

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Н.М. НУРМУХАМЕТОВ

МИКРОБИОЛОГИЯ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Уфа
Башкирский ГАУ
2011

УДК 576
ББК 40.5
Н 90

Рекомендовано к изданию методической комиссией
агрономического факультета (протокол № 8 от 5 апреля 2010 г.)

Автор:

Н.М. Нурмухаметов

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор ***А.М. Мифтахова***,
доктор биологических наук, профессор ***И.К. Хабиров***

Ответственный за выпуск:

заведующий кафедрой ботаники, физиологии селекции растений,
профессор ***М.М. Хайбуллин***

Программа составлена на основе типовой программы (Микробиология. Изд. Москва, 1991) с учетом региональных особенностей. Она согласована с программами курса «Физиология растений (раздел «Минеральное питание растений»», Почвоведение (раздел «Почвообразовательный процесс»), Земледелие (раздел «Система обработки почвы и севообороты»). Примерное распределение времени по видам занятий: лекции – 22 часа, Лабораторные занятия – 24 часа, самостоятельная работа – 40 часов.

Программа обсуждена и одобрена на заседании кафедры ботаники, физиологии и селекции растений (протокол № 1 от 5 сентября 2000 года.) и методической комиссией (протокол № 1 от 26 сентября 2000 года).

Программа разработана комиссией в составе доцентов Н.М. Нурмухаметова, М.М. Хайбуллина, З.Р. Акъюловой, А.В. Денисовой.

УДК 576
ББК 40.5

© Нурмухаметов Н.М., 2011
© Башкирский государственный
аграрный университет, 2011

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
1 Правила работы и поведения в лаборатории.....	6
2 Работа с микроскопом	7
3 Методы приготовления препаратов микроорганизмов.....	10
4 Исследование морфологии микроорганизмов	13
5 Методические указания к изучению микрофлоры почвы, воды и воздуха.....	25
6 Превращение микроорганизмами соединений угле- рода.....	36
7 Превращение микроорганизмами соединений азота.....	47
8 Изучение превращения микроорганизмами мине- ральных соединений азота	50
9 Изучение биологической фиксации азота атмосферы	57
10 Методические указания к самостоятельной работе студентов	65
11 Методические указания к изучению дисциплины, во- просы и тесты самоконтроля знаний студентов	74
12 Программа по микробиологии для высших сельско- хозяйственных учебных заведений	113
Словарь наиболее часто употребляемых терминов в микро- биологии	130
Библиографический список	135

ВВЕДЕНИЕ

Микробиология – одна из фундаментальных биологических наук, знания которой играет большую роль в формировании мировоззрения специалиста, и позволяет глубоко анализировать биологические процессы, происходящие в природе, организме. Микробиологи научились использовать широкие возможности клеток микроорганизмов и заставили их работать для получения нужных нам продуктов. Этим занимается микробная биотехнология.

В курсе предусматривается наиболее важных вопросов современной микробиологии, овладение микробиологической техникой, выработка навыков научных исследований и использование полученных знаний в практической работе. Изучение микробиологии немыслимо без усвоения достижений других общебиологических наук. Она базируется на знании физики, неорганической, органической, физколлоидной химии, ботаники. И в тоже время обеспечивает изучение фитопатологии, почвоведения, агрохимии, земледелия, растениеводства.

Микробиология знакомит студента с жизнью мельчайших живых существ, населяющих биосферу земли: вирусов, микоплазм, риккетсий, бактерий, актиномицетов, дрожжей, микроскопических грибов, цианобактерий. Она изучает строение, функции названных микроорганизмов, их распространение, размножение в различных условиях среды и использование в интересах человека.

Мир микроорганизмов сложен и разнообразен. Микробы широко распространены в природе, особенно их много в почве, где они являются основными участниками биогенного круговорота веществ в природе, накапливая необходимые для роста и развития растений питательные вещества, повышают плодородие и структуру почвы. Многие из них являются продуцентами антибиотиков и других биологически активных веществ.

Микробиология является основой современной биотехнологии, т.к. микроорганизмы – наиболее мощные агенты, которые может использовать человек в своих интересах.

Благодаря развитию биотехнологии стало возможным искусственно обогащать почву некоторыми видами полезных микробов, внося с семенами бактериальные удобрения: ризоторфин, ризобин, ризолигнин, приготовляемые из клубеньковых бактерий, азотобактерин, ризофил, получаемые из азотобактера. В перспективе возможно ис-

пользование ассоциативных азотфиксирующих микробов под зерновые культуры и кукурузу.

Одним из важных направлений микробной биотехнологии является создание биопрепаратов для защиты растений. Они обладают рядом достоинств: избирательностью действия, отсутствием фитотоксичности, безопасностью для человека и теплокровных животных. И что еще ценно, эти препараты, состоящие из живых микробов или продуктов их метаболизма, не загрязняют окружающую среду.

Для повышения продуктивности животноводства в настоящее время используются препараты микробного синтеза: микробный белок, незаменимые аминокислоты, витамины, ферменты, антибиотики, заменители цельного молока, закваски в кормопроизводстве и другие препараты.

Одна из причин появления и развития биотехнологии – необходимость охраны окружающей среды. Создание безотходных технологических процессов в животноводстве с применением на определенных участках цикла микробов, регулирование процессов нитрификации, денитрификации внесением ингибиторов. Широкое внедрение микробиологического метода защиты растений, организация производства биомассы микробов для биодеградации токсических соединений в почве, очистка сточных вод предприятий и другие приемы являются направлениями в решении проблемы окружающей среды.

Таким образом, полученные студентом знания по микробиологии помогут агроному в практической деятельности использовать препараты из микроорганизмов и их метаболитов для повышения продуктивности земледелия.

1 ПРАВИЛА РАБОТЫ И ПОВЕДЕНИЯ В ЛАБОРАТОРИИ

Лабораторная работа 1

Работники производственных бактериологических лабораторий и студенты на практических занятиях постоянно должны помнить, что они имеют дело с микроорганизмами, которые далеко не всегда могут быть безвредными для окружающей среды и здоровья человека. При неосторожном обращении с материалом, содержащим болезнетворные микробы, работник может заразиться сам или стать источником распространения инфекции. Поэтому при работе в бактериологической лаборатории или на» практических занятиях по микробиологии необходимо всегда соблюдать следующие правила личной и общественной безопасности:

1. Работа в лаборатории в наглухо застегнутом халате и головном уборе (косынка, шапочка).

2. В помещении лаборатории не принимать пищу и воду, не курить, не допускать излишних разговоров и ненужных переходов.

3. Пользоваться только своим рабочим местом и прикрепленным к нему оборудованием.

4. Соблюдать чистоту и опрятность в работе, работать сидя. После окончания работы тщательно продезинфицировать и вымыть руки с мылом.

5. Использованные пипетки, предметные и покровные стекла, шпатели, ватные тампоны и т.п. помещают в сосуд с дезинфицирующей жидкостью (1%-ный раствор хлорамина, 3%-ный раствор фенола). Пинцеты, бактериологические петли и некоторые другие металлические предметы прожигают в пламени газовой горелки.

6. Все использованные материалы (инфицированные растения, трупы животных, отработанные культуры микробов и т.д.) сжигать или обезвреживать стерилизацией в автоклаве. Эта работа проводится сотрудниками лаборатории.

7. Стол, одежду, обувь и другие предметы, случайно загрязненные исследуемым материалом или культурой микробов (разбилась пробирка, упала капля) подвергают немедленной дезинфекции в присутствии преподавателя.

8. После окончания работы поставить в термостат засеянные чашки и пробирки. Культуры микробов и остатки исследуемого материала сдать преподавателю, а рабочее место привести в порядок и продезинфицировать.

9. Производить влажную уборку и периодическую дезинфекцию всех рабочих помещений и стерилизацию оборудования.

2 РАБОТА С МИКРОСКОПОМ

2.1 Общие правила работы с микроскопом

Место для микроскопа выбирают дальше от прямого солнечного света. Работа на столе с темной поверхностью меньше утомляет глаза. Лучше смотреть в окуляр левым глазом, не закрывая правого. При работе с бинокулярной насадкой сначала регулируют расстояние между окулярами в соответствии с расстоянием между глазами наблюдателя так, чтобы поля зрения обоих окуляров сливались в одно.

Переносят микроскоп, держа одной рукой за штатив, другой – за основание микроскопа. Следует предохранять микроскоп от толчков, соприкосновения с сильнодействующими веществами типа кислот, щелочей. Не рекомендуется вынимать окуляр из трубы, чтобы не загрязнять пылью трубу и объективы. Во время работы желательно защищать микроскоп от дыхания, так как конденсация паров ведет к его порче.

Линзы должны быть всегда чистыми. Микроскоп следует хранить в чехле. Нельзя касаться пальцами оптических поверхностей.

2.2 Работа с иммерсионной системой микроскопа

При работе с иммерсионным объективом ($V = 90\times$; $A = 1,25$) устанавливают зеркало плоской стороной и поднимают конденсор.

Каплю иммерсионной жидкости (кедрового масла) наносят на препарат, не размазывая по стеклу. Погружать в иммерсионную жидкость можно только иммерсионные объективы (не сухие!)

Глядя сбоку на предметное стекло, опускают объектив до поверхности масляной капли. Далее, глядя в окуляр, осторожно опускают объектив при помощи макровинта, следя при этом за появлением изображения. Когда оно появится, для регулирования изображения пользуются микровинтом. Если изображение нерезкое, тусклое или плывет, что-то сделано неправильно: загрязнена фронтальная линза объектива, мешают пузырьки воздуха в масле, случайно закрыта диафрагма, сдвинута лампа или зеркало. Причину некачественного изображения надо устранить.

По окончании работы поднимают тубус, снимают препарат и осторожно протирают фронтальную линзу объектива хлопчатобумажной салфеткой, смоченной очищенным бензином.

Иммерсионную жидкость хранят в специальных двухкамерных масленках. В наружную камеру наливают ксилол или очищенный бензин для очистки объективов от масла, во внутреннюю – кедровое масло. Камеру с маслом герметично закрывают пробкой, в которую вставляют стеклянную палочку для нанесения капли масла на препарат.

2.3 Установка освещения

Удобнее пользоваться искусственным источником света – он более постоянен, чем дневной, лучше освещает объект, что важно при работе с сильными объективами (90×). Наиболее известен метод освещения препарата по Келеру. Рациональное освещение объекта достигается при использовании осветителей типа ОИ-7, ОИ-9 и ОИ-19. Осветитель с низковольтной лампой устанавливают на расстоянии 25-30 см от микроскопа при помощи соединительной планки (крестовины). Полевая диафрагма осветителя открыта; используют объектив 8×, зеркало с плоской поверхностью; конденсор поднят.

Препарат в поле зрения микроскопа фокусируют при открытых диафрагмах осветителя и конденсора. Из осветителя удаляют матовое стекло. Полевую диафрагму осветителя закрывают. На зеркало помещают белый лист бумаги для получения четкого изображения нити лампы осветителя.

Движением зеркала перемещают световой поток в поле зрения микроскопа. Фокусируют препарат. Опускают конденсор до тех пор, пока изображение (проекция) краев полевой диафрагмы осветителя в плоскости препарата не станет четким. Центрируют легкими движениями зеркала изображение отверстия диафрагмы. Наблюдая в микроскоп, постепенно открывают полевую диафрагму осветителя так, чтобы освещенный круг ее заполнил все поле зрения микроскопа; лучше, если он немного выйдет за пределы поля зрения.

Положение осветителя, зеркала, конденсора микроскопа в дальнейшем не менять! Порядок установки света по Келеру рекомендуют также и при темнопольной и фазово-контрастной микроскопии.

2.4 Измерение объектов

Измерять клетки микроорганизмов в микрометрах можно на фиксированных и живых препаратах при помощи шкалы окулярного микрометра (окулярмикрометра) – окулярной линейки. У кокков определяют диаметр клеток, у других форм бактерий – длину и ширину.

Окулярная линейка – круглая стеклянная пластинка, посередине которой нанесена шкала делений (50 или 100 делений) общей длиной 5 мм. Вывинчивают линзу окуляра и окулярную линейку устанавливают шкалой вверх на диафрагму окуляра. Ставят препарат и определяют, скольким делениям линейки соответствует длина и ширина клетки. Измеряют не менее 10-20 клеток.

Чтобы рассчитать истинные размеры клеток, определяют цену деления окулярной линейки при помощи объектного микрометра (объектмикрометра). Последний представляет собой металлическую пластинку в форме предметного стекла с отверстием в центре; в отверстие помещено стекло с линейкой (шкала из 100 делений). Общая длина шкалы объектного микрометра 1 мм, величина одного деления 10 мкм (0,01 мм).

Объектный микрометр помещают вместо препарата на столик микроскопа, фокусируют изображение линейки при малом увеличении, затем перемещают в центр поля и меняют объектив на тот, при котором измеряли клетки. Перемещая столик микроскопа и поворачивая окуляр, устанавливают объектный и окулярный микрометры так, чтобы их шкалы были параллельны и одна перекрывала другую.

Определение цены деления окулярного микрометра проводят по принципу нониуса, т.е. совмещают одну из черт шкалы окулярного микрометра с чертой объектного микрометра и находят следующее совмещение. Допустим, в двух делениях объектного микрометра (20 мкм) умещается пять делений окулярного микрометра, тогда одно деление окулярного микрометра при данном увеличении равно 4 мкм (20:5).

Зная, скольким делениям окулярной линейки соответствует длина и ширина изучаемых клеток, умножают цену деления окулярного микрометра на эти числа. Вычисленные значения цены делений линейки справедливы только для данной системы окуляр – объектив.

3 МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Лабораторная работа 2

3.1 Техника взятия культуры для приготовления препарата

Пробирку с культурой держат в левой руке почти в горизонтальном положении вблизи горелки. Обожженной в пламени бактериологической иглой из пробирки берут небольшое количество микробной массы. Перед взятием культуры правой рукой вынимают ватную пробку из пробирки, зажимая ее между мизинцем и ладонью, а края пробирки обжигают на пламени горелки. Иглу держат в правой руке большим, указательным и средним пальцами.

Если культуру берут из жидкой среды, не следует сильно наклонять пробирку, чтобы не смочить ее края и пробку. Для взятия культуры лучше пользоваться петлей. После взятия культуры края пробирки и пробку обжигают в пламени и закрывают пробирку.

3.2 Исследование живых клеток микроорганизмов методами «раздавленной» и «висячей» капли

В обоих случаях возможно окрашивание объекта «прижизненными» красителями – витальная окраска. Прижизненными красителями могут служить метиленовый синий, нейтральный красный в концентрациях от 0,001 до 0,0001%.

Оба метода применяют для выявления подвижности клеток микроорганизмов, наблюдения за размножением, образованием и прорастанием спор, установления реакции микроорганизмов на химические соединения и физические факторы воздействия, изучения размеров клеток, характера их расположения и определения запасных веществ клетки.

Препараты микроскопируют, слегка затемняя поле зрения; конденсор немного опускают, поступление света регулируют вогнутым зеркалом. Вначале пользуются малым увеличением – объектив 8×, после того как обнаруживают край капли, устанавливают объектив 40× или иммерсионный (90×). Более четкие результаты, можно получить при микроскопии в темном поле или в фазовом контрасте.

Метод «раздавленной» капли. На чистое предметное стекло наносят каплю водопроводной воды. В нее вносят культуру и смеси-

вают с водой. Накрывают каплю покровным стеклом так, чтобы под ним не образовывались пузырьки воздуха. Стеклопалочкой прижимают покровное стекло к предметному и удаляют избыток воды фильтровальной бумагой, поднося ее к краям покровного стекла. При просмотре приготовленного препарата под микроскопом с иммерсионным объективом на покровное стекло наносят каплю кедрового масла.

Метод «висячей» капли. Применяют для длительных наблюдений за клетками микроорганизмов. На стерильное покровное стекло наносят иглой негустую суспензию микроорганизмов, выращенных в жидкой питательной среде или подготовленных для данной цели в физиологическом растворе (0,5%-й раствор NaCl). Покровное стекло переворачивают и помещают на стерильное предметное с лункой посередине так, чтобы капля свободно свисала над лункой. Для герметичности края лунки смазывают вазелином.

3.3 Фиксированные препараты микроорганизмов

В микробиологии часто готовят фиксированные препараты. Их рассматривают под микроскопом окрашенными. Под фиксацией подразумевают такую обработку живого объекта, которая дает возможность быстро прервать течение жизненных процессов в нем, сохранив тонкую структуру. В результате фиксации клетки прочно прикрепляются к стеклу и лучше прокрашиваются. Фиксация необходима в случае работы с патогенными микроорганизмами для безопасности.

Приготовление мазка. На чистое обезжиренное предметное стекло наносят каплю водопроводной воды. Для обезжиривания стекол используют смесь этилового спирта и серного эфира в соотношении 1:1. Эту операцию выполняют вдали от горелок. Прокаленной бактериологической иглой из пробирки с культурой берут небольшое количество микробной массы и вносят в каплю. Каплю тщательно размазывают петлей по стеклу на площади приблизительно 4 см².

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. 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 медленно проводят нижней стороной над пламенем горелки. 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. 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.

Существуют простые и дифференцированные методы окраски. При простой окраске используют какой-либо один краситель, например метиленовый синий, фуксин, генциан фиолетовый в щелочных или карболовых растворах. Прокрашивается вся клетка. При дифференцированной окраске отдельные структуры клетки окрашиваются разными красителями. Таковы методы окраски по Граму, окраска спор.

Для окрашивания микроорганизмов применяют кислые и основные красители. Первые вступают в реакцию с веществами основной, вторые – кислотной природы. Поскольку в белках есть основные (NH_2^+) и кислотные (COOH^-) радикалы, клеточные структуры хорошо окрашиваются и теми и другими красителями.

Из основных красителей наиболее часто в микробиологии применяют: красные – нейтральный красный, сафранин, фуксин, гематоксилин; синие – виктория, метиленовый синий; фиолетовые – генциан фиолетовый, кристаллический фиолетовый, метиленовый фиолетовый; зеленые – янус зеленый, метиленовый зеленый, малахитовый зеленый; коричневые – везувин, хризоидин; черные – индулин. Кислые красители могут быть следующие: красные и розовые – кислый фуксин, эритрозин; черные – нигрозин; желтые – конго, пикриновая кислота, флуоресцин.

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

Некоторые микроорганизмы (спирохеты) и отдельные структуры (внеклеточная слизь), плохо выявляемые при помощи позитивных красителей, становятся хорошо заметными при окрашивании препаратов негативными красителями. Споры без соответствующей обработки не окрашиваются, поэтому при окрашивании клеток бацилл позитивными красителями они окрашиваются как бы негативным способом: имеют вид преломляющих свет включений в вегетативных клетках.

Материалы и оборудование. Культуры микроорганизмов, пробирки, колбы, чашки Петри, бактериологические иглы, петли, шпатели, штативы, предметные и покровные стекла, красители.

4 ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Лабораторная работа 3

4.1 Форма клеток

4.1.1 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. Из почвы выделены также бактерии, имеющие довольно своеобразную форму.

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 *Azctobacter 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);

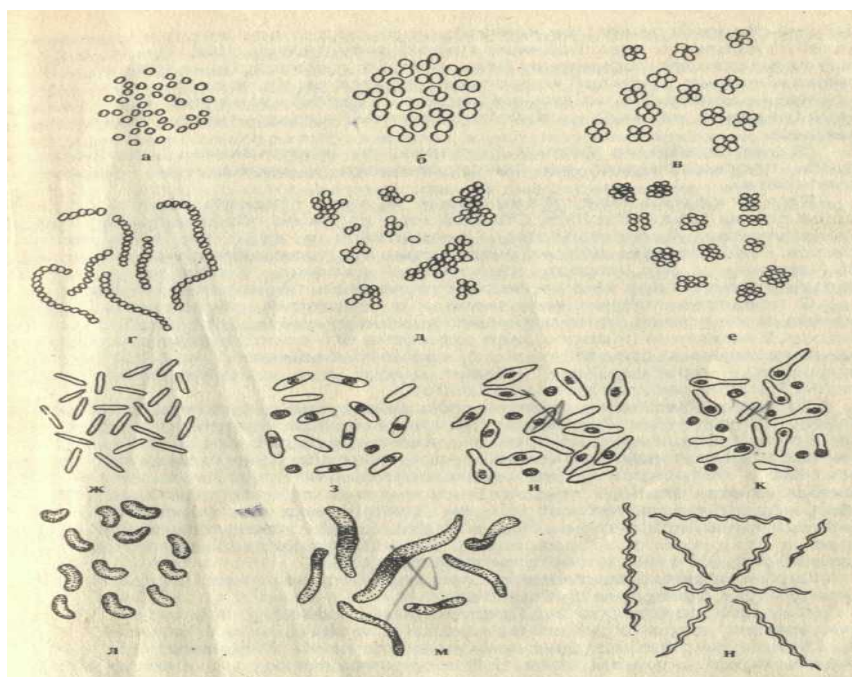


Рисунок 1

Форма бактерий: ♦шаровидная: а – микрококки; б – диплококки; в – тетракокки; г – стрептококки; д – стафилококки; е – сарцины; ♦палочковидная: ж – не образующие спор, з, и, к – споро-образующие (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 сардины; 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 влагиалищах, отчего микроорганизмы приобретают желтовато-бурую (охристую) окраску. На препарате часто обнаруживаются остатки ожелезненных влагиалищ 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 HCl для обесцвечивания влагиалищ и окрашивают в течение суток эритрозинном. Влагиалища 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. *vibratio* – трепещущий, вибрирующий) – слегка изогнутые клетки; изгиб их меньше половины окружности;

- ◆ спириллы (от лат. *spira* – 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 пе-

реходят 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.

4.1.2 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.

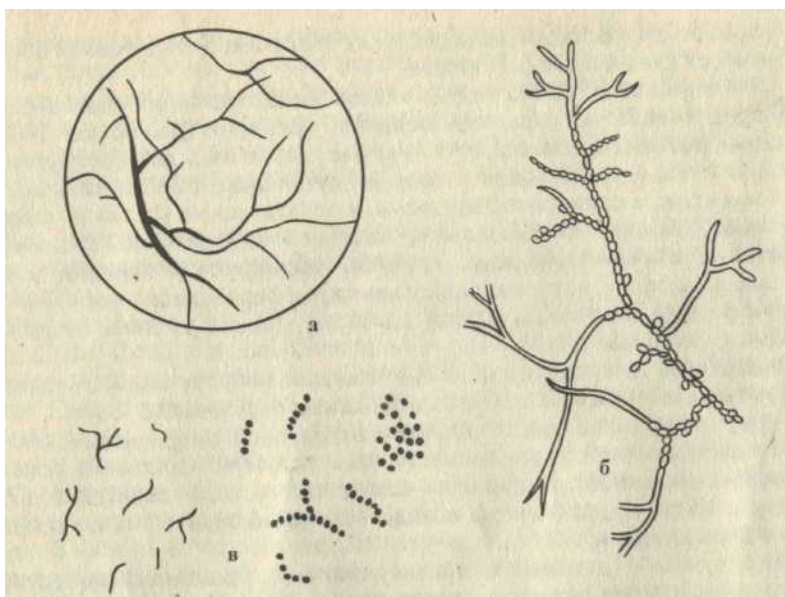


Рисунок 2
Актиномицеты (а), нокардии (б) и микобактерии (в)

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 голу-

бые, 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 спороносцы со спорами. Спороносцы 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.

4.1.3 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).

4.1.4 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.

4.1.5 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 бесполом, 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 бесполом 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.

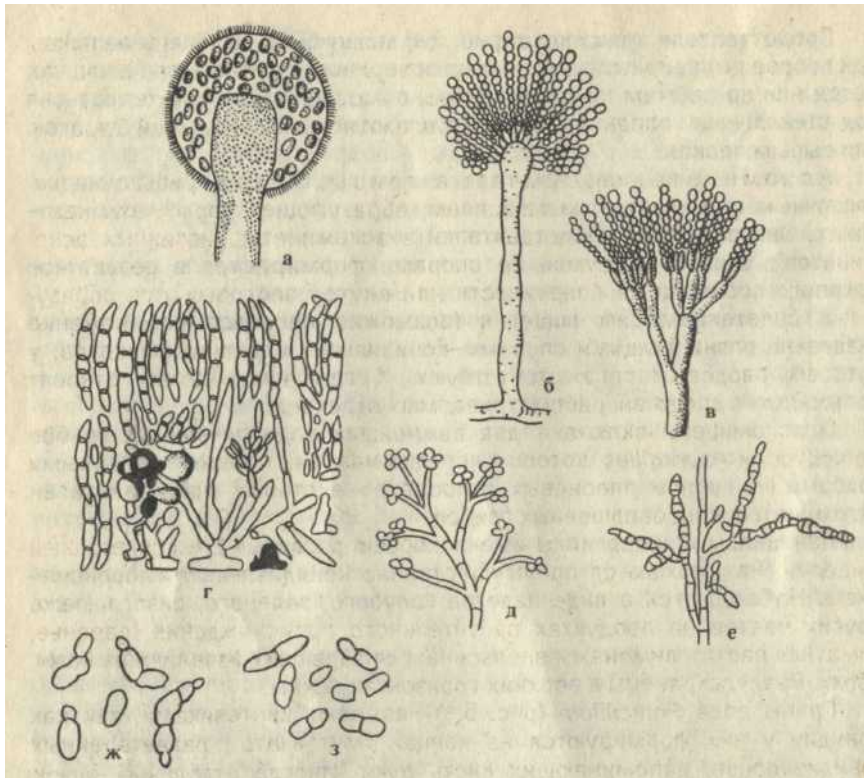


Рисунок 3

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 ($-0,5 \text{ мм}^2$) 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. Стекло палочкой 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 $8\times$ на объектив $40\times$ и детально рассматривают кисточки. Во время просмотра при малом увеличении конденсор несколько опускают, при переводе на объектив $40\times$ 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 получаются 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 вер-

шине 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* (шизосахаро-мицеты).

