буквы S или несколько – в виде спирали;
- ♦ спирохеты – длинные и тонкие клетки с большим количеством мелких, но крутых завитков; длина клеток превышает их толщину в 5-200 раз.

Вибрионы и спириллы удобно просматривать на фиксированном и окрашенном фуксином препарате, приготовленном из навозной жижи, предварительно инкубированной в течение нескольких суток в термостате. На таком препарате много клеток разных видов микроорганизмов, среди них часто встречаются извитые формы.

Для ознакомления со спирохетами следует приготовить фиксированный крашеный препарат зубного налета. Особенно удачны препараты соскоба из кариесного (гнилого) зуба. Зубные спирохеты чрезвычайно тонкие, почти волосовидные.

Миксобактерии, или слизистые бактерии. Группа бактерий, стоящих на более высокой ступени развития, чем описанные выше. У отдельных представителей миксобактерии (*Sorangium, Polyangium*) даже в световой микроскоп четко видно дифференцированное ядро. Вегетативные клетки имеют палочковидную форму с заостренными или округлыми концами. По мере старения они укорачиваются и переходят в микроспоры, соединяющиеся впоследствии слизью и образующие первичные и вторичные цисты. Из последних в дальнейшем формируются плодовые тела. Для наблюдений за формой миксобактерии берут колонии, развившиеся вокруг комочков почвы на гелевых пластинах, на которых единственным источником углерода служит целлюлоза.

Актиномицеты (от лат. *actis* — луч, *myses* – гриб) – лучистые грибы (рисунок 2а). Эта группа микроорганизмов занимает промежуточное положение между бактериями и грибами, поэтому ее представителей называют грибобактериями. Они одноклеточные, как бактерии, и образуют мицелий, как грибы. Диаметр нитей у этих микроорганизмов очень мал, как у бактерий (0,5-0,8 мкм), гифы мицелия длинные и ветвистые, как у грибов. Например, у актиномицетов длина ветвящихся нитей достигает нескольких миллиметров, у настоящих грибов – нескольких сантиметров. С грибами актиномицетов объединяет также способность размножаться спорами.

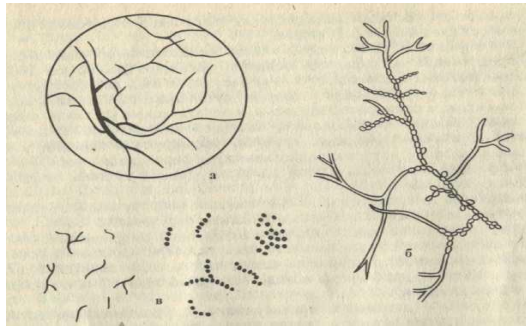


Рисунок 2 Актиномицеты (а), нокардии (б) и микобактерии (в)

На питательных средах актиномицеты формируют пушистые, бархатистые, мучнистые, преимущественно плотные кожистые колонии, срастающиеся с субстратом и иногда имеющие характерный землистый запах. Мицелий актиномицетов на питательных средах дифференцирован: одна часть погружена в субстрат (субстратный мицелий). Многие представители актиномицетов продуцируют пигменты, поэтому их воздушный мицелий и колонии окрашены в голубые, синие, фиолетовые, розовые, бурые, коричневые или черные тона. Актиномицеты, образующие диффундирующие в питательную среду пигменты, окрашивают и ее в соответствующий цвет.

Чтобы выявить характерные морфологические признаки колонии актиномицета, сначала рассматривают их при малом увеличении на питательной среде в чашках Петри или по краю колонии в пробирке. При этом можно видеть, что гифы мицелия частично внедряются в субстрат, частично стелются по его поверхности и приподнимаются над ней. На концах нитей воздушного мицелия хорошо просматриваются спораносцы со спорами. Спораносцы по строению бывают прямыми, волнистыми, спиральными и мутовчатыми.

Затем готовят фиксированный, окрашенный фуксином препарат. Для этого на предметное стекло наносят кусочек колонии актиномицета вместе со средой, чтобы взять не только воздушный, но и субстратный мицелий. Вторым предметным стеклом плотно прижимают этот кусочек к стеклу, раздавливают и размазывают с водой. Далее сушат, фиксируют, красят. На фиксированном окрашенном препарате дифференциации мицелия не видно, как правило, не видны и споры, однако четко просматриваются мицелиальные одноклеточные нити.

Много общего с актиномицетами имеют нокардия, или проактиномицеты, и микобактерии, генетически с ними связанные.

Нокардия. Это формы микроорганизмов, переходные между актиномицетами и микобактериями. Воздушный мицелий у них отсутствует или развит слабо. На питательных средах развиваются колонии тестообразной (мягкой) консистенции с характерным мицелиальным ободком. Окраска их также разнообразна, как и у истинных актиномицетов.

В молодом возрасте проактиномицеты образуют мицелий, который вскоре начинает септироваться (в нитях образуются перегородки) и расчленяться на палочковидные фрагменты, в дальнейшем переходящие в укороченные палочки, но чаще в кокки.

Для знакомства с проактиномицетами можно воспользоваться чистой культурой *Nocardia rubra*, образующей красные (от лат. *rubra* – красный) колонии (рисунок 2б).

Микобактерии (рисунок 2в). Это наиболее низкоорганизованные актиномицеты. В некоторых классификациях их относят к бактериям. Настоящего мицелия микобактерии не образуют. Колонии тестообразной консистенции, продуцируют пигмент. В молодой культуре формируются палочки искривленной формы с неровным контуром: звездообразные, иногда довольно длинные, с боковыми отростками. В старых культурах ветвистые палочки часто распадаются сначала на более короткие палочки, затем на кокки.

Грибы. Объектами исследования микробиологии служат многие виды микроскопических грибов. С некоторыми их представителями знакомятся на практических занятиях.

Грибы относят к эукариотам. Тело гриба состоит из мицелия, или грибницы – сплетения тонких ветвящихся нитей - гиф.

Зигомицеты. Низшие грибы, имеют хорошо развитый ветвистый одноклеточный мицелий. Размножаются половым путем и бесполым, т.е. при помощи спор. Представитель класса – мукор (*Mucor mucedo*) развивается в виде войлочного белого или серого налета на продуктах растительного происхождения и навозе травоядных животных.

Мицелий мукоровых грибов пронизывает субстрат и частично стелется по его поверхности. Вверх от грибницы отходят особые воздушные гифы – спорангиеносцы, вздувающиеся на концах. Вздутия представляют собой спорангии, в дальнейшем они отделяются от спорангиеносцев перегородкой. В спорангиях бесполым путем образуются многочисленные спорангиоспоры – эндоспоры (от лат. *endo* –внутренние).

Перегородка, отделяющая спорангий от спорангиеносца, проходит куполообразно, поэтому верхняя часть спорангиеносца оказывается внутри спорангия. Эту часть спорангиеносца называют колонкой, у разных видов мукоровых грибов она имеет неодинаковую форму (грушевидная, шаровидная, цилиндрическая).

Для просмотра осторожно берут препаровальной иглой небольшое количество мицелия, другой препаровальной иглой снимают его на сухое предметное стекло. Препарат сначала рассматривают без покровного стекла при малом увеличении микроскопа. Видны спорангиеносцы и круглые темные шарики на их концах – спорангии. Обычно спорангии покрыты тонкими шипами кристаллов оксалата кальция.

Затем на поверхность препарата наносят каплю воды, накрывают его покровным стеклом. Оболочка спорангия при этом разрушается, и споры

вываливаются. Рассматривают их последовательно при малом и большом увеличении без иммерсии.

Представители рода (рисунок 3а) могут быть выделены из почвы при посеве пылевидных ее частиц на поверхность сусло-агара в чашках Петри или на свежем конском навозе, помещенном на три-четыре дня под стеклянный колпак на тарелку с влажной фильтровальной бумагой или сырым песком.

