Практичне заняття №5

Тема: Вивчення мікробних ценозів ґрунту і мікрофлори ризосфери.

Теоретичні відомості:

Ґрунтовий біоорганомінер-й комплекс де в 1г родючого чорнозему міститься мільярди бактер-х клітин, сотні тисяч грибів і актиноміцетів.

За трофічн. потребами поділ-ня:

- **амоніфікатори** (органотрофи) використ. органічні азотвмісні сполуки (білки, амінокислоти, сечовину) Обліков-ся на м'ясо-пептон. агарі (МПА) (Pseudomonas, Bacillus, Micrococcus, Proteus)
- **амілолітичні мікр-ми**: засвоюють мінер. форми азоту та розкладають складні вуглеводи (крохмаль). Обліковують на крохмале-аміачному агарі (КАА) (Streptomyces, та безспорові бактерії)
- **мікроскоп. гриби (мікроміцети)** у початкових фазах деструкції рослин. опаду, розкладні клітковини, лігніну та формув. гумусових речовин. Обліков. на сердов. чалена або сусло-агарі. (Penicillium, Aspergillus, Mucor, Fusarium, Trichoderma)

- **Азотфіксатори та олігонітрофіли:**

здатні зв'язувати молекул. азот атмосф. або задовольняться його мінеральн-ми, Обліков. на безазотистих серед-х Ешбі та Виноградського (Azotobacter, Clostridium, Azospirillum, Rhizobium)

(5-15 см) найвища чисельність і біохімічна активність в орному шарі.

(3) зони концентрув. мікроорг-в:

Ризосфера – вузька зона ґрунту (1-3мм), яка прилягає до коренів рослин та перебуває під їхнім прямим впливом.

Ризоплана – поверхня самого кореня рос-ни, на яких мікроор-ми формують щільні мікробні асоціації та біоплівки.

Філосфера – поверхня надземних органів рос-н (листя, стебла) де розвив-ся епіфітна мікрофлора

Явище стимуляції розмнож-ня мікроорг-в у прикорен. зоні порівняно з ґрунтом, вільним від коренів, наз. ризосферним ефектом.

(R/s ratio) вираж-ся відношенням чисельності мікр-в у 1г ризосф. ґрунту (R) до їхньої чисел-ті у 1г перифір. (контроль) ґрунту (S)

$$E = (R/S) = N_{ризосфера} / N_{контроль}$$

Велич. коеф. R/S для бактер. станов. тобто 100 і більше

Мікрофлора ризосфери виконує роль зах. біол. бар'єра; сапрофітні бактерії продукують антибіотики, фітоауксини та гібереліни, мобілізують важкорозч. фосфати і стимул. кореневе живлення рослин.
Водночас у ризосфері можуть накопичуватись і денітрифік. або фітопатогенні при порушенні співвідн.

(1) Відбір проб та приготування розведень ґрунтових суспензій.

1) **Відбір ризосф. г.** – обережно виконують рослину разом із грудкою ґрунту, легким струшуванням видаляють слабозв'яз. перефер. г., т., що міцно утримується на коренях (ризосферний) обережно зчищають стерил. скальпелем у стер. боксі чи папір.

2) **відбір контр-го г.**; з міжрядь тієї ж ділянки з глибини 5–15 см відбирають пробу перефер. (контр-го) г., вільного від коренів.

3) **приготув. вихідного розвед-ня (1:10)** зважують по 10 г ризосф. та контр. ґрунту на вагах. Вносять кожну навіску в окремі конічні колби з 90 мл стерил. водопров. води (розведен. 10^{-1}). Колби збовтують на ротац. струшув. протяг. 10 хв.

4) **приготування серії розведень;** окремим стерил. піпетками послідовно переносять по 1 мл суспензії у пробірки з 9 мл стерил. води, отримують розведення 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}.

(2) Висів ґрунтових суспензій на елективні живильні середовища

Для обліку чисел-ті різних груп провід. поверхн. або глибин. висів з відповід-х розведень у стер. чашки Петрі у 3-разовій повторності;

Живильне середовище	Робоче розведення	Обліковувана група мікроорг-в	Умови інкубації
М'ясо-пептон. агар (МПА)	10^{-5} – 10^{-6}	амоніфікуючі бак. (органотрофи)	24–48 годин при 28–30°С
Крохм.-аміач. агар (КАА)	10^{-4} – 10^{-5}	Актинобакт-ї та амілолітичні бак.	7–10 діб при 28°С
Середов. Чапека (сусло-агар)	10^{-3} – 10^{-4}	мікроскоп. гриби (мікроміцети)	3–5 діб при 25°С
Середов. Ешбі (безазотисте)	10^{-2} – 10^{-3}	Азотобактер та олігонітрофіли	5–7 діб при 28°С

(3) Дослідження мікрофлори ризоплану (поверхні кореня)

1) **метод відбитків** (за Мешкінат):

стерил. пінц. беруть відмиті у стер. воді відрізки корня (1–2 см) і прикладають, щоб послідовно у декількох місцях до застиглої поверхні МПА або КАА в чашці Петрі. Корінь видаляють, чашки інкубують при 28°С протягом 24–48 год.

