

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
"КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"  
ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ  
КАФЕДРА ПРИКЛАДНОЙ ЭКОЛОГИИ

С.Ю. СЕЛИВАНОВСКАЯ, Л.Г. АХМЕТЗЯНОВА, Н.В. ДАНИЛОВА,  
Л.Р. БИКТАШЕВА

## ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

(Учебно-методическое пособие к курсу  
"Экология растений, животных, микроорганизмов")

Учебно-методическое пособие

КАЗАНЬ

2023

УДК 504.06  
ББК 20.18

*Принято на заседании учебно-методической комиссии ИЭИП  
Протокол № 2 от 23 марта 2023 года*

**Рецензент:**

д.б.н., проф. Степанова Н.Ю. (Казанский  
Приволжский федеральный университет)

**Селивановская С.Ю., Ахметзянова Л.Г., Данилова Н.В.,  
Бикташева Л.Р.**

**Экология микроорганизмов: учебно-методическое пособие /**  
С.Ю.Селивановская, Л.Г.Ахметзянова, Н.В. Данилова, Бикташева Л.Р.  
– Казань, 2023. – 43 с.

Учебно-методическое пособие предназначено для изучения дисциплины «Экология организмов: растений, животных микроорганизмов». Пособие посвящено вопросам анализа распространения микроорганизмов в природных средах обитания и их роли в круговоротах веществ. Пособие предназначено для бакалавров, обучающихся по направлениям «Экология и природопользование» и «Почвоведение», а также может представлять интерес для обучающихся на смежных специальностях.

© Селивановская С.Ю., 2023  
© Ахметзянова Л.Г., 2023  
© Данилова Н.В., 2023  
© Бикташева Л.Р., 2023  
© Казанский (Приволжский)  
федеральный университет, 2023

## Содержание

|  |    |
|--|----|
| ПРЕДМЕТ И МЕСТО ЭКОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ В СИСТЕМЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ДИСЦИПЛИН.....          | 4  |
| Основные направления экологического изучения микроорганизмов.....                        | 5  |
| Техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории.....                    | 8  |
| Общие сведения о работе с микроорганизмами.....  | 9  |
| <i>Питательные среды</i> .....   | 9  |
| <i>Методы стерилизации</i> .....   | 10 |
| <i>Культивирование микроорганизмов</i> .....   | 11 |
| <i>Техника посева</i> .....  | 12 |
| <i>Методы приготовления препаратов микроорганизмов</i> .....                             | 13 |
| МИКРООРГАНИЗМЫ В ПРИРОДНЫХ СРЕДАХ .....  | 15 |
| Учет численности микроорганизмов в почве .....   | 15 |
| Учет численности микроорганизмов в воде и других жидкостях .....                         | 18 |
| Учет численности микроорганизмов в воздухе.....  | 18 |
| Идентификация микроорганизмов.....   | 19 |
| Культуральные признаки.....  | 19 |
| Морфологические признаки .....   | 21 |
| Определение качественного состава микроскопических грибов .....                          | 26 |
| УЧАСТИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В КРУГОВОРОТЕ ВЕЩЕСТВ В ПРИРОДЕ .....                            | 31 |
| Микроорганизмы, разрушающие клетчатку (окисление целлюлозы) .....                        | 31 |
| Свободноживущие азотфиксирующие бактерии .....   | 32 |
| Лабораторная работа №1. Бактерии в почве.....  | 34 |
| Лабораторная работа №2. Микроскопические грибы в почве .....                             | 35 |
| Лабораторная работа №3. Бактерии в воздухе .....   | 36 |
| Лабораторная работа №4. Азотфиксирующие микроорганизмы в почве.....                      | 37 |
| Лабораторная работа №5. Микроорганизмы, разрушающие клетчатку (окисление целлюлозы)..... | 38 |
| Приложение 1. Питательные среды для культивирования микроорганизмов .....                | 39 |
| Приложение 2. Определение влажности почвы .....  | 40 |
| Приложение 3. Пример оформления протокола.....   | 41 |

## ПРЕДМЕТ И МЕСТО ЭКОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ В СИСТЕМЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ДИСЦИПЛИН

Экология изучает закономерности влияния всего многообразия факторов естественной среды обитания на популяции, составляющие их отдельные организмы, сообщества и их эволюцию (изменчивость под влиянием условий среды, появление мутантов, действие естественного отбора) и механизмы приспособления организмов к среде. В задачу экологии входит также изучение внутривидовых и межвидовых взаимоотношений организмов и особенностей пищевых цепей в экосистемах. Важной проблемой экологии является выяснение биоэнергетики экосистем и круговоротов элементов в них.

Экология микроорганизмов является наукой, которая специальным образом изучает взаимоотношения между микроорганизмами и их биотическим или абиотическим окружением.

В настоящее время в экологии выделяется две области – макроэкология, включающая экологию растений и животных и экология микроорганизмов. Одной из причин исторического разделения макро- и микроэкологии являются значительные различия в методологическом аппарате этих двух частей одной науки.

Макроэкологи используют полевые наблюдения и количественные оценки состава и разнообразия видов в качестве основного методического подхода. Лабораторные исследования лишь помогают им обрабатывать данные и позволяют проводить некоторые химические анализы.

Напротив, эколог-микробиолог помимо сбора образцов для анализа мало что может сделать в поле. Основную работу он проводит в лаборатории. Фундаментальным подходом к изучению экологии высших растений и животных являются количественные наблюдения за развитием отдельных популяций в различных условиях среды. За более чем 100 лет наблюдений экологи растений и животных приобрели ценный опыт, который позволяет предсказывать появление и направление развития отдельных популяций растений и животных в зависимости от смены условий существования. Были построены модели развития той или иной популяции и взаимоотношений между популяциями.

Знания же о микробных сообществах пока крайне малочисленны как в отношении описания систем, так и в плане предсказания их развития.

В настоящее время исследователи, занимающиеся проблемами экологии микроорганизмов, доказали, что среда обитания последних охватывает широкие зоны биосферы, часто с экстремальными условиями обитания, где не могут развиваться ни растения, ни животные. Микроорганизмы найдены в самых глубоких слоях океана, где рядом с подводными термальными источниками они формируют новые оазисы жизни, не основанной на первичной фототрофной продукции органического вещества, а полностью зависящей от образования органического вещества в результате деятельности хемолитотрофных организмов. В толще скальных пород на глубинах 4-6 км микроорганизмы осуществляют «водородный» и «метановый» циклы.

Микроорганизмы обнаружены высоко в горах, вплоть до высоты 8 км, а также внутри метеоритных остатков.

Предпосылки для возникновения экологии микроорганизмов были созданы идеями Л. Пастера о большом значении «бесконечно малых» организмов и исследованиями В.И. Вернадского, показавшего громадные размеры биогеохимических превращений, осуществляемых микроорганизмами в природе. Огромную роль в создании и развитии экологического направления в микробиологии сыграл С.Н. Виноградский. Он не только поставил вопрос о необходимости изучения микроорганизмов в условиях, близких к естественной среде жизни, но и разработал методические подходы к экологическому исследованию микроорганизмов и постоянно призывал к развитию разнообразных методов изучения микроорганизмов в природе.

Обозначим лишь основные направления экологического изучения микроорганизмов.

### **Основные направления экологического изучения микроорганизмов**

Одним из важнейших направлений является наблюдение за жизнедеятельностью микроорганизмов в естественной среде обитания.

Микроорганизмы часто рассматриваются в качестве первых обитателей Земли. Впервые за живыми микроорганизмами в микроскоп наблюдал А. Левенгук. Именно Левенгук обнаружил микроорганизмы в каплях дождевой воды (их естественное местообитание) и выявил действие перца на микробы (влияние окружающей среды). В конце XIX – начале XX веков С.Н. Виноградский и М. Бейеринк разработали принцип элективных культур, что можно определить как дату рождения науки, которую впоследствии стали называть «экология микроорганизмов».

Микроорганизмы продемонстрировали огромное разнообразие форм и мест заселений. За последние десятилетия стало очевидно, что из конкретных выделяются определенные микроорганизмы с определенными функциями. Тот факт, что в пробах, взятых в природе, почти никогда не находят микроорганизмы в виде чистых культур, позволяет сделать вывод о взаимодействии микробных популяций друг с другом и микроокружением, с его быстро меняющимися физико-химическими параметрами. Важным и перспективным в научном и практическом отношении является изучение структуры и функционирования комплексов микроорганизмов в рамках которого развиваются представления о таких классических экологических понятиях как сукцессия и гомеостаз. К сожалению, даже существующие современные методы все еще не дают достаточной возможности экологам-микробиологам реально оценить численность, биомассу микроорганизмов и наблюдать за развитием микроорганизмов в их микроокружении. С приходом методов молекулярной микробиологии стало возможным находить новые

формы микроорганизмов, которые невозможно было выделить в чистые культуры или культивировать в лабораторных условиях. Оказалось, что количество микроорганизмов, выделенных в чистую культуру, ничтожно мало и составляет лишь 0,1% от общего количества. Некоторые ученые предполагают, что при существующей скорости описания новых видов все растения и животные будут описаны через 50 лет, а на описание всех микроорганизмов потребуется 10000 лет.

Важной задачей экологии микроорганизмов является изучение эколого-географических закономерностей распределения микроорганизмов в почвах, морях и океанах.

Одну из центральных проблем экологии микроорганизмов составляет изучение биогеохимических процессов, осуществляемых микроорганизмами в биосфере. Сюда включается исследование круговоротов элементов и биоэнергетики экосистем – использование потока солнечной энергии для фотосинтеза, энергии окисления неорганических (хемосинтез) и органических (дыхание и брожение) соединений.

Впервые вопрос о громадных размерах биогеохимической деятельности микроорганизмов был поставлен В.И. Вернадским. Он сформулировал основные понятия биогенной миграции химических элементов в биосфере. По современным представлениям, биогеохимические процессы, протекающие в экосистемах с помощью микроорганизмов, можно разделить на несколько широких категорий.

1. Минерализация - превращение органических соединений в неорганические, ведущая к упрощению биохимического состава экосистем.

2. Превращение неорганических элементов питания в органический протоплазматический комплекс микробной клетки.

3. Окисление, являющееся одним из источников энергии в экосистемах. Хемоавтографы (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Thiobacillus*, *Ferrobacillus*, *Hydrogenomonas*) получают энергию при окислении аммония, нитрита, серы, сероводорода, металлических сульфидов, закиси железа, водорода, гетеротрофы - при окислении органических веществ. Наблюдается также окисление неорганических соединений экосистемы продуктами метаболизма микроорганизмов.

4. Восстановление, которое может быть связано с энергетическим метаболизмом клетки, так как при этом акцептируется электрон от окисляемого субстрата. При снижении  $eH$  за счет микробиологического потребления кислорода в экосистеме также создаются восстановительные условия, при которых может осуществляться редукция многих элементов ( $Fe_3^+$  в  $Fe_2^+$ ,  $Mn_4^+$  в  $Mn_2^+$  и т.д.). Органические и неорганические кислоты, образуемые гетеротрофными и фотосинтезирующими микроорганизмами, могут вызывать огромные биохимические превращения - растворять фосфаты, силикаты, разрушать глинистые минералы и горные породы, участвуя, таким образом, в первичном почвообразовании. В почвах под действием кислот изменяется доступность элементов микроорганизмам и растениям.

5. Фиксация или превращение газовой формы элемента в негазовую. К этой категории биогеохимических превращений в экосистемах относятся такие процессы, как фотосинтез, биологическая фиксация азота, окисление сероводорода.

6. Формирование геологических отложений. С биогеохимической деятельностью микроорганизмов связано образование серных, сульфидных, марганцевых, железных руд, известняков, угля, нефти, торфа и других каустобиолитов.

7. Выделение органических хелатообразующих или комплексирующих соединений, которые растворяют относительно нерастворимые неорганические вещества или удерживают различные компоненты в растворимой форме. В частности, таким путем растворяются и предохраняются от осаждения многие металлические ионы (Fe, Ca, Mn, Zn, Mg, Co, Cu и др.), что создает условия для их вертикальной и горизонтальной миграции.

8. Отложение на поверхности клеток микробов неорганических веществ (например, железа и марганца), широко распространенное в природе и причиняющее человеку значительный ущерб (засорение труб водопроводной сети).

9. Фракционирование изотопов. Микроорганизмы обладают способностью использовать более легкий изотоп из смеси природных изотопов. Это явление служит веским доказательством биогенной природы некоторых химических процессов, протекающих в биосфере, например, микробиологического происхождения серных месторождений, обогащенных легким изотопом серы  $S_{32}$ .