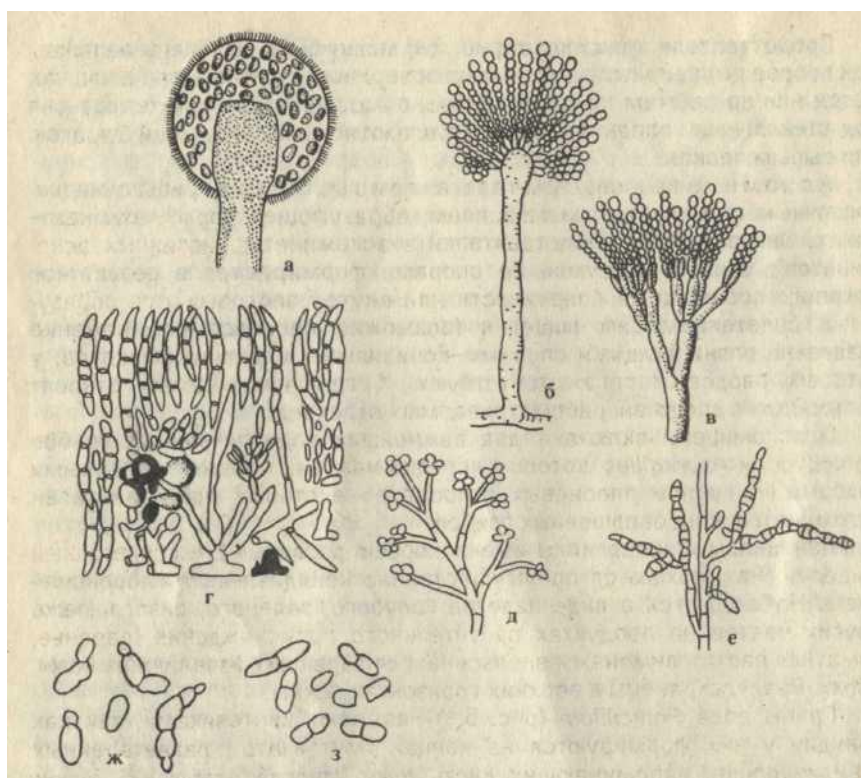


Рисунок 3 Микроскопические грибы: а – Мисог; б – Aspergillus; в – Penicillium; г – Fusarium; д – Trichoderma; е – Alternaria; ж – дрожжи почкующиеся; з – делящиеся

Аскомицеты, или сумчатые грибы. Высшие грибы с многоклеточным или членистым мицелием, образующие споры в сумках – асках. Они включают представителей эуаскомицетов (истинных аскомицетов), у которых сумки со спорами формируются в результате полового процесса на поверхности или внутри плодовых тел, образуемых сплетением гиф мицелия (возможно бесполое размножение экзогенно возникающими спорами-конидиями), и гемиаскомицетов, у которых плодовые тела отсутствуют. К гемиаскомицетам относят большинство дрожжей, рассматриваемых отдельно.

Эуаскомицеты включают два важнейших рода почвенных грибов

Penicillium и *Aspergillus*, которые нередко называют также плесневыми грибами. К группе плесневых относят и некоторых представителей зигомицетов и несовершенных грибов.

Пенициллы и аспергиллы имеют хорошо развитый многоклеточный мицелий. Размножаются преимущественно конидиальным спороношением. Наблюдаются в виде налетов голубого, зеленого, сизого, реже других цветов на продуктах растительного происхождения (варенье, томатная паста), лимонах и апельсинах, отсыревших изделиях из кожи, обоях. Распространены в верхних горизонтах почвы.

Грибы рода *Penicillium* (рисунок 3в) называют кистевиками, так как конидии у них формируются на концах мутовчато разветвленных конидиеносцев, напоминающих кисть руки. Иногда отдельный пучок конидиеносцев, выходящих как бы из одной точки и отчленяющих конидии, напоминает рисовальные кисти.

При просмотре строения конидиеносцев *Penicillium glaucum* препаровальной иглой вырезают кусочек мицелия (0,5 мм²) на границе между зеленым и белым участками. Гриб к занятию выращивают в чашке Петри. Если он старый и мицелий уже весь зеленый, просмотр будет неудачным. Осторожно при помощи двух препаровальных игл кусочек мицелия снимают со среды и помещают в каплю воды на предметное стекло. Сверху кладут покровное стекло.

Поскольку мицелиальная пленка гриба довольно толстая, может получиться так, что под покровным стеклом вода не окружает мицелий со всех сторон. В этом случае из капельницы под покровное стекло добавляют воду до тех пор, пока кусочек мицелия не будет окружен ею. Стеклопалочкой или препаровальной иглой слегка надавливают на центр покровного стекла. Избыток воды удаляют фильтровальной бумагой.

Препарат просматривают сначала при малом увеличении, уделяя основное внимание краям, так как на них обычно хорошо видны кисти конидиеносцев. Когда подходящий участок найден, переходят с объектива 8Ч на объектив 40Ч и детально рассматривают кисточки. Во время просмотра при малом увеличении конденсор несколько опускают, при переводе на объектив 40Ч регулируют освещенность поднятием конденсора.

Для грибов рода *Aspergillus*, или леечная плесень (рисунок 3б), обычны одноклеточные конидиеносцы шаровидно, булавовидно или грушевидно вздутые. На них располагаются параллельно друг другу короткие кеглеобразные стеригмы, каждая из которых отшнуровывает радиально цепочки конидий. Некоторые виды аспергиллов имеют два ряда стеригм. Вся головка конидиеносца с радиально расходящимися цепочками конидий напоминает наконечник лейки со струйками воды.

Со строением конидиеносцев аспергиллов знакомятся на примере *Aspergillus niger*. Препаровальной иглой берут небольшое количество мицелия на границе между черным и коричнево-бурым участками колонии и вносят в каплю воды на предметном стекле. Далее поступают так же, как и

при просмотре пеницилла. В начальной стадии спорообразования аспергилл похож на мукор (бесцветные головки), затем с возрастом головки покрываются стеригмами, на которых развиваются споры. В результате получают так называемые кудрявые головки. От мукора аспергилл всегда можно отличить по присутствию таких головок. У мукора головки гладкие – «лысые», так как споры его эндогенного происхождения (внутренние), а у аспергилла и пеницилла – экзогенного (внешние).

Дейтеромицеты, или несовершенные грибы. Имеют многоклеточный мицелий, но у них нет полового процесса и совершенной стадии спороношения. Размножаются бесполом путем при помощи конидий или вегетативно участками гиф. В природе широко распространены представители родов *Fusarium*, *Trichoderma*, *Alternaria*. Встречаются на растительных остатках, плодах, семенах и в почве.

Среди грибов рода *Fusarium* (рисунок 3г) есть сапротрофы, живущие в почве и на растительных остатках, и паразиты, вызывающие заболевания многих видов растений (увядание, гнили корней, стеблей, плодов, полегание сеянцев древесных и кустарниковых пород, болезни семян).

Колонии отдельных видов фузариума на питательных средах (сусло-агар) разнообразны по структуре: они могут быть рыхлыми, ватообразными, пышными воздушными или плотными пленчатыми. Колонии бывают белые или различных тонов розового или желтого цвета. Нередко питательная среда тоже окрашивается в разные цвета и оттенки от розового до коричневого.

Приготовив в капле воды препарат обычным способом и рассматривая его под микроскопом, можно увидеть более или менее разветвленные конидиеносцы и очень характерные для фузариума конидии, так называемые макроконидии. Они заострены на концах, продолговатые, согнутые, нередко серповидные, с несколькими перегородками. У многих видов фузариума образуются еще овальные, мелкие, бесцветные, чаще одноклеточные микроконидии.

Грибы рода *Trichoderma* (рисунок 3д) легко выделить из почвы на подкисленном сусло-агаре. Через два-три дня инкубации при 23-25° на поверхности среды появляются сначала белые, затем с оттенками зеленого участки с рыхлой клочковатой или войлочной поверхностью, образованной мицелием и скоплением конидиеносцев. С возрастом они становятся темно-зелеными. При большом увеличении микроскопа видны прямостоячие, многократно супротивно разветвленные конидиеносцы, приподнимающиеся над мицелием. На вершине конидиеносцев расположены шаровидные головки, каждая из которых состоит из 10-20 одноклеточных бесцветных конидий.

Разные виды рода *Alternaria* (рисунок 3е) можно выделить с поверхности листьев пораженных этим грибом растений картофеля или томата, семян капусты и других растений, из почвы. Альтернарии характеризуются своеобразным строением многоклеточных грушевидных

конидий, соединенных цепочками. Колонии на сусло-агаре сначала светлые, пушистые, затем зеленовато-серые или оливково-черные, бархатистые или ворсистые, нередко с ясно выраженной концентрической зональностью; иногда с самого начала сажисто-черные, во многих случаях темный пигмент диффундирует в среду.

Дрожжи. По современным представлениям, дрожжи – сборная группа одноклеточных микроскопических организмов, относящихся к разным классам грибов. Преимущественно они представлены в классе Аскомицеты.

