521 группа дисц. Микробиология

Задание для лекции: найти материал по теме, законспектировать

Тема лекции: **Почвенная микромикробиология**

Вопросы:

1. Почвенные микроорганизмы, методы определения их состава и активности;
2. Роль микроорганизмов в почвообразовании и воспроизводстве плодородия почв;
3. Влияние агроприемов на почвенные микроорганизмы.

Задание по лабораторной работе: сделать конспект по указанной теме

**Занятие № 8,9**

**Тема: Определение численности и разнообразия микроорганизмов в почвах различных типов методом посева. Освоение метода выделения чистой культуры**

**Цель занятия:** ознакомиться с методикой посева микрофлоры почвы различных типов, сделать посев, ознакомиться с методикой определения численности микроорганизмов, освоить метод выделения чистой культуры. Формируемые компетенции – владеть методами культивирования микроорганизмов, получения чистых культур, методами микробиологического контроля с/х сырья и продуктов переработки, управлять микробиологической активностью почвы и сельскохозяйственной продукции при хранении и переработке (ПК-5, ПК-12).

**Материалы и оборудование:** термостат, сушильный шкаф, технохимические весы, химические стаканы, стеклянные палочки, разновесы, электроплитка, стерильные пробирки, чашки Петри, колбы на 100 и 50 мл, пипетки на 1 мл, дистиллированная стерильная вода, почва различных типов, питательная среда (МПА).

Взятие средней почвенной пробы и подготовка образца. Среднюю почвенную пробу получают смешиванием отдельных образцов, количество которых зависит от микрорельефа (ровный, волнистый, склон и т.д.) и площади. С площади 100 м2 рекомендуется брать пробу из 3 точек, с более 100 м2 – из пяти, с 1 га и более – из 15. При исследовании пашни пробы берут с глубины всего пахотного слоя, снимая верхний двухсантиметровый слой, при изучении микрофлоры почвенного профиля – по генетическим горизонтам (снизу вверх).

Почвенный образец берут стерильным буром, стерильной лопатой, ножом в заранее приготовленную широкогорлую стерильную банку, закрывающуюся корковой пробкой, обернутой стерильной ватой, либо в стерильные полиэтиленовые, либо пергаментные мешки. На пакеты, банки наклеивают этикетки с указанием места взятия пробы, горизонта и других сведений.

Почвенные образцы анализируют в первые сутки после взятия. Допускается хранение в холодном помещении (холодильнике) в течение 2 дней. Для большей однородности среднего образца, его тщательно перемешивают, вынимают корни растений, различные включения.

**Количественный учет микроорганизмов в почве.** Микроорганизмы в почве распределены неравномерно. Поэтому для их учета в этой среде взятые образцы смешивают в стерильной банке. Из средней пробы 1 г почвы переносят в колбу с 99 мл стерильной водопроводной воды (получается разведение 10-2). Из разведения 10-2 1 мл переносят в пробирку с 9 мл стерильной водопроводной воды (получается разведение 10-3) и т. д. Схема приготовления разведений:

1. 1 г почвы + 99 мл стерильной воды — 10-2.

2. 1 мл разведения 10-2 + 9 мл стерильной воды— 10-3

3. 1 мл разведения 10-3 + 9 мл стерильной воды —10-4.

4. 1 мл разведения 10-4 + 9 мл стерильной воды — 10-5

Из последних разведений по 1 мл вносят в стерильные чашки, после чего заливают по 10-12 мл расплавленного и охлажденного до 45°С МПА, содержимое равномерно распределяют и оставляют на ровной поверхности. Чашки с застывшей средой переворачивают вверх дном и ставят в термостат. Через 3-4 дня подсчитывают выросшие колонии, умножают на разведение и определяют количество живых микроорганизмов в 1 г сырой почвы.

Для пересчета на 1 г абсолютно сухой почвы ее высушивают до постоянной массы, устанавливают влажность и вносят поправку.

