



Національний університет
водного господарства
та природокористування

Міністерство освіти і науки України
Національний університет водного господарства та
природокористування
Навчально-науковий інститут агроекології та землеустрою
Кафедра агрохімії, ґрунтознавства та землеробства

05-01-203

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до лабораторних занять з навчальної дисципліни
«Біологія ґрунтів з основами сільськогосподарської
мікробіології»
для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня
за спеціальністю 201 «Агрономія»
денної та заочної форм навчання

Рекомендовано науково-
методичною комісією зі
спеціальності 201
«Агрономія».
Протокол № 10 від
10.07.19 р.

Рівне – 2019



Національний університет

водного господарства

та природокористування

Методичні вказівки до лабораторних занять з навчальної дисципліни «Біологія ґрунтів з основами сільськогосподарської мікробіології» для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня за спеціальністю 201 «Агрономія» денної та заочної форм навчання / Володимирець В. О., Кучерова А. В. – Рівне : НУВГП, 2019. – 85 с.

Укладачі: Володимирець В. О., к.б.н., доцент кафедри агрохімії, ґрунтознавства та землеробства; Кучерова А. В., ст. викладач кафедри агрохімії, ґрунтознавства та землеробства.

Відповідальний за випуск – Колесник Т. М., к.с.-г.н., доцент, завідувач кафедри агрохімії, ґрунтознавства та землеробства.



Національний університет
водного господарства
та природокористування

© Володимирець В. О.,
Кучерова А. В., 2019
© НУВГП, 2019



З М І С Т

Вступ	4
Лабораторне заняття № 1. Мікробіологічна лабораторія, її оснащення та комплектування, охорона праці і техніка безпеки під час проведення мікробіологічних досліджень	5
Лабораторне заняття № 2. Методи виділення, культивування та мікроскопування мікроорганізмів ..	12
Лабораторне заняття № 3. Вивчення колоній і техніка виділення чистих культур бактерій	21
Лабораторне заняття № 