Диаметр клеток дрожжей колеблется от 8 до 15 мкм. Форма их разнообразна: эллипсоидная, грушевидная, округлая, цилиндрическая. Размножаются вегетативно – почкованием, делением и половым путем с образованием спор. К почкующимся дрожжам (рисунок 3ж) относят представителей «культурных» дрожжей рода *Saccharomyces* (сахаромицеты), к делящимся – виды рода *Schizosaccharomyces* (шизосахаромицеты).

При половом процессе слияние вегетативных клеток дрожжей ведет к образованию сумок со спорами, иногда сначала формируются споры, которые впоследствии копулируют друг с другом. В каждой сумке образуется от двух до восьми, иногда 12 спор. Среди дрожжей есть аспорогенные ложные дрожжи, не способные к половому процессу и спорообразованию. Они относятся к классу Несовершенные грибы.

С делящимися дрожжами (рисунок 3з) можно познакомиться на примере *Schizosaccharomyces pombe* (от лат. *schizo* – рваться, делиться, *saccharomyces* – сахарный гриб, *pombe* – название африканского напитка, из которого этот организм выделен). Дрожжам размножение делением несвойственно. Шизосахаромицеты служат как бы отклонением от нормы. Эти грибы размножаются половым путем, связанным со спорообразованием, что характерно для сумчатых грибов. Рассматривают виды рода на фиксированных окрашенных фуксином препаратах. Это цилиндрической формы крупные клетки с округлыми концами. Размножение делением характерно также для дрожжей рода *Endomyces*.

Из почкующихся дрожжей наиболее окультурены дрожжи пивные, или пекарские, – *Saccharomyces cerevisiae*. Форма их разнообразна, размножаются почкованием и аскоспорами. При почковании на материнской клетке возникает маленькая выпуклость – «почка» – это дочерняя клетка, в которую переходит одно ядро, клетка увеличивается в размерах и отделяется. Если условия для такого размножения благоприятны (достаточное количество сахара, соответствующая температура, аэрация), процесс идет очень быстро. У некоторых представителей рода клетки после почкования не успевают разъединиться и возникает псевдомицелий (ложный мицелий).

Для лабораторных занятий могут быть использованы пивные дрожжи. Небольшой кусочек дрожжевой массы за несколько часов до занятий помещают в теплую подсахаренную воду и ставят в теплое место. Образуется беловатая мутная жидкость. На предметное стекло наносят ее каплю, закрывают покровным стеклом, наносят сверху кедровое масло и

просматривают препарат с иммерсионной системой. Клетки хорошо видны и при меньших увеличениях.

В пекарских дрожжах обычно присутствует две расы: одна представлена округло-эллипсоидными клетками, быстро разьединяющимися при почковании; другая – удлинённо-цилиндрическими, образующими при почковании ветвистые кустики (псевдомицелий). На многих клетках видны почки. В мелкозернистом содержимом живых дрожжей хорошо заметны крупные прозрачные вакуоли, занимающие иногда центральное положение.

С представителями аспорогенных дрожжей, размножающихся только почкованием и не образующих спор, можно познакомиться на примере *Candida kefari*. Их клетки мелкие, диаметром около 5 мкм.

Размножение у дрожжеподобных организмов может происходить также в результате распада гиф на отдельные клетки – оидии, или артроспоры, как у *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*).

Задания:

- 1) Изучить теорию вопроса.
- 2) Провести микроскопическое изучение препаратов.
- 3) Зарисовать представителей основных групп микроорганизмов.

Вопросы для самоконтроля

1. Чем отличаются прокариоты от эукариот?
2. Перечислите основные формы бактерий и дайте их характеристику?
3. Что представляют собой поверхностные и внутренние структуры бактерий и какие их функции?
4. Каковы особенности грамположительных и грамотрицательных бактерий?
5. Назовите виды бактерий, не имеющих клеточной стенки?
6. В чем отличие нуклеотида прокариот от ядра эукариот?
7. Какие функции выполняют эндоспоры бактерий и какие споры у грибов?
8. Чем объясняется термоустойчивость бактерий?
9. Расскажите о классификации микроорганизмов?
10. Назовите основных представителей грамположительных и грамотрицательных бактерий, микоплазм и архебактерий?

Лабораторная работа 3

Количественный и качественный учет микроорганизмов в почве

3.1 Количественный учет микроорганизмов в почве

Цель работы: освоить методику определения титра микроорганизмов в исследуемом образце почвы

Материалы и оборудование: исследуемый образец почвы, набор пробирок для разведения вытяжки почвы, 0,9% раствор NaCl или вода стерильные, стеклянные мерные пипетки, чашки Петри, шпатели, питательная среда, спиртовка; микроскоп, ПК с выходом в интернет, программное обеспечение (скайп) для связи с производством НВП «БашИнком» (время видеозвонка по согласованию).

Общие сведения. Метод является наиболее распространенным для определения общей микробной обсемененности различных субстратов. Сущность чашечного метода заключается в том, что производят посев определенного объема исследуемого материала в чашки Петри с плотной питательной средой соответствующего состава. При последующем выращивании посева в термостате из каждой клетки в результате размножения образуется колония; количество колоний подсчитывают.

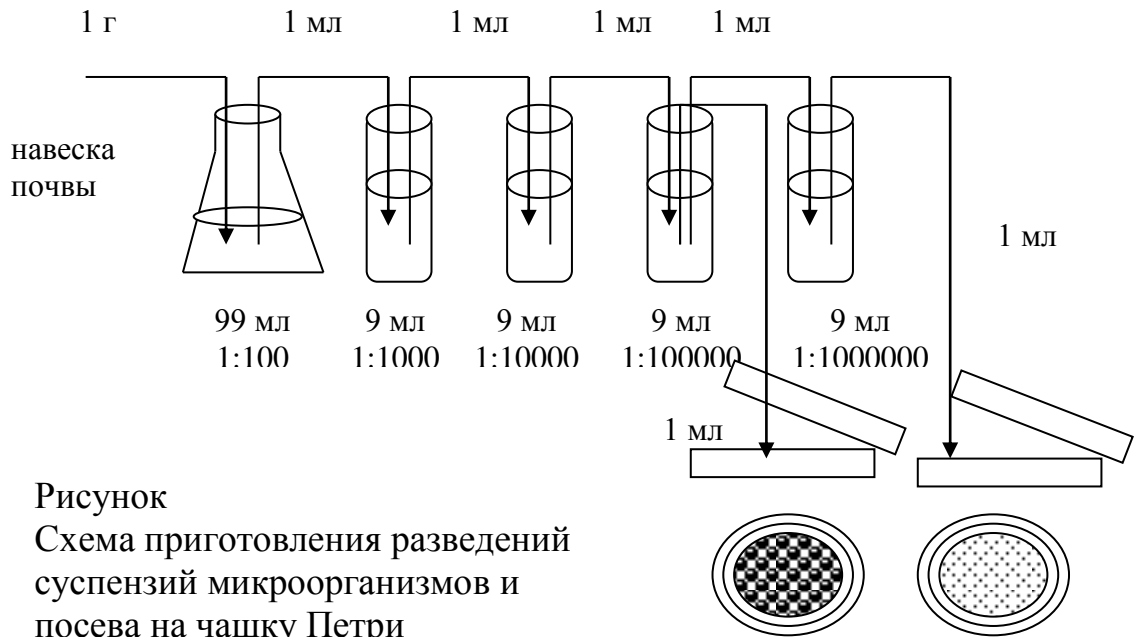
Работа этим методом включает три этапа: приготовление разведений, посев на плотную питательную среду в чашки Петри и подсчет выросших колоний.

Ход работы

1. Приготовить разведения исследуемого образца почвы.

При учете в почве количества микроорганизмов обычно используют для анализа среднюю пробу, которую получают, перемешав пробы, взятые стерильными инструментами из разных мест анализируемого участка. Для определения количества бактерий в почве используется метод разведений.

Анализируемая почва (взвешенная на стерильном часовом стекле) последовательно разводится в 100, 1000, 10000 и более раз. Разведение готовят следующим образом (рисунок). 1 г навески почвы стерильно вносят в колбу № 1 с 99 мл стерильной водопроводной воды, размешивают в течение 3-5 минут и дают 1,5 мин. отстояться, получают разведение 1/100. После этого из колбы № 1 (разведение 1/100) стерильной пипеткой набирают 1 мл почвенной болтушки (суспензии) и вносят в пробирку № 1 с 9 мл стерильной воды (тут и далее размешивание 1 мин., отстаивание 0,5 мин.) получают разведение 1/1000. Набирают 1 мл суспензии из пробирки № 1 (1/1000 разв.) и переносят в пробирку № 2 с 9 мл стерильной воды и получают разведение 1/10000. Из пробирки № 2 1 мл суспензии переносят в пробирку № 3 с 9 мл стерильной воды (разв. 1/100000) и т.д.



