

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И КАДРОВ

**Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»**

Кафедра ботаники и физиологии растений

О. А. Цыркунова, А. А. Горновский, О. А. Порхунцова

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Часть 2

*Методические указания по изучению дисциплины
для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по
специальностям 1-74 02 01 – «Агрономия», 1-74 02 02 – «Селекция и
семеноводство», 1-74 02 05 – «Агрохимия и почвоведение»,
1-33 01 06 – «Экология сельского хозяйства», 1-74 02 03 – «Защита
растений и карантин», 1-74 02 04 – «Плодоовощеводство»*

**Горки
БГСХА
2020**

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И КАДРОВ

Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

Кафедра ботаники и физиологии растений

О. А. Цыркунова, А. А. Горновский, О. А. Порхунцова

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Часть 2

*Методические указания по изучению дисциплины
для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по
специальностям 1-74 02 01 – «Агрономия», 1-74 02 02 – «Селекция и
семеноводство», 1-74 02 05 – «Агрохимия и почвоведение»,
1-74 02 03 – «Защита растений и карантин»,
1-74 02 04 – «Плодоовощеводство»*

Горки
БГСХА
2020

УДК 576.8 (077)

Авторы:

старший преподаватель *О. А. Цыркунова*;
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *А. А. Горновский*;
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *О. А. Порхунцова*

Рецензент:

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *Ю. Л. Тибец*

Сельскохозяйственная микробиология. Часть 2: методические указания по изучению дисциплины / О. А. Цыркунова, А. А. Горновский, О. А. Порхунцова. – Горки : БГСХА, 2020. – 60 с.

Для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальностям 1-74 02 01 – «Агрономия», 1-74 02 02 – «Селекция и семеноводство», 1-74 02 05 – «Агрохимия и почвоведение», 1-74 02 03 – «Защита растений и карантин», 1-74 02 04 – «Плодовоеводство».

© УО «Белорусская государственная
сельскохозяйственная академия», 2020

ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1. В помещении микробиологической лаборатории должны строго соблюдаться порядок и чистота.

2. Находиться в лаборатории необходимо без верхней одежды и в белых халатах.

3. Нельзя в лаборатории принимать пищу, пить, употреблять жевательные резинки.

4. Приступая к лабораторным занятиям, студенты занимают постоянные места за учебными столами.

5. Рабочее место должно быть оборудовано всем необходимым для выполнения работы.

6. Студенты пользуются закрепленными за ними микроскопами на протяжении всего курса и несут за них ответственность.

7. На рабочем столе не должно быть никаких лишних предметов.

8. Не следует создавать сквозняки и вызывать интенсивное движение воздуха (бег, быстрая ходьба и др.).

9. Перед началом работы студенты заранее знакомятся с заданием.

10. Записи наблюдений, зарисовки в рабочих тетрадях обязательны.

11. Во время работы следует избегать прикосновений руками к лицу, волосам, одежде, личным предметам.

12. После окончания работы препараты оставляют в эксикаторе, металлические предметы (петли, иглы, пинцеты) после употребления стерилизуют в пламени огня, пипетки помещают в стакан с дезинфицирующей жидкостью.

13. В лаборатории должны быть полотенце и мыло, чтобы после выполнения работ студенты мыли руки.

14. После окончания занятий рабочее место должно быть приведено в порядок.

При работе в газифицированных лабораториях студенты должны быть ознакомлены с правилами работы с газом и заполнить контрольный лист по технике безопасности.

Оборудование рабочего места: коробочка с предметными стеклами, корковые пробки, бактериологические петли, газовые горелки или спиртовки, спички, штатив с красками и иммерсионным маслом, емкость с водой и приспособлением для ее слива, книжка из фильтровальной бумаги, эксикатор, микроскопы с хлопчато-бумажными тряпочками для протирания объективов.

УСТРОЙСТВО СВЕТОВОГО МИКРОСКОПА «МИКРОМЕД - 1»

Бинокулярный микроскоп имеет тубус с двумя окулярами. При наблюдении объекта обоими глазами одновременно достигается большая резкость глубины, меньше утомляется зрение.

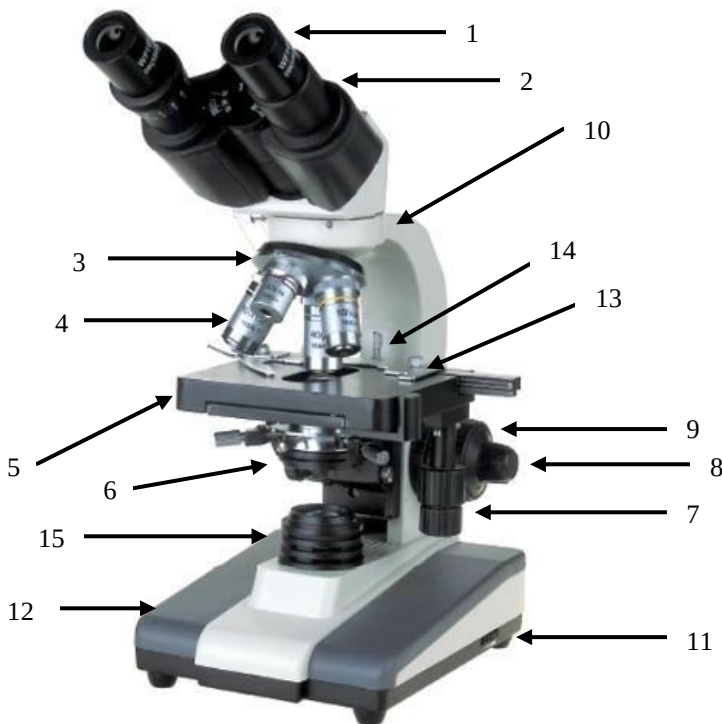


Рисунок 1 – Микроскоп с бинокулярной насадкой и встроенным в основание осветителем с галогенной лампой и блоком питания.

1 – окуляры; 2 – бинокулярная насадка; 3 – револьверное устройство; 4 – объективы; 5 – предметный столик; 6 – конденсор; 7 – рукоятка перемещения предметного столика в двух взаимно-перпендикулярных направлениях; 8 – рукоятка тонкой фокусировки; 9 – рукоятка грубой фокусировки; 10 – тубус; 11 – рукоятка регулировки яркости горения лампы; 12 – основание микроскопа; 13 – препаратодержатель; 14 – винтовой упор (ограничитель перемещения предметного столика при фокусировке); 15 – источник света.

В тубус микроскопа сверху вставлен окуляр, в нижней части он снабжен вращающимся по кругу револьвером, в отверстия которого ввинчиваются объективы. Вращая револьвер, можно подвести любой объектив, который после легкого щелчка, закрепится на месте.

Окуляры имеют две линзы (верхнюю и нижнюю). Расстояние между линзами равно полусумме их фокусных расстояний. С уменьшением фокусного расстояния повышается увеличение окуляра. Короткие окуляры будут более сильными, а более слабыми – длинные. Окуляры обозначают по тому увеличению, которые они дают ($\times 10$, $\times 16$, $\times 20$).

Объективы подразделяются на *сухие* и *иммерсионные*. Сухим называют такой объектив, между линзой которого и рассматриваемым препаратом находится воздух, в котором, как в среде менее плотной, чем стекло, часть лучей преломляется и рассеивается, не дойдя до объектива.

В микробиологии используется иммерсионный объектив (погруженный в масло). Между линзой и рассматриваемым препаратом находится масло (однородная среда). Получается система: стекло препарата – иммерсионное масло – стекло объектива (с одинаковым показателем преломления). Благодаря маслу все лучи, не преломляясь и не изменяя направления, попадают в объектив, чем улучшают изображение микробов, делают его более четким (рис. 2). На оправе объектива обозначается даваемое им увеличение ($\times 4$, $\times 10$, $\times 40$, $\times 60$, $\times 100$).

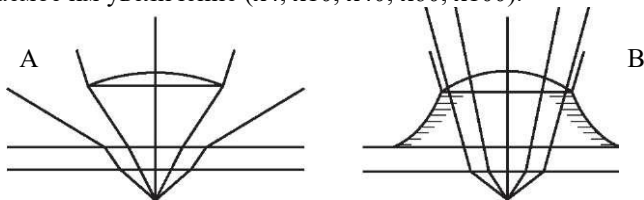


Рисунок 2 – Схема хода лучей при сухой (А) и иммерсионной (В) системах

Общее увеличение микроскопа равняется произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Например, иммерсионный объектив с увеличением $\times 100$ и окуляром $\times 10$ дает увеличение объекта в 1000 раз.

Конденсор состоит из системы линз, предназначенных для собирания лучей, идущих от источника света, в одной точке – фокусе, который должен находиться в плоскости рассматриваемого препарата. При микроскопировании окрашенных объектов конденсор должен быть поднят до уровня предметного столика. При изучении неокрашенных объектов следует опускать конденсор.

ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ФИКСИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ И МИКРОСКОПИРОВАНИЯ

Препарат-мазок. Для исследования микроорганизмов обычно используют фиксированные и окрашенные препараты, которые готовят следующим образом:

1. Обезжиривают предметное стекло. Для этого на него наносят каплю воды и растирают ее корковой пробкой. Можно использовать для этой цели реактивы (спирт, эфир и т.д.).

2. Обеззараживают бактериологическую петлю – прокаливают ее в пламени и дают остыть.

3. Берут подготовленной петлей микробный материал (из жидкой культуры или из колонии микробов на поверхности твердой питательной среды) и делают мазок – размазывают тонким слоем по стеклу, после чего петлю сразу прокаливают.

4. Высушивают мазок на воздухе или держат стекло высоко над пламенем, но не допуская закипания материала.

5. Фиксируют высушенный мазок, проводя стекло тыльной стороной 3–4 раза в пламени. Можно использовать фиксатор. Микроорганизмы при этом погибают и закрепляются на стекле.

6. Окрашивают препарат, нанося на него несколько капель красителя. Например, окраска кристаллвиолетом производится в течение 30–60 с. При простом способе окраски используют один краситель, и весь материал получают одноцветным. При сложных способах окраски применяют несколько красок и реактивов. Это позволяет выявить строение клеток бактерий, так как различия в химическом составе частей клетки обеспечивают неодинаковые отношения к разным красителям и позволяют получить разноцветную картинку. К сложным способам окраски относятся окраска по Граму, капсул, спор, волютин.

7. Окрашенный препарат тщательно промывают водой.

8. Просушивают препарат, промакивая его между листами фильтровальной бумаги.

Микроскопирование. Перед началом работы проверьте исправность микроскопа и чистоту оптики.

В лабораторной практике обычно используют масляную иммерсию. На оправе иммерсионного объектива имеется черная круговая нарезка, обозначение oil – масляная иммерсия и цифра 100 – увеличение 100^x.

1. На приготовленный и окрашенный препарат-мазок наносят небольшую каплю иммерсионного масла.

2. Поднимаем до упора конденсор, опускаем предметный столик с помощью макровинта.

3. Помещаем препарат на предметный столик микроскопа между держателем и прижимом препаратоводителя.

4. Окрашенные препараты рассматривают **только с иммерсионным объективом** (100/1,25 oil).

5. Осторожно погружаем объектив в масло с помощью макровинта до стекла.

6. Наблюдая в окуляр, проводим грубую фокусировку **вращая макровинт от себя.**

7. Окончательную фокусировку производим с помощью микровинта (вращение микровинта допускается **в пределах одного оборота**).

8. Во время микроскопирования правой рукой производим вращение микровинта, левой – передвижение препарата.

Препарат необходимо просмотреть в разных полях зрения для полноты изучения материала (рис. 3), что достигается вращением двух винтов столика микроскопа, приводящих его вместе с препаратом в движение в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Прежде чем дать отрицательный ответ, необходимо просмотреть не менее 100 полей зрения.

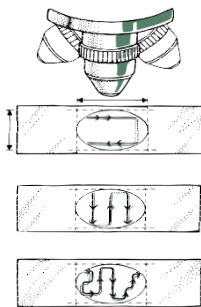


Рисунок 3 – Схемы изучения препарата в разных полях зрения

Окончание микроскопирования.

1. После окончания просмотра препарата опускаем предметный столик, крутя макровинт от себя, снимаем препарат.

2. При использовании иммерсионной системы необходимо вытереть масло с объектива мягкой чистой тряпочкой или марлей.

3. Поднимаем предметный столик до упора и укрываем микроскоп защитным чехлом.

4. Ставим микроскоп в шкаф.

Раздел 5. ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ СОЕДИНЕНИЙ УГЛЕРОДА

Углерод является одним из важнейших элементов, он входит в состав органических веществ. В природе происходит круговорот углерода. Растения строят органическое вещество из углекислого газа атмосферы, превращая лучистую энергию солнца в скрытую энергию химических связей (осуществляют фотосинтез). Только небольшая часть бактерий может использовать солнечную энергию (фотолитоавтотрофы) или энергию окисления неорганических веществ (хемолитоавтотрофы) для самостоятельного синтеза органических веществ из углекислоты.

В воздухе содержится 0,03 % CO₂. Атмосфера пополняется углекислым газом при вулканических извержениях, сжигании топлива, в результате дыхания людей, животных, растений и микроорганизмов. Почвенная микрофлора разлагает органические вещества, осуществляя минерализацию растительных и животных остатков до углекислого газа. Микробы получают энергию в основном при освобождении ее из безазотистых органических веществ. Различают две формы катаболизма (энергетического обмена): брожение – без доступа свободного кислорода и дыхание, или окисление – с кислородом. При дыхании энергия освобождается полностью и конечными продуктами являются CO₂ и H₂O.

Брожение – это разложение органических безазотистых веществ без доступа кислорода с выделением энергии и образованием продуктов, которые дальше в среде без кислорода не разлагаются. Название брожения дается по конечным продуктам (спиртовое, маслянокислое, молочнокислое и др.).

Работа 17. Спиртовое брожение

Спиртовым брожением называется процесс разложения сахара под действием микроорганизмов на этиловый спирт и углекислый газ. Суммарное уравнение спиртового брожения:



Спиртовое брожение лежит в основе виноделия, пивоварения, хлебопечения.

Постановка опыта. Для изучения спиртового брожения пользуются синтетической средой следующего состава, г: сахараза (или глюкоза) – 15,0; дрожжи – 0,5; пептон – 0,5, KH_2PO_4 – 0,3; MgSO_4 – 0,1; вода дистиллированная – 100 мл.

В колбу вносят дрожжи, добавляют часть отмеренной цилиндром воды и тщательно взбалтывают для лучшего растворения, а затем прибавляют все по рецепту. Колбу закрывают пробкой, в которую вставлена изогнутая трубочка. В открытый конец трубки капают серную кислоту, а затем закрывают его фольгой. В результате этого из колбы будет легко выходить выделяющийся при брожении углекислый газ, но задерживаться пары воды.