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 *Endo-mycetes*.

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 разъединяющимися при почковании; другая – удлиненно-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*).

Материалы и оборудование. Коллекцию культур следует пересевать каждые два-три месяца на свежие питательные среды: бактерии и актиномицеты на мясо-пептонный агар, дрожжевые и плесневые грибы на сусло-агар. За два-три дня до занятий культуры пересевают в пробирки (бактерии и актиномицеты) или чашки Петри (грибы из расчета по две пробирки каждой культуры и одну-две чашки Петри на группу студентов из 10-15 человек).

Для занятий необходимы микроскопы и все принадлежности к ним, предметные и покровные стекла, бактериологические петли (иглы), препаровальные иглы, свежий 5%-й раствор фуксина.

Контрольные вопросы

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 грибов?
8. Чем объясняется термоустойчивость бактерий?
9. Расскажите о классификации и номенклатуре микроорганизмов?
10. На основании каких признаков представители царства Prokarya на четыре отдела?
11. Назовите основных представителей грамположительных и грамотрицательных бактерий, микоплазм и архебактерий?

5 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ИЗУЧЕНИЮ МИКРОФЛОРЫ ПОЧВЫ, ВОДЫ И ВОЗДУХА

Лабораторная работа 4

5.1 Теория вопроса

Природной средой, в которой имеются все необходимые условия для развития микроорганизмов, является почва. Она защищает микроорганизмы от губительного действия прямых солнечных лучей и снабжена также в достаточной степени влагой, кислородом, органическими и минеральными веществами, имеет благоприятную реакцию среды.

Вода водоемов также является средой обитания микроорганизмов, количество которых тем выше, чем больше в воде питательных веществ и сильнее она загрязнена органическими остатками. Особенно много бактерий в воде открытых водоемов: прудов, озер, рек, которые легко загрязняются. Воды глубинные, ключевые, артезианских колодцев содержат намного меньше бактерий, т.е. они подвергаются фильтрации, просачиваясь через слои почвы.

Водопроводная вода также содержит микроорганизмы, число которых в зависимости от содержания органических и минеральных веществ может колебаться. Одним из критериев качества воды является количество микробов в единице объема. При наличии в 1 мл ее до 100 микроорганизмов вода считается хорошей, от 100 до 500 – допустимой к употреблению от 500 и выше – непригодной для использования в сыром виде. Присутствие в воде *Bact. coli* (кишечная палочка) свидетельствует о возможности нахождения в воде патогенных бактерий кишечной группы.

Воздух не является средой для обитания микроорганизмов, а служит лишь средой их переноса, т.к. не содержит питательных веществ, отсутствует необходимая влага. Источником микрофлоры воздуха являются почва, растительность, животные и люди. Количество микроорганизмов в воздухе зависит от погоды, времени года и места взятия пробы.

5.2 Количественный и качественный учет микроорганизмов в почве, воде и воздухе

Основные задачи работы:

1) Выявить и определить количество микроорганизмов в образце пахотной почвы, воде и воздухе.

2) Изучить культуральные признаки роста колоний и морфологии клеток микроорганизмов, определить род бактерий, грибов, актиномицетов.

5.3 Учет микрофлоры почвы

Подготовка образца к микробиологическому анализу. Хорошо перемешивают почву, высыпают на сухое стекло, протертое спиртом и обожженное пламенем горелки. Почву тщательно перемешивают шпателем и раскладывают ровным слоем. Пользуясь пинцетом, удаляют корешки и другие посторонние включения. Непосредственно перед работой шпатель и пинцет прокалывают в пламени и слегка остужают на воздухе. Из разных мест распределенной на стекле почвы шпателем отбирают небольшие порции и в стерильной, предварительно тарированной фарфоровой чашке взвешивают на технических весах 1 г среднего образца.

Для разрушения почвенных агрегатов и десорбции клеток микроорганизмов в почвенных частицах пробу подвергают обработке.

Заранее готовят две стерильные колбы емкостью до 250 мл; одну со 100 мл водопроводной водой, другую оставляют пустой. Берут из первой колбы 0,4-0,8 мл воды, увлажняют ею навеску почвы в фарфоровой чашке до пастообразного состояния, и смесь растирают 5 мин. стерильным резиновым пестиком или пальцем в резиновой перчатке. Стерильной водой из первой колбы растертую почвенную массу переносят в пустую колбу, используя для этого весь объем воды. Почву растирают и переносят в колбу около пламени горелки. Колбу с почвенной суспензией встряхивают на качалке в течение 5 мин. После этого суспензии дают отстояться 30 сек., чтобы осели крупные частицы, и тотчас же используют ее для приготовления препарата или разведений. При этом учитывают, что в полученной исходной суспензии исследуемый материал (почва разведена в 100 раз (1:10).

Если численность микроорганизмов в исследуемом субстрате невелика, то готовят исходную суспензию в 10 мл воды (1:10).

5.4 Методы определения количества клеток микроорганизмов

5.4.1 Подсчет клеток на фиксированных окрашенных мазках (метод Виноградского–Шульгиной–Брида). Метод сводится к тому, что в определенном объеме исследуемой суспензии непосредственно под микроскопом подсчитывают количество клеток микроорганизмов. Использование фиксированных мазков дает возможность сохранять препараты длительный срок и проводить подсчет не по ходу опыта, а в другое удобное для исследования время.

Приготовление препарата, строго определенный объем исследуемой суспензии (обычно 0,02 до 0,05 мл) наносят микропипеткой на хорошо обезжиренное, сухое предметное стекло, помещенное на миллиметровую бумагу с очерченной площадью в 6 или 4 см². К капле суспензии добавляют каплю стерильного 0,03%-ного водного раствора агара, быстро их перемешивают стерильной бактериологической палочкой и равномерно распределяют на площади отмеченной на бумаге. Мазок высушивают на воздухе, фиксируют 20-30 мин. 96%-ным спиртом и окрашивают тем или иным красителем в течение определенного времени. Затем препарат осторожно промывают в кристаллизаторе с водой. Воду меняют до тех пор, пока после очередного погружения в нее препарата она не останется бесцветной. Готовый препарат высушивают на воздухе.

Подсчет клеток микроорганизмов проводят с иммерсионным объективом в квадратах окулярной сетки, которую вставляют в окуляр. Просчитывают 50-100 квадратов сетки (не менее 10 полей зрения) передвигая препарат по диагонали. При отсутствии окулярной сетки можно подсчитать клетки микроорганизмов на всей площади поля зрения микроскопа. Максимальная, с точки зрения практической целесообразности точность достигается, когда общее число подсчитанных клеток составляет 600-1000 единиц (форма записи результатов подсчета как в таблице 1). На основании данных рассчитывают среднее количество клеток в квадрате сетки (поле зрения):

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n},$$

где n – число просчитанных квадратов сетки (полей зрения).

Для определения доверительного интервала вычисляют средне-квадратическое отклонение для варианта по формуле:

$$G_{\bar{X}} = \mp \frac{\sqrt{\sum X}}{n}.$$

Наиболее вероятное число клеток в квадрате сетки (поле зрения) при 95%-ном уровне значимости ($P_{0,95}$) рассчитывают, используя формулу:

$$\bar{X} = \mp 2G_{\bar{X}}.$$

При $P_{0,95}$ доверительный интервал соответственно равен 2,76. Для определения наиболее вероятного количества клеток в 1 г (1 мл) изучаемого субстрата необходимо учесть разведение, объем суспензии и площадь квадрата окулярной сетки (поля зрения) определяют с помощью объективного микрометра. Объект – микрометр помещают на стол микроскопа вместо препарата, и при том же увеличении микроскопа, при котором проводили подсчет клеток, измеряют сторону квадрата сетки (или диаметр поля зрения). Зная сторону квадрата сетки, определяют ее площадь по формуле; вычисляют площадь поля зрения. Пересчет количества клеток в квадратике сетки производят по формуле:

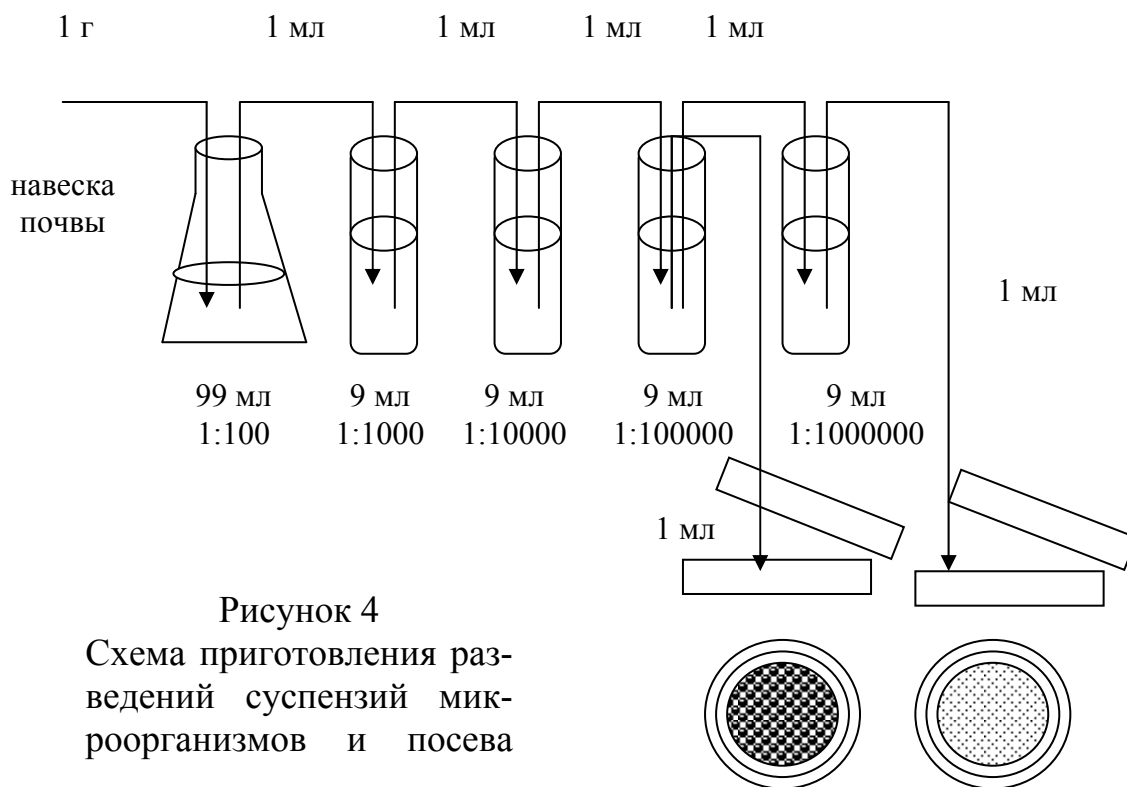
$$S = \pi r^2,$$

$$\frac{\bar{X} \mp 2G_{\bar{X}} \times 6 \times 10^8 \times K}{S \times 0,05},$$

где S – площадь квадратной сетки (мкм^2)
 0,05 – объем взятой суспензии (мл),
 K – разведение суспензии,
 6×10^8 – площадь мазка (мкм^2)

5.4.2 Количественный учет микроорганизмов в почве методом питательных пластин. При учете в почве количестве 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 4). 1 г навеску почвы стерильно вносят в колбу № 1 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 9 мл стерильной воды получают разведение 1/10000. Из пробирки № 2 1 мл суспензии переносят в пробирку № 3 9 мл стерильной воды, получают разведение 1/100000 и т.д.



Стерильную пипетку меняют каждый раз при новой концентрации почвенной болтушки.

Для определения количества микроорганизмов в 1 мл почвенной болтушки каждого разведения осуществляют поверхностной 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. Аналогично осуществляются учет количества микроорганизмов в воде, воздухе и других субстратах.

Лабораторная работа 5

5.5 Порядок подсчета

Количество микроорганизмов в 1 г или 1 мл исследуемого образца определяют, подсчитав колонии, выросшие на чашки Петри, и, умножив их на степень разведения.

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.

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: $20 \times 8 \times 10000 = 1600000$ клеток.

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 сводят в таблицу для анализа:

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

Разведения	Повторность опыта	Количество колоний на чашках	ΣX	x	$G_{\bar{x}}$	Наиболее вероятное кол-во микроорганизмов в 1 г исходного субстрата при $P_{0,95}$ (доверительный интервал)
1:10 ⁵	1 2					

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 высеве из данного разведения;

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

2 – t – критерий при $P_{0,95}$;

K – разведение из которого проведен высев,

V – объем суспензии, взятый для посева, мл;

ΣX – общее количество подсчитанных колоний при высеве данного разведения,

n – число повторностей.

Таблица 2 Определение количества микроорганизмов в почве

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

Все результаты подсчета колоний и последующих пересчетов записывают в таблицу 2. Сравнивают доверительные интервалы, по-

лученные пересчетом данных посева из разных разведений, и делают вывод о достоверности результатов.

Помимо количества определяют качественный состав микрофлоры анализируемых образцов. Используют две различные группы диагностических признаков: морфологические и культуральные, по которым необходимо описать доминирующую форму и определить ее процент.

Признаки, наблюдаемые под микроскопом, относятся к признакам морфологического характера: форма бактериальной клетки (палочки, кокки, сарцина), тип роста (единичные клетки, образуют цепочки), способность к спорообразованию (форма спорообразования), подвижность, характер жгутования, окраска по Граму.

Для описания морфологических признаков необходимо из доминирующих колоний приготовить фиксированный окрашенный препарат.

Таблица 3 Некоторые особенности морфологии клеток микроорганизмов, выросших на МПА

№ колоний	Микроскопическая картина (рисунок)	Форма клеток	Сочетания клеток	Подвижность	Наличие спор
1					
2					
3					

Культуральные признаки. Описывают и зарисовывают преобладающие, а также наиболее интересные колонии. Результаты наблюдений вносят в таблицу 4.

Таблица 4 Культуральные признаки микроорганизмов, выросших на МПА

№ колоний	Форма	Диаметр мм	Блеск, прозрачность	Цвет	Поверхность	Профиль	Край	Структура	Консистенция	Флуоресценция	Рисунок колоний
1											
2											
3											

5.6 Учет численности микрофлоры воздуха методом питательных пластин (метод Коха)

Наиболее простым, но недостаточно точным является метод оседания микроорганизмов на агаровую пластинку (метод Коха). Этим методом обнаруживают загрязнение микроорганизмами воздуха различных помещений. Метод заключается в том, что чашку Петри с МПА оставляют на определенное время (5 мин.) открытой (поверхностный посев), а затем закрывают крышкой и ставят в термостат при 37°C, чтобы каждая клетка попавшая на среду, образовала в результате размножения колонию. О степени загрязнения воздуха судят по количеству выросших колоний. Метод дает приблизительные результаты количества микроорганизмов в единице объема воздуха.

Ход работы: расправляют МПА и выливают содержимое одной пробирки (стерильно) в чашку Петри, закрывают крышку, равномерно распределяют МПА по дну чашки и ждут, пока застынет. Открытые чашки ставят в разные аудитории на 5 минут, после чего крышки закрывают. На крышке отмечают место, где производился анализ, фамилию исполнителя, а затем помещают в термостат при 37°C.

5.6.1 Результаты опыта

а) Количественный учет микрофлоры воздуха производят, подсчитывая число колоний, выросших на МПА.

Если определить площадь дна чашки Петри, то можно, зная число колоний, выросших на чашке, рассчитать количество бактерий в 1 м³ воздуха.

По Омелянскому на поверхность среды в 100 см² в течение 5 мин. при спокойном состоянии воздуха оседает количество микроорганизмов, содержащихся в 10 литрах воздуха (0,01 м³).

Пример расчета: В чашке Петри диаметром в 10 см выросло 25 колоний.

1) Определяют площадь питательной среды в чашке Петри по формуле:

$$S = \pi r^2,$$

где $\pi = 3,14$; r – радиус чашки.

2) Вычисляют количество колоний на площади, равной 100 см²:

25 колоний – 78,5 см²

x колоний – 100 см²

$$x = 32 \text{ колонии}$$

Итак, на площади 100 см² имеется 32 колонии.

3) Пересчитывают количество бактерий на 1 м³ (1000 л) воздуха.

32 колонии бактерий содержатся на площади 100 см² соответствующей 10 л воздуха:

32 колонии – 10 л

x клеток – 1000 л

$$x = \frac{32 \times 1000}{10} = 3200$$

Следовательно, в 1 м³ воздуха содержится 3200 клеток микроорганизмов.

Таблица 5 Определение степени загрязненности воздуха разных аудиторий

№ аудитории	Количество микроорганизмов в 1 м ³ воздуха	Степень загрязненности воздуха

По расчетам, сравнивая результаты анализов воздуха различных аудиторий, определяют аудиторию с меньшей и большей загрязненностью воздуха. Результаты заносят в таблицу 5.

б) Качественный анализ микрофлоры воздуха. Для качественной характеристики микрофлоры воздуха описывают доминирующие колонии по внешним признакам и их микроскопируют. Методика и форма записи такая же, как в таблицах 3 и 4.

5.7 Определение общего количества бактерий в воде

Общая обсеменность («микробное число») определяется количеством микроорганизмов, выросших на МПА или других средах общего назначения, при глубинном посеве на чашку Петри 1 мл воды. Для этого в зависимости от степени предполагаемого загрязнения исследуемую воду разводят водопроводной водой. Обычно делают десятикратное разведение от 1:10 до 1:1000. Исследуемую воду в объеме 1 мл из соответствующего разведения, начиная с большего вносят в стерильные чашки Петри (не менее двух) и заливают 15 мл расплавленного и остуженного до 50°С МПА. Плавными движениями равномерно перемешивают содержимое на дне чашки. Чашки с застывшим агаром помещают дном кверху в термостат с температурой 37°С на 24 часа. Чистую воду засевают в неразведенном виде.

5.7.1 Результаты опыта. После инкубации производят подсчет выросших колоний, отмечая каждую колонию на дне чашки чернилами и восковыми карандашами. Число выросших колоний соответствует количеству микроорганизмов в засеянном объеме воды соответствующего разведения. Для получения среднего арифметического

числа следует сосчитать число колоний, выросших в каждой чашке, умножить на соответствующее разведение. Результаты, (таблица 6) подсчитанные по отдельным чашкам, сложить, а затем разделить на количество засеянных чашек. Полученное число и будет являться показателем общей микробной обеспеченности воды.

Таблица 6 Количество микроорганизмов в воде

Название анализируемой воды	Количество микроорганизмов в 1 мл воды	Доминирующая форма, %

Описание доминирующей формы микроорганизмов в воде по морфологическим и культуральным признакам проводят так же, как и в почве. Методика определения и форма записи такая же (таблица 3 и 4).

5.8 Выделение чистой культуры

Основным методом выделения чистых культур микроорганизмов является метод, предложенный известным немецким микробиологом Р. Колхом. Он заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии, которая считается результатом развития одной клетки. В чистую культуру могут быть выделены микроорганизмы из колоний, выросшие на поверхности твердых питательных сред в чашках Петри (можно для этой цели использовать посе́вы из почвы, воды и других субстратов). Для выделения чистой культуры: А) выбирают изолированную колонию; Б) проверяют ее на чистоту, т.е. готовят из намеченной колонии фиксированный окрашенный препарат и убедившись в однородности клеток (в этом случае культура становится чистой) в из этой же колонии стерильной иглой набирают небольшое количество культуры и пересевают штрихом на косо́й МПА, соблюдая условия асептики.

Пробирку надписывают и помещают в термостат при 28-30°C. Чистую культуру зарисовывают. На следующем занятии из выросшей в пробирки культуры вновь готовят фиксированный окрашенный препарат и сравнивают увиденное с рисунком. Если культура загрязнена – задачу повторяют.

В тетрадь для практических работ вносят схему приготовления разведений; название анализируемых образцов, результаты посевов из различных субстратов и воздуха, оформленные в таблицы, рисунки

доминирующей формы по морфологическим и культуральным признакам.

По результатам наблюдений и исследований составляют отчет по учебно-исследовательской работе.

План изложения отчета по УИРС:

- 1) Введение – 0,5 стр.; теория вопроса – 2-3 стр.
- 2) Цель и задачи работы; методика исследований.
- 3) Результаты исследований; выводы.
- 4) Библиография.

Материалы и оборудование. Стерильные чашки Петри, колбы объемом 250 мл с 99 мл стерильной воды, стерильные пипетки на 1 мл, пробирки с МПА (2/3 и 1/3 объема) восковые карандаши, часовые стекла, металлические шпатели или ложки, весы, свежие почвенные пробы, микроскопы и все необходимое для приготовления окрашенных препаратов и микроскопирования, лупы, бактериальные иглы, тушь, спички, горелки, этиловый спирт, резиновые перчатки или резиновый пестик, фарфоровые чашки.

Контрольные вопросы

1. Какую цель предусматривает метод определения количества клеток микроорганизмов в почве?
2. Как Вы понимаете количественный учет микроорганизмов в почве методом питательных пластин?
3. Для чего определяют морфологические и культуральные признаки микроорганизмов?
4. Характеризуйте метод выделения чистой культуры бактерий?

6 ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ СОЕДИНЕНИЙ УГЛЕРОДА

Лабораторная работа 6

6.1 Знакомство с микрофлорой силоса и определение его кислотности

6.1.1 Теория вопроса. 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 час-

тично 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.

Буферность растертой растительной массы определяют при титровании по количеству 0,1н раствора молочной кислоты, необходимому для смещения рН до 4. Поскольку на образование молочной кислоты затрачивается примерно 60% сахаров корма, рассчитав, сколько сахаров составляют 100%, определяют так называемый, сахарный минимум данного растительного сырья, т.е. наименьшее количество сахара, необходимое для образования такого количества молочной и уксусной кислот, которое сместит рН до 4.

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.

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.

Цель опыта изучить возбудителей и продукты молочнокислого брожения при силосовании и сенаже.

6.1.2 Постановка и обобщение опыта. Для анализа из торцовой 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 и сенажа из него готовят препарат следующим образом. Берут пинцетом силос, сенаж и плотно его прижимают к предметному стеклу без добавления воды, стараясь, чтобы на стекле остался отпечаток. Препарат сушат на воздухе, фиксируют на пламени и окрашивают метиленовым синим (2-3 мин.). Смыть мазок водопроводной водой и высушив, микроскопируют обычно с иммерсионной системой.

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

6.1.3 Определение кислотности силоса. Общую кислотность определяют следующим образом. Берут навеску силоса и сенажа по 5 г и помещают в широкую пробирку (диаметром 2-2,5 см). Содержимое заливают 50 мл дистиллированной воды, закрывают резиновой пробкой и тщательно перемешивают. Навеску 30 мин. настаивают при температуре 10-12°, а затем определяют кислотность вытяжки титрованием. 10 мл вытяжки (с двойным количеством дистиллированной воды) оттитровывают до появления устойчивой слабо-розовой окраски.

Пример расчета. На титрование 10 мл вытяжки израсходовано 1,7 мл 0,1н NaOH, а на 50 мл вытяжки – 8,5 мл. 50 мл вытяжки полу-

чены из 5 г силоса, следовательно, для нейтрализации 100 г силоса будет израсходовано X:

$$X = \frac{100 \times 8,5}{5} = 170 \text{ мл } 0,1\text{н NaOH, или } 170 \times 0,009 = 1,53\%.$$

Определение рН в силосе. рН определяют с помощью индикаторов. В пробирку берут 2 мл вытяжки силоса и добавляют 2 капли универсального индикатора и перемешивают, затем, сравнивая цвет раствора стандартной шкалой, определяют концентрацию водородных ионов.

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?

Материалы и оборудование. Микроскоп и все необходимое для микроскопирования, весы и разновесы, колбочки емкостью 100 мл, пипетки на 10 мл и 2 мл, фарфоровые чашки, пинцеты, индикаторы (смесь равных объемов бромтимолблея и метилрога), фенолфталеин, метиленовый синий, 0,1н NaOH, дистиллированная вода.

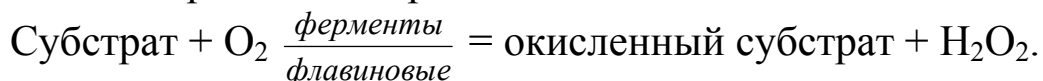
Лабораторная работа 7

6.2 Изучение маслянокислого брожения углеводов

6.2.1 Теория вопроса. Превращение углеводов с образованием масляной кислоты производится облигатно анаэробными спорообразующими палочками.

Типичным представителем маслянокислых бактерий, осуществляющих маслянокислое брожение, является (*Clostridium butyricum*) – крупная палочка (1-2×10 мкм). Молодые клетки этих бактерий имеют палочковидную форму, далее в клетках отлагается гланулеза (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 кластридий 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.



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.

Цель опыта – изучить возбудителей и продукты маслянокислого брожения.

6.2.2 Постановка опыта. 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.