Стерильную пипетку меняют каждый раз при новой концентрации почвенной болтушки.

2. Сделать посев соответствующих разведений на плотную питательную среду в чашки Петри

Для определения количества микроорганизмов в 1 мл почвенной болтушки каждого разведения осуществляют поверхностный или глубинный посев.

При глубинном посеве 1 мл суспензии из соответствующего разведения переносят стерильными пипетками в стерильные чашки Петри. На крышках чашки Петри перед посевом указывается название анализируемого материала, разведение и фамилия студента.

Посевы из разведений можно сделать одной пипеткой, но начинать необходимо с наибольшего разведения. Затем, осторожно приоткрыв под углом крышку чашки Петри, заливают дно чашки 15-20 мл МПА, расплавленного и охлажденного до 50°C. Чашки закрывают и тщательно смешивают посевной материал с питательной средой легкими вращательными движениями по поверхности стола (глубинный посев) оставляют до застывания МПА, переворачивают вверх дном и помещают в термостат при 28-30°C.

Клетки микроорганизмов в питательной среде начинают активно размножаться и образуют колонии, видимые невооруженным глазом. Колонии подсчитывают на 5 сутки.

3. Произвести подсчет количества выросших микроорганизмов по истечении срока инкубации.

Количество микроорганизмов в 1 г или 1 мл исследуемого образца определяют, подсчитав колонии, выросшие на чашки Петри, и, умножив их на степень разведения. Лучшее разведение то, при высеve из которого на плотной питательной среде вырастает от 50 до 100 колоний.

Подсчет осуществляется без снятия крышки с чашки Петри, для удобства подсчитанную колонию отмечают точкой на наружной стороне дна чашки, пользуясь тушью или восковым карандашом.

При густом посеве (большое количество колоний) дно чашки делят на равные по площади секторы. Посчитывают количество колоний в нескольких секторах, определяют среднее число колоний на один сектор и умножают на количество секторов и получают число колоний, выросших на чашке. Среднее арифметическое число высчитывается только из цифр одного порядка.

Например, на дне чашки 8 секторов, количество колоний в одном секторе 20 (среднее число из результатов трех секторов), посев произведен суспензией разведения 1:10000, количество микроорганизмов в 1 г образца будет равно:

$$20 \text{ Ч} \times 8 \text{ Ч} \times 10000 = 1600000 \text{ клеток.}$$

Таблица 1 Численность колоний микроорганизмов, выросших на МПА, и расчет наиболее вероятного количества микроорганизмов в 1 г почвы

Разведение	Повторность опыта	Количество колоний на чашках	ΣX	x	$G_{\bar{X}}$	Наиболее вероятное кол-во микроор- в 1 г исходного субстрата при $P_{0,95}$ (доверительный интервал)

Для подсчетов колоний более точные результаты дают чашки, в которые на плотной питательной среде вырастает от 50 до 200 колоний.

Если число колоний, выросших на питательной среде, оказалось меньше 10, то данные результаты не достоверны и их не используют.

Результаты опыта вносят в таблицу 1 для анализа:

Наиболее вероятное количество микроорганизмов, содержащиеся в 1 г (№ мл) исходного субстрата, при уровне достоверности 95% ($P_{0,95}$) вычисляют по формуле:

$$(\bar{X} \mp 2G_{\bar{X}}) \times K \times \frac{1}{V},$$

где $\bar{X} + 2G_{\bar{X}}$ – среднее число колоний, выросшие при высеve из данного разведения;

$$G_{\bar{X}} = \frac{\sqrt{\Sigma X}}{n} \text{ – среднее квадратическое отклонение;}$$

2 – t – критерий при $P_{0,95}$;

K – разведение из которого проведен высеv,

V – объем суспензии, взятый для посева, мл;

ΣX – общее количество подсчитанных колоний при высеve данного разведения,

n – число повторностей.

Все результаты подсчета колоний и последующих пересчетов записывают в таблицу 2. Сравнивают доверительные интервалы, полученные пересчетом данных посева из разных разведений, и делают вывод о достоверности результатов. В результате визуального анализа (характер роста колоний микроорганизмов) определяют доминирующие микроорганизмы (бактерии, грибы) и данные вносят в таблицу 2.

Таблица 2 Определение количества микроорганизмов в почве

Название анализируемого образца	Количество микроорганизмов в 1 г (мл)	Доминирующая форма (%)

Выросшие колонии микроорганизмов идентифицируют с помощью микроскопии, фотографируют препараты микроорганизмов камерой микроскопа и сохраняют изображения в виде отдельных файлов на персональном компьютере для определения принадлежности микробов к различным таксономическим группам (грибы, бактерии).

Задание

1. Изучить теорию вопроса
2. Выявить и определить количество микроорганизмов в образцах пахотной и целинной почвы.

3.2 Качественный учет микроорганизмов в почве

Цель работы: освоить методику качественного учета микроорганизмов в исследуемых образцах почвы

Материалы и оборудование: чашки Петри с выросшими колониями микроорганизмов из различных разведений почвы, предметные и покровные стекла, бактериологические петли, красители, спиртовка, дезсредства; микроскоп, ПК с выходом в интернет, программное обеспечение (скайп) для связи с производством НВП «БашИнком» (время видеозвонка по согласованию).

Общие сведения. Помимо учета количества микроорганизмов в 1 г почвы, выросших на чашках Петри, определяют качественный состав микрофлоры анализируемых образцов почвы. Для этого используют две различные группы диагностических признаков: морфологические и культуральные. Признаки, наблюдаемые под микроскопом, относятся к признакам морфологического характера: форма бактериальной клетки (палочки, кокки, сарцины), тип роста (единичные клетки, образуют цепочки), способность к спорообразованию (форма спорообразования), подвижность, характер жгутования, окраска по Граму. Характер роста колоний микроорганизмов на поверхности плотной питательной среды или в жидкой

среде оценивают по целому ряду критериев и относят к культуральным признакам.

Ход работы

Морфологические признаки

Для описания морфологических признаков необходимо из доминирующих колоний приготовить фиксированный окрашенный препарат и препарат живых микроорганизмов методом «раздавленная капля» и заполнить таблицу 1.

Таблица 1 Некоторые особенности морфологии клеток микроорганизмов, выросших на МПА

№ колонии	Микроскопическая картина (рисунок)	Форма клеток	Сочетание клеток	Подвижность	Наличие спор
1					
2					

Культуральные признаки. Описывают и зарисовывают преобладающие, а также наиболее интересные колонии. Результаты наблюдений вносят в таблицу 2.

Таблица 2 Культуральные признаки микроорганизмов, выросших на МПА

№ колонии	Форма	Диаметр	Блеск, прозрачность	Цвет	Поверхность	Профиль	Край	Структура	Консистенция	Флуоресценция	Рис. Колонии
1											
2											
3											

Наиболее существенной особенностью роста микроорганизмов на плотной питательной среде является характер колонии. Описание поверхности колонии проводят по следующей схеме:

1. Форма колонии (округлая, неправильной формы, ризоидная и т.д.).
2. Поверхность колоний (гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная).
3. Профиль колонии (плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и т.д.)
4. Блеск и прозрачность (колония блестящая, матовая, тусклая, мучнистая, прозрачная и т. д.
5. Цвет колонии (бесцветная – грязно-белые колонии относят к бесцветным, или пигментированная – белая, желтая, золотистая, оранжевая, сиреневая, красная, черная).

6. Размер (диаметр) колонии измеряется с помощью обычной линейкой или окулярного микрометра при малом увеличении микроскопа и указывают ее величину в мм. Чашки при этом помещают на столик микроскопа крышками вниз. Точечными называют колонии менее 1 мм в диаметре, но видимые невооруженным глазом. Мелкие колонии 1 – 2 мм, средние – 2 – 4 мм и крупные – более 4 мм в диаметре.
7. Край колонии (ровный, волнистый, зубчатый, бахромчатый и т. д.) определяют при малом увеличении микроскопа или с помощью лупы. Чашку помещают на столик микроскопа, как указано выше.
8. Структуру колонии (однородная, мелко – или крупнозернистая, струйчатая т. д.) определяют при малом увеличении микроскопа или с помощью лупы.
9. Консистенцию колонии определяют, прикасаясь к ее поверхности петлей. Колония может легко сниматься с агара, быть плотной, мягкой или врастающей в агар, слизистой (прилипает к петле), тягучей, волокнистой (снимается целиком), хрупкой (легко ломается при прикосновении петлей).

