

Документ подписан простой электронной подписью

Информация о владельце:

ФИО: Волхонов Михаил Станиславович

Должность: Ректор

Дата подписания: 14.02.2025 17:12:25

Уникальный программный ключ:

40a6db1879d6a9ee29ec8e0ffb2f95e4614a0998

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ
ФГБОУ ВО КОСТРОМСКАЯ ГСХА

Кафедра агрохимии, биологии и защиты растений

МИКРОБИОЛОГИЯ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

*Для контактной и самостоятельной работы студентов,
обучающихся по направлениям подготовки 35.03.04 Агрономия,
35.03.05 Садоводство, очной формы обучения*

КАРАВАЕВО
Костромская ГСХА
2025

УДК 576.8
ББК 28.4
М 59

Составитель: канд. с.-х. наук, доцент, заведующий кафедрой агрохимии, биологии и защиты растений Костромской ГСХА Ю.В. Смирнова.

Рецензент: канд. с.-х. наук, доцент, доцент кафедры земледелия, растениеводства и селекции Костромской ГСХА С.В. Болнова.

*Рекомендовано методической комиссией
факультета агробизнеса в качестве методических указаний
для контактной и самостоятельной работы студентов,
обучающихся по направлениям подготовки 35.03.04 Агрономия,
35.03.05 Садоводство, очной формы обучения*

М **Микробиология** : методические указания / сост.
59 Ю.В. Смирнова. — Караваево : Костромская ГСХА, 2025. — 84 с. ;
20 см. — 50 экз. — Текст непосредственный.

В методических указаниях представлены темы, освещающие методы исследования морфологических, физиологических и биохимических свойств микроорганизмов. Рассмотрены способы приготовления препаратов для микроскопического анализа, изложены приемы исследования микрофлоры воды, воздуха и почвы. Включен краткий словарь терминов, практические задачи для самостоятельной работы студентов, а также рекомендованы учебные пособия для изучения дисциплины.

УДК 576.8
ББК 28.4

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Требования к содержанию и оформлению работы	5
Техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории	6
Лабораторная работа 1-2	
Методы исследования микроорганизмов. Морфология прокариот	8
Лабораторная работа 3	
Идентификация микроорганизмов	17
Лабораторная работа 4	
Физиологические функции микроорганизмов	21
Лабораторная работа 5	
Роль микроорганизмов в природе и жизни человека - семинар	27
Лабораторная работа 6	
Роль микроорганизмов в круговороте углерода в природе	29
Лабораторная работа 7	
Круговорот азота в природе	32
Лабораторная работа 8	
Превращение микроорганизмами органических и минеральных соединений азота	34
Лабораторная работа 9	
Процессы биологической фиксации молекулярного азота атмосферы микроорганизмами	37
Лабораторная работа 10	
Круговорот углерода и азота в природе - коллоквиум	39
Лабораторная работа 11	
Микробиологическая активность почвы	41
Лабораторная работа 12	
Состав и численность микроорганизмов различных типов почв. Роль микроорганизмов в круговороте зольных элементов	45
Лабораторная работа 13	
Микроорганизмы и почвообразовательный процесс	47
Лабораторная работа 14-15	
Взаимоотношения микроорганизмов и растений	49
Лабораторная работа 16	
Микробиологические препараты и их использование в сельском хозяйстве	54
Лабораторная работа 17	
Роль микроорганизмов в почвообразовательном процессе - коллоквиум	56
Краткий словарь терминов	58
Практические задачи для самостоятельной работы студентов	65
Список рекомендуемых источников	77
Приложения	78

ВВЕДЕНИЕ

Микробиология – раздел биологической науки, изучающий систематику, морфологию, закономерности развития, физиологию, биохимию, генетику различных микроорганизмов, распространение и роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе, значение в жизнедеятельности человека.

Курс лабораторно-практических работ по микробиологии направлен на углубление восприятия студентами знаний о микромире, понимание роли этих организмов в осуществление планетарных экологических функций, в почвообразовательном процессе, а также в частных случаях сельскохозяйственного производства, в организации быта и производственной сферы человеческого общества.

Знание микробиологических основ сельского хозяйства должно способствовать умению студента принимать правильные технологические решения в изменяющихся условиях внешней среды, и, в случаях необходимости, вносить корректизы в агрономические операции.

Помимо приобретения теоретических знаний по микробиологии будущим специалистам сельскохозяйственного профиля необходимы лабораторно-практические занятия, являющиеся, по сути, небольшими научно-исследовательскими работами.

Лабораторный практикум способствует:

- закреплению теоретических представлений о микроорганизмах – их морфологии, физиологии, биохимии и генетике;
- пониманию роли микроорганизмов в формировании и развитии биосферы;
- формированию практических навыков работы с микроорганизмами;
- освоению классических и современных методов исследования микроорганизмов;
- развитию навыков самостоятельной практической работы и формированию умения грамотно анализировать полученные результаты.

ТРЕБОВАНИЯ К СОДЕРЖАНИЮ И ОФОРМЛЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

1. Лабораторные работы оформляются в тетради каждым студентом индивидуально.
2. Лабораторная тетрадь подписывается студентом до начала выполнения первой лабораторной работы.
3. Каждая лабораторная работа должна содержать следующие структурные элементы:
 - наименование лабораторной работы;
 - результаты и обсуждение (наименование задания, экспериментальный материал, полученный ЛИЧНО студентом в ходе выполнения лабораторной работы);
 - выводы.
4. Лабораторная работа, оформленная в соответствии с данными требованиями, представляется в конце КАЖДОГО ЗАНЯТИЯ на подпись преподавателю.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ

Работа в микробиологической лаборатории требует от студентов большой аккуратности и тщательного соблюдения требований техники безопасности.

Исследовательские и учебные занятия в лаборатории ведутся с открытым огнем и живыми микробиологическими культурами, что при небрежной работе представляет собой реальную опасность для здоровья и жизни студентов и сотрудников. Поэтому совершенно неукоснительно должны соблюдаться следующие правила:

1. в лабораторию нельзя входить в верхней одежде;
2. верхняя одежда и сумки не должны находиться в лаборатории;
3. запрещается принимать пищу и пить воду в лаборатории;
4. работа в лаборатории ведется исключительно в халатах и сменной обуви или бахилах, длинные волосы должны быть собраны в пучок;
5. работу с биологическим материалом проводить только предварительно обработанным инструментом;
6. при работе микробиологической петлей не трогать ее рабочую часть руками, не класть петлю на стол, и обжигать на огне спиртовки до и после работы;
7. микробиологические препараты, пробирки и чашки с посевами нельзя помещать на учебники и тетради;
8. при случайном попадании биологического материала на стол, руки или другие поверхности необходимо сразу же оповестить об этом преподавателя и провести обработку загрязненной поверхности дезинфицирующим раствором;
9. рабочее место следует поддерживать в чистоте, не загромождать его посудой и лишними вещами;
10. студентам запрещается работать в лаборатории в отсутствие преподавателя или лаборанта, а также в неустановленное время без разрешения преподавателя.

- 11.к выполнению каждой лабораторной работы можно приступать только после прохождения инструктажа по технике безопасности и ознакомления с методиками постановки опыта;
- 12.лабораторную работу необходимо проводить в точном соответствии с описанием в практикуме;
- 13.для проведения работы следует пользоваться только чистой и сухой лабораторной посудой; для отбора объемов реагентов нужно иметь мерную посуду (пипетки, мерный цилиндр или мерный стакан); нельзя выливать избыток налитого в пробирку реагента обратно в емкость;
- 14.зажигать спиртовку можно только после установки ее на рабочее место. Зажженную спиртовку нельзя передвигать и передавать товарищу; гасить фитиль следует только колпачком спиртовки;
- 15.нагревание предметного стекла в пламени спиртовки при приготовлении некоторых препаратов следует проводить равномерно;
- 16.по окончании работы следует привести в порядок свое рабочее место: помыть посуду, протереть поверхность рабочего лабораторного стола, выключить микроскоп;
- 17.после работы необходимо тщательно вымыть руки с использованием дезинфекционных средств;
- 18.после ознакомления с настоящими правилами поставить свою подпись в журнале по технике безопасности.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1-2

Методы исследования микроорганизмов. Морфология микроорганизмов

Вопросы для обсуждения:

1. Какие типы микроорганизмов существуют на Земле?
2. В чем заключается специфика строения и жизнедеятельности вирусов?
3. Особенности строение клетки бактерий. Места обитания бактерий?

Материалы и оборудование:

Стерильные чашки Петри; питательная среда МПА; стерильная пробирка; стерильная колба; стерильная пипетка; исследуемые пробы воды; пробирки со скошенным МПА.

Задания:

1. Ознакомиться с правилами техники безопасности.
2. Познакомиться с различными типами микроскопов.
3. Зарисовать основные морфологические типы бактерий.
4. Определить микробиологическую обсемененность воздуха методом естественной седиментации (метод Коха).
5. Определить численность микроорганизмов в воде различных источников.
6. Описать колонию микроорганизма, выделить чистую культуру.

1. Правила техники безопасности в лаборатории

Внимательно прочесть правила техники безопасности, выслушать пояснения преподавателя и кратко записать основные положения правил в тетрадь.

2. Изучение микроскопической техники лаборатории

1. Микроскоп биологический рабочий – БИОЛАМ. Разрешающая способность 0,2 мкм. Предельное увеличение 900 раз.
2. Микроскоп биологический рабочий – МБР-3. Бинокулярный. Разрешающая способность 0,2 мкм. Предельное увеличение 1350 раз.

3. Микроскоп биологический исследовательский – МБИ-6. Снабжен бинокулярной насадкой, обладающей собственным увеличением в 2,5 раза, фотографической насадкой и телекамерой с выходом на компьютер. Разрешающая способность 0,2 мкм. Рабочее увеличение 2250 раз.

4. Люминесцентный микроскоп – МИКМЕД-6. Оснащен триокулярной насадкой и телекамерой. Источник освещения – ртутно-кварцевая лампа, дающая ультрафиолетовое излучение, разрешающая способность 0,15 мкм. Рабочее увеличение 1500 раз. При использовании флюорохромных красителей дает цветное изображение объекта.

Принцип работы люминесцентного микроскопа основан на способности отдельных объектов и красителей светится при освещении их ультрафиолетовыми лучами. Люминесцентные микроскопы снабжены источником ультрафиолетового света и набором светофильтров. У бактерий очень слабо выражена собственная флюоресценция. Поэтому необходимо их обработать флюоресцирующими красками (флюорохромами), которые окрашивают структурные элементы клетки в различные цвета.

5. Микроскоп биологический марки МОТИК-300 с телеметрической системой передачи изображения на экран компьютера, фотографированием изображения и автоматическим проведением измерения изучаемых объектов. Рабочее увеличение – 1500.

6. Электронный микроскоп. *Принцип работы* электронного микроскопа основан на использовании вместо световых лучей потока электронов, получаемых из электронной пушки. Все оптические линзы заменены электромагнитными катушками, создающими электромагнитное поле, которое управляет движением электронов. Электронный микроскоп увеличивает предмет в 50–200 тыс. раз. Препараты для исследования готовят на тонких пленках коллоидия. На пути потока электронов ставят исследуемый объект, который отражается на люминесцирующем экране. Изображение объекта можно сфотографировать аппаратом,

вмонтированным в микроскоп. С помощью электронной микроскопии можно детально изучать строение бактерий, вирусов, бактериофагов.

В тетради составьте таблицу, где опишите основные типы микроскопов, их марки и характеристики.

3. Изучение морфологических форм микроорганизмов

К морфологическим свойствам относятся не только форма, но и размер клеток, расположение клеток в пространстве, наличие спор и капсул, подвижность и характер окраски бактерий по Граму. Морфология бактерий зависит от условий выращивания на питательных средах, температуры и других факторов. Наиболее типична морфология бактерий в молодых культурах. Среди основных морфологических форм бактерий различают (рис. 1):

- **шаровидные (кокковые)**, которые по характеру взаиморасположения делятся на: *микрококки* (отдельное расположение); *диплококки* (сцепленные попарно); *тетракокки* (сцепленные по четыре); *стрептококки* (сцепленные в цепочку); *сарцины* (сцепленные в пакеты по 8, 12, 16 и т.д.); *стафилококки* (сцепленные беспорядочно в виде виноградной грозди);
- **палочковидные**, которые различаются по форме: *правильная* (энтеробактерии, псевдомонады); *неправильная* (коринебактерии) по размеру: *мелкие* (брюцеллы, бордепеллы); *средние* (бактероиды, кишечная палочка); *крупные* (бациллы, клостридии); по форме концов: *обрубленные* (бациллы); *закругленные* (сальмонеллы, псевдомонады); *заостренные* (фузобактерии); *утолщенные* (коринебактерии) и т.д.

Размеры бактерий в среднем составляют 0,5–5 мкм. *Escherichia coli*, например, имеет размеры 0,3–1×1–6 мкм, *Staphylococcus aureus* – диаметр 0,5–1 мкм, *Bacillus subtilis* – 0,75×2–3 мкм.

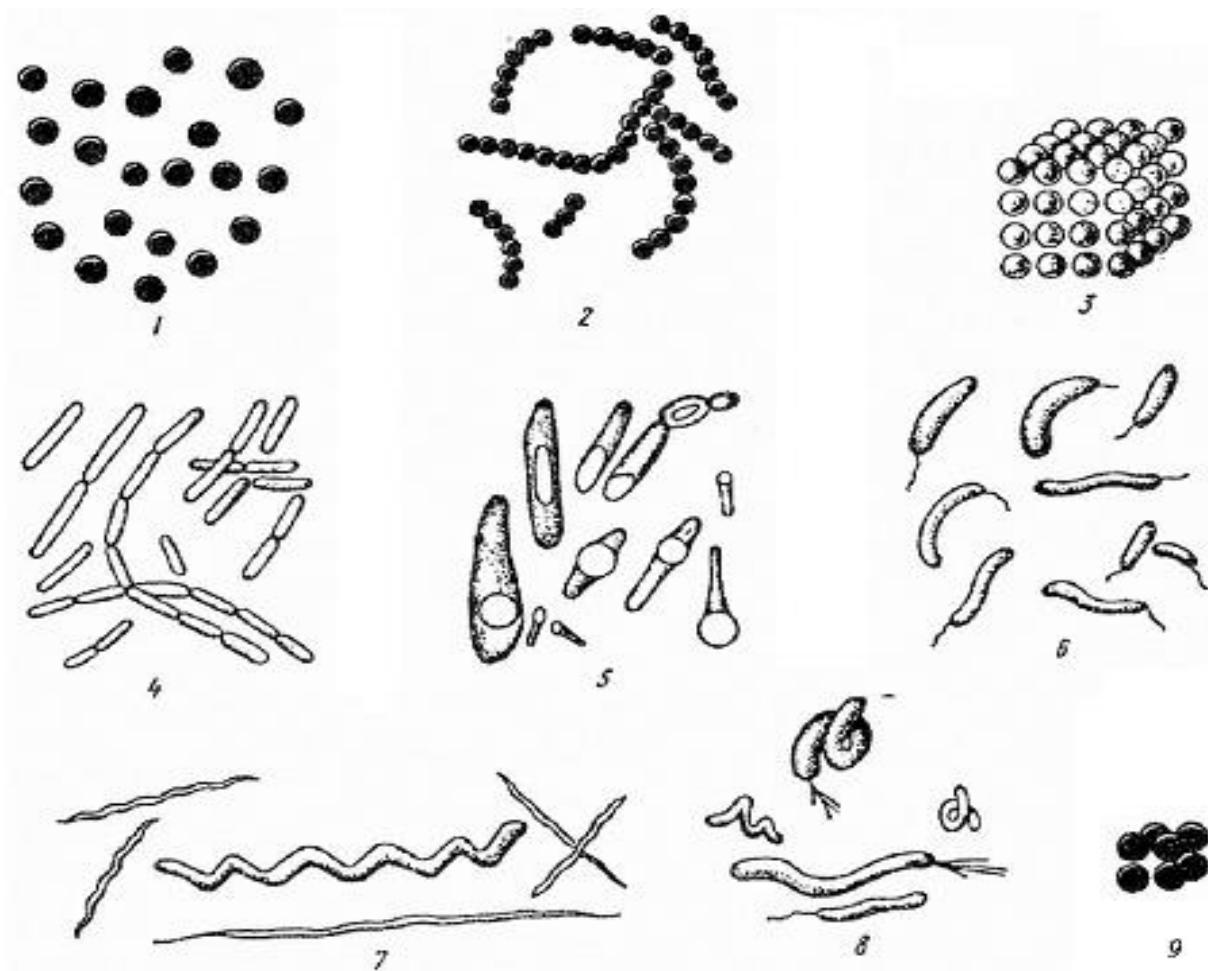


Рисунок 1 – Морфологические формы бактерий: 1 — микрококки; 2 — стрептококки; 3 — сарцины; 4 — палочки без спор; 5 — палочки со спорами (бациллы); 6 — вибрионы; 7 — спирохеты; 8 — спирILLы (с жгутиками); 9 — стафилококки

1. Просмотрите готовые препараты фиксированных окрашенных бактерий, изучите их и зарисуйте в тетрадь, укажите морфологическую форму бактерий.