6.2.3 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.

Отразить результаты микроскопического изучения возбудителей маслянокислого брожения и проведения качественной реакции на масляную кислоту.

Материалы и оборудование. Раствор Люголя (J+KJ); 5%-ный раствор хлорного железа; пробирки, пипетки, предметные и покровные стекла; микроскопы, картофель, мел, водяная баня.

Лабораторная работа 8

6.3 Изучение брожения пектиновых веществ

6.3.1 Теория вопроса. 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 – протопектиназу и полигалактуроназу.

Процесс брожения пектиновых веществ состоит из двух последовательно идущих стадий. В первой стадии осуществляется гидро-

лиз 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.

Цель опыта – изучить возбудителей и продукты брожения пектиновых веществ льна.

6.3.2 Постановка опыта. Для изучения брожения пектиновых веществ ставят следующий опыт. Снопик льняной соломы высотой 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 35-37°. Через 2-3 дня в ней начинается брожение, а через 5-8 дней оно заканчивается.

6.3.3 Обобщение опыта.

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

На препарате обычно выявляются крупные палочковидные бактерии с плектридиальным типом спорообразования (барабанная палочка) и прерывчатым расположением гранулезы, окрашенной в синий цвет. Это *Clostridium pectinovorum*.

Нередко на препарате обнаруживается *Cl. felsineum* палочки меньшего размера, сигарообразной формы, со спорой на конце. Гранулеза 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, которая описана в лабораторной работе 6.

Отразить результаты микроскопического изучения возбудителей пектинового брожения и проведения качественной реакции на масляную кислоту.

Материалы и оборудование. Раствор Люголя (J+KJ), 5%-ный раствор хлорного железа, пробирки, пипетки, скальпели, предметные и покровные стекла, микроскопы, льняная солома, ножницы, водяная баня.

Лабораторная работа 9

6.4 Изучение анаэробного разложения клетчатки

6.4.1 Теория вопроса. Клетчатка (целлюлоза) – главная составная часть растительных организмов. Обычно растительные остатки, попадающие в почву, на 40-70% состоят из целлюлозы. Огромное количество целлюлозы, в виде растительных остатков и отходов попадает в почву и водоемы, где подвергается разрушению под воздействием ферментов различных микроорганизмов.

Анаэробное разложение клетчатки имеет большое значение для круговорота углерода в природе.

6.4.2 Постановка опыта. Опыт по брожению целлюлозы ставят таким образом: в круглую плоскодонную колбу вносят 1-2 г фильтровальной бумаги (или вату), нарезанной мелкими полосками, и заливают доверху средой следующего состава (в %):

KNH_4HPO_4 – 0,2; пептон – 0,1
 KH_2PO_4 – 0,1; MgSO_4 – 0,05
 CaCl_2 – 0,03; CaCO_3 – 0,5

Среду заражают небольшим количеством почвы и закрывают колбу корковой пробкой с отверстием для выхода газов.

Элективные условия в данном случае определяются следующими факторами: 1) клетчаткой (источник углерода), которая может потребляться только специфическими целлюлозоразлагающими бактериями, имеющими фермент целлюлазу; 2) анаэробнозом.

Пептон, введенный в среду в небольшом количестве, практически не нарушает элективные среды, но сильно стимулирует процесс.

Через несколько дней при температуре 30-35° начинается брожение клетчатки, которое длится 2-3 недели. Фильтровальная бумага по мере сбраживания слегка ослизняется, желтеет и постепенно разрушается бактериями.

6.4.3 Обобщение опыта. Микроскопирование анаэробных целлюлозоразлагающих бактерий. Извлекают пинцетом со дна колбы кусочки разлагающейся бумаги и размазывают на предметном стекле (без добавления воды). Мазок сушат обычным способом, фиксируют на пламени горелки и окрашивают фуксином.

В колбах, инкубируемых при температуре 30°, развиваются длинные тонкие палочки с круглой опорой на конце – *Clostridium Omelianskii*.

Отразить результаты микроскопического изучения возбудителей брожения клетчатки.

Материалы и оборудование. Пинцеты, предметные и покровные стекла, микроскопы, фуксин, фильтровальная бумага, пептон, колбы круглые плоскодонные на 100-150 мл, корковые пробки с отверстиями, почва, соли: KNH_4HPO_4 , KH_2PO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 , CaCO_3 .

Контрольные вопросы

1. Какие микроорганизмы служат возбудителями маслянокислого брожения, брожения пектиновых веществ, целлюлозы?
2. В чем сущность названных типов брожений?
3. Чем отличается окисление углеводов при участии микроорганизмов от различного типа брожений?

Лабораторная работа 10

6.5 Определение общей биологической активности почвы

Для анализа в фарфоровые тигельки емкостью 20 г берут с вариантов опыта навески воздушно-сухой или свежей почвы, просеянной через сито с 2 мм отверстиями по 10 г в трех или более повторениях. Одновременно определяют ее влажность. 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. Для связывания выделяемой микроорганизмами почвы углекислоты на дно сосуда наливают 25 мл 0,1-нормального раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$ или NaOH с двумя каплями

фенолфталеина и выдерживают несколько часов или 5-10 суток в термостате при температуре 27-28°C (рис.5).

Контролем служат также подготовленные сосуды без почвы. При снятии опыта в каждую колбу перед титрованием добавляют 2 мл 50%-ного раствора $BaCl_2$ и титруют 0,1н раствором HCl до исчезновения розовой окраски.

По разнице в титровании контрольных и опытных проб в колбах, умноженной на 2,2 (соответствует 1 мл щелочи), определяют количество выделившейся углекислоты (CO_2) в миллиграммах навеской почвы и делают пересчет на 100 г ее за сутки.

$$JD = \frac{(A - B) \times 2,2}{N \times V},$$

где JD – интенсивность «дыхания», мг CO_2 на 100 г сухой почвы за 1, 10, 24 час;

A – количество пошедшей 0,1 н HCl на титрование контрольной пробы, мл;

B – количество пошедшей 0,1 н HCl на титрование опытной пробы, мл;

2,2 – коэффициент мг CO_2 , соответствующей 1 мл щелочи;

N – навеска сухой почвы, г;

V – время экспозиции, час.

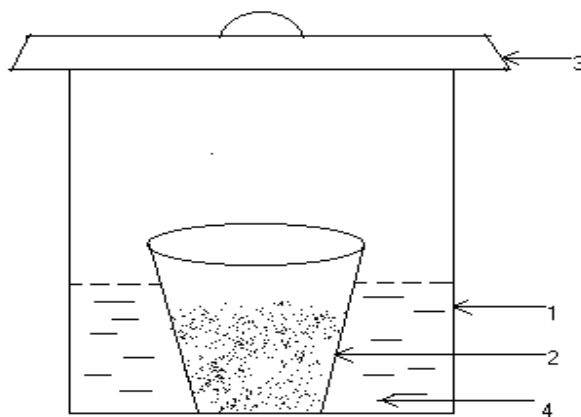


Рисунок 5

Прибор для определения общей биологической активности почвы: 1 – стеклянный сосуд, 2 – тигель с почвой, 3 – крышка сосуда, 4 – раствор $Ba(OH)_2$ или $NaOH$, фенолфталеин, термостат, 50% р-р $BaCl_2$, 0,1н р-р HCl

Лабораторная работа 11

6.6 Газометрическое определение активности каталазы

Каталаза принимает активное участие в клеточном дыхании, а также в расщеплении перекиси водорода в организмах. Прибор со-

стоит из двух бюреток, параллельно укрепленных на штативе, соединенных в суженной части резиновыми трубочками с тройником, у которого 2 противоположных конца изогнуты в одну и ту же сторону. Третий конец тройника соединен резиновой трубкой с каталазником (колба).

Бюретка с делениями для измерения объема газа в верхней части закрыта резиновой пробкой, в которую через отверстие вставлен маленький тройник. Измерительная часть аппарата заполняется 5%-ным раствором серной кислоты. В приборе должна быть достигнута герметичность. Перед определением уровень жидкости в аппарате устанавливается на нуле. Для определения активности фермента берут 2 г влажной почвы, помещают в реакционную колбу и смешивают с 1 г мела. Затем в пенициллиновый пузырек наливают 5 мл 3% перекиси водорода и с помощью нитки ставят его на дно колбы. При открытом кране аппарата колбу закрывают пробкой с резиновой трубкой, соединенной с измерительной бюреткой прибора. Проверяют уровень жидкости в приборе, закрывают сообщение с воздухом винтовым зажимом и засекают время, опрокидывают пенициллиновый пузырек с перекисью водорода в колбе. Содержимое колбы взбалтывают и спускают ее в водяную баню при 20°C, если комнатная температура ниже указанной. Учитывают количество выделенного кислорода из раствора перекиси водорода в течение 5 минут.

Активность каталазы выражается в миллилитрах кислорода, выделенного из раствора перекиси водорода в течение 3-5 минут в расчете на 1 г сухой почвы при температуре 20-21°C. Контролем служат навески стерилизованные в сушильном шкафу в течение 2-3 часов при температуре 150-160°C.

Материалы и оборудование. Прибор каталазник, 5% раствор серной кислоты, почва, мел, 3% раствор перекиси водорода, винтовой зажим, сушильный шкаф.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятиям – метаболизм, катаболизм, биосинтез.
2. Какова роль ферментов в жизнедеятельности микробной клетки?
3. Какие методы позволяют определить общую биологическую активность и численность, состав отдельных групп микроорганизмов в почве?

7 ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ СОЕДИНЕНИЙ АЗОТА

Лабораторная работа 12

7.1 Аммонификация белков

Белки представляют азотсодержащие высокомолекулярные соединения, состоящие из аминокислот (соединенных пептидной связью), которые в виде целой молекулы не могут поступать в клетку. Микроорганизмы, разлагающие белки, выделяют протеолитические экзоферменты, которые разрывают некоторые пептидные связи в белковых молекулах, в результате чего образуются фрагменты (полипептиды, олигопептиды), способные проникнуть в клетку или гидролизовать внеклеточно пептидазами до аминокислот. Последние либо непосредственно используются клеткой, либо подвергаются дезаминированию (отщепление аммиака от аминокислот).

Гидролиз белков можно представить следующим образом:



Примеры дезаминирования аминокислот:

Гидролитическое – $\text{R-CHNH}_2\text{-COOH} + \text{H}_2\text{O} = \text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{R-CH}_2\text{OH}$.

Восстановительное – $\text{R-CHNH}_2\text{COOH} + 2\text{H} = \text{NH}_3 + \text{R-CH}_2\text{COOH}$.

Окислительное – $\text{R-CHNH}_2\text{COOH} + \text{O}_2 = \text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{R-COOH}$.

Распад белков в почве и в других субстратах сопровождается накоплением аммиака. Отсюда этот процесс и называют аммонификацией белковых веществ.

При разложении белковых веществ, кроме аммиака, выделяется сероводород (H_2S), метилмеркаптан (CH_3SH) и дурнопахнущие продукты – скатол и индол.

Возбудителями аммонификации белков могут быть: аэробы *Bac. mycoides*, *Pseudomonas fluorescens*; факультативные анаэробы *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* и анаэробы *Clostridium putrificus* и *Cl. sporogenes*.

7.1.1 Цель опыта – изучить возбудителей процесса аммонификации белка и продукты их жизнедеятельности.

7.1.2 Задание.

1) Выполнить лабораторную работу 12.

- 2) Поставить опыт.
- 3) Результаты опыта обобщить и сделать выводы.
- 4) Ответить на вопросы (устно).

7.1.3 Постановка опыта. Для изучения процесса аммонификации белков в качестве питательной среды используют мясной бульон (МБ) с добавлением 3% пептона¹ (С:N среды равно 3,5:1).

30 мл среды наливают в эрленмейеровскую колбу емкостью 100 мл и добавляют 1/3 чайной ложки почвы. Колбу закрывают ватными пробками. Между пробкой и стенками горлового отверстия колбы подвешивают две бумажки – красную лакмусовую, смоченную дистиллированной водой (для обнаружения выделяющегося аммиака), и фильтровальную, смоченную уксуснокислым свинцом² (для обнаружения H₂S и метилмеркаптана). Бумажки не должны касаться среды.

На колбу одевают этикетку с указанием группы и фамилии студента. Опытные колбы помещают в термостат при 28-30°.

Материалы и оборудование. Питательная среда – МБ + 3% пептона. Цилиндры емкостью 100 мл, колбы Эрленмейера на 100-150 мл, почва, полоски красной лакмусовой и фильтровальной бумаги, раствор уксуснокислого свинца, вата для пробок и дистиллированная вода.

7.1.4 Результаты опыта. На 3-6-е сутки инкубации опыт заканчивают и содержимое в колбе анализируют. Определяют продукты жизнедеятельности микроорганизмов при разложении белков и возбудителей процесса.

1) *Исследование возбудителей гнилостного распада белковых веществ.* Для обнаружения возбудителей аммонификации белковых веществ готовят препарат живых бактерий (в раздавленной капле), а также фиксированный и окрашенный фуксином. Чаще других в препарате встречаются подвижные клетки *Proteus vulgaris*.

Это не спорообразующие палочки (4-6 мкм, а иногда и более). Кроме того, на препарате много спорообразующих клеток стрептобацилл – *Bac. cereus*, *Bac. mycoides* и *Clostridium putrificus*. У последних диаметр спор крупнее клеток и они расположены терминально. Из неспороносных преобладают псевдомонады – небольшая (0,5×1,5-2 мкм) неспороносная палочка. *Pseudomonas fluorescens* вызывает ам-

¹ В состав пептона входит 30% свободных аминокислот, остальное составляет смесь ди-, три- и полипептидов.

² Разбавленный уксуснокислый свинец обрабатывают раствором NaOH до тех пор, пока осадок не растворится.

модификацию белковых веществ в аэробных и в анаэробных условиях (факультативный анаэроб).

2) *Определение продуктов гнилостного распада белковых веществ.*

а) *Проба на аммиак.* Выделяющийся в атмосферу NH_3 улавливается подвешенной красной лакмусовой бумажкой, которая при этом синееет. Накопление аммиака в субстрате устанавливают при помощи реактива Несслера¹. Реакция капельная. На фарфоровые пластинки с лунками или в фарфоровые чашки наносят каплю реактива Несслера, затем каплю субстрата. При наличии большого количества аммиака образуется коричневый или буроватый осадок, при небольшом – появляется оранжевая или желтая окраска.

б) *Проба на сероводород.* Сероводород обнаруживается с помощью подвешенной фильтровальной бумажки, смоченной уксуснокислым свинцом – $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COOH})_2$ – бумажка чернеет. Если почерневшая бумажка порывается серебристым налетом, это свидетельствует о том, что наряду с сероводородом образуется еще и метилмеркаптан (CH_3SH).

в) *Проба на индол.* Наличие индола можно обнаружить по запаху. Индол придает субстрату неприятный, тошнотворный запах. Результаты опыта, в том числе и микроскопические наблюдения, необходимо отразить в тетради.

Материалы и оборудование. Белые фарфоровые пластинки с лунками (или фарфоровые чашки), реактив Несслера, микроскоп и все необходимое для приготовления окрашенных препаратов, пипетки, покровные стекла и все необходимое к микроскопу.

Контрольные вопросы

1. Что представляют собой белки по химическому составу?
2. Какие ферменты вырабатывают микроорганизмы, разлагающие белки?
3. Как происходит гидролиз белка и полипептидов?
4. Что такое дезаминирование и какие известны пути дезаминирования?
5. Приемы окислительного и гидролитического дезаминирования?

¹ Реактив Несслера готовится следующим образом: 20 г KJ растворяют в 50 мл воды и к раствору добавляют до насыщения (около 32 г) небольшими порциями HgJ_2 . После этого добавляют 460 мл воды и 134 г KOH . Отстоявшуюся жидкость сливают в темную склянку.

6. Назовите виды бактерий, которые разлагают белки в почве грибы, актиномицеты и простейшие?
7. Значение процесса разложения белка и продуктов их гидролиза (аминокислот) в почве для сельского хозяйства?

8 ИЗУЧЕНИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМАМИ МИНЕРАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ АЗОТА

Лабораторная работа 13

8.1 Нитрификация

Аммиак, образующийся в почве, в навозе и в воде при минерализации азотсодержащих органических соединений, а также аммиак аммонийных солей, поступающих в почву с удобрениями, окисляется в азотистую, затем в азотную кислоту. Этот процесс получил название нитрификации.

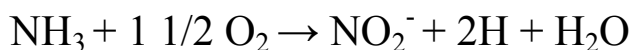
Процесс нитрификации был открыт Шлезингом и Мюнцем в 1877 г. Виноградский С.Н. в 1888 г. установил, что в превращении аммиака в нитрит и нитрат (при нитрификации) участвуют нитрифицирующие бактерии. Главным образом – это бактерии двух родов: *Nitrosomonas* и *Nitrobacter*. Эти бактерии способны использовать в качестве доноров водорода неорганические соединения и ионы (аммиак, нитрит). В результате окисления их они получают энергию для синтетических процессов.

Микроорганизмы, использующие неорганические доноры водорода, получили название хемолитотрофов. У большинства организмов с подобным типом энергетического обмена окисление неорганических доноров водорода обязательно сочетается с автотрофной фиксацией CO_2 . Эти бактерии получают углерод, необходимый для синтеза клеточного вещества, в результате восстановления углекислого газа.

Недавно было установлено, что определенные гетеротрофные микроорганизмы способны продуцировать нитриты и нитраты из различных органических компонентов. Например, гриб *Aspergillus flavus* продуцирует нитрат из аминокислотсодержащих компонентов.

Окисление аммиака и восстановление углекислого газа, согласно С.Н. Виноградскому, выделившему впервые нитрифицирующие

бактерии и открывшему хемосинтез, возникает у бактерий первой фазы следующим путем:



Первую фазу нитрификации вызывают: *Nitrosomonas* и *Nitrosoaspira*.

Бактерии второй фазы нитрификации – *Nitrobacter* получают энергию за счет окисления нитрита до нитрата: $\text{NO}_2 + \frac{1}{2}\text{O}_2 = \text{NO}_3$.

Нитрифицирующие бактерии играют в природе существенную роль. В хорошо аэрируемой почве ионы NH_4^+ подвергаются быстрому окислению и образуются анионы NO_2^- , которые подкисляют почву. Это ведет к растворимости минералов, в состав которых входят соли калия, магния, кальция и фосфорной кислоты. Последние становятся доступными для растений. В этом отношении нитрифицирующие организмы имеют важное значение в сельском хозяйстве. Однако ионы аммония задерживаются в почве и не теряются, ионы NO_3^- могут вымываться или подвергаться процессу денитрификации. За счет последнего процесса теряется значительное количество азота из почвы.

В связи с большими потерями азота в почве в результате образования нитратов в процессах нитрификации в настоящее время ведутся поиски веществ, способных специфически подавлять рост нитрифицирующих бактерий.

8.1.1 Цель опыта – изучить возбудителей процесса нитрификации и продукты их жизнедеятельности.

8.1.2 Задание.

- 1) Выполнить лабораторную работу № 13.
- 2) Поставить опыт.
- 3) Результаты опыта обобщить и сделать выводы.
- 4) Ответить на вопросы (устно).

8.1.3 Постановка опыта. Для наблюдения процесса нитрификации и знакомства с возбудителями процесса поставим опыт по методу Виноградского на гелевых пластинах. Для этого промытые, прокипяченные чашки Петри с кремнекислым гелем¹ пропитывают 3-5 мл питательной среды следующего состава: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^-$ – 2,0 г; K_2HPO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,3; NaCl – 0,5; FeSO_4 – 0,2 г.

¹ Для приготовления пластин из кремнекислого геля берут определенного удельного веса (1,06) раствор кремнекислого натрия или жидкого стекла и определенного удельного веса соляную кислоту (1,10), смешивают в равных объемах и разливают (по 15-20 мл) в чашки Петри. Через 12 ч. на чашке выпадает плотная студенистая масса (гель), состоящая из кремневой кислоты. Гель отмывают от следов хлора. С точки зрения питания эти пластины совершенно инертны.

Соли цинка, молибдена, титана, алюминия – следы. $MgCO_4$ или $CaCO_3$ добавляют 0,3-0,5 г на чашку. Затем упаривают до образования гладкой эмалированной поверхности. На поверхности пластин раскладывают комочки почвы, так как в субстрате отсутствуют источник органического углерода, то на пластинках могут развиваться только нитрифицирующие бактерии. Они ассимилируют углерод из CO_2 за счет энергии окисления аммиака до азотистой кислоты.

Для того чтобы было видно, где идет процесс нитрификации, в чашку вносится $MgCO_4$ или $CaCO_3$. Образовавшаяся азотистая кислота растворит мел и вокруг комочков почвы образуется зона растворения мела. В этой зоне исследуют возбудителей процесса и продукты их жизнедеятельности.

На поверхность гелевой пластины, пропитанной выше питательной средой, разложить по бумажному или металлическому трафарету 50 комочков почвы. В случае использования металлического трафарета его фламбируют над огнем и металлическими выступами слегка касаются поверхности пластины так, чтобы на платине остались едва заметные отпечатки трафарета. На них и раскладывают 50 комочков свежей почвы. Почву помещают на стерильное часовое стекло (стерилизация фламбированием), а на другое часовое стекло наливают стерильную или дистиллированную воду.

Палочкой с оттянутым концом (предварительно палочку слегка проводят над огнем, затем смачивают водой) захватывают комочек почвы (диаметр 1-2 мм) и помещают на отпечатках трафарета на поверхности геля. Чашку закрывают крышкой. На крышке подписывают восковым карандашом номер группы и фамилию студента. Чашку помещают во влажную камеру и ставят в термостат при $t = 28-30^\circ$.

Материалы и оборудование. Гелевые пластины, пропитанные питательной средой для первой фазы нитрификации, свежая почва, часовые стекла, палочки с оттянутым концом, трафареты, дистиллированная вода, восковой карандаш.

8.1.4 Результаты опыта. Через некоторое время, в зависимости от нитрифицирующей активности микроорганизмов почвы (спустя 7, 14, 21 день), вокруг отдельных комочков почвы появляются зоны растворения мела. В этих зонах следят за исчезновением аммиака и появлением азотистой кислоты.

1) *Определение продуктов жизнедеятельности нитрифицирующих бактерий.* Чтобы познакомиться с продуктами жизнедеятельности бактерий первой фазы нитрификации, надо стерильным ланцетом вы-

резать из зон растворения мела три кусочка геля и поместить их в лунки фарфоровой пластинки или в фарфоровые чашки. Для контроля вырезают три кусочка геля из мест, в которых мел не растворился, и также помещают в лунки фарфоровой пластинки (или фарфоровые чашки). Сначала делают пробы с кусочками геля из контрольных зон. Все реакции капельные.

а) Пробу на аммиак делают с реактивом Несслера; гель приобретает желтовато-оранжевую окраску, что свидетельствует о присутствии аммиака.

б) Пробу на нитрит делают с цинк-йод-крахмалом, добавляя каплю 10%-ной серной кислоты. Гель остается без изменения, что указывает на отсутствие нитрата.

Аналогичные пробы делают с кусочками геля, взятым из зон растворения мела (или $MgCO_3$). В этом случае реакция на аммиак с реактивом Несслера отрицательная (гель не окрашивается). Проба с цинк-йод-крахмалом в кислой среде – положительная (гель окрашивается в темно-синий цвет), что свидетельствует о появлении азотистой кислоты.

При длительном стоянии чашек в термостате вслед за первой фазой может пройти вторая фаза нитрификации ($NO_2 + 1/2 O_2 = NO_3^-$). В этом случае реакция на нитрит с цинк-йод-крахмалом в кислой среде будет отрицательная (кусочек геля остается бесцветным).

в) Проба на нитрат. Третий кусочек геля пробуют на наличие нитрата. При отсутствии нитрата делают пробу с дифениламином, растворенным в крепкой серной кислоте. При этом контрольный кусочек геля остается бесцветным, а гель, взятый из зон растворения мела, синеет, что свидетельствует о наличии нитрата.

2) Исследование возбудителей нитрификации. Для знакомства с возбудителями нитрификации из зон растворения мела петлей берут немного материала и готовят фиксированный и окрашенный препарат. При микрокопировании можно обнаружить овальные клетки, похожие на нуль – *Nitrosomonas*, и извитые клетки с неравномерно окрашенной цитоплазмой – *Nitrosospira*. Первые встречаются в старопородных почвах, вторые – в целинных.

Так как клеточная масса нитрифицирующих бактерий очень мала (низкий коэффициент полезного действия хемосинтеза), то препараты нитрифицирующих бактерий не всегда удаются.

Наблюдать нитрифицирующие бактерии можно также, используя прием, предложенный Е.З. Теппер. Для этого чашки осторожно

заливают дистиллированной водой, бактерии при этом собираются на ее поверхности. Если к поверхности воды прикоснуться чистым обезжиренным предметным стеклом, то на нем останется отпечаток нитрифицирующих бактерий. После сушки и фиксации такого препарата его окрашивают и просматривают под микроскопом с иммерсионной системой.

В чашках, в которых прошла и вторая фаза нитрификации, можно обнаружить также и мелкую угловатую палочку – *Nitrobacter*. Результаты опыта, а также рисунки возбудителей отразить в тетради.