Колбу взвешивают на технических весах с точностью до 0,01 г, прикрепляют этикетку, на которой указывают массу колбы, номер группы, факультет и фамилию исполнителя, и помещают в термостат при температуре 25 °С.

Элективные условия для прохождения спиртового брожения:

- 1) Высокая концентрация сахара;
- 2) присутствие в опыте дрожжей – возбудителей спиртового брожения;
- 3) анаэробные условия;
- 4) кислая среда за счет KH_2PO_4 ;
- 5) накопление в процессе опыта значительного количества спирта.

Результаты опыта. Брожение обычно продолжается 2–3 дня. Конец брожения устанавливается по прекращению газообразования.

Определение интенсивности брожения. Под интенсивностью брожения понимают количество сброженного сахара в процентах от исходного за определенный промежуток времени. Чтобы определить интенсивность спиртового брожения, необходимо выполнить ряд операций.

1. Определяют массу выделенного углекислого газа. Это можно сделать, подсчитав разность массы бродильной колбы при постановке опыта и после его окончания:

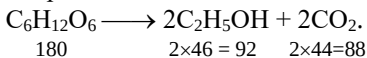
$$a = m_1 - m_2,$$

где a – масса выделенной углекислоты;

m_1 – масса колбы при постановке опыта;

m_2 – масса колбы после окончания брожения.

По массе выделившегося CO_2 можно определить количество образовавшегося в опыте спирта и сброженного сахара, пользуясь суммарным уравнением спиртового брожения:



Например, $a = 7$ г – выделилось 7 г CO_2 .

2. Рассчитывают массу образовавшегося спирта (x_1):

$$\begin{array}{l} 88 \text{ г } \text{CO}_2 - 92 \text{ г } \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} \\ 7 \text{ г } \text{CO}_2 - x_1 \text{ г } \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} \end{array}$$
$$x_1 = \frac{7 \times 92}{88} = 7,3 \text{ г спирта.}$$

3. Вычисляют массу сброженного сахара (x_2):

$$\begin{array}{l} 88 \text{ г } \text{CO}_2 - 180 \text{ г } \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \\ 7 \text{ г } \text{CO}_2 - x_2 \text{ г } \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \end{array}$$
$$x_2 = \frac{7 \times 180}{88} = 14,3 \text{ г сахара.}$$

4. Определяют интенсивность брожения (x_3):

Если в 100 мл среды по рецепту 15 г сахара (100 %), то 14,3 г сброженного сахара составляет x_3 %

$$\begin{array}{l} 15 \text{ г } \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - 100 \% \\ 14,3 \text{ г } \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - x_3 \% \end{array}$$
$$x_3 = \frac{14,3 \times 100}{15} = 95 \%,$$

т. е. интенсивность брожения в примере составляет 95 %.

Взвешивают колбы и рассчитывают интенсивность брожения в собственных бродильных колбах.

Микроскопирование дрожжей производят методом «раздавленной капли». Для этого со дна сброженной жидкости берут петлей немного осадка и наносят на предметное стекло, добавляют каплю раствора метиленового синего, накрывают покровным стеклом, сверху капают иммерсионное масло и рассматривают с помощью иммерсионного объектива. При просмотре обращают внимание на дрожжевые клетки, находящиеся в стадии почкования. Определяют процентное содержание живых и мертвых дрожжевых клеток. Мертвые клетки окрашиваются метиленовым синим, живые не окрашиваются. Делают подсчеты живых и мертвых клеток в 10 полях зрения, выводят средние значения этих показателей в одном поле зрения и рассчитывают соотношение живых и мертвых дрожжевых клеток в процентах. Результаты записывают в табл. 2.

Таблица 2 – Результаты исследования дрожжей

Номер поля зрения	Число клеток	
	Живых (неокрашенных)	Мертвых (окрашенных)
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
Сумма		
Среднее		
Процент		

Можно приготовить препарат-мазок из колбы, фиксировать в пламени, красить метиленовым синим 2–3 мин и рассматривать с иммерсией.

Возбудителями спиртового брожения являются главным образом дрожжи, реже некоторые плесневые грибы и бактерии. Однако практическое значение имеют только дрожжи. Они встречаются на поверхности растений, плодов, ягод, зерна, в воздухе и почве.

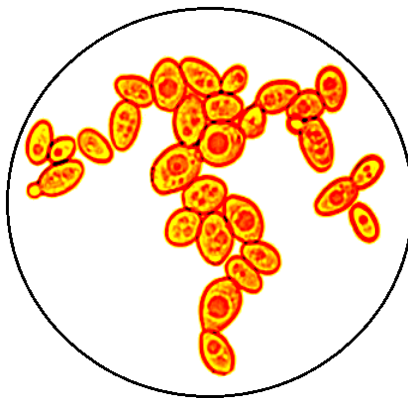


Рисунок 22 – Хлебные дрожжи

Saccharomyces cerevisiae

Характеристика дрожжей. Относятся к микроскопическим грибам и являются эукариотами. Принадлежат главным образом к роду *Saccharomyces*. Хлебные (пекарские) дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* одноклеточные, немиецеллярные. Клетки их округлой, овальной или слегка удлинённой формы, диаметр – 8–10 мкм, имеют хорошо заметное под микроскопом ядро. Дрожжи содержат много запасных веществ – волютин, гликоген, капли жира, зерна белковых веществ. Размножаются обычно почкованием, но могут размножаться спорами. При половом размножении споры образуются после слияния содержимого двух клеток и их деления в сумке, или аске. Неподвижные. Факультативные анаэробы. Хорошо сбраживают моносахариды и дисахариды. Аминогетеротрофы. Ауксоавтотрофы. Мезофилы.

Зарисовывают дрожжи в тетради и записывают их характеристики.

Материалы и оборудование: колбы на 100 мл и каучуковые пробки с изогнутыми (s-образными) трубками, сахароза или глюкоза, пептон, KH_2PO_4 , MgSO_4 , дрожжи, колбы с дистиллированной водой, мерные цилиндры на 100 мл, крепкая серная кислота (H_2SO_4), кусочки фольги, этикетки, покровные стекла, метиленовый синий.

Контрольные вопросы

1. Что такое спиртовое брожение и каково его значение?
2. Назовите элективные условия спиртового брожения.
3. Дайте характеристику дрожжам.
4. Как готовится препарат «раздавленная капля»?

Работа 18. Молочнокислое брожение

Молочнокислым брожением называется процесс анаэробного разложения углеводов молочнокислыми бактериями с образованием молочной кислоты:



Молочнокислое брожение лежит в основе переработки молока в молочнокислые продукты, а также силосования и квашения овощей.

Для изучения молочнокислого брожения лучше всего в качестве питательной среды пользоваться молоком. В нем имеются все питательные вещества для развития молочнокислых бактерий (лактоза, казеин, кальций, фосфор, витамины).

Приготовление молочнокислых продуктов

Свежее молоко разливают в три стакана и закрывают их бумажными крышками. В этих стаканах будут готовиться следующие молочнокислые продукты: простокваша, кефир, ацидофилин или йогурт.

В первом стакане – *простокваша* – продукт только молочнокислого брожения в результате естественного скисания молока под действием находящихся в нем молочнокислых бактерий. Крышку стаканчика с молоком подписывают и оставляют при температуре 25–30 °С на 18–24 ч для скисания.

Во втором стакане – *кефир* – продукт смешанных брожений (молочнокислого и спиртового). Для его получения стакан с молоком пастеризуют в водяной бане при температуре 60 °С в течение 30 мин для уничтожения собственных молочнокислых бактерий, затем охлаждают до 25–30 °С и заквашивают кефирными зернами, представляющими собой симбиоз молочнокислых бактерий и кефирных дрожжей (1–2 чайные ложки кефирной закваски на 100 мл молока (молоко можно не пастеризовать)). Подписывают и оставляют при температуре 25–30 °С на 12–24 ч для скисания.

В третьем стакане – *ацидофилин* – продукт только молочнокислого брожения. Для его приготовления стакан с молоком пастеризуют в водяной бане при температуре 60 °С в течение 30 мин, затем охлаждают до 35–40 °С и заквашивают ацидофильной закваской (1 чайная ложка на 100 мл молока). Подписывают и помещают в термостат при температуре 37–39 °С на 8–12 ч.

В третьем стакане вместо ацидофилина можно приготовить *йогурт* – продукт только молочнокислого брожения. Для его приготовления стакан с молоком пастеризуют в водяной бане при температуре 60 °С в течение 30 мин, затем охлаждают примерно до 40 °С и заквашивают йогуртной закваской (1 чайная ложка на 100 мл молока). Подписывают и помещают в термостат при температуре 40–45 °С на 8–12 ч.

Все полученные после скисания молочнокислые продукты хранят в холодильнике.

Исследование молочнокислых продуктов

Определение кислотности. Кислотность молока и молочных продуктов выражается в процентах накопившейся молочной кислоты или в градусах Тернера. Градус Тернера (°Т) – это величина, которая показывает объем децинормальной (0,1 н.) щелочи (мл), пошедшей на нейтрализацию кислотности 100 мл молочного продукта.

Отмеряют 10 мл молочного продукта цилиндром и переносят в колбу для титрования, добавляют 20 мл дистиллированной воды (предварительно ополоснув цилиндр, которым отмеряли молочный продукт), приливают 1–2 капли фенолфталеина и титруют 0,1 н. раствором NaOH при постоянном взбалтывании до появления устойчивой слабо-розовой окраски. Объем щелочи, пошедшей на титрование, умножают на 10.

Определяют кислотность во всех трех стаканах с готовыми молочнокислыми продуктами (простокваша, кефир, ацидофилин или йогурт). Контролем служит свежее молоко. Если на поверхности продуктов образовалась пленка, то прежде, чем взять сгусток для титрования, ее снимают, затем разбивают сгусток и перемешивают содержимое.

Микроскопирование. Молоко – среда, богатая белком и жиром. При высоких температурах происходит денатурация белков, поэтому препараты из молочнокислых продуктов не фиксируют в пламени.

1. Мазок делают очень тонким слоем на сухом обезжиренном стекле.

2. Высушивают мазок только на воздухе (нельзя держать над пламенем).

3. Фиксируют в фиксаторе, состоящем из равных объемов (1:1) спирта и эфира, погружая препарат в стакан с фиксатором 3–4 раза. Спирт убивает и закрепляет микробный материал на стекле, а эфир обезжиривает препараты.

4. После фиксации ожидают полного испарения со стекла спирта и эфира.

5. Окрашивают препарат метиленовым синим 2–3 мин.

6. Промывают препарат водой.

7. Просушивают фильтровальной бумагой. Просматривают препараты, пользуясь иммерсионной системой.

В образовании молочнокислых продуктов участвуют гомоферментативные молочнокислые бактерии.

Простокваша содержит почти чистую культуру молочного лактококка *Streptococcus lactis*. Клетки молочного стрептококка мелкие (диаметром до 1 мкм), имеют овальную форму, у молодых культур в виде коротких цепочек, а у старых – соединены попарно. Кислотность простокваши 90–120 °Т.

Кефир – молочнокислый продукт одновременно молочнокислого и спиртового брожений. Содержит возбудителей молочнокислого брожения – молочный лактококк *Streptococcus lactis* (в кефире образует довольно длинные цепочки) и казеиновую палочку *Lactobacillus casei*, а

также возбудителей спиртового брожения – кефирные дрожжи *Saccharomyces kefire*. Кислотность кефира составляет 80–110 °Т.

Ацидофилин (ацидофильная простокваша) содержит только молочнокислую бактерию – ацидофильную палочку *Lactobacillus acidophilus* (длиной 4–5 мкм). Кислотность ацидофилина может достигать 250–300 °Т.

Йогурт содержит только молочнокислые бактерии – термофильный стрептококк *Lactococcus thermophilus* и болгарскую палочку *Lactobacillus bulgaricus*. Кислотность йогурта составляет 100-120 °Т.

Характеристика молочнокислых бактерий. Грамположительные. Могут быть кокками и палочками. Содержат запасные вещества волютин и гликоген (поэтому хорошо красятся метиленовой синью). Неподвижные, неспоровые, факультативные анаэробы (аэротолеранты). Среди них есть мезофилы и термофилы. Источник углерода моно- и дисахариды (глюкоза, фруктоза, лактоза). Источник азота – белки (казеин молока) – аминокетеротрофы. Требовательны к фосфору, кальцию, витаминам – аукогетеротрофы. Ацидофилы.

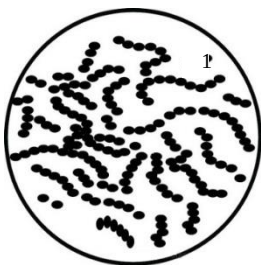


Рисунок 23 – Микрофлора простокваши

1 – молочный стрептококк (*Streptococcus lactis*)

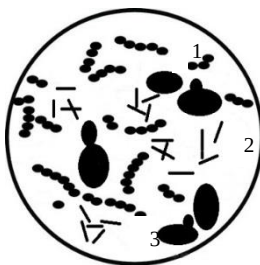


Рисунок 24 – Микрофлора кефира

1 – молочный стрептококк *Streptococcus lactis*;
2 – казеиновая палочка (*Lactobacillus casei*);
3 – кефирные дрожжи (*Saccharomyces kefire*).

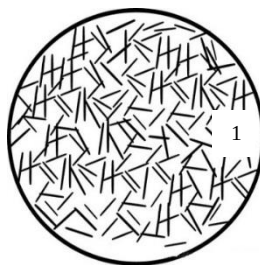


Рисунок 25 – Микрофлора ацидофилина

1 – ацидофильная палочка (*Lactobacillus acidophilus*)

Результаты исследований заносят в табл. 3.

Таблица 3 – Характеристика молочнокислых продуктов

Молочный продукт	Кислотность, °Т	Микрофлора
Молоко		
Простокваша		

Кефир Ацидофилин		
---------------------	--	--

Делают рисунки микрофлоры молочных продуктов – простокваши, кефира и ацидофилина (или йогурта) и записывают характеристику молочнокислых бактерий.

Материалы и оборудование: свежее молоко, стаканы емкостью 100 мл, закрытые бумажными крышками с резинками, водяная баня, стаканы с закваской кефирных зерен и ацидофильной (йогуртной) закваской, чайные ложки, бюретки для титрования, 0,1 н. раствор NaOH, колбы для титрования, фенолфталеин, фиксатор (смесь спирта и эфира 1:1), метиленовый синий.

Контрольные вопросы

1. Что такое молочнокислое брожение и каково значение данного процесса?
2. Назовите возбудителей молочнокислого брожения и дайте им характеристику.
3. Как готовится препарат-мазок для изучения молочнокислых бактерий?
4. В каких единицах измерения выражается кислотность молочных продуктов?