4. Изучение микрофлоры воздуха методом естественной седиментации (метод Коха)

Принцип работы заключается в осаждение микробных частиц и капель под действием силы тяжести и нисходящих токов воздуха на поверхность плотной питательной среды в открытой чашке Петри.

1. Заполнить чашки Петри расплавленной питательной средой МПА (мясо-пептонный агар);

2. Чашку Петри с застывшей средой МПА оставить открытой в выбранном для исследования помещении, время экспозиции 15 минут;
3. Через 15 минут чашку Петри закрыть, вернуться в лабораторию, подписать чашку, указав дату посева, объект исследования, группу, ФИ.
4. Чашку с посевом поставить в термостат на выращивание, инкубационный период 5 суток при температуре 24-25°C;
5. Взять чашку Петри с посевами воздуха, сделанными на предыдущем занятии, перевернуть ее дном к себе и, не открывая крышки, подсчитать количество выросших колоний;

По количеству выросших колоний подсчитать микробное число воздуха, пользуясь правилом Омелянского (на поверхность питательной среды площадью 100 см² в течение 5 мин оседает столько микроорганизмов, сколько их содержится в 10л воздуха). Каждая микробная клетка дает начало одной колонии. Зная количество выросших колоний и время экспозиции, вычислить количество микробов, содержащихся в 1 м³ (1000 л) воздуха.

6. Если рост плотный, следует разделить донышко на несколько равных секторов маркером и подсчитать два противоположных сектора, найти среднюю величину и умножить ее на число секторов;
7. Сделать пересчет на один кубический метр по формуле:

$$\text{Кол-во микроорганизмов} = \frac{\text{Кол-во колоний на чашке} \times 1000}{30}$$

8. Результаты занести в таблицу 1;

Таблица 1 – Результаты определения микробиологической обсемененности воздуха помещений академии

Аудитории	Кол-во колоний на чашке, шт.	ОМЧ (общее микробное число)
1.		
2.		

9. Сделать заключение о санитарном состоянии воздуха помещений академии.

При формулировании учесть, что бактериологические показатели чистоты воздуха закрытых помещений составляют:

Оценка воздуха		Всего микробов, кл./м ³
Летний период	Чистый	1500
	Загрязненный	2500
Зимний период	Чистый	4500
	Загрязненный	7000

5. Количественное определение микроорганизмов в воде различных источников

Одним из ключевых показателей биологической загрязненности считается число бактерий, присутствующее в 1 мл воды или общее микробное число (ОМЧ).

1. Отобрать пробу воды с соблюдением правил стерильности в стерильную пробирку с притертой резиновой или ватно-марлевой пробкой;

Примечание: для сравнительной оценки в группе студентов провести несколько посевов воды – водопроводной, бутилированной, дистиллированной или фильтрованной на выбор.

2. Из пробирки пипеткой взять 1 мл воды и перенести в стерильную чашку Петри;
3. Залить чашку расплавленной питательной средой МПА (мясо-пептонный агар);
4. Чашки подписать, указав дату посева, объект исследования, группу, ФИ.
5. Чашку с посевом поставить в термостат на выращивание, инкубационный период 5 суток при температуре 24-25⁰C;
6. Взять чашки Петри со своими посевами воды и произвести подсчет колоний по той же методике, которая описана для учета посевов воздуха;
7. Результаты выразить в количестве клеток на один миллилитр и занести их в таблицу 2.

Таблица 2 – Учет количества микроорганизмов в исследуемой воде

Вариант	Кол-во колоний на чашке, шт.	Кол-во клеток в 1 мл воды, кл.	Качество воды
1.			
2.			

8. Сделать заключение о качестве воды.

При формулировании учесть, что бактериологические показатели воды составляют: **0-10** кл./мл – отличное; **10-100** кл./мл – хорошее; **100-1000** кл./мл – удовлетворительное (употреблять после кипячения); **более 1000** кл./мл – употреблять нельзя, необходима проверка.

6. Изучение и описание колоний, выделение чистой культуры микроорганизмов

Изучение культуральных свойств бактерий – один из этапов работы по определению видовой принадлежности микроорганизмов.

Культуральные свойства микроорганизмов определяются характером роста их в плотных, жидких и полужидких питательных средах. Культуральные свойства характерны для каждого вида микроорганизмов и являются важным признаком. На поверхности плотных питательных сред микроорганизмы могут расти в виде колоний, штриха или сплошного газона. *Колонией* называют изолированное скопление клеток одного вида, выросшее из одной клетки. В зависимости от того, где развивались клетки (на поверхности плотной питательной среды, в толще ее или на дне чашки Петри), различают поверхностные, глубинные и донные колонии. Колонии, выросшие на поверхности среды, отличаются большим разнообразием и являются наиболее существенной особенностью роста микроорганизмов на плотном субстрате. При их описании учитывают следующие признаки:

1. **Форма колонии** (рис. 2);
2. **Размер (диаметр) колонии** – измеряют в мм, если размер колонии не превышает 1 мм, то ее называют точечной, 1–2 мм – мелкой, 2–4 мм – средней, 4–6 и более мм – крупной;
3. **Прозрачность.** Колонии могут быть прозрачными, пропускающими свет, и мутными, через которые не видны контуры предметов;
4. **Контур края** (рис. 3). Различают гладкий (S) и шероховатый (R) контур края;
5. **Рельеф колонии (профиль)** (рис. 4) характеризуется приподнятостью ее

над поверхностью питательной среды и контуром формы в вертикальном разрезе. Рельеф колонии определяется невооруженным глазом или под лупой при рассматривании сверху и сбоку.

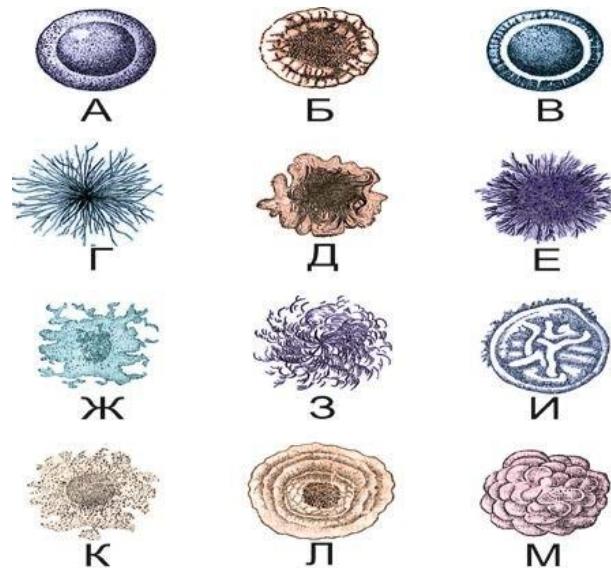


Рисунок 2 - Форма колоний:

А – круглая, Б – круглая с фестончатым краем, В – круглая с валиком по краю, Г, Д – ризоидная, Е – с ризоидным краем, Ж – амебовидная, З – нитевидная, И – складчатая, К – неправильная, Л – концентрическая, М – сложная

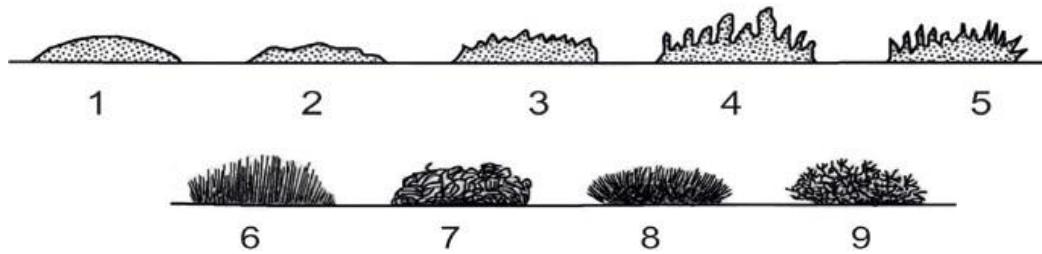


Рисунок 3 - Контур края:

1 – гладкий (S), 2 – волнистый, 3 – зубчатый, 4 – лопастной, 5 – неправильный,
6 – реснитчатый, 7 – нитчатый, 8 – ворсинчатый, 9 – ветвистый

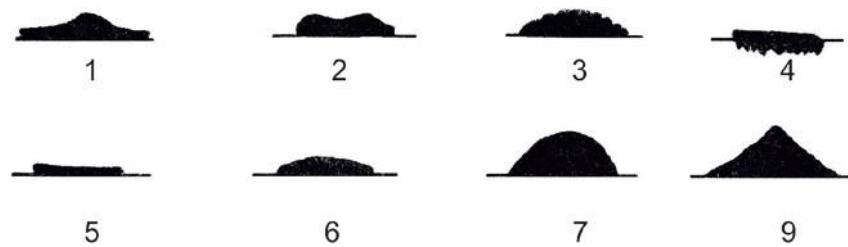


Рисунок 4 - Рельеф колонии (профиль):

1 – изогнутый, 2 – кратерообразный, 3 – бугристый, 4 – врастаящий в агар, 5 – плоский,
6 – выпуклый, 7 – каплевидный, 8 – конусовидный

6. **Поверхность колонии** – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная.
7. **Цвет.** Для определения цвета колонии пользуются шкалой цветов А.С. Бондарцева. Особо отмечают выделение пигментов в субстрат. При описании колоний актиномицетов отмечают пигментацию воздушного и субстратного мицелия, а также выделение пигментов в среду.
8. **Консистенция** колоний исследуется посредством прикосновения микробиологической петлей. По консистенции колонии бывают:
 - пастообразные, легко снимающиеся и размазывающиеся по поверхности питательной среды наподобие сливочного масла;
 - вязкие или слизистые, прилипающие и тянувшиеся за петлей;
 - волокнистые или кожистые, плотные, снимающиеся с поверхности плотной среды в виде упругой пленки, соответствующие величине и форме колонии;
 - хрупкие, сухие, рассыпающиеся при прикосновении петли;
 - крошковатые;
 - плотные, врастаящие в среду.

1. Взять чашку с посевом воды или воздуха;
2. Выделить колонию, которую нужно идентифицировать;
3. Описать ее по следующему плану (табл. 3);

Таблица 3 – Описание бактериальной колонии

Признаки	Характеристика
Форма колонии	
Размер колонии	
Прозрачность	
Форма края	
Профиль	
Поверхность колонии	
Цвет	
Консистенция	

4. После описания, микробиологической петлей перенести материал из колонии в пробирку со скошенным мясо-пептонным агаром;

5. Пробирку подписать и поместить в термостат на выращивание;
6. Из того же материала приготовить препарат и окрасить его, используя метод простого окрашивания.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3

Идентификация микроорганизмов

Вопросы для обсуждения:

1. Генетическая детерминация признаков микроорганизмов.
2. Систематика бактерий.

Материалы и оборудование:

Выделенная чистая культура; предметные стекла; реактивы для окраски по Граму; микроскопы.

Задания:

1. Провести изучение чистой культуры микроорганизмов.
2. Освоить технику приготовления микробиологических препаратов, окрашенных по методу Грама.
3. Провести идентификацию выделенного микроорганизма.

1. Изучение чистой культуры микроорганизмов

Чистая культура – популяция микроорганизмов на питательной среде (жидкой или твердой), представленная клетками одного вида. Это основной тип культур, с которыми имеет дело микробиология. Они позволяют изучать морфологические, биохимические, генетические и другие свойства исключительно одного вида микроорганизмов, пусть даже понятие «вид» по отношению к бактериям является весьма расплывчатым. Чистые культуры – исключительно продукт деятельности человека, в естественных условиях они не встречаются.

1. Взять пробирку со своим посевом изучаемого микроорганизма;
2. Провести визуальное изучение ее состояния, отмечая:
 - наличие или отсутствие роста посторонних микроорганизмов;

- интенсивность роста и равномерность его распределения по штриху;
 - цвет и его соответствие цвету колонии, из которой сделан посев;
 - характер поверхности и форма края.
3. На основании визуального изучения, сделать вывод о предполагаемом соответствии полученной чистой культуры материалу исходной колонии.

2. Техника приготовления микробиологических препаратов, окрашенных по методу Грама

Для идентификации, изучения морфологии, выявления структурных элементов мазок бактериальной культуры необходимо зафиксировать и окрасить.

Этапы приготовления мазка:

- 1.Нанесение микробной культуры.
- 2.Высушивание.
- 3.Фиксация.
- 4.Окрашивание.

Мазок готовят на обезжиренном чистом предметном стекле, куда наносят небольшую каплю воды. В этой капле эмульгируют исследуемый материал, который распределяют тонким слоем на поверхности около 2 см². Если микроорганизмы выращены на жидкой питательной среде, то культуру берут петлей или стерильной пипеткой и каплю наносят непосредственно на стекло (без воды). После этого мазок высушивают на воздухе и фиксируют.

Методы фиксации:

- физический – над пламенем спиртовки;
- химический – в растворах спирта, ацетона, смеси Никифорова, формалина.

Фиксацию мазка над пламенем спиртовки производят в течение нескольких секунд мазком вверх. Эту операцию проводят достаточно быстро после полного высушивания мазка, не перегревая его (прикладывание

предметного стекла к тыльной стороне ладони должно вызывать чувство выраженного тепла, но не жжения).

Цели фиксации:

- обеззараживание патогенных микроорганизмов;
- закрепление клеток на стекле;
- убитые микроорганизмы лучше воспринимают красители.

Окраска бактерий по методу Грама:

Данный метод окраски разработан в 1884 г. датским ученым Кристианом Грамом и предназначается для первичной дифференциации микроорганизмов по типу строения клеточной стенки.

Окраска по методу Грама предполагает обработку препарата красителями трифенилметанового ряда генициан-виолетом или кристал-виолетом, раствором йода, этиловым спиртом и красителем красного цвета (обычно используется фуксин, приготовленный по методу Циля). При наличии в клеточной стенке бактерий большого количества муреина – кристал-виолет и йод образуют стойкий химический комплекс, нерастворимый в спирте, поэтому такие бактерии окрашиваются в сине-фиолетовый цвет и называются **граммоположительными**.

При малом количестве муреина, фиолетовые красители лишь адсорбируются на липопротеидной поверхности клеточной стенки и при обработке спиртом легко смываются. Такие бактерии окрашиваются дополнительным красителем красного цвета и называются **граммотрицательными**.

Окраску следует провести в следующем порядке (модификация Синева):

1. На сухой, хорошо зафиксированный препарат, положить фильтровальную бумагу, пропитанную генициан-виолетом, смочить ее водой до отчетливого влажного блеска поверхности, держать 2 мин;
2. Бумажку снять, слить избытки краски и, не промывая водой, нанести на препарат каплю раствора Люголя – держать 1 мин;

3. Избытки раствора слить и нанести на препарат 2-3 капли этилового спирта, держать 30 сек;
4. Промыть препарат водой из промывалки и нанести на него раствор фуксина Циля, держать 2 минуты;
5. Препарат снова промыть водой и затем высушить фильтровальной бумагой до полного высыхания (на препарате не должно быть даже мельчайших капель влаги);
6. Микроскопировать сначала с объективом $\times 10$, затем с объективом $\times 60$;
7. Определить тип окраски и зарисовать микроорганизмы в тетради.