Материалы и оборудование. Опытные чашки, реактив Несслера, реактив цинк-йод-крахмал, 10%-ная H_2SO_4 , дифениламин в крепкой серной кислоте, пипетки на 1мл, фарфоровые пластинки с лунками или фарфоровые чашки, микроскоп и все необходимое для микрокопирования.

Контрольные вопросы

1. Что понимают под нитрификацией?
2. Написать уравнения нитрификации (первой и второй фаз нитрификации).
3. Возбудители нитрификации (первой и второй фазы)?
4. Что получают бактерии в процессах нитрификации?
5. Отношение нитрифицирующих бактерий к источникам углерода и как они осуществляют хемосинтез?
6. Что такое гетеротрофная нитрификация? Какие организмы участвуют в ней?
7. Назначение процесса нитрификации в природе и в сельском хозяйстве?
8. Меры борьбы с нитрификацией в почве и в навозе?

Лабораторная работа 14

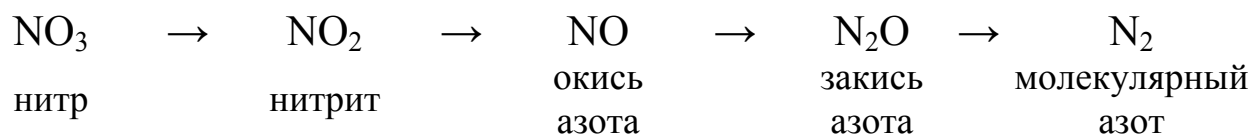
8.2 Денитрификация

Восстановление нитрата может происходить в результате конструктивного и энергетического обмена. В первом случае, подобно большинству растений, многие бактерии способны использовать в качестве источника азота нитрат, восстанавливая его через нитрит до аммиака, с последующим включением его в метаболизм.



Такое восстановление нитрата до аммиака получило название ассимиляторной денитрификации или «аммонификации нитрата».

В энергетическом обмене при дыхании в анаэробных условиях некоторые микроорганизмы используют кислород нитрата, нитрат восстанавливается до молекулярного азота или до закиси азота. Такое восстановление нитрата надо рассматривать как тип дыхания, при котором акцептором водорода служит кислород нитрата.



Восстановление нитрата до N_2 получило название диссимиляторной денитрификации. Бактерии, вызывающие этот процесс, обладают системой переноса электронов – цитохромами. При нитратном дыхании у денитрифицирующих бактерий окисляемый субстрат подвергается полному окислению до CO_2 и H_2O .

При нитратном дыхании микроорганизмы получают энергии значительно больше, чем при брожении.

Окись и закись азота, как и молекулярный азот, летучи и в процессе диссимиляторной денитрификации происходит обеднение почвы азотом.

Возбудителями денитрификации являются: *Pseudomonas fluorescens*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri*.

8.2.1 Цель опыта – изучить возбудителей денитрификации и продукты жизнедеятельности их при ассимиляционной и диссимиляционной денитрификации.

8.2.2 Задание.

- 1) Выполнить лабораторную работу 14.
- 2) Поставить опыт.
- 3) Результаты опыта обобщить и сделать выводы.
- 4) Ответить на вопросы (устно).

При изучении процесса денитрификации чаще используют среду Гильтая или жидкую среду следующего состава:

Na –виннокислый (сегнетова соль) – 20 г;

KNO_3 – 2,0 г;

K_2HPO_4 – 0,5 г;

FeSO_4 – 0,2 г;

Дистиллированная вода – 1000 мл.

8.2.3 Постановка опыта. В склянку от прибора для денитрификации (см. рисунок 27 «Практикум по микробиологии») наливают немного питательной среды и к ней добавляют 1/3 чайной ложки почвы. Среду перемешивают с почвой для удаления пузырьков воздуха, затем наполняют склянку питательной средой до края и закрывают каучуковой пробкой. В пробку вставлена открытая с двух сторон стеклянная трубка, расширенная в средней части ее. Пробка вытесняет часть жидкости и последняя входит в трубку.

В сосудике под пробкой создаются анаэробные условия. Отсутствие углеводов в среде исключает процесс брожения. В этих условиях будут развиваться лишь микроорганизмы, способные использовать кислород нитрата. Так как единственным источником азота в среде является нитрат для роста клеточной массы, часть азота нитрата будет подвержена ассимиляционной денитрификации (часть нитрата восстановится через NH_2OH до NH_3). Остальная часть нитрата в актах дыхания до молекулярного азота.

Нитрат в анаэробных условиях при отсутствии углеводов определяет процесс денитрификации. При постановке опыта необходимо сделать качественную реакцию на нитрат с дифениламином (реакция капельная). Каплю дифениламина, растворенного в крепкой серной кислоте, внести в фарфоровую чашку и к ней добавить каплю субстрата. Капля посинеет, что будет свидетельствовать о наличии в среде нитрата.

На прибор следует повесить этикетку с указанием номера группы и фамилии студента. Прибор со средой помещают в термостат при 28-30°.

Материалы и оборудование. Питательная среда для денитрифицирующих бактерий, приведенная выше, свежая почва, фарфоровая пластинка или чашки, чайная ложка, пипетка на 1 мл, реактив – дифениламин в крепкой серной кислоте и приборы для постановки опыта.

8.2.4 Результаты опыта. После пяти-шести дней инкубации культуру подвергают анализу. Отмечают появление пузырьков газа (CO_2 и N_2) под пробкой. Нередко отмечается позеленение питательной среды, что указывает на развитие в среде *Pseudomonas fluorescens*, *Paracoccus denitrificans*. Последние чаще развиваются на среде с лимонной кислотой. На среде с сегнетовой солью развивается, как правило, неспорозная палочка *Pseudomonas stutzeri*.

Для знакомства с возбудителями процесса из середины субстрата берут каплю и готовят фиксированный и окрашенный препарат, рассматривают под микроскопом с иммерсионной системой.

Для определения продуктов жизнедеятельности денитрифицирующих бактерий сначала делают пробу на нитрат (NO_3) с дифениламином и нитрит (NO_2) с цинк-йод-крахмалом с добавлением капли 10%-ной H_2SO_4 , а затем на аммиак с реактивом Несслера. Обычно после 6 дней инкубации реакции на NO_3 и NO_2 бывают отрицательными. Часть нитрата восстанавливается до аммиака (с реактивом Несслера субстрат показывает положительную реакцию). Основная же масса азота нитрата восстанавливается до молекулярного азота, о чем свидетельствует обильное образование газов (CO_2 и N_2).

Результаты опыта записать, а возбудителей процесса зарисовать.

Материалы и оборудование. Для анализа опыта необходимо приготовить: пипетки моровские, фарфоровые пластинки или чашки, дифениламин в крепкой серной кислоте, цинк-йод-крахмал, 10%-ную серную кислоту, реактив Несслера, микроскоп и все необходимое для микроскопирования и приготовления окрашенных препаратов.

Контрольные вопросы

1. Что понимают под денитрификацией?
2. Что такое ассимиляторная денитрификация?
3. Что такое диссимиляторная денитрификация?
4. Назовите возбудителей денитрификации.
5. Какова связь между наличием кислорода в почве и денитрификацией?
6. Потери азота при диссимиляторной денитрификации в почве.
7. Меры борьбы с денитрификацией в почве и в навозе.

9 ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИКСАЦИИ АЗОТА АТМОСФЕРЫ

Лабораторная работа 15

9.1 Изучение несимбиотической азотфиксации

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 свободно живущие в почве.

В 1983 г. С.Н. Виноградским была выделена первая свободноживущая азотфиксирующая бактерия – *Cl. 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.

Cl. 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.

Cl. 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.

9.1.1 Цель опыта – изучить *Cl. pasteurianum* и продукты его жизнедеятельности.

9.1.2 Задание.

- 1) Выполнить лабораторную работу 15.
- 2) Поставить опыт.
- 3) Результаты опыта обобщить и сделать выводы.
- 4) Ответить на вопросы (устно).

9.1.3 Постановка опыта. Для выявления анаэробных азотфиксаторов в почве можно использовать безазотистую среду С.Н. Виноградского:

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°.

Материалы и оборудование. Безазотистая питательная среда Виноградского, мерные цилиндры на 100 мл, CaCO₃, колбы Эрленмейера емкостью 100-150 мл, почва, алюминиевая чайная ложка или шпатель.

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

9.2 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 *Cl. pasteurianum* содержит гранулезу (полисахарид, близкий к крахмалу), которая от раствора J в KJ 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.

Материалы и оборудование. Микроскопы и все необходимое для микрокопирования и приготовления препаратов в раздавленной капле, раствор J+KJ (1:2) пробирки, 10%-ное хлорное железо (FeCl₃).

9.3 Изучение несимбиотической азотфиксации (род *Azotobacter*)

Azotobacter был выделен Бейеринком в 1901 г. Аэроб, представляет собой короткие палочки, часто округленные, сцепленные попарно. Образует слизистые капсулы предохраняющие. При старении палочки превращаются в кокки.

В настоящее время известно около 10 видов азотобактера. Они очень близки по морфологии и физиологии. Более хорошо изучены *Az. chroococcum*, *Az. vinelandii*, *Az. agile*. Наиболее распространен в

почве *Az. chroococcum*, образующий на плотной среде колонии с бурым, почти черным пигментом.

В качестве источника углерода азотобактер использует углеводы, спирты, органические кислоты, особенно масляную и уксусную. При заправке соломы в почву часто наблюдается развитие азотобактера. Это объясняется тем, что при разложении соломы целлюлозоразлагающими бактериями образуются промежуточные продукты распада (оксикислоты), которые служат энергетическим материалом для азотобактера. В отсутствие связанных форм азота азотобактер может использовать молекулярный азот воздуха.

Культуры азотобактера усваивают 10-20 мг азота на 1 г потребленного органического вещества.

Азотобактер является очень требовательным микроорганизмом, не очень широко распространенным в почвах. Распространение азотобактера ограничивают следующие факторы:

1) Кислая реакция среды. Для его нормального развития требуется нейтральная или слабокислая среда. В кислой среде он инактивируется. В зоне подзолистых и дерново-подзолистых почв азотобактер можно найти в огородных и пойменных почвах с более благоприятным значением рН и богатых органическими веществами.

2) Недостаточная аэрация.

3) Недостаточное содержание фосфора.

В почвах, где P_2O_5 меньше 14 кг/га, азотобактер не обнаруживается.

Культуру *Az. chroococcum*, выращенную на стерильной почве, используют в качестве земледобрильного препарата (азотобактерин). Эффективность действия азотобактерина определяется не только улучшением азотного питания растений, но и связана с выработкой азотобактером биологически активных и особенно фунгистатических веществ.

Весьма близки к азотобактеру бактерии рода *Beijerinckia*. Они отличаются от него значительной кислотоустойчивостью (могут расти в среде даже при рН 3,0), меньшей чувствительностью к повышенным дозам солей алюминия и железа. Бактерии этого рода широко распространены в кислых почвах южной и тропической зон.

9.3.1 Цель опыта – изучение азотобактера и определение плотности заселения его в почве.

9.3.2 Постановка опыта. Для выявления азотобактера в почве можно использовать метод С.Н. Виноградского на гелевых пласти-

нах. Последние отмывают от хлора и пропитывают 3-5 мл питательной среды следующего состава (на 200 мл воды):

Маннит или тростниковый сахар – 20,0 г;

K_2HPO_4 – 1,0 г;

$MgSO_4$ – 0,5 г;

$NaCl$ – 0,5 г;

$FeSO_4$ – 0,01 г;

$MnSO_4$ – 0,01 г;

$CaCO_3$ – 5,0 г;

Смесь микроэлементов по М.В.Федорову¹.

После упаривания среды до исчезновения избыточной влаги на поверхности геля раскладывают по трафарету 50 комочков почвы. Которые с помощью стеклянной палочки, заостренный конец которой фламбируют, смачивают водой, налитой в часовое стекло.

На крышках чашек Петри делают надпись карандашом по стеклу. Чашки помещают во влажную камеру в термостат при температуре 28-30°.

Материалы и оборудование. Гелевые пластины, пропитанные средой для азотобактера, свежие почвенные образцы (желательно почвы разных типов), часовые стекла, стеклянные палочки с оттянутыми концами.

9.3.3 Результаты опыта. На 6-7-е сутки комочки почвы в чашках Петри обрастают слизистыми азотобактера. Если комочки почвы обрастают колониями *Az. chroococcum* то они со временем приобретают бурю окраску. *Az. vinelandii*, *Az. agilis* образуют колонии, которые вызывают заметную флуоресценцию среды.

Бактерии рода *Weijerinckia* дают выпуклые, блестящие, нередко складчатые слизистые колонии вязкой консистенции. Их можно обнаружить в красноземах.

Микроскопическое изучение азотобактера. Для ознакомления с возбудителем аэробной азотфиксации из колоний готовят фиксированный препарат, окрашивают метиленовым синим (2-3 мин.) и просматривают с иммерсионной системой объектива. Клетки азотобактера шаровидные, часто встречаются попарно. При окраске метиленовым синим хорошо заметны капсулы.

Определение плотности азотобактера в почве. Для выявления плотности населения азотобактера в почве подсчитывают число ко-

¹ Содержит: 5 г H_3BO_3 ; 5 г $(NH_4)_2MoO_4$; 0,5 г KJ ; 0,5 г $NaBr$; 0,2 г $ZnSO_4$; 0,3 г $AL_2(SO_4)_3$; на 1 л дистиллированной воды и на 100 мл среды берут 1 мл смеси.

мочков почвы, обросших колониями этих бактерий, и определяют, какой процент они составляют от общего числа комочков почвы, разложенных на чашке.

Материалы и оборудование. Опытные чашки Петри, микроскоп и все необходимое для приготовления препаратов и микроскопирования.

Контрольные вопросы

1. Назвать свободноживущие в почве азотфиксирующие бактерии.
2. Дать морфологическую и физиологическую характеристику анаэробных азотфиксаторов
3. Как получить накопительную культуру *Cl. pasteurianum*? Какими факторами определяются элективные условия среды?
4. Как приготовить препарат *Cl. pasteurianum* в раздавленной капле?
5. Какие продукты жизнедеятельности образуют *Cl. pasteurianum*?
6. Как провести качественную реакцию на масляную кислоту?
7. Как получить накопительную культуру азотобактера? Какая питательная среда используется?
8. Как приготовить препарат из колоний азотобактера в почве?
9. Как определить плотность азотобактера в почве?
10. Каково значение несимбиотической азотфиксации в почве.

Лабораторная работа 16

9.4 Изучение симбиотической азотфиксации

Клубеньковые бактерий (род *Rhizobium*) относятся к симбиотическим азотфиксатором. 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, граммотрицательные, 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 прото-

плазмы 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 бактериоидами. В качестве источника азота могут использовать весьма 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 рН 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 вызывает 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 бактерио-

идную 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, родственной гемоглобину. Фиксация молекулярного азота происходит только в тех клубеньках, в которых присутствует леглобин.

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 100-200 кг/га ежегодно.

Следует отметить, что в растении преобладает та раса бактерий, которая проникает в клубенек первой. В 1912 г. был разработан земледобрительный 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 15-20%.

9.4.1 Цель работы – ознакомиться с клубеньками и изучить клубеньковые бактерии.

9.4.2 Задание.

- 1) Выполнить лабораторную работу 16.
- 2) Поставить опыт.
- 3) Результаты опыта обобщить и сделать выводы.
- 4) Ответить на вопросы (устно).

Приготовление препаратов. Разрезают клубенек пополам и отжимают каплю жидкости на предметное стекло (можно раздавить клубенек между двумя стеклами). Разбавив ее каплей дистиллиро-

ванной воды, готовят фиксированный препарат, окрашенный фуксином.

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

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

Материалы и оборудование. Зафиксированные корни разных бобовых растений с клубеньками, ботаническая бритва и все необходимое для приготовления препаратов и микрокопирования.

Контрольные вопросы

1. Дайте морфологическую и физиологическую характеристику клубеньковых бактерий.
2. Фиксируют ли азот клубеньковые бактерии в чистых культурах?
3. Дать понятие о специфичности, вирулентности, активности клубеньковых бактерий.
4. Что такое нитрагин (ризоторфин)?
5. Как приготовить препарат клубеньковых бактерий?
6. Какова сравнительная значимость несимбиотической и симбиотической фиксации азота в почве?

10 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЕ СТУДЕНТОВ

Мир микроорганизмов сложен и разнообразен, он включает в себя бактерии, микроплазмы, актиномицеты, микроскопические грибы, водоросли, простейшие вирусы. Ознакомьтесь с их распределением и значением в природе, различных отраслях народного хозяйства, охране окружающей среды и решении общебиологических задач.

10.1 Микроорганизмы, их классификация, морфология, строение и размножение

По строению клетки микроорганизмы разделяются на эукариоты и прокариоты. Отрадите эти различия в таблице 7.

Таблица 7 Характеристика микробов клеточной организации

Признаки	Эукариоты	Прокариоты
Наличие истинного ядра с мембраной Наличие нуклеоида Присутствие в клетке митохондрий, аппарата Гольджи, эндоплазматической сети Наличие рибосом Целлюлоза и хитин в составе клеточной стенки Споры для размножения Споры для сохранения жизнеспособности Наличие капсул Представители		

Из эукариотных микроорганизмов детальнее ознакомьтесь с грибами. Представьте рисунок морфологических признаков грибов, отметьте соответствующие обозначения цифрами: род *Mucor*, род *Penicillium*, род *Aspergillus*.

Признаки:

- 1) Одноклеточный мицелий
- 2) Многоклеточный мицелий
- 3) Спорангий со спорами
- 4) Спорангиеносец
- 5) Конидий
- 6) Конидиеносец

Ознакомьтесь с основами систематики грибов, с характеристикой основных классов (зигомицеты, аскомицеты, базидиомицеты, дейтеромицеты).

Отметьте систематическое положение грибов, указанных в таблице 8, 9, 10.

Таблица 8 Классы грибов

Представители	Классы грибов			
	зигомицеты	аскомицеты	базидиомицеты	децтеромицеты
Дрожжи Пенициллиум Триходерма Мукор Аспергиллус Фузариум				

Таблица 9 Физиологические особенности грибов

Представители	Аэробы	Анаэробы	Гетеротрофы
Дрожжи Пенициллиум Аспергиллус Муко́р			

Таблица 10 Продукты микробного синтеза

Микроорганизмы	Лимонная кислота	Антибиотики	Спирт	Белок
Аспергиллус Пенициллиум Дрожжи Актиномицеты Муко́р				

Представьте рисунок внутренней структуры бактериальной клетки и сделайте соответствующие обозначения цифрами:

- 1) клеточная стенка;
- 2) цитоплазматическая мембрана;
- 3) нуклеоид;
- 4) цитоплазма;
- 5) рибосома;
- 6) мезосомы;
- 7) включения запасных питательных веществ.

Истинные бактерии имеют различную форму. Изобразите на рисунке разнообразие шаровидных, палочковидных, извитых и нитчатых форм.

Сделайте соответствующие подписи (монококки, диплококки, тетракокки и т.д.).

	Шаровидные Палочковидные Извитые Нитчатые	
--	----------------------------------------------------	--

Различают бациллярное, кластридиальное и плектридиальное расположение спор (дать рисунок).

Отдельные бактерии способны к передвижению. Проанализируйте различные способы и скорость движения. Изобразите на ри-

сунке бактерии с различным числом и расположением жгутиков. Назовите их. Отметьте формы, которым присуще скользящее движение.

К прокариотам также относятся микоплазмы и актиномицеты. Изучите особенности строения этих групп прокариот. Отрадите это на рисунке

Микоплазмы

Актиномицеты

У прокариотных микроорганизмов существуют различные способы размножения: от простого деления до образования спораносцев и спор. Чтобы легче запомнить этот материал, заполните таблице 11

Таблица 11 Способы размножения

Группы микроорганизмов	Способы размножения
Истинные бактерии Кокки, палочковидные Миксобактерии Почкующиеся Актиномицеты Микоплазмы	

Все прокариотные микроорганизмы характеризуются высокими темпами размножения. Представьте в виде кривой фазы роста бактериальной культуры на питательной среде. Укажите названия этих фаз.

10.2 Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы

Составьте конспект - таблицу по прилагаемому образцу.

Таблица 12 Отношение микробов к температуре

Психрофилы			Мезофилы			Термофилы		
мин.	опт.	мак	мин.	опт.	мак.	мин.	опт.	мак.

Таблица 13 Влияние концентрации водородных ионов

Микроорганизмы	Показатели pH		
	4,5-3,0	4,7-7,2	6,8-8,1
Бактерии Актиномицеты Грибы Водоросли			

Таблица 14 Отношение микробов к аэрации

Микроорганизмы	Аэробы	Анаэробы	
		облигатные	факультативные
Плесневые грибы Дрожжи Азотобактер Актиномицеты Бациллы: Клостридиум Бактерии: Молочнокислые Нитрифицирующие Клубеньковые Денитрифицирующие Уксуснокислые			

В природных субстратах популяции микроорганизмов существуют не изолированно, а в тесном контакте друг с другом. Основными типами взаимоотношений являются: симбиоз, метабиоз, антагонизм, паразитизм.

Таблица 15 Взаимоотношения микроорганизмов в почве
(приведите конкретные примеры)

Взаимоотношения	Среди микроорганизмов	Между микроорганизмом и растением
Симбиоз Метабиоз Антагонизм Паразитизм		

10.3 Обмен веществ

Обмен веществ представляет собой совокупность двух взаимосвязанных процессов – анаболизма (конструктивный обмен) и катаболизма (энергетический обмен)

Усвоенный материал изложите в таблице 16 с указанием представителей.

Укажите в таблице 17 из каких мономеров строятся в микробной клетке сложные органические вещества.

Таблица 16 Способы получения энергии микробами

Способы получения	Исходные вещества	Конечные продукты	Источник кислорода (свободный, связанный)	Представители
Аэробное дыхание Анаэробное (нитратное дыхание) Неполное окисление органических вещества Брожение				

Таблица 17 Синтез органических веществ

Органические вещества	Мономеры				
	Аминокислоты	Моносахара	Нуклеотиды	Жирные кислоты	Глицерин
Белки Липиды Полисахариды Нуклеиновые кислоты					

Таблица 18 Отметьте типы питания микроорганизмов

Типы питания	Источник энергии	Источник углерода	Микроорганизмы
Фотоавтотрофы (фотолитотрофы) Фотогетеротрофы (фотоорганотрофы) Хемоавтотрофы (хемолитотрофы) Хемогетеротрофы (хемоорганотрофы) Сапрофиты Паразиты			

10.4 Превращение микроорганизмами соединений углерода

Специалисту с.-х. производства необходимо знать процессы консервирования кормов и овощей.

Составьте динамику микробиологических процессов созревания силоса.

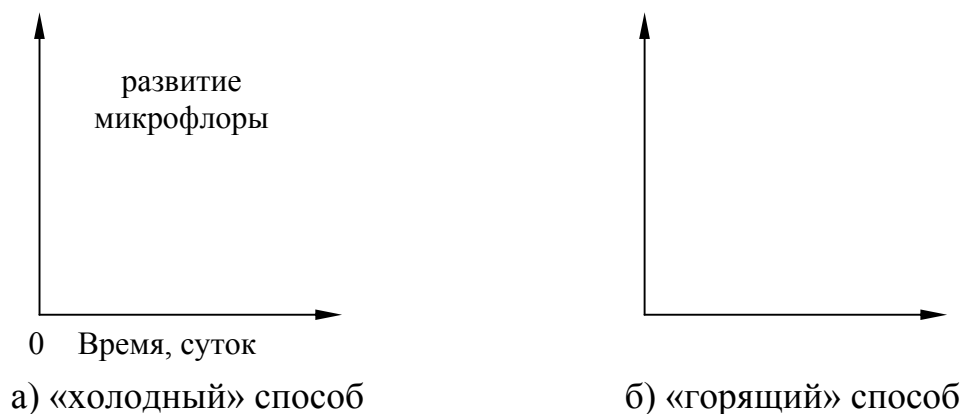


Рисунок 6

Динамика микробиологических процессов созревания силоса
 Время
 _____ – молочнокислая микрофлора
 ----- – маслянокислая микрофлора
 – грибная микрофлора

Таблица 19 Консервирование сельскохозяйственной продукции и микробиологические консерванты (сушка сена, силосование, квашение овощей, дрожжевание кормов и т.д.)

Название продукции	Способ консервирования	Условия среды, активизирующие процесс	Консервант	Примечание

10.5 Превращение микроорганизмами соединений азота

Агроному необходимо иметь ясное представление о химизме превращений соединений азота и их значение для сельского хозяйства. Заполните таблицу 20 по круговороту азота в природе.

Таблица 20 Круговорот азота в природе

Название процесса	Исходные соединения	Конечные соединения	Микроорганизмы, участвующие в процессе	Условия, благоприятствующие процессу	Значение
Аммонификация					
Нитрификация					
1-фаза					
2-фаза					
Денитрификация					
Азотфиксация:					
свободноживущие					
симбиотические					

Укажите азотфиксирующие микроорганизмы и дайте их морфологическую характеристику

Таблица 21 Азотфиксирующие микроорганизмы почвы

Живущие в симбиозе		Свободноживущие	
с бобовыми растениями	с небобовыми растениями	Аэробные	анаэробные

Синтез микроорганизмами белка и биологически активных веществ

Укажите в таблице 22 продуценты биологически активных веществ (ответ не должен быть однозначным).