Таким образом, все химические элементы и природные соединения биосферы подвергаются микробиологическим превращениям.

Важной экологической проблемой является выяснение закономерностей адаптации микроорганизмов к различным факторам естественной среды обитания. Данное направление изучает приспособительные изменения микроорганизмов под влиянием измененных условий среды, помогающие им выжить в этих условиях. Особый интерес представляет изучение адаптивных реакций микроорганизмов в экосистемах с экстремальными условиями, находящихся вблизи лимитов биологического выживания (соленые и щелочные озера, воды рудников, горячие источники, компосты, подвергающиеся разложению при высокой температуре, ледники и т. д.). В этих стрессовых условиях могут выживать только организмы, приспособленные к ним. В таких экосистемах часто доминирует лишь один тип микроорганизмов, что приводит к формированию в экстремальных условиях моноспецифического сообщества, занимающего определенную экологическую нишу. Таким образом, адаптация является важным экологическим признаком, регулирующим состав ценозов в экосистемах с экстремальными условиями и обеспечивающим эволюционный процесс в этих условиях.

В рамках экологии микроорганизмов активно развиваются в настоящее время исследования, посвященные изучению особенностей экологической стратегии микроорганизмов во взаимоотношениях с микроорганизмами, животными и растениями.

Важнейшими проблемами экологии микроорганизмов является познание закономерностей развития природных микробных ассоциаций с целью широкого их использования для нужд сельского хозяйства, очистки окружающей среды от антропогенного загрязнения, мониторинговых исследований. Развитие экологических биотехнологий с использованием микроорганизмов является одним из перспективных направлений экологии микроорганизмов.

Согласно мнению многих ученых, не вызывает сомнений, что в будущем экология микроорганизмов интегрируется в общую экологию, несмотря на некоторое разделение в настоящий момент макро- и микроэкологии.

### **Техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории**

Не входить в лабораторию в пальто, головном уборе, не вносить посторонние вещи.

Приступать к занятиям, только надев хлопчатобумажный халат.

Строго соблюдать правила обращения с химическими реактивами и красителями.

С большой осторожностью пользоваться смесью спирта с эфиром, не переносить ее на столы с горелками.

Поскольку некоторые микроорганизмы, особенно споры грибов, являются аллергенами, не допускать их распыления - не оставлять открытыми чашки Петри, пробирки, колбы с культурами микроорганизмов.

Перед тем как набирать ртом с помощью пипетки суспензии микроорганизмов или реактивы, убедиться в том, что пипетка закрыта с тупого конца ватой.

В лаборатории поддерживать порядок и чистоту.

По окончании занятий протирать иммерсионный объектив микроскопа мягкой тканью, накрывать микроскоп полиэтиленовым чехлом, приводить в порядок рабочее место, мыть руки.

Помнить о том, что студенты несут ответственность за используемые ими микроскопы, другое лабораторное оборудование, чистоту рабочего места.

Перед уходом из лаборатории дежурному проверять, выключены ли газ, вода, электроприборы.



## Общие сведения о работе с микроорганизмами

### *Питательные среды*

Одной из основных задач экологии микроорганизмов является выявление численности и разнообразия микроорганизмов в объекте исследования. Численность микроорганизмов выражается в колониеобразующих единицах (КОЕ). Выделение и учет численности микроорганизмов производят при их выращивании на различных питательных средах. Однако универсальной среды, на которой выделялись бы все существующие в конкретном объекте микроорганизмы, нет. Относительно универсальная среда на основе мясного бульона была предложена немецким ученым Р. Кохом. На ней хорошо развиваются микроорганизмы, использующие органические азотсодержащие соединения.

Для анализа определенных групп микроорганизмов в практику микробиологии С.Н. Виноградским были введены элективные, или избирательные, среды. Они составлены в расчете на предельно строгие условия, при которых должен развиваться только избранный микроорганизм и никакой другой. Основным принцип элективных сред – учет избирательных потребностей микроорганизма в специфических условиях развития. Зная физиологические особенности соответствующей группы микроорганизмов, можно подобрать не только химический состав среды, но и такие условия культивирования (активную кислотность среды, условия аэрации, температуру и т.д.), при которых создается лабораторная имитация экологической ниши естественных условий обитания. Примером элективных сред могут служить среды для азотфиксаторов, нитрификаторов. Эти среды применяют в основном для выделения микроорганизмов из природных сред обитания и получения их накопительных культур. Для культивирования избранных микроорганизмов используют также оптимальные среды. Основным принцип оптимальных сред заключается в создании наиболее благоприятных условий внесением в среду различных стимулирующих рост добавок (витаминов, микроэлементов, ростовых веществ).

По составу питательные среды подразделяются на естественные (натуральные) и синтетические.

Естественными называют среды, состоящие из продуктов животного или растительного происхождения и имеющие сложный неопределенный химический состав. Это - различные части растений, животные ткани, солод, дрожжи, навоз, почва, вода морей, озер, минеральных источников. Их используют в качестве экстрактов или настоев. На естественных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, так как в них есть все компоненты, необходимые для роста. В то же время эти среды мало пригодны для изучения физиологии обмена веществ у микроорганизмов, так как неопределенность их состава не позволяет учесть потребление компонентов

среды и накопление продуктов обмена. Естественные среды используют главным образом для поддержания культур микроорганизмов, накопления их биомассы и диагностических целей.

Синтетические – это такие среды, в состав которых входят известные химически чистые соединения в строго указанных концентрациях. Синтетические среды бывают простыми и сложными по составу. Именно эти среды используют для исследований, посвященных изучению обмена веществ у микроорганизмов.

Кроме этого, существуют и полусинтетические среды, относящиеся к средам с неопределенным составом. В них наряду с соединениями известной химической природы входят вещества неопределенного состава. Например, в среду с мясным бульоном могут входить пептон, глюкоза или сахароза, поваренная соль, фосфат калия и т.д.

Питательные среды могут быть различной консистенции – плотные, жидкие и полужидкие.

Плотные питательные среды готовят из жидких сред, добавляя 1,2-2% агара или 10-15% желатины. При приготовлении полужидких сред вносят 0,1-0,2% агара.

Агар – это растительный коллоид, получаемый из некоторых морских водорослей. В его состав входят в основном полисахариды, а также ничтожно малое количество азотистых веществ. Большинство микроорганизмов не используют его в качестве субстрата питания, и поэтому агар удобен как инертный уплотнитель среды. Температура плавления агара – 100<sup>0</sup>С, затвердевания - 40<sup>0</sup>С.

Желатина - кислый азотсодержащий продукт, добываемый при выварке костей, хрящей, сухожилий, чешуи рыб. Температура плавления желатины (22-25<sup>0</sup>С) ниже температуры культивирования большинства микроорганизмов, что ограничивает ее применение в качестве уплотняющего средства.

Плотными питательными средами служат также гелевые пластины. Прописи приготовления некоторых питательных сред представлены в Приложении 1.

### ***Методы стерилизации***

Стерилизация – это полное уничтожение клеток микроорганизмов в питательных средах, посуде и т.д. Известно несколько методов стерилизации, остановимся на наиболее распространенных. Чаще всего применяют стерилизацию нагреванием.

Фламбуирование или прокаливание. Применяют для стерилизации платиновых петель, игл, шпателей, ножниц, ланцетов, пинцетов непосредственно перед их использованием.

Стерилизация сухим жаром. Применяют для обработки посуды и сухих материалов, например, крахмала, мела. Стерилизуемый объект выдерживают при температуре 170<sup>0</sup>С в течение 2 часов (считая с момента установления необходимой температуры) в печи Пастера или электросушильных шкафах.

Не рекомендуется поднимать температуру выше 170<sup>0</sup>С, так как ватные пробки и бумага начинают разрушаться (буреют, становятся ломкими).

Перед стерилизацией стеклянную посуду закрывают ватными пробками и обертывают бумагой. Чашки Петри, пробирки, пипетки, вату, марлю заворачивают в бумагу или помещают в особые футляры и пеналы, в которых стерильная посуда может храниться после стерилизации.

Стерилизация насыщенным паром под давлением. Наиболее быстрый и надежный способ стерилизации, при котором гибнут самые устойчивые споры. С его помощью стерилизуют большинство питательных сред, посуду. Обработку насыщенным паром проводят в герметически закрывающемся толстостенном котле – автоклаве. Надежная стерилизация достигается нагреванием при 120<sup>0</sup>С и давлении 1 атм. в течение 20 мин.

Пастеризация. Представляет собой неполную, или частичную, стерилизацию, что означает нагревание при 65-80<sup>0</sup>С в течение соответственно 30-10 минут с последующим быстрым охлаждением. Прием предложен для уничтожения неспорообразующих бактерий в продуктах, чьи свойства ухудшаются при кипячении, например, молоко, пиво, вино и т.д.

Холодная стерилизация (фильтрование через мелкопористые фильтры). Применяют для стерилизации сред, компоненты которых легко разлагаются при нагревании. Через мелкие поры фильтра проходят только ультрамикрорганйзмы – вирусы, бактериофаги.

### ***Культивирование микроорганизмов***

Выращивание микроорганизмов на питательных средах называют культивированием, а развившиеся микроорганизмы – культурой. При развитии в жидких средах культуры образуют суспензию, осадок или пленку. При развитии на твердой среде – колонии. Культура может быть чистой – содержать потомство клетки только одного вида - или смешанной – в которой присутствует несколько видов микроорганизмов. В том случае, если культура состоит преимущественно из клеток одного вида, она называется накопительной.

Внесение клеток микроорганизмов или какого-либо исследуемого материала (образца почвы, пробы воды) в стерильную питательную среду для получения чистой или накопительной культуры называют посевом. Перенесение уже выращенных клеток из одной среды в другую (стерильную) называют пересевом, или пассированием.

Микроорганизмы выращивают при определенной постоянной температуре в термостатах или термостатируемых комнатах. Культивирование при определенной температуре называется инкубацией или инкубированием.

Выращивают микроорганизмы в стеклянной посуде – пробирках, колбах или чашках Петри. В пробирках микроорганизмы культивируют как в жидких, так и на плотных средах.

Жидкой средой для аэробных микроорганизмов заполняют обычно 1/3 пробирки, для анаэробных – 2/3. Если плотная среда в пробирках предназначена для последующего выращивания микроорганизмов, при

подготовке к стерилизации ее наливают на 1/3-1/4 объема пробирок. После стерилизации пробирки с еще не застывшей средой раскладывают на поверхности стола в наклонном положении для получения скошенной поверхности агара. Это так называемые косяки – косые или скошенные среды. Плотная среда, застывшая при вертикальном положении пробирки, называется столбиком. Столбики питательной среды используют для хранения культуры.

При культивировании микроорганизмов в колбах используют только жидкие среды. Для аэробных микроорганизмов среду наливают тонким слоем (например, 30 мл в колбы Эрленмейера на 100 мл), для анаэробных микроорганизмов колбу заполняют на 2/3 объема.

В чашках Петри микроорганизмы культивируют только на твердых средах.

### ***Техника посева***

Посев (или пересев) всегда производят вблизи горелки. При посеве клеток микроорганизмов из пробирки в пробирку пробирки должны находиться в наклонном положении, гарантирующем стерильность посева. При вертикальном расположении пробирок возможно попадание из воздуха посторонних клеток микроорганизмов. Непосредственно перед посевом бактериологическая петля (игла) должна быть простерилизована в пламени горелки.

Посев штрихом. При высеве в плотную скошенную среду (на косяк) бактериологической петлей с культурой легким движением, не повреждая поверхности среды, проводят прямую или волнообразную черту по ее поверхности.

Посев уколом. При посеве в столбик питательной среды иглу вводят в толщу ее центральной части.

При посеве в жидкую среду переносят культуру петлей, слегка наклоняя пробирки, чтобы избежать смачивания пробок и краев пробирок.

При посеве культуры микроорганизмов на чашки Петри можно осуществлять глубокий и поверхностный посевы. Последний является более сложным, поэтому для подсчета численности бактерий методом питательных пластин можно ограничиться глубинным посевом, а поверхностный использовать при учете численности различных физиологических групп микроорганизмов или идентификации микроорганизмов.