Задание

1. Изучить теорию вопроса
2. Определить культуральные признаки роста колоний и морфологии клеток микроорганизмов: на основании изученных признаков определить принадлежность микроорганизмов к таксонам высокого ранга (царство, семейство, род и др.).
3. Препараты микроорганизмов сфотографировать и сохранить в виде отдельных файлов на персональном компьютере.

Выводы

Контрольные вопросы:

1. С какой целью проводят первичный скрининг образцов почвы?
2. Расскажите о ходе работы при разведении образца почвы. Как подсчитать титр выросших колоний микроорганизмов?
3. Какие признаки микроорганизмов можно отнести к морфологическим признакам?
4. Какие признаки можно отнести к культуральным признакам?
5. Для чего определяют морфологические и культуральные признаки микроорганизмов?

Лабораторная работа 4

Изучение возбудителей маслянокислого брожения и продуктов их жизнедеятельности

Цель занятия: изучить возбудителей и продукты маслянокислого брожения углеводов и пектиновых веществ.

Материалы и оборудование. Раствор Люголя (J+KJ); 5%-ный раствор хлорного железа; пробирки, пипетки, предметные и покровные стекла; картофель, мел, льняная солома, ножницы, водяная баня; микроскоп, ПК с выходом в интернет, программное обеспечение (скайп) для связи с производством НВП «БашИнком» (время видеозвонка по согласованию).

1.2 Изучение маслянокислого брожения углеводов

Общие сведения. Превращение углеводов с образованием масляной кислоты производится облигатными анаэробными спорообразующими бактериями.

Типичным представителем маслянокислых бактерий, осуществляющих маслянокислое брожение, является (*Clostridium butyricum*) – крупная палочка (1-2Ч10 мкм). Молодые клетки этих бактерий имеют палочковидную форму, далее в клетках отлагается гранулеза (полисахарид), они утолщаются, сохраняя палочковидную форму, а затем становятся веретеновидными (кlostридиальными). Гранулеза постепенно исчезает, в одном из концов клеток формируются споры. Клетки спорообразующих анаэробов грам-положительны, подвижны (характеризуются перитрихальным расположением жгутиков). Бактерии – облигатные анаэробы, кислород токсичен для их вегетативных клеток, однако споры могут переносить аэробные условия. Клетки кlostридий не содержат цитохромов, они лишены каталазы, но имеют большое количество флавиновых ферментов (ФАД, ФМД), которые способны переносить водород от субстрата на свободный кислород с образованием перекиси водорода.

ферменты

Субстрат + O₂ флавиновые = окисленный субстрат + H₂O₂.

В отсутствие каталазы перекись водорода аккумулируется в бактериальных клетках в летальных концентрациях.

В природе маслянокислое брожение имеет большое значение как звено в цепи превращений соединений углерода. В то же время в ряде производств народного хозяйства маслянокислые бактерии могут наносить значительный ущерб, вызывая вспучивание сыров, прогоркание молока, порчу консервов, силоса, овощей, картофеля и других продуктов.

Вместе с тем масляная кислота требуется для некоторых промышленных целей и ее добывают на заводах, сбраживая специально подготовленные заторы чистой культурой маслянокислых бактерий. Образовавшуюся кислоту затем отделяют и очищают химическим методом.

Практическая часть. Для изучения маслянокислого брожения опыт ставят на среде с картофелем. Сырой неочищенный картофель нарезают мелкими кубиками, заполняют ими 1/3 высокой пробирки, добавляют немного мела (для нейтрализации масляной кислоты), заливают водопроводной водой на 2/3 и помещают в водяную баню при температуре 80° на 10 минут (для пастеризации). В среду не вносят ни почвы, ни

маслянокислых бактерий, так как на коже картофеля споры их всегда имеются. Через 2-3 дня картофель всплывает наверх, вследствие бурно идущего газообразования. По окончании брожения культуральную жидкость используют для микроскопирования маслянокислых бактерий и качественного определения продуктов брожения.

Обобщение опыта. 1) Микроскопическое изучение маслянокислых бактерий проводят в раздавленной капле. Для этого питательную среду из пробирки с картофелем берут, закрыв указательным пальцем верхний конец пипетки и погрузив ее в средний слой сброженной жидкости. Слегка приподняв палец, набирают в пипетку жидкость, снова зажимают пальцем верхний конец пипетки и, вынув ее из колбы, наносят каплю на предметное стекло. К накопительной культуре добавляют каплю раствором Люголя (J + KJ) и покрывают покровным стеклом, на которое помещают каплю кедрового масла.

В тех местах клетки, где содержится гранулеза, возникает синее окрашивание. Зарисовывают только окрашенные клетки, явно относящиеся к группе маслянокислых бактерий.

2) **Проведение качественной реакции на масляную кислоту.** Получение маслянокислого железа (реакция с $FeCl_3$). Нейтральные растворы маслянокислых солей при нагревании с $FeCl_3$ приобретают коричневое окрашивание вследствие образования маслянокислого железа.

Для проведения этой реакции в пробирку наливают 3-5 мл сброженной жидкости, добавляют 1-2 мл 5%-ного хлорного железа и нагревают на пламени. Раствор маслянокислого железа в отраженном свете приобретает буровато-коричневое окрашивание, а в проходящем свете – кроваво-красное.

1.2 Изучение брожения пектиновых веществ

Общие сведения. Пектиновые вещества содержатся в значительных количествах во всех растительных тканях и служат главной составной частью межклеточного вещества, цементирующего растительные клетки и ткани.

Пектиновые вещества являются сложными полисахаридами, состоящими из Д-галактуроновой кислоты, соединенных одна с другой в длинную цепь. Они разрушаются микроорганизмами, содержащими ферменты - пектиназу и протопектиназу.

Процесс брожения пектиновых веществ состоит из двух последовательно идущих стадий. В первой стадии осуществляется гидролиз пектиновых веществ, во второй – происходит дальнейшее сбраживание отдельных продуктов гидролиза (галактозы и арабинозы) до масляной и уксусной кислот, CO_2 и H_2 .

Пектиновое брожение наблюдается при мочке лубоволокнистых растений – льна, конопли, кенафа, джута, канатика и других. Целлюлозные волокна этих растений, имеющие промышленное значение, склеены с окружающими их тканями пектином. Этот процесс осуществляют пектиноразлагающие ферменты анаэробных бактерий.

Практическая часть. Для изучения брожения пектиновых веществ ставят следующий опыт. Снопик льняной соломы длиной 6-7 см перевязывают в двух местах ниткой и вносят в пробирки (лучше большего размера, чем в стандартные). Пробирки наполняют на 2/3 водопроводной водой, зажимают пинцетом и кипятят на горелке 2-3 мин. для удаления экстрактивных (легкосбраживаемых) веществ, которые могут служить источником углерода для других маслянокислых бактерий. Вода приобретает желтовато-зеленый цвет. Ее сливают. Вновь наполнив пробирку водопроводной водой, ее вторично кипятят несколько минут и снова сливают. Это повторяют 5-6 раз. После последнего кипячения жидкость не сливают. Охлаждают ее под краном и вводят свежий стебель, не подвергавшийся нагреванию с целью внесения возбудителя брожения.

Пробирку со снопиком ставят в термостат при температуре 30-35°. Через 2-3 дня в ней начинается брожение, а через 5-8 дней оно заканчивается.

Обобщение опыта. 1) Микроскопирование возбудителей брожения пектиновых веществ. Извлекают снопик из пробирки, берут несколько соломинок из центра снопики, и отжимают из одного их конца немного жидкости на предметное стекло. Добавляют каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют с иммерсионной системой.

На препарате обычно выявляются крупные палочковидные бактерии с плектридиальным типом спорообразования (барабанная палочка) и прерывчатым расположением гранулы, окрашенной в синий цвет. Это *Clostridium pectinovorum*. Нередко на препарате обнаруживается *Clostridium felsineum* - палочки меньшего размера, сигарообразной формы, со спорой на конце. Гранула может заполнить всю вегетативную часть клетки.