Таблица 22 Использование продуктов микробного синтеза в растениеводстве и животноводстве

Продуценты	Кормовой белок	Аминокислоты	Витамины	Гиббереллины
Назовите микробов, обозначьте знаком (+) вещества, в биосинтезе которых их используют				

Назовите в таблице 23 процессы и конечные продукты в круговороте азота в почве.

Таблица 23 Роль ферментов в превращении соединений азота

Исходный материал	Ферменты	Название процесса	Конечный продукт
Белок	Протеазы		
Мочевина	Уреаза		
Хитин	Хитиназа		
Аммиак	Трансаминаза		
Селитра	Нитратредуктаза		
Азот	Нитрогеназа		

Какая кривая верно отражает динамику азотфиксации клубеньковыми бактериями в зависимости от влажности почвы?

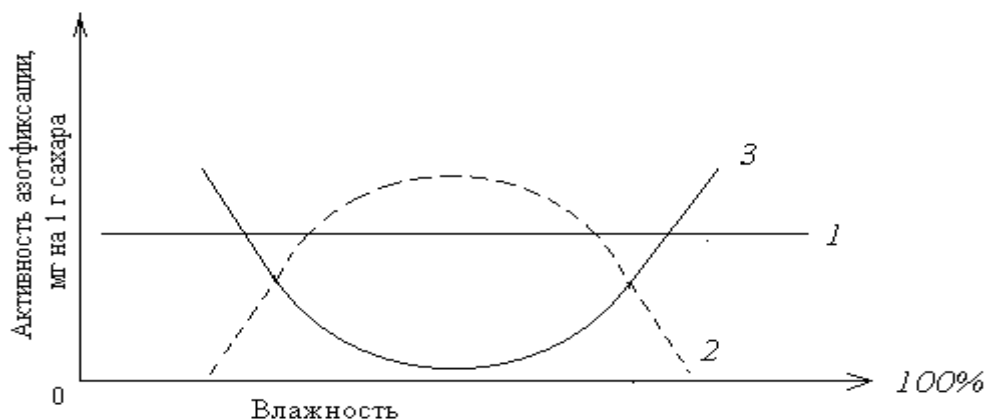


Рисунок 7

Динамика азотфиксации клубеньковыми бактериями

10.6 Микробиологические препараты для борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных культур

Таблица 24 Антибиотики в растениеводстве и животноводстве

Название	Продуценты	Против каких заболеваний применяются	Способ применения
Трихотецин Фитобактериомицин и т.д.			

Таблица 25 Назначение микробиологических препаратов в защите растений

Препараты	Назначение				
	Против вредителей			Против грызунов	Антагонисты против корневых гнилей
	бактериальные	грибные	вирусные		

Таблица 26 Способы применения биологических препаратов в защите растений

	Энтобакте-рин	Антибиотики	Боверин	Триходермин
Обработка семян				
Опрыскивание растений				
Внесение в почву				

Укажите преимущества биологического метода защиты растений перед химическими и физическими методами 1), 2), 3), 4)...

Проставьте в соответствующей графе знак (+)

Таблица 27 Биологические методы защиты растений от вредителей и грызунов

Препараты	Вредные организмы			
	Мыши, крысы	Колорадский жук	Плодожорка	Сибирский шелкопряд
Энтобактерин Дендробациллин Бактериоденцид Боверин и т.д.				

Заполните таблицу 28 по бактериальным удобрениям.

Таблица 28 Бактериальные удобрения и техника их применения в сельском хозяйстве

Название удобрений	Тип удобр. (порошок, торф, суспензия)	Под какие культуры вносятся	Какой процесс активизируется	Способ применения	Нормы внесения	Срок годности	Возможные прибавки урожая

11 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ИЗУЧЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ, ВОПРОСЫ И ТЕСТЫ САМОКОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ

11.1 Цели и задачи дисциплины, сфера профессионального использования

Основная цель изучения дисциплины «Микробиология» в вузе – формирование представлений теоретических знаний, практических умений и навыков по научным основам биологических процессов для сохранения и воспроизводства плодородия почв, методам и способам применения биологических препаратов, хранения органических удобрений, консервирования кормов и овощей.

Задачами дисциплины является изучение:

– методов микроскопирования микроорганизмов, их культивирования, идентификации по морфологическим, культуральным и физиологическим признакам для систематики микроорганизмов;

- биологических значений микроорганизмов, подтверждающих своим существованием теорию биохимического единства жизни и их экологических возможностей в окружающей среде;
- действия микроорганизмов и их метаболитов на биологическую активность почвы и взаимоотношения микроорганизмов и растений.

11.1.1 Сфера профессионального использования

Студент должен знать и уметь использовать:

- теоретические и практические основы микробиологии;
- систематику, морфологию, физиологию, метаболизм микроорганизмов;
- методы определения почвенных микроорганизмов, их состав и активность;
- системы использования почвы и микробиологические основы повышения ее плодородия;
- превращение микроорганизмами соединений углерода, азота, фосфора, серы, железа и др. и регулирование агротехническими приемами;
- методы и способы консервирования кормов и овощей;
- применение в сельском хозяйстве микробных препаратов, метаболитов для защиты и стимуляции роста растений.

Раздел 11.2.1 Предмет, объекты, истории и задачи микробиологии

Раздел 11.2.2 Микроорганизмы, их систематика, морфология, строение и размножение

Раздел 11.2.3 Генетика микроорганизмов

Раздел 11.2.4 Микроорганизмы и окружающая среда

Раздел 11.2.5 Взаимоотношения микроорганизмов между собой и другими существами

Раздел 11.2.6 Питание микроорганизмов

Раздел 11.2.7 Метаболизм микроорганизмов

Раздел 11.2.8 Превращение микроорганизмами соединений углерода

Раздел 11.2.9 Превращение микроорганизмами соединений азота

Раздел 11.2.10 Биологическая фиксация молекулярного азота

Раздел 11.2.11 Превращение микроорганизмами соединений серы, фосфора, железа и других элементов

Раздел 11.2.12 Биосинтез микроорганизмов белка и биологически активных веществ

Изучив раздел 11.2.1, студент должен знать:

- характеристику основных групп микроорганизмов: бактерий, микроскопических грибов, водорослей, простейших вирусов;
- роль микроорганизмов в охране окружающей среды и общебиологических задач;
- историю возникновения и развития микробиологии;
- вклад русских и зарубежных ученых в становлении и развитии сельскохозяйственной микробиологии.

Студент должен уметь:

- распознавать под микроскопом микроорганизмы;
- характеризовать основные группы микроорганизмов, их распространение и роль в круговороте веществ в природе;
- характеризовать научные направления ученых в области микробиологии.

При изучении раздела 11.2.1 студенты должны прослушать лекции, самостоятельно проработать соответствующий раздел учебника.

Раздел 11.2.2 Микроорганизмы, их систематика, морфология, строение и размножение

Изучив раздел 11.2.2, студент должен знать:

- общие признаки и разнообразие микроорганизмов;
- основные принципы классификации;
- строение клеток прокариот, их размножение;
- фазы кривой роста, их особенности.

Студент должен уметь:

При изучении раздела 11.2.2 студентам необходимо прослушать лекции и отработать лабораторные занятия, самостоятельно проработать раздел учебника.

Следует сделать акцент на понятия: значение морфологических, цитологических, культуральных, физиологических и биохимических признаков для систематики микроорганизмов. Современные методы исследования микробной клетки: оптическая и электронная микроскопия, цитохимические и физико-химические методы.

Реакция таксиса у микроорганизмов (хемотаксис, аэротаксис, фототаксис).

Для самооценки уровня знаний по изучаемому разделу ответить на вопросы:

- 1) Что понимается под филогенетической, генетической, нумерической систематикой?
- 2) Что такое ДНК- и РНК-геномные, сложные и простые вирусы?

- 3) Чем отличается строение клеток прокариота от эукариота?
- 4) Как происходит образование спор у бактерий и какую функцию она выполняет в жизни клетки?

Раздел 11.2.3 Генетика микроорганизмов

Изучив раздел 11.2.3, студент должен знать:

- механизмы, вызывающие изменение генетической информации;
- генетические рекомбинации у прокариот – трансформация, конъюгация, трансдукция;
- генная инженерия в микробиологии.

Студент должен уметь:

- практически использовать достижения генетики микроорганизмов и генной инженерии в микробиологии.
- способы получения ценных форм микроорганизмов для сельского хозяйства и биотехнологической промышленности.

При изучении раздела 11.2.3 студенты должны самостоятельно проработать соответствующий раздел учебника.

Следует сделать акцент на следующие понятия: модификация, мутация, рекомбинация, трансформация, трансдукция, плазмиды бактерий.

Для самооценки уровня знаний по изучаемому разделу ответить на вопросы:

- 1) Назовите наследственные факторы микроорганизмов.
- 2) Как происходит синтез белка в клетках микробов?
- 3) Что понимается под мутагенными факторами?
- 4) Что такое внехромосомные факторы наследственности?
- 5) В каких областях применяются достижения генетики микроорганизмов и генная инженерия?

Раздел 11.2.4 Микроорганизмы и окружающая среда

Изучив раздел 11.2.4, студент должен знать:

- зависимость микроорганизмов от водного режима среды, критические температурные точки;
- отношение микроорганизмов к кислороду, значение рН в их жизнедеятельности;
- природу и происхождение (абиотических, биотических) антимикробных веществ.
- Микробостатический и микробоцидный эффект.

Студент должен уметь:

- определять оптимальные, минимальные, максимальные значения температуры, влажности среды, рН кислорода и др. для жизнедеятельности микроорганизмов.

– Применять различные антимикробные соединения, важнейшие химиотерапевтические препараты, дезинфицирующие и стерилизующие, консервирующие средства.

При изучении раздела 11.2.4 студенты должны прослушать лекции, самостоятельно проработать соответствующий раздел учебника.

Для самооценки уровня знаний по изучаемому разделу ответить на вопросы:

1) Каково отношение микроорганизмов к различным факторам внешней среды?

2) В чем суть критических температурных точек, значения рН, кислорода и др. в жизнедеятельности микроорганизмов?

3) Какими методами можно предупредить развитие микроорганизмов?

4) Что понимается под микробостатическим и микробоцидным эффектом?

Раздел 11.2.5 Взаимоотношения микроорганизмов между собой и другими существами

Изучив раздел 11.2.5, студент должен знать:

– характер взаимоотношений между микроорганизмами и другими существами;

– сапрофитные и паразитические микроорганизмы высших растений, животных и человека;

При изучении раздела 11.2.5 студент должен прослушать лекцию и самостоятельно проработать раздел учебника.

Следует сделать акцент на понятия: метабиоз, симбиоз (протокоперация, комменсализм, мутуализм) антагонизм, паразитизм, хищничество.

Следует должен уметь:

– практическое использование симбиоза в сельском хозяйстве.

Для самооценки уровня знаний по изучаемому разделу ответить на вопросы:

1) Какие микроорганизмы относятся к сапрофитам и паразитам?

2) Что понимается под инфекцией и иммунитетом у растений, животных и человека?

3) Назовите хищные бактерии и грибы?

4) Как осуществляются взаимоотношения между микроорганизмами между собой и другими существами?

Приведите примеры.

Раздел 11.2.6 Питание микроорганизмов

Изучив раздел 11.2.6, студенты должны знать:

– Способы питания, поступление питательных веществ в клетку.

- Источники углерода, азота и другие элементы для разных групп микроорганизмов;
- Типы питания у микроорганизмов;
- Характеристику автотрофного и гетеротрофного типов питания;

Студент должен уметь:

- определять потребности микроорганизмов в различных источниках углерода, азота и других элементов;
- приготовить питательные среды для культивирования микроорганизмов;

При изучении раздела 11.2.6 студенты должны прослушать лекции, отработать лабораторные занятия, самостоятельно проработать соответствующий раздел учебника.

Для самооценки уровня знаний по изучаемому разделу ответить на вопросы:

- 1) Что такое фототрофия и хемотрофия?
- 2) Открытие хемосинтеза С.Н. Виноградским.
- 3) Какие органические и минеральные соединения азота используют микроорганизмы и их роль в обмене веществ?
- 4) Какие источники углерода используют микроорганизмы для своего питания?

Раздел 11.2.7 Метаболизм микроорганизмов

Изучив раздел 11.2.7, студент должен знать:

- катаболизм и биосинтез;
- ферменты микроорганизмов и их роль в жизнедеятельности микроорганизмов;
- химическую природу, сущность действия и классификацию ферментов;
- способы получения микроорганизмами энергии и пути ее превращения;
- пути сбраживания углеводов;
- химизм и энергетику различных бактерий;
- дыхательную цепь и систему переноса электронов; у аэробных и анаэробных микроорганизмов;
- окисления неорганических соединений;
- использование лучистой энергии;
- биосинтез аминокислот, белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов и других важнейших компонентов клеток микроорганизмов;

Студент должен уметь:

- использовать практическое значение процессов брожений;
- применять тепловую энергию, выделяемую микроорганизмами, в сельском хозяйстве (овощеводстве закрытого грунта);
- технологические процессы биосинтеза аминокислот, белков, углеводов, липидов.

При изучении раздела 11.2.7 студенты должны прослушать лекцию и самостоятельно проработать соответствующий раздел учебника.

Раздел 11.2.8 Превращение микроорганизмами соединений углерода

Изучив раздел 11.2.8, студент должен знать:

- значение процессов превращений углеродсодержащих веществ в круговороте в природе и роль микроорганизмов в фитогенном распаде органического вещества;
- значение молочнокислого брожения в пищевой промышленности, быту и при силосовании кормов;
- основные факторы, определяющие правильное течение микробиологических процессов, идущих при квашении и силосовании;
- процессы брожения, вызываемые бактериями рода клостридиум;
- микроорганизмы, разрушающие клетчатку, гемицеллюлозу, лигнина, жиров и их химизмы.

Студент должен уметь:

- использовать молочнокислые бактерии при получении молочной кислоты, кисломолочных продуктов и консервировании продуктов сельского хозяйства;
- определять возможные пороки консервированных продуктов и силоса.
- распознавать причины порчи, пороки консервированных продуктов, силоса и сенажа и пути их предупреждения;
- использовать дрожжи в спиртовой промышленности, виноделии, пивоварении, хлебопечении;
- определять микроорганизмы, вызывающие брожение пектиновых веществ, клетчатки, лигнина и подчеркнуть их значение в природе и почве.

При изучении раздела 11.2.8 студенты должны прослушать лекцию и отработать лабораторное занятие, самостоятельно проработать соответствующий раздел учебника.

Следует сделать акцент на понятия: гомоферментативное и гетероферментативное молочнокислое брожение. Химизм этих процессов. Причины и условия переключения спиртового брожения на глицериновое. Значение в природе и в сельском хозяйстве процессов брожений и окислений соединений углерода.

Для самооценки уровня знаний по изучаемому разделу ответить на вопросы:

1) Какие особенности технологии приготовления силоса и сенажа?

2) Что требуется для правильного силосования и сенажа в траншеях;

3) Какие основные факторы, определяющие правильное течение микробиологических процессов, идущих при квашении и силосовании?

4) Оптимальная влажность и качественные показатели силоса и сенажа;

5) Назовите основные свойства возбудителей масляно-кислого брожения, брожения клетчатки, пектиновых веществ;

6) Практическое использование микроорганизмов, усваивающих углеводороды;

Разделы 11.2.9; 11.2.10; 11.2.11; 11.2.12 Превращение микроорганизмами соединений азота, серы, фосфора, железа

Изучив разделы 11.2.9; 11.2.10; 11.2.11; 11.2.12, студент должен знать:

– значение аммонификации азотсодержащих органических соединений;

– характеристику возбудителей и ход процесса аммонификации в аэробных и анаэробных условиях;

– улетучивание аммиака из почвы и при хранении навоза;

– условия накопления аммиака в почве;

– положительную и отрицательную роль нитрификации в плодородии почвы;

– биологическую и абиологическую фиксацию азота;

– связь фиксации азота с фотосинтезом высших растений;

– условия, благоприятствующие симбиотической фиксации молекулярного азота;

– масштабы биологической азотфиксации в природе и методы ее исследования;

– сочетание биологического и минерального азота в сельском хозяйстве РБ;

- биотехнологические принципы управления биологической азотфиксацией в почве;
- значение сульфатфикации в плодородии почвы;
- роль микроорганизмов в фосфорном питании растений в почве;
- микроорганизмы, восстанавливающие соединения железа, и процессы оглеения почв;
- перспективы получения биотехнологическими методами новых форм продуцентов, биологически активных соединений с заранее заданными свойствами.

Студент должен уметь:

- характеризовать возбудителей и ход процесса аммонификации в анаэробных условиях;
- регулировать процесс денитрификации агротехническими приемами;
- определить экологию свободноживущих фиксаторов азота;
- характеризовать свойства клубеньковых бактерий, определяющих эффективность симбиоза;
- выявить возможную роль микроорганизмов в процессах превращений соединений серы, фосфора, железа и других элементов в питании растений;
- использовать микробные метаболиты для стимуляции роста растений и животных.

При изучении разделов 11.2.9; 11.2.10; 11.2.11; 11.2.12 студенты должны прослушать лекцию и отработать лабораторное занятие, самостоятельно проработать соответствующие разделы учебника.

Следует сделать акцент на понятия: причины порчи сельскохозяйственной продукции и возможности ее предупреждения, значение соотношения C:N

В органическом веществе в процессах минерализации и мобилизации азота в почве, возможность окисления аммиака гетеротрофными микроорганизмами, свободноживущие азотфиксаторы, азотфиксирующие актиномицеты – франкна и их симбиоз с небобовыми растениями, синтез и сверх синтез микроорганизмами аминокислот, особенно незаменимых.

Для самооценки уровня знаний по изучаемым разделам ответить на вопросы:

- 1) Какие азотсодержащие соединения подвергаются аммонификации?

- 2) Какими агротехническими приемами возможно регулирование соотношения C:N?
- 3) Какие эффективные меры борьбы с потерями азота из почвы при денитрификации?
- 4) Какие абиотические факторы влияют на развитие свободноживущих и симбиотических азотфиксирующих бактерий?
- 5) В чем заключается положительное значение нитрификации в почве?
- 6) Какой источник углерода используют нитрифицирующие бактерии?
- 7) Назовите свойства клубеньковых бактерий.
- 8) Каковы особенности генетического и биохимического аспекта фиксации молекулярного азота?
- 9) Какие эффективные приемы способствуют азотфиксации микроорганизмами?
- 10) Назовите микроорганизмы и их роль в превращениях соединений серы, фосфора, железа и других элементов.
- 11) Назовите способы использования микробных метаболитов для стимуляции роста растений и животных.

11.3 Почвенная микробиология

Раздел 11.3.1 Развитие взглядов на роль микроорганизмов в образовании почв

Изучив раздел 11.3.1, студент должен знать:

- значение работ В.В. Докучаева, П.А. Костычева, В.А. Сукачева, Б.Б. Польшова и других для развития биологического направления в почвоведении;
- периоды становления почвенной микробиологии и работы С.Н. Виноградского, М.С. Бейеринка, С.А. Ваксимана, В.Л. Омелянского, Н.Г. Холодного, Н.А. Красильникова, С.П. Костычева, Е.Н. Мишустина и др. о сообществах микроорганизмов разных типов почв.

Студент должен уметь:

- характеризовать особенности современного состояния почвенной микробиологии – развитие нового направления - почвенной биотехнологии.

При изучении раздела 11.3.1 студенты должны прослушать лекции и самостоятельно проработать соответствующий раздел учебника.

Следует сделать акцент на понятия: почва, как живая система, геохимические функции почвенных микроорганизмов, анализ основных направлений работ по почвенной микробиологии.

Для самооценки уровня знаний по изучаемому разделу ответить на вопросы:

- 1) Назовите периоды становления почвенной микробиологии.
- 2) Перечислите ученых внесших вклад в развитие почвенной микробиологии.
- 3) В чем состоит особенность современного состояния почвенной микробиологии – развитие нового направления – почвенной биотехнологии?

Раздел 11.3.2 Почвенное микронаселение, методы определения его состава и активности

Изучив раздел 11.3.2, студенты должны знать:

- влияние факторов внешней среды на микрофлору почвы;
- понятия микробных популяций, времени генераций и скорости роста;
- типы взаимоотношений микроорганизмов с микроорганизмами, с высшими растениями;
- методы определения состава микроорганизмов и суммарной биохимической их активности.

Студент должен уметь:

- определять численность важнейших групп микроорганизмов почвы;
- характеризовать групповой состав микроорганизмов различных типов почв;

При изучении раздела 11.3.2 студенты должны прослушать лекции, отработать лабораторные занятия, самостоятельно проработать соответствующий раздел учебника.

Для самооценки уровня знаний по изучаемому разделу ответить на вопросы:

- 1) Какое влияние оказывает на жизнедеятельность микроорганизмов засоление и осмотическое давление почвы?
- 2) Назовите методы определения суммарной биохимической активности почвенного микронаселения.
- 3) Кем предложен метод прямого микроскопирования микроорганизмов почвы?
- 4) Как вы понимаете метод предельных разведений?

Раздел 11.3.3; 11.3.4; 11.3.5; 11.3.6 Процесс образования почв и деятельность микроорганизмов. Факторы среды, определяющие развитие микробного ценоза почвы

Изучив разделы, студенты должны знать:

- роль микроорганизмов в образовании и разрушении перегноя, агрегатировании и формировании почвенной структуры;
- роль температуры, влажности, кислотности, механического состава почвы на активность микроорганизмов;
- анализ процессов накопления и распада гумуса в различных почвенных типах в зависимости от направленности микробиологических процессов;
- влияние разных способов обработки почвы на характер микробиологических процессов в почве;
- влияние мелиорации почв на микробиологические процессы и состав микронаселения.

Следует сделать акцент на понятия: роль микроорганизмов в формировании почвенной структуры, деятельность микроорганизмов при сочетании температуры и влажности, отражение горизонтальной и вертикальной поясности в составе микробного населения почв, гетерогенное распределение и активность микроорганизмов в пахотном слое почвы.

Для самооценки уровня знаний по изучаемым разделам ответить на вопросы:

- 1) Какие методы позволяют определить численность и состав отдельных групп микроорганизмов в почве?
- 2) Как установить быстроту распада в почве определенного химического вещества?
- 3) Чем определяется изменение численности микроорганизмов по сезонам года при окультивировании почвы?
- 4) На чем основано выделение основных типов «стратегов» микроорганизмов?
- 5) Какие изменения претерпели взгляды ученых на воздействие обработки почвы на почвенное микронаселение со времен формирования теории обработки почвы В.Р.Вильямсом?
- 6) Какое влияние оказывает внесение извести и гипса на отдельные группы микроорганизмов?

Раздел 11.3.7 Системы использования почвы и микробиологические основы повышения ее плодородия

Изучив раздел, студенты должны знать:

- роль биологического и технического азота в земледелии;

- биологический азот как источник белка и удобрений;
- значение одно- и многолетних бобовых растений как азотфиксаторов;
- влияние гербицидов и других токсических соединений (пестицидов) на почвенную микрофлору;
- влияние севооборотов и монокультур на микрофлору почвы;
- принципы управления микробиологическими процессами с целью повышения плодородия почвы, увеличения урожайности с.-х. культур.

Студент должен уметь:

- определять потребности почв в азоте, фосфоре, калии микробиологическими методами;
- разработать мероприятия для снижения потерь азота при разных способах приготовления навоза;
- разработать приемы повышения коэффициента использования азотных удобрений растением путем подавления денитрификации;
- приемы повышения эффективности связывания азота свободными азотфиксаторами в почве.

При изучении раздела 11.3.7 студенты должны прослушать лекцию, самостоятельно проработать соответствующий раздел учебника.

Следует сделать акцент на понятия: процессы мобилизации и иммобилизации соединений азота, фосфора и других элементов, севообороты и монокультура, химизация земледелия.

Для самооценки уровня знаний по изучаемому разделу ответить на вопросы:

- 1) Какие мероприятия проводятся для активизации деятельности азотфиксаторов в почве?
- 2) Как влияет известкование кислых почв на состав почвенного микронаселения?
- 3) Какие факторы определяют скорость разложения в почве пестицидов?
- 4) Какие перспективы использования процесса биологической азотфиксации в земледелии и растениеводстве РБ?
- 5) Укажите основные отличия в процессах, происходящих при холодном и горячем приготовлении навоза!
- 6) Какое влияние отдельных видов удобрений на развитие микроорганизмов почвы?

Раздел 11.3.8 Взаимоотношения микроорганизмов и растений
Изучив раздел 11.3.8, студент должен знать:

- корневую и прикорневую микрофлору растений;
- влияние отдельных представителей ризосферных микроорганизмов на всхожесть семян и развитие растений;
- повышение полевой всхожести семян путем регулирования состава ризосферных микроорганизмов (протравление, бактеризация и т.д.);
- о микоризе растений и их роль в питании растений;
- роль эпифитных микроорганизмов в жизни растений.

Студент должен уметь:

- определять корневую и прикорневую микрофлору растений;
- регулировать состав ризосферных микроорганизмов с использованием протравителей семян, бактеризацией, созданием внешней среды.

При изучении раздела 11.3.8 студенты должны прослушать лекцию и отработать лабораторное занятие, самостоятельно проработать соответствующий раздел учебника.

Следует сделать акцент на понятия: специфичность микрофлоры корневой зоны разных видов растений, эпифитную микрофлору, микоризу растений и на ее виды.

