Практичне заняття №2

Тема: Облік чисельності мікроорганізмів. Ідентифікація мікроор-в.

Теоретичні відомості:

Облік чисельності мікр-в у ґрунті є базовим показником біол-ї активн-ті та екологіч. стану агроекосистем.

прямі методи	побічні методи
мікроскопічні (за Виноградорським у модифікації Федорова) дозволяє підраховувати загальну кільк-ть мікробних клітин безпосер. у препараті ґрунт. суспензії відомого об'єму на фіксований площі предметного скла.	культуральні, метод посіву на щільні живильні середовища базується на висіванні суспензій ґрунту на агаризов. середовища. Окрема 1 колонія розрост-ся з однієї або кількох життєзд-х клітин, результ-т виконаної у колонієутвор-х один. (КУО) на 1г сухого ґрунту.

* Характеристика елективних середовищ:

- м'ясо-пептонний агар (МПА)

амоніфікуючі бактерії (органотрофи)

(Розклад білків, та азотовмісних сполук, виділення амоніаку)

- Крохмале-аміачний агар (КАА)

актиноміцети та мінералотрофи

(Участь у мінералізації гумусу та важкодоступних сполук)

- Середовище Чалека

мікроелементний ґрунтовий (мінеральний)

(Деструкція клітковини, лігніну, утворення ґрунтової структури)

- Безазотисте середовище Ешбі

вільноживучі азотфіксатори (Azotobacter)

(Фіксація атмосф-го N₂, збагачення ґрунту азотом)

(*) Принципи ідентифікації м-в:

- морфологічні ознаки: форма клітин (нитки, палочки, звивисті) розміри, наявність спор, капсул, розташ-ня джгутиків)
- тинкторіальні властивості: однорідність забарвлення, відношення до забарвлення за Грамом (грампозитивні - фіолетові, грамнегативні - рожеві)
- культуральні ознаки: характер росту на рідких та щільних середовищах (форма, контур, поверхня, край, консист.-ня колонії)
- фізіолого-біохімічні власт-ті: тип дихання (аероби / анаероби), відношення до джерел С (вуглець) і N (азот) ферментативна активність (каталазна, оксидазна, лецитиназна, амілолітична)

Звіт:

Математичні розрахунки:

$$N = (a \times 10^{n}) / (V \times K_B)$$

N - чисельність мікроорг-в у 1 г сух. ґрун. (КУО/г)
a - середня кільк-ть колоній, що виросли
10^{n} - ступень розведен. в чашці Петрі
V - об'єм суспензії ґрунтової суспензії
K_B - коеф-т гігроскоп. вологості ґрунту
(K_B = 1 - (вологість / 100)

- Задача №1

Дано: кіл-ть колоній - 45, розведення 10^{-5}, об'єм посіву - 0,1 мл, вологість ґрунту - 20%

Знаходимо коеф-т вологості
K-в = 1 - 20 : 100 = 0,8

Обчисл. чисел-ть бактерій:

$$N = \frac{45 \times 10^{5}}{0,1 \times 0,8} = 56,25 \text{ млн КУО/г сухого ґрунту}$$

• Задача №2

Дано: кільк-ть колоній – 32,
розведення 10^{-4},
об'єм посіву – 0,1 мл
коеф. вол-ті – 0,85

$$N = \frac{32 \cdot 10^4}{0,1 \times 0,85} = 3,76 \text{ млн КУО/г абсолют. сухого ґрунту}$$

• Задача №3

Дано: загал. кіл-ть грудочок – 50
обросли колоніями – 42

Обчислюємо відсоток обростання:

$$P = \frac{n}{N} \times 100\%$$

P – відсоток обростання грудочок %

n – кіл-ть груд, оброслих колоніями
N – загальна кіл-ть висіяних грудочок ґрунту

$$P = \frac{42}{50} \cdot 100\% = 84\%$$

Відсоток обростання стан. 84%.

Лабораторна таблиця 1.
(результат обліку чисельності мікроор-в)

Еколого-трофічна група	Середовище	Розведення	Кількість колоній	Чисельність
Амоніфікатори	МПА	10^{-5}	45	56,25 млн (КУО/г)
Актиноміцети	КАА	10^{-4}	32	3,76 млн (КУО/г)
Мікроміцети	Чапека	10^{-2}	не визначено	не визначено
Азотфіксатори	Ешбі	ґрунтові грудочки	42 із 50	84%

(*) Для середовища Чапека потрібне фунгістатичне кількість колоній →

Лабор. таблиця №2 Морф. біохім. хар-ка виділеного ізоляту	
Шифр ізоляту джер. виділення	Штам Б1 (ізольовано з МПА, дерново-підзолистий ґрунт
Морфол-я колоній на МПА	форма: кругла, колір: кремовий, край: рівний, поверхня: блискуча
Морф-я клітин (мікроскоп)	палички із закруглен. кінцями, розмір 1,2 × 3,0 мкм
Забарвлення за Грамом	грампозитивні (Gram+) фіолет. забарвлення
Наявність ендоспор	утворює овальні центрально розташовані спори
Ферментативна активність	каталазопозитивний (3% H_2O_2 – активне виділення бульбашок O_2)
Системат. висновок	рід Bacillus (Bacillus subtilis

✱ Відповіді на контрольні питання:

①	Прямі	побічні
підрахунок клітин за допом-ю мікроскопа	вирощув. мікроорг-в на поживних серед-х і підрахунку колоній

② КУО - колонієутворююча одиниця, тобто життєздатна клітина або група клітин, здатна утвор. колонію.

Культур. метод виявляє мікроорг-ми, які мають рости за заданих умов і на використаному поживному серед-чі

③ Амоніфікатори - м'ясо-пептонний агар (МПА)

Актиноміцети - крохмале-аміачний агар (КАА)

Мікроміцети - сереж-ще Чапека

Азотфіксатори - безазотисте середо-ще Ешбі

④ $K_{-В} = 1 - W/100$ (W - вологість ґрунту у відсотках)

Цього враховують, щоб перерахувати чисельність мікроор-в на 1г абсолют. сухого ґрунту.

⑤ Під час фарбування кристалічний фіолетовий і обробки розчином Люголя утвор-ся забарвлений комплекс

| Грампозитивні бактерії | Грамнегативні
---|---|---
| утримують його завдяки товстому шару пептидоглікану й запасаються фіолет-ми після знебарвл-я спиртом. | знебарвлюються а після додаткового фарбування набувають рожевого кольору

⑥ Етапи ідентиф. за Берджі:

а) вивчення форми, розм-в і розташ. клітин

г) виз-ня забарвл-я за Грамом

з) дослідж. форми, кольору та поверхні колоній

и) визнач. наявності спор та ін. стр-р

і) проведення фізіолого-біохім. тестів

в) порівняння отриманих ознак із даними визначника Берджі та встановлення ймовірної систем-ї належності.

⑦ Каталазний тест використ-ть для визнач. здатності мікроор-в розкладати пероксид водню на воду й кисень. Позитивна реакція супроводж-ся утвор-м бульбашок газу.

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2 \uparrow$$