Работа 14. Маслянокислое брожение

Маслянокислое брожение – это процесс анаэробного разложения углеводов маслянокислыми бактериями с образованием масляной кислоты и других продуктов по уравнению:



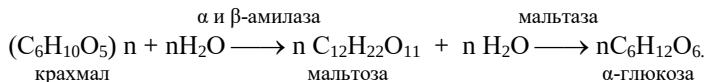
В природе маслянокислое брожение имеет большое значение как звено в цепи превращений соединений углерода. В то же время в народном хозяйстве маслянокислые бактерии приносят значительный ущерб, вызывая вспучивание сыров, прогоркание молока, порчу консервов, силоса, овощей, картофеля и других продуктов. Вместе с тем масляная кислота требуется для некоторых промышленных целей.

Маслянокислое брожение лежит в основе брожения (анаэробного разложения) полисахаридов – крахмала, клетчатки, пектиновых веществ.

Брожение крахмала. Крахмал – это полисахарид, запасное вещество растительных клеток. Особенно много крахмала в семенах злаков, клубнях картофеля.

Химизм анаэробного разложения, или брожения крахмала, состоит из двух фаз.

Первая фаза – это гидролиз крахмала под действием выделяемых микробами экзоферментов до α -глюкозы:



Вторая фаза – это маслянокислое брожение поглощенной микробами α -глюкозы:



Постановка опыта. Для изучения маслянокислого брожения крахмала опыт ставят на среде с картофелем. Сырой неочищенный картофель нарезают мелкими кубиками, заполняют ими высокую пробирку на 1/3, добавляют немного мела для нейтрализации масляной кислоты, заливают водой до 2/3 объема пробирки, закрывают ватной пробкой, оборачивают пробку бумагой, подписывают и пастеризуют пробирку в водяной бане при температуре 80 °С 10 мин, а затем помещают в термостат при 30–35 °С.

Элективные условия, необходимые для прохождения в опыте маслянокислого брожения:

- 1) Наличие крахмала как специфического источника углерода, который используется только микроорганизмами, содержащими фермент амилазу, вызывающую гидролиз крахмала до глюкозы;
- 2) присутствие маслянокислых бацилл на коже картофеля;
- 3) анаэробные условия под высоким столбиком жидкости;
- 4) нейтральная среда за счет внесения мела;
- 5) пастеризация, позволяющая отделить маслянокислые бациллы от неспорных форм.

Результаты опыта. Через 5–6 дней брожения отмечают, что часть картофеля под действием CO_2 и H_2 всплывает на поверхность среды. Хорошо различим неприятный запах масляной кислоты.

Микроскопирование. Исследование маслянокислых бацилл проводят в «раздавленной капле». Для этого петлей делают мазок по стенке в

нижней части пробирки со средой и переносят каплю жидкости на предметное стекло. Добавляют к ней каплю крепкого раствора Люголя (КJ + J), накрывают покровным стеклом, сверху на него наносят каплю иммерсионного масла и исследуют препарат. При просмотре обращают внимание на крупные, подвижные палочки, которые под действием йода постепенно замедляют движение и останавливаются. Йод проникает внутрь клеток и окрашивает гранулезу в сине-фиолетовый цвет (характерная качественная реакция йода на растительный крахмал). На фоне окрашенной части клеток отчетливо выделяется неокрашенная или слегка желтоватая спора.

Можно приготовить также препарат-мазок, фиксированный в пламени и окрашенный кристаллвиолетом.

Возбудителями маслянокислого брожения являются маслянокислые бациллы. Они были открыты Л. Пастером в 1861 году. Широко распространены в почве, навозе, воде, на разлагающихся органических остатках. Все они относятся к роду *Clostridium*.

Характеристика маслянокислых бацилл. Грамположительные. Представляют собой палочки, подвижные (перитрихи – двигаются кувыркаясь), содержат гранулезу, споровые – у типичных спора расположена кластридиально, у нетипичных – плектридиально. Облигатные анаэробы. Аминоавтотрофы. Ауксоавтотрофы. Среди них есть мезофилы и термофилы.

Брожение крахмала вызывают типичные маслянокислые бациллы *Clostridium butyricum*. Это крупные палочки (1×8 мкм). Подвижные. В клетках накапливается много запасного крахмалоподобного вещества –

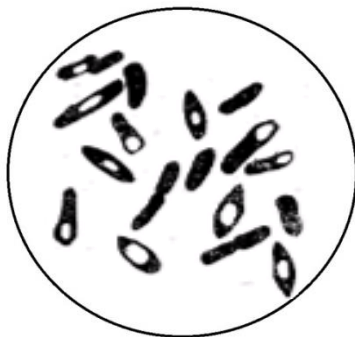


Рисунок 26 – Маслянокислые бациллы (*Clostridium butyricum*)

гранулезы. При спорообразовании клетки приобретают веретеновидную форму – спора расположена терминально или субтерминально, спорообразование кластридальное. В качестве источника углерода могут использовать моно-, ди- и полисахариды (декстрины, крахмал). Мезофилы. Облигатные анаэробы.

Зарисовывают маслянокислые бациллы в тетради, подписывают и приводят их характеристику.

Материалы и оборудование: высокие пробирки с ватными пробками, картофель, подставки для резки, скальпели, чашечки с мелом и ложечки, колбы с дистиллированной водой, полоски бумаги для обертывания пробок, водяная баня, покровные стекла, крепкий раствор Люголя для окраски гранулезы или кристаллвиолет.

Контрольные вопросы

1. Что такое маслянокислое брожение, и каково значение данного процесса?
2. Назовите возбудителей маслянокислого брожения и дайте им характеристику.
3. Какие элективные условия маслянокислого брожения?
4. Откуда берутся ферменты, участвующие в гидролизе крахмала?

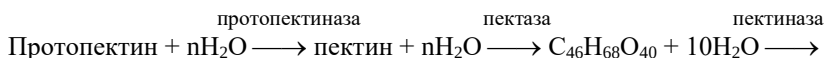
Работа 20. Брожение пектиновых веществ

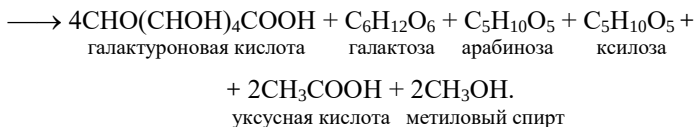
Пектиновые вещества – это межклеточные вещества растительных тканей, склеивающие волокна. У технических культур (лен, конопля, кенаф, джут, канатник и др.) лубяные волокна соединены с кострой и паренхимой при помощи пектиновых веществ.

Пектиновые вещества являются сложными полисахаридами. Имеются три типа пектиновых веществ: 1) протопектин – водо-нерастворимая часть клеточной стенки; 2) пектин – водорастворимый полимер галактурановой кислоты, содержащий метилэфирные связи; 3) пектиновая кислота – водорастворимый полимер галактурановой кислоты, свободный от метилэфирных связей.

Пектиновые вещества разлагаются микроорганизмами. Брожение пектиновых веществ происходит в две фазы.

Первая фаза – гидролиз пектиновых веществ до моносахаров под действием экзоферментов, выделяемых микроорганизмами:





Вторая фаза – это маслянокислое брожение образовавшихся моносахаров (галактозы, арабинозы, ксилозы):



Брожение пектиновых веществ происходит при водяной мочке льна.

Постановка опыта. Для изучения брожения пектиновых веществ в лабораторных условиях воспроизводят процесс водяной мочки льняных стеблей. Для этого готовят снопики из сухой льняной соломки (высотой – 6–8 см и толщиной, соразмерной с диаметром пробирки), перевязывают их в двух местах нитками и кипятят 3–5 мин для удаления экстрактивных (легко сбраживающихся) веществ. Вода при этом становится желто-зеленого цвета. Помещают снопики в высокие пробирки, заливают на 2/3 их объема водой, закрывают ватными пробками и прогревают в кипящей водяной бане до появления в жидкости пузырьков. Затем пробирки охлаждают под краном и в снопик вводят свежий длинный стебель льняной соломки для заражения. Пробирки вновь закрывают ватными пробками, оборачивают их бумагой, подписывают и помещают в термостат при температуре 28–30 °С.

Элективные условия, необходимые для брожения пектиновых веществ:

- 1) Питательная среда – льняные волокна, освобожденные кипячением от экстрактивных веществ;
- 2) присутствие бацилл мочки льна на стеблях и особенно на соломке, используемой для заражения;
- 3) анаэробные условия, которые достигаются благодаря высокому столбику жидкости в пробирке;
- 4) устранение после кипячения и пастеризации неспорных форм.

Результаты опыта. Брожение пектиновых веществ заканчивается в пробирках через 7–8 дней. Снопики всплывают, вытесняемые образовавшимися при брожении газами. Так как брожение пектиновых веществ сводится к маслянокислому брожению, неприятный запах масляной кислоты легко улавливается.

Микроскопирование возбудителей брожения пектиновых веществ. Готовят препарат-мазок. Для этого извлекают снопик из пробирки, достают из него соломинку и теребят. Затем растрепанным участком делают мазок по предварительно обезжиренному предметному стеклу. Мазок высушивают, фиксируют в пламени и окрашивают кристаллвиолетом 30–60 с. Рассматривают с помощью иммерсионной системы микроскопа.

Брожение пектиновых веществ осуществляют бациллы мочки льна. Они были открыты С.Н. Виноградским в 1895 г.

К бациллам мочки льна относятся *Clostridium pectinovorum* и *Clostridium felsineum*.

Характеристика бацилл мочки льна. Являются нетипичными маслянокислыми бактериями. Углерод используют только в виде пектиновых веществ. Грамположительные. Подвижные палочки размером – 10–15 мкм. Спорообразование плектридиальное – спора находится на конце клетки, и они имеют вид ракетки или барабанной палочки. Содержат гранулезу. *Clostridium pectinovorum* представляют собой крупные палочки с длинной вегетативной частью. *Clostridium felsineum* – палочки меньшего размера с более короткой вегетативной частью, эти бактерии более кислотоустойчивые. В процессе водяной мочки льна они сменяют предыдущие бактерии, поэтому встречаются чаще в перекисших пробирках. Бациллы мочки льна – облигатные анаэробы. По отношению к источнику азота малотребовательны, способны усваивать любые его формы.

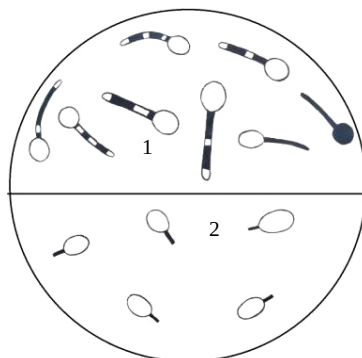


Рисунок 27 – **Бациллы мочки льна**
1 – *Clostridium pectinovorum*; 2 – *Clostridium felsineum*.

Зарисовывают бациллы мочки льна в тетради, подписывают и дают им характеристику.

Материалы и оборудование: льняная соломка, высокие пробирки с ватными пробками, ножницы, нитки, пинцеты, водяная баня, кристалл-виолет.

Контрольные вопросы

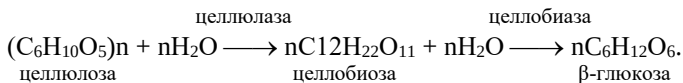
1. Назовите типы пектиновых веществ.
2. Кто является возбудителем брожения пектиновых веществ.
3. Из скольких фаз состоит брожение пектиновых веществ и как они называются?
4. Дайте характеристику бациллам мочки льна.

Работа 21. Брожение целлюлозы

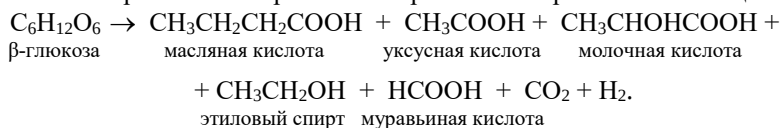
Целлюлоза, или клетчатка представляет собой сложный поли-сахарид $(C_6H_{10}O_5)_n$, входящий в состав оболочек растительных клеток. Растения на 40–70 % состоят из клетчатки. На долю этого вещества приходится более 50 % всего органического вещества биосферы. Огромное количество целлюлозы в виде растительных остатков и отходов попадает в почву и водоемы, где разлагается микроорганизмами – бактериями, актиномицетами, микроскопическими грибами.

В анаэробных условиях происходит брожение клетчатки. Химизм разложения состоит из двух фаз.

Первая фаза – гидролиз клетчатки под действием экзоферментов, выделяемых микроорганизмами, до глюкозы:



Вторая фаза – это дальнейшее сбраживание глюкозы по типу маслянокислого брожения с образованием различных органических веществ:



Постановка опыта. Для получения накопительной культуры анаэробных целлюлозоразлагающих бактерий пользуются питательной средой Омелянского следующего состава: $(NH_4)_3PO_4$ – 1,0 г, K_2HPO_4 – 1,0

г, MgSO_4 – 0,5 г, NaCl – 0,1 г, CaCO_3 – 2,0 г, FeSO_4 – 2 капли 1%-ного раствора, пептон – 0,6 г, дистиллированная вода – 1000 мл.

При подготовке опыта среду разливают в колбы на 2/3 объема. Добавляют 0,5–1 г почвы и кипятят колбы со средой и почвой 5 мин для уничтожения неспоровых форм. Вносят в колбу несколько полосок фильтровальной бумаги. Доливают доверху питательную среду и закрывают колбу пробкой с затвором для выхода газов. Помещают в термостат при температуре 30–35 °С.

Элективные условия, необходимые для развития целлюлозоразлагающих бацилл:

- 1) Источник углерода – клетчатка (фильтровальная бумага);
- 2) внесение целлюлозоразлагающих бацилл с почвой;
- 3) анаэробные условия;
- 4) минеральные элементы и пептон для питания;
- 5) освобождение от неспоровых форм при кипячении.

Результаты опыта. Опыт продолжается 2–3 недели.

Микроскопирование. Со дна колбы извлекают пинцетом кусочек разлагающейся бумаги и делают ею мазок по обезжиренному предметному стеклу. Высушивают, фиксируют в пламени, окрашивают кристаллвиолетом (30–60 с) и исследуют с помощью иммерсионной системы микроскопа.

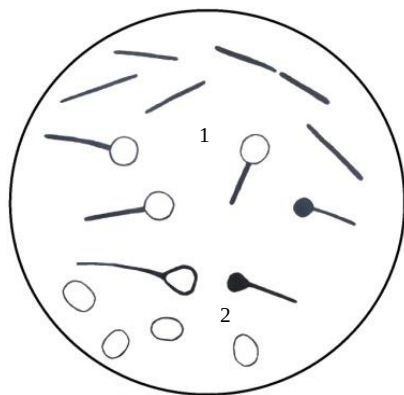


Рисунок 28 – Целлюлозоразлагающие бациллы
1 – *Clostridium omelianskii*; 2 – *Clostridium dissolvens*.