3. Идентификация микроорганизмов

1. По результатам микроскопического изучения препаратов отметить следующие признаки изучаемого микроорганизма (таблица 4):

Таблица 4 – Описание бактериальных колоний

Признаки	Характеристика
Форма клетки	
Размеры клетки	
Окраска по Граму	
Наличие спор	
Наличие капсул	

2. На основании информации по результатам изучения колоний и микрокопирования определить род и вид микроорганизма. Для этой цели использовать определительную таблицу (Приложение 1. Таблица для определения основных родов и видов микроорганизмов воды и воздуха).
3. Записать в тетрадь ключ хода определения.
4. Указать полную информацию о систематическом положении идентифицированного микроорганизма.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 4

Физиологические функции микроорганизмов

Вопрос для обсуждения:

1. Питание и дыхание микроорганизмов как основа их распространения в природе.

Материалы и оборудование:

Автоклав, дистилятор, термостат, колбы, химические реагенты, питательные среды.

Задания:

1. Изучить условия выращивания, а также состав и типологию питательных сред для культивирования микроорганизмов.
2. Познакомиться с методами стерилизации некоторых материалов и оборудования.

1. Типы и состав питательных сред, условия выращивания микроорганизмов в искусственных условиях

Культивирование микроорганизмов предполагает создание всех необходимых условий для их питания, дыхания и размножения. Для полноценного питания готовятся питательные среды, удовлетворяющие следующим требованиям:

1. Наличие полного набора необходимых для жизни питательных элементов;
2. Создание общей концентрации, не превышающей концентрацию цитоплазмы клетки (влажность на уровне 80 – 90 %);
3. Установление уровня pH, соответствующего потребностям данного организма;
4. Обязательная исходная стерильность питательной среды.

Для соблюдения оптимальных условий дыхания учитывается отношение микроорганизмов к кислороду.

Аэробные микроорганизмы обеспечиваются кислородом с помощью следующих приемов:

1. Разлив питательных сред тонким слоем в емкости для культивирования.
2. Поверхностный посев на плотные питательные среды.
3. Непрерывное перемешивание питательной среды на специальных качалках.
4. Принудительная подача воздуха (или кислорода) в сосуд-культиватор с помощью компрессора.

Анаэробные микроорганизмы выращиваются при отсутствии кислорода, что достигается следующими приемами:

1. Удаление воздуха вакуум-насосом из сосуда-культиватора.
2. Придонный посев в питательную среду, помещенную толстым слоем в узкую емкость.
3. Посев в освобожденную от воздуха питательную среду под слой вазелинового масла

Для активного размножения микроорганизмы нуждаются в соответствующих им температурных условиях. Для обеспечения этих условий посевы для выращивания помещаются в термостаты, в которых поддерживается постоянный и оптимальный температурный режим. В частности, для почвенных микроорганизмов температура в термостате должна быть на уровне 22-24°С.

При изучении и практическом использовании микроорганизмов применяются самые разнообразные питательные среды.

Существует несколько классификаций сред.

1.По консистенции:

– *жидкие среды* готовятся добавлением в дистиллиированную воду различных органических и неорганических веществ. Исторически такой тип сред был первым способом выращивания микроорганизмов. До сих пор жидкие среды используются во многих аспектах микробиологии;

- *полужидкие среды* получают путем добавления в жидкую среду 0,5 % агара;
- *твёрдые питательные среды*. Первым их начал применять в широкой практике Р. Кох. Твёрдые питательные среды получают путем добавления загустителей (уплотнителей) к жидким средам. В качестве загустителей служат агар-агар, желатин и силикагели.

Агар – сложный полисахарид, состоящий из смеси агарозы и агаропектина и получаемый из бурых и красных водорослей. Вследствие некоторых своих особенностей он занял лидирующее положение среди остальных загустителей. К числу таких преимуществ можно отнести относительно высокую температуру плавления (95–100°C), неспособность большинства микроорганизмов использовать его в качестве питательного субстрата и относительную дешевизну. Агар добавляют в концентрации от 1,5 до 3 %.

Желатин – продукт неполного гидролиза белка коллагена, выделяемого из кожи, костей и хрящей животных. Также используется в качестве загустителя, но гораздо реже по причинам низкой температуры плавления (25–30°C) и большого количества микроорганизмов, обладающих протеолитической активностью и, соответственно, разлагающих желатин.

Силикагель – неорганическое вещество, представляющее собой высушенные перенасыщенные растворы кремниевых кислот. Так как органических веществ этот загуститель не содержит, его используют преимущественно для выращивания хемолитоавтотрофов.

- *сыпучие питательные среды* используются в микробиологической промышленности для хранения культур микроорганизмов. Чаще всего в качестве сыпучих сред выступают отруби или кварцевый песок, пропитанные раствором питательной среды.

2. По природе компонентов:

- *натуральные питательные среды* состоят исключительно из продуктов естественного происхождения – крови, молока, овощных,

дрожжевых или мясных отваров. Натуральные среды отличаются широким спектром веществ в своем составе, универсальностью, но у них есть существенные недостатки – невозможно точно установить их качественный или количественный состав. Таким образом, нельзя их использовать для изучения метаболизма микроорганизмов;

- *полусинтетические (искусственные) питательные среды* получают добавлением различных синтетических компонентов к вышеперечисленным натуральным средам;
- *синтетические питательные среды* состоят исключительно из точных навесок заранее известных и чистых органических и/или неорганических веществ. Состав подобных сред всегда точно известен, их возможно использовать для изучения метаболизма. Кроме этого, некоторые микроорганизмы растут преимущественно именно на синтетических средах.

3. По назначению:

- *универсальные питательные среды* используются для выращивания широкого спектра микроорганизмов. Если сам микроорганизм не требователен к составу питательных сред, то он стабильно будет расти на универсальных питательных средах. Подобные питательные среды чаще всего являются также натуральными по своему составу;
- *элективные питательные среды* используются для выделения культур микроорганизмов из естественных ниш. Своим составом они благоприятствуют одним микроорганизмам и препятствуют росту других. Таковой средой является среда Эшби, используемая для выращивания азотфикссирующих бактерий. Так как сама среда не содержит в себе источника азота, то только бактерии, способные фиксировать его из атмосферы, способны расти на ней.

Среда ЭШБИ относится к группе синтетических, плотных, элективных питательных сред. Она предназначена для выращивания азотфикссирующих

микроорганизмов. Свойства элективности (избирательности) ей придает состав, в котором полностью отсутствуют источники азота.

Среда МПА – мясо-пептонный агар – относится к группе плотных, искусственных питательных сред, общего назначения. На этой среде культивируются практически любые формы микроорганизмов, обладающие гетеротрофным типом питания. Она широко применяется в микробиологической практике медицинского, санитарного, исследовательского и других направлений. Выпускается в виде сухого концентрата, который перед употреблением необходимо развести в воде в нужной пропорции и простерилизовать.

2. Основные методы стерилизации

Создание асептических условий – необходимое требование для правильной работы в микробиологических лабораториях. Существует множество способов обеспечить подобные условия.

1. Термическая стерилизация (методы, основанные на высоких температурах):

- фламбирование – обработка рабочего инструмента в пламени. Подобным образом обрабатываются микробиологические петли, иглы, шпатели, горлышки посуды непосредственно перед работой. Фламбирование происходит в верхней, самой горячей части пламени;
- обработка сухим жаром (180°C, 2 ч) в сухожаровых шкафах. Применяется для пустой стеклянной и фарфоровой посуды, термоустойчивых порошков;
- автоклавирование – обработка насыщенным паром под давлением. Осуществляется в специальных приборах – автоклавах, в которых создается дополнительное давление, позволяющее проводить обработку паром температурой выше 100°C. Чаще всего для стерилизации в микробиологической практике, используют температуры от 112 до 135°C. Для этого в автоклавах создается

дополнительное давление в 0,5–1,5 атм. Автоклавированием стерилизуют в первую очередь микробиологические среды;

- тиндализация – особый способ температурной стерилизации сред и различных веществ, которые нельзя стерилизовать при температурах выше 100°C. Тиндализацию осуществляют текучим паром в кипятильниках Коха или в незакрытых автоклавах. Обработку проводят в течение 10–15 мин., после чего среды на сутки ставят в благоприятные условия – в термостат при 30°C. В это время споры, которые выжили при обработке текучим паром, прорастают, становясь вегетативными клетками. Спустя сутки процедуру повторяют. Проделав весь цикл несколько раз, можно добиться полного исчезновения спор;
- пастеризация – однократное нагревание объекта стерилизации до 60–70°C в течение 10–15 мин. Подобный метод не позволяет избавиться от спор микроорганизмов и стерильности не обеспечивает. Пастеризацию используют в тех случаях, когда объект не выдерживает нагревания выше 70–80°C. Чаще всего пастеризацию используют для вина, пива, молока и т. д.;
- кипячение используется редко для стерилизации металлического и стеклянного инструмента в течение 30–40 мин.

2. Холодная стерилизация (без повышения температуры):

- стерилизации химическими веществами чаще всего подвергаются поверхности, и реже – инструмент. В качестве дезинфицирующих средств может выступать множество соединений – хлорсодержащие, спирты, ПАВ, третичные амины, соединения серебра, перекисные соединения и многое другое. Для каждого дезинфицирующего средства есть свои режимы обработки и другие особенности;
- стерилизации газообразными веществами подвергается лабораторная посуда, не выдерживающая высоких температур – вся посуда из термолабильного пластика, например. Стерилизация осуществляется

в специальных приборах, посуду также необходимо корректно упаковать. В качестве стерилизующих газов используют оксид этилена, формальдегид, озон;

- стерилизации облучением подвергаются в первую очередь помещения, рабочее место (в ламинарном боксе) и поверхности. Стерилизацию проводят с помощью ультрафиолетового излучения, и реже – некоторых других его видов;
- стерилизация фильтрованием применяется для тех соединений, которые не выдерживают даже небольшого нагревания. В качестве бактериальных фильтров используют соединения с размерами пор не более 0,7 мкм. Особенное распространение получили мембранные фильтры на основе нитроцеллюлозы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 5 (СЕМИНАР)

Роль микроорганизмов в природе и жизни человека

Вопросы для обсуждения:

1. Общее представление о микромире.
2. Значение микроорганизмов в основных процессах жизнедеятельности растений, животных и человека; роль микроорганизмов в процессах почвообразования.

Материалы и оборудование:

Иллюстрационный материал; компьютер; мультимедийный проектор.

Задания:

1. На основе самостоятельно подготовленных сообщений студентов познакомиться с видовым разнообразием микромира и его значением в природе и обществе.

1. Многообразие мира микроорганизмов. Особенности организации

Микроорганизмы широко распространены в природе. Они постоянно присутствуют в почвах, водоемах, на поверхности и внутри тела человека,

животных и растений, в пищевых продуктах, воздухе и т.д. При их участии происходит разложение различных органических веществ в почвах и водоемах, они обуславливают круговорот веществ и энергии в природе; от их деятельности зависит плодородие почв, формирование многих полезных ископаемых. Большое количество микроорганизмов используются в медицине, промышленности и сельскохозяйственном производстве.

1. Самостоятельно подготовить сообщение о любом представителе микроорганизмов. Объем доклада не более 5 страниц машинописного текста;
2. Сообщение должно быть представлено в виде презентации, с использованием фото- и видеоматериалов;
3. В докладе следует обязательно отразить систематическое положение выбранного объекта, дать его краткую характеристику, подробнее остановившись на интересных фактах (см. **Пример 1**).
4. Тему доклада следует выбирать заранее, предварительно обсудив с преподавателем. Для выбора темы можно воспользоваться списком основных изучаемых видов микроорганизмов (Приложение 2).

ПРИМЕР 1. Характеристика микроорганизма.

1. *Название* микроорганизма: Clostridium tetani



2. *Систематическое положение:*

Отдел: Firmicutes

Класс: Firmibakteria

Семейство: Bacillaceae

3. *Морфологические признаки:*

Крупные, отдельно расположенные палочки величиной от 4 до 8 мкм в длину, и от 0,3 до 0,8 мкм в поперечнике. Иногда они располагаются цепочками и образуют круглые, терминально расположенные споры, которые в 2-3 раза шире, чем сама палочка. Концевое расположение спор придаёт бациллам форму барабанной палочки. Эти палочки имеют до 20

жгутиков, расположенных по всей поверхности тела бациллы, хорошо окрашиваются всеми анилиновыми красками; в молодых культурах грамположительны, в старых – встречаются грамотрицательные бациллы. Капсулы они не имеют.

4. Физиологическая характеристика.
5. Распространение в природе.
6. Практическое использование

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 6

Роль микроорганизмов в круговороте углерода в природе

Вопросы для обсуждения:

1. Основные закономерности круговорота углерода и значение этого процесса для сельскохозяйственного производства.

Материалы и оборудование:

Стерильные пробирки; сухие и прессованные дрожжи; метиленовый синий; раствор Люголя; предметные и покровные стекла; почва с опытного поля из-под различных сельскохозяйственных культур; чашки Петри.

Задания:

1. Составить таблицу, характеризующую основные типы брожения.
2. Провести микроскопическое изучение дрожжевых клеток.
3. Заложить опыт для изучения процесса разложения целлюлозы.

1. Основные типы брожения, вызываемые микроорганизмами в природе и используемые человеком в жизненной практике

Углерод – важнейший элемент органической природы. Он является неотъемлемой частью всех живых организмов. Зеленые растения ежегодно потребляют колоссальное количество углекислоты. Если бы в природе отсутствовали источники пополнения атмосферы углеродом, то вскоре жизнь полностью бы затихла.

Основным источником пополнения атмосферы углекислотой является жизнедеятельность микроорганизмов. Многие микроорганизмы разлагают органические вещества животных и растительных остатков на более простые, вплоть до углекислоты и воды. Эти превращения весьма многообразны по своей химической природе.

1. Описать по форме (таблица 6) следующие типы брожения, вызываемые микроорганизмами: спиртовое, молочно-кислое (гомоферментативное, гетероферментативное, с участием бифидобактерий), уксусно-кислое, масляно-кислое, пропионовое, разложение пектиновых веществ, разложение целлюлозы.

Таблица 6 – Характеристика основных типов брожения

Название процесса	Исходные соединения	Продукты брожения	Микроорганизмы-возбудители	Использование
1.				
2.				

Вывод:

2. Микроскопическое изучение дрожжевых клеток

Спиртовое брожение – это процесс превращения углеводов, вызываемый дрожжами, некоторыми видами бактерий и отдельными представителями мукоровых грибов. Однако практическое значение имеет лишь спиртовое брожение, осуществляемое дрожжами.

Спиртовое брожение лежит в основе виноделия, пивоварения, хлебопечения. Большинство видов культурных дрожжей, используемых в бродильных производствах, принадлежит к роду *Saccharomyces*.

Обнаружение гликогена.

1. Взять пробирку с активированными дрожжами, с помощью микробиологической петли нанести каплю раствора на предметное стекло и добавить к ней 1-2 капли 0,5% раствора Люголя;
2. Накрыть покровным стеклом и микроскопировать;

3. В 5 полях зрения подсчитать количество клеток дрожжей, окрашенных в светло-желтый цвет (*гликоген отсутствует*); клеток дрожжей с включениями красно-бурого цвета (*гранулы гликогена*).

Гликоген – запасное питательное вещество. От его количества зависит бродильная сила дрожжей. В молодых активных клетках он должен занимать от 1/3 до 2/3 объема клетки. Содержание его на 1/4 и менее считается недостаточным. В незначительном количестве он содержится в вакуолях и полностью отсутствует в перезревших и голодных клетках.

4. Зарисовать в тетради несколько клеток, сделать вывод о качестве дрожжей.

Определение соотношения живых и мертвых клеток.

1. Взять пробирку с активированными дрожжами, с помощью микробиологической петли нанести каплю раствора на предметное стекло и добавить к ней 1-2 капли красителя «метиленовый синий» (концентрация 1:5000);

2. Накрыть покровным стеклом и микроскопировать;

3. В 5 полях зрения подсчитать количество живых (бесцветных) и количество мертвых (синих) клеток.

