521 группа дисц. Микробиология

Задание для лабораторной работы

**Тема: Знакомство с возбудителями аммонификации и денитрификации, азотфиксации и продуктами их жизнедеятельности.**

**Цель занятия**: ознакомиться с техникой проведения аммонификации, денитрификации, азотфиксации и их возбудителями, методами выявления продуктов их жизнедеятельности, ответить на вопросы теста. Формируемые компетенции – знать микробиологические процессы трансформации различных соединений микроорганизмами, влияние продуктов метаболизма на качество и безопасность сырья, и продукты переработки, управлять микробиологической активностью почвы и сельскохозяйственной продукции при хранении и переработке.

**Материалы и оборудование:** шпатели, цилиндры на 100 мл, колбы Эрленмейера на 100 мл, полоски красной лакмусовой бумажки, вата, белые фарфоровые пластинки с лунками, реактив Несслера, реактив дифениламин в крепкой серной кислоте, цинк-йод-крахмал, 10%-ный р-р серной кислоты, пипетки, микроскопы, среда для аммонификации, питательная среда Гильтая, почва, зафиксированные корни разных бобовых растений с клубеньками, ботанические бритвы.

**Аммонификация**. Микроорганизмы, вызывающие аммонификацию органических веществ, выделяют в окружающую среду протеолитические ферменты, под действием которых эти вещества гидролизуются до аминокислот. Аминокислоты поступают в клетку и в ней дезаминируются с образованием аммиака, органических кислот и других продуктов (сероводород, меркаптан, индол, скатол). Для изучения аммонификации органических веществ в качестве питательной среды используют мясной бульон с добавлением 3% пептона. По 30 мл среды разливают в 4-5 колб Эрленмейера на 100 мл и добавляют по 0,5 чайной ложки почвы. Колбы закрывают ватными пробками. Над средой подвешивают две бумажки – красную лакмусовую, смоченную дистиллированной водой для обнаружения выделяющегося аммиака, и фильтровальную, смоченную щелочным раствором ацетата свинца для выявления сероводорода и меркаптана, закрепляя их между пробками и стенками горлышка колбы. Бумажки не должны касаться среды. Сверху колбы прикрывают пергаментной бумагой.

На 3-5-е сутки инкубации при 28-30º С опыт заканчивают и содержимое колбы анализируют. Для обнаружения возбудителей готовят препарат живых бактерий в раздавленной капле, а также фиксированный и окрашенный. Чаще других в препарате встречаются подвижные клетки Proteus bulgaris, преобладающие на первых стадиях распада белков. Это неспорообразующие, неодинаковой длины палочки. Также на препарате много спорообразующих клеток Bacillus mycoides и Clostridium putrificus.

Bacillus mycoides вызывают аммонификацию белковых веществ в аэробных условиях, а Clostridium putrificus – в анаэробных.

**Качественные реакции** на продукты гнилостного распада белка:

1. ***Проба на аммиак***. Выделяющийся аммиак окрашивает красную лакмусовую бумажку в синий цвет. Накопление аммиака в субстрате устанавливают при помощи реактива Несслера. На фарфоровые пластинки с лунками или в чашки помещают каплю реактива, затем каплю субстрата. При большом количестве аммиака образуется коричневый или буроватый осадок, при небольшом – оранжевая или желтая окраска.
2. ***Проба на сероводород***. Обнаруживают с помощью подвешенной фильтровальной бумажки, смоченной ацетатом свинца [Pb(CH3COO)2]. Бумажка чернеет под действием сероводорода. Если она покрывается серебристым налетом, значит, выделяются и меркаптаны.
3. ***Проба на индол*.** Пользуются реакцией Сальковского или реакцией с парадиметиламидобензальдегидом. В первом случае к 10 мл субстрата добавляют 1 мл 0,2%-ного КNO2 и несколько капель концентрированной серной кислоты. При взаимодействии этих веществ с индолом получается красно-фиолетовое окрашивание. Вторая реакция: к 10 мл субстрата добавляют 5 мл парадиметиламидобензальдегида и 5 мл насыщенного сульфата калия. При наличии индола возникает интенсивно красное окрашивание.

**Денитрификация**. В почве совершается ряд процессов, в результате которых окисленные формы азота (нитраты, нитриты) восстанавливаются в окислы азота или молекулярный азот. Это приводит к существенным потерям из почвы ценных для растений соединений. Суммарно этот процесс выражают уравнением:

С6Н12О6 + 4 NO3 = 6СО2 + 6Н2О +2N2

Восстановление нитратов и нитритов до газообразных азотных соединений происходит в результате процессов прямой и косвенной денитрификации. Под прямой денитрификацией подразумевают биологическое восстановление нитратов, а под косвенной — химическое восстановление нитратов. Прямая, или биологическая, денитрификация, в свою очередь, разделяется на процессы двух типов — ассимиляторную и диссимиляторную денитрификации. При ассимиляторной денитрификации нитраты восстанавливаются до NH3, который служит источником азота для построения клеточных веществ. В процессах диссимиляторной денитрификации нитраты используются в качестве окислителя органических веществ вместо молекулярного кислорода, что обеспечивает микроорганизмы необходимой энергией. Эти энергетические процессы называются процессами нитратного дыхания.