В случае глубинного посева берут стерильной пипеткой 1 мл клеточной суспензии и переносят в чашки Петри. Затем в чашки Петри вливают расплавленную среду в количестве 20 мл на чашку. Температура среды должна быть примерно 45<sup>0</sup>С. Ее определяют, прикладывая пробирку с расплавленной средой к щеке: если щеке не горячо – среду можно выливать в чашку Петри. Среду перемешивают с микробной суспензией осторожными круговыми движениями. Чашкам дают застыть, переворачивают вверх дном, чтобы избежать попадания на поверхность среды конденсата с крышки, и помещают в термостат.

При поверхностном посеве в стерильные чашки Петри предварительно разливают по 20 мл растопленной питательной среды и дают застыть. Желательно разливать среды за сутки до проведения посева и выдержать чашки Петри со средой в термостате при температуре 30-40<sup>0</sup>С для того, чтобы поверхность среды подсохла. Суспензию микроорганизмов в количестве 0,05 мл стерильной пипеткой помещают на поверхность агаровой пластины и затем осторожно растирают стеклянным шпателем Дригальского по поверхности среды. Приоткрытую чашку Петри держат в вертикальном положении около пламени горелки. Шпатель непосредственно перед посевом стерилизуют фламбированием.

### ***Методы приготовления препаратов микроорганизмов***

Для изучения морфологии микроорганизмов готовят препараты и просматривают их под микроскопом.

Исследование живых микроорганизмов осуществляют методами раздавленной и висячей капли. В обоих случаях окрашивание объекта проводят прижизненными красителями - так называемая витальная окраска. Прижизненными красителями могут служить метиленовый синий, нейтральный красный в концентрациях от 0,001 до 0,0001%.

В случае использования метода раздавленной капли на чистое предметное стекло наносят каплю водопроводной воды. В нее вносят культуру и смешивают с водой. Накрывают каплю покровным стеклом так, чтобы под ним не образовывались пузырьки воздуха. Избыток воды удаляют фильтровальной бумагой, поднося ее к краям покровного стекла.

Для метода висячей капли требуется специальное предметное стекло с лункой посередине. На стерильное покровное стекло наносят иглой негустую суспензию микроорганизмов, выросших в жидкой питательной среде или заранее подготовленных для этой цели. Так, при выращивании на плотных средах микроорганизмы предварительно разводят в физиологическом растворе (0,5% NaCl). Покровное стекло переворачивают и помещают на стерильное предметное стекло с лункой так, чтобы капля свободно свисала в лунку.

Фиксированные препараты. Под фиксацией подразумевается такая обработка живого объекта, которая дает возможность быстро прервать течение жизненных процессов в объекте, сохранив его тонкую структуру. В результате фиксации клетки прочно прикрепляются к стеклу и лучше прокрашиваются. Фиксация обязательна при работе с патогенными микроорганизмами.

Приготовление фиксированного препарата. На чистое обезжиренное предметное стекло наносят каплю водопроводной воды. Для обезжиривания стекла используют этиловый спирт и серный эфира в соотношении 1:1. Прокаленной бактериологической петлей из пробирки с культурой или с поверхности среды из чашки Петри берут небольшое количество микробной массы и вносят в каплю воды. Каплю тщательно размазывают петлей по стеклу на поверхности около 4 см<sup>2</sup>. Затем мазок сушат на воздухе при комнатной

температуре. Высушенный препарат фиксируют. Для этого стекло три-четыре раза медленно проводят нижней стороной над пламенем горелки. Зафиксированный препарат окрашивают. При окрашивании мазка препарат помещают в препаратодержатель. На мазок наносят несколько капель красителя. По окончании окрашивания препарат промывают водой, фильтровальной бумагой удаляют воду, подсушивают на воздухе и микроскопируют.

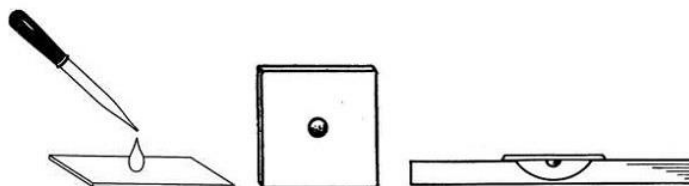


Рис. 1. Метод висячей капли.

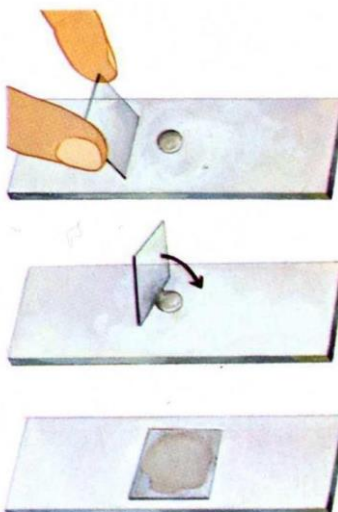


Рис. 2. Метод раздавленной капли.

Существуют простые и дифференцированные методы окраски. При простой окраске используют какой-либо один краситель, например, метиленовый синий, фуксин, генциан фиолетовый. При этом окрашивается вся клетка.

При дифференцированной окраске отдельные структуры клетки окрашиваются разными красителями.

## МИКРООРГАНИЗМЫ В ПРИРОДНЫХ СРЕДАХ

### Учет численности микроорганизмов в почве

Почва – наиболее благоприятная среда для развития микроорганизмов. В связи с большой гетерогенностью ее состава для учета численности в ней микроорганизмов с исследуемого участка берут среднюю пробу.

Среднюю почвенную пробу получают смешиванием отдельных образцов, количество которых зависит от микрорельефа, степени гетерогенности почвы и ее однородности в ботаническом отношении. Рекомендуют с площади 100 м<sup>2</sup> брать пробу из трех точек, с площади, превышающей 100 м<sup>2</sup>, - из пяти по методу «конверта», с 1 га и более – из 15 точек. При исследовании пашни пробы берут с глубины всего пахотного слоя, снимая верхний слой толщиной 2 см; при изучении микрофлоры почвенного профиля – по генетическим горизонтам (снизу вверх).

Почвенный образец берут буром, лопатой и ножом. В поле перед взятием образца их тщательно очищают, затем обрабатывают спиртом и обжигают. Укладывают образец в заранее приготовленную стеклянную широкогорлую стерильную банку, закрывающуюся корковой пробкой, обернутой стерильной бумагой, либо в стерильные пергаментные пакеты. На пакеты и банки наклеиваются этикетки с указанием места взятия пробы, горизонта и других сведений.

Почвенные образцы анализируют в первые сутки. При необходимости допускается хранение их в холодном помещении (в холодильнике) в течение 2 дней.

### *Приготовление почвенной суспензии и посев*

На стерильное часовое стекло стерильным шпателем помещают 5 г почвы. Чтобы при взвешивании в почву не попали микроорганизмы из воздуха, особенно споры грибов, часовое стекло накрывают другим часовым стеклом. Предварительно стекла взвешивают. Часовые стекла и шпатели стерилизуют фламбированием. Навеску почвы переносят в стерильную фарфоровую ступку, увлажняют 0,5 мл воды и растирают пальцем в стерильной резиновой перчатке в течение 5 мин. Перед приготовлением почвенной суспензии для каждого образца готовят 2 стерильные колбы на 250 мл. Одна содержит 50 мл стерильной водопроводной воды, другая - пустая. Водой из первой колбы растертую почвенную массу смывают в пустую стерильную колбу. Колбу с полученной почвенной суспензией взбалтывают 10 мин и дают отстояться крупным частицам почвы.

Далее готовят разведения, содержащие разные концентрации почвы в 1 мл воды.

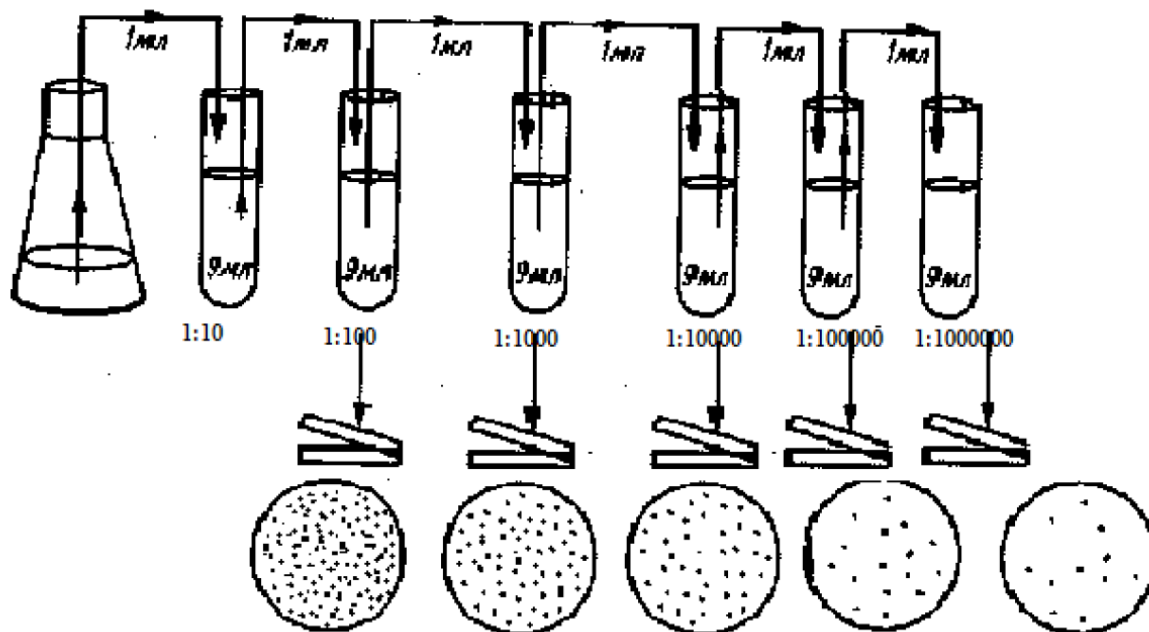


Рис. 3. Приготовление разведений.

Для этого из колбы стерильной пипеткой берут 1 мл суспензии, содержащей  $10^{-1}$  г почвы, и переносят в пробирку с 9 мл стерильной водопроводной воды. Пипетку неоднократно промывают в пробирке, чтобы максимально смыть клетки с ее стенок. Концентрация почвы в пробирке будет  $10^{-2}$  г.

Другой стерильной пипеткой берут 1 мл суспензии из первой пробирки и переносят ее во вторую пробирку, тщательно повторяя процедуру промывания пипетки. Концентрация почвы во второй пробирке будет  $10^{-3}$  г. Точно также новыми стерильными пипетками производят дальнейшие разведения почвенной суспензии до достижения разведения  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$  г.

Для определения численности микроорганизмов в каждом разведении методом питательных пластин проводят глубинный или поверхностный посев. Методы посева описаны выше. Для учета бактерий используют среду МПА, для учета микроскопических грибов – среду Чапека (Приложение 1).



### ***Учет численности микроорганизмов***

Клетки микроорганизмов, попав в питательную среду, начинают размножаться и образуют видимые невооруженным глазом колонии. Каждая колония на чашке с питательной средой вырастает из одной колониобразующей единицы (КОЕ), которая может представлять собой бактериальную, дрожжевую клетку, кусочек мицелия актиномицета или гриба.

Подсчет численности бактерий осуществляют через 24-48 часов инкубации чашек в термостате, грибов – через 7 суток, актиномицетов – через 10-14 суток.

Количество КОЕ в 1 г сырой почвы устанавливают, умножая число КОЕ в чашке на степень разведения – число, показывающее, во сколько раз в конкретном случае разбавили 1 г почвы.

Для правильного определения численности КОЕ подсчитывают только чашки, в которых колоний свыше 10 и не более 250-300.

Для сравнения количества КОЕ в разных почвах необходимо подсчитать их число в 1 г абсолютно сухой почвы. Для этого одновременно со взятием навески определяют влажность почвы. Метод определения влажности почвы приведен в приложении. Для определения количества КОЕ в абсолютно сухой почве необходимо число клеток в сырой почве разделить на количество абсолютно сухой почвы, содержащейся в 1 г сухой почвы.

Пример расчета. При посеве из пробирки с разведением почвенной суспензии 10-6 г на чашке выросло 18 колоний. Содержание абсолютно сухого вещества почвы составило 70%, т.е. 0,7 г сухой почвы в 1 г сырой почвы.

Число клеток (КОЕ) в 1 г сырой почвы равно 18000000.

Число клеток (КОЕ) в 1 г сухой почвы равно

$$x = \frac{18000000}{0,7} = 25714286 \text{ (клеток)}$$

Метод питательных пластин легко выполним, но имеет ряд недостатков, самый существенный из которых – отсутствие универсальной среды для развития всех микроорганизмов, обитающих в почве.