В хороших засевных дрожжах количество мертвых клеток не должно превышать 5%.

4. Зарисовать в тетради несколько клеток, сделать вывод о качестве дрожжей.

3. Постановка опыта для изучения скорости разложения целлюлозы

Разложение целлюлозы – это важный микробиологический процесс, при котором целлюлоза служит источником углеродного питания микроорганизмов.

Целлюлоза – это сложный полимер, усвоение которого микроорганизмами возможно только после длительного воздействия на него экзоферментами. Поэтому опыт закладывается на продолжительный срок – минимум на четыре недели. В природе процесс разложения целлюлозы имеет

важное положительное значение, т.к. участвует в осуществлении круговорота углерода.

1. Взять стерильную чашку Петри, две полоски фильтровальной бумаги, почву из-под сельскохозяйственной культуры.
2. Взвесить фильтровальные бумажки, массу записать в тетрадь.
3. Засыпать почву на 1/2 объема чашки, увлажнить и положить на ее поверхность полоски фильтровальной бумаги.
4. Чашку закрыть, подписать и поставить в термостат.

В лабораторных тетрадях записать, какой опыт заложен, кратко методику постановки, тип почвы, взятой на исследование, массу фильтра и обязательно отметить дату постановки опыта.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 7

Круговорот азота в природе

Вопросы для обсуждения:

1. Как связаны процессы круговорота углерода и азота в природе.
2. Общие закономерности круговорота азота. Иммобилизация азота.

Материалы и оборудование:

Пробирки с мясо-пептонным бульоном; индикаторные бумажки; образцы почвы из-под разных с/х культур.

Задания:

1. Составить сводную таблицу характеристики процессов круговорота азота.
2. Провести постановку опыта по изучению процесса аммонификации.

1. Сравнительная оценка процессов круговорота азота

Азотистые вещества в природе находятся в форме органических и минеральных соединений. Органические соединения входят в состав гумуса, растительных и животных остатков, а также в состав живых организмов. Минеральные соединения азота представлены солями азотной, азотистой кислот, аммонийными солями. Все эти соединения в природе подвергаются

постоянным изменениям. Из органических форм они превращаются в минеральные формы и наоборот. Эти превращения осуществляются в основном микроорганизмами, которые участвуют в круговороте азота.

1. Описать по плану основные процессы круговорота азота в природе: аммонификация, нитрификация, денитрификация (таблица 7).
2. Указать положительные и отрицательные стороны процессов круговорота азота, их значение в почвообразовательном процессе.

Таблица 7 – Характеристика основных процессов круговорота азота в природе

Название процесса	Исходные соединения	Продукты трансформации	Микроорганизмы-возбудители	Использование
1.				
2.				

2. Постановка опыта по изучению процесса аммонификации

Распад белковых соединений сопровождается выделением аммиака и называется *аммонификацией*. Процесс *аммонификации* (или *гниения*) широко распространен в природе, в нем участвуют бактерии, грибы, актиномицеты. Эта богатая и разнообразная физиологическая группа микроорганизмов получила общее название аммонификаторов. Микроорганизмы используют продукты распада белков как источник азота, углерода и энергии.

1. В пробирку с мясо-пептонным бульоном на кончике скальпеля внести исследуемую почву.
2. Для контроля за ходом процессов в пробирку вставить индикаторные бумажки: лакмусовая – для фиксации выделения аммиака и с уксуснокислым свинцом – для контроля за выделением сероводорода.
3. Пробирку с посевом завязать пергаментной бумагой, подписать и поставить в термостат.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 8

Превращение микроорганизмами органических и минеральных соединений азота

Вопросы для обсуждения:

1. Минерализация азотсодержащих органических соединений.
2. Характеристика процессов нитрификации и денитрификации.

Материалы и оборудование:

Посевы предыдущего занятия; предметные и покровные стекла; реактивы для окраски по Граму; образцы почвы из-под разных с/х культур; залитые средой Эшби чашки Петри; стерильные колбы с жидкой средой Эшби.

Задания:

1. Провести учет опыта по изучению процесса аммонификации.
2. Заложить опыт по выделению культуры свободноживущих азотфиксаторов Azotobakter и Clostridium из почвы из-под разных с/х культур.

1. Учет опыта по изучению процесса аммонификации

Процесс аммонификации имеет огромное значение в природе и жизни человека. Численность аммонифицирующих бактерий, а также отдельные доминирующие виды бацилл могут служить одним из достоверных показателей биологической активности почв. Интенсивность минерализации органических веществ в почве в значительной мере определяется численностью и активностью аммонификаторов и обуславливает степень обеспеченности почвы минеральными соединениями азота, а последние – эффективное плодородие почвы.

1. Взять свой посев, сделанный на предыдущем занятии, и, не встрихивая пробирку, оценить визуально:
 - помутнение среды, образование осадка на дне пробирки;
 - образование на ее поверхности бактериальной пленки;

- изменение цвета индикаторных бумажек.
- Приготовить мазок из содержимого пробирки, взяв материал из осадка и пленки и окрасить его по Граму.
 - Рассмотреть под микроскопом и ориентировочно определить возбудителей процесса, зарисовать.
 - Результаты своих наблюдений и результаты работы других студентов занести в таблицу 8.

Таблица 8 – Учет активности процесса аммонификации

Изучаемая почва	Наличие осадка, мм	Наличие бактериальной пленки (в баллах)	Интенсивность выделения (в баллах)		Сумма баллов
			NH ₃	H ₂ S	
1.					
2.					

Вывод:

2. Выделение культуры свободноживущих азотфиксаторов из почвы сельскохозяйственных полей

Для поддержания благоприятного азотного баланса в почве и улучшения азотного питания растений процесс биологического связывания азота атмосферы микроорганизмами – *азотфиксация* – имеет исключительное значение. Потеря почвой азота происходит за счет вымывания его в нижние горизонты и улетучивания аммиака и газообразного азота в результате процессов денитрификации.

Растения в процессе роста и развития потребляют из почвы много азота. Однако ни высшие растения, ни животные не могут ассимилировать свободный азот атмосферы самостоятельно. Способностью потреблять молекулярный азот обладают только некоторые микроорганизмы, получившие название *азотфиксирующих*, именно им и принадлежит особо важная роль в обогащении почвы связанным азотом. *Бактерии-азотфиксаторы* используют молекулярный азот для синтеза клеточных белков. После отмирания клеток азотфиксаторов и последующей аммонификации их белков в почве увеличивается содержание минерального азота. При жизни азотфиксаторы

также способны выделять из своих клеток в окружающую среду азотистые вещества (аммиак, аминокислоты). Азотфикссирующие микроорганизмы принято подразделять на *свободноживущие* и *симбиотические*.

Принцип выделения основан на элективных свойствах питательной среды, в которой нет азотсодержащих соединений (источников азота). Следовательно, растя на ней смогут лишь микроорганизмы, способные усваивать азот из воздуха. Жидкая среда используется для морфологического изучения культуры, а твердая – для количественной оценки развития микроорганизмов р. *Azotobakter*.

Выделение культуры свободноживущих азотфиксаторов Azotobakter и Clostridium на твердой питательной среде.

1. Провести посев изучаемой почвы на поверхность среды – методом почвенных комочеков. Высев провести стерильными пипетками.
2. Чашки Петри подписать, указав дату посева и вид почвы, поместить в термостат. Инкубационный период 5 суток при температуре 24-25⁰C.

Выделение культуры свободноживущих азотфиксаторов Azotobakter и Clostridium на жидкой питательной среде.

1. Взять колбу с жидкой питательной средой Эшби и с помощью скальпеля всыпать почву в питательную среду.
2. Колбу закрыть и завязать пергаментным колпачком, предварительно написав на ней свою фамилию, дату посева и характеристику почвы.
3. Поставить в термостат. Инкубационный период 5 суток при температуре 24-25⁰C.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 9

Процессы биологической фиксации молекулярного азота атмосферы микроорганизмами

Вопросы для обсуждения:

1. Фиксация азота ассоциативными, свободноживущими и симбиотическими микроорганизмами.
2. Биология клубеньковых бактерий.

Материалы и оборудование:

Посевы предыдущего занятия; предметные и покровные стекла; реактивы для окраски по Граму.

Задания:

1. Провести учет опыта по выращиванию азотобактера на жидкой и твердой питательной среде.
2. Обсудить решение ситуационных задач по вопросам круговорота азота.

1. Учет опыта по выращиванию азотобактера на жидкой и твердой питательной среде

Наиболее важными и хорошо изученными свободноживущими азотфиксаторами являются бактерии из родов *Azotobacter* и *Clostridium*. Азотобактер распространен в почвах, богатых легко доступным органическим веществом, имеющих нейтральную или слабощелочную реакцию среды.

Источником азота для азотобактера служит молекулярный азот, но этот микроорганизм может также усваивать азот нитратов, солей аммония, аминокислот. Углерод и энергию азотобактер получает из разнообразных органических веществ: углеводов, спиртов, органических кислот и их солей. Азотобактер требователен к наличию в среде фосфора, кальция и железа, а также микроэлементов – молибдена, бора. Экологи и почвенные микробиологи используют этот микроорганизм для индикации уровня почвенного плодородия, степени окультуренности почвы, обнаружения в почве различных

токсикантов (пестицидов и др.). На основе клеток азотобактера готовят бактериальное удобрение – *азотобактерин*.

К свободноживущим азотфиксаторам относится ряд спорообразующих бактерий рода *Clostridium*. Среди них маслянокислые (*Cl. pasteurianum*), ацетонобутиловые (*Cl. acetobutylicum*), пектинразлагающие (*Cl. pectinovorum*). В определенных условиях эти бактерии могут фиксировать молекулярный азот. Подобно азотобактеру, *Cl. pasteurianum* использует различные источники углерода, энергию получает за счет сбраживания этих веществ. На безазотистых средах эти бактерии фиксируют молекулярный азот, но они могут усваивать также азот из различных минеральных и органических соединений.

1. Взять посевы, сделанные на предыдущем занятии.
2. Описать характер роста на твердой питательной среде.
3. Сделать подсчет количества комочеков почвы, вокруг которых появился рост азотобактера.
4. По соотношению общего количества почвенных комочеков и количества комочеков с азотобактером высчитать процент обсемененности.
5. Результаты занести в таблицу 9, проанализировать полученные результаты и написать вывод.

Таблица 9 – Количественная оценка обсемененности азотобактером почв различных полей севооборота, %

Наименование почвы	Повторность		Среднее
	1	2	
1.			
2.			
3.			

Вывод:

6. Взять посевы, сделанные на предыдущем занятии.
7. Описать характер роста на жидкой питательной среде.
8. Приготовить 2 мазка из жидкой культуры из разных слоев и окрасить их по Граму.

9. Изучить препарат под микроскопом и зарисовать клетки *Azotobacter* и *Clostridium* с указанием их основных отличий.

2. Решение ситуационных задач по вопросам круговорота азота

Решение ситуационных задач поможет студентам научиться ориентироваться и правильно оценивать микробиологические процессы, идущие в почве. Прогнозировать ситуацию с возникновением иммобилизации на полях, рассчитывать приход биологического азота в зависимости от типа азотфиксации и выращиваемой культуры.

1. Решить задачи, приведенные в разделе «Практические задачи для самостоятельной работы студентов» (раздел 2. «Роль микроорганизмов в круговороте веществ», подраздел 2.2. «Круговорот азота в природе»).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 10 (КОЛЛОКВИУМ)

Круговорот углерода и азота в природе

Вопросы для подготовки:

1. Анаэробное дыхание микроорганизмов с использованием нитратов и сульфатов.
2. Анаэробное дыхание микроорганизмов. Химизм процесса. Биологическая роль дыхания.
3. Анаэробное дыхание по типу брожения. Энергетический выход.
4. Ассоциативная азотфиксация. Характеристика микроорганизмов.
5. Ацетилбутиловое брожение. Химизм процесса. Характеристика микроорганизмов.
6. Аэробное дыхание микроорганизмов. Понятие об энергетическом обмене.
7. Биологическая азотфиксация свободноживущих микроорганизмов. Характеристика *p. Azotobacter* и *p. Clostridium*.
8. Дыхание микроорганизмов, химизм процесса.
9. Маслянокислое брожение. Значение его для сельскохозяйственного производства.

- 10.Молочнокислые бактерии. Использование молочнокислого брожения в пищевой промышленности и сельскохозяйственном производстве.
- 11.Общая закономерность круговорота азота в природе, ход этого процесса в естественных экосистемах и сельскохозяйственных ситуациях.
- 12.Общие закономерности круговорота углерода в природе. Роль микроорганизмов в этом процессе.
- 13.Общие закономерности круговорота азота в природе и связь этого процесса с круговоротом углерода.
- 14.Основные источники азота, доступные микроорганизмам.
- 15.Основные источники связанного азота, доступные растениям. Роль азота в жизнедеятельности организма.
- 16.Основные типы биологической азотфиксации. Значение этого процесса в природе и сельском хозяйстве.
- 17.Питание микроорганизмов. Пищевые потребности, пути поступления питательных веществ в клетку.
- 18.Процесс аммонификации. Виды микроорганизмов – аммонификаторов. иммобилизация азота.
- 19.Процесс денитрификации. Различия ассимиляционной и диссимиляционной денитрификации. Характеристика микроорганизмов-денитрификаторов.
- 20.Процесс нитрификации. Особенности первой и второй фазы нитрификации. Морфология и физиология нитрифицирующих бактерий. Позитивные и негативные последствия его в сельскохозяйственных ситуациях.
- 21.Процессы денитрификации. Значение его в сельскохозяйственных ситуациях.
- 22.Разложение клетчатки и лигнина микроорганизмами, участвующими в этом процессе.
- 23.Разложение пектиновых веществ. Использование этого процесса в первичной обработке льна.

24. Симбиотическая азотфиксация. Характеристика микроорганизмов р. *Rhizobium*. Условия и эффективность бобово-ризобиального комплекса.
25. Специфичность, вирулентность и эффективность клубеньковых бактерий. Размеры поступления азота в почву при возделывании бобовых растений.
26. Спиртовое брожение. Характеристика дрожжей р. *Saccharomyces*.
27. Типы питания микроорганизмов. Синтетические процессы конструктивного обмена.
28. Уксуснокислое брожение. Химизм процесса. Характеристика микроорганизмов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 11

Микробиологическая активность почвы

Вопросы для обсуждения:

1. Какими показателями можно выразить микробиологическую активность почвы.
2. Перечислите способы управления микробиологическими процессами.

Материалы и оборудование:

Чашки Петри; питательные среды МПА, Чапек, Эшби; стерильные колбы на 250 мл с физиологическим раствором; стерильные пробирки с физиологическим раствором; стерильные пипетки; почва из-под разных с/х культур; чашки Петри с опытом по разложению целлюлозы.

Задания:

1. Провести постановку опыта по определению численности микроорганизмов различных физиологических групп в дерново-подзолистой почве.
2. Сделать учет опыта по изучению интенсивности разложения целлюлозы и провести микроскопическое изучение микроорганизмов, участвующих в разложении целлюлозы.

1. Постановка опыта по определению численности микроорганизмов различных физиологических групп в дерново-подзолистой почве

Почвы содержат огромное количество и разнообразие микроорганизмов.

Микроорганизмы обусловливают протекание в почве ряда наиболее важных процессов. Они являются необходимым звеном в круговороте всех биогенных элементов, участвуют в почвообразовании и поддержании почвенного плодородия.

Объекты исследования: образцы почвы с опытного поля КГСХА из-под различных сельскохозяйственных культур.

Направление исследования: на изучение поставлены наиболее важные в агрономическом отношении группы микроорганизмов, количество которых в почве свидетельствует о ее плодородии и экологическом равновесии. Такими группами микроорганизмов являются: общая группа гетеротрофных бактерий, участвующих в процессе аммонификации, свободноживущие азотфиксаторы, клубеньковые бактерии и фосфатмобилизирующие бактерии. Определение численности этих микроорганизмов позволит сделать прогноз на необходимые агрономические мероприятия.