Брожение целлюлозы вызывают целлюлозоразлагающие бациллы. Они широко распространены в почве, навозе, речном иле, сточных водах.

К целлюлозоразлагающим бациллам относятся: *Clostridium omelian-skii* (открытый В.Л. Омелянским в 1902 г.) и *Clostridium dissolvens* – это две формы мезофилы, оптимальная температура для их развития 30–40 °С.

К термофильным относится *Clostridium thermocellum*, оптимальная температура около 60 °С.

В приготовленной колбе при невысоких температурах инкубации будут развиваться первые две формы.

Характеристика целлюлозоразлагающих бацилл. Относятся к маслянокислым бактериям, но нетипичным – углерод используют только в виде клетчатки. Это грамположительные длинные палочки, подвижные, спорообразование плектридиальное (крупная спора находится на конце тонкой вегетативной клетки), облигатные анаэробы. *Clostridium omelian-skii* имеет круглую правильной формы спору, а у *Clostridium dissolvens* – спора грушевидной, чуть сплюснутой формы.

Зарисовывают в тетради и описывают целлюлозоразлагающие бациллы.

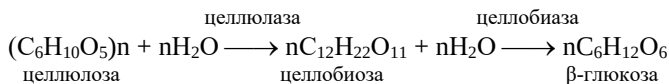
Материалы и оборудование: колбы емкостью 100 мл с резиновой пробкой и затвором, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, K_2HPO_4 , MgSO_4 , NaCl , FeSO_4 , CaCO_3 , пептон, почва, полоски фильтровальной бумаги, пинцеты, кристаллиолет.

Контрольные вопросы

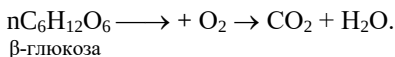
1. Перечислите элективные условия брожения клетчатки.
2. Назовите возбудителей брожения клетчатки и дайте им характеристику.
3. Как готовят препарат-мазок для изучения целлюлозаразлагающих бацилл?
4. Во сколько этапов идет анаэробное разложение клетчатки?

Работа 22. Окисление целлюлозы

Аэробное разложение, или окисление целлюлозы (клетчатки), проходит в две фазы. Первая фаза – это гидролиз целлюлозы под действием экзоферментов, выделяемых наружу микроорганизмами, до β-глюкозы:



Вторая фаза – это полное окисление поглощенной микробами β -глюкозы до углекислого газа и воды:



Постановка опыта. В работе используют метод почвенных пластинок Кристенсена. Чашку Петри заполняют почвой слоем около 1 см, предварительно увлажненной водой или средой Гетчинсона следующего состава: $NaNO_3$ – 2,5 г, K_2HPO_4 – 1,0 г, $MgSO_4$ – 0,3 г, $CaCl_2$ – 0,1 г, $NaCl$ – 0,1 г, $FeCl_3$ – 0,01 г, вода дистиллированная – 1000 мл. Поверхность почвы выравнивают шпателем, сверху накладывают кружок фильтровальной бумаги и плотно прижимают к поверхности среды, чашки помещают в термостат, при 27–30 °С. Периодически смачивают почву в чашке водой, но не допускают того, чтобы вода полностью заливала фильтровальную бумагу, и не развивались бы на фильтровальной бумаге анаэробные целлюлозоразлагающие бактерии.

Результаты опыта. Через 4–5 суток после постановки опыта на бумаге появляются пигментные зоны и ослизненные участки, указывающие на разрушение клетчатки. Через 1,5–2 недель их можно микроскопировать.

Микроскопирование. Для микроскопического изучения аэробных целлюлозоразлагающих бактерий бактериологической петлей берут немного слизи, покрывающей фильтровальную бумагу, растирают ее на предметном стекле, фиксируют мазок в пламени и окрашивают кристаллвиолетом 30–60 с. Препарат рассматривают, пользуясь иммерсионной системой микроскопа.

Возбудителями аэробного разложения клетчатки являются бактерии, актиномицеты, плесневые грибы. Наибольшее значение имеют бактерии. К ним относятся миксобактерии, цитофаги и вибрионы. Миксобактерии образуют яркоокрашенные слизистые плодовые тела на разлагающейся древесине. На фильтровальной бумаге в нашем опыте развиваются в основном цитофаги и вибрионы.

Цитофаги – *Cytophaga* – крупные длинные слегка изогнутые палочки с острыми краями.

Вибрионы – *Cellvibrio* – мелкие тонкие изогнутые клетки и *Cellfalcicula* – мелкие короткие толстые изогнутые клетки с заостренными концами.

Характеристика аэробных целлюлозоразлагающих бактерий: грамотрицательные, палочки и вибрионы, подвижные, неспоровые.

Зарисовывают и описывают аэробные целлюлозоразлагающие бактерии в тетради.

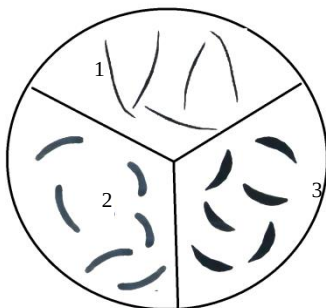


Рисунок 29 – Аэробные целлюлозоразлагающие бактерии
1 – *Cytophaga*; 2 – *Cellvibrio*; 3 – *Cellfalcicula*.

Материалы и оборудование: чашки Петри, среда Гетчинсона, дистиллированная вода, почва, простерилизованные кружки фильтровальной бумаги, шпатели, кристаллвиолет.

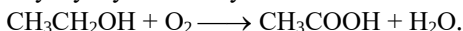
Контрольные вопросы

1. Назовите и опишите фазы аэробного разложения клетчатки.
2. Кто является возбудителем окисления клетчатки?
3. Дайте характеристику аэробным целлюлозаразлагающим бактериям.

Работа 18. Окисление спирта в уксусную кислоту

Некоторые микроорганизмы получают энергию в результате неполного аэробного окисления органических веществ кислородом воздуха, т.е. осуществляют окисление не до конечных продуктов (CO_2 и H_2O), а до не полностью окисленных органических соединений (например, органических кислот), выделяемых в среду.

Типичным примером процессов неполного окисления является окисление спирта в уксусную кислоту:



Возбудителями являются уксуснокислые бактерии. Уксуснокислые бактерии широко распространены в природе, встречаются на зрелых плодах, ягодах, в квашеных овощах, вине, пиве, квасе. Они были открыты Л. Пастером в 1868 г.

Окисление спирта в уксусную кислоту используют в производстве уксуса из вина и спирта.

Постановка опыта. В колбы наливают по 30–50 мл непастеризованного пива или легкого вина (виноградного, яблочного или ягодного) и добавляют 5–10 мл 10 %-ной уксусной кислоты для подкисления среды. Помещают в термостат при температуре 25–30 °С.

Результаты опыта. Через несколько дней (2–6) на поверхности среды появляется серовато-белая пленка уксуснокислых бактерий.

Препаровальными иглами переносят небольшие кусочки пленки с поверхности скисшего пива или вина в фарфоровую чашку и на предметное стекло.

Определение вида уксуснокислых бактерий. Добавляют к пленке в фарфоровой чашке несколько капель раствора Люголя и устанавливают реакцию на йод.

Микроскопирование. Для микроскопического исследования бактериальную пленку на предметном стекле аккуратно расправляют, фиксируют в пламени, окрашивают кристаллвиолетом 30–60 с, рассматривают с иммерсией.

На пиве и вине хорошо развиваются такие уксуснокислые бактерии: *Acetobacter aceti* – типичные уксуснокислые бактерии, образуют на поверхности гладкую слизистую пленку, окрашивающуюся йодом в желтый цвет. Развиваются при относительно низких температурах (20–22 °С);

Acetobacter pasteurianum образуют на поверхности среды морщинистую сухую пленку, окрашивающуюся йодом в синий цвет. Оптимальная температура развития 30–34 °С.

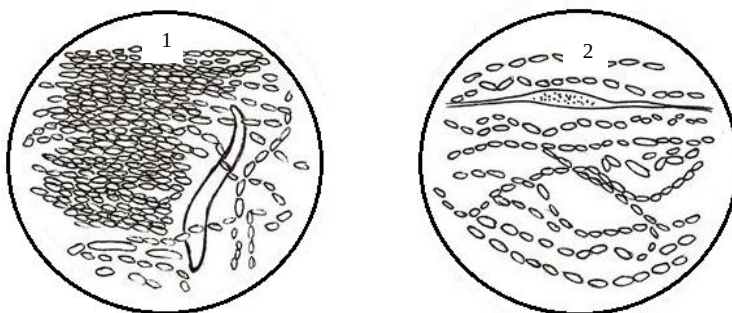


Рисунок 30 – Уксуснокислые бактерии
1 – *Acetobacter aceti*; 2 – *Acetobacter pasteurianum*.

Характеристика уксуснокислых бактерий. Грамотрицательные. Представляют собой короткие палочки, расположенные цепочками, неспоровые, в основном подвижные, строгие аэробы, которые образуют пленки на поверхности среды, отличаются высокой устойчивостью к кислотам (ацидофильные).

Зарисовывают и описывают уксуснокислые бактерии в тетради.

Материалы и оборудование: пиво или легкое вино в плоскодонных колбах на 100 мл, 10 %-ная уксусная кислота, цилиндры, препаровальные иглы, кристалвиолет, раствор Люголя, фарфоровые чашки.

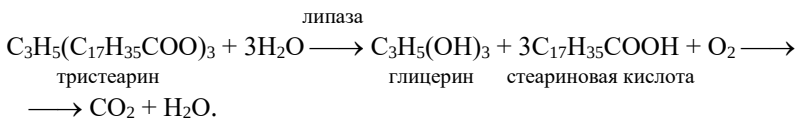
Контрольные вопросы

1. Каков химизм окисления спирта в уксусную кислоту?
2. Назовите возбудителей окисления спирта в уксусную кислоту и дайте им характеристику.
3. Как проводится постановка опыта по изучению уксуснокислых бактерий.
4. Где нашли практическое применение реакции неполного окисления?

Работа 24. Окисление микроорганизмами жира

Жир входит в состав клеток всех организмов как конституционное и запасное вещество. В почву жир попадает с растительными, животными и микробными остатками.

Микроорганизмы, окисляющие жир, выделяют фермент липазу, который вызывает гидролиз жира до глицерина и жирных кислот. Продукты гидролиза в дальнейшем постепенно полностью окисляются до углекислого газа и воды:



Постановка опыта. Приготавливается среда Рана: K_2HPO_4 – 5 г; $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ – 5 г; CaCl_2 – 1 г; MgSO_4 – 1 г; NaCl – следы; FeCl_3 – следы; вода дистиллированная – 1000 мл. Среду наливают в колбы по 30 мл и

заражают 1/3 чайной ложки почвы. Вносят 1 мл касторового (или подсолнечного) масла. Помещают в термостат при 25–30 °С.

Результаты опыта. На 7–10-е сутки по мере развития жиροокисляющих микроорганизмов в прозрачном масле появляются белые хлопья нерастворимых в воде жирных кислот.

Микроскопирование. Готовят препарат-мазок с поверхности среды в колбе, фиксируют в фиксаторе из спирта и эфира несколько минут, окрашивают фуксином (30–60 с), исследуют с иммерсионной системой.

Кроме того, используется простокваша, которая хранится при комнатной температуре, на ее поверхности появляется кремовая бархатистая морщинистая пленка молочной плесени, из которой готовят препарат мазок, фиксируют в фиксаторе, окрашивают метиленовым синим (2–3 мин) и рассматривают с иммерсией.

Окисление жира в почве происходит под действием некоторых бактерий и плесневых грибов.

Из бактерий наиболее энергично в почве разлагает жиры *Pseudomonas fluorescens* – мелкая, подвижная, неспоровая аэробная палочка, образующая в питательной среде зеленоватый пигмент.

На молочном продукте легко можно найти молочную плесень *Oidium lactis*, которая относится к дрожжеподобным грибам, растет в виде крупных длинных нитей, размножается делением и почкованием.

Зарисовывают все микробы в тетради и подписывают.

Материалы и оборудование: колбы на 100 мл, среда Рана, касторовое или подсолнечное масло, стаканчик на 100 мл с простоквашей и пленкой на ее поверхности, фиксатор из спирта и эфира (1:1), фуксин, метиленовый синий.

Контрольные вопросы

1. Каков химизм окисления микроорганизмами жира?
2. Назовите возбудителей окисления жира и дайте им характеристику.
3. Каким образом проводят микроскопирование для изучения микроорганизмов, вызывающих окисление жира?

Раздел 6. ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ АЗОТА

Азот – один из элементов-органогенов, он входит в состав аминокислот, белков, мочевины, хитина, нуклеиновых кислот и других органических веществ. Его значение в питании растений велико. В почве азот находится в первом минимуме. В воздухе атмосферный молекулярный азот (N_2) составляет 78,1 %, но растения не могут его усваивать. Растениям недоступен и органический азот, они могут усваивать только минеральные формы азота (аммиачный, нитратный, нитритный), кроме N_2 .

Преобразование форм азота в почве осуществляется микроорганизмами и включает следующие этапы:

- 1) Аммонификация;
- 2) нитрификация;
- 3) денитрификация;
- 4) биологическая азотфиксация.

Работа 25. Аммонификация белковых веществ

Аммонификация – это разложение органических азотсодержащих веществ с выделением азота в виде аммиака (NH_3). Этот процесс называется также минерализацией азота или гниением. Он проходит в несколько этапов в результате жизнедеятельности различных групп микроорганизмов, главным образом бактерий, а также актиномицетов и плесневых грибов.

В почву белковые вещества попадают с остатками отмерших растений, животных, микроорганизмов, с органическими удобрениями. При аммонификации белковых веществ выделяется аммиак, углекислый газ, при анаэробном распаде могут образовываться дурнопахнущие продукты – сероводород, меркаптаны, скатол, индол, кадаверин (трупные яды).

Постановка опыта. Для выращивания аммонифицирующих бактерий используют мясопептонный бульон (МПБ) с 3 % содержанием пептона или пептонную воду. Среду разливают в маленькие пробирки с ватными пробками чуть больше, чем наполовину их объема, добавляют немного почвы для заражения, закрепляют две индикаторные бумажки: розовую лакмусовую – индикатор на аммиак, а полоску фильтровальной бумажки, пропитанную в растворе уксуснокислого свинца – индикатор на сероводород (бумажки не должны касаться среды). Пробирки закрывают ватными пробками, плотно оборачивают пробки пергаментной бумагой, подписывают и помещают в термостат при температуре 25–30 °С.