Питание у разных бактерий специфично, и на каждой среде выделяется только физиологическая группа. Так, на наиболее часто применяемой среде мясо-пептонном агаре МПА развиваются в основном гнилостные бактерии, способные усваивать легко доступные органические формы азота. Для более полного представления о населенности почвы делают посева на элективные среды или используют метод прямого подсчета микроорганизмов под микроскопом.

### **Учет численности микроорганизмов в воде и других жидкостях**

Число микроорганизмов в воде, навозной жиже, огуречном рассоле и других жидких субстратах можно также определять методом питательных пластин.

Для этого исследуемые жидкости 3 мин хорошо взбалтывают, затем берут стерильной пипеткой 1 мл жидкости и вносят ее в 99 мл стерильной водопроводной воды. Это исходное разбавление субстрата в 100 раз. Далее готовят методом разведения разные концентрации исследуемой жидкости и определяют число КОЕ путем посева на питательные среды, описанным выше.

### **Учет численности микроорганизмов в воздухе**

Для определения количества КОЕ в воздухе часто применяют очень простой метод Коха (осаждение клеток микроорганизмов на плотных питательных средах).

Стерильные чашки Петри с питательной средой открывают в исследуемом помещении (или на исследуемой площади) на 5 мин.

В качестве питательной среды используют МПА. Частицы пыли с микроорганизмами под действием силы тяжести оседают на поверхность плотной питательной среды. Затем чашки помещают с термостат.

Через определенное время инкубации клетки микроорганизмов образуют на среде колонии, которые можно подсчитать.

Чашки Петри рекомендуется размещать на уровне 1 м от поверхности пола или земли. В одной точке желательно размещать 2-3 чашки Петри.

На площади 100 см<sup>2</sup> за 5 мин осаждается столько клеток, сколько их находится в 10 л воздуха (0,01 м<sup>3</sup>).

Зная площадь чашки Петри, можно подсчитать количество клеток в 1 м<sup>3</sup> воздуха. Для этого число колоний, выросших в чашке Петри, относят к общей площади чашки, затем пересчитывают, сколько таких колоний поместилось бы на 100 см<sup>2</sup> и далее в 1 м<sup>3</sup> воздуха.

## Идентификация микроорганизмов

При определении вида микроорганизмов на первом этапе учитывают морфологические и культуральные признаки.

### Культуральные признаки

Характер роста культуры на МПБ и других жидких средах или колоний на МПА и других плотных средах (сусло-агар, агаризованная синтетическая среда) - важные систематические признаки микроорганизмов.

При развитии культуры на жидких средах отмечают: характер развития пленки (тонкая, сухая, складчатая, слизистая) и ее цвет; наличие мути (слабая, умеренная, сильная); присутствие, характер осадка (обильный, плотный, хлопьевидный) и его цвет.

Культуральные признаки, выявляемые на плотных средах, следующие:

- форма колоний (рис.2): круглая, ризоидная, неправильная, концентрическая, амёбовидная, мицелиальная;
- профиль колоний (рис.3): изогнутый; кратерообразный; бугристый; растущий в субстрат; плоский; выпуклый; каплевидный; конусовидный;
- край колоний (рис.4): гладкий, волнистый, зубчатый, лопастной, реснитчатый, ворсистый, ветвистый;
- размеры колоний: крупная (10 мм и более в диаметре), средняя (от 1 – 10мм), точечная (не превышает 1 мм);
- поверхность колонии: гладкая, морщинистая, шероховатая, складчатая, бугристая;
- оптические свойства поверхности: прозрачная, просвечивающая, непрозрачная, блестящая, матовая, флуоресцирующая;
- цвет: грязно-белый, белый, желтый, оранжевый, сиреневый, синий, красный, черный и т. д.);
- структура колоний (рис.4): однородная, мелко- или крупнозернистая, радиально или концентрически исчерченная, мучнистая, пленчатая, растущая в агар, легко снимающаяся иглой с агара;
- консистенция: маслянистая, тестообразная, слизистая, сухая, плотная, сметанообразная.

При изучении колоний актиномицетов обращают особое внимание на пигмент, выделяемый в среду, окраску воздушного и субстратного мицелия. Значение имеет запах колоний (землистый, эфирный, фруктовый).



Рис. 4. Форма колоний микроорганизмов

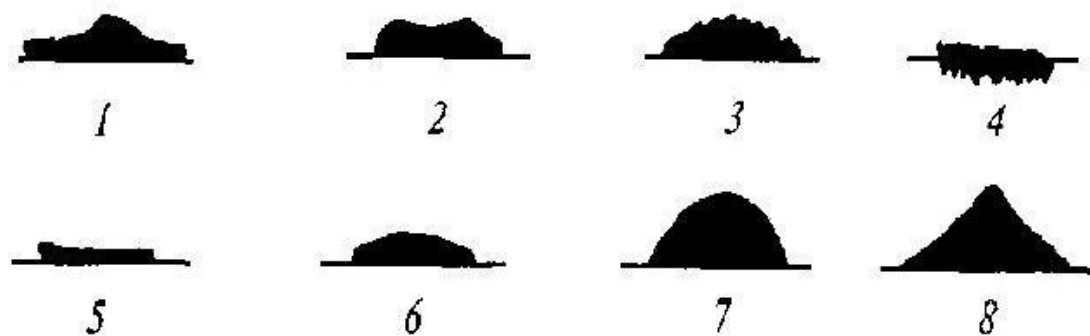


Рис. 5. Профиль колонии

1 – изогнутый; 2 – кратерообразный; 3 – бугристый; 4 – врастающий в субстрат; 5 – плоский; 6 – выпуклый; 7 – каплевидный; 8 - конусовидный

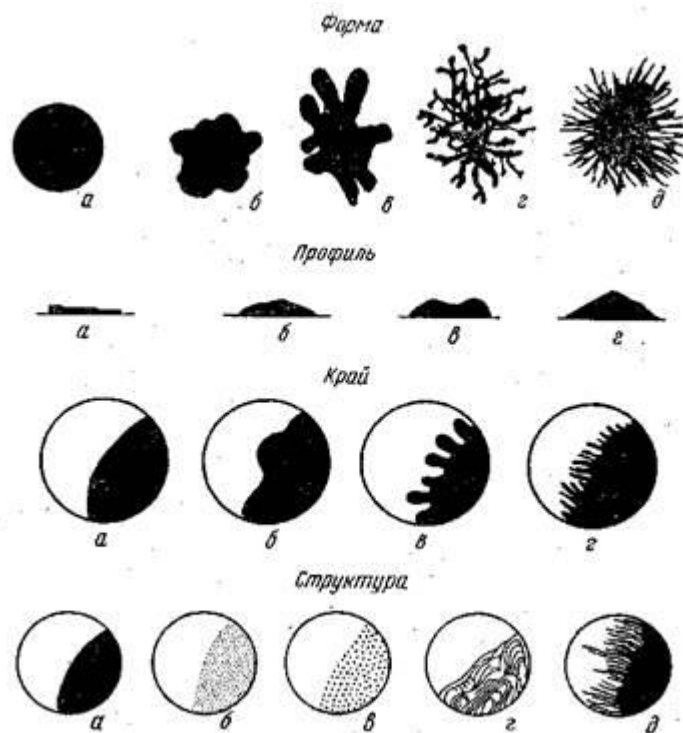


Рис. 6. Характеристика колоний

*форма*: а – округлая, б – неправильная, в – амебовидная, г – ризоидная, д – мицелиальная;

*профиль*: а – плоский, б – выпуклый, в – кратерообразный, г – бахромчатый;

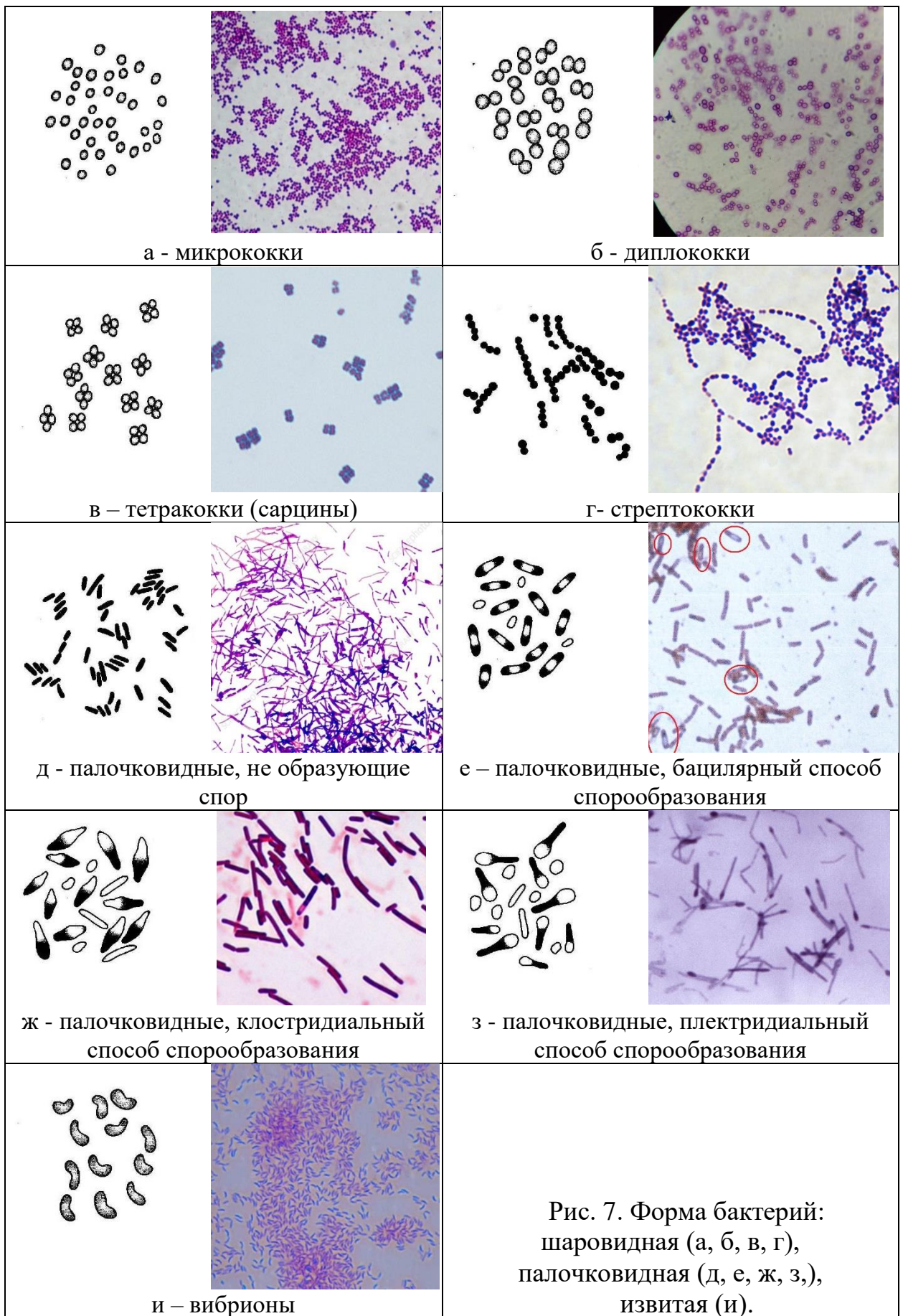
*край* : а – ровный, б – волнистый, в – лопастной, г –бахромчатый;

*структура*: а – однородная, б – мелкозернистая, в – крупнозернистая, г – струйчатая, д – волнистая

### Морфологические признаки

Морфологическими признаками у бактерий служат:

- форма клеток: шаровидные, палочковидные и извитые (рис. 7);
- у палочковидных бактерий отмечают форму концов клетки: вогнутые, закругленные, закругленные или усеченные;
- расположение клеток: одиночные, соединенные попарно, в цепочки или в виде пакетов;
- размеры клеток;
- способность к спорообразованию и расположение в клетках спор: бациллярное, кластридиальное и плектридиальное;
- способность к движению и тип жгутикования (один жгутик – монотрих, пучок жгутиков на одном конце – лофотрих, пучки жгутиков на обоих концах клеток – амфитрих, жгутики по всей поверхности клеток – перитрих).



Из каждой группы колоний, выросших на плотных средах, готовят препарат и определяют по форме клеток, к какому роду микроорганизмов они относятся.