Для самооценки уровня знаний по изучаемому разделу ответить на вопросы:

- 1) От чего зависит формирование эпифитной микрофлоры?
- 2) Какие виды микроорганизмов могут обитать на поверхности растений?
- 3) Какие основные условия формирования микоризы?

Раздел 11.3.9 Микробные земледобritельные препараты и их эффективность

Изучив раздел 11.3.9, студент должен знать:

- перспективы использования земледобritельных препаратов;
- пути повышения эффективности инокуляции семян бактериями;
- инокуляцию бобовых растений клубеньковыми бактериями, азотобактерином семян овощных культур.

Студент должен уметь:

- подбирать микробные препараты и установить дозы их применения для инокуляции разных с.-х. культур;
- использовать микоризацию растений при посадке плодовых культур и лесонасаждениях;
- технологические процессы приготовления микробных препаратов, предназначенных для инокуляции семян и растений.

При изучении раздела 11.3.9 студенты должны прослушать лекции, отработать лабораторные занятия, самостоятельно проработать соответствующий раздел учебника.

Следует сделать акцент на понятия: инокуляция, эффективность инокуляции, азоспириллиум, цианобактерии и их влияние на растения.

Для самооценки уровня знаний по изучаемому разделу ответить на вопросы:

1) Какие виды микробных препаратов используют для инокуляции семян бобовых растений?

2) Назовите какие микробные препараты применяют для инокуляции семян зерновых и овощных культур.

3) Как используют препарат АМБ?

Раздел 11.3.10 Использование микробов – антагонистов и микробных метаболитов в сельском хозяйстве

Изучив раздел 11.3.10, студенты должны знать:

- роль корневой системы растений в селекции микроорганизмов – антагонистов;

- определять микроорганизмов-антагонистов и антибиотических веществ для борьбы с болезнями растений и профилактики заболеваний; антибиотические вещества, используемые для защиты растений;

- микробиологический метод борьбы с вредными насекомыми;

- препараты микробного происхождения, стимулирующие рост растений.

Студент должен уметь:

- применять антибиотические вещества для борьбы с болезнями растений и профилактики заболеваний;

- использовать бактериальные, грибные, вирусные препараты для защиты растений от вредителей.

При изучении раздела 11.3.10 студенты должны прослушать лекции, самостоятельно проработать соответствующий раздел учебника.

Следует сделать акцент на понятия: самоочищение почвы от паразитических микроорганизмов путем подбора разных видов растений в севообороте; уничтожение грызунов с помощью микробиологических препаратов; антибиотические вещества.

Для самооценки уровня знаний по изучаемому разделу ответить на вопросы:

1) Какие антибиотические вещества используются для защиты растений?

2) Назовите препараты микробного происхождения, стимулирующие рост растений.

Раздел 11.3.11 Микробиология кормов

Изучив раздел 11.3.11, студент должен знать:

- биотехнологические методы приготовления и хранения растительных кормов;
- методы силосования кормов;
- условия, способствующие правильному развитию процесса силосования;
- химические и микробиологические показатели качества силоса и сенажа;
- микрофлору комбикормов и корнеплодов.

Студент должен уметь:

- определять химические и микробиологические показатели качества кормов;
- подбирать культуры для силосования сенажа;
- применять заквасы и химические консерванты при силосовании кормов;
- установить сроки уборки культур для силосования и сенажирования.

При изучении раздела 11.3.11 студенты должны прослушать лекцию и отработать лабораторное занятие, самостоятельно проработать соответствующий раздел учебника.

Следует сделать акцент на понятия: обыкновенное и бурое сено; самосогревание сена, зерновых кормов; кормовые токсикозы; буферность растений; дрожжевание кормов.

Для самооценки уровня знаний по изучаемому разделу ответить на 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?

Раздел 11.3.12 Использование продуктов микробного синтеза в питании животных

Изучив раздел 11.3.12, студент должен знать:

- значение белка, аминокислот, антибиотиков, синтезируемого микроорганизмами в питании животных;
- применение аминокислот и витаминов микробного происхождения для кормовых целей.

Студент должен уметь:

- применять белки, аминокислоты, витамины, антибиотики в питании животных.

При изучении раздела 11.3.12 студенты должны прослушать лекции, самостоятельно проработать соответствующий раздел учебника.

Следует сделать акцент на понятия: синтез белка на понятия: синтез белка на углеводородах; механизм действия антибиотиков.

Для самооценки уровня знаний по изучаемому разделу ответить на вопросы:

- 1) Как осуществляется синтез белка на углеводородах?
- 2) В чем преимущество использования белка, синтезируемого микроорганизмами перед растительным белком?

11.4 Тесты для итогового контроля знаний студентов

11.4.1 Определения и термины

- 1) Вирусы грибов называют _____
- 2) Вирусы бактерий называют _____
- 3) Образование АТФ, когда роль донора и акцептора водорода выполняют органические соединения называется _____
- 4) Полная или частичная зависимость развития одного организма (паразита) от другого (хозяина) называется _____
- 5) Микробы, развивающиеся при концентрации соли от 1 до 10% называются умеренные _____
- 6) Микроорганизмы, не имеющие истинного оформленного ядра, называются _____
- 7) Шаровидные клетки, соединенные в цепочку, называются _____
- 8) Шаровидные бактерии в виде виноградной грозди называются _____
- 9) Микроорганизмы, использующие углерод органических соединений, называются _____

- 10) Микроорганизмы, использующие энергию солнца, называются _____
- 11) Микроорганизмы, развивающиеся при высоких температурах, называются _____
- 12) Микроорганизмы, развивающиеся при низких температурах, называются _____
- 13) Микроорганизмы, развивающиеся при pH 4.0-4.5, называются _____
- 14) Микроорганизмы, развивающиеся в отсутствие кислорода, называются _____
- 15) Микроорганизмы, развивающиеся при высоких концентрациях соли, называются _____
- 16) Микроорганизмы, завершающие минерализацию органических соединений, называются _____
- 17) Третий путь образования пировиноградной кислоты из глюкозы называется _____
- 18) Анаэробный окислительно-восстановительный энергодающий процесс, при котором роль донора и акцептора водорода играют органические соединения, называется _____
- 19) Расы дрожжей, ведущие брожение при 14-25°C, используемые в спиртовой промышленности и хлебопечении, называются _____
- 20) Расы дрожжей, адаптированные к жизнедеятельности при низких температурах (6-10°C), используемые в пивоварении и виноделии, называются _____
- 21) Тип молочнокислого брожения, при котором, кроме молочной кислоты, образуются другие продукты, называется _____
- 22) Тип молочнокислого брожения, при котором образуется только молочная кислота, называется _____
- 23) Молочнокислое брожение в сельском хозяйстве используется при приготовлении _____
- 24) Основную роль в круговороте азота наряду с животными и растениями играет _____
- 25) Элективная для нитрификаторов среда Виноградского содержит азот в форме ионов _____
- 26) При окислении аммиака в нитрит и нитрита в нитрат нитрификаторы получают _____
- 27) Трансформация азотсодержащих органических соединений, недоступных растениям, в аммонийную форму называется _____

28) Усвоение бактериями молекулярного азота называется

29) Восстановление нитратов до молекулярного азота называется

ся

30) Бактерии, фиксирующие азот в клубеньках растений, называются

31) Микроорганизмы зоны корня называются

32) Микроорганизмы поверхности растений называются

11.4.2 Инструкция по выполнению тестовых заданий

1. Задание закрытой формы. Напишите номер правильного ответа.

Вопрос: Какие функции выполняют споры у палочковидных бактерий?

1. движения;
2. размножения;
3. защиты от неблагоприятных условий;
4. прикрепления к субстрату. **Ответ:** 3

2. Задание на установление правильной последовательности.

Вопрос: Эффективность бобово-ризобиального симбиоза.

1. Люцерна;
2. Горох;
3. Люпин. **Ответ:** 1 3 2

3. Задание на установление правильного соответствия.

Вопрос: Клубеньковые бактерии: Растение – хозяин:

- | | |
|-----------------------------|-----------|
| 1. Rhizobium phaseoli; | А) горох |
| 2. Bradyrhizobium Lupine; | Б) фасоль |
| 3. Rhizobium Leguminosarum; | В) Люпин |
| 4. Rhizobium trifolii; | Г) соя |
| | Д) клевер |
| | Е) акация |

Ответ: 1Б, 2В, 3А, 4Д

11.4.3 Общая микробиология

1. Какая цель достигается при использовании иммерсионной системы микроскопа?

1. повышение разрешающей способности микроскопа;
2. улучшение четкости изображения;
3. ухудшение видимости.

2. Что должно находиться между «иммерсионным» объективом микроскопа и препаратами?

1. вода;
2. кедровое масло;
3. воздух;
4. покровное стекло.

3. Какие увеличения характерны для «сухих» объектов?

1. $\times 90 - 1$;
2. $\times 40 - 2$;
3. $\times 8 - 3$;
4. $\times 3 - 4$.

4. Какое из значений разрешающей способности электронного микроскопа обеспечивает наиболее четкое изображение?

1. 25А-1;
2. 5А-2;
3. 10А-3;
4. 2А-4.

5. У каких систем микроскопа разрешающая способность выше?

1. иммерсионных;
2. сухих.

6. Какой метод используется для приготовления живых препаратов?

1. метод фиксированных крашенных препаратов;
2. метод раздавленной капли.

7. Что должно находиться между «сухим» объективом и препаратом?

1. вода;
2. кедровое масло;
3. воздух;
4. покровное стекло.

8. Какое из увеличений имеет иммерсионный объектив?

1. $\times 90 - 1$;
2. $\times 40 - 2$;
3. $\times 8 - 3$;
4. $\times 3 - 4$.

9. Какое из значений разрешающей способности светового микроскопа обеспечивает наиболее четкое изображение?

1. 0,44 мкм;
2. 0,2 мкм;

3. 0,8 мкм;

4. 1,0 мкм.

10. Что выполняет роль иммерсионной жидкости в иммерсионной системе микроскопа?

1. вода;

2. кедровое масло;

3. раствор фуксина.

11. Какое сочетание «объектив-окуляр» обеспечивает лучшее изображение препарата?

1. 90×8;

2. 40×24.

12. Какие из шаровидных бактерий соединены в виде цепочки?

1. монококки;

2. тетракокки;

3. стрептококки;

4. стафилококки;

5. сарцины.

13. У каких бактерий более извитые клетки?

1. вибрионов;

2. спирохет;

3. сарцин;

4. стрептококков.

14. Какие из бактерий имеют по одному жгутику?

1. лофотрихи;

2. монотрихи;

3. перитрихи;

4. амфитрихи.

15. Что общего у актиномицетов и бактерий?

1. размножение спорами;

2. жгутики;

3. форма клетки;

4. одноклеточность;

5. многоклеточность.

16. Какие функции выполняют споры у палочковидных бактерий?

1. движения;

2. размножения;

3. защиты от неблагоприятных условий;

4. прикрепления к субстрату;
5. накопления запасных питательных веществ.

17. Назовите палочковидную бактерию:

1. *Bacillus mycoides*;
2. *Vibrio sp*;
3. *Mirococcus agilis*;
4. *Spirillum sp*;
5. *Sarcina flava*.

18. Сколько плоскостей деления имеют сарцины?

1. одну;
2. две;
3. три;
4. четыре;
5. не имеют.

19. Какие бактерии относятся к извитым?

1. микрококки;
2. сарцины;
3. бациллы;
4. стрептококки;
5. спириллы.

20. Какие бактерии образуют споры?

1. спириллы;
2. кокки;
3. бациллы;
4. спирохеты;
5. вибрионы.

21. Где наиболее распространены железобактерии?

1. воде;
2. навозе;
3. навозной жиже;
4. ротовой полости;
5. воздухе.

22. Каким формам бактерий присуща способность образовывать споры?

1. нитчатым;
2. спирадевидным;
3. палочковидным;
4. шаровидным;
5. серповидным.

23. Какие из следующих структур клетки ответственны за движение?

1. споры;
2. жгутики;
3. фимбрии;
4. нуклеус.

24. Назовите шаровидную бактерию:

1. *Micrococcus agilis*;
2. *Bacillus mycoides*;
3. *Vibrio sp.*;
4. *Spirillum sp.*

25. Какие функции выполняют споры актиномицетов?

1. движения;
2. сохранения в природе;
3. размножения;
4. накопления запасных питательных веществ;
5. прикрепление к субстрату.

26. Какие из бактерий покрыты жгутиками по всей поверхности клетки?

1. монотрихи;
2. перитрихи;
3. лофотрихи.

27. Что общего у актиномицетов и грибов?

1. размножение спорами;
2. жгутики;
3. ширина клетки;
4. фимбрии;
5. наличие ядерной мембраны.

28. Назовите извитую бактерию:

1. *Micrococcus agilis*;
2. *Vibrio sp.*;
3. *Bacillus mycoides*;
4. *Actinomyces chromogenes*.

29. Перечислите основные особенности актиномицетов:

1. занимают промежуточное положение между дрожжами и грибами;
2. занимают промежуточное положение между бактериями и грибами;
3. размножаются спорами;

4. имеют мицелий;
5. не имеют мицелия.

30. Назовите ферменты, не относящиеся к эндоферментам:

1. гидролазы;
2. оксидоредуктазы;
3. изомеразы;
4. лигазы;
5. лиазы.

31. Какой источник углерода используют автотрофы?

1. этиловый спирт;
2. глюкоза;
3. фруктоза;
4. целлюлоза;
5. углекислота.

32. Какие ферменты играют роль в процессах брожения?

1. целлюлаза;
2. цитохромоксидаза;
3. НАД;
4. липаза;
5. уреазы.

33. Какие ферменты катализируют реакции расщепления сложных соединений на более простые?

1. трансферазы;
2. лигазы;
3. оксидоредуктазы;
4. гидролазы;
5. изомеразы.

34. Назовите группу фотогетеротрофных микроорганизмов:

1. бесцветные серобактерии;
2. несерные пурпурные;
3. нитрификаторы;
4. аммонификаторы;
5. изомеразы.

11.4.4 Микробиологическая трансформация соединений углерода

35. Какие продукты образуются при гомоферментативном молочнокислом брожении?

1. молочная кислота;
2. уксусная кислота;

3. этиловый спирт;
4. углекислый газ;
5. водород.

36. Какие продукты образуются при гетероферментативном молочнокислом брожении?

1. молочная кислота;
2. уксусная кислота;
3. диацетил;
4. этиловый спирт;
5. водород;
6. углекислый газ;
7. глицерин.

37. Отметьте признаки, характерные для группы молочнокислых бактерий:

1. форма клеток-кокки;
2. форма клеток-палочки;
3. образуют споры;
4. не образуют споры;
5. подвижны;
6. неподвижны;
7. требовательны к источникам азота и ростовым веществам;
8. нетребовательны к источникам азота и ростовым веществам.

38. Укажите возбудителей гомоферментативного молочнокислого брожения:

1. *Streptococcus lastis*;
2. *Zactobacillus bulgar*;
3. *Zactobactacidophilus*;
4. *Zeucionostoc*;
5. *Streptococcus cremoris*.

39. Какие источники углерода используют молочнокислые бактерии?

1. целлюлоза;
2. глюкоза;
3. пектиновые вещества;
4. лактоза.

40. Отметьте термофильные молочнокислые бактерии:

1. *Lact. bulgaricus*;
2. *Strept. thermophilus*;
3. *Zactobacillus acidophilus*;
4. *Streptococcus lastis*.

41. Укажите возбудителей гетероферментативного молочно-кислого брожения:

1. *Streptococcus lastis*;
2. *Lact. bulgaricus.*;
3. *Zeusconostoc mesentoroid*.

42. Отметьте значение pH минимальное для развития молочнокислых бактерий:

1. pH 3,0;
2. pH 3,5-4,0.
3. pH 5,5-6,5.

43. К какой группе относятся молочнокислые бактерии по отношению к кислороду?

1. аэробы;
2. анаэробы;
3. факультативные анаэробы;
4. микроаэрофилы.

44. Какие ферменты микроорганизмов принимают участие в расщеплении клетчатки?

1. целлюлаза;
2. уреаза;
3. амилаза;
4. целлобиаза;
5. липаза.

45. Какой продукт образуется на первом этапе гидролиза клетчатки?

1. целлобиоза;
2. лактоза;
3. глюкоза;
4. уксусная кислота.

46. Какие продукты образуются при брожении клетчатки?

1. масляная кислота;
2. уксусная кислота;
3. этиловый спирт;
4. углекислый газ;
5. водород.

47. Укажите мезофильных возбудителей брожения клетчатки:

1. *Clostridium disolvens*;
2. *Clostr. omelianskii*;

3. *Cl.butyricum*;
4. *Saccharom.cerevisiai*.

48. Укажите термофильных возбудителей брожения клетчатки:

1. *Clostridium disolvens*;
2. *Clostr.omelianskii*;
3. *Clostr.thermocellum*;
4. *Saccharom.cerevisiai*.

49. Укажите признаки, характерные для бактерий, сбраживающих клетчатку:

1. образуют споры;
2. не образуют споры;
3. образуют гранулезу;
4. не образуют гранулезу;
5. аэробы;
6. анаэробы.

50. Где локализуется фермент целлюлаза у целлюлозоразлагающих микроорганизмов?

1. на поверхности клетки;
2. в среду выделяется;
3. в среду не выделяется;
4. вблизи нуклеотида.

51. Укажите, где обитают бактерии, сбраживающие клетчатку?

1. в почве;
2. в навозе;
3. в молоке;
4. на поверхности;
5. в рубце жвачных животных.

52. Какие брожения вызывают бактерии рода *Clostridium*?

1. маслянокислое;
2. молочнокислое;
3. маслянокислое брожение пектиновых веществ;
4. спиртовое;
5. брожение клетчатки;
6. ацетонобутиловое.

53. Назовите конечные продукты, образующиеся при брожении веществ:

1. масляная кислота;

2. уксусная кислота;
3. молочная кислота;
4. углекислый газ;
5. водород;
6. глицерин.

54. Укажите ферменты, которые принимают участие в гидролизе пектиновых веществ:

1. протопектиназа;
2. целлюлаза;
3. уреазы;
4. амилаза;
5. полигалактуроназа.

55. Какие продукты образуются при гидролизе пектиновых веществ?

1. галактоза;
2. лактоза;
3. арабиноза;
4. ксилоза;
5. галактуроновая кислота;
6. бутиловый спирт;
7. глицерин;
8. вода.

56. Укажите возбудителей пектинового брожения:

1. Clostr. butyricum;
2. Cl. felsineum;
3. Clostr. pectinovorum;
4. Pseudomonas fluorescens;
5. Azot. chroococcum.

57. Где применяется пектиновое брожение в практике?

1. пивоварение;
2. водяная мочка лубоволокнистых растений;
3. хлебопечение;
4. винокурение;
5. росаяная мочка лубоволокнистых растений.

58. Назовите конечные продукты, образующиеся при окислении пектиновых веществ:

1. масляная кислота;
2. уксусная кислота;
3. углекислый газ;

4. вода;
5. глицерин.

59. Укажите микроорганизмы, окисляющие спирт в уксусную кислоту:

1. Acetobacter;
2. Saccharomyces;
3. Huconobacter;
4. Bacillus;
5. Clostridium.

60. Назовите продукты окисления спирта бактериями:

1. уксусная кислота;
2. масляная кислота;
3. бутиловый спирт;
4. вода;
5. CO₂.

61. Дайте морфолого-физиологическую характеристику уксуснокислых бактерий:

1. палочки;
2. кокки;
3. образуют споры;
4. не образуют споры;
5. аэробы;
6. анаэробы.

62. Какой вид уксуснокислых бактерий содержит в клеточной оболочке клетчатку:

1. Acetobacter aceti;
2. Acetobacter xylinum;
3. Acetobacter xperoxydans.

63. Назовите сырье, используемое при промышленном приготовлении уксуса:

1. вино;
2. квас;
3. бутиловый спирт;
4. этиловый спирт;
5. метиловый спирт.

64. Какое брожение лежит в основе силосования кормов?

1. молочнокислое;
2. спиртовое;
3. брожение пектиновых веществ;

4. пропионовокислое;
5. маслянокислое.

65. Укажите микроорганизмы принимающие участие в процессе созревания силоса:

1. *Bac. mycoides*;
2. *Ps. fluorescens*;
3. *Latobact. plantarum*;
4. *Aspergillus niger*;
5. *Azot. chroococcum*.

66. От чего зависит сахарный минимум?

1. от наличия кислорода в среде;
2. от pH растительной массы;
3. от количества сахара в растениях;
4. от содержания жира в растительной массе;
5. от присутствия маслянокислых бактерий.

67. Отметьте pH хорошего силоса:

1. pH 6,0;
2. pH 7,0;
3. pH 5,5;
4. pH 4-4,2.

68. Укажите брожение, желательное при созревании силоса:

1. пропионовокислое;
2. брожение, вызываемое группой кишечной палочки;
3. маслянокислое;
4. молочнокислое;
5. спиртовое.

11.4.5 Микробиологические превращения соединений азота

69. Что понимают под аммонификацией:

1. превращение азотсодержащих органических соединений в азот минеральный;
2. минерализация органических форм азота до аммиака;
3. процессы окисления аммиака до нитратов;
4. окисление нитритов до нитратов.

70. Какие соединения служат субстратами для процесса аммонификации:

1. белковые вещества;
2. мочевины;
3. цианамид кальция;
4. гумус;
5. клетчатка;

6. пектиновые вещества.

71. Какой фермент участвует в аммонификации белковых веществ?

1. пептидаза;
2. амилаза;
3. уреаза;
4. цитохромоксидаза.

72. Укажите возможные случаи дезаминирования аминокислот аммонифицирующими микроорганизмами:

1. гидролитическое;
2. окислительное;
3. восстановительное;
4. декарбоксилирование;
5. анаэробное;
6. аэробное.

73. Какие конечные продукты образуются при аммонофикации белковых веществ в аэробных условиях?

1. аммиак;
2. водород;
3. углекислый газ;
4. молочная кислота;
5. сероводород;
6. метан;
7. вода;
8. глицерин.

74. При каких соотношениях С и N в почве наблюдается процесс иммобилизации азота?

1. отношение углерода к азоту C:N равно 100:1;
2. отношение углерода к азоту C:N равно 15:1;
3. отношение углерода к азоту C:N равно 5:1.

75. Укажите условия накопления аммиака в почве:

1. недостаток минерального азота в почве;
2. отношение углерода к азоту C:N должно быть меньше 25:1;
3. отношение углерода к азоту C:N должно быть равным 10:1;
4. отношение углерода к азоту C:N должно быть больше, чем 25:1;
5. отношение C:N должно быть 100:1.

76. Какой фермент участвует в аммонификации мочевины?

1. амилаза;

2. уреаза;
3. пероксидаза;
4. липаза.

77. Назовите микроорганизмы, вызывающие процесс аммонификации белковых веществ:

1. Bacillus;
2. Pseudomonas;
3. Chrotobacter;
4. Streptococcus;
5. Clostridium;
6. Nitrosomonas.

78. Какие продукты образуются при разложении мочевины?

1. углекислый газ;
2. азотистая кислота;
3. аммиак;
4. вода;
5. азотная кислота.

79. Назовите микроорганизмы, вызывающие аммонификацию мочевины:

1. Nitrococcus ureae;
2. Pseud. fluorescens;
3. Nitr. europea;
4. Bac. pasteurii.

80. Какое значение имеют процессы аммонификации в почве:

1. недоступные формы азота переходят в доступную форму для растений;
2. минеральный азот закрепляется в форме недоступной для растений;
3. способствует закреплению минеральной формы азота в почве.

81. Что называется процессом иммобилизации азота:

1. разложение белков до аммиака;
2. окисление аммиака до азотистой и азотных кислот;
3. восстановление нитратов до молекулярного азота;
4. минеральные формы азота переводятся в белок плазмы клеток микроорганизмов.

82. Что называется 1 фазой нитрификации:

1. окисление аммиака в азотистую кислоту;
2. окисление азотистой кислоты в азотную кислоту;
3. ассимиляция атмосферного азота.

83. Назовите микроорганизмы, которые вызывают процесс нитрификации:

1. Nitrosomonas;
2. Proteus;
3. Nitrospira;
4. Sorangium;
5. Nitrobacter;
6. Bactoderma.

84. Что получают микроорганизмы при окислении аммиака в нитрит и нитрита в нитрат?

1. азот при построении клетки;
2. энергию;
3. кислород.

85. Какой источник углерода используют нитрифицирующие бактерии?

1. глюкоза;
2. углекислый газ;
3. целлюлоза;
4. лактоза.

86. Назовите положительное значение деятельности нитрифицирующих бактерий в почве:

1. переводят трехкальциевые фосфаты в дифосфат кальция, доступный растениям;
2. переводят аммиак в доступную для растений форму;
3. закрепляют азотсодержащие соединения в почве.

87. Назовите отрицательное значение нитрификации в почве:

1. продукты нитрификации легко вымываются;
2. продукты нитрификации адсорбируются почвой;
3. продукты нитрификации служат субстратом для денитрификации.

88. Что называется 2 фазой нитрификации?

1. окисление аммиака в азотистую кислоту;
2. окисление азотистой кислоты в азотную кислоту;
3. ассимиляция атмосферного азота.

89. Какой характер взаимодействия присущ нитрифицирующим бактериям 1 и 2 фазы нитрификации?

1. антагонизм;
2. метаболизм;
3. синеризм.