1. Взять навеску почвы (1 г) и поместить в чистую стерильную колбу с физиологическим раствором.
2. Поместить колбу на качалку и встряхивать в течение 10 мин.
3. Сделать разведение по следующей схеме:

Схема разведения (рис. 1):

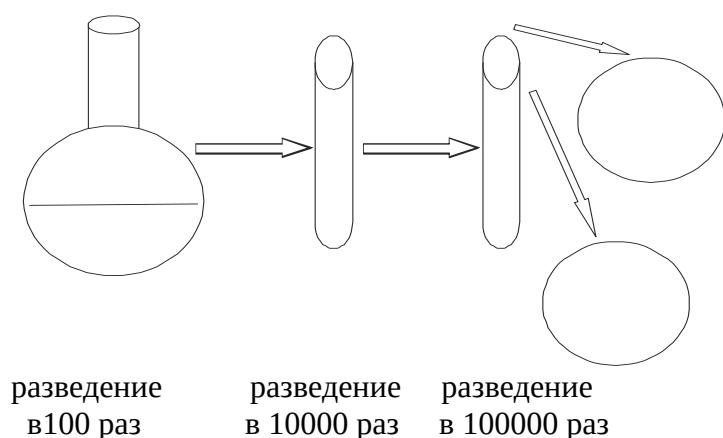


Рисунок 5 – Схема разведения

4. Колба – 1 г почвы + 100 мл физ. раствора – разведение в 100 раз.
5. Первая пробирка – 0,1 мл взвеси из колбы + 9,9 мл физ. раствора – разведение в 10 000 раз.
6. Вторая пробирка – 1 мл раствора из первой пробирки + 9 мл физ. раствора – разведение в 100 000 раз.
7. Из второй пробирки по 1 мл помещается в стерильные пустые чашки Петри.
8. Чашки Петри заполнить расплавленной питательной средой и подписать.

В работе используются следующие питательные среды:

1. *Питательная среда МПА (мясопептонный агар)* – для определения численности аммонификаторов.
2. *Питательная среда Эшиби* – для определения количества свободно живущих азотфиксаторов.
3. *Глюкозо-аспаргиновая среда* – для изучения фосфатмобилизующих бактерий.
4. *Питательная среда Чапека* – для определения численности микромицетов.

2. Учет активности процесса разложения целлюлозы

Биологическая активность почвы может определяться не только по численности отдельных групп микроорганизмов, но и по интенсивности некоторых процессов, вызываемых ими.

Скорость разложения клетчатки в почве зависит от наличия в ней легкодоступного азота, поэтому данный метод позволяет судить об энергии мобилизации почвенных процессов в целом.

Являясь очень устойчивой к действию физико-химических факторов, она легко разлагается микроорганизмами с выделением углерода, который в форме различных соединений участвует в создании почвенного плодородия. Целлюлозу разлагают аэробные микроорганизмы (бактерии и грибы) и анаэробные мезофильные и термофильные бактерии. Для большинства

микроорганизмов, разлагающих целлюлозу, характерна высокая специфичность по отношению к этому веществу.

В кислых почвах ее разрушают главным образом грибы и в небольшой степени актиномицеты, в нейтральных почвах – грибы, актиномицеты и бактерии. Особенностью целлюлозоразлагающих микроорганизмов является их высокая требовательность к источникам азотного питания. Микроорганизмы почв, разрушающие целлюлозу, служат важнейшими поставщиками органических веществ для разнообразных групп микроорганизмов (в том числе азотфиксирующих), связанных общей пищевой цепью. Поскольку активность целлюлозоразрушающих микроорганизмов зависит также от наличия в почве доступного фосфора и других элементов, то степень распада клетчатки, можно считать, отражает направленность хода микробиологических процессов в целом.

1. Для учета интенсивности процесса разложения целлюлозы взять чашку со своим опытом.
2. Внимательно рассмотреть состояние посева, отметить изменение в состоянии целлюлозных полосок.
3. Визуально оценить степень разложения целлюлозы в процентах.
4. Сравнить этот показатель с результатами, полученными на других почвах. Занести результаты в сводную таблицу 10.

Таблица 10 – Интенсивность разложения целлюлозы в изучаемых почвах

Почва							
% разложения							

Вывод:

5. Взять чашку Петри с опытом по разложению целлюлозы и с помощью микробиологической петли приготовить мазок.
6. Окрасить по Граму и рассмотреть под микроскопом.
7. Зарисовать и подписать названия основных видов целлюлозоразрушающих бактерий с указанием их систематического положения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 12

Состав и численность микроорганизмов разных типов почв.

Роль микроорганизмов в круговороте зольных элементов

Вопросы для обсуждения:

1. Количественное и качественное разнообразие почвенных микроорганизмов.
2. Их значение в обеспечении растений зольными элементами.

Материалы и оборудование:

Чашки Петри с посевами предыдущего занятия; предметные стекла; набор красок по Граму.

Задания:

1. Провести количественный учет основных агрономически важных групп микроорганизмов в почвах опытного поля.

1. Количественный учет основных групп микроорганизмов в почвах опытного поля

Почвенные микроорганизмы принимают активное участие в трансформации внесенных в почву минеральных и органических удобрений, разложении пожнивно-корневых остатков и соломы, а также в превращении органического вещества самой почвы - гумуса.

Поэтому изучение и знание их видового состава, численности, условий для активной жизнедеятельности позволяют специалистам сельского хозяйства принимать правильные, научно обоснованные решения при размещении культур в севообороте, выборе способов обработки почвы, составлении системы удобрений, осуществлении различных мелиоративных мероприятий и выборе технологий возделывания отдельных сельскохозяйственных культур.

1. Подсчитать количество колоний на чашках Петри. При подсчете учсть, следующее:
 - на среде МПА подсчитывают все выросшие колонии;

- на среде ЭШБИ учитывают только поверхностные прозрачные, блестящие слизистые колонии (такой рост дают свободно живущие азотфиксаторы, главным образом азотобактеры);
- на среде ГАА (глюкозо-аспаргиновый агар) подсчитывают колонии, вокруг которых имеют место зоны растворения фосфатов;
- на среде Чапека считают округлые колонии, формирующие воздушный мицелий на поверхности среды.

2. Результаты подсчета занести в таблицу 11.

Таблица 11 – Численность микроорганизмов в изучаемой почве

Группа микроорганизмов	Питательная среда	Количество колоний на чашке	Разведение	Кол-во микроорганизмов в 1 г почвы
Аммонификаторы	МПА			
Азотфиксаторы	ЭШБИ			
Фосфатрастворяющие	ГАА			
Микромицеты	Чапека			

Вывод:

При формулировании вывода учесть, что для дерново-подзолистых почв нормальные показатели численности микроорганизмов составляют: аммонификаторы – 2,5–3,0 млн. кл./г сухой почвы; азотфиксаторы – 300–500 тыс. кл./г; фосфатрастворяющие – 1,5 – 2,0 млн., клубеньковые – 50 – 100 тыс. на 1 г.

3. Взять чашку Петри с посевом и с помощью микробиологической петли приготовить мазок.
4. Окрасить по Граму и рассмотреть под микроскопом.
5. Зарисовать и подписать названия основных видов бактерий с указанием их систематического положения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 13

Микроорганизмы и почвообразовательный процесс

Вопросы для обсуждения:

1. Экологический принцип существования почвенных экосистем.
2. Роль микроорганизмов в процессе образования и разрушения гумуса в почве.

Материалы и оборудование:

Калькулятор; расчетные данные предыдущих занятий.

Задания:

1. Освоить способы расчета биомассы почвенных микроорганизмов и объема минерализации органических веществ в почвах опытного поля.
2. Обсудить решение ситуационных задач по микробиологической активности почвы.

1. Расчет биомассы микроорганизмов и объема минерализации органических веществ в почвах опытного поля

Размеры биомассы микроорганизмов можно подсчитать исходя из данных по численности микроорганизмов в почве. В ходе предыдущего занятия была определена общая численность гетеротрофных микроорганизмов на среде МПА. На данной среде учитываются далеко не все виды микроорганизмов.

Исследованиями многих ученых установлено, что общая численность микрофлоры почвы в среднем в 1000 раз выше тех величин, которые учитываются на питательной среде МПА.

Используя эту информацию, сделайте соответствующие расчеты. Для расчетов используйте формулу:

$$\text{Биомасса, т/га} = H \times C \times M \times K/m,$$

где H – численность аммонификаторов в млн. кл/г;

C – коэффициент перерасчета на общее число почвенных микроорганизмов, выраженное в миллиардах, который равен 1000;

M – масса почвы пахотного горизонта на площади 1 га – 3 000 000 000 г;

К – коэффициент перерасчета численности в биомассу – 1, из расчета, что один миллиард почвенных микроорганизмов весит 1 мг;

М – коэффициент перевода миллиграммов в тонны на 1га – 1 000 000 000;

Если при расчетах сократить величину 3 000 000 000, которая будет в числителе, и величину 1 000 000 000, которая в знаменателе, формула значительно упрощается:

$$\text{Биомасса, т/га} = H \times 3$$

Полученный результат будет характеризовать размеры сырой биомассы.

Сухая биомасса составляет 10% от сырой, т.е. в 10 раз меньше.

Под *размерами минерализации* подразумевается то количество органического вещества, которое будет израсходовано данной популяцией на энергетический обмен. На эти цели микроорганизмы расходуют углерода в 4 раза больше, чем на поддержание своей биомассы. То, что расходуется на энергетический обмен, удаляется из почвы в виде углекислого газа. Эта величина и будет составлять объем минерализации для почвы данного варианта.

Рассчитайте этот показатель для своего варианта почвы и сравните его с другими вариантами по таблице 12.

Таблица 12 – Комплексная оценка микробиологической активности почвы

Почва	Численность м/о, млн.кл./г	Биомасса сухая т/га	Разложение целлюлозы %; т/га	Объем минерализации, т/га	Общ. индекс активности
1.					
2.					
3.					

Вывод:

2. Решение ситуационных задач по микробиологической активности почвы

Задача 1. Как изменится численность микроорганизмов в почве одного поля при внесении в почву органических удобрений?

Задача 2. В результате активной обработки почвы и внесения минеральных удобрений может наступить снижение запасов гумуса. Укажите возможные микробиологические причины этого явления.

Задача 3. Определить возможности возникновения иммобилизации азота при внесении в почву органических удобрений со следующим отношением углерода к азоту: 50/1; 8/1.

Примечание: кроме указанных задач, можно использовать задачи из раздела «Практические задачи для самостоятельной работы студентов» (раздел 4. «Роль микроорганизмов в почвообразовательном процессе»).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 14-15

Взаимоотношение микроорганизмов и растений

Вопрос для обсуждения:

1. Эпифитная микрофлора растений и ее роль в жизнедеятельности растений, подготовке кормов и хранения зерна.
2. Применение методов биоконверсии в сельском хозяйстве.
3. Микробиологические основы технологии получения высококачественного силоса.

Материалы и оборудование:

Чашки Петри; питательная среды МПА; стерильные колбы на 250 мл с физиологическим раствором; стерильные пробирки с физиологическим раствором; стерильные пипетки; листья комнатных растений; силос; сено; предметные стекла; набор красок по Граму; колбы для титрования; фарфоровые ступки и пестики; бюретки с раствором NaOH; фенолфталеин; универсальный индикатор.

Задания:

1. Определить численность эпифитной микрофлоры методом посева и методом отпечатка.
2. Изучить микрофлору силоса/сена методом микрокопирования.

3. Определить кислотность силюса.

1. Определение численности эпифитной микрофлоры вегетативных органов комнатных растений

Для агронома знакомство с эпифитной микрофлорой имеет не меньшее значение, чем изучение микрофлоры почвы, воды, воздуха и других местообитаний. Эпифитные микроорганизмы могут использоваться для биоиндикации состояния экосистем, так как их жизнь тесно связана с изменением факторов окружающей среды. Они оказывают существенное влияние на рост и развитие растений, качество семян и другой растениеводческой продукции, способны вступать в антагонистические отношения с фитопатогенными организмами, что в ряде случаев позволяет применять их для контроля численности вредных объектов. Изучение сукцессий эпифитов в условиях антропогенных стрессов расширяет и углубляет наши представления об экологических нишах видов и их параметрах, позволяет прогнозировать смену экологических ниш в сообществах, что важно при поиске путей управления популяциями микроорганизмов.

Среди эпифитов можно найти различные физиологические группы микроорганизмов. Например, в значительных количествах на поверхности листьев растений встречаются возбудители молочнокислого брожения (*Lactobacter plantarum*, *Streptococcus lactis* и др.), денитрифицирующие бактерии (род *Pseudomonas*), однако большинство эпифитов являются типичными аммонификаторами.

Качественный и количественный состав микрофлоры филлосферы растений, особенности микробно-растительных взаимодействий изучают с помощью соответствующих методов. Среди наиболее распространенных методов исследования микроорганизмов, населяющих надземную поверхность растений, отметим методы смыва и отпечатков (реплик).

Определение численности эпифитной микрофлоры методом смыва

1. Сделать навеску растительного материала 1 г.

2. Перенести навеску в колбу со стерильным физиологическим раствором.
3. Встряхивать колбу на качалке в течение 10 минут.
4. Из полученной взвеси сделать разведение в 10 000 раз по следующей схеме.

Последовательность разведения и посева (рис. 6):

- Колба – 1 г растения + 100 мл физ. раствора – разведение в 100 раз.
- Первая пробирка – 1,0 мл взвеси из колбы + 9,0 мл физ. раствора – разведение в 1000 раз.
- Вторая пробирка – 1 мл раствора из первой пробирки + 9,0 мл физ. раствора – разведение в 10 000 раз.
- Из второй пробирки по 1 мл помещается в стерильную пустую чашку Петри.

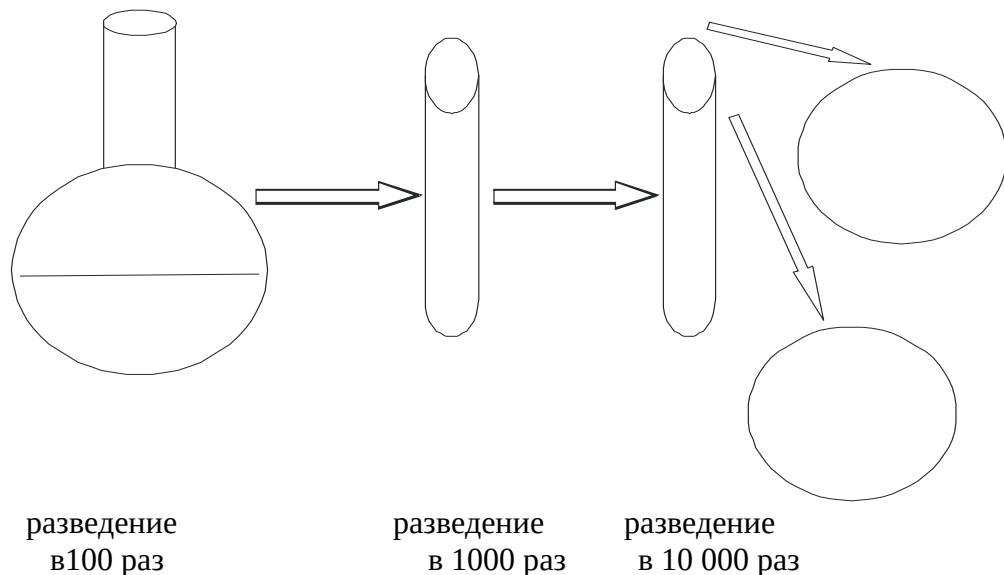


Рисунок 6 – Схема разведения

5. Чашку Петри заполнить расплавленной питательной средой и подписать.
6. Взять чашку Петри с посевами, сделанными на предыдущем занятии, перевернуть ее дном к себе и, не открывая крышки, подсчитать количество выросших колоний;
7. Если рост плотный, разделить донышко на несколько равных секторов восковым карандашом и подсчитать два противоположных сектора, найти среднюю величину и умножить ее на число секторов;

8. Результаты занести в таблицу 13, проанализировать и сформулировать вывод.