Из общего числа микроорганизмов, развивающихся на МПА, можно выделить следующие роды: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Mycobacterium*, *Actinomyces*.

Род *Pseudomonas*. На МПА микроорганизмы этого рода формируют колонии: круглые, неправильной формы, плоские и выпуклые, слизистые и пастообразные, просвечивающие, бесцветные или пигментированные (грязно-белые, синие, сине-зеленые, красные, желтые, бурые и черные).

Характерная особенность представителей рода - образование сине-зеленого или желто-зеленого флуоресцирующего пигмента. Некоторые колонии удается наблюдать только в ультрафиолетовых лучах. У других видов пигменты диффундируют в среду, окрашивая ее в соответствующий цвет. Образование определенного пигмента зависит от состава и реакции среды.

Клетки *Pseudomonas* прямые или слегка изогнутые, часто с заостренными концами. Они располагаются одиночно, парами или короткими цепочками. Размеры клеток 1,5-4×0,5-1 мкм. Двигаются эти организмы при помощи жгутиков (монотрихи или лофотрихи), не образуют чехлов; для них неизвестны стадии покоя. Бактерии *Pseudomonas* - аэробы, но в анаэробных условиях способны использовать для дыхания кислород нитратов. Клетки грамотрицательные.

Род *Flavobacterium*. На МПА дают выпуклые или слабо выпуклые округлые колонии диаметром 2-3 мм с цельным краем, чаще гладкие и блестящие, прозрачные, желтого цвета за счет каротиноидных пигментов, не диффундирующих в среду, встречаются желтовато-оранжевые колонии, иногда и красные.

Клетки палочковидной формы (0,5×1,0-3,0 мкм) с закругленными концами, неподвижны. Располагаются флавобактерии одиночно, парами и в виде коротких цепочек, иногда - в виде нити. Эндоспор не образуют. Грамотрицательные.

Род *Micrococcus*. На МПА, как правило, образуют колонии мелких и средних размеров (диаметр 2-4 мкм). Колонии могут быть: матовые, блестящие, маслянистые; гладкие, выпуклые, плоские; зернистые, мелкоскладчатые; пастообразной слизистой консистенции, иногда встречаются сухие плотные; цвет колоний возможен белый, серый, реже колонии бесцветные, встречаются буроватые, обычно - желтые, розовые или красные. Пигменты в среду не диффундируют. Клетки мелкие (диаметр 0,2-1,5 мкм), одиночные, могут встречаться пары, тетрады или скопления неправильной формы. Клетки неподвижные, не образуют эндоспор. Грамположительные.

Род *Sarcina*. Колонии средних размеров, круглые, компактные, выпуклые, плоские; гладкие, бугристые или складчатые, зернистой структуры; матовые или жирно-блестящие; желтые, лимонно-желтые, иногда розовые, красные, белые. Клетки сферические (диаметр 1,8-3 мкм), соединены в пакеты. Пакет

объемный - куб, состоит из 8 клеток, поскольку образуется при делении клетки в трех взаимно перпендикулярных плоскостях. Под микроскопом пакет выглядит состоящим из четырех клеток (одна сторона куба). Есть сарцины, у которых пакеты уложены упорядоченно по четыре, и под микроскопом они смотрятся как большие тьюки, состоящие из четырех пакетов.

Род *Mycobacterium*. Относится к группе микобактерии. На МПА микобактерии растут медленно или очень медленно. Они образуют мелкие, круглые компактные колонии, иногда приподнятые; мягкие, пастообразной или слизистой консистенции (растекающиеся по субстрату), бывают сухие крошащиеся, бугристые складчатые; матовые, блестящие, бесцветные или окрашенные (розовые, оранжевые, желтые, зеленые, синие, бурые, черные). Пигмент в среду не выделяют. Молодые клетки - ветвистые или угловатые с неправильными контурами (3,0-7,0×0,7 мкм); с возрастом у большинства видов клетки распадаются на кокки и палочки. Большинство видов грамположительные.

Род *Bacillus*. Палочковидные бактерии, способные образовывать более или менее термоустойчивые споры. Во время формирования споры палочковидная форма клеток сохраняется. По характеру роста колоний на МПА (или МПА + сусло-агар) можно иногда определить видовую принадлежность бацилл. Клетки грамположительные. Аэробы.

*Bacillus megaterium* - земляная палочка (от лат. terra — земля, почва). Колонии гладкие, белые, выпуклые, жирно-блестящие, редко - складчатые (рис. 6); края колоний резко очерчены или волнисто-бахромчатые. Споры овальные или цилиндрические, не шире материнской клетки, в поперечнике достигают 2 мкм. Длина клеток - 5-7 мкм и более.

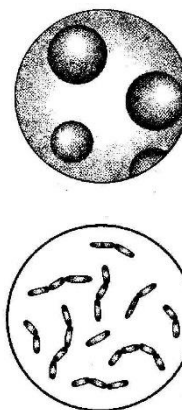


Рис.8. *Bacillus megaterium*. Колонии на МПА (сверху), клетки культуры под микроскопом (снизу).

*B. subtilis* (от лат. *sub* — внутри или под, *tilia* — липа, трава, впервые выделена из сена) - сенная палочка. Колонии сухие мелкоморщинистые, бархатистые; бесцветные или розовые; срастающиеся с агаром; край колоний волнистый или слегка волнистый. Палочки короткие тонкие - 3-5×0,9 мкм. Споры овальные (0,9×0,6 мкм), расположены не строго центрально, на некоторых средах - ближе к центру. Клетки подвижные (перитрихи).

*B. mesentericus* - картофельная палочка. Название связано не с картофелем, а с картофельной болезнью хлеба, которую она вызывает. Появляется картофельная палочка на качественном пшеничном хлебе при хранении его в течение нескольких дней в теплом месте при повышенной влажности, вызывая разрушение белковых веществ и крахмала. При ее интенсивном развитии



внешние признаки мякиша изменяются: при разломе он становится тянущимся и липким, появляется затхло-гнилостный, иногда с примесью сладковатого, запах. Колонии на МПА тонкие, сухие, морщинистые, серовато-белые. Палочки тонкие, длинные и короткие; подвижные ( $3-10 \times 0,5-0,6$  мкм); иногда они соединены в длинные нити. Споры овальные и продолговатые ( $0,9-0,5$  мкм). При формировании спор клетки не меняют палочковидной формы. Прорастание спор экваториальное.

*B. mycoides* - грибовидная палочка. Образует колонии, напоминающие рост гриба: ризоидные или мицелиевидные, стелющиеся по поверхности агара (рис. 7). Пучки нитей отходят от края колоний, создавая иллюзию ветвления; нити изгибаются направо или налево, образуя право- или левовращающиеся формы колоний. Клетки в поперечнике -  $0,8-1,2$  мкм, по длине в зависимости от среды -  $5-7$  мкм, часто  $10$  мкм и более. Цитоплазма вакуолизирована, с гранулами запасных питательных веществ. Формы подвижные (перитрихи). Вид имеет много вариантов. Клетки грамположительные.

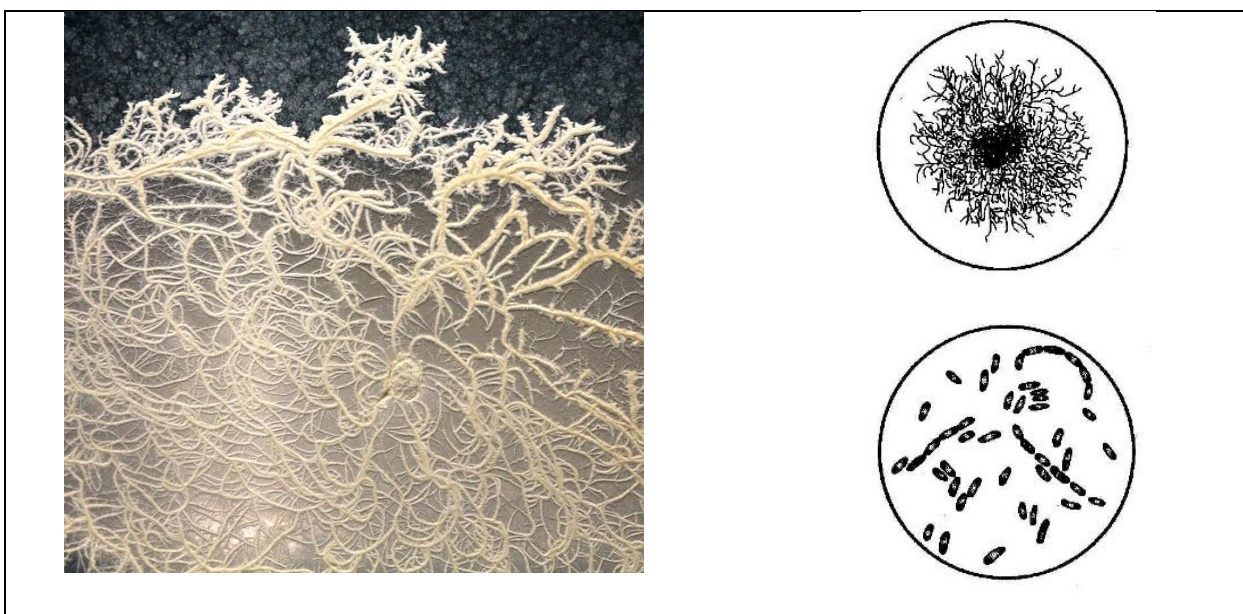


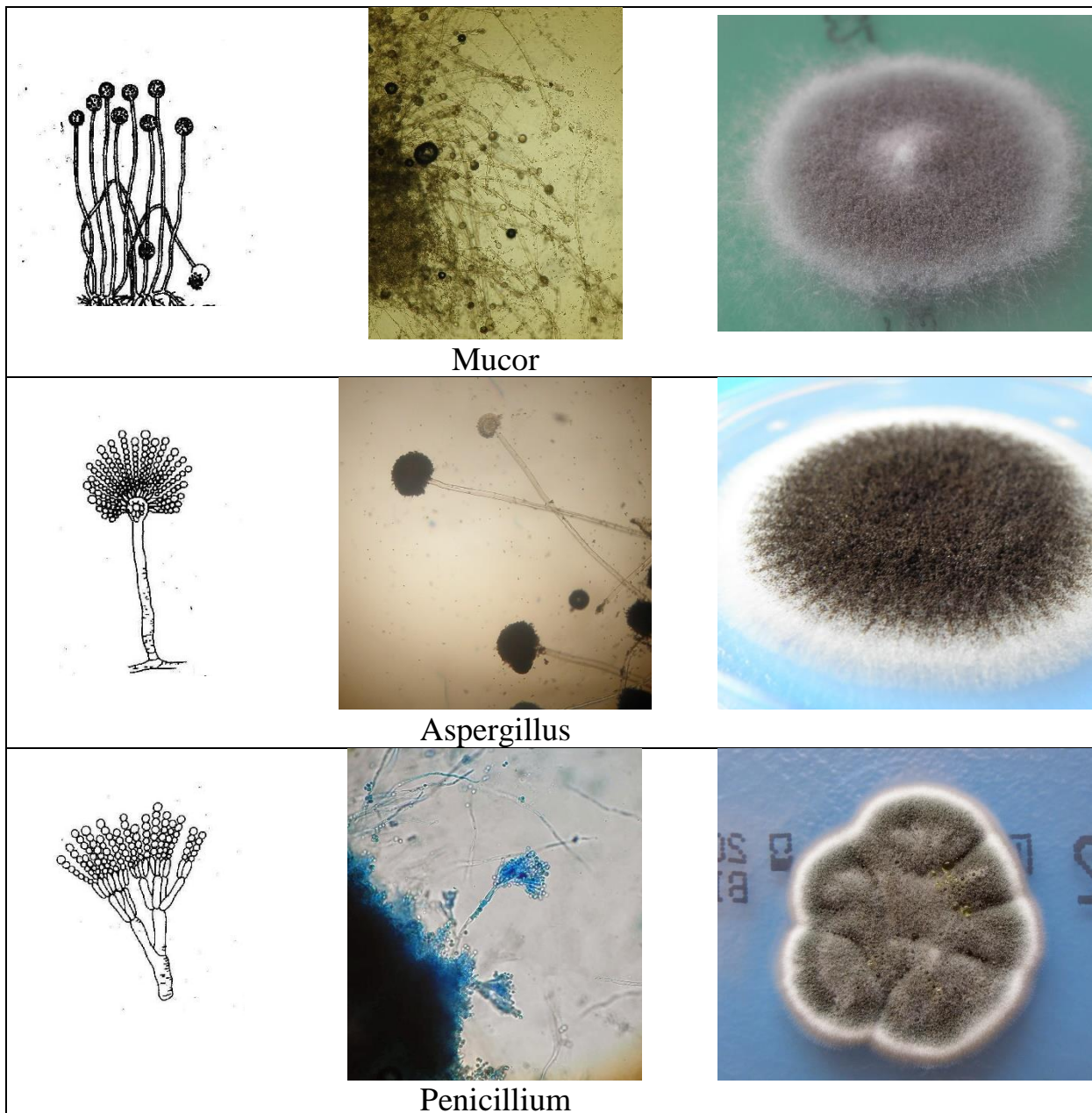
Рис. 9. *Bacillus mycoides*. Колонии на МПА (сверху), клетки культуры под микроскопом (снизу)

*B. cereus* (от лат. *seca* - восковой) — колонии восковидные, толстые, компактные, матовые со складчатым центром и ризоидными волнистыми краями; иногда мелкобугристые, с бахромчатыми краями, от которых отходят тонкие сплетения нитей. Клетки толстые, диаметром  $1-1,5$  мкм, длиной  $3-5$  мкм, иногда и более; одиночные или соединены в цепочки, нити. Споры овальные ( $1,2-1,5 \times 0,9$  мкм), расположены субтерминально, прорастают полярно.