**Определение численности микробов в почве методом прямого счета.** Наряду с другими методами число микробов в почве можно определить прямым подсчетом их под микроскопом. Такие методы разработаны С. Н. Виноградским, Д. Г. Звягинцевым и другими исследователями. Метод прямого счета микробов под микроскопом, предложенный С. Н. Виноградским, сводится к следующему. Из средней пробы отвешивают 5 г почвы и вносят в Эрленмейеровскую колбу объемом 250 мл. Почву заливают 50 мл стерильной воды, встряхивают в течение 5 мин, после чего в течение 1 мин отстаивают. Из колбы стерильной пипеткой берут 0,01 мл суспензии и распределяют ее на площади 4 см2 предметного стекла (под стекло кладут очерченный квадрат такой же площади). После подсушивания препарат заливают тонким слоем 0,1%-ного водного раствора агара, вновь подсушивают, фиксируют 96 %-ным этиловым спиртом в течение 10-20 мин и окрашивают 1-2 мин фуксином основным феноловым Циля или другим красителем. Затем краситель сливают и смывают его путем погружения стекла до 5 раз в стакан с водой. Высушивают на воздухе. Количество клеток подсчитывают под иммерсионным объективом микроскопа в 50-100 квадратах окулярной сетки, которую помещают на постоянную металлическую диафрагму между глазной и собирательной линзами окуляра. При объективе Х90 и окуляре XI0 сторона клетки окулярной сетки равна 0,02 мм, а ее площадь 0,0004 мм2.

**Расчет**. При увеличении в 900 раз на площади в 1 см2 вмещается 25·104 квадратов окулярной сетки (1 см2 = 100 мм2, 100 мм2 :0,0004= 25·104 ).

Для определения микробов в 1 г почвы необходимо среднее количество клеток в одном квадрате окулярной сетки умножить еще на 1000, так как в 0,01 мл суспензии содержится 0,001 г почвы. При наличии в квадрате окулярной сетки трех микробных клеток в 1 г почвы их будет 3·109, при наличии пяти - 5·109 и т. д.

**Получение чистых культур.** Чистой культурой микробов называют популяцию микроорганизмов одного вида, полученную из изолированной микробной колонии. Под микробной колонией подразумевается потомство бактерий, возникающее в результате размножения одной микробной клетки. Выделение чистой культуры микробов является обязательным этапом всякого бактериологического исследования. Чистая культура необходима для изучения морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств, по совокупности которых определяется видовая принадлежность исследуемого микроорганизма.

Для выделения чистых культур микробов из материалов, содержащих обильную смешанную микрофлору, предложено много различных методов. Наибольшее распространение получил метод механического разъединения микроорганизмов, находящихся в исследуемом материале, с целью получения изолированных колоний на поверхности или в глубине питательной среды. Очень широко применяются элективные питательные среды, стимулирующие развитие тех микроорганизмов, чистую культуру которых предполагается выделить. Некоторые виды микробов обладают высокой чувствительностью к воздействию определенных факторов внешней среды. Индивидуальная устойчивость микробов к тому или иному фактору была использована для разработки методов выделения чистых культур путем умерщвления сопутствующей микрофлоры. Этим способом производится выделение споровых форм микробов, устойчивых к действию высокой температуры, микобактерий туберкулеза, безразличных к действию концентрированных растворов минеральных кислот. Для выделения бактерий в виде чистых культур известно сравнительно мало методов. Чаще всего это делают путем изолирования отдельных клеток на твердой питательной среде, используя метод посева штрихом.

Из чистой культуры обычно вырастают одинаковые колонии и при микроскопировании выявляются похожие клетки, в частности по размеру и окраске по Граму. Однако возможны исключения, например, колонии, вырастающие из чистой культуры, могут быть гладкие (S) и шероховатые (R). Кроме того, в чистых культурах различных микроорганизмов могут появиться кокковидные клетки, цисты и споры. Наконец, некоторые микроорганизмы проявляют грамвариабельность.

**Задание 1:** законспектировать методику отбора образцов почвы, приготовления почвенной суспензии методом разведения, получение чистой культуры.

**Задание 2:** приготовить почвенные суспензии различных типов почв методом разведения, поставить в термостат, провести подсчет микроорганизмов в почвах различного типа методом прямого счета, данные записать в рабочую тетрадь.

***Контрольные вопросы:***

1. В какой среде – почве, воде, воздухе – наиболее обильно представлены микроорганизмы?

2. Какие методы изучения количественного состава микробов почвы вы знаете?

3. Расскажите технику получения чистой культуры,для чего их выделяют из объектов окружающей среды?

4.Что такое накопительные культуры и как можно выделить накопительные культуры подвижных форм бактерий?