Таблица 13 – Результаты определения численности эпифитных микроорганизмов вегетативных органов различных комнатных растений

Вид растения	Количество колоний на чашке, кл.	Разведение	Количество микроорганизмов, тыс. кл./г
1.			
2.			
3.			

Вывод:

Определение численности эпифитной микрофлоры методом отпечатка

1. Залить расплавленной средой 2 стерильные чашки Петри;
2. Приготовленный лист комнатного растения взять стерильным пинцетом и положить его верхней стороной на поверхность застывшей питательной среды, аккуратно прижимая стерильным прессом в течение 1 минуты;
3. Лист убрать, чашку закрыть, подписать и поместить в термостат с температурой 24-26⁰С на выращивание. Инкубационный период 5 суток.
4. Повторить процедуру, сделав посев нижней стороны листа растения.
5. Взять чашку Петри с посевами, сделанными на предыдущем занятии, подсчитать выросшие колонии, не открывая крышки;
6. Сравнить численность эпифитной микрофлоры на верхней и нижней стороне листа.
7. Результаты занести в таблицу 14, проанализировать и сформулировать вывод.

Таблица 14 – Результаты определения численности эпифитных микроорганизмов вегетативных органов различных комнатных растений (метод отпечатка)

Вид растения	Количество колоний на чашке, кл.	
	верхняя сторона листа	нижняя сторона листа
1.		
2.		

Вывод:

8. Взять чашку Петри с посевом и с помощью микробиологической петли приготовить мазок.
9. Окрасить по Граму и рассмотреть под микроскопом.
10. Зарисовать и подписать названия характерных бактерий с указанием их систематического положения.

2. Микроскопическое изучение микрофлоры сена/силоса

1. Приготовить два препарата:
 - живую висячую каплю;
 - мазок, окрашенный по Граму;
2. Для приготовления мазка использовать небольшое количество сена (силоса) – взять пинцетом и растереть по поверхности предметного стекла;
3. Мазок зафиксировать в пламени спиртовки и окрасить по методу Грама;
4. Препараты рассмотреть под микроскопом, описать и зарисовать микроорганизмы, отметить их основные характеристики.

3. Определение кислотности силоса

1. Взять навеску силоса в 2,5 г и растереть в ступке.
2. Перенести в широкую пробирку или химический стакан, и добавить 50 мл дистиллированной воды.
3. Тщательно перемешать и настаивать 30 минут.
4. Из пробирки пипеткой взять 10 мл вытяжки, смешать с 10 мл дистиллированной воды и титровать 0,1Н раствором NaOH в присутствии фенолфталеина до слабо розовой окраски.
5. Общую кислотность выразить в % молочной кислоты, учитывая, что 1мл 0,1Н раствора NaOH соответствует 0,009 г молочной кислоты.

Пример расчета:

- на 10 мл вытяжки израсходовано 2мл NaOH,
- на 50 мл – $2\text{мл} \times 5 = 10 \text{ мл.}$
- 10 мл NaOH приходится на 2,5 г силоса,

а на 100 г - $10\text{мл} \times 40 = 400 \text{ мл.}$

% молочной кислоты: $400 \times 0,009 = 3,6 \text{ мл.}$

- pH силюса определяется из той же вытяжки с помощью индикатора.

6. Результаты занести в таблицу 15.

Таблица 15 – Основные качественные характеристики силюса

Показатели	Норма	Фактические данные
Цвет	оливково-зеленый	
Запах	приятный	
pH	4,2	
Общая кислотность	2,5	
Микрофлора	молочнокислые бактерии	
Наличие споровых бактерий и грибов	отсутствуют	

Вывод:

7. На основании проведенного исследования сделать заключение о качестве силюса и в случае несоответствия стандарту, указать предполагаемые ошибки в технологическом процессе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 16

Микробиологические препараты и их использование в сельском хозяйстве

Вопросы для обсуждения:

1. Какие микроорганизмы используются для промышленного изготовления препаратов различного назначения?
2. Каковы механизмы их действия?

Материалы и оборудование:

Образцы микробиологических препаратов

Задания:

1. Составить таблицу классификации микробиологических препаратов.
2. Обсудить решение ситуационных задач по применению бактериальных удобрений.

1. Классификация микробиологических препаратов

Микробиологические препараты регулируют нормальное функционирование почвенной и ризосферной микрофлоры, режим питания растений, защиту растений от болезней и вредителей.

Таблица 16 – Общая классификация промышленных микробиологических препаратов

Из живых культур	Из продуктов жизнедеятельности
1. Землеудобрительные	1. Антибиотики
2. Лечебные	2. Ферменты
3. Защитные	3. Витамины
4. Кормовые	4. Стимуляторы роста

Таблица 17 – Микробиологические препараты в сельском хозяйстве

Тип препаратов	Наименование	Организмы-продуценты	Применение
Землеудобрительные	Нитрагин		
	Фосфобактерин		
	АМБ		
	Агрофил		
Препараты для защиты растений	1. Энтобактерин		
	2. Дендробациллин		
	3. Вирин		
	4. Боверин		
Антибиотики	1. Пенициллин		
	2. Трихотецен		
	3. Гризин		
Стимуляторы Роста растений	1. Гиббереллин		
	2. Ауксины		
	3. Цитокинины		

2. Решение ситуационных задач по вопросам применения бактериальных удобрений

Решение ситуационных задач поможет студентам научиться правильно и эффективно применять бактериальные удобрения, рассчитывать необходимую дозу препарата/удобрения, определять сроки применения.

1. Решить задачи, приведенные в разделе «Практические задачи для самостоятельной работы студентов» (раздел 3. «Бактериальные удобрения»).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 17 (КОЛЛОКВИУМ)

Роль микроорганизмов в почвообразовательном процессе

Вопросы для подготовки:

1. Азотобактерин и фосфобактерин. Характеристика препаратов и условия применения.
2. Антибиотики. Их производство и применение.
3. Влияние обработки почвы на деятельность почвенным микроорганизмов.
4. Влияние органических удобрений на почвенное микронаселение.
Способы подготовки навоза.
5. Железобактерии и их роль в круговороте железа в природе.
6. Зависимость почвообразовательного процесса от природных факторов.
7. Как определить численность эпифитных микроорганизмов зерна или стебля растений?
8. Корневая и прикорневая микрофлора. Ее влияние на жизнь растений.
9. Круговорот серы и характеристика основных видов серобактерий.
10. Круговорот фосфора и роль микроорганизмов в этом процессе.
Фосфатрастворяющие микроорганизмы.
11. Микориза и ее значение.
12. Микробиологические препараты для борьбы с вредителями сельскохозяйственных растений.
13. Микробиологические процессы при сушке сена, силосовании и сенажировании корма.
14. Минеральный и биологический азот в земледелии.
15. Нитрагин (Ризоторфин). Характеристика, назначение и правила применения препарата.
16. Опишите методику определения численности и биомассы микроорганизмов в почве.
17. Понятие о биологической активности почвы. Гидрофактор.
18. Понятие о почве и почвенном плодородии.

- 19.Роль микроорганизмов в почвообразовательном процессе. Экологические группы почвенных микроорганизмов. Образование и разрушение гумуса в почве.
- 20.Роль микроорганизмов в процессе образования и разрушения гумуса.
- 21.Типы взаимоотношений микроорганизмов и растений.
- 22.Экологические группы почвенных микроорганизмов, микрофлора различных типов почв.
- 23.Эпифитная микрофлора. Ее роль при хранении и прорастании семян.

КРАТКИЙ СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Автотрофные организмы – организмы, способные создавать органическое вещество из углекислого газа, воды и минеральных солей благодаря фотосинтезу или хемосинтезу.

Автохтонные организмы - основная группа собственных почвенных микроорганизмов, способных минерализовать гумусные соединения.

Азотные удобрения – удобрения, минеральные или органические соединения, содержащие азот в различной форме.

Азотфиксация – процесс биологической фиксации атмосферного азота, осуществляемый свободноживущими, ассоциативными и клубеньковыми азотфиксирующими бактериями.

Актиномицеты - группа прокариотных организмов, имеющих мицеллярное строение, по внешним признакам сходное со строением грибов.

Аммонификация – микробиологический процесс окисления органических азотсодержащих соединений (белок, нуклеиновые кислоты, мочевина и т.д.) до аммиака.

Анаэробный организм - микроорганизмы, способные осуществлять дыхательные реакции без участия свободного кислорода воздуха.

Антибиотики – химические соединения, синтезируемые многими видами организмов, и способные подавлять жизнедеятельность патогенной микрофлоры.

Аэробный организм – организм, требующий для дыхания и нормального обмена веществ обязательного участия кислорода воздуха.

Бактериальные удобрения – препараты бактерий, которые вносят в почву для повышения ее плодородия.

Бактерии – простейшие одноклеточные организмы различной формы и размера.

Бактериальная хромосома – двусpirальная молекула ДНК, содержащая 80 – 90 % генетической информации данного вида бактерий и расположенная, как правило, в центральной части клетки.

Бактероиды – клетки клубеньковых бактерий на третьем этапе своего развития, располагающиеся внутри клубеньков, осуществляющие активную азотфиксацию и неспособные к делению.

Бактериофаги - специфическая группа вирусов, паразитирующих только на бактериальных клетках.

Биогенные элементы - основные химические элементы, на базе которых синтезируются все главные органические соединения живых организмов – С, Н, О, Н, Р.

Брожение – окислительно-восстановительный процесс, приводящий к образованию АТФ, при котором роль донора и акцептора атомов водорода играют органические соединения, образовавшиеся в ходе самого брожения.

Вакцина – живая или убитая культура микроорганизмов, лишенная болезнетворных свойств, но сохранившая способность стимулировать формирование иммунитета к данному заболеванию.

Вирулентность - мера или степень патогенности данного вида микроорганизмов. Для клубеньковых бактерий степень вирулентности характеризует способность бактериальных клеток проникать в корень, двигаться по его тканям и стимулировать образование клубеньков.

Вирусы – группа ультрамикроскопических облигатных внутриклеточных паразитов, не имеющие клеточного строения, способных размножаться только в клетках живых организмов.

Волютин – запасное питательное вещество, откладываемое в цитоплазме бактерий в виде небольших гранул. Состоит из полифосфатов и служит резервом фосфора для обмена веществ бактериальных клеток.

Галобактерии - группа бактерий, обитающих в средах с повышенным содержанием солей.

Ген – участок молекулы ДНК, отвечающий за синтез 1 полипептидной цепочки молекулы белка.

Генотип – полный набор генов, которым обладает клетка любого организма.

Гетеротрофные организмы – организмы, использующие для питания готовые органические соединения.

Гликоген – запасное питательное вещество углеводной природы (животный крахмал) способный синтезироваться в клетках грибов и некоторых других микроорганизмов.

Гликолиз – процесс расщепления сахара до ПВК (пировиноградная кислота).

Грибы – низшие эукариотные одноклеточные и многоклеточные организмы с мицеллярным строением. По типу питания - хемоорганотрофные организмы.

Гумус – органическое вещество почвы. Состоит в основном из гуминовых и фульвокислот, которые образуются в результате трансформации разных органических остатков под влиянием почвенных организмов.

Денитрификация – процесс восстановления нитратных соединений до аммиака или свободного азота. Осуществляется в воде, в почве, в клетках растений и микроорганизмов.

Дыхание - окислительно-восстановительный процесс, идущий с образованием АТФ, при котором роль донора атомов водорода играют органические и неорганические соединения, акцепторами атомов водорода всегда служат неорганические соединения.

Идентификация – процесс установления систематического положения изучаемого организма.

Иммобилизация – процесс перехода подвижных, растворимых форм химических элементов в связанное состояние, недоступное для потребления растений.

Инкубация – выращивание в искусственно созданных условиях в частности культивирование при определенной температуре.

Капсула – внешний защитный слой, окружающий клетку некоторых бактерий и состоящий преимущественно из полисахаридов

Клеточная стенка бактерий – наружная структура клетки, присущая большинству прокариотных организмов, построенная на муреине,

выполняющая защитную и каркасную функцию, обуславливающая голофитный тип питания клетки.

Клон – культура, полученная из соматических клеток исходного материала.

Клостридии – формы споровых бактерий, у которых диаметр эндоспоры больше диаметра самой клетки.

Клубеньки – внешние шарообразные или разветвленные выросты на корнях некоторых растений (главным образом у бобовых), образование которых связано с проникновением в корень и обитанием там симбиотических бактерий.

Клубеньковые бактерии – наиболее распространенная группа симбиотических бактерий, относящаяся преимущественно к роду *Rhizobium*.

Коли-титр – показатель санитарного состояния воды или других жидкостей, выражющийся в количестве мл жидкости, содержащих одну кишечную палочку. В норме составляет 333мл.

Конъюгация – процесс, при котором сблизившиеся родительские клетки соединяются при помощи конъюгационных мостиков, через которые происходит обмен генетическим материалом.

Ксенобиотики – чужеродные для организмов соединения, способные вызвать их гибель (промышленные загрязнители, пестициды, лекарственные средства, бытовая химия.)

Культивирование – выращивание микроорганизмов на питательных средах.

Леггемоглобин – комплексное органическое соединения по строению сходное с гемоглобином крови животных. Образуется в тканях клубеньков бобовых растений при заражении их клубеньковыми бактериями. Выполняет окислительные функции и усиливает активность симбиотической азотфиксации.

Лектины – белковые молекулы, синтезирующиеся в клетках корней бобовых растений и привлекающие клетки специфических видов клубеньковых бактерий к корневым волоскам.

Микориза – грибокорень, совокупность окончания корней высших растений и мицелия гриба, находящихся в симбиозе. Различают эктотрофную и эндотрофную микоризу.

Микробиология – наука о мельчайших, невидимых невооруженным глазом организмах, называемых микроорганизмами или микробами.

Микоплазмы – систематическая группа бактерий (отдел Tenericutes), характеризующихся мелкими размерами – 0,1 – 0,2 мкм и отсутствием клеточной стенки.

Минерализация – процесс трансформации органических соединений до минеральных соединений с помощью ферментов микроорганизмов.

Модификация – фенотипические различия между микроорганизмами, одинаковыми по генотипу.

Муреин – (пептидогликан) полимерное органическое соединение, состоящее из коротких полипептидов и остатков глюкозы. Специфическое вещество клеточных стенок бактерий.

Мутация – изменение генотипа под воздействием различных химических и физических факторов.

Нитрагин – удобительный препарат, действующим началом которого является живая культура клубеньковых бактерий. Применяется для обработки семян бобовых растений перед посевом для усиления симбиотической азотфиксации.

Нитрификация – процесс окисления аммиака в азотистую и азотную кислоту, осуществляемый нитрифициирующими бактериями.

Нуклеоид – структура клеток прокариот, представленная одной молекулой ДНК. Аналог ядра клеток эукариот.

Олиготрофы – микроорганизмы, обитающие в среде с низким содержанием питательных веществ (олиго – бедный).

Паразиты – организмы, живущие на поверхности или внутри другого организма и питающиеся за его счет.

Пастеризация – процесс тепловой обработки жидких сред и пищевых продуктов при температуре 60–90°, направленный на уничтожение большинства грамотрицательных микроорганизмов и сохранение качества продукта.

Пили – короткие выросты на оболочке бактериальных клеток.

Плазмиды – отдельные короткие молекулы ДНК, рассредоточенные по цитоплазме бактериальных клеток и несущие наследственную информацию, способствующую расширению адаптационных свойств микроорганизмов.

Посев – внесение клеток микроорганизма или какого-либо исследуемого материала (образца почвы, пробы воды) в стерильную питательную среду для получения чистой или накопительной культур.

Ризоплана – микрофлора, обитающая на поверхности корней высших растений.

Ризосфера – прикорневая зона, в которой сосредотачивается большое количество микроорганизмов что, связано с влиянием корневых выделений.

Сапрофиты – организмы, питающиеся за счет мертвого органического вещества.

Спора – покоящаяся клетка, окруженная плотной оболочкой и образовывающаяся внутри бактериальной клетки, устойчива к неблагоприятным факторам внешней среды.

Термофилы – микроорганизмы, обитающие в среде при повышенных температурах (оптимум + 45°С)

Трансдукция – процесс переноса генетического материала от одной бактериальной клетки к другой, посредством бактериофага.