2) **ш-д кореневих зрізів;** стер. відрізки коренів розтрощують на повер-ні розплавл-го й охолодж. до 45°С безазотист. агару Ешбі. Навколо коренів 3–5 діб спостер. розв. специф. колоній азотфіксаторів або бульбочкових бактерій.

④ Приготув. та мікроскопія забарв-х препаратів

1. На знежирене предм. скло наносять краплю розвед. грунтів. суспензії (10^{-3}) або краплю зливу з кореня.

2. Бактеріолог. петлею розмазують краплю в тонкий мазок площею 1–2 $см^2$, висушують на повітрі та фіксують у полум'ї спиртівки.

3. Фарбують мазки розчином фуксину Ціля-Нільсена (1–2 хв) або провор. диференц. фарбув-ня за методом Грама.

4. Промивають водою, підсушують фільтр. папером та мікроскопують з імерсійним об'єктивом (90×), замальовують морфол. типи бактерій (коки, палички, звиті форми) та міцелій грибів у лабор. журнал.

④ Обробка експерим-х даних та розр-ки:

Перерахунок кіл-ті життєзд. клітин мікроор-в (КУО) на 1 г абс. сух. г.

$$A = (N \times C \times K) / m$$

A – кіл-ть КУО в 1 г абс. сух. г.
N – середня кіл-ть колоній, підрах. на чаш. Петрі
C – кратність розвед. грунтів. суспензії (10^4, 10^5)
K – коеф-т перерах. на абсол. сух. г. $K = \frac{(100+w)}{100}$
m – об'єм суспензії, нанесен. на чашку (мл)

w – вологість грунту

Еколого-трофічна група мікроор-в	Живильне середовище	Чисельність у контролі (S) КУО/г	Чис-ть у ризосфері (R), КУО/г	Ризосферний ефект R/S
Амоніфікуючі бактерії	МПА	$12,5 \times 10^6$	$148,0 \times 10^6$	11,8
Актиномікети	КАА	$3,2 \times 10^6$	$8,5 \times 10^6$	2,7
Мікроск. гриби	Середовище Чапека	$45,0 \times 10^3$	$180,0 \times 10^3$	4,0
Олігонітрофіли	Сер-ще Ешбі	$1,8 \times 10^6$	$24,5 \times 10^6$	13,6

⑤ Контрольні запитання:

① Ґрунтовий мікробіоценоз – сукупність мікроор-в ґрунту
Ризосфера – зона ґрунту навколо кореня рослини
Ризоплана – безпосередня поверхня кореня
Філосфера – поверхня надземних частин рослин

② Кореневі виділ., містять цукри, амінокислоти, орган. кислоти, вітаміни та ферменти. Вони живлять і стимулюють розвиток мікроор-в.

③ Ризосферний ефект – збільшення кількості мікроор-в біля коренів.
R/S = кіл-ть мікроор-в у ризосфері / кіл-ть у ґрунті

④ Найбільша кіл-ть мікроор-в спостерігається під час активного росту рослини,
До кінця вегетації їх кіл-ть і склад змінюються,

⑤ Амоніфікатори – м'ясо-пептоний агар (МПА)

Актиноміцети – крохмал-аміак. агар
Мікроміцети – середовище Чапека
Олігонітрофіли – середовище Ешбі

⑥ Позитивна роль – забезпечення рослин поживними речовинами, стимулювання росту та захист від хвороб.
Негативна – конкуренція за поживні речовини й виділення токсинів,

⑦ Rhizobium – утвор. у бульбочках на коренях бобових

Azospirillum – живуть біля коренів злакових рослин

Azotobacter – вільноживучі бактерії ґрунту, заселяють прикореневу зону.

⑧ Для вивч. мікрофлори використ. мікроскопію, метод змивання мікроор-в з коренів, посів на поживні середовища та підрахунок колоній,