*B. idosus* (от лат. *idos* - образ, вид) - колонии сухие, матовые, плоские, мелкоморщинистые, легко и целиком снимающиеся иглой с поверхности агара. Клетки - тонкие прямые палочки ( $2-3 \times 0,6$  мкм), подвижные. Споры овальные, чаще образуются в центральной части клеток.

## Определение качественного состава микроскопических грибов

Помимо бактерий природные объекты населены и другими микроорганизмами – микроскопическими грибами. Грибы относят к эукариотам. Тело гриба состоит из мицелия, или грибницы, - сплетения тонких ветвящихся нитей – гиф (рис. 10).





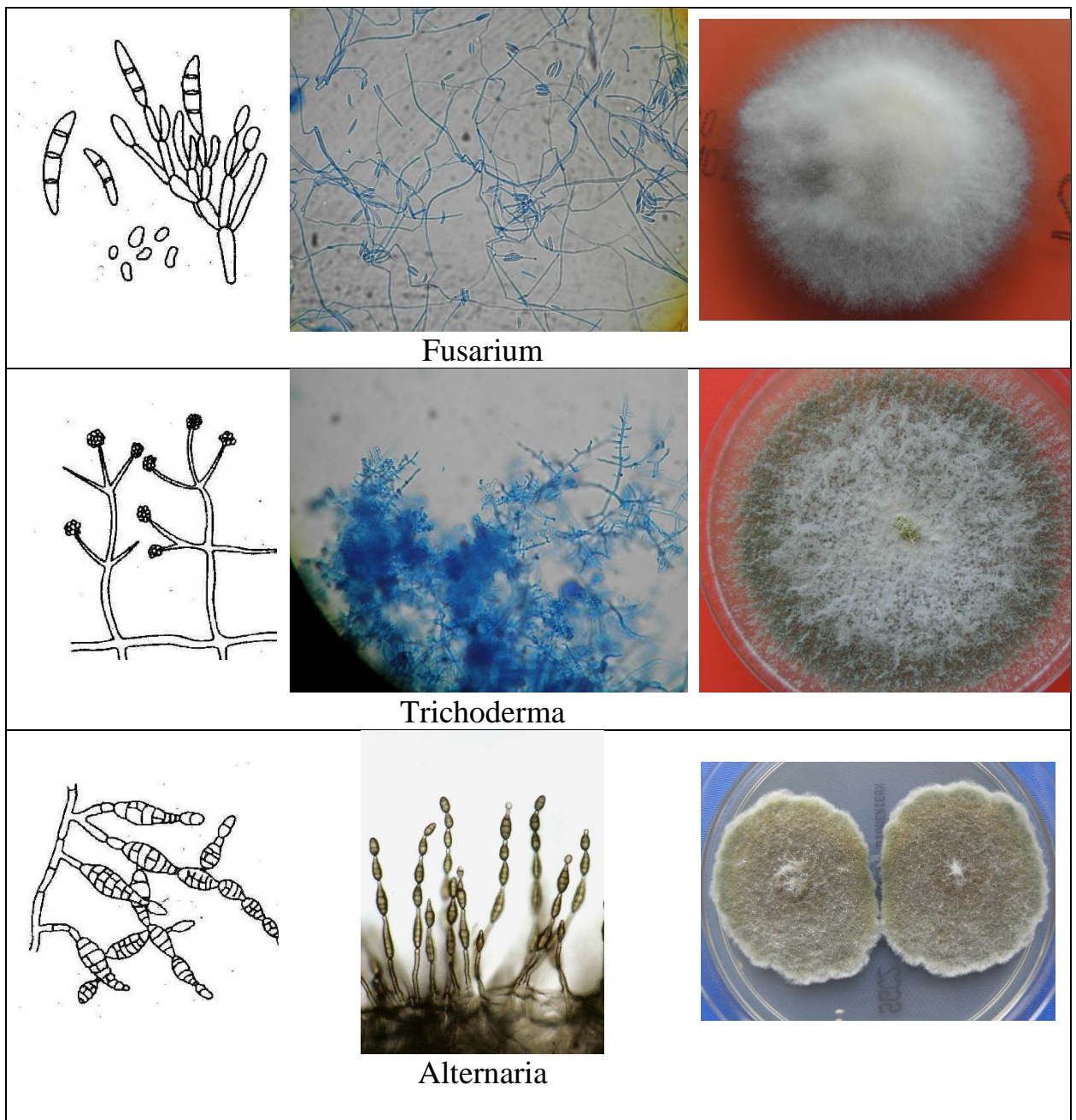


Рис. 10. Микроскопические грибы

**Зигимицеты.** Низшие грибы, имеют хорошо развитый ветвистый одноклеточный мицелий. Размножаются как половым путем, так и бесполом, т. е. при помощи спор.

Представитель класса - мукор (*Mucor mucedo*) развивается в виде войлочного белого или серого налета на продуктах растительного происхождения и навозе травоядных животных.

Мицелий мукоровых грибов пронизывает субстрат и частично стелется по его поверхности. Вверх от грибницы отходят особые воздушные гифы - спорангиеносцы, вздувающиеся на концах. Вздутия представляют собой спорангии, в дальнейшем они отделяются от спорангиеносцев перегородкой. В спорангиях бесполом путем образуются многочисленные спорангио-споры - эндоспоры.

Перегородка, отделяющая спорангий от спорангиеносца, расположена куполообразно, поэтому верхняя часть спорангиеносца оказывается внутри спорангия. Этот участок спорангиеносца называется колонкой и у разных видов муконовых грибов имеет различную форму (грушевидную, шаровидную, цилиндрическую).

Для просмотра муконовых грибов следует осторожно взять препаровальной иглой небольшое количество мицелия и другой препаровальной иглой снять его на сухое предметное стекло. Препарат сначала рассматривают без покровного стекла при малом увеличении микроскопа. Видны спорангиеносцы и круглые темные шарики на их концах - спорангии. Обычно они покрыты тонкими шипами из кристаллов оксалата кальция. Затем на поверхность препарата наносят каплю воды, накрывают его покровным стеклом. Оболочка спорангия при этом разрушается, и споры выпадают. Препарат рассматривают последовательно при малом и большом увеличении.

**Аскомицеты, или сумчатые грибы.** К аскомицетам относят высшие грибы с многоклеточным или членистым мицелием, образующие споры в сумках - асках. Они включают представителей эуаскомицетов (истинных аскомицетов), у которых сумки со спорами формируются в результате полового процесса на поверхности или внутри плодовых тел, образуемых сплетением гиф мицелия (возможно бесполое размножение экзогенно возникающими спорами - конидиями), и гемиаскомицетов, у которых плодовые тела отсутствуют. К гемиаскомицетам относят большинство дрожжей.

Эуаскомицеты включают два важнейших рода почвенных грибов - *Penicillium* и *Aspergillus*, которых нередко называют также плесневыми грибами. К группе плесневых относят и некоторых представителей зигомицетов и несовершенных грибов.

Пенициллы и аспергиллы имеют хорошо развитый многоклеточный мицелий. Размножаются преимущественно конидиальным спороношением. Наблюдаются в виде налета голубого, зеленого, сизого цвета на продуктах растительного происхождения (варенье, томатной пасте, лимонах и апельсинах), отсыревших изделиях из кожи, обоях. Распространены в верхних горизонтах почвы.

Грибы рода *Penicillium* называют кистевиками, так как они образуют конидии на концах мутовчаторазветвленных конидиеносцев, напоминающих кисть руки. Иногда отдельный пучок конидиеносцев, выходящих из одной точки и отчленяющих конидии, напоминает рисовальные кисти.

*Aspergillus*, или леечная плесень, имеет обычно одноклеточные конидиеносцы шаровидно, булавовидно или грушевидно вздутые. На них располагаются параллельно друг другу короткие кеглеобразные стеригмы, каждая из которых отшнуровывает радиально цепочки конидий. Некоторые виды аспергиллов имеют два ряда стеригм. Вся головка конидиеносца с радиально расходящимися цепочками конидий напоминает наконечник лейки со струйками воды.

Для рассмотрения строения конидиеносцев препаровальной иглой вырезают кусочек мицелия (приблизительно 0,5 мм<sup>2</sup>) на границе между его

зеленым и белым (в случае с *Penicillium glaucum*) или между черным и коричневым участками (в случае с *Aspergillus niger*). Гриб к занятию выращивают в чашке Петри; старые грибы с полностью зеленым мицелием не годятся для просмотра. Осторожно с помощью двух препаровальных игл кусочки мицелия снимают со среды и помещают в каплю воды на предметное стекло. Сверху на мицелий кладут покровное стекло. Затем слегка надавливают на покровное стекло в центре стеклянной палочкой (или препаровальной иглой). Избыток воды можно удалить фильтровальной бумагой.

Препарат сначала просматривают при малом увеличении, уделяя основное внимание его краям, так как на них обычно хорошо видны кисти конидиеносцев. Когда подходящий участок найден, переходят на большое увеличение и детально рассматривают кисточки.

В начальной стадии спорообразования *Aspergillus* похож на *Mucor* (бесцветные головки), затем с возрастом головки покрываются стеригмами, на которых развиваются споры. В результате получают так называемые кудрявые головки. От мукора аспергилл всегда можно отличить наличием таких головок. У мукора головки гладкие - «лысые», так как споры его эндогенного происхождения (внутренние), а у аспергилла и пеницилла - экзогенные споры (внешние).

**Дейтеромицеты, или несовершенные грибы.** Имеют многоклеточный мицелий, но у них нет полового процесса и совершенной стадии спороношения. Размножаются бесполом путем при помощи конидий или вегетативно участками гифов. В природе широко распространены представители родов *Fusarium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, которых формально относят к дейтеромицетам. Встречаются они на растительных остатках, плодах, семенах и в почве.

Среди грибов рода *Fusarium* есть сапротрофы, живущие в почве и на растительных остатках, и паразиты, вызывающие заболевания многих видов растений (увядание, гнили корней, стеблей, плодов, полегание сеянцев древесных и кустарниковых пород, болезни семян, различные пигментации органов растений).

Колонии отдельных видов фузариума на питательных средах разнообразны по структуре: они могут быть рыхлыми, ватообразными, пушистыми, паутинистыми или плотными пленчатыми. Колонии бывают белые или различных тонов розового или желтого цветов. Нередко питательная среда также окрашивается в разные цвета и оттенки от розового до коричневого.

Фузариумы характеризуются большим разнообразием ферментов, благодаря которым могут использовать в качестве источников питания различные вещества, некоторые виды даже способны усваивать клетчатку.

Приготовив в капле воды препарат обычным способом и рассматривая его под микроскопом, можно увидеть более или менее разветвленные конидиеносцы и очень характерные для фузариума конидии, так называемые макроконидии. Они заострены на концах, продолговатые, согнутые, нередко серповидные, с несколькими перегородками (напоминают бананы). У многих

видов фузариума образуются, кроме того, овальные мелкие бесцветные, чаще одноклеточные, микроконидии.