Трансформация – процесс переноса генов, при котором часть ДНК клетки-донора может проникать в родственную бактериальную клетку-реципиент.

Фенотипическая изменчивость – возникает под действием изменяющихся условий существования. Генотип клетки остается без изменений.

Хемолитотрофные организмы - организмы, образовывающие органические вещества из неорганических, при этом для восстановления углекислоты используется химическая энергия, получаемая при окислении минеральных веществ.

Цианобактерии – группа прокариот, обладающая сине-зеленым пигментом, и осуществляющая смешанное питание – автотрофное за счет фотосинтеза и гетеротрофное за счет потребления готовых органических соединений.

Штамм – культура микроорганизмов одного и того же вида, выделенная из различных природных сред (почв, водоемов, организмов и т.д.) или из одной и той же среды, но в разное время.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАДАЧИ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ

Цель: решение предложенных задач или размышления над практическими ситуациями предполагает приобретение студентами навыков использования полученных микробиологических знаний в собственной жизни и сельскохозяйственных ситуациях.

Задачи сгруппированы по темам основных разделов дисциплины микробиология.

I. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ – МОРФОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.

Теоретические предпосылки к решению задач:

1. Основных представителей микромира можно объединить в три группы:
1) вирусы (доклеточные формы); 2) прокариоты (клеточные, но безъядерные формы; 3) микроскопические эукариоты (клеточные формы с обособленным ядром).
2. Вирусы состоят из одной молекулы ДНК или РНК и белковой оболочки. Не обладают функциями питания и дыхания. Они ведут только паразитический образ жизни, размножаются с высокой скоростью только внутри клетки хозяина, поэтому вызывают многочисленные болезни растений животных и человека. Бороться с ними трудно, т.к. по химическому составу они не отличаются от основного содержимого клетки хозяина.
3. Прокариоты – это клеточные организмы, обладающие полноценным обменом веществ. Они должны питаться, дышать и размножаться. Для питания необходимым условием является присутствие воды. Тип питания может быть автотрофным или гетеротрофным. Дыхание может быть или аэробным, или анаэробным. Образ жизни может быть, как паразитическим, так и сапрофитным (на мертвых органических остатках). При паразитировании внутрь клетки, как правило, не проникают, размножаются и распространяются по межклетникам.

4. Эукариотические микроорганизмы широко представлены среди грибов.

Они могут довольствоваться меньшим, чем прокариоты количеством влаги и обладают более мощным набором ферментов, благодаря чему могут интенсивно разлагать твердые органические вещества – клетчатку, лигнин, пектины. Питание в основном гетеротрофное. Дыхание может быть или аэробным, или анаэробным, но преимущественно аэробное. Образ жизни, так же, как и у эукариот может быть, как паразитическим, так и сапрофитным.

Варианты практических ситуаций

Приведенные в задачах варианты ответов не являются тестами для выбора правильного ответа. Это вопросы для ориентации и размышления, требующие микробиологических знаний. Все они могут быть базой для положительного или отрицательного ответа, требующего аргументации студента.

1.1. Основы вирусологии

1. Если началась эпидемия гриппа, какие мероприятия защиты Вам кажутся наиболее приемлемыми и почему:

- a. прием антибиотиков
- b. резкое снижение температуры
- c. полоскание горла
- d. изоляция больного
- e. использование защитной маски
- f. прием специализированных антивирусных препаратов
- g. другие известные вам методы

2. Если Вы обнаружили в посадках картофеля единичные растения с признаками вирусного заболевания, Ваши действия:

- a. не обращать внимание – ущерб не велик
- b. удалить больное растение и бросить рядом со здоровыми
- c. удалить и сжечь
- d. удалить и бросить в компостную кучу, засыпав землей.
- e. применить опрыскивание марганцево-кислым калием остальных растений

3. Если признаки вирусного поражения проявились на картофеле еще до первого окучивания практически по всему полю, Ваши действия:

- a. продолжать выращивание и проводить окучивание
- b. провести обработку ядохимикатами
- c. запахать и посеять вико-овсянную смесь
- d. другие ваши решения.

4. Если Вам известно, что Ваш знакомый инфицирован ВИЧ, Ваше поведение

- a. прервать всякие контакты
- b. не допускать половых контактов
- c. исключить совместное пользование маникюрными приборами
- d. не обращать внимания, продолжать общаться в прежнем режиме.

1.2. Основы бактериологии:

5. Если пищевые продукты хранятся не в холодильнике, то молоко и суп становятся кислыми, а на хлебе и овощах появляется плесень. Объясните:

- a. какая микрофлора развивается в том и другом случае и почему.
- b. какими веществами объясняется кислый вкус испорченных жидкостей.
- c. почему холодильник обеспечивает длительную сохранность продуктов.
- d. почему кислое молоко вызывает расстройство пищеварения, готовая простокваша даже полезна и лечебна.

6. В практике повседневной жизни мы постоянно кипятим воду для чая.

Объясните:

- a. какова главная цель этой операции
- b. чем опасна нагретая, но не доведенная до кипения вода
- c. какие микроорганизмы погибают при кипячении в первую очередь, какие могут сохраняться.
- d. почему свежая заварка чая прозрачная и обладает бактерицидными свойствами, а через 2-3 дня она будет мутной и непригодной к употреблению.

7. У человека заболело горло.

- a. какие микроорганизмы чаще всего вызывают эту неприятность.
- b. источники их попадания на верхние дыхательные пути.
- c. какие меры могут быть эффективны в начальной стадии заболевания.
- d. почему они не всегда достигают цели.

8. У человека разыгралась серьезная ангина.

- a. чем она отличается от обычного ОРЗ
- b. какие организмы в основном ее вызывают, чем они характеризуются

- c. какие осложнения возможны при ангине и почему
- d. основные методы лечения.

9. В посадках огурцов на листьях часто появляются угловатые коричневые пятна. Это бактериоз. Вызывается неспоровой, грамотрицательной бактерией из рода *Pseudomonas*. Какие действия вам следует предпринять и почему?

- a. не обращать внимания
- b. обработать раствором марганцево-кислого калия .
- c. удалить больные листья.
- d. обработать раствором фунгицидов
- e. другие ваши предложения

10. В процессе приготовления квашеной капусты нарезанную капусту трамбуют, плотно прижимают крышкой и кладут на нее груз

- a. зачем это делается
- b. что получается, если пренебречь этим правилом
- c. в первые дни квашения на поверхности образуется много пены, ее происхождение
- d. почему капуста иногда получается мягкой?
- e. какие секреты приготовления квашеной капусты известны вам лично.

11. Если заложить на хранение зерно с повышенной влажностью, оно начинает согреваться (температура поднимается до 30°), а потом гореть (50-60°)

- a. откуда возникает это тепло
- b. чем оно опасно для качества зерна
- c. какие действия надо предпринять
- d. какой контроль надо осуществлять, чтобы не допустить подобных явлений

12. При хранении сена в стогах можно столкнуться с такими нежелательными явлениями как плесневение сена, его почернение, и даже естественное возгорание. Объясните:

- a. какие микроорганизмы могут быть причиной этих явлений
- b. какие технологические операции были нарушены при заготовке
- c. какими действиями можно спасти продукцию, если вовремя обнаружить отклонение от нормы

d. почему не портится сено, закатанное в полиэтиленовые рулоны.

13. В пищевой промышленности широко применяются специальные производственные штаммы микроорганизмов с повышенной активностью нужных ферментов. Какими приемами их можно получить.

- a. отбором из диких популяций
- b. методом мутационных изменений
- c. методами генетической трансформации
- d. методом генетической трансдукции

14. В медицине для защиты от инфекционных заболеваний широко применяются всевозможные вакцины. Что это такое и как их получают

- a. Это ослабленные, но живые патогенные микроорганизмы.
- b. Это убитые микроорганизмы
- c. Это вещества клеток или вирусных частиц синтезированные искусственно
- d. Используются ли для получения вакцин теплокровные животные.
- e. Другие способы, о которых Вы знаете.

II. РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В КРУГОВОРОТЕ ВЕЩЕСТВ В ПРИРОДЕ

Жизнь на планете Земля возможна только благодаря постоянно совершающемуся круговороту основных химических элементов, которые переходят из минеральной формы в органические соединения благодаря жизнедеятельности высших и низших растений, а из органической формы переходят опять в минеральную благодаря жизнедеятельности разнообразных микроорганизмов. Разнообразие микроорганизмов обусловлено имеющимися в их клетках генами и образующимися на базе этих генов ферментами. В зависимости от ферментного набора одни микроорганизмы приурочены к одному типу круговорота, а другие к другому. Поэтому различают микрофлору круговорота углерода, микрофлору круговорота азота, микрофлору круговорота зольных элементов и.т.д. (Деление достаточно условное, т.к. в природе все взаимосвязано).

2.1. Круговорот углерода в природе

В разделе «Роль микроорганизмов в круговороте углерода» рассматриваются микробиологические процессы таких соединений как простые

сахара, крахмал, пектиновые вещества, целлюлоза, лигнин. Каждую группу указанных соединений преобразуют определенные виды микроорганизмов, которые используют эти вещества в качестве источников питания и дыхания. Преобразованные соединения частично идут на нужды клетки микроорганизма, а частично выделяются в окружающую среду как продукты обмена. При аэробном дыхании конечными продуктами являются углекислый газ и вода. При анаэробных процессах – это органические соединения различной степени сложности. Они часто оказываются полезными для человека и используются в его жизнедеятельности.

15. Как в природе, так и в жизни человека широко распространенным процессом является спиртовое брожение. И в хлебопечении, и в спиртовом производстве используется один вид дрожжей – *Saccharomyces cerevisiae*, а эффект получается разный. Чем это можно объяснить.
16. Если долго передерживать тесто, поставленное на пироги, или блины, появляется сильный запах спирта. Чем это можно объяснить? Почему этого не было в начале процесса.
17. В ходе приготовления вина вместо нормального продукта можно получить уксус. От чего это зависит? Как не допустить такого результата.
18. Перед первой мировой войной немецкие спиртовые заводы были быстро и без особых затрат переориентированы на производство глицерина, необходимого для приготовления взрывчатых веществ. Почему это возможно? Что было изменено в технологии этих предприятий?
19. Что происходит с молоком в процессе его естественного перехода в простоквашу. Чем объясняется ее благотворное влияние на организм человека?
20. В нашей торговле широко распространены кисломолочные продукты с приставкой «Био». Чем они отличаются от обычных? В чем заключается их полезность? Что Вы знаете об их изготовлении?

21. Если что-то общее между приготовлением простокваш и приготовлением силосных кормов? Какими приемами человек регулирует эти процессы?
22. Когда закладывается силосная траншея, растительная масса в ней тщательно утрамбовывается. Если вы, как агроном, не проследили за этой процедурой, к каким последствиям это может привести?
23. На сельскохозяйственных полях и на садовых участках в почву ежегодно запахиваются и закапываются растительные остатки. Какие вещества в них содержатся? Что с ними происходит? Что лучше - закопать или сжечь эти остатки?
24. Садовые почвы часто мульчируют опилками или стружкой древесных пород. Какие микроорганизмы их разлагают? Каковы плюсы и минусы этого мероприятия?

2.2. Круговорот азота в природе

Циклическое движение азота по биосфере осуществляется по четырем ступеням: переход свободного, инертного азота (N_2) в связанную форму - NH_2 и затем в состав органических соединений (**азотфиксация**); расщепление азотсодержащих органических соединений (в первую очередь белков) до минеральных форм азота – NH_3 (**минерализация**); окисление аммиачного азота (NH_3) до окисленных соединений - NO_2 и NO_3 (**нитрификация**); восстановление азотных окислов до свободного азота (**денитрификация**)

В природных экосистемах все процессы осуществляются микроорганизмами и поддерживаются в равновесном состоянии. В сельскохозяйственном производстве интенсивность того или иного процесса может сильно изменяться в результате обработки почвы, использования минеральных и органических удобрений, применения ядохимикатов. Специалисту – аграрнику надлежит уметь прогнозировать результаты агрономических воздействий на почву во избежание крупных нарушений природных закономерностей, что может привести к потерям сельскохозяйственной продукции или значительному снижению ее качества.

25. Интенсивность процесса минерализации органических удобрений и польза от использования сильно зависит от соотношения в них между количеством углерода и количеством азота (С:N) Объясните как сложится баланс азота в почве и как это отразится на жизни растений, если

- a. соотношение С:N в компосте составляет 100:1
- b. соотношение С:N в компосте составляет 20:1
- c. соотношение С:N в компосте составляет 10:1
- d. соотношение С:N в компосте составляет 50:1

26. Оставшуюся после уборки зерновых культур солому можно использовать по-разному – собрать и использовать на корм животным, сжечь (при этом зола попадает в почву), запахать (при этом в почву попадает органическая масса с соотношение С:N-100:1). Попытайтесь проанализировать плюсы и минусы каждого из этих мероприятий.

27.Процесс нитрификации в сельскохозяйственных почвах может иметь как положительное, так и отрицательное значение. Это зависит от особенностей почвы и от действий агронома. Как будет осуществляться нитрификация и какова ее агрономическая значимость в следующих ситуациях:

- a. почвы кислые (рН- 4,5), бедны гумусом (1,5%), тяжелого механического состава.
- b. почвы легкие, черноземные (содержание гумуса 4.5%), нейтральные, интенсивно удобряются органическими удобрениями, минеральные удобрения вносятся в аммиачной форме.
- c. почвы дерново-подзолистые, слабокислые, обеспеченность гумусом средняя (2,4%), органических удобрений получают недостаточно, а минеральные азотные удобрения вносятся в основном нитратной форме.

Проанализируйте каждую ситуацию с точки зрения возможных мероприятий, направленных на улучшение ситуации.

28.Для всех сельскохозяйственных полей очень важным и полезным является процесс биологической азотфиксации. Биологический азот поступает в почву в результате жизнедеятельности свободноживущих, ассоциативных и симбиотических микроорганизмов. Оцените возможный приход биологического азота в следующих ситуациях:

- a. поле засеяно зерновыми культурами. Агрохимический состав почвы удовлетворительный по всем показателям (рН- 5.8, гумус 2%, сод Р -200мг/кг, К - 150 мг/кг) Год засушливый.
- b. такое же поле, но по условиям увлажнения ситуация хорошая.
- c. поле засеяно клевером. Эксплуатируется второй год. Будет ли обогащение почвы азотом? Какие типы азотфикссирующих микроорганизмов здесь будут активны?
- d. в поле высеяна горохо-овсяная смесь на зеленый корм. Масса скошена в июле. Как сложится ситуация с поступлением биологического азота в этих условиях
- e. на Вашем садовом участке возделываются несколько овощных культур – капуста, картофель, морковь, бобы. Под какими культурами приход биологического азота будет наибольшим. Какие внешние условия влияют на данный процесс.

III. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ УДОБРЕНИЯ

На основании знаний о влиянии микроорганизмов на жизнедеятельность растений, в частности на их минеральное питание в настоящее время микробиологическая промышленность выпускает многочисленные препараты, которые используются в качестве бактериальных удобрений. Для правильного и эффективного применения их необходимо умение установить необходимую дозу препарата с учетом его микробиологического титра и знать условия их эффективного использования.

29. В Вашем распоряжении имеется бактериальное удобрение «Ниртагин», объясните:

- a. какие микроорганизмы составляют его основу
- b. для каких культур его можно использовать
- c. какая дополнительная информация вам потребуется для принятия решения
- d. как установить и проверить рекомендуемую дозу.

30. Вам необходимо заказать и приобрести бактериальное удобрение для обработки семян клевера лугового для посева 50 гектар этой культуры.

- a. какое удобрение надо искать
- b. какую информацию следует уточнить
- c. сколько препарата потребуется для этой цели
- d. когда и как провести обработку?

31. Вам предложили приобрести ценное бактериальное удобрение «Азотобактерин» с активностью (бактериальным титром) 10 млрд. кл. на 1 г препарата.

- a. под какие культуры целесообразно его использовать
- b. какое действие оно будет оказывать на растения
- c. сколько препарата потребуется для применения на 1га площади
- d. какие условия могут повлиять на эффективность применения этого бактериального удобрения.