Элективные условия, необходимые для аммонификации:

- 1) Обилие в среде белковых форм азота;
- 2) высокий столбик среды позволяет развиваться на поверхности среды аэробам, в середине толщи среды – факультативным анаэробам, а на дне пробирки – облигатным анаэробам.

Результаты опыта. Через неделю делают выводы о продуктах, выделяемых при аммонификации белковых веществ, и микроскопируют возбудителей этого процесса.

Определение аммиака и сероводорода:

Посинение розовой лакмусовой бумажки свидетельствует о выделении аммиака.

Почернение фильтровальной бумажки, смоченной уксуснокислым свинцом, говорит о выделении сероводорода, а если она еще и покрывается серебристым налетом, значит наряду с сероводородом выделяются и меркаптаны.

Отмечают в опытных пробирках изменение цвета индикаторных бумажек и делают выводы о выделяющихся в результате аммонификации белковых веществ газах.

Микроскопирование. Готовят препарат-мазок, для этого бактериальную петлю опускают почти до самого дна пробирки и удерживают там несколько секунд, потом медленно поднимают петлю, задерживаясь посередине толщи среды еще на несколько секунд, а затем извлекают из пробирки и делают мазок, чтобы в готовом препарате можно было найти разных по отношению к кислороду микробов. Фиксируют в пламени, красят кристаллвиолетом (30–60 с) и рассматривают с иммерсией.

Белки могут разлагаться бактериями, актиномицетами, грибами. Среди аммонифицирующих (гнилостных) бактерий встречается большое разнообразие, различных по форме и по-разному относящихся к кислороду. Среди них есть легко узнаваемые по ряду морфологических признаков:

Аэробы. *Bacillus mycoides* – грибовидная бацилла – небольшие палочки (0,8×5–7 мкм), подвижные (перитрихи), спорообразование центральное, бациллярное, споры овальные, клетки соединены в длинные цепочки. На твердых питательных средах дают характерные грибовидные колонии;

Bacillus mesentericus – картофельная палочка – крупные палочки (0,6×8–10 мкм) с бациллярным спорообразованием, с закругленными концами, споры овальные и продолговатые, одиночные или соединенные в цепочки;

Факультативные анаэробы. *Proteus vulgaris* – протей обыкновенный – грамотрицательный, тонкие, подвижные (перитрихи), неспоровые палочки различной длины (0,3×4–6 и более мкм). Из-за своей полиморфности названы в честь мифического бога Протея;

Escherichia coli – кишечная палочка – грамотрицательный, подвижные (перитрихи), мелкие, короткие, неспоровые палочки (0,5×2–4 мкм);

Облигатные анаэробы. *Clostridium putrificus* – гнилостная палочка – подвижные палочки с плекстридиальным расположением споры (спора на конце клетки, которая имеет вид барабанной палочки);

Clostridium sporogenes – спорогенная палочка – палочки округлой формы (5–6 мкм), подвижные, спорообразование кластридиальное (спора занимает почти всю центральную часть клетки, имеющий вид лимона).

Характеристика аммонифицирующих (гнилостных) бактерий: среди них есть грамположительные и грамотрицательные формы, они представляют собой палочки, подвижные, споровые и неспоровые, аэробы, факультативные анаэробы и облигатные анаэробы, гетеротрофы.

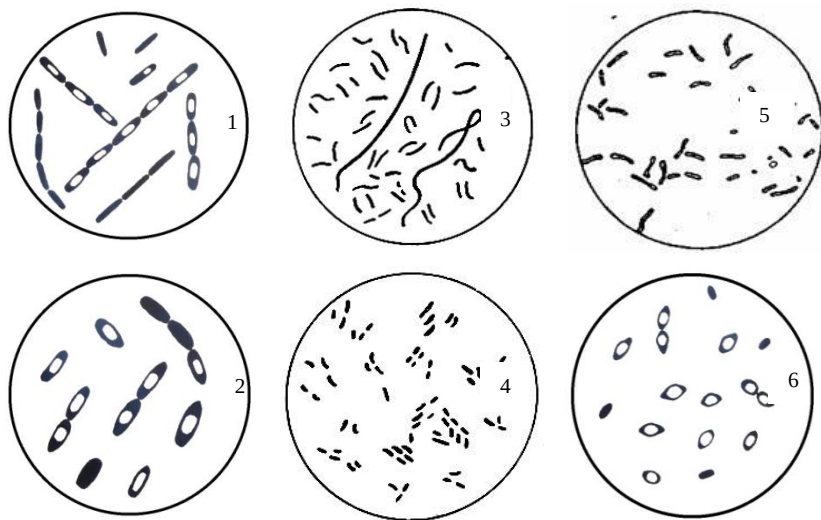


Рисунок 31 – Гнилостные бактерии

1 – грибовидная бацилла (*Bacillus mycoides*); 2 – картофельная палочка (*Bacillus mesentericus*); 3 – протей обыкновенный (*Proteus vulgaris*); 4 – кишечная палочка (*Escherichia*

coli); 5 – гнилостная палочка (*Clostridium putrificus*); 6 – спорогенная палочка (*Clostridium sporogenes*).

Зарисовывают найденные аммонифицирующие бактерии в тетради и подписывают.

Материалы и оборудование: питательная среда (МПБ с 3 % пептона или ПВ), разлитая в малые пробирки с ватными пробками, фарфоровые чашки с почвой и ложечками, чашки Петри с розовой лакмусовой бумагой и полосками фильтровальной бумаги, пропитанные раствором уксуснокислого свинца $Pb(CH_3COO)_2$, кристалливиолет.

Контрольные вопросы

1. Назовите этапы превращения азота в природе.
2. Что такое аммонификация и кто является возбудителем данного процесса?
3. Дайте характеристику гнилостным бактериям.
4. Назовите элективные условия аммонификации.

Работа 26. Нитрификация

Нитрификация – это процесс окисления аммиака (или аммиачных форм азота) сначала в азотистую кислоту (или нитриты), а затем в азотную кислоту (или нитраты). Этот процесс идет в две фазы:

I фаза – $2NH_3 + 3O_2 = 2HNO_2 + 2H_2O + 275 \text{ кДж}$,

II фаза – $2HNO_2 + O_2 = 2HNO_3 + 87 \text{ кДж}$.

Постановка опыта. Для исследования процесса нитрификации готовят питательную среду Виноградского (табл. 4).

Таблица 4 – Питательная среда для нитрификации

Состав питательной среды	Концентрация, %	Объем рабочих растворов, мл	Объем среды, мл
$(NH_4)_2 SO_4$	0,2	5	25
K_2HPO_4	0,1	5	
$MgSO_4$	0,05	5	
$NaCl$	0,2	5	
$FeSO_4$	0,04	5	
$CaCO_3$ (сухой)	0,5	0,13 г	

Питательную среду наливают в плоскодонные колбы Виноградского или Эрленмейера, заражают 0,1 г почвы, плотно закрывают ватными

пробками, подписывают и помещают в термостат при температуре 25–30 °С.

Элективные условия, необходимые для нитрификации:

- 1) присутствие в среде аммиачной формы азота;
- 2) отсутствие в среде органических форм углерода, так как нитрифицирующие бактерии строгие автотрофы;
- 3) аэробные условия за счет тонкого слоя среды на большой поверхности дна колбы;
- 4) нейтральная среда за счет внесения мела;
- 5) набор минеральных элементов питания.

Результаты опыта. Нитрификация проходит очень медленно. В почве обе фазы идут одновременно, а в жидких питательных средах фазы нитрификации проходят последовательно. Пока есть аммиак, идет первая фаза его окисления в азотистую кислоту, и только после полного исчезновения аммиака начинается вторая фаза – окисление азотистой кислоты в азотную.

Для наблюдения за ходом нитрификации на 7, 14, 21 и 28-й день производят капельные реакции на аммиак, азотистую и азотную кислоты.

Проба на аммиак. В фарфоровую чашечку вносят 2–3 капли жидкости из колбы и 1 каплю реактива Несслера. В присутствии аммиака появляется желто-оранжевое окрашивание, при его избытке – коричневые хлопья.

Проба на азотистую кислоту или нитриты. В фарфоровую чашечку вносят 2–3 капли жидкости из колбы, каплю 20 %-ной серной кислоты и 1–2 капли реактива цинк – йод – крахмал. В присутствии азотистой кислоты появляется синее окрашивание.

Проба на азотную кислоту или нитраты. Делают при отсутствии аммиака (в присутствии нитритов можно добавить для их нейтрализации несколько кристаллов мочевины). В фарфоровую чашечку вносят 2–3 капли жидкости из колбы и 1–2 капли дифениламина в крепкой серной кислоте. В присутствии азотной кислоты появляется синее окрашивание.

Результаты капельных реакций заносят в таблице 5.

Таблица 5 – Наблюдение за ходом нитрификации

Дата	Результаты капельных реакций на:			Вывод о ходе нитрификации
	NH_3	HNO_2	HNO_3	

--	--	--	--	--

Условные обозначения:

- ++ очень сильная реакция;
- + положительная реакция;
- + – неопределенная реакция;
- отрицательная реакция.

Микроскопирование. После завершения первой фазы нитрификации (на 21-й или 28-й день) готовят препарат-мазок с поверхности среды. Фиксируют в пламени, окрашивают кристаллвиолетом (30–60 с), исследуют под микроскопом с иммерсией.

Нитрификацию вызывают нитрифицирующие бактерии, которые были впервые получены в чистой культуре в 1890 г. С.Н. Виноградским. Нитрификаторы распространены почти повсеместно. Особенно их много в хорошо обработанных плодородных почвах, а в кислых почвах они отсутствуют.

Нитрифицирующие бактерии строго специфичны в отношении окисляемого вещества. Нитрифицирующие бактерии первой фазы окисляют аммиак в азотистую кислоту и не способны окислять азотистую кислоту в азотную. Они называются *нитрозными* бактериями. К ним относится европейский нитрозомонас (*Nitrosomonas europaea*) – это мелкие (1–1,5 мкм), подвижные, округлые палочки.

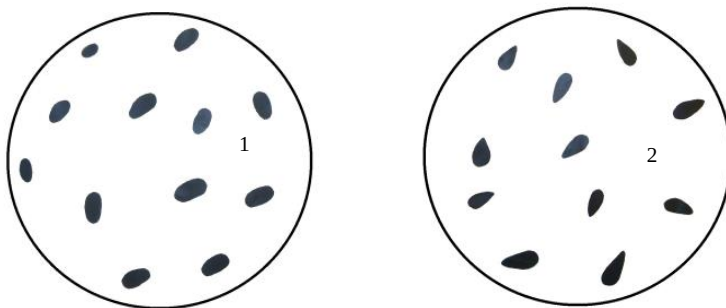


Рисунок 32 – Нитрифицирующие бактерии

- 1 – европейский нитрозомонас (*Nitrosomonas europaea*);
- 2 – нитробактер Виноградского (*Nitrobacter winogradskii*).

Нитрифицирующие бактерии второй фазы способны окислять только азотистую кислоту в азотную и не развиваются в присутствии аммиака. Они называются *нитратными* бактериями. К ним относится нитробактер Виноградского (*Nitrobacter winogradskii*) – это мелкие

(1 мкм) палочки клиновидной (грушевидной) формы, один конец у них более узкий, неподвижные.

Характеристика нитрифицирующих бактерий: грамположительные, среди них встречаются кокки, палочки, извитые и другие формы, бывают подвижные и неподвижные формы, неспоровые, строгие аэробы и автотрофы (хемолитоавтотрофы) – осуществляют хемосинтез – энергию, получаемую при окислении аммиака или азотистой кислоты, используют для построения из CO_2 органического вещества.

Находят и зарисовывают нитрифицирующие бактерии первой и второй фазы в тетради.

Материалы и оборудование: колбы Виноградского или Эрленмейера на 250 мл с ватными пробками, штативы с пробирками с приготовленными растворами $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , MgSO_4 , NaCl , FeSO_4 и пустыми подписанными пробирками-подставками с пипетками на 5 мл, фарфоровые чашки с почвой и ложечками, а также мелом и ложечками, карандаши по стеклу, фарфоровые чашечки для капельных реакций, длинные пипетки, реактив Несслера, цинк-йод-крахмал, 20%-ная H_2SO_4 , дифениламин, кристаллвиолет.

Контрольные вопросы

1. Что такое нитрификация, какие бактерии вызывают данный процесс?
2. Перечислите этапы нитрификации.
3. Какие элективные условия необходимы для нитрификации?
4. Как проводят пробы на аммиак, нитриты и нитраты?

Работа 22. Денитрификация

Денитрификация – это процесс восстановления нитратов и нитритов до молекулярного азота (N_2). При этом происходит потеря почвой доступных растениям минеральных форм азота. Это явление носит отрицательный характер.

Денитрификация делится на прямую, или микробиологическую – это биологическое восстановление нитратов, и косвенную, или химическую – это химическое восстановление нитратов (происходит в кислой среде).

Прямая денитрификация осуществляется денитрифицирующими бактериями и происходит в анаэробных условиях в результате их нит-

ратного дыхания, когда микроорганизмы используют для окисления органического вещества не свободный молекулярный кислород, а при его отсутствии связанный кислород нитратов или нитритов.

Постановка опыта. Для наблюдения за процессом денитрификации готовят питательную среду следующего состава: сегнетова соль (калий натрий виннокислый) – 20,0 г, KNO_3 – 2,0 г, K_2HPO_4 – 0,5 г, MgSO_4 – 0,1 г, вода дистиллированная – 1000 мл.

Среду наливают в колбу на половину ее объема, добавляют 0,5 г почвы, тщательно перемешивают для удаления пузырьков воздуха, затем наполняют колбу питательной средой до самых краев и закрывают пробкой, в которую вставлена открытая с двух сторон стеклянная трубка, расширенная в средней части. Пробка вытесняет часть жидкости из колбы в стеклянную трубку. Наливают в трубку несколько капель вазелинового масла, чтобы создать в колбе анаэробные условия. Колбу подписывают и помещают в термостат.

Элективные условия, необходимые для денитрификации:

- 1) нитратная форма азота в среде;
- 2) анаэробные условия;
- 3) набор элементов питания для денитрифицирующих бактерий.

Результаты опыта. Через неделю опыт завершается. Отмечают появление пузырьков газов (CO_2 и N_2) и изменение цвета среды. Чтобы доказать, что нитраты исчезли, делают капельную реакцию на нитраты с дифениламиноом (см. лабораторную работу 26) и записывают вывод в тетради.

Микроскопирование. Для знакомства с денитрифицирующими бактериями берут пробу петлей из нижней части колбы и делают препарат-мазок. Фиксируют в пламени, красят кристаллвиолетом (30–60 с), рассматривают с иммерсионной системой микроскопа.