Способностью диссимиляторной денитрификации обладают только специфические аэробные бактерии. Преобладающими родами денитрификаторов в почве являются Pseudomonas, Paracoccus.

Помимо названных мезофильных микроорганизмов, денитрификацию могут вызывать и термофильные бактерии, развивающиеся при температуре 55-65° С. Это спорообразующие бактерии, относящиеся к роду Bacillus.

Денитрифицирующие бактерии используют нитраты, в качестве акцептора водорода при отсутствии О2 для окисления органических веществ. При нитратном дыхании органические вещества полностью окисляются до СО2 и Н2О. Таким образом, денитрификаторы растут аэробно без нитратов или анаэробно в их присутствии. Большинство органических субстратов, использующихся в аэробном окислении, может быть потреблено при отсутствии О2, но с нитратами в среде. Существование денитрификаторов в анаэробных условиях обеспечивают не только нитраты, но и нитриты.

 В зависимости от вида микроорганизма, осуществляющего диссимиляторную денитрификацию нитратов или нитритов, конечными продуктами этих процессов являются N2, N2 O, NO.

Начальный этап восстановления нитратов при диссимиляторной денитрификации катализируется ферментом нитратредуктазой. Образование этого фермента в клетках микроорганизмов происходит под воздействием нитрата только в анаэробных условиях. В присутствии кислорода воздуха синтез нитратредуктазы не происходит.

Для наблюдения процесса денитрификации пользуются средой Гильтая, состоящей из двух растворов:

1 раствор – КNО3 – 2,1 г, аспарагин – 1,0, дистиллированная вода – 250 мл. 2 раствор – лимоннокислый натрий – 5,0 г, КН2РО4 – 2,0, МgSO4 – 2,0, CaCl2 – 2,0, FeCl3 – следы, дистиллированная вода – 500 мл.

Растворы сливают вместе, устанавливают рН 6,8-7,0 и доводят до 1 л.

Постановка опыта: в колбу Эрленмейера наливают немного питательной среды, добавляют 1/3 чайной ложки почвы. Среду перемешивают с почвой для удаления пузырьков воздуха, наполняют колбу питательной средой до края и закрывают каучуковой пробкой, в которую вставлена открытая с двух сторон стеклянная трубка, слабо расширенная в средней части. Пробка вытесняет часть жидкости, которая входит в трубку. В нее над средой наливают вазелиновое масло небольшим слоем, и в колбе создаются анаэробные условия. Отсутствие углеводов исключает процесс брожения. В этих условиях будут развиваться лишь микроорганизмы, способные использовать кислород связанных соединений (в первую очередь нитратов). Колбы со средой и почвой помещают в термостат при температуре 30-35ºС. При постановке опыта устанавливают нахождение в среде нитратов. Для этого к капле дифениламина с серной кислотой, нанесенной на фарфоровую пластинку, добавляют каплю субстрата; капля окрашивается в темно-синий цвет. После 5-6 дней инкубации культуру анализируют: отмечают появление пузырьков газа (СО2 и N2) под пробкой. Наблюдается позеленение питательной среды, что указывает на появление в ней Pseudomonas fluorescens или Pseudomonas pyocyanea. Pseudomonas pyocyanea чаще всего развиваются на среде с лимонной кислотой. На среде с сегнетовой солью развивается Bact. Stutzeri.

Для проведения **качественных реакций** проводят пробу на нитраты (NО3) с дифениламином и нитриты (NО2) с цинк-йод-крахмалом в кислой среде, а затем на аммиак с реактивом Несслера. После 6 дней инкубации реакции на нитраты и нитриты бывают отрицательными. Часть нитратов восстанавливается до аммиака, основная же масса азота нитратов восстанавливается до молекулярного азота, о чем свидетельствует обильное образование газов (СО2 и N2).

**Азотфиксация** - связывание (ассимиляция) молекулярного азота атмосферы и перевод его в азотистые соединения. Биологическая азотфиксация осуществляется клубеньковыми бактериями, живущими в симбиозе с высшими растениями (симбиотическая азотфиксация), а также свободноживущими азотфиксаторами - азотобактером, цианобактериями, спириллами, энтеробактериями, микобактериями (несимбиотическая азотфиксация). Азотфиксация играет важную роль в круговороте азота в природе и обогащении почвы и водоемов связанным азотом (симбиотическая азотфиксация ежегодно может обогащать 1 га почвы на 200-300 кг азота, несимбиотическая - на 15-30 кг).