2) Проведение качественной реакции на масляную кислоту. Накопление в культуральной жидкости масляной кислоты (наряду с уксусной кислотой, возникающей при гидролизе пектина) можно обнаружить с помощью качественной реакции (см. Изучение маслянокислого брожения углеводов).

Задания:

- 1) Изучить теорию вопроса.
- 2) Провести микроскопирование возбудителей маслянокислого брожения углеводов и пектиновых веществ.
- 3) Зарисовать клетки маслянокислых бактерий.
- 4) Сделать качественную реакцию на масляную кислоту.

Выводы

Вопросы для самоконтроля

- 1) Назовите возбудителей маслянокислого брожения?
- 2) Какие продукты образуются при гидролизе пектиновых веществ?
- 3) Где применяется пектиновое брожение в практике?
- 4) Значение маслянокислого брожения в природе.

Лабораторная работа 5

Изучение симбиотической азотфиксации

Цель занятия: ознакомиться с клубеньками и изучить клубеньковые бактерии различных бобовых растений.

Материалы и оборудование. Зафиксированные корни разных бобовых растений с клубеньками, ботаническая бритва, предметные и покровные стекла, красители, микроскоп, ПК с выходом в интернет, программное обеспечение (скайп) для связи с производством НВП «БашИнком» (время видеозвонка по согласованию).

Общие сведения. Клубеньковые бактерии (род *Rhizobium*) относятся к симбиотическим азотфиксаторам. Они живут в клубеньках на корнях бобовых. В симбиотической системе фиксация азота происходит в клубеньках.

В настоящее время установлено, что клубеньковые бактерии фиксируют молекулярный азот не только в условиях симбиоза с бобовыми растениями, но и в чистой культуре, на определенных питательных средах.

Клубеньковые бактерии представляют собой неспорообразующие, грамотрицательные, аэробные, подвижные палочки, которые проходят сложный цикл развития. При старении они теряют подвижность и переходят в состояние так называемых опоясанных палочек. Такое название они получили потому, что при обработке анилиновыми красителями в их клетках хорошо окрашенные участки протоплазмы чередуется с плохо окрашенными. Это зависит от того, что с возрастом бактериальная клетка наполняется жировыми включениями, не воспринимающими окраску. Молодые клетки красятся равномерно. В культурах клубеньковых бактерий образуется утолщенные, разветвленные Т-образные и У-образные клетки значительно крупнее обычных. Их называют бактероидами. В качестве источника азота могут использовать различные вещества: соли аммония и азотной кислоты, аминокислоты и т. д.

Клубеньковые бактерии могут ассимилировать разнообразные углеводы, в том числе и некоторые полисахариды. Им доступны также многие органические кислоты и многоатомные спирты. Оптимальное значение pH для большинства культур *Rhizobium* находится в пределах 6,6-7,5, а при 4,5-5,0 и 8,0 их рост приостанавливается. Оптимальная температура развития – около 25°.

Клубеньковые бактерии отличаются большой специфичностью. Только отдельные виды *Rhizobium* способны заражать и образовывать клубеньки лишь у определенной группы бобовых растений.

Одним из свойств клубеньковых бактерий является их активность, т.е. способность в симбиозе с бобовыми растениями ассимилировать молекулярный азот. В почве обнаруживаются штаммы клубеньковых бактерий активные и неактивные. При обитании долгое время в почве (без

растения-хозяина) клубеньковые бактерии теряют активность. 70% почв содержит *Rhizobium* с пониженной активностью. Заражение бобовых растений эффективным штаммом клубеньковых бактерий способствует активной фиксации азота. Неэффективный, неактивный штамм вызывает образование клубеньков, но фиксации азота в них не происходит.

Большое значение имеет вирулентность клубеньковых бактерий – способность их проникать в ткань корня, размножаться там и вызывать образование клубеньков. Энергичное усвоение азота может быть в том случае, если растение инфицируется вирулентной и активной культурой *Rhizobium*.

Заражение корневой системы растений происходит только через молодые корневые волоски. Бактерии привлекаются корневыми выделениями (хемотаксис), прикрепляются к корневым волоскам и в дальнейшем проникают в них, образуя инфекционную нить. В ответ на проникновение бактерий клетки корня начинают делиться.

Как только в них проникают бактерии, деление прекращается, растительные клетки увеличиваются в размере и образуют бактериоидную ткань. Бактерии в клубеньках быстро размножаются. Бактериальные клетки при этом увеличиваются в размере и меняют форму. Образуются бактериоиды. Клубеньки, содержащие активные клетки клубеньковых бактерий, имеют красноватую окраску, они содержат пигмент леглобин, родственный гемоглобину. Фиксация молекулярного азота происходит только в тех клубеньках, в которых присутствует леггемоглобин.

Между растениями и бактериями создаются симбиотические взаимоотношения. Контакт устанавливается через сосудистую систему. От растения к клубенькам движутся сахара и минеральные соли, а от бактерий к растению – азотистые вещества. Растение обеспечивает бактерии питательными веществами и создает оптимальные условия для их существования.

В результате связывания молекулярного азота клубеньковыми бактериями в симбиозе с бобовыми растениями почва обогащается азотом в количестве от 100 до 200 кг/га ежегодно.

Следует отметить, что в растении преобладает та раса бактерий, которая проникает в клубенек первой.

В 1912 г. был разработан земледобрильный препарат нитрагин, который готовится с использованием чистой культуры клубеньковых бактерий, выращенной на стерильной почве или торфе. Бактеризованные перед посевом семена вносятся в почву. Нитрагин целесообразно применять особенно там, где давно не культивировались бобовые. Но если раса клубеньковых бактерий нитрагина достаточно активная, он принесет пользу и там, где недавно выращивались культуры бобовых. Активные и вирулентные клубеньковые бактерии, попадая в почву, будут конкурировать с неактивными расами, находящимися в ней, скорее будут заражать растения и энергичнее фиксировать азот. Нитрагин дает прибавку урожая до 20%.

Практическая часть. Разрезают клубенек пополам и отжимают каплю жидкости на предметное стекло (можно раздавить клубенек между двумя стеклами). Разбавив ее каплей дистиллированной воды, готовят фиксированный препарат, окрашенный фуксином.

Если клубеньки очень мелкие, можно отдельные из них поместить на предметное стекло, добавить каплю воды, другим предметным стеклом раздавить и размазать по стеклу, а затем препарат фиксируют, красят и просматривают с помощью иммерсионной системы объектива.

В препарате можно обнаружить мелкие неспоровые палочки, а также крупные ветвистые формы, хорошо красящиеся – бактериоиды.

Задание:

- 1) Изучить теорию вопроса.
- 2) Рассмотреть в микроскоп клубеньковые бактерии, приготовленные из клубеньков бобовых растений.
- 3) Зарисовать клетки клубеньковых бактерий.
- 4) Познакомиться с препаратами клубеньковых бактерий

Выводы

Вопросы для самоконтроля

1. Дайте морфологическую и физиологическую характеристику клубеньковых бактерий.
2. Фиксируют ли азот клубеньковые бактерии в чистых культурах?
3. Назовите и охарактеризуйте симбиотические признаки клубеньковых бактерий.
4. Что такое нитрагин (ризоторфин)?
5. Как приготовить препарат клубеньковых бактерий?

Лабораторная работа 6

Изучение несимбиотической азотфиксации

Цель опыта – изучить азотфиксирующий микроорганизм *Clostridium pasteurianum* и продукты его жизнедеятельности.

Материалы и оборудование. Безазотистая питательная среда Виноградского, мерные цилиндры на 100 мл, CaCO_3 , йод в йодистом калии (J:KJ = 1:2), колбы Эрленмейера емкостью 100-150 мл, пробирки, 10%-ное хлорное железо (FeCl_3), почва, предметные и покровные стекла, пипетки, алюминиевая чайная ложка или шпатель; микроскоп, ПК с выходом в интернет, программное обеспечение (скайп) для связи с производством НВП «БашИнком» (время видеозвонка по согласованию).

Общие сведения. Ассимиляция молекулярного азота атмосферы микроорганизмами называется азотфиксацией. Азотфиксирующие бактерии переводят молекулярный азот в органические вещества и включают его в белки своих клеток.

Бактерии, усваивающие азот атмосферы, можно разделить на симбиотические, живущие в симбиозе с растением, и свободноживущие в почве.