Грибы рода *Trichoderma* нередко можно обнаружить на коре, древесине, засохших листьях и стеблях, а также на семенах различных трав, кустарников и деревьев; их легко выделить из почвы. Через 2-3 дня инкубации при 23-25°C на поверхности среды появляется сначала белый, затем с оттенками зеленовато-желтого цвета рыхлоклочковатый или войлочный налет, образованный мицелием и скоплением конидиеносцев. С возрастом он становится темно-зеленым. При большом увеличении микроскопа видны прямостоячие, многократно супротивно разветвленные конидиеносцы, приподнимающиеся над мицелием. На вершине конидиеносцев расположены шаровидные головки, каждая из которых состоит из 10-20 одноклеточных бесцветных конидий. Представители этого рода энергично разрушают белковые соединения и разнообразные углеводы. Обладая антибиотическими свойствами в отношении других грибов, в том числе паразитических, триходерма выполняет оздоравливающую функцию в почве.

Разные виды рода *Alternaria* можно выделить с листьев пораженных этим грибом растений картофеля или томата, с семян капусты и других растений, из почвы. Они характеризуются своеобразным (обратнобулавовидным) строением многоклеточных грушевидных конидий, соединенных цепочками. Конидиеносцы, являясь боковыми ответвлениями мицелия, имеют вид простых или слаборазветвленных одноклеточных, иногда многоклеточных веточек. Колонии на сусло-агаре сначала светлые, пушистые, затем зеленовато-серые или оливково-черные, бархатистые или ворсистые, нередко с ясно выраженной концентрической зональностью; иногда колонии с самого начала сажисто-черные, уплощенные, во многих случаях темный пигмент диффундирует в среду.

**Дрожжи.** По современным представлениям, дрожжи - это сборная группа одноклеточных микроскопических организмов, относящихся к разным классам грибов, преимущественно к классу аскомицетов.

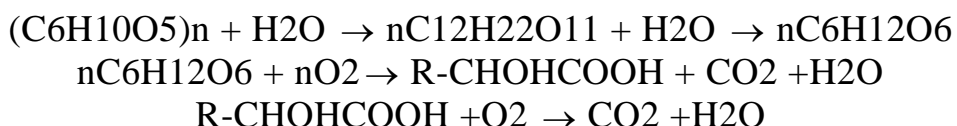
Диаметр клеток дрожжей колеблется от 8 до 15 мкм. Форма их разнообразна: эллипсоидная, грушевидная, округлая, цилиндрическая. Размножаются вегетативным и половым путем. Вегетативные способы размножения - почкование и деление; половой способ размножения связан с образованием спор. К почкующимся дрожжам относятся представители «культурных» дрожжей рода *Saccharomyces* (сахаромицеты), к делящимся - виды рода *Schizosaccharomyces* (шизосахаромицеты). При половом процессе слияние вегетативных клеток ведет к образованию сумок со спорами или сначала могут сформироваться споры, которые в последующем копулируют друг с другом. В каждой сумке образуется от 2 до 8, иногда 12 спор. Среди дрожжей есть аспорогенные, ложные дрожжи, не способные к половому процессу и спорообразованию. Они относятся к классу несовершенных грибов.

## УЧАСТИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В КРУГОВОРОТЕ ВЕЩЕСТВ В ПРИРОДЕ

### Микроорганизмы, разрушающие клетчатку (окисление целлюлозы)

Этот процесс является наиболее масштабным в природе. Клетчатка составляет от 15 до 60% сухой массы растений. Отмершие части растений поступают в почву и там подвергаются разрушению. В хорошо аэрируемой почве клетчатку (целлюлозу) окисляют аэробные микроорганизмы – бактерии, грибы и актиномицеты. Микроорганизмы вырабатывают ферменты (целлюлазный комплекс), которые вызывают гидролиз целлюлозы до глюкозы. В свою очередь глюкоза окисляется до оксикислот, а затем до конечных продуктов - углекислого газа и воды.

Схематично эти процессы выражаются уравнениями:



### Проведение анализа

Для знакомства с клетчаткоразрушающими бактериями используют питательную среду Омелянского (Приложение 1). Питательную среду разливают в конические колбы слоем 1,5-2 см (например, в колбу Эрленмейера на 250 мл наливают 50 мл среды). Питательную среду стерилизуют в автоклаве, параллельно из фильтровальной бумаги готовят складчатые фильтры и стерилизуют их в автоклаве или сушильном шкафу.

Питательную среду заражают комочком почвы (примерно 1/3 чайной ложки на 50 мл среды) и на поверхность среды опускают складчатый фильтр конусом вверх. Колбы помещают в термостат на 25-30°C на 10-14 суток.

На границе между воздухом и средой создаются оптимальные условия для развития аэробных клетчаткоразрушающих микроорганизмов. В этой зоне наиболее активно идет процесс разрушения фильтровальной бумаги. Через 8-10 суток на фильтре появляются желто-оранжевые пятна колоний клетчаткоразрушающих бактерий. Бумага фильтра ослизняется, разлагается, и фильтр постепенно оседает на дно.

В колбе из разрушенных масс клетчатки микробиологической петлей готовят мазок в капле жидкости. Мазок окрашивают фуксином или генцианвиолетом и микроскопируют.

На препаратах можно обнаружить представителей различных родов: микроскопических грибов *Trichoderma*, *Fusarium*, *Alternaria*, бактерий *Bacillus*, *Cytophaga*, *Cellvibrio*.

*Cytophaga* – слегка изогнутые, довольно длинные (3-8 мкм) палочки с заостренными концами. При старении переходят в укороченные палочки с

округлыми концами, возможен переход и в шаровидную форму. Разные виды этого рода образуют на клетчатке колонии в виде желтых, розовых, пурпурных или красно-коричневых пятен.

*Cellvibrio* – мелкие, слегка изогнутые в виде полумесяца неспорообразующие палочки с закругленными концами. Колонии очень быстро распространяются по поверхности фильтровальной бумаги, окрашивая ее в желто-оранжевый цвет.

### **Свободноживущие азотфиксирующие бактерии**

Процесс фильтрации атмосферного азота бактериями имеет большое значение для общего баланса азота в почве. Пополнение запасов азота идет за счет фиксации молекулярного азота воздуха микроорганизмами. Ассимиляцию молекулярного азота осуществляют прокариоты, которых в зависимости от их взаимоотношений с растениями делят на три группы: симбиотические азотфиксаторы (живущие в симбиозе с растениями), ассоциативные азотфиксаторы (ризосферные (корневые) и филлосферные (листовые) бактерии, формирующие ассоциации с различными видами небобовых растений) и свободноживущие почвенные азотфиксаторы (живущие независимо от присутствия растений, вне ризосферы, в почве пара и даже в почве дорог).

Среди свободноживущих азотфиксаторов интерес представляют виды рода *Azotobacter*. Азотобактер – облигатный аэроб, с качестве источника азота использует молекулярный азот, в качестве источника углерода – органические кислоты, углеводы и спирты. Наиболее распространены в природе три вида азотобактера.

*Azotobacter chroococcum* – в молодой культуре имеет палочковидные, подвижные клетки. В старой культуре клетки кокковидные, соединены в пары и сарциноподобные пакеты, обычно окруженные слизистой капсулой. Колонии на плотных питательных средах слизистые, растекающиеся или выпуклые, бесцветные или окрашенные в темно-коричневый до черного цвет.

*Azotobacter agile* – клетки шаровидной или слегка овальной формы. Расположены одиночно или парами. Колонии влажно-блестящие, гладкие. Выделяют в среду желтый или зеленоватый пигмент.

*Azotobacter vinelandii* – в молодой культуре клетки палочковидные, в старой – форма клеток шаровидная. Колонии гладкие, блестящие или слизистые. Микроб выделяет сине-зеленый флюоресцирующий пигмент, проникающий в субстрат.

### Проведение анализа

Для определения наличия азотобактера используют метод посева комочков почвы на агаризованную среду Эшби (Приложение 1). Стерильную питательную среду разливают в чашки Петри. После застывания и высушивания среды на пластинки раскладывают комочки почвы размером с



просяное зернышко. Расстояние между комочками – 1 см. Количество комочков – 25. Засеянные чашки Петри помещают в термостат при температуре 28-30оС. На 5-7 сутки вокруг комочков почвы развиваются слизистые колонии азотобактера. Результаты заносят в таблицу. Для количественного учета азотобактера подсчитывают число комочков, давших начало колониям, и определяют их процент об общего числа комочков, засеянных на чашку Петри.

Из колоний готовят мазки, окрашивают фуксином и просматривают под микроскопом. Если колонии со временем приобретают бурую окраску, их относят к *Azotobacter chroococcum*, если они образуют зеленый флуоресцирующий пигмент, то в зависимости от морфологии их относят либо к *Azotobacter agile*, либо к *Azotobacter vinelandii*.

Таблица. Оформление результатов учета численности азотобактера

| Вариант опыта      | Повторность | Общее число комочков почвы | Число комочков почвы, давших колонии | Выделение азотобактера (%) |
|--------------------|-------------|----------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
| Парниковая почва   | 1           | 25                         | 22                                   | 88                         |
|                    | 2           | 25                         | 23                                   | 92                         |
|                    | 3           | 25                         | 20                                   | 80                         |
| Серая лесная почва | 1           | 25                         | 16                                   | 64                         |
|                    | 2           | 25                         | 15                                   | 60                         |
|                    | 3           | 25                         | 11                                   | 44                         |

## Лабораторная работа №1. Бактерии в почве

Цель работы: Определить численность и разнообразие бактерий в почве.  
Оборудование:

- весы,
- сушильный шкаф,
- автоклав,
- термостат,
- микроскоп,
- стерильный бокс.

Материалы:

- чашки Петри,
- шпатель пластиковый,
- колбы конические стеклянные на 100мл и 1000 мл,
- пробирки стеклянные,
- ватно-марлевые пробки,
- пипетки стеклянные,
- шпатель Дригальского,
- петля микробиологическая,
- спиртовая горелка,
- предметные стекла,
- покровные стекла,
- краситель (генциан фиолетовый 10%).

Ход работы:

1. Приготовить чистую посуду для проведения исследования (чашки Петри, пробирки, колбы конические на 100 мл, колба коническая на 1000 мл).
2. Провести стерилизацию посуды сухожаровым методом.
3. Приготовить питательную среду для культивирования бактерий (МПА). Рассчитать навеску сухой среды и объем воды для приготовления (коническая колба на 1000 мл).
4. Провести стерилизацию питательной среды и воды для разведений методом автоклавирования.
5. Стерильную питательную среду разлить в стерильные чашки Петри.
6. Приготовить почвенную суспензию.
7. Приготовить разведения суспензии в пробирках до  $10^{-6}$  г.
8. Произвести посев на чашки Петри.
9. Поместить чашки Петри в термостат для инкубации при  $t=28^{\circ}\text{C}$  в течение 1-2 суток.
10. Произвести подсчет численности колоний (КОЕ/г.)
11. Описать морфологические признаки колоний (2 шт.)
12. Провести фотофиксацию внешнего вида колоний.
13. Провести микроскопирование.
14. Описать культуральные признаки клеток (2 шт.)
15. Провести фотофиксацию внешнего вида клеток препарата.

Результаты:

Оформить протокол исследования (Приложение 3). В результатах отразить фотоматериалы, численность микроорганизмов, выводы.

## Лабораторная работа №2. Микроскопические грибы в почве

Цель работы: Определить численность и разнообразие микроскопических грибов в почве.

Оборудование:

- весы,
- сушильный шкаф,
- автоклав,
- термостат,
- микроскоп,
- стерильный бокс.

Материалы:

- чашки Петри,
- шпатель пластиковый,
- колбы конические стеклянные на 100мл и 1000 мл,
- пробирки стеклянные,
- ватно-марлевые пробки,
- пипетки стеклянные,
- шпатель Дригальского,
- петля микробиологическая,
- спиртовая горелка

### Ход работы:

1. Приготовить чистую посуду для проведения исследования (чашки Петри, 1 колба коническая на 1000 мл).
2. Провести стерилизацию посуды сухожаровым методом.
3. Приготовить питательную среду для культивирования грибов (Чапека). Рассчитать навеску сухой среды и объем воды для приготовления (коническая колба на 1000 мл).
4. Провести стерилизацию питательной среды и воды для разведений методом автоклавирования.
5. Стерильную питательную среду разлить в стерильные чашки Петри.
6. Приготовить почвенную суспензию.
7. Приготовить разведения в пробирках до  $10^{-3}$  г.
8. Произвести посев на чашки Петри.
9. Поместить чашки Петри в термостат для инкубации при  $t=28^{\circ}\text{C}$  в течение 7 суток.
10. Произвести подсчет численности колоний (КОЕ/г.)
11. Описать морфологические признаки колоний (2 шт.)
12. Провести фотофиксацию внешнего вида колоний.
13. Провести микроскопирование.
14. Описать культуральные признаки (2 шт.)
15. Провести фотофиксацию внешнего вида препарата.