К денитрифицирующим бактериям относятся: *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas studzeri*, *Pseudomonas fluorescens* (последний вызывает позеленение среды, так как выделяет зеленый флуоресцирующий пигмент).

Характеристика денитрифицирующих бактерий: граммотрицательные, мелкие палочки и кокки, подвижные, неспоровые, факультативные анаэробы – в аэробных условиях они осуществляют аэробное дыхание, а при отсутствии кислорода – анаэробное (нитратное) дыхание, гетеротрофы.

Зарисовывают в тетради возбудителей денитрификации.

Материалы и оборудование: питательная среда для денитрифицирующих бактерий, колба на 100 мл с затвором, вазелиновое масло, почва, этикетка, фарфоровые чашки, дифениламин, пипетки, кристалл-виолет.

Контрольные вопросы

1. Что такое денитрификация и какое значение имеет этот процесс?
2. Назовите виды денитрификации и как с ними можно бороться?
3. Кто является возбудителем прямой денитрификации?
4. Какие элективные условия необходимы для денитрификации?

Работа 23. Свободноживущие азотфиксирующие микроорганизмы

Микроорганизмы, обитающие в почве самостоятельно и способные использовать молекулярный азот атмосферы для построения своего органического вещества, называются свободноживущими азотфиксаторами. После их отмирания в почве происходит минерализация органического азота до аммиака, доступного для питания растений. Масштабы поступления биологического азота в почву за счет деятельности свободноживущих в ней азотфиксаторов значительны и могут составлять 15–50 кг азота на гектар и более.

Свободноживущие азотфиксирующие микроорганизмы делятся на анаэробные и аэробные.

1. Анаэробный свободноживущий азотфиксатор *Clostridium pasteurianum*. Этот микроорганизм был открыт в 1893 г. С.Н. Виноградским и назван в честь Л. Пастера. Энергию, получаемую в результате маслянокислого брожения органических форм углерода (моно-, ди- и полисахаридов), использует на связывание молекулярного азота. Азотфиксирующая способность составляет 10–12 мг азота на 1 г сброженного сахара. Этот микроорганизм встречается во всех почвах.

Постановка опыта. Для создания накопительной культуры *Clostridium pasteurianum* используют безазотистую среду Виноградского следующего состава: глюкоза – 20,0 г, K_2HPO_4 – 1,0 г, $MgSO_4$ – 0,5 г, NaCl – 0,5 г, вода дистиллированная – 1000 мл.

Среду разливают в высокие пробирки на 2/3 их объема, добавляют 0,5 г мела (для нейтрализации масляной кислоты) и заражают 1 г почвы. Пробирки закрывают ватными пробками, оборачивают пробки бумагой,

подписывают. Подготовленные пробирки пастеризуют при температуре 60 °С в течение 30 мин, а затем помещают в термостат при 25–30 °С.

Элективные условия, необходимые для развития *Clostridium pasteurianum*:

- 1) отсутствие в среде азота;
- 2) анаэробные условия за счет высокого столбика среды в пробирке;
- 3) присутствие глюкозы, необходимой для маслянокислого брожения;
- 4) нейтральная среда за счет мела;
- 5) необходимый набор элементов минерального питания;
- 6) пастеризация, которая уничтожает неспоровые формы, а бациллы остаются.

Результаты опыта. Через неделю пробирки исследуют. Отмечают выделение газов и масляной кислоты в результате брожения.

Микроскопирование. Для исследования микрофлоры бактериологической петлей проводят по стенке в нижней части пробирки, где в осадке мела, часто покрытые пленкой, накапливаются клостридиумы. Быстро переносят микробы на предметное стекло и готовят препарат-мазок, фиксированный в пламени и окрашенный кристаллвиолетом (30–60 с). Рассматривают, пользуясь иммерсионной системой микроскопа.

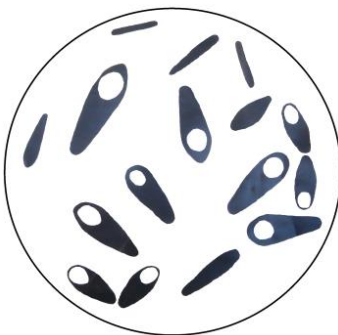


Рисунок 33 – *Clostridium pasteurianum*.

Характеристика *Clostridium pasteurianum*. Являются типичными маслянокислыми бациллами. Грамположительные. Клетки представляют собой крупные палочки шириной 0,8–1,3 и длиной 1,5–8 мкм, подвижные (перитрихи), споровые (спорообразование клостридиальное,

клетки имеют вид веретена), откладывают в теле гранулезу, облигатные анаэробы, гетеротрофы.

Зарисовывают в тетради споровые формы.

2. Аэробный свободноживущий азотфиксатор Азотобактер (*Azotobacter chroococcum*). Азотобактер впервые выделен в чистой культуре голландским ученым М. Бейеринком в 1901 г. В настоящее время известно около 10 видов азотобактера. Наиболее распространенным и хорошо изученным является *Azotobacter chroococcum* – обитатель плодородных почв. Образует на плотной питательной среде Эшби колонии с бурым, почти черным пигментом. Для *Azotobacter agilis* характерны бесцветные колонии, *Azotobacter vinelandii* дает флуоресцирующую желтовато-зеленоватую окраску колоний. Азотфиксирующая способность у азотобактера составляет 15–20 мг азота на 1 г потребляемого органического вещества.

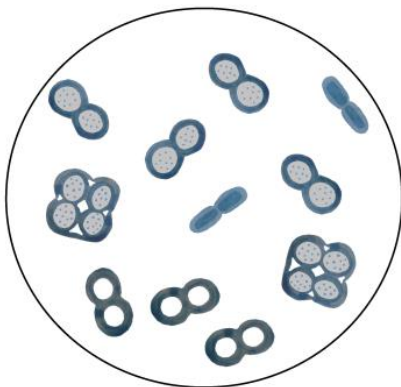


Рисунок 34 – *Azotobacter chroococcum*.

Постановка опыта. Для выявления азотобактера в почве и определения относительного его содержания пользуются методом почвенных комочков. Для этого используют агаризованную питательную среду Эшби следующего состава: маннит (глюкоза) – 20,0 г, K_2HPO_4 – 0,2 г, $MgSO_4$ – 0,2 г, $NaCl$ – 0,2 г, K_2SO_4 – 0,1 г, $CaCO_3$ – 5,0 г, агар-агар – 20,0 г, вода дистиллированная – 1000 мл.

Приготовленную среду разливают в чашки Петри и дают ей застыть. Для оценки плодородия почв по плотности населения в них азотобактера можно использовать две различные по плодородности почвы. То-

гда дно чашки карандашом по стеклу делят на две равные части и отмечают их цифрами (1 и 2). Производят посев комочков почвы диаметром примерно 2 мм с помощью стеклянной палочки, смоченной в воде (25 комочков почвы № 1 на половину чашки с номером один и 25 комочков почвы № 2 на половину чашки с номером два). Комочки раскладывают на некотором расстоянии друг от друга и хорошо смачивают водой.

Чашки закрывают, оборачивают бумагой, подписывают и помещают в термостат при температуре 28–30 °С.

Элективные условия, необходимые для развития азотобактера:

- 1) Отсутствие в среде азота;
- 2) аэробные условия, так как посев поверхностный;
- 3) присутствие в среде маннита, фосфора и минеральных элементов для питания;
- 4) нейтральная среда за счет мела;
- 5) достаточная влажность при хорошем увлажнении комочков.

Результаты опыта. Посеянные чашки исследуют через неделю.

Определение плотности населения азотобактера. Подсчитывают комочки почвы, вокруг которых появились густо слизистые бесцветные, светло-коричневые или темно-бурые колонии азотобактера. Выражают число комочков обрращения в процентах от общего количества разложенных комочков отдельно для каждой почвы. Сравнивают эти показатели у анализируемых почв и делают выводы об их плодородии.

Азотобактер очень требователен к плодородию почвы. Почва должна быть нейтральной (рН 7,2–7,4), структурной (аэрируемой), с влажностью 60–80 % ПВ, богатой органическим веществом, фосфором, микроэлементами (Мо, В). Присутствие азотобактера в почве является показателем ее окультуренности и плодородия.

Микроскопирование. Для знакомства с азотобактером из неподсохших блестящих слизистых колоний готовят препарат-мазок, фиксированный в пламени и окрашенный метиленовым синим (2–3 мин). Рассматривают с иммерсией.

В нашем опыте хорошо развивается *Azotobacter chroococcum*.

Характеристика азотобактера. Грамотрицательный, по форме встречаются кокки, палочки и цисты. Имеет четко выраженный цикл развития. В молодой культуре клетки имеют форму крупных, коротких палочек с закругленными концами (размером 3×6 мкм), подвижные (перитрихи), неспоровые. С возрастом клетки азотобактера принимают округлую форму, становятся крупными кокками (диаметром 4 мкм) и теряют подвижность. Кокки соединены по две или четыре клетки и покрыты

общей толстой слизистой капсулой. Содержат запасные вещества волютин и гликоген. Именно эти клетки и фиксируют азот атмосферы. Азотобактер очень влаголюбив, при нехватке влаги становится цистами – покоящимися клетками, покрытыми плотной оболочкой. Аэроб. Гетеротроф.

Azotobacter chroococcum можно использовать как компонент бактериальных удобрений, которыми обрабатывают семена различных культур (овощных, картофеля, зерновых) перед посевом для улучшения азотного питания растений и ростостимулирующего действия в результате деятельности микроорганизмов.

Зарисовывают в тетради азотобактер и делают поясняющие подписи.

Материалы и оборудование: для посева клостридия – колбы со средой Виноградского, фарфоровые чашки с почвой и ложечками, а также чашки с мелом и ложечками, высокие пробирки с ватными пробками, полоски бумаги для обертывания пробирок, водяная баня;

для посева азотобактера – чашки Петри со средой Эшби, две чашки Петри с различными почвами и два стаканчика с дистиллированной водой и стеклянными палочками, бумага для обертывания чашек;

для микроскопирования – кристаллвиолет и метиленовый синий.

Контрольные вопросы

1. Какое значение имеют свободноживущие азотфиксаторы?
2. Перечислите свободноживущих азотфиксаторов и дайте им характеристику.
3. При каких условиях развиваются *Clostridium pasteurianum* и *Azotobacter chroococcum*?
4. Для чего применяют бактериальные удобрения из азотобактера и как их применяют?

Работа 29. Клубеньковые бактерии бобовых растений

Клубеньковые бактерии относятся к симбиотическим азотфиксаторам. Они живут в клубеньках на корнях бобовых растений и способны фиксировать азот атмосферы только в таком симбиозе. Клубеньки у одних растений (горох, бобы) – крупные, у других (клевер) – мелкие, у некоторых могут иметь вид больших бородавчатых наростов на главном корне (люпин).

Клубеньковые бактерии характеризуются следующими свойствами: *специфичностью* – заражают только определенные виды бобовых растений; *вирулентностью* – проникают в ткань корня, где размножаются

и вызывают образование клубеньков; *активностью* – способны использовать молекулярный азот.

Наиболее энергично процесс усвоения азота в клубеньках отмечается в фазе бутонизации и цветения бобовых, когда клубеньковые бактерии принимают форму бактериоидов. Однолетние бобовые растения способны в симбиозе с клубеньковыми бактериями накапливать за вегетационный период на 1 га от 50 до 100 кг азота, а многолетние – 150–300 кг.

Микроскопирование. Для знакомства с клубеньковыми бактериями готовят препараты-отпечатки или мазки из клубеньков бобовых растений. Для этого отделяют клубеньки от корней, помещают на предметное стекло и другим предметным стеклом раздавливают и размазывают по поверхности. У люпина надрезают нарост на корне и делают мазок обнаженной тканью. Фиксируют в пламени, окрашивают кристаллвиолетом (30 – 60 с), рассматривают с помощью иммерсионной системы. В препаратах отыскивают мелкие, неспоровые палочки и крупные бактериоиды.

Клубеньковые бактерии относятся к родам *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*. В клубеньках люпина развиваются *Rhizobium lupini*, клевера – *Rhizobium trifolii*, гороха и бобов – *Rhizobium leguminosarum*.

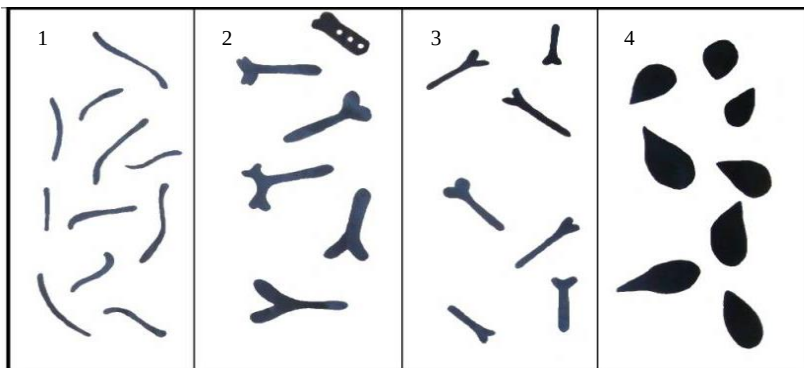


Рисунок 35 – Бактериоды бобовых растений

1 – люпина; 2 – гороха; 3 – бобов; 4 – клевера.

Характеристика клубеньковых бактерий бобовых растений. Грамотрицательные. В почве они представляют собой подвижные или неподвижные палочки и кокки, азот фиксировать не могут. Проникая и развиваясь в клетках корней, они становятся сначала неподвижными палочками, которые с возрастом накапливают запасные вещества и переходят в состояние так называемых опоясанных палочек (такие клетки

особенно хорошо видны у гороха). Затем из этих клеток образуются бактериоиды – клетки крупных размеров, неподвижные и различной формы, специфичной для разных видов клубеньковых бактерий: У-образной, Т-образной, нитевидной, грушевидной и др. Именно бактериоиды обладают азотфиксирующей способностью. Клубеньковые бактерии неспоровые, аэробы и гетеротрофы.

Из клубеньковых бактерий готовят бактериальные удобрения – Сапронит, Ризофос (марок «Галега», «Люцерна», «Клевер»), Вогал, Со-яРиз, которыми обрабатывают семена бобовых растений перед посевом для ускорения образования клубеньков и улучшения азотного питания растений. Бактеризация культур производится специфичными им ра-сами клубеньковых бактерий.

Зарисовывают в тетради и подписывают бактериоиды различных видов клубеньковых бактерий.

Материалы и оборудование: зафиксированные в формалине корни бобовых растений с клубеньками (горох, бобы, люпин, клевер), маленькие пинцеты, лезвия, кристаллвиолет.