В 1983 г. С.Н. Виноградским была выделена первая свободноживущая азотфиксирующая бактерия – *Clostridium pasteurianum*. Эта анаэробная спорообразующая палочка с перитрихияльными жгутиками, вызывающая маслянокислое брожение. Маслянокислое брожение служит для этих микроорганизмов энергетическим процессом, необходимым для жизнедеятельности и фиксации молекулярного азота.

Clostridium pasteurianum неприхотлив, устойчив к кислой реакции среды (встречается и в кислых почвах pH 4,5-5,5), нетребователен к энергетическому материалу. Может использовать широкий набор углеродсодержащих веществ – монодисахариды, некоторые полисахариды (декстрин и крахмал) и органические кислоты, в качестве источника азота может усваивать молекулярный азот.

Clostridium pasteurianum фиксирует 3-4 мг азота, а в определенных условиях 10-12 мг азота на 1г использованного сахара, и поскольку этот микроорганизм широко распространен в природе, он имеет значение в обогащении почв связанным азотом.

Практическая часть. Для выявления анаэробных азотфиксаторов в почве можно использовать безазотистую среду С.Н. Винаградского:

Глюкоза – 20,0 г; K_2HPO_4 – 1,0 г; $MgSO_4$ – 0,5 г; NaCl – 0,5 г;

Дистиллированная вода – 1000 мл.

В колбу Эрленмейера емкостью 100-150 мл наливают на 2/3 объема питательной среды и добавляют четверть чайной ложки мела (для нейтрализации, образующейся при брожении масляной кислоты). Среду заражают почвой (1/3 чайной ложки); колбу закрывают ватной пробкой, прикрепляют этикетку с надписью: № группы, факультет и фамилия – и ставят в термостат при 28-30°.

Результаты опыта. Через несколько дней поверхность жидкости покрывается пленкой аэробных бактерий, а на дне колбы начинается маслянокислое брожение, сопровождающееся выделением газов и масляной кислоты.

Микроскопическое исследование *Clostridium pasteurianum* обычно находится в осадке мела и почвы. Для обнаруживания его содержимое колбы перемешивают, и дают осесть грубым частицам. Затем из середины субстрата пипеткой берут немного жидкости и наносят каплю на предметное стекло. К ней добавляют каплю йода в йодистом калии (J:KJ=1:2), накрывают покровным стеклом и микроскопируют с иммерсионной системой объектива. Клетки *Clostridium pasteurianum* содержит гранулезу (полисахарид, близкий к крахмалу), которая от раствора йода в йодистом калии приобретает синий цвет. Среди них преобладают веретенообразные формы с овальными спорами.

Качественная реакция на масляную кислоту. Из продуктов

жизнедеятельности, кроме газов, можно обнаружить масляную кислоту (реакция с хлорным железом). К 5 мл субстрата, внесенному в пробирку, добавляют 2 мл хлорного железа и нагревают до кипения. Образующийся раствор маслянокислого железа в проходящем свете имеет кроваво-красный или вишнево-красный цвет.

Задание:

- 1) Изучить теорию вопроса.
- 2) Провести микроскопирование свободноживущего азотфиксатора *Clostridium pasteurianum*.
- 3) Зарисовать клетки микроорганизма *Clostridium pasteurianum*.
- 4) Сделать качественную реакцию на масляную кислоту.

Выводы

Вопросы для самоконтроля

1. Назвать свободноживущие в почве азотофиксирующие бактерии.
2. Дать морфологическую и физиологическую характеристику анаэробных азотфиксаторов
3. Как приготовить препарат *Clostridium pasteurianum* в раздавленной капле?
4. Какие продукты жизнедеятельности образуют *Clostridium pasteurianum*?
5. Как провести качественную реакцию на масляную кислоту?

Лабораторная работа 7

Определение общей биологической активности почвы

Цель занятия: ознакомиться с методикой определения «дыхания почвы».

Задания:

- 1) Изучить теорию вопроса.
- 2) Определить количество выделившейся углекислоты (CO_2) из почвы.

Материалы и оборудование: почва, стеклянный сосуд, фарфоровые тигельки, раствор $\text{Ba}(\text{OH})_2$ или NaOH , фенолфталеин, термостат, 50% р-р BaCl_2 , 0,1н раствор HCl , штатив, сито, технический вазелин, весы.

Теоретическая часть. Почвенное дыхание является результатом деятельности микроорганизмов, корней растений и химических процессов. Но все же основная роль в продуцировании почвой углекислого газа принадлежит микроорганизмам. Выделение углекислоты - одна из важнейших функций почвы. Происходящая в ней минерализация органических веществ, обеспечивает потребность растений в углекислом газе. Энергия дыхания может дать представление об интенсивности биологического обмена прежде всего потому, что обмен веществ у всех

гетеротрофов сопровождается выделением CO_2 . К тому же углекислый газ только в очень небольших количествах связывается почвой.

Дыхание почвы является одним из доминирующих показателей биологической активности почвы, поскольку отражает деятельность основных групп почвенных микроорганизмов.

Чем выше уровень плодородия почвы и благоприятнее режим, тем выше размеры продуцирования CO_2

Практическая часть. Для анализа в фарфоровые тигельки емкостью 20 г берут с вариантов опыта навески почвы, просеянной через сито с 2 мм отверстиями по 10 г в трех или более повторениях. В стеклянный сосуд наливают 25 мл 0,1 н. раствора щелочи $\text{Ba}(\text{OH})_2$ или NaOH (рисунок). Тигельки с почвой для учета выделившейся углекислоты спускают на дно стеклянного сосуда с притертой крышкой и плотно закрывают. Для герметичности крышку сосуда смазывают техническим вазелином. В собранном виде сосуд выдерживают несколько часов в термостате при температуре 27—28°C.

После этого сосуд извлекают из термостата, добавляют в нее 1 мл 20%-ного раствора хлористого бария, 2—3 капли фенолфталеина и титруют 0,1 н. раствором соляной кислоты до исчезновения розовой окраски.

Одновременно с опытным образцом проводят холостое (без почвы) определение. Затем почву в стаканчике высушивают до постоянной массы и взвешивают.

Количество выделившегося углекислого газа (в мг на 1 кг сухой почвы) определяют по формуле:

$$B_a = \frac{(a - b) \cdot k \cdot 1000}{V},$$

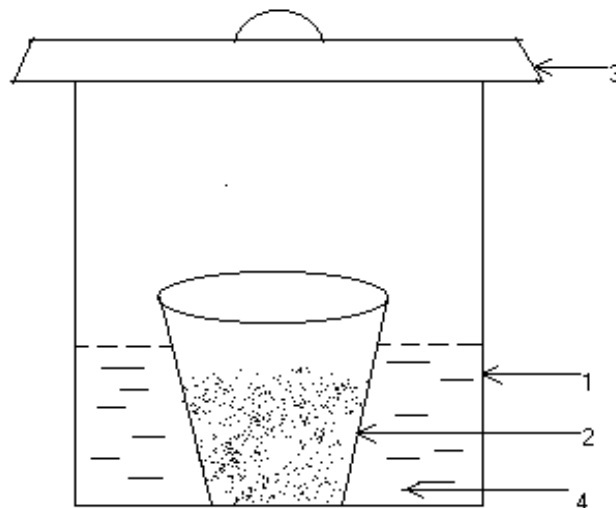


Рисунок. Прибор для определения общей биологической активности почвы: 1 – стеклянный сосуд, 2 – тигель с почвой, 3 – крышка сосуда, 4 – раствор $\text{Ba}(\text{OH})_2$ или NaOH

где B_a - искомая величина; a - количество 0,1 н. раствора HCl , пошедшей на

титрование щелочи при холостом (контрольном) определении, мл; b — то же, в опыте, мл; k — коэффициент перевода мл 0.1 н. раствора щелочи в мг CO_2 , равный 2,2; V — масса сухой почвы в стакане, г; 1000 — коэффициент для пересчета на 1 кг почвы.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое почвенное дыхание?
2. Содержание O_2 и CO_2 в почве.
3. Какие группы микроорганизмов участвуют в минерализации органических веществ
4. Методика определения интенсивности почвенного дыхания.

Лабораторная работа 8

Эпифитная микрофлора

Цель занятия: Ознакомиться с эпифитной микрофлорой семян зерновых культур.

Задания:

- 1) Изучить теорию вопроса.
- 2) Рассмотреть в микроскоп препараты, приготовленные из микроорганизмов, обитающих на поверхности зерна.