***Клубеньковые бактерии***. Их можно просматривать непосредственно в ткани клубеньков люпина, гороха, вики, фасоли и др. Острой ботанической бритвой готовят очень тонкий продольный или поперечный срез клубенька, затем в раздавленной капле на предметном стекле наблюдают под микроскопом при разных увеличениях и с помощью иммерсионной системы объектива. Для точной зарисовки их внешней формы и определения стадии развития готовят фиксированный и окрашенный фуксином препарат. Разрезают клубенек на две части, и место разреза многократно прокалывают стерильной препаровальной иглой, вызывая возможно большее механическое разрушение клеток клубенька. Из механически поврежденного клубенька отжимают каплю жидкости на предметное стекло и, разбавив ее каплей дистиллированной воды, готовят окрашенный препарат. В препарате обнаруживают разных размеров и форм, в том числе и ветвистых форм, бактероиды клубеньковых бактерий – Bact. Radicicola.

***Свободноживущие азотфиксирующие бактерии***. Из них наибольший интерес представляют Azotobacter и бактерии рода Clostridium. Clostridium pasteurianum фиксирует азот из атмосферы в анаэробных условиях. Энергию для этого клетки получают за счет маслянокислого брожения*.*

Постановка опыта: для выявления анаэробных азотфиксаторов используют безазотную среду С.Н.Виноградского: глюкоза – 20,0 г, К2НРО4 – 1,0 г, MgSO4 – 0,5, NaCl – 0,5, дистиллированная вода – 1000 мл. В колбу Эрленмейера (100-150 мл) наливают на 2/3 колбы питательную среду, добавляют четверть чайной ложки мела. Для заражения в среду вносят 1/2 чайной ложки почвы, колбы ставят в термостат при 25-30ºС. Через несколько дней поверхность жидкости покрывается пленкой аэробных бактерий, а на дне колбы начинается маслянокислое брожение с выделением газа.

***Анализ*** проводят после 5-6 дней инкубации. Clostridium pasteurianum обычно находится в осадке мела и почвы. Для его обнаружения содержимое колбы хорошо размешивают и дают осесть грубым частицам. Затем из середины субстрата пипеткой берут немного среды и каплю наносят на предметное стекло. К ней добавляют каплю йода в йодистом калии (J:KJ=1:2), накрывают покровным стеклом и микроскопируют под иммерсией. Клетки Clostridium pasteurianum содержат в цитоплазме гранулезу (полисахарид, близкий к крахмалу), которая от раствора J в KJ приобретает синий цвет. Среди них преобладают веретенообразные формы с продолговатыми спорами.

**Реакция на масляную кислоту**: в пробирку прилить 5 мл субстрата, добавить 2 мл хлорного железа, нагреть до кипения. Образующийся раствор маслянокислого железа имеет кроваво-красный цвет.

***Azotobacter***. Для выявления его в почве, опыт проводят на гелевых пластинах. Их отмывают от хлора и пропитывают 3-5 мл питательной среды следующего состава: манит или тростниковый сахар – 20,0 г, К2НРО4 – 1,0 г, MgSO4 – 0,5, NaCl – 0,5, Fe SO4 – 0,01, MnSO4 – 0,01, CaCO3 – 5,0 г, дистиллированная вода – 200 мл; смесь микроэлементов: H3BO3 – 5 г, (NH4)2MoO4 5 г, KJ – 0,5 г, NaBr – 0,5 г, ZnSO4 – 0,2 г, Al2(SO4)3 – 0,3 г, дистиллированная вода – 1000 мл. Смесь упаривают до исчезновения избыточной влаги, затем на поверхность геля раскладывают по трафарету 50 комочков почвы. Чашки помещают во влажную камеру в термостат при 28-30ºС. На 6-7 сутки инкубации комочки почвы обрастают слизистыми колониями азотобактера.

Если комочки почвы обрастают колониями Azotobacter chroococcum, то они со временем приобретают бурую окраску. Azotobacter agile и Azotobacter vinelandii создают колонии, которые вызывают заметную флюоресценцию среды. Azotobacter beijerinckii – колонии слизистые, бесцветные, их можно обнаружить в красноземах.

Для ознакомления с возбудителями аэробной фиксации из колоний готовят окрашенные препараты и просматривают под иммерсией. Клетки азотобактера шаровидные, чаще встречаются диплококки.

**Задание 1:** законспектировать технику проведения аммонификации, денитрификации, азотфиксации, характеристику их возбудителей, методы выявления продуктов их жизнедеятельности.

***Контрольные вопросы:***

1. Расскажите, в чем сущность аммонификации, какие качественные реакции на продукты аммонификации можно проделать?
2. Какие типы денитрификации вы знаете, в чем сущность процесса, какими микроорганизмами вызывается?
3. Что такое азотфиксация, какова роль в круговороте азота, какими микроорганизмами вызывается?