Контрольные вопросы

1. Какими свойствами обладают клубеньковые бактерии?
2. Какова азотфиксирующая способность бактерий рода *Rhizobium*?
3. Дайте характеристику клубеньковым бактериям.
4. Каким образом готовят препарат для изучения клубеньковых бактерий?
5. Какие бактериальные удобрения готовят из клубеньковых бактерий и как их используют?

Раздел 7. МИКРОБИОЛОГИЯ КОРМОВ

Работа 30. Исследование силоса, сенажа и квашеных продуктов

Силос. Силосование – это способ консервирования влажной зеленой растительной массы. Силос (от исп. *silos* – яма) один из древнейших видов корма. В основе силосования (заквашивания) лежит молочнокислое брожение. Силосованный корм сохраняет сочность, приобретает кислый вкус, становится более мягким, лучше поедается скотом и может храниться продолжительное время. Силос имеет влажность 70–80 % и кислотность (рН) 4,0–4,2.

Для оценки качества силоса проводят органолептические, химические и микробиологические исследования.

К *органолептическим показателям* качества силоса относятся цвет, запах, консистенция и вкус.

Цвет должен быть ближе к цвету растений, из которых приготовлен силос. Доброкачественный силос имеет оттенки зеленого, желто-зеленого, коричнево-зеленого цвета. У испорченного силоса преобладает темно-коричневый и черный цвет.

Запах доброкачественного силоса должен быть приятным, напоминающим запах свежеспеченного хлеба, моченых яблок. При порче силоса появляется запах уксуса и неприятный запах масляной кислоты.

Консистенция у доброкачественного силоса должна быть выраженной. У испорченного силоса растительная масса делается ослизненной, листочки не отделяются друг от друга.

Вкус доброкачественного силоса слабокислый, приятный. У испорченного силоса вкус резко кислый с горьковатым привкусом.

Важнейшими *химическими показателями* качества силоса является его кислотность и соотношение органических кислот. У силоса хорошего качества рН должна быть около 4,0–4,2, молочной кислоты более 60%, уксусной – менее 40% и масляной не допускается.

Микробиологическая оценка качества силоса проводится по его микрофлоре. В силосе хорошего качества должны быть молочнокислые бактерии и немного дрожжей, не должно быть маслянокислых, гнилостных бактерий и плесневых грибов.

Выполнение работы. Для анализа из торцевой части траншеи, ямы или наземных буртов берут среднюю пробу силоса и помещают в стерильный кристаллизатор. Исследования рекомендуется проводить не позднее 1–2 суток после взятия пробы.

Определение рН силоса. Навеску силоса 1 г растирают в фарфоровой ступке с 10 мл дистиллированной воды. Настаивают около 5 мин и определяют кислотность полученной вытяжки с помощью индикаторной бумаги для определения рН силоса (цвет опущенной в вытяжку бумажки сравнивают со шкалой) или с помощью портативного рН-метра.

Оценка качества силоса. Для определения качества исследуемого силоса используют метод его балльной оценки органолептических и химических показателей, предложенный А.Н. Михиным (табл. 6).

Таблица 6 – Оценка качества силоса по А.Н. Михину

Показатели	Балл
Цвет:	
зеленый	3
желто-зеленый или коричневый	2
черно-зеленый	1

черный	0
Запах:	
ароматический, фруктовый, слабокислый, хлебный	4
слабоароматический, уксуснокислый, огуречный	3
резко уксуснокислый, запах масляной кислоты	2–1
затхлый, навозный, сильный запах масляной кислоты	0
Величина pH:	
4,2 и ниже	5
4,3 – 4,5	4
4,6 – 5,0	3
5,1 – 6,0	2
6,1 – 6,3	1
6,4 и выше	0

Данные балльной оценки при определении цвета, запаха и pH суммируют и получают общий балл, по которому определяют качество силоса: 11–12 баллов – силос очень хорошего качества, 9–10 – хорошего качества, 7–8 – среднего качества, 4–5 – плохого качества.

Силос, имеющий оценку 3 балла и ниже, считается очень плохим и к скармливанию животным непригоден.

Производят оценку указанных показателей в баллах и делают вывод о качестве исследуемого силоса.

Микроскопирование. Для знакомства с микрофлорой силоса из него готовят препарат-отпечаток следующим образом. Берут пинцетом наиболее сочный стебель и плотно прижимают его к предметному стеклу. Можно положить силос на предметное стекло и прижать его другим стеклом, тогда сразу на двух стеклах получится отпечаток. Использованный растительный материал удаляют со стекла, а мазок сушат, фиксируют в пламени и окрашивают кристаллвиолетом 30–60 с. Рассматривают препараты, пользуясь иммерсионной системой микроскопа.

На поверхности растений находится эпифитная микрофлора – гнилостные, молочнокислые бактерии, дрожжи, плесневые грибы. При силосовании измельченная растительная масса помещается в ямы, траншеи или башни, спрессовывается и изолируется от доступа воздуха. Накопление молочной и уксусной кислот под действием молочнокислых бактерий обуславливает сохранность силоса, потому что нежелательные для силосования бактерии (маслянокислые, гнилостные) не могут развиваться в среде с кислой реакцией. Критические значения pH для развития различных групп бактерий: молочнокислых – 3,5–4,0, маслянокислых – 4,7–5,0, гнилостных – 5,0–5,5. Кислую среду (pH 4,0) хорошо переносят плесневые грибы, но они являются строгими аэробами

и в хорошо укрытом заsilосованном корме в анаэробных условиях развиваться не могут. Кислотоустойчивость свойственна также дрожжам, они встречаются в силосе обычно в небольших количествах. Дрожжи сбраживают сахара до спирта, что придает корму приятный запах и вкус, продуцируют витамины и другие биологически активные вещества.

В препарате находят гомоферментативные молочнокислые бактерии: *Lactobacterium plantarum* (растительную палочку) – тонкие неспоровые палочки, варьирующие в размере, и *Streptococcus lactis* (молочный стрептококк) – короткие цепочки или пары кокков. Иногда встречаются клетки почкующихся дрожжей. В силосе низкого качества обнаруживаются маслянокислые бациллы, гнилостные бактерии и плесневые грибы.

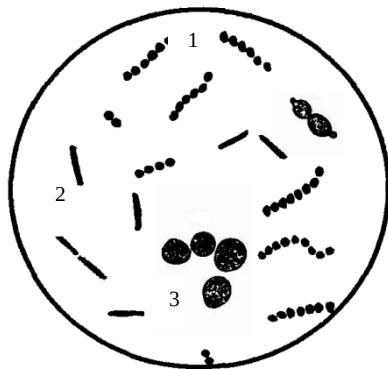


Рисунок 36 – Микрофлора силоса

- 1 – *Streptococcus lactis* (молочный стрептококк);
 2 – *Lactobacterium plantarum* (растительная палочка);
 3 – *Saccharomyces* (дрожжи дикие).

Зарисовывают и подписывают микрофлору силоса в тетради.

Сенаж. Сенажирование – это способ консервирования провяленных растений, главным образом, бобовых, убранных в начале стадии бутонизации. Сначала растительная масса 1–2 суток лежит в валках, а затем ее подбирают, измельчают, загружают в траншеи или башни, уплотняют и изолируют от воздуха. Влажность сенажа составляет 40–55 %. Сохраняется под влиянием «физиологической сухости» и биохимических процессов, вызываемых микроорганизмами.

Физиологическая сухость сырья – это состояние клеток растений, когда их водоудерживающая сила выше сосущей силы микроорганизмов. В растении вода может находиться в двух состояниях: в свободном и в составе клеточных коллоидов. В процессе проявлявания растительная масса, прежде всего, теряет свободную и слабосвязанную воду, при этом резко возрастает водоудерживающая сила коллоидов. При проявлении растений до влажности 68–70 % водоудерживающая сила клеток равняется 21–27 кгс/см²; 59–60 % – 31–37 кгс/см²; 50–55 % – 50–60 кгс/см²; 40–50 % – 60 кгс/см² и более; 15–20 % – 295, при этом сосущая сила большинства бактерий составляет 50–52 кгс/см², то есть влага у такого сырья практически недоступна для большинства микроорганизмов, в том числе для гнилостных и маслянокислых бактерий. Определенную опасность представляют собой плесени, их сосущая сила составляет 300 кгс/см², но при создании анаэробных условий плесени не развиваются.

На проявленной массе до влажности 40–55% слабо развиваются гнилостные и маслянокислые бактерии. Сильно замедляется также деятельность молочнокислых бактерий, вследствие чего молочнокислое брожение при сенажировании в сравнении с силосованием протекает менее интенсивно, корм подкисляется в меньшей степени до pH 4,7–5,2. Меняется и тип молочнокислого брожения. Из кислот в сенаже в основном образуется молочная кислота – 78–95% от суммы всех кислот.

Выполнение. Для исследования сенажа определяют pH и готовят препарат-отпечаток, как и при исследовании силоса.

Зарисовывают в тетради микрофлору сенажа и отмечают его кислотность.

Квашенные продукты. Молчнокислое брожение лежит в основе квашения капусты, огурцов и др. Микробиологические процессы при этом такие же, как и при силосовании.

Выполнение. Для исследования выжимают сок из квашеных продуктов и определяют его кислотность с помощью индикаторной бумаги для определения pH силоса. Затем делают препараты-отпечатки как и при исследовании силоса. Микрофлора квашеной капусты и соленых огурцов такая же, как и в силосе.

В квашеной капусте развивается *Streptococcus lactis* Молочный стрептококк, *Lactobacterium plantarum* var. *brassica* Капустная палочка (разновидность растительной) и *Saccharomyces* дрожжи дикие.

В соленых огурцах – *Streptococcus lactis* Молочный стрептококк, *Lactobacterium plantarum* var. *cucumis* Огуречная палочка (разновидность растительной) и *Saccharomyces* дрожжи дикие.

В более кислых продуктах больше палочковидных молочнокислых бактерий, а в менее кислых – шаровидных. Число дрожжевых клеток также может быть различным – это зависит от содержания в растениях сахара.

Заполняют таблицу 7.

Таблица 7 – Результаты исследования квашеных продуктов

Продукт	Кислотность, рН	Микрофлора
Квашеная капуста		
Соленый огурец		

Зарисовывают в тетради микрофлору квашеных продуктов.

Материалы и оборудование: силос или сенаж, квашеная капуста, солёные огурцы, ступки с пестиками, цилиндры на 100 или 50 мл, рН-мдистиллированная вода, индикаторная бумага для определения рН силоса со шкалой или рН-метр, кристаллвиолет.

Контрольные вопросы

1. Что такое силос?
2. Какой микробиологический процесс лежит в основе силосования культур?
3. Назовите показатели, по которым оценивается качество силоса.
4. Почему в хорошем силосе не могут развиваться маслянокислые, гнилостные бактерии и плесневые грибы?
5. Что такое сенаж?
6. Какие процессы лежат в основе сенажирования кормов?
7. Почему в сенаже при влажности 40–55% не могут развиваться маслянокислые, гнилостные бактерии и плесневые грибы?
8. Назовите микрофлору силоса, сенажа и квашенной капусты и соленого огурца.

Работа 26. Микробиологическая оценка зерна

На поверхности зерна обитает разнообразная микрофлора. Часть микроорганизмов попадает туда из ризосферы, часть заносится с пы-

лью и насекомыми. Однако на зерне, как и на всей поверхности растений, развиваются лишь некоторые микроорганизмы, так называемые эпифиты. Эпифитные микроорганизмы, размножающиеся на поверхности стеблей, листьев и семян растений, получили название микроорганизмов филлосферы. Эпифиты питаются продуктами экзосмоса растений; устойчивы к высоким концентрациям фитонцидов, выдерживают периодические колебания влажности. Численность этих микроорганизмов невелика и видовой состав их довольно постоянен: более 90 % составляют гнилостные бактерии, в основном это неспороносные бактерии рода *Pseudomonas*. Особенно часто на зерне встречается *Pseudomonas herbicola*, образующая на плотных средах золотисто-желтые колонии. Встречаются также *Pseudomonas fluorescens*, микрококки, молочнокислые бактерии, дрожжи. Бациллы и микроскопические грибы составляют небольшой процент. В определенных условиях эпифитные микроорганизмы могут быть полезны для растений, так как препятствуют проникновению паразитов в ткани растения. На хранение зерна эпифитные микроорганизмы могут действовать отрицательно. На развитие микроорганизмов на зерне, а, следовательно, на сохранность последнего решающее влияние оказывают: влажность, температура, степень аэрации, целостность зерна и состояние его покровных тканей. В зрелом зерне вода находится в связанном состоянии и недоступна микроорганизмам, которые в этом случае находятся в состоянии анабиоза. На зерне с повышенной влажностью микроорганизмы размножаются тем быстрее, чем выше температура. Развитие микробиологических процессов в хранящемся зерне с повышенной влажностью приводит к заметному, а иногда и очень значительному повышению температуры. Это явление получило название термогенез.

Самосогревание зерна ведет к смене микрофлоры. Свойственная зерну эпифитная микрофлора исчезает. Начинают обильно размножаться непигментированные неспороносные палочки, вытесняющие *Pseudomonas herbicola*. Позднее появляются термостойкие микрококки, образующие на плотных средах чаще всего мелкие белые плоские колонии, а также плесневые грибы, актиномицеты. Самосогревание свыше 40–50 °С способствует развитию спорообразующих и термофильных бактерий.

По мере самосогревания изменяется видовой состав и плесневых грибов. Виды *Penicillium*, которые преобладали вначале, заменяются представителями рода *Aspergillus*.

Таким образом, по видовому составу микрофлоры можно судить не только о том, подвергалось ли зерно самосогреванию, но и насколько далеко зашел этот процесс. Преобладание *Pseudomonas herbicola* в микробном ценозе зерна служит показателем его хороших качеств. Большое количество спорообразующих бактерий и грибов указывает на потерю семенами всхожести.

Благоприятные условия для развития на зерне микроорганизмов приводят к накоплению выделяемых ими токсинов. При скармливании такого зерна скоту и домашней птице возникают отравления.

Правильное хранение зерна сводится к тому, чтобы не допускать развития на нем микроорганизмов.

Количественный учет микроорганизмов на зерне.

Навеску массой 5 г помещают в колбу с 50 мл стерильной водопроводной воды. Колбу взбалтывают круговыми вращательными движениями 10 мин. Из полученной вытяжки готовят разведения 1:100, 1:1000, 1:10000. (отдельными стерильными пипетками берут по 10 мл суспензии и переносят в колбы, содержащие по 90 мл стерильной водопроводной воды). Затем из каждого разведения делают посев на МПА в двух повторностях. Чашки инкубируют при 30 °С. наряду с МПА используют различные элективные среды. Через 3–5 дней инкубации подсчитывают общее число колоний, выросших на МПА в чашках, и рассчитывают количество микроорганизмов на 1 г зерна.