Результаты: Оформить протокол исследования (Приложение 3). В результатах отразить фотоматериалы, численность микроскопических грибов, выводы.

### Лабораторная работа №3. Бактерии в воздухе

Цель работы: Определить численность и разнообразие бактерий в воздухе.

Оборудование:

- весы,
- сушильный шкаф,
- автоклав,
- термостат,
- микроскоп,
- стерильный бокс.

Материалы:

- чашки Петри,
- шпатель пластиковый,
- колба коническая стеклянная на 1000 мл,
- ватно-марлевые пробки,
- петля микробиологическая,
- спиртовая горелка,
- предметные стекла,
- покровные стекла,
- краситель (генциан фиолетовый 10%).

Ход работы:

1. Приготовить чистую посуду для проведения исследования (чашки Петри, 1 колба коническая на 1000 мл).
2. Провести стерилизацию посуды сухожаровым методом.
3. Приготовить питательную среду для культивирования бактерий (МПА). Рассчитать навеску сухой среды и объем воды для приготовления (коническая колба на 1000 мл).
4. Провести стерилизацию питательной среды методом автоклавирования.
5. Стерильную питательную среду разлить в стерильные чашки Петри.
6. Произвести посев на чашки Петри.
7. Поместить чашки Петри в термостат для инкубации при  $t=28^{\circ}\text{C}$  в течение 1-2 суток.
8. Произвести подсчет численности колоний (КОЕ/г.)
9. Описать морфологические признаки колоний (2 шт.)
10. Провести фотофиксацию внешнего вида колоний.
11. Провести микропирование.
12. Описать культуральные признаки клеток (2 шт.)
13. Провести фотофиксацию внешнего вида клеток препарата.

Результаты:

Оформить протокол исследования (Приложение 3).

В результатах отразить фотоматериалы, численность микроорганизмов, выводы.

## Лабораторная работа №4. Азотфиксирующие микроорганизмы в почве

Цель работы: Выделение свободноживущих азотфиксирующих микроорганизмов из почвы

Оборудование:

- весы,
- сушильный шкаф,
- автоклав,
- термостат,
- микроскоп,
- стерильный бокс.

Материалы:

- чашки Петри,
- шпатель пластиковый,
- колба коническая стеклянная на 1000 мл,
- ватно-марлевые пробки,
- петля микробиологическая,
- спиртовая горелка,
- предметные стекла,
- покровные стекла,
- краситель (генциан фиолетовый 10%).

### Ход работы:

1. Приготовить чистую посуду для проведения исследования (чашки Петри, 1 колба коническая на 1000 мл).
2. Провести стерилизацию посуды сухожаровым методом.
3. Приготовить питательную среду для культивирования азотофиксирующих микроорганизмов (Эшби). Рассчитать навеску сухой среды и объем воды для приготовления (коническая колба на 1000 мл).
4. Провести стерилизацию питательной среды методом автоклавирования.
5. Стерильную питательную среду разлить в стерильные чашки Петри.
6. Произвести посев на чашки Петри.
7. Поместить чашки Петри в термостат для инкубации при  $t=28^{\circ}\text{C}$  в течение 7 сут.
8. Произвести анализ обрастания почвенных комочков.
9. Описать морфологические признаки обрастания.
10. Провести фотофиксацию внешнего вида комочков.
11. Провести микроскопирование.
12. Описать культуральные признаки клеток.
13. Провести фотофиксацию внешнего вида клеток.

### Результаты:

Оформить протокол исследования (Приложение 3).

В результатах отразить фотоматериалы, разнообразие микроорганизмов, выводы.

## Лабораторная работа №5. Микроорганизмы, разрушающие клетчатку (окисление целлюлозы)

Цель работы: Выделение и характеристика разнообразия микроорганизмов, разрушающих клетчатку (окисление целлюлозы)

Оборудование:

- весы,
- сушильный шкаф,
- автоклав,
- термостат,
- микроскоп,
- стерильный бокс.

Материалы:

- шпатель пластиковый,
- колбы конические стеклянные на 500 мл и 250 мл,
- ватно-марлевые пробки,
- фильтр бумажный,
- петля микробиологическая,
- спиртовая горелка,
- предметные стекла,
- покровные стекла,
- краситель (генциан фиолетовый 10%).

### Ход работы:

1. Приготовить чистую посуду для проведения исследования (1 колба коническая на 500 мл и 5 колб конических на 250 мл).
2. Провести стерилизацию посуды сухожаровым методом.
3. Приготовить питательную среду для культивирования микроорганизмов (Омелянского). Рассчитать навеску сухой среды и объем воды для приготовления (коническая колба на 500 мл).
4. Приготовленную питательную среду разлить по 50 мл в конические колбы на 250 мл.
5. Провести стерилизацию питательной среды методом автоклавирования.
6. Произвести посев в конические колбы на 250 мл.
7. Поместить конические колбы на 250 мл в термостат для инкубации при  $t=28^{\circ}\text{C}$  в течение 14 сут.
8. Описать изменения, произошедшие с целлюлозой (бумажный фильтр) за время инкубации.
9. Провести фотофиксацию внешнего вида бумажного фильтра и среды.
10. Провести микроскопирование.
11. Описать культуральные признаки клеток (2-3 шт.)
12. Провести фотофиксацию внешнего вида клеток препарата.

### Результаты:

Оформить протокол исследования (Приложение 3).

В результатах отразить фотоматериалы, выводы.

## **Приложение 1. Питательные среды для культивирования микроорганизмов**

### **Мясо-пептонный бульон (МПБ)**

Для приготовления мясного бульона 500 г мелко изрубленного свежего мяса без костей заливают в эмалированной кастрюле 1 л водопроводной воды и дают настояться 12 ч при комнатной температуре или 1 ч при 50-55<sup>0</sup>С. Мясо отжимают, экстракт процеживают через марлю со слоем ваты, кипятят 30 мин для свертывания коллоидных белков и фильтруют дважды. Фильтрат доливают до 1 л. К 1 л мясного бульона добавляют 5-10 г пептона (первый продукт гидролиза белка) и 5 г поваренной соли. Среду нагревают до растворения пептона, постоянно помешивая. Затем устанавливают нейтральную или слабощелочную реакцию среды, приливая 20%-й раствор Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> до посинения красной лакмусовой бумажки. После установления рН среду снова кипятят 5-10 мин, и белки, свернувшиеся при изменении реакции среды, отфильтровывают через бумажный фильтр.

### **Мясо-пептонный агар (МПА)**

К 1 л мясо-пептонного бульона (МПБ) добавляют 20 г агара. Среду нагревают до растворения агара (температура его плавления – 100<sup>0</sup>С, затвердевания - 40 <sup>0</sup>С).

### **Среда Чапека (г/л дистиллированной воды)**

сахароза или глюкоза – 20,0

NaNO<sub>3</sub> – 2,0

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,0

MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,5

KCl – 0,5

CaCO<sub>3</sub> – 3,0

агар – 20,0

После стерилизации среды перед тем, как разлить ее в чашки Петри, к ней добавляют стерильную молочную кислоту из расчета 4 мл на литр среды.

### **Среда Эшби (г/л водопроводной воды)**

Маннит – 20,0

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,2

MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,2

NaCl – 0,2

K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,1

CaCO<sub>3</sub> – 5,0

агар – 20,0

**Среда Гетчинсона (г/л дистиллированной воды)**

$K_2HPO_4$  – 1,0

$CaCl_2$  – 0,1

$MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,3

$NaCl$  – 0,1

$FeCl_3$  – 0,01

$NaNO_3$  – 2,5

После стерилизации среды в колбу вносят стерильный складчатый фильтр.

**Среда Омелянского (г/л водопроводной воды)**

$NH_4Cl$  – 1,0

$K_2HPO_4$  – 0,5

После стерилизации среды в колбу вносят стерильный складчатый фильтр.

**Приложение 2. Определение влажности почвы**

В металлический или стеклянный бюкс, высушенный до постоянной массы, берут навеску почвы массой 5-10 г.

Сушат почву до постоянной массы при температуре 105°C. Затем определяют массу высушенной почвы.

Влажность почвы рассчитывают как разность массы сырой и высушенной почвы, отнесенной к массе сырой почвы, выраженной в процентах.

Содержание абсолютно сухой почвы равно 100% - % влажности почвы.



### Приложение 3. Пример оформления протокола

Протокол № \_\_\_\_

**Название работы** \_\_\_\_\_  
Выполнил/а \_\_\_\_\_  
Дата \_\_\_\_\_  
Цель работы \_\_\_\_\_  
Место отбора проб \_\_\_\_\_  
Анализируемый объект \_\_\_\_\_

#### Материалы и методы исследования.

1. Используемое оборудование \_\_\_\_\_
2. Используемые материалы \_\_\_\_\_
3. Стерилизация (посуды, сред, инструментов) \_\_\_\_\_
4. Питательная среда \_\_\_\_\_
5. Расчет приготовления среды \_\_\_\_\_
6. Метод посева \_\_\_\_\_
7. Расчёт численности колоний (КОЕ/г)

#### Результаты.

Колония №1 (фото 1.1).

1. Культуральные признаки

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| форма                              |  |
| профиль                            |  |
| край                               |  |
| размер                             |  |
| поверхность                        |  |
| оптические свойства<br>поверхности |  |
| цвет                               |  |
| структура                          |  |
| консистенция                       |  |

## 2. Морфологические признаки (фото 1.2)

|  |  |
|--|--|
| форма клеток   |  |
| форма концов клетки  |  |
| расположение клеток  |  |
| размеры клеток   |  |
| способность к спорообразованию и расположение в клетках спор |  |
| способность к движению и тип жгутикования форма клеток       |  |

## Колония №2 (фото 2.1)

### 1. Культуральные признаки колоний

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| форма                           |  |
| профиль                         |  |
| край                            |  |
| размер                          |  |
| поверхность                     |  |
| оптические свойства поверхности |  |
| цвет                            |  |
| структура                       |  |
| консистенция                    |  |

### 2. Морфологические признаки (фото 2.2)

|  |  |
|--|--|
| форма клеток   |  |
| форма концов клетки  |  |
| расположение клеток  |  |
| размеры клеток   |  |
| способность к спорообразованию и расположение в клетках спор |  |
| способность к движению и тип жгутикования форма клеток       |  |

**Выводы:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## ЛИТЕРАТУРА

- Шлегель Г. Общая микробиология. М.: Мир.-1987.-567 с.
- Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. М.: Изд-во МГУ.-1985.-376 с.
- Марфенина О.Е. Микробиологические аспекты охраны почв. - Изд-во МГУ, 1991. 128с.
- Звяинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. Изд-во МГУ, 2005.
- Добровольский Г.В. Структурно-функциональная роль почв и почвенной биоты в биосфере / Г.В. Добровольский, И.П. Бабьева, Л.Г. Богатырев и др. – М.: Наука, 2003.-364 с.
- Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. -М.: Наука, 2003.-348 с.
- Экология микроорганизмов: Учеб. для студ. вузов / А.И. Нетрусов, Е.А. Бонч-Осмоловская, В.М. Горленко и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.:Издательский центр «Академия», 2004.-272 с.
- Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для вузов.-М.: Дрофа, 2004.-256 с.
- Кураков А.В., Ильинский В.В., Котелевцев С.В., Садчиков А.П. Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях (ред. Садчиков А.П., Котелевцев С.В.). - М.: Издательство "Графикон", 2006. - 336 с.
- Добровольский, Г. В. Экология почв. Учение об экологических функциях почв : учебник / Г. В. Добровольский, Е. Д. Никитин. — 2-е изд., уточ. и доп. — Москва : МГУ имени М.В.Ломоносова, 2012. — 412 с. — ISBN 978-5-211—06211-5. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/114600> (дата обращения: 11.10.2023). — Режим доступа: для авториз. пользователей.
- Коростелёва, Л. А. Основы экологии микроорганизмов : учебное пособие / Л. А. Коростелёва, А. Г. Кощаев. — Санкт-Петербург : Лань, 2021. — 240 с. — ISBN 978-5-8114-1400-0. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/168485> (дата обращения: 11.10.2023). — Режим доступа: для авториз. пользователей.