Материалы и оборудование: микроскопы, семена зерновых культур, пробирки, колбы, чашки Петри, бактериологические иглы, петли, шпатели, предметные и покровные стекла, красители; микроскоп, ПК с выходом в интернет, программное обеспечение (скайп) для связи с производством НВП «БашИнком» (время видеозвонка по согласованию).

Общие сведения. Эпифитными следует считать микроорганизмы, способные жить на поверхности здоровых, живых растений - на их корнях и надземных органах. К этой особой экологической группе микроорганизмов относятся, по последним данным, более 70 различных видов, принадлежащих к различным систематическим группам.

Они способны переходить с семян на корни и надземные органы растений. Если на стерильные семена нанести, например, *Bacillus mycoides* или азотобактер, то листья и корни развивающихся из этих семян растений остаются стерильными.

Эпифиты выносят более высокие концентрации фитонцидов, чем другие микроорганизмы. Это свойство их обычно используют для учета количества и видового состава эпифитных микроорганизмов в почве посредством высева на питательные среды с фитонцидами. Эпифитные микроорганизмы выдерживают периодические колебания влажности и силы света, которые имеют место на поверхности растений.

Микроорганизмы, обладающие этими тремя свойствами, могут жить, питаться и размножаться на растениях, пользуясь продуктами растительного экзосмоса.

Среди эпифитных микроорганизмов есть продуценты физиологически активных веществ - антибиотиков, стимуляторов роста растений, витаминов, аминокислот, гербицидов.

Эпифитные микроорганизмы не являются специфическими для определенных видов растений. Любой вид эпифитов может жить на любом виде растений и возможно произвольное выращивание растений с определенными видами эпифитных микроорганизмов. Эпифиты могут быть использованы и как продуценты физиологически активных веществ для повышения урожая растений и защиты их от болезней. Эпифитные микроорганизмы являются причиной такого явления как термогенез при неправильном хранении зерна и сена.

Практическая часть. Для ознакомления с эпифитной микрофлорой зерна, небольшую навеску замачивают в таком же объеме воды и выдерживают сутки при температуре 25 °С. Затем делают мазок, фиксируют, окрашивают простым методом и микроскопируют.

Вопросы для самоконтроля:

1. Что называют эпифитной микрофлорой?
2. Чем отличаются эпифитные микроорганизмы от других?
3. Что такое термогенез?
4. Положительные аспекты термогенеза

Лабораторная работа 9

Знакомство с микрофлорой силоса и определение его кислотности

Цель работы: изучить возбудителей и продукты молочнокислого брожения при силосовании кормов.

Материалы и оборудование: весы, колбы емкостью 100 мл, пипетки на 10 мл и 2 мл, фарфоровые чашки, пинцеты, бумажные фильтры, краситель метиленовый синий, покровные и предметные стекла, дистиллированная вода, ионметр, микроскоп, ПК с выходом в интернет, программное обеспечение (скайп) для связи с производством НВП «БашИнком» (время видеозвонка по согласованию).

Общие сведения. Молочнокислые бактерии, обитающие на растениях, играют большую роль при силосовании кормов. В основе силосования лежит молочнокислое брожение. Молочнокислые бактерии сбраживают сахар силосующихся растений в молочную и частично уксусную кислоты, которые

подавляют развитие гнилостных, маслянокислых и других нежелательных бактерий, портящих корм. Молочнокислые бактерии снижают рН корма до 4,2-4,0. Если кислотность силоса по тем или иным причинам уменьшается и рН становится выше 4,5-4,7, то создаются условия, благоприятствующие жизнедеятельности вредных для сохранности корма микроорганизмов. В нем накапливаются продукты, обладающие неприятными вкусовыми свойствами: дурно пахнущая масляная кислота, амины, аммиак и др.

Для того чтобы обеспечить нормальное развитие молочнокислых бактерий в процессе силосования, необходимо достаточное содержание сахара в силосующихся растениях и изоляция корма от доступа воздуха, т.е. создание анаэробных условий.

Растения хорошо силосуются, если в них сахара много, а сахарный минимум небольшой. Если фактическое содержание сахара в растениях примерно равняется сахарному минимуму, то они силосуются плохо, малейшее отклонение в процессе силосования приведет к порче силоса. Если фактическое содержание сахара меньше сахарного минимума, то растения не силосуются.

При силосовании сохраняются цветки и листья, содержащие наибольшее количество питательных веществ. Потери сухих веществ при правильном силосовании не превышает 10-15%. Хороший силос характеризуется следующими показателями: цвет – зеленый (лишь несколько изменяется), запах – ароматично-фруктовый, слабокислый, хлебный, рН = 4,0-4,2, общая кислотность около 2,2-2,5% (в переводе на молочную кислоту), влажность – 70%.

Микрофлора силоса представлена молочнокислыми палочками и молочнокислыми стрептококками. Иногда встречаются клетки почкующихся дрожжей.

В хорошем силосе нередко в небольших количествах встречаются дрожжи. Последние образуют эфиры, придающие силосу приятный запах и обогащающие корм белком и витаминами. Однако в больших количествах дрожжи ухудшают качество силоса, снижая его кислотность, так как являются конкурентами с молочнокислыми бактериями в потреблении сахара.

Ход работы.

1) Приготовить и рассмотреть в микроскоп возбудителей молочнокислого брожения силоса.

Для анализа из торцевой части траншеи, ям или наземных буртов берут среднюю пробу силоса и сенажа. С этой целью, сняв стерильным ножом верхний слой силоса и сенажа, вырезают кубики по средней линии бурта с интервалом в 1 м. Их складывают в стерильную банку емкостью 1-2 л с притертой пробкой так, чтобы силос был уложен плотно и доверху.

Пробы перемешивают в стерильном кристаллизаторе, измельчают стерильными ножницами и берут навески для анализов. Исследование рекомендуется проводить не позднее суток после взятия пробы.

Для знакомства с микрофлорой силоса из него готовят препарат следующим образом:

1. Взять пинцетом силос и плотно его прижать к предметному стеклу без добавления воды, стараясь, чтобы на стекле остался отпечаток.
2. Препарат высушить на воздухе, зафиксировать в пламени и окрасить метиленовым синим (2-3 мин.).
3. Смыть краситель водопроводной водой, высушить, микроскопировать с иммерсионной системой.

На препарате выявляются тонкие неспороносные палочки и молочнокислые стрептококки. Обычно преобладают *Lactobacillus plantarum* – гомоферментативные мезофильные короткие палочки, часто располагающиеся параллельными рядами. Иногда встречаются клетки почкующихся дрожжей. В силосе низкого качества обнаруживаются бациллы и плесневые грибы.

2) Определить общую кислотность силоса

Наиболее ярким показателем микробиологических процессов, протекающих в силосе, является его pH. Определение производится ионометром.

1. Навеску силоса (20 г) предварительно растереть в фарфоровой ступке, перенести в колбочку и затем залить дистиллированной водой (80 мл).
2. Силос с водой энергично взболтать в течение 5 минут, отфильтровать через бумажный фильтр.
3. Прозрачный фильтрат сразу использовать для определения pH.

В доброкачественном силосе pH должно быть не выше 4.0

Задания:

- 1) Изучить теорию вопроса.
- 2) Приготовить и рассмотреть в микроскоп возбудителей молочнокислого брожения силоса.
- 3) Определить общую кислотность силоса.

Выводы

Контрольные вопросы

1. Какие процессы используют при подготовке кормов к хранению?
2. Жизнедеятельность каких бактерий обуславливает силосование зеленого корма?
3. Чем различается деятельность гомоферментативных и гетероферментативных форм бактерий?
4. Какие условия определяют характер продуктов, образуемых молочнокислыми бактериями?

Библиографический список

1. Емцев, В. Т. **Микробиология** [Текст]: учебник для бакалавров: для студентов вузов, обучающихся по направлениям и специальностям агрономического образования : рек. УМО по образованию / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. - 8-е изд., испр. и доп. - М.: Юрайт, 2012. - 445 с.
2. Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии [Текст] : учеб. пособие для студ.вузов по агр.спец. / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. - 4-е изд., перераб. и доп. - М. : Колос, 1993. - 175 с.
3. Сергеев, В. С. Микробиология [Электронный ресурс] : учебное пособие / В. С. Сергеев ; М-во сел. Хоз-ва РФ, Башкирский ГАУ. – Уфа : Башкирский ГАУ, 2014. – 99 с. – режим доступа: <http://biblio.bsau.ru/metodic/27242.pdf>