Определение качественного состава микрофлоры зерна.

Колонии группируют по культуральным признакам. Из каждой группы колоний готовят препараты, выявляют принадлежность микроорганизмов к роду или семейству и определяют численность микробов каждой группы в процентах от общего количества микроорганизмов.

На основании микробиологического анализа делают заключение о качестве зерна. На свежем доброкачественном зерне преобладает *Pseudomonas herbicola* (до 80 %), образующая блестящие оранжевые колонии. Встречаются *Pseudomonas fluorescens*, формирующие желтовато-зеленоватые флуоресцирующие колонии; непигментированные неспорообразующие палочки; дрожжи – блестящие, выпуклые, часто окрашенные в розовые тона колонии. При учете на сусло-агаре с мелом выявляются молочнокислые бактерии, образующие чечевицеобразные мелкие колонии с зонами растворения мела.

На несвежем зерне, хранившемся при повышенной влажности *Pseudomonas herbicola*, *Pseudomonas fluorescens* не выявляются. Обнаружи-

ваются микрококки, образующие мелкие белые блестящие плоские колонии; спорообразующие палочки; актиномицеты, а также неспороносные палочки. При учете на сусло-агаре выявляются в большом количестве грибы.

Материалы и оборудование. Образцы семян различных культур, колбы и пробирки со стерильной водой, набор питательных сред и лабораторной посуды, стерильные пипетки и шпатели.

Контрольные вопросы

1. Что такое эпифитная микрофлора?
2. Какой микроорганизм преобладает в микрофлоре здоровых семян?
3. Как изменяется микрофлора при изменении условий хранения?
4. Как определяют количественный состав микрофлоры зерна?

Работа 32. Учет ризосферной микрофлоры (по Красильникову)

В корневой системе растений микроорганизмов привлекают питательные вещества. Питательными веществами для бактерий, развивающихся на корнях, являются продукты *экзоосмоса* растений. В почве, непосредственно прилегающей к корням, получившей название ризосферы, дополнительным источником питания служат в основном отмирающие клетки эпиблемы с корневыми волосками. На корнях, как правило, преобладают неспоровые палочки рода *Pseudomonas*.

Бактерии в корневой зоне растений, используя корневые выделения, очищают зону корня от продуктов метаболизма растений, выполняя санитарную функцию. Минерализуя органические остатки, они в то же время переводят ряд элементов питания в доступную для растений форму. Отдельные виды бактерий, развивающиеся на корнях, выделяют ростовые вещества и витамины, благоприятно влияя на рост и развитие растений. Встречаются также и фитопатогенные микроорганизмы, вызывающие заболевания растений.

Выполнение работы. Стерильной лопатой подкапывают почву под растениями, стерильным пинцетом извлекают корни. Приставшую к корням почву стряхивают в стерильную чашку Петри, тщательно перемешивают и из нее берут навеску средней пробы в 1 г. Одновременно берут навеску почвы для определения влажности.

Навеску помещают в 99 мл стерильной воды (в колбу) и готовят ряд разведений. Колбу взбалтывают 10 мин и дают 1 мин отстояться, получают разведение 1:100 (в 1 мл воды находится 0,01 г почвы). Готовят четыре пробирки с 9 мл воды в каждой и заранее стерилизуют их в автоклаве. Из колбы пипеткой набирают 1 мл почвенной суспензии и переносят в пробирку № 1, раствор при этом разбавляется в десять раз (разведение 1:1000). Другой пипеткой продувают полученную смесь для равномерного перемешивания, затем набирают 1 мл и переносят в пробирку № 2, получая при этом десятикратное разведение предыдущего раствора (1:10 000). Новой пипеткой сначала продувают полученный почвенный раствор, а потом набирают 1 мл и переносят в пробирку № 3 (разведение 1: 100 000). Затем, поступая аналогично, переносят 1 мл из пробирки № 3 в пробирку № 4 (разведение 1:1 000 000), а из нее набирают градуированной пипеткой и переносят на поверхность МПА в чашке Петри 0,1 мл или 0,05 мл и стеклянным шпателем почвенную суспензию растирают легкими круговыми движениями досуха по поверхности среды, не повреждая ее при этом. Чашки в момент посева только слегка приоткрывают под углом, во избежания посева микробов из воздуха. Посев из каждого разведения желательно проводить хотя бы в две чашки.

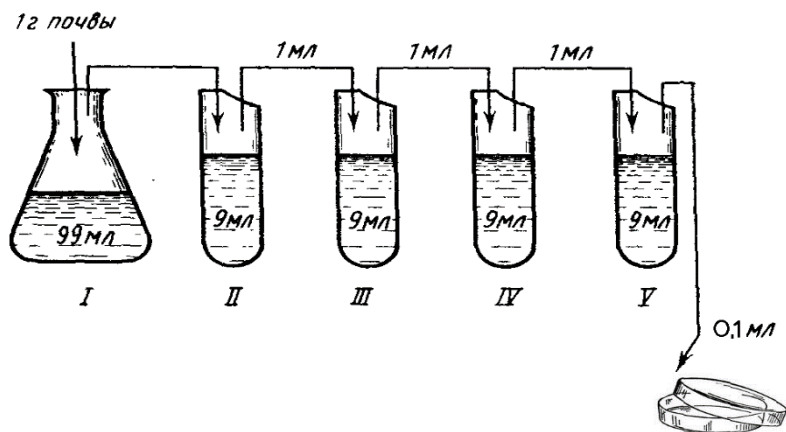


Рисунок 21 – Схема разведения почвы

При глубинном посеве из разведений стерильной пипеткой берут 1мл суспензии и вносят в стерильную чашку Петри, а затем в чашку добавляют соответствующую агаризованную питательную среду.

Чашки Петри с МПА после посева закрывают, оборачивают бумагой, переворачивают вверх дном, чтобы избежать попадания конденсационной воды на поверхность агара, подписывают и помещают в термостат при температуре 28–30 °С.

Количественный учет микроорганизмов в ризосфере. Через неделю после посева подсчитывают число выросших на среде колоний. Для удобства подсчитанные колонии можно отмечать тушью на наружной стороне дна чашки. Для определения числа микроорганизмов в 1 г почвы нужно умножить число колоний на степень разведения.

Определение качественного состава микрофлоры ризосфы. Выбирают наиболее типичные колонии и описывают их культуральные признаки. Готовят из этих колоний препараты-мазки, фиксируют в пламени, окрашивают кристаллвиолетом и рассматривают с помощью иммерсионной системы микроскопа.

Описывают и зарисовывают в тетради морфологические признаки микрофлоры ризосферы. Делают выводы о преобладающих формах микроорганизмов.

Материалы и оборудование: чашки Петри со стерильным мясопептонным агаром, колбы с 99 мл стерильной воды, пробирки с 9 мл воды, простерилизованные в автоклаве (по 4 штуки на стол), стерильные пипетки на 1 мл и шпатели, почва прикорневого слоя, весы, бумага для обертывания чашек, кристаллвиолет.

Контрольные вопросы

1. Почему почве, прилегающей к корню растения, развивается большое количество микроорганизмов ?
2. Что такое микрофлора ризосферы?
3. Какие микроорганизмы преобладают в ризосфере?
4. Как подсчитывают число микроорганизмов в прикорневом слое почвы?

Приложение

Приготовление красителей и индикаторов

Кристаллвиолет (метилловый фиолетовый), **водный раствор**: метилловый фиолетовый кристаллический – 7 г, этиловый спирт 96°-ный – 100 мл, вода дистиллированная – 900 мл. Раствор устойчив.

Фуксин основной, насыщенный спиртовой раствор: фуксин основной кристаллический – 10 г, этиловый спирт 96°-ный – 100 мл. Раствор может храниться долгое время в бутылке из темного стекла.

Фуксин основной карболовый – фуксин Циля: фуксин основной кристаллический – 1 г, карболовая кислота (фенол) – 5 г, этиловый спирт 96°-ный – 10 мл, вода дистиллированная – 100 мл. К спиртовому раствору основного фуксина приливают 5%-ный раствор фенола (воду для его приготовления подогревают до 50°С), добавляют несколько капель глицерина. Настаивают в термостате 48 ч и фильтруют через бумажный фильтр. Раствор устойчив. Хранят в закупоренной таре.

Фуксин Пфейффера: карболовый фуксин Циля – 1 мл, вода дистиллированная – 9 мл. Готовят на срок не более 10 дней.

Фуксин основной, водный раствор: фуксин основной, насыщенный спиртовой раствор – 1 мл, вода дистиллированная – 9 мл. Раствор устойчив.

Метиленовый синий, насыщенный спиртовой раствор: метиленовый синий кристаллический – 10 г, этиловый спирт 96°-ный – 100 мл. Оставляют на 2–3 дня в термостате, периодически встряхивая, а затем фильтруют. Раствор устойчив.

Метиленовый синий, водный раствор: насыщенный спиртовой раствор метиленового синего – 1 мл, вода дистиллированная – 9 мл. Раствор устойчив.

Уксуснокислый синий Нейссера: готовят два раствора.

1. Метиленовый синий кристаллический – 0,1 г, этиловый спирт 96°-ный – 2 мл, уксусная кислота ледяная – 5 мл, вода дистиллированная – 100 мл.

2. Метилловый фиолетовый кристаллический – 0,1 г, этиловый спирт 96°-ный – 1 мл, вода дистиллированная – 30 мл. Перед употреблением смешивают две части первого раствора с одной частью второго. Раствор неустойчив.

Раствор хризоидина: хризоидин кристаллический – 1,0 г, вода дистиллированная горячая – 300 мл. Горячий раствор фильтруют через бумажный фильтр, после охлаждения готов к употреблению.

Эритрозин карболовый: эритрозин кристаллический – 3 г, фенол (карболовая кислота) – 5 г, вода дистиллированная – 100 мл. Карболовую кислоту растворяют в воде, нагретой до 50 °С, добавляют эритрозин, отстаивают и фильтруют через бумажный складчатый фильтр.

Раствор Люголя (для окраски по Граму): йод кристаллический – 1 г, калий йодистый – 2 г, вода дистиллированная – 300 мл. Навеску йода и йодистого калия растирают в ступке пестиком, доливают 1 мл воды и растирают, добавляют еще 5 мл воды, продолжая растирать. Когда кристаллы растворятся, доливают всю оставшуюся порцию воды. Хранят в темной посуде. Срок годности не более 30 дней.

Раствор Люголя (крепкий, для выявления гранулезы): йод кристаллический – 7 г, калий йодистый – 20 г, вода дистиллированная – 100 мл. Раствор готовят так же, как и предыдущий.

Бумажки Синева: нарезают кусочки фильтровальной бумаги размером 2×3 см; готовят 0,5%-ный спиртовой раствор кристаллвиолета; пропитывают бумажки 2–3 раза в этом растворе, высушивают; хранят защищенными от действия света.

Реактив Нesslerа: KJ – 7 г, HgJ₂– 10 г, KOH – 10 г. Готовят два раствора. 1. Навески KJ и HgJ₂ растворяют в 40 мл дистиллированной воды. 2. Навеску KOH растворяют в 40 мл дистиллированной воды. Растворы 1 и 2 смешивают и доводят общий объем до 100 мл. Хранят в темной стеклянной посуде. В продаже имеется готовый реактив Нesslerа.

Цинк-йод-крахмал: 2 г хлористого цинка (ZnCl₂) растворяют в 100 мл дистиллированной воды, нагревают до кипения и приливают растворённый крахмал (0,4 г крахмала в 10 мл воды). Объем смеси доводят водой до 100 мл, кипятят до тех пор, пока она не станет прозрачной, охлаждают (можно настаивать неделю) и добавляют 100 мл 0,2 %-ного раствора йодистого калия (0,2 г KJ в 100 мл воды) или йодистого цинка.

Дифениламин: 1 г дифениламина (C₆H₅-NH-C₆H₅) растворяют в 100 мл крепкой серной кислоты и полученный раствор приливают к 20 мл дистиллированной воды.

Уксуснокислый свинец: 10 г уксуснокислого свинца Pb (CH₃COO)₂ растворяют в 100 мл воды и приливают 10%-ный раствор NaOH (10 г щелочи на 100 мл воды) до исчезновения осадка.

ЛИТЕРАТУРА

1. А в р а м е н к о И. Ф. Микробиология. / И. Ф. Авраменко. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1979. – 176 с.
2. А с о н о в Н.Р. Практикум по микробиологии. / Н. Р.Асонов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1988. – 160 с.
3. Большой практикум по микробиологии. / Т. В. Аристовская [и др.] – М.: Высш. шк., 1962. – 490 с.
4. Е ж о в Г. И. Руководство к практическим занятиям по сельскохозяйственной микробиологии. / Г. И. Ежов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1981. – 271 с.
5. Е м ц е в, В. Т. Микробиология / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Дрофа, 2005. – 445 с.
6. К о л е ш к о О. И. Экология микроорганизмов почвы. / О. И. Колешко. – Мн.: Высш. шк., 1981. – 176 с.
7. К о ч е м а с о в а , З. Н. Санитарная микробиология и вирусология / З. Н. Кочемасова, С. А. Ефремова, А. М. Рыбакова. – М.: Медицина, 1987. – 352 с.
8. М и ш у с т и н, Е. Н. Микробиология / Е. Н. Мишустин, В. Т. Емцев. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1987. – 367 с.
9. Р а з у м о в с к а я З. Г. Лабораторные занятия по почвенной микробиологии. / З. Г. Разумовская, Т. Я. Чижик, Б. В. Громов. – Л.: ЛГУ, 1960. – 184 с.
10. Руководство к практическим занятиям по микробиологии /под ред. Н. С. Егорова. – М.: МГУ, 1995. – 224 с.
11. Сельскохозяйственная микробиология: метод. указания к лабораторным занятиям / сост. О. С. Кильчевская. – Горки: БГСХА, 2006. – 68 с.
12. Т е п п е р, Е. З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М.: Колос, 1993. – 175 с.

У ч е б н о е и з д а н и е

Цыркунова Ольга Александровна
Горновский Андрей Анатольевич
Порхунцова Ольга Анатольевна

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Методические указания по изучению дисциплины

Редактор
Технический редактор
Корректор

Подписано в печать . Формат 60×84¹/₁₆ . Бумага офсетная.
Ризография. Гарнитура «Таймс». Усл. печ. л. . Уч.-изд. л. .
Тираж 75 экз. Заказ .

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».
ЛИ № 02330/0548504 от 16.06.2009.
Ул. Студенческая, 2, 213407, г. Горки.

Отпечатано в УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».
Ул. Мичурина, 5, 213407, г. Горки.