11.4.6 Почвенная микробиология

90. На развитие почвенной микрофлоры влияют абиотические факторы:

1. температура;
2. хищные формы биоты;
3. влажность;
4. антагонисты;
5. аэрация.

91. Биотические факторы, влияющие на развитие почвенной микрофлоры:

1. продуценты антибиотиков;
2. кислотность;
3. паразитические формы микробов;
4. окислительно-восстановительный потенциал;
5. активность окислителей клетчатки.

92. Принципы низкого содержания нитратов в парующей почве ранней весной и поздней осенью:

1. снижение активности нитрификаторов;
2. высокая активность психрофилов;
3. высокая активность нитрификаторов;
4. высокая активность термофилов;
5. конкуренция микробов и растений за нитраты.

93. Нежелательные последствия превращения солей аммония в нитраты микроорганизмами:

1. вымывание нитратов из верхних горизонтов;
2. восстановление нитратов до газообразных продуктов;
3. поглощение нитратов корнями растений;
4. потери азота при прямой и косвенной денитрификации;
5. ассимиляционная нитратредукция микроорганизмов.

94. Эффективные меры борьбы с потерями азота из почвы при денитрификации:

1. дробное внесение удобрений;
2. внесение высоких доз удобрений;
3. улучшение водно-физических свойств почвы;
4. использование ингибиторов нитрификации;
5. применение мелкодисперсных форм удобрений.

95. Последствия обработки почвы высокими дозами пестицидов для микробиоценозов:

1. пространственная перегруппировка популяций;

2. увеличение плотности всех популяций;
3. активизация биохимических процессов;
4. снижение активности ряда биохимических реакций;
5. снижение индекса видового разнообразия.

96. Ассоциативные бактерии находятся:

1. на поверхности корня растения;
2. в клубеньках;
3. в почве.

97. Зона корня растений, где развиваются микроорганизмы:

1. ризосфера;
2. фоллосфера.

98. Поверхность корня растений, на которой развиваются микроорганизмы:

1. ризосфера;
2. ризоплана;
3. филлосфера.

99. Грибы – микоризообразователи:

Локализация:

- | | |
|---------------------------|-----------------------------------------|
| 1. эктомикориза растения; | А) внутри и между клеток корня; |
| 2. эндомикориза; | Б) вокруг корня (чехол) и межклетниках; |
| 3. псевдомикориза. | В) во всех тканях корня растения. |

100. Бобово-ризобиальный симбиоз: Обогащение 1 гектара почвы за год (пахотного слоя) азотом:

- А) 150-200 кг
- Б) 70-90 кг
- В) 10-20 кг
- Г) может быть даже вынос из почвы.

Клубеньковые бактерии:

1. *Rhizobium phaseoli*;
2. *Bradyrhizobium Lupine*;
3. *Rhizobium Leguminosarum*;
4. *Rhizobium trifolii*/

Растение – хозяин:

- А) горох;
- Б) фасоль;
- В) люпин;
- Г) соя;
- Д) клевер
- Е) акация

101. Где локализованы эндомикоризные грибы растений?

1. внутри и между клеток корня;
2. во всех тканях корня растения;

3. вокруг корня (чехол) и межклетниках.

102. Каково значение грибов-микоризообразователей для растений?

1. увеличивают рабочую поверхность корня;
2. способствуют поглощению из почвы фосфора;
3. минерализуют многие органические соединения;
4. фиксируют молекулярный азот;
5. продуцируют биологически активные вещества.

103. Где используют грибы-микоризообразователи в растениях?

1. при степном лесоразведении;
2. рекультивации нарушенных земель;
3. при посеве зерновых культур.

104. Отметьте оптимальное значение температуры среды азотфиксирующим микроорганизмом:

1. температура...30-35;
2. температура...24-26;
3. температура...5-7;
4. температура...37-40.

105. Отметьте оптимальное значение реакции среды для большинства культур клубеньковых бактерий:

1. pH 6,5...7,5;
2. pH 7,5...8,5;
3. pH 3,5...4,5;
4. pH 8,0...9,0.

106. Каково значение сапрофитных микроорганизмов зоны корня растений?

1. вызывают процесс денитрификации;
2. синтезируют ростовые вещества;
3. вызывают корневую гниль у растений;
4. вырабатывают антибиотические вещества;
5. конкуренты высших растений.

107. Назовите микроорганизмы, вызывающие ризобиальный симбиоз с растением гороха:

1. *Rhizobium Leguminosarum*;
2. *Rhizobium trifolii*;
4. *Rhizobium phaseoli*.

108. Какие растения вступают в симбиотические отношения с азотфиксирующими бактериями?

1. кукуруза;

2. яровая пшеница;
3. клевер;
4. люцерна;
5. озимая рожь;
6. горох.

109. Перечислите симбиотические признаки клубеньковых бактерий:

1. вирулентность;
2. азотфиксирующая активность;
3. эффективность;
4. специфичность;
5. конкурентоспособность;
6. не способность конкуренции.

110. Каково значение фиксации молекулярного азота микроорганизмами для растений?

1. обеспечивают растения азотом атмосферы;
2. повышают содержание белка;
3. задерживают рост и развитие растений;
4. повышают урожайность растений.

111. От каких факторов зависит продуктивность накопления азота бобовыми культурами?

1. обеспеченность почвы влагой;
2. наличие в почве доступных форм фосфора, калия, кальция, молибдена;
3. реакция среды;
4. без бактериализации.

112. Абиотические факторы, влияющие на развитие почвенной микрофлоры:

1. температура почвы;
2. влажность почвы;
3. реакция почвенной среды;
4. содержание CO₂;
5. содержание O₂;
6. солнечная радиация;
7. севооборот.

113. Какими методами определяют численность микроорганизмов почвы?

1. посев на твердые питательные среды;
2. прямой подсчет под оптическим микроскопом;

3. прямой подсчет под электронным микроскопом;
4. методом колориметрирования;
5. методом озоления клеток.

114. Какими методами определяют активности почвенных микроорганизмов?

1. нитрификационная способность;
2. интенсивность «дыхания» почвы;
3. метод аппликации;
4. активность ферментов;
5. химический анализ почвы;
6. определение катионов и анионов.

115. Какие микробиологические процессы происходят в почве при внесении органических удобрений?

1. повышается численность микрофлоры;
2. повышается общая биологическая активность почвы;
3. снижается содержание воды;
4. разрушается структура почвы.

116. Какое воздействие на почвенные микроорганизмы оказывают минеральные удобрения?

1. активизирует их жизнедеятельность;
2. отрицательно действуют на автотрофные микроорганизмы;
3. иммобилизуют доступных элементов питания;
4. губительно действуют на жизнедеятельность микрофлоры почвы;
5. задерживают разложения растительных остатков.

117. Укажите основные отличия в процессах, происходящих при холодном приготовлении навоза:

1. развитие кокковидных бактерий;
2. неспорообразующие бактерий;
3. аммонификаторы;
4. развитие маслянокислых бактерий.

118. Укажите основные отличия в процессах, происходящих при горячем приготовлении навоза:

1. аэробные неспорообразующие бактерий, грибы, актиномицеты;
2. температура 30-35 градусов;
3. развитие термофильных бактерий.

119. Чем отличается азотобактер от клостридий?

1. аэробное дыхание;

2. анаэробное дыхание;
3. способность использовать большой набор органических соединений (моно-и дисахариды);
4. высокоплодородные почвы рН – 3...5.

120. Назовите отличительные признаки бактерий рода Clostridium:

1. образуют споры;
2. не образуют спор;
3. фиксируют молекулярный азот воздуха;
4. не фиксирует молекулярного азота воздуха.

121. Краткая характеристика нитрифицирующих бактерий?

1. аэробные;
2. анаэробные;
3. окисляют аммиак в NO_2 и до NO_3 ;
4. автотрофы;
5. гетеротрофы.

11.4.7 Проведение итогового контроля заданий

Выполнение тестовых заданий может осуществляться на компьютерах, а без их наличия – бланковым методом. Ответы студент записывает на отдельном листе и передает для проверки преподавателю.

Задания построены на:

- выборе вариантов возможных ответов на поставленный вопрос;
- установление правильной последовательности поставленных ответов на поставленный вопрос;
- установление правильного соответствия возможных ответов на различные признаки;

Критерий оценки знаний студентов определяется по сумме баллов. Рейтинговая оценка уровня подготовленности студентов по дисциплине «Микробиология» оценивается в 100 баллов.

Градация оценок с учетом единой шкалы пересчета баллов

Оценка	Градация от максимального количества баллов
ОТЛИЧНО	более 85
ХОРОШО	85-70
УДОВЛЕТВОРИТЕЛЬНО	69-55
НЕУДОВЛЕТВОРИТЕЛЬНО	до 55

12 ПРОГРАММА ПО МИКРОБИОЛОГИИ ДЛЯ ВЫСШИХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ

**(по специальности 110201 Агрономия,
110101 – Агрохимия и агропочвоведение, 110102 – Агроэкология)**

12.1 Основы общей микробиологии.

Предмет, объекты, история и задачи микробиологии

Предмет микробиологии, ее место и роль в системе биологических и сельскохозяйственных наук. Мир микроорганизмов и его разнообразие. Характеристика основных групп микроорганизмов: бактерий, микроскопических грибов и водорослей, простейших, вирусов. Их распространение и роль в круговороте веществ в природе, в различных отраслях промышленного и сельскохозяйственного производства, в решении проблем питания. Охраны окружающей среды и общебиологических задач. История возникновения и развития микробиологии. Открытие микроорганизмов А. Левенгуком. Период описательной микробиологии. Исследование микроорганизмов Д. Самойловичем и М. Тереховским. Работы Ф. Кона и К. Нигели. Открытия Л. Пастера (природа брожения, возбудители болезней). Роль Л. Пастера в формировании науки о функциях микроорганизмов и возникновении различных областей микробиологии. Физиологический период развития микробиологии. Значение работ Р. Коха, И.И. Мечникова, Д.И. Ивановского, Н.Ф. Гамалея, Д'Эрреля, М. Бейеринка и других исследователей. Сельскохозяйственная микробиология. Вклад русских ученых в становление и развитие сельскохозяйственной микробиологии. Работы С.Н. Виноградского, В.Л. Омелянского, С.П. Костычева, Н.Н. Худякова, В.С. Буткевича, Н.Г. Холодного, М.В. Федорова, Н.А. Красильникова, Е.Н. Мишустина и других ученых.

12.2 Микроорганизмы, их систематика, морфология, строение и размножение

Мир микроорганизмов: общие признаки и разнообразие. Положение среди других организмов. Прокариотные и эукариотные микроорганизмы, их основные различия. Принципы систематики (таксономии): филогенетический, генетический, нумерический. Международные правила номенклатуры и диагностики. Значение морфологи-

ческих, цитологических, культуральных, физиологических и биохимических признаков для систематики микроорганизмов. Таксономическое значение состава и структуры ДНК, химическая гибридизация нуклеиновых кислот. Систематика бактерий. Отделы, классы, порядки и важнейшие семейства и роды бактерий. Краткая характеристика отдельных групп эукариотических микроорганизмов: водорослей, простейших и грибов. Вирусы. Структура вирусов. Основные принципы классификации. ДНК- и РНК- геномные, сложные и простые вирусы. Репродукция вирусов. Роль вирусов в природе. Фаги. Бактериофаги, микофаги, актинофаги. Их роль в природе и производстве.

Современные методы исследования микробной клетки: оптическая и электронная микроскопия, цитохимические и физико-химические методы. Морфология микроорганизмов. Размеры. Одноклеточные и многоклеточные формы. Основные формы одноклеточных бактерий. Морфология бактерий, водорослей, простейших и грибов. Строение клеток прокариот. Состав и строение клеточных стенок у грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Капсулы и слизистые слои. Цитоплазматическая мембрана, организация и функция. Цитоплазма. Ядерный аппарат (нуклеоид) у бактерий. Включения, их состав и значение. Жгутики и другие придатки клеток. Жгутики и реснички у эукариотов. Движение жгутиковых и скользящих форм. Реакция таксиса у микроорганизмов (хемотаксис, аэротаксис, фототаксис). Фимбрии и пили у бактерий и их функции. Цисты и эндоспоры бактерий; образование, состав и свойства эндоспор. Размножение. Циклы развития и способы размножения прокариотных и эукариотных микроорганизмов. Бинарное деление и почкование бактерий. Размножение водорослей, грибов, простейших.

Рост популяций микроорганизмов в периодических культурах. Фазы кривой роста, их особенности. Непрерывные культуры. Хемостат. Турбидостат. Значение метода непрерывного культивирования для изучения физиологии микроорганизмов и для биотехнологической промышленности.

12.3 Генетика микроорганизмов

Наследственные факторы микроорганизмов. Организация генетического аппарата. Понятие о генетическом коде. Репликация ДНК. Синтез белка. Механизмы, вызывающие изменение генетической информации. Модификации, мутации и рекомбинации. Молекулярные основы мутагенеза и типы мутаций. Мутагенные факторы. Разнообра-

зие мутантов, селекция различных мутантов. Генетические рекомбинации у прокариот – трансформация, конъюгация, транедукция. Внехромасомные факторы наследственности. Плазмиды бактерий.

Практическое использование достижений генетики микроорганизмов и геновая инженерия в микробиологии. Получение ценных форм микроорганизмов для сельского хозяйства и биотехнологической промышленности.

12.4 Микроорганизмы и окружающая среда

Отношение микроорганизмов к различным факторам внешней среды. Зависимость отдельных микроорганизмов от водного режима среды. Осмотическое деление клетки у разных микроорганизмов и отношение микроорганизмов к разным уровням увлажненности среды. Критические температурные точки в жизнедеятельности микроорганизмов. Психрофильные, мезофильные и термофильные микроорганизмы. Влияние кислотности среды на развитие отдельных микроорганизмов. Критические значения рН в жизнедеятельности микроорганизмов. Отношение микроорганизмов к кислороду. Аэробные, анаэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы. Окислительно-восстановительный потенциал среды и развитие разных групп микроорганизмов. Влияние давления, ядовитых веществ и радиации на микроорганизмы. Предупреждение развития микроорганизмов с помощью физических и химических факторов (пастеризации, стерилизации, снижения рН и т.д.).

Антимикробные вещества. Природа и происхождение (абиотических, биотических) антимикробных веществ. Специфичность и механизм действия. Микробостатический и микробоцидный эффект. Области применения различных антимикробных соединений. Важнейшие химиотерапевтические препараты, консервирующие, дезинфицирующие и стерилизующие средства, мутагены.

12.5 Взаимоотношения микроорганизмов между собой и другими существами

Характер взаимоотношений между микроорганизмами: метабиоз, симбиоз, (протокооперация, комменсализм, мутуализм), антагонизм («активный» и «пассивный» антагонизм, паразитизм, хищничество), конкуренция, амменсализм. Практическое использование сим-

биоза в сельском хозяйстве и медицине. Сапрофитные и паразитические микроорганизмы. Хищные бактерии и грибы. Поражение паразитическими микроорганизмами высших растений, животных и человека. Инфекция и иммунитет у растений, животных и человека.

12.6 Питание микроорганизмов

Разнообразие потребностей в питании в мире микроорганизмов. Способы питания, поступление питательных веществ в клетку. Факторы, влияющие на поступление питательных веществ в клетку. Пассивная и облегченная диффузия, активный транспорт и перенос групп. Химический состав клеток микроорганизмов. Важнейшие соединения клеток. Соединения и функции различных компонентов клеток микроорганизмов. Источники углерода, азота и других элементов для разных групп микроорганизмов. Использование органических и минеральных соединений углерода в качестве источников питания. Типы питания у микроорганизмов. Фототрофия и хемотрофия. Характеристика автотрофного и гетеротрофного типов питания. Фотосинтез и хемосинтез у микроорганизмов. Открытие хемосинтеза С.Н. Виноградским. Фотолитоавтотрофия, фотоорганогетеротрофия, хемолито-автотрофия, хемоорганогетеротрофия. Сапрофиты, комменсалы и паразиты. Паратрофия, миксотрофия, метилотрофия.

Органические и минеральные соединения азота, используемые микроорганизмами, роль в обмене веществ. Потребность микроорганизмов в готовых аминокислотах, витаминах и других факторов роста.

Способность микроорганизмов использовать различные соединения серы и фосфора. Потребность в железе, магнии, калии, кальции, натрии, марганце, молибдене и других микроэлементах. Их роль в обмене веществ.

Использование микроорганизмами высокомолекулярных соединений, не растворимых в воде.

12.7 Метаболизм микроорганизмов

Катаболизм и биосинтез. Их значение и взаимосвязи у разных микроорганизмов (автотрофов, гетеротрофов).

Ферменты микроорганизмов и их роль в жизнедеятельности микроорганизмов. Химическая природа, сущность действия и классификация ферментов. Локализация ферментов в клетке микроорга-

низмов. Конститутивные и индуцированные ферменты. Области применения ферментов микробного происхождения в промышленности и сельском хозяйстве.

12.7.1 Энергетические процессы

Способы получения микроорганизмами и пути ее превращения. Биологическое окисление. Эндогенные и экзогенные, органические и неорганические окисляемые субстраты. Их разнообразие и пути унификации окислительных процессов. Кислород и другие акцепторы водорода. Центральная роль АТФ и способы ее образования (субстратное фосфо-рилирование, окислительное фосфорилирование в цепи переноса электронов, фотофосфорилирование).

12.7.1.1 Окисление органических соединений

Брожение. Брожение как способ получения энергии в анаэробных условиях. Пути сбраживания углеводов: фруктозо-дифосфатный (гликолиз), пентозофосфатный и путь Энтнера - Дудорова. Сбраживание органических кислот, аминокислот и других соединений. Химизм и энергетика различных брожений. Изменение брожения в зависимости от условий выращивания микроорганизмов. Двухфазность брожения и ее причины. Практическое значение процессов брожения.

Дыхание. Химизм аэробного дыхания. Цикл Кребса или цикл трикарбоновых кислот (ЦТК). Дыхательная цепь и система переноса электронов у аэробных микроорганизмов. Разнообразие субстратов, окисляемых микроорганизмами: белки, углеводы, липиды, углеводороды и др. Полное окисление субстратов до CO_2 и H_2O . Неполное окисление органических субстратов, образуемые продукты.

Анаэробное дыхание. Химизм анаэробного дыхания с использованием кислорода нитратов и сульфатов. Расходование энергии микроорганизмами в процессах жизнедеятельности. Выделение тепловой и световой энергии микроорганизмами. Использование тепловой энергии, выделяемой микроорганизмами, в сельском хозяйстве (овощеводстве закрытого грунта).

12.7.1.2 Окисление неорганических соединений

Литотрофия (хемосинтез). Группа хемолитоавтотрофных микроорганизмов, основные свойства. Эффективность использования свободной энергии.

12.7.1.3 Использование лучистой энергии

Фототрофные микроорганизмы. Характеристика фотосинтезирующих бактерий и цианобактерий. Особенности бактериального (бескислородного) и растительного (кислородного) фотосинтеза.

Пигменты, устройство фото-синтезирующего аппарата. Основные стадии фотосинтеза. Образуемые продукты и пути их использования.

12.7.2 Биосинтез

Основные мономеры конструктивного метаболизма (органические кислоты, аминокислоты, сахара, азотистые основания, другие соединения). Пути образования и дальнейшего использования.

Ассимиляция углекислоты гетеротрофами и автотрофами. Рибулезо-дифосфатный цикл углерода, его распространение. Ассимиляция CO₂ зелеными серобактериями и метанообразующими бактериями. Значение цикла трикарбоновых кислот и глиоксалатного шунта.

Биосинтез аминокислот, белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов и других важнейших компонентов клеток микроорганизмов. Образование ферментов (протеаз, нуклеаз, пектиназ, целлюлаз, липаз), полисахаридов (декстранов), витаминов, гибберелинов, других ростовых факторов, токсинов, антибиотиков, алкалоидов.

12.8 Превращение микроорганизмами соединений углерода

Значение процессов превращений углеродосодержащих веществ в круговороте в природе и роль микроорганизмов в фитогенном распаде органического вещества.

Молочнокислое брожение и его возбудители. Значение молочнокислого брожения в пищевой промышленности, быту и при силосовании кормов. Гомоферментативное, гетероферментативное молочнокислое брожение и бифидоброжение. Химизм этих процессов.

Использование молочнокислых бактерий при получении молочной кислоты, кисломолочных продуктов и консервировании продуктов сельского хозяйства. Квашение и маринование кормов как приемы консервирования, в основе которых лежат разные микробиологические принципы и требования.

Микробиологические основы и регламентация процессов консервирования плодов, овощей винограда и силосования кормов, приготавливаемых из разных сельскохозяйственных культур. Основные факторы определяющие правильное течение микробиологических процессов, идущих при квашении и силосовании. Возможные пороки консервированных продуктов и силоса. Причины порчи и пути их предупреждения.

Спиртовое брожение его химизм. Дрожжи как возбудители спиртового брожения (дикие и культурные, низовые и верховые). Ис-

пользование дрожжей в спиртовой промышленности, виноделии, пивоварении, хлебопечении.

Получение глицерина при спиртовом брожении. Причины и условия переключения спиртового брожения на глицериновое.

Пропионовокислое брожение. Возбудители и химизм процесса. Использование пропионовокислых бактерий в сыроделии и для получения витамина В.

Процессы брожения, вызываемые бактериями рода Клостридиум. Маслянокислое и ацетобутиловое брожение. Значение в природе и в сельском хозяйстве. Основные свойства возбудителей этих процессов, широта их распространения в природе. Брожение пектиновых веществ и его значение в первичной обработке лубоволокнистых растений.

Микроорганизмы, разрушающие клетчатку. Аэробные и анаэробные формы целлюлозоразрушающих бактерий. Грибы-разрушители клетчатки. Неполное окисление углеводов и других органических соединений микроорганизмами с образованием кислот. Образование уксусной, лимонной и других кислот. Возбудители, ход процессов и использование этих процессов в народном хозяйстве. Окисление этилового спирта в уксусную кислоту. Значение этого процесса в природе и в сельском хозяйстве.

Разрушение микроорганизмами гемицеллюлоз и лигнина. Окисление микроорганизмами жира и высокомолекулярных кислот жирного ряда. Окисление микроорганизмами органических кислот и углеводов (алифатических и ароматических). Возбудители и химизм процессов. Практическое использование микроорганизмов, усваивающих углеводороды. Мероприятия по усилению процесса окисления углеводородов микроорганизмами в плане получения микробного белка и защиты окружающей среды от загрязнения.

12.9 Превращение микроорганизмами соединений азота

12.9.1 Аммонификация азотсодержащих органических соединений (минерализация азота)

Значение аммонификации азотсодержащих органических соединений (белков, нуклеиновых кислот, мочевины, мочевой и гиппуровой кислоты, хитина). Разложение белковых веществ. Характеристика возбудителей и хода процесса аммонификации в аэробных и анаэробных условиях. Дезаминирование аминокислот. Конечные продукты разложения белков и аминокислот.

Причины порчи сельскохозяйственной продукции и возможности ее предупреждения.

Аммонификация мочевины. Уробактерии. Химизм процесса распада мочевины. Устойчивость уробактерий к аммиаку. Распад хитина. Микрофлора, вызывающая этот процесс. Улетучивание аммиака из почвы и при хранении навоза. Меры предупреждения. Образование фитотоксических веществ при разложении растительных остатков.

12.9.2 Иммобилизация азота в почве

Понятие минерализации и иммобилизации азота в почве. Значение соотношения C:N в органическом веществе в процессах минерализации и иммобилизации азота в почве. Реминерализация иммобилизованного азота. Условия накопления аммиака в почве.

12.9.3 Процессы нитрификации и денитрификации

Окисление аммиака в азотную и азотистую кислоты. Хемолитоавто-трофные бактерии, вызывающие процесс нитрификации. Энергетика процесса, его хемолитоавтотрофная природа. Характеристика возбудителей нитрификации первой и второй фазы. Работы С. Н. Виноградского и их значение. Возможность окисления аммиака гетеротрофными микроорганизмами. Влияние условий среды на процесс нитрификации. Положительная и отрицательная роль нитрификации в плодородии почвы. Восстановление нитратов и нитритов с образованием молекулярного азота. Микробиологическая и химическая денитрификация. Роль микроорганизмов в химической денитрификации. Химизм процессов ассимиляторной и дисимиляторной денитрификации. Микроорганизмы, вызывающие восстановление окисленных соединений азота. Значение процессов денитрификации в обеднении почвы азотом. Регуляция денитрификации агротехническими приемами. Меры борьбы с денитрификацией при хранении навоза.

12.10 Биологическая фиксация молекулярного азота

Биологическая и абиологическая фиксация азота. Свободноживущие азотфиксирующие микроорганизмы: аэробные и анаэробные - азотобактер, азомонас, бейеринкиа, дерксия, клебсиелла, псевдомонас, клостридиум и другие микроорганизмы. Цианобактерии, усваивающие молекулярный азот. Экология свободноживущих фиксаторов азота. Фиксация азота атмосферы аэробными почвенными спириллами в условиях ассоциативного симбиоза с растениями. Фиксация азо-

та в ризосфере и филлосфере. Связь фиксации азота с фотосинтезом высших растений.