32. Вы собираетесь использовать бактериальное удобрение «Фосфоробактерин». Что Вы знаете об этом препарате?

- a. для какой цели его используют.
- b. какие микроорганизмы составляют его действующее начало
- c. какое действие оно будет оказывать на растения.
- d. в каких условиях применение его будет результативным.
- e. почему агрономы часто предпочитают внести минеральное удобрение вместо бактериальных

33. В настоящее время микробиологическая промышленность выпускает бактериальное удобрение «Азоспируллин»

- a. какие микроорганизмы составляют его основу.
- b. каким химическим элементом оно будет обеспечивать растения
- c. под какие культуры его целесообразно использовать
- d. есть ли строгая специфичность этого препарата и с/х растений
- e. в каких условиях – полевых или тепличных он будет более эффективен и почему.

IV. РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПОЧВООБРАЗОВАТЕЛЬНОМ ПРОЦЕССЕ

Закономерности почвообразовательного процесса и, следовательно, свойства почв каждой климатической зоны определяются следующими факторами: материнская горная порода, климат, рельеф, тип растительности и микробиологическая активность. Главным фактором плодородия почвы служит содержание в них специфического почвенного органического вещества – гумуса. Накопление его происходит очень медленно – 1 см плодородного слоя образуется в среднем за 100 лет. При этом часть гумуса постоянно

минерализуется микроорганизмами. При сельскохозяйственном использовании запасы гумуса могут изменяться очень быстро, особенно в случае его потери. Для того чтобы потерять не наблюдалось, следует заботиться о том, чтобы разрушение гумуса не было больше его созидания.

В естественных экосистемах баланс накопления и минерализации гумуса определяется в основном соотношением количества осадков и приходом тепла в данной климатической зоне. Это соотношение очень хорошо объясняется с помощью показателя гидрофактор и описывается уравнением Р. Волобуева

$$Hf = 43,2 \times \log (P-T)$$

34. Как сложится баланс гумуса в почвах, если они располагаются в климатической зоне с гидрофактором, равным 110.
- какая это климатическая зона. Какими условиями она характеризуется?
 - каковы общие запасы гумуса в почвах этой зоны
35. Что Вы можете сказать о закономерностях почвообразовательного процесса в зоне, показатель гидрофактора в которой в среднем составляет 120 ед. Какой фактор – тепло или влага в данном случае является лимитирующим в процессе накопления гумуса
36. Что Вы можете сказать о состоянии и плодородии почв, если при определении численности микроорганизмов их общее количество достигает 15–20 млрд. кл./г почвы. Сделайте предположительное описание обеспеченности этих почв гумусом, влагой, кислородом. Каков уровень рН.
37. О каких почвенных условиях свидетельствует показатель численности микроорганизмов, выросших на среде МПА, в 2-3 млн. кл./г. Объясните, какая микрофлора растет на МПА. Какую функцию она выполняет в почве
38. Дайте сравнительное описание почвенных условий для двух участков, в одном из которых численность азотбактера составляла 900 тыс. кл./г почвы, а на другом всего лишь 50 тыс./г. Проанализируйте все факторы, которые могут оказать влияние на жизнедеятельность микроорганизма.

Объясните, какое положительное влияние данная микрофлора может оказывать на жизнь растений, произрастающих на данной почве.

39. Опишите агрономические мероприятия, которые будут приводить к повышению численности полезной почвенной микрофлоры и какие могут привести к отрицательному влиянию на биоту. Чем это может быть опасно для сельского хозяйства и природы в целом.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

Основная литература

1. Емцев, В.Т. Микробиология /В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. — М.: Дрофа, 2006. — 445 с.
2. Емцев В.Т., Шильникова В.К. Микробиология /В.Т. Емцев, В.К. Шильникова. — М.: Агропромиздат, 1990. — 356 с.
3. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии /Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. — М.: Колос, 2004. — 256 с.
4. Шильникова, В.К. Микробиология /В.К. Шильникова, А.А. Ванькова, Г.В. Годова. — М.: Дрофа, 2006. — 268 с.

Дополнительная литература

1. Бабьева, И.П. Биология почв /И.П. Бабьева, Г.М. Зенова. — М.: Изд-во МГУ, 1989.- 350 с.
2. Виноградский, С.Н. Почвенная микробиология. — М.: Наука 1952. – 787с
3. Градова, Н.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии. — М.: Изд. МГУ, 2001. — 131 с.
4. Гусев, М.В. Микробиология / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. — М.: Изд-во МГУ, 2009. - 448 с.
5. Нетрусов, А.И. Микробиология / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. — М.: Изд. центр «Академия», 2006. — 352 с.
6. Нетрусов А. И. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для вузов. М. : Академия, 2005. 608 с. 37
7. Общая биология: энциклопедия современного естествознания. — М.: Мир, 2000. — Т. 2. — 650 с.
8. Стейниер, Р. Мир микробов. Т. 1, 3 / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрем. — М.: Мир, 1979. — 318 с.
9. Сэги, И. Методы почвенной микробиологии. — М.: Изд-во Колос, 1983. — 295 с.
- 10.Шлегель, Г. Общая микробиология. — М.: Мир, 2003. — Т. 1, 2. — 600 с.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Таблица для определения основных родов и видов микроорганизмов воды и воздуха

1. Клетки круглые (кокки).....	2
— Клетки палочковидные.....	7
— Клетки нитевидные, в виде тонких гиф.....	12
2. Клетки размером в 0,8 – 1 мкм; грамположительные, в мазке расположены мозаично, часто треугольными группами.....	3
— Клетки расположены в мазке иначе; грамположительные или грамотрицательные.....	4
3. Колонии мелкие или средних размеров, белые, выпуклые, гладкие.....	<i>Staphylococcus albus</i>
— мелкие, желтые, гладкие.....	<i>Staphylococcus aureus</i>
4. Кокки крупные, размеры от 1,2 до 5мкм, грамположительные и грамотрицательные, расположены одиночно, по два, или в пакетах.....	5
— Кокки мелкие (0,2 – 0,3 мкм) расположены одиночно, по два, или в цепочках.....	6
5. Кокки расположены по 4 или 8 клеток в пакетах, размеры клеток 1,2 – 1,4 мкм, колонии круглые 0,3 – 0,5см, желтые или розовые, матовые с ровным краем.....	<i>Sarcina flava</i>
— Кокки расположены по два, клетки крупные 2,5 – 4 мкм имеют капсулу; образуют цисты, грамотрицательные; молодые клетки палочковидные, слабо подвижные. Колонии крупные 6-8 мм в диаметре, серые, выпуклые, край ровный, поверхность гладкая.....	<i>p.Azotobacter</i>
— Клетки очень крупные 5 – 6 мкм в поперечнике, овальные или шаровидные, часто раздутые, могут образовывать длинные цепочки, цист не образуют. По Граму могут окрашиваться и отрицательно, и положительно.....	<i>p.Azomonas</i>

- Клетки округлые или овальные. 3–5 мкм в диаметре, почкующиеся, всегда грамположительные. Колонии 4–5 мм в диаметре, розовые с гладкой матовой поверхностью (дрожжи).....p. **Rhodotorula**
- 6.— Кокки мелкие одиночные, грамположительные. Колонии белые, плоские, поверхность гладкая, край ровный.....p. **Micrococcus**
- Кокки мелкие, грамположительные, расположены в цепочках; Колонии очень мелкие 1-2 мм в диаметре, белые, выпуклые, край ровный.....p. **Streptococcus**
7. Клетки палочковидные, грамотрицательные, спор не образуют.....8
- Клетки палочковидные грамположительные, образуют эндоспоры.....9
8. Палочки мелкие, неподвижные. Колонии 7-10мм в диаметре, светло-серые, плоские, гладкие с ровным четким краем.....p. **Bacterium**
- Палочки мелкие (2–3 мкм), подвижные. Колонии очень тонкие, бесцветные, часто расползающиеся или роящиеся.....p. **Pseudomonas**
- Палочки средней величины (в мазке 3-4 мкм), неподвижные с заостренным концом. Колонии ярко-желтые, плоские, гладкие 5-6 мм в диаметре.....p. **Ervinia**
- Палочки мелкие или средней величины (2-3 мкм), перитрихально подвижные. Колонии 3-4 мм в диаметре, грязно-белые, плоские, гладкие с влажной блестящей поверхностью и ровным краемp. **Escherichia** (кишечная палочка)
- Палочки очень мелкие (0,8 – 1,0 мкм), интенсивно подвижные. Колонии бесцветные, или беловатые, слизистые, блестящие иногда с коричневатой пигментацией агара (уксусно-кислые бактерии).....p. **Acetobacter**
9. Палочки споровые грамположительные. Спора не увеличивает диаметр клетки.....10
- Палочки споровые грамположительные. Спора сильно растягивает диаметр клетки, делая ее веретеновидной или похожей на барабанную полочку.....11

10. Палочки крупные (10-12 мкм в длину), толстые с гранулированной цитоплазмой. Колонии крупные (8-10 мм), светло-серые, слизистые, «жирные».....***Bacillus megaterium***

—Палочки слабоподвижные, длинные - 8-10 мкм в длину, но тонкие. Споры мелкие. Колонии серые шероховатые.....***Bacillus subtilis***

—Палочки крупные в длинных цепочках, неподвижные, колонии серые сильно ветвящиеся – «кудрявые».....***Bacillus micoides***

—Палочки средних размеров, короткие, толстые. Спора расположена центрально. Колонии складчатые.....***Bacillus mesentericus***

11. Палочки неподвижные, с заостренными концами. Спора расположена в центре клетки. Диаметр клетки расширен, форма ее становится веретеновидной. Колонии тонкие придонные.....***Clostridium pasteurianum***

—Палочки с прямыми концами. Споры расположены терминально. Клетки напоминают барабанную палочку.....***Clostridium pectinovorum***

—Палочки с прямыми концами, короткие. Спора расположена терминально. Палочка похожа на столовую ложку***Clostridium felsineum***

12. Гифы тонкие переплетающиеся, грамположительные. Колонии сухие белые или с пигментом, края четкие, погружены в агар, в центре колонии обычно образуется воздушный мицелий.....***p. Actinomyces***

—Гифы распадаются на достаточно крупные фрагменты в виде палочек различной длины или кокков. Окраска по Граму положительная. Колонии без воздушного мицелия, гладкие, или шероховатые, складчатые, чаще без пигментации, плотные. При пересеве материал берется трудно***p. Micromonospora***

Приложение 2

Список основных изучаемых видов микроорганизмов

Название семейства	Краткая характеристика микроорганизмов, принадлежащих к данному семейству.	Представители	Среда обитания
1	2	3	4
Pseudomonadaceae	Неспоровые бактерии - прямые или слегка изогнутые палочки с полярно расположенными жгутиками, строгие аэробы, хемоорганотрофы. Ряд видов возбудители болезней растений и человека.	Pseudomonas	Широко распространены в природе (в почвах, в воде рек, на растениях и животных, в сточных водах и воздухе).
Azotobacteriaceae	Крупные клетки, от палочки до овальной формы, подвижные с перитрихальным жгутикованием, не образующие спор, хемоорганотрофы. Способны фиксировать атмосферный азот.	Azotobacter chroococcum, Azotobacter beijerinckii,	Широко распространены в почвах, водоемах, на поверхности листьев и корней растений.
Nitrobacteriaceae	Микроорганизмы, с палочковидными, эллипсоидальными, сферическими и спиральными клетками, не образующие спор, подвижные или не подвижные, облигатные хемолитоавтотрофы и аэробы.	Nitrosomonas, Nitrosospira, Nitrosococcus, Nitrosolobus, Nitrobacter, Nitrospira, Nitrococcus,	Широко распространены в почвах, водоемах. Участвуют в процессах окисления аммиака до нитритных форм азота.
Beggiatoaceae	Микроорганизмы, в виде бесцветных длинных неразветвленных нитей (трихомы) различной толщины, состоящие из цепочек клеток. Грамотрицательные, миксотрофы или хемоорганогетеротрофы, аэробы или миксоаэрофилы. Участвуют в окислении сульфидных форм серы до сульфатов.	Beggiatoa	Обитают в стоячих водах с высоким содержанием сероводорода.
Rhizobiaceae	Бактерии палочковидной, кокковидной или нитевидной формы, неподвижные, не образующие спор, грамотрицательные. Большинство представителей - симбионты на бобовых растений	Rhizobium trifoli Rhizobium lupini Rhizobium leguminosarum	Клубеньковые бактерии, обитают внутри клубеньков на корнях бобовых и некоторых других растений

Продолжение приложения 2

1	2	3	4
Chromatiaceae	Пурпурные серные бактерии, фотолитотрофы, строгие анаэробы.	Chromatium, Thiospirillum	Участвуют в окислении соединений серы до окислов и свободной серы.
Chlorobiaceae	Зеленые серные бактерии, фотолитотрофы, строгие анаэробы.	Chlorobium	
Micrococcaceae	Сферические клетки, способные делиться в одной или нескольких плоскостях (монококки, диплококки, стафилококки, тетракокки, сарцины), подвижные и неподвижные, спор не образуют, хемоорганотрофы, аэробы или факультативные анаэробы.	Micrococcus, Staphylococcus	Широко распространены в почвах и пресных водах. Встречаются болезнетворные виды, развивающиеся на коже и слизистых оболочках теплокровных организмов.
Streptococcaceae	Клетки сферической или овальной формы, соединяются в пары, цепочки разной длины или тетрады. Неподвижны, спор не образуют, хемоорганотрофы, факультативные анаэробы. Играют важную роль в получении кисломолочных продуктов, силоса и т.д.	Streptococcus lactis, Streptococcus cremoris, Streptococcus thermophilus	Широко распространены в почве, на поверхности растений, в молоке и молочных продуктах, пищеварительном тракте животных и человека.
Bacillaceae	Клетки палочковидные, подвижные, с перитрихально расположенными жгутиками; имеются и неподвижные формы, образующие споры. Грамположительные, аэробы и анаэробы	Bacillus cereus, Bacillus megaterium, Bacillus mesentericus, Bacillus mycoides, Bacillus subtilis, Clostridium pasterianum, Clostridium botulinum, Desulfotomaculum	Широко распространены в почве и воде, а также пищеварительном тракте животных и человека. Некоторые представители могут вызывать заболевания. Восстанавливают сульфаты в сульфиды.
Lactobacillaceae	Прямые и изогнутые палочки, одиночные или в цепочках, спор не образуют, неподвижные, аэробы или факультативные анаэробы. Сбраживают углеводы с образованием молочной кислоты.	Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus lactis	Широко распространены в почве и воде, а также пищеварительном тракте животных и человека. Используются в пищевой промышленности для получения кисломолочных продуктов: сыра и т.д.

Учебно-методическое издание

Микробиология : методические указания / сост. Ю.В. Смирнова. — Караваево : Костромская ГСХА, 2025. — 84 с. ; 20 см. — 50 экз. — Текст непосредственный.

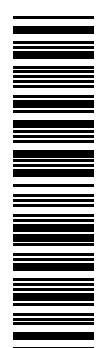
Методические указания издаются в авторской редакции

© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования "Костромская государственная сельскохозяйственная академия"
156530, Костромская обл., Костромской район, пос. Караваево, уч. городок, д. 34

Компьютерный набор. Подписано в печать _____. Заказ № 1190.
Формат 60x84/16. Тираж 50 экз. Усл. печ. л. 4,88. Бумага офсетная.
Отпечатано _____.

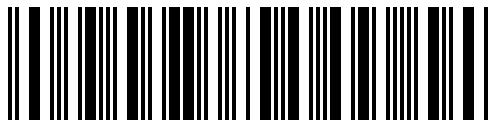
вид издания: первичное (электронная версия)
(редакция от 6.02.2025 № 1190)

Отпечатано с готовых оригинал-макетов в академической типографии
на цифровом дубликаторе. Качество соответствует предоставленным
оригиналам.
(Электронная версия издания - I:\подразделения\рио\издания 2025\1190.pdf)



2025*1190

ФГБОУ ВО КОСТРОМСКАЯ ГСХА



2025*1190

(Электронная версия издания - I:\подразделения\рио\издания 2025\1190.pdf)