Симбиотическая фиксация азота у бобовых культур. Клубеньковые бактерии и их симбиоз с бобовыми растениями. Основы симбиотических взаимоотношений бобовых растений и клубеньковых бактерий. Свойства клубеньковых бактерий (специфичность, вирулентность, активность, конкурентоспособность), определяющие эффективность симбиоза. Условия, благоприятствующие симбиотической фиксации молекулярного азота. Симбиотическая азотфиксация у небобовых (древесных, кустарниковых и травянистых) растений. Азотфиксирующие актиномицеты - франкия и их симбиоз с небобовыми растениями. Листовые клубеньки. Генетические и биохимические аспекты фиксации молекулярного азота. Генная инженерия биологической азотфиксации. Конструирование новых суперкультур азотфиксирующих микробов. Масштабы биологической азотфиксации в природе и методы ее исследования. Сочетание биологического и минерального азота в сельском хозяйстве РБ. Биотехнологические принципы управления биологической азотфиксацией в почве.

12.11 Превращение микроорганизмами соединений серы, фосфора, железа и других элементов

Образование сероводорода из серосодержащих соединений. Образование сероводорода из минеральных соединений (сульфатов) и микроорганизмы, вызывающие эти процессы. Окисление микроорганизмами сероводорода в серу и серную кислоту. Серобактерии и тионовые бактерии. Значение сульфификации в плодородии почвы РБ.

Роль микроорганизмов в освобождении фосфорной кислоты из органических соединений и в переводе нерастворимых фосфатов в растворимое состояние. Биологическое связывание фосфора. Восстановление окислительных соединений фосфора и возможная роль микроорганизмов в этом процессе. Роль микроорганизмов в фосфорном питании растений в почвах РБ.

Окисление и восстановление соединений железа микроорганизмами. Характеристика основных представителей железобактерий. Микроорганизмы, восстанавливающие соединения железа, и процессы оглеения почв.

Трансформация микроорганизмами соединений кальция, магния кремния, калия и других элементов.

Участие микроорганизмов в образовании полезных ископаемых: месторождений серы, торфа, каменного угля. Микробное выщелачивание. Роль микроорганизмов в добыче полезных ископаемых.

12.12 Биосинтез микроорганизмами белка и биологически активных веществ

Биотехнология микроорганизмов-продуцентов веществ, используемых в сельском хозяйстве и медицине. Синтез и сверхсинтез микроорганизмами аминокислот, особенно незаменимых. Использование микроорганизмов для получения белка. Биоконверсия целлюлозолигнинных и крахмалосодержащих субстратов и отходов. Биологические агенты биоконверсии. Микроорганизмы, применяемые в процессе биоконверсии целлюлозолигнинных субстратов в белок. Образование микроорганизмами витаминов. Накопление культурами микроорганизмов гетероауксина, гиббереллина и других ростовых веществ. Образование микроорганизмами антибиотиков. Использование микробных метаболитов для стимуляции роста растений и животных. Биотехнологическое производство аминокислот (лизина, триптофана), гиббереллина, витаминов, антибиотиков, ферментов и других биологически активных веществ в РФ. Перспективы получения биотехнологическими методами новых форм продуцентов биологически активных соединений с заранее заданными свойствами. Токсические соединения, вырабатываемые токсигенными микроорганизмами. Пищевые и кормовые отравления, вызываемые токсинами микробного происхождения.

12.13 Основы почвенной и сельскохозяйственной микробиологии. Развитие взглядов на роль микроорганизмов в образовании почв

Почва как живая система. Процесс почвообразования в представлении М.В. Ломоносова. Значение работ В.В. Докучаева, П.А. Костычева, Н.А. Димо, В.Н. Сукачева, Б.Б. Польшова, Н.П. Ремезова и других для развития биологического направления в почвоведении. Становление почвенной микробиологии. Работы С.Н. Виноградского, М.С. Бейеринка, С.А. Ваксманна, В.Л. Омелянского, Н.Г. Холодного, Н.Н. Худякова, Н.А. Красильникова. Исследования СП. Костычева, Е.Н. Мишустина и др. о сообществах микроорганизмов разных типов почв.

Геохимические функции почвенных микроорганизмов. Возникновение и развитие "почвенных" разделов микробиологии, альгологии, зоологии. Труды Э.А. Штина, М.М. Голлербаха, М.С. Гилярова. Анализ основных направлений работ по почвенной микробиологии (эколого-географическое направление, раскрытие отдельных микробиологических процессов в почве и роль в плодородии, выявление новых форм почвенных микроорганизмов и др.)

Особенности современного состояния почвенной микробиологии – развитие нового направления – почвенной биотехнологии.

12.14 Почвенное микронаселение, методы определения его состава и активности

Микроструктура почвы и мозаичность. Нативные органические вещества. Влияние факторов микроокружения на микрофлору: рН, окислительно-восстановительный потенциал, влажность, температура, газовый состав атмосферы почвы, твердая фаза почв. Засоление и осмотическое давление. Адсорбция микроорганизмов. Трофические цепи и экологические группы микроорганизмов. Периодические колебания численности и состава микроорганизмов. Понятия микробных популяций, времени генераций и скорости роста. Активное и латентное состояние микробов.

Почвенные формы бактерий, грибов, дрожжей, водорослей, простейших. Новые формы микроорганизмов. Типы взаимоотношений микроорганизмов и микроорганизмами, с высшими растениями. Микробы – хищники и паразиты. Биологическая активность почв РБ и почвенные ферменты.

Общая характеристика методов изучения состава и численности почвенного микронаселения. Прямые методы микроскопирования почв с использованием оптического и электронного микроскопа. Метод капиллярной микроскопии. Высев микроорганизмов на плотные питательные среды. Метод предельных разведений. Принцип селективных питательных сред и его использование при исследовании микрофлоры почв. Характеристика группового состава микроорганизмов различных типов почв РБ. Методы определения суммарной биохимической активности почвенного микронаселения. Установление активности ферментов в почве.

12.15 Процесс образования почв и деятельность микроорганизмов

Микроорганизмы, участвующие в первичном почвообразовательном процессе. Роль микроорганизмов в образовании и разрушении перегноя. Автохтонная и зимогенная микрофлора почвы. Закономерности, определяющие накопление перегноя в почвах разных климатических зон РБ. Роль микроорганизмов в агрегатировании и формировании почвенной структуры.

12.16 Факторы среды, определяющие развитие микробного ценоза почвы

Температурный фактор и деятельность почвенного микронаселения в разных почвенно-климатических зонах. Роль температуры в формировании микробного ценоза почвы. Влияние влажности почвы на характер микробиологических процессов. Деятельность микроорганизмов при сочетании температуры и влажности. Воздушный режим почвы как фактор, определяющий направленность микробиологических процессов в почве. Кислотность почвы и ее влияние на состав микробных ассоциаций. Влияние механического состава почвы на активность микроорганизмов. Адсорбция бактерий и других микроорганизмов в почве.

12.17 Особенности состава микробных ценозов почв различных типов

Развитие взглядов на специфичность микробных ассоциаций различных почв. Приоритет российских ученых в разработке учения о микробных ассоциациях почв. Биогенность почв различных типов. Влияние окльтуренности на численность микробного населения почвы. Количественный и качественный состав бактерий и грибов в почвах различных типов. Основные группы почвенного микронаселения: зимогенная и автохтонная микрофлора, олиготрофные и хемолитоавтотрофные микроорганизмы. Распространение микроорганизмов в профиле различных почв. Отражение горизонтальной и вертикальной поясности в составе микробного населения почв. Структура микробного ценоза почв. "Экологическая стратегия" микроорганизмов. Анализ процессов накопления и распада гумуса в различных почвенных типах в зависимости от направленности микробиологических процессов.

Показатели биологической активности почв. Принципы микробиологической диагностики и индикации типа и окультуренности почвы. Микробиологическая индикация загрязнений почв. Самоочищение почв. Микробиологическая мелиорация почв. Роль российских ученых в разработке проблемы биодиагностики и индикации почв и почвенного плодородия.

12.18 Влияние на микроорганизмы почвы ее обработки и мелиорации

Гетерогенное распределение и активность микроорганизмов в пахотном слое почвы.

Влияние разных способов обработки почвы (отвальной, безотвальной, поверхностного рыхления и др.) на характер микробиологических процессов в почве. Минерализация растительных остатков на разной глубине пахотного слоя.

Влияние мелиорации почв на микробиологические процессы и состав микронаселения. Использование микробиологических показателей при оценке эффективности мелиорации почвы. Химическая мелиорация почв.

12.19 Системы использования почвы и микробиологические основы повышения ее плодородия

Определение потребности почв в азоте, фосфоре, калии микробиологическими методами. Установление нуждаемости в известковании с помощью микроорганизмов. Микробиологические методы определения запаса микроэлементов в почве.

Роль биологического и технического азота в земледелии РФ. Биологический азот как источник белка и удобрений. Активизация деятельности ассоциативных азотфиксаторов в почве. Значение одно- и многолетних бобовых растений как азотфиксаторов. Повышение эффективности связывания азота свободноживущими азотфиксаторами в почве. Перспективы использования процесса биологической азотфиксации в земледелии и растениеводстве РФ.

12.19.1 Удобрение и микробиологические процессы в почве

Процессы, происходящие в навозе при разных способах его хранения. Качественный и количественный состав микроорганизмов навоза разной степени разложения.

Химизация земледелия и роль биологических факторов. Техника применения минеральных азотных удобрений с учетом возможных их трансформаций микробами почвы. Интенсивная химизация как причина сдвигов почвенной динамики. Изменение состава микрофлоры почвы при внесении в нее навоза и минеральных удобрений. Влияние известкования кислых почв на состав почвенного микронаселения.

Процессы мобилизации и иммобилизации соединений фосфора и других элементов под влиянием микроорганизмов.

Повышение коэффициента использования азотных удобрений растением путем подавления денитрификации.

Влияние гербицидов и других токсических соединений (пестицидов) на почвенную микрофлору. Разрушение микроорганизмами пестицидов. Факторы, определяющие скорость разложения в почве пестицидов.

Влияние севооборотов и монокультур на микрофлору почвы. Принципы управления микробиологическими процессами с целью повышения плодородия почвы, увеличения урожайности сельскохозяйственных культур РБ.

12.20 Взаимоотношения микроорганизмов и растений

Корневая и прикорневая микрофлора растений (ризоплана и ризосфера). Специфичность микрофлоры корневой зоны различных видов растений. Влияние отдельных представителей ризосферных микроорганизмов на всхожесть семян и развитие растений. Повышение полевой всхожести семян путем регулирования состава ризосферных микроорганизмов (протравливание, бактеризация и т.д.).

Микориза растений. Эндотрофия, эктотрофия и эндоэктотрофная микориза растений. Роль микоризы в питании растений.

Эпифитная микрофлора и ее состав. Роль эпифитных микроорганизмов в жизни растений. Микрофлора зерна и ее изменение при разных условиях хранения зерна. Использование видового состава эпифитной микрофлоры при оценке качества зерна.

12.21 Микробные земледобritельные препараты и их эффективность

Инокуляция (бактеризация) бобовых растений клубеньковыми бактериями. История вопроса. Эффективность инокуляции на разных почвах. Препарат «ризоторфин» и его производство. Пути повышения эффективности инокуляции в РБ.

Препарат «азотобактерин». Сущность действия и эффективность «азотобактерина». Перспективы его использования. Производство «азотобактерина».

Использование бактерий азоспириллум для бактеризации растений. Использование цианобактерий (сине-зеленых водорослей).

Препарат «фосфоробактерин» и его влияния на растения. Препарат «силикатных» бактерий. Препарат АМБ.

Микоризация растений и, целесообразность ее использования при лесонасаждениях.

12.22 Использование в сельском хозяйстве микробовантагонистов и микробных метаболитов для защиты и стимуляции роста растений

Явление микробного антагонизма и самоочищение почвы. Роль корневой системы растений в селекции микроорганизмов-антагонистов. Интенсификация самоочищения почвы от паразитических микроорганизмов путем подбора разных видов растений в севообороте. Использование микроорганизмов-антагонистов и антибиотических веществ для борьбы с болезнями растений и профилактики заболеваний. Антибиотические вещества, используемые для защиты растений.

Микробиологический метод борьбы с вредными насекомыми. Бактерии группы *Bacillus cereus* и их использование для уничтожения насекомых-вредителей. Грибные и вирусные препараты, применяемые для защиты растений от вредителей. Уничтожение грызунов с помощью микробиологических препаратов.

Препараты микробного происхождения, стимулирующие рост растений. Гибберелин и его использование.

12.23 Микробиология кормов. Микробиологические процессы при сушке и силосовании кормов

Биотехнологические методы приготовления и хранения растительных кормов. Обыкновенное и бурое сено. Микробиологические процессы, происходящие при сушке сена. Потери питательных веществ, происходящие в результате жизнедеятельности эпифитной микрофлоры. Брикетирование при заготовке сена. Самосогревание сена, зерновых кормов. Кормовые токсикозы.

Силосование кормов. Методы силосования кормов. Микробиологические процессы, происходящие при силосовании кормов, и их

регулирование. Буферность растений, влажность растительной массы и силосуемость кормов. Сахарный минимум. Условия, способствующие правильному развитию процесса силосования. Применение заквасок и химических консервантов при силосовании кормов. Использование сульфитных щелоков. Химические и микробиологические показатели качества кормов.

Сенажирование кормов. Микробиологические процессы при созревании сенажа. Факторы, обуславливающие сохранность сенажа.

Использование углекислого газа при силосовании и сенажировании кормов. Дрожжевание кормов.

Микрофлора комбикормов и корнеплодов. Санитарно-показательные микроорганизмы.

Использование микроорганизмов при подготовке кормов к скармливанию для улучшения их поедаемости.

Задачи микробиологии в повышении качества заготавливаемых кормов – важного звена в республике Башкортостан.

12.24 Использование продуктов микробного синтеза в питании животных

Значение белка, синтезируемого микроорганизмами, в питании животных. Выращивание микроорганизмов на гидролизатах и других отходах различных производств для получения кормового белка. Техническое осуществление синтеза белка на углеводородах.

Применение аминокислот и витаминов микробного происхождения для кормовых целей.

Применение для кормления животных антибиотических веществ, используемых в медицине. Целесообразность применения в животноводстве антибиотиков, не применяемых для лечебных целей. Механизм действия антибиотиков, добавляемых в корм на организм животных. Задачи биотехнологии в решении проблем питания сельскохозяйственных животных.

12.25 Микробиология воды и воздуха

Распространение микроорганизмов в воде озер и морей. Факторы, влияющие на распределение и количество микроорганизмов в воде озер и морей. Их роль в образовании первичной продукции водоемов и разложении органических веществ. Микробиологические по-

казатели загрязнения воды. Биологическая очистка загрязненных вод на полях орошения, полях фильтрации и других искусственных сооружениях. Микроорганизмы в воздухе. Основные факторы, определяющие сохранение ими жизнеспособности в этой среде. Агробиология. Пути загрязнения воздуха микроорганизмами. Распространение инфекционных заболеваний через воду и воздух.

СЛОВАРЬ НАИБОЛЕЕ ЧАСТО УПОТРЕБЛЯЕМЫХ ТЕРМИНОВ В МИКРОБИОЛОГИИ

- Агритрол** – микробиологический инсектицидный препарат, созданный на основе бактерий *Bacillus thuringiensis*.
- Актидион** – антибиотик, продуцируемый *Streptomyces griseus*; используют для борьбы с мучнистой росой и другими грибными заболеваниями растений.
- Аскоспоры** – споры, образующиеся в мешковидных вместилищах – асках – у сумчатых грибов.
- Автохтонная микрофлора** – коренная, местная. Она разлагает гумусовые соединения.
- Агрофил** – создан на основе, относящегося к роду *Agrobacterium* (*A. radiobacter*, штамм 10). В 1 г препарата содержится не менее 10 млрд. активных бактериальных клеток. В открытом грунте он обеспечивает прибавку урожайности на 20-50 ц/га, в закрытом грунте – 2-4 кг/м².
- Аммонификация** – минерализация белков и других азотсодержащих соединений в почве при участии микроорганизмов азот освобождается в виде аммиака.
- Анабиоз** – приспособление к неблагоприятным условиям существования.
- Анаболизм** – процессы синтеза макромолекул клетки.
- Антагонизм** – тип взаимоотношений, когда один вид микроба задерживает или подавляет развитие другого.
- Антисептики** – органические и неорганические вещества, обладающие бактерицидным действием.
- Антибиотики** – соединения, синтезируемые, как правило, микроорганизмами и обладающие способностью в небольших концентрациях оказывать токсичное избирательное действие на другие микроорганизмы.
- Ацидотолерантные** – кислотоустойчивые микроорганизмы.
- Аэросомы** – газовые вакуоли.
- Бактерии** – одноклеточные прокариотные организмы с клетками сферической, цилиндрической или спиральной формы.
- Бактериозы** – болезни растений и животных, вызываемые бактериями.

Бактериофаг – вирус, хозяином которого является бактерия.

Бактороденцид – бактериальный препарат, содержащий в качестве действующего начала возбудителей тифа грызунов.

Бациллы – палочковидные бактерии, в цикл развития которых входит спорообразование.

Боверин – биологический инсектицидный препарат.

Вирин – обозначение вирусных инсектицидных препаратов.

ВТМ – вирус табачной мозаики.

Галофилы – микробы, способные жить лишь при высоких концентрациях солей (NaCl).

Гомеостаз – устойчивое, стабильное состояние органа, организма, популяции.

Гранулез – вирусное заболевание насекомых, характеризующееся образованием в клетках тканей хозяина включений – гранул.

Гипотонический – раствор с низким осмотическим давлением.

Гипертонический – раствор с высоким осмотическим давлением.

Дендробациллин – бактериальный инсектицидный препарат. Содержит кристаллы эндотоксина и споры бактерий *Bacillus thuringiensis*. Применяют против многих видов хвое- и листогрызущих насекомых.

Инокуляция – введение живых микроорганизмов, инфекционного материала в организм или его в ткани.

Иммобилизация – переход минеральных форм азота, фосфора, калия и др. в недоступные для растений соединения.

Капсид супервирионный – белковое образование, содержащее один вирион. Возникают в большом количестве при гранулезах насекомых, вызываемых бакуловирусами группы Б.

Конидии – бесполого размножения грибов.

Катаболизм – это комплекс процессов расщепления пищевых веществ – углеводов, жиров, белков, которые происходят в основном за счет реакций окисления, в результате чего выделяется энергия.

Компостирование – это экзотермический процесс биологического окисления, в котором органический субстрат подвергается аэробной биодegradации смешанной популяцией микроорганизмов в условиях повышенной температуры и влажности.

Комменсализм – тип симбиоза, когда один из партнеров симбиотической системы (комменсал) возлагает на другого партнера (хозяина) регуляцию взаимоотношений с окружающей средой, однако при этом не вступает с ним в тесный контакт.

Консументы – организмы, являющиеся в пищевой цепи потребителями органических веществ (все животные, часть микроорганизмов, паразитические и насекомоядные растения).

Лаз – период задержки размножения микроорганизма.

Леггемоглабин – ткань клубенька, заполненная бактероидами приобретение красноватую окраску благодаря этому пигменту, родственному гемоглобину.

Лиофилизация – получение сухих культур микроорганизмов высушиванием из замороженного состояния (-76°C) под высоким давлением.

Логарифмическая (экспонциальная) – фаза с наибольшей скоростью размножения микроорганизмов.

Метаболиты – вещества, образующиеся в клетках, тканях и органах растения, животных, микробов в процессе обмена веществ.

Метилтрофия – тип питания, источником энергии и углерода для которых служат одноуглеродные соединения (метан, метанол, формиат, метиламин и др.).

Микофильные грибы – группа грибов, паразитирующих на других грибах.

Микоплазмы – бактерии, не имеющих ригидной клеточной стенки.

Микробиоценоз – сообщества микроорганизмов.

Мониторинг (окружающая среда) – система долгосрочных наблюдений за изменением экосистемы и биосферы.

Мутуализм – форма симбиоза, при которой оба организма извлекают выгоду из своего сожительства.

Норма расхода (биопрепарата) – количество биопрепарата, расходуемого на единицу обрабатываемой площади или объема.

Норма реакции – генотипически обусловленные способы и характер реагирования организма на изменение окружающей среды.

Нематициды – препараты против нематод и пр.

Оценка качества – лабораторный анализ качества разводимой популяции или штамма микроорганизмов.

Паразит – организм, обитающий на другом организме (хозяин) или внутри него, питаясь им и нередко уничтожая его.

Полиэдроз – вирусное заболевание, вызываемое бакуло- и реовирусами и характеризующееся образованием большого количества белковых включений полиэдрозной формы.

Потенциал биотический – способность микроорганизма размножаться и выживать в конкретной среде; потенциальный рост численности популяции в условиях изоляции от естественных врагов, болезней и прочих неблагоприятных факторов.

Прокариоты – микроорганизмы с примитивным ядерным аппаратом.

Плазмиды – внехромосомные кольцевидные молекулы ДНК различной молекулярной массы, обладающие свойствами репликона – способностью к независимой репликации.

Симбиоз – совместное существование двух или нескольких разных организмов, приносящее им взаимную выгоду. Симбиоз может осуществляться как на уровне межклеточных организмов, так и на уровне отдельных клеток (внутриклеточный симбиоз).

Синергизм – комбинированное действие микроорганизмов или каких-либо веществ на организм, при котором суммированный эффект превышает действие, оказываемое каждым компонентом в отдельности.

Склероции – покоящаяся стадия гриба, образующаяся в неблагоприятных условиях; плотное сплетение гиф, заполненных питательными веществами, которые содержат мало воды. Жизнеспособность склероций может сохраняться несколько лет.

Стерилизация – полное уничтожение вегетативных форм микробов и их спор.

Сообщество – ассоциация взаимодействующих популяций, обычно определяемая характером связей или местом, где они живут.

Спора(ы) – микроскопические зачатки низших и высших растений, микроорганизмов, имеющие разное происхождение и служащие для их сохранения или размножения при неблагоприятных условиях.

Токсины – вещества бактериального, растительного или животного происхождения, способные угнетать физиологические функции живых организмов, что приводит к их заболеванию или гибели.

Триходермин – биологический препарат, созданной на основе гриба *Trichoderma Lignorum*. Используется для борьбы с болезнями

растений, в частности с корневыми гнилями овощных культур в закрытом грунте, ризоктониозом картофеля.

Трихомецин – антибиотический препарат на основе антибиотика, продуцируемого грибом *Trichotecium roseum*. Высокий положительный эффект дает при использовании против мучнистой росы огурцов, корневых гнилей зерновых культур.

Фаги – облигатные паразиты микроорганизмов.

Фотолитоавтотрофия – тип питания, характерный для микроорганизмов, использующих энергию света для синтеза веществ клетки из CO_2 и окисляющих при фотосинтезе неорганические соединения (H_2O , H_2S , S^0).

Фотоорганогетеротрофия – тип питания, характерный для микроорганизмов, которые получают энергию в процессе фотосинтеза, а в качестве доноров электронов могут использовать простые органические соединения, например органические кислоты, спирты.

Фунгициды – защищающие растения от фитопатогенных грибов.

Фосфолипиды, или фосфатиды – сложные жиры, представляют собой эфиры глицерина и высокомолекулярных жирных кислот.

Хемолитотрофия – тип питания, характерный для микроорганизмов, получающих энергию при окислении неорганических соединений, таких как H_2 , NH_4^+ , NO_2^- , Fe^{2+} , H_2S .

Хемоорганогетеротрофия – тип питания, характерный для микроорганизмов, получающих необходимую энергию и углерод из органических соединений.

Эндоспора – внутриклеточная тельца сферической, эллиптической формы.

Эукариот – микроорганизмы, имеющие истинное ядро.

Эффект Пастера – явление подавления спиртового брожения в аэробных условиях.

Энтобактерин – бактериальный инсектицидный препарат, созданной на основе пятого серотипа бактерий *Bacillus thuringiensis*. В 1 г препарата содержится не менее чем 30 млрд. жизнеспособных спор и кристаллов эндотоксина. Используют против гусениц капустной и репной белянок, капустной моли и огневков на овощных культурах. Норма расхода препарата варьирует от 1 до 5 кг/га.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Основная

1. Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. – М.: Изд. МГУ, 1989. – 247 с.
2. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 464 с.
3. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология. – 5-е издание, переработанное и дополненное. – М.: Дрофа, 2005. – 445 с.
4. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. – М.: Изд. МГУ, 1987. – 343 с.
5. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. – М.: Дрофа, 2005. – 185 с.

Дополнительная

1. Бекер В.Е., Лиениныш Г.К., Райнулись Е.П. Биотехнология. – М.: Мир, 1990. – 490 с.
2. Емцев В.Т. Основы экологической биотехнологии. – М.: ОНТИ GYW, 2001. – 76 с.
3. Нурмухаметов Н.М. Биологические пути повышения эффективного плодородия почв. – Уфа. – 254 с.
4. Нурмухаметов Н.М. Микробные биотехнологии в агропромышленном производстве. – Уфа. – 303 с.
5. Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 347 с.

Учебное издание

Н.М. НУРМУХАМЕТОВ

МИКРОБИОЛОГИЯ

Технический и художественный редактор: *А.Е. Дереева*

Подписано в печать **20. 05. 2010** г. Формат бумаги 60×84¹/₁₆

Усл.-печ. л. **7, 91**. Бумага офсетная

Гарнитура «Таймс». Печать трафаретная. Заказ **319**. Тираж **70** экз.

Типография ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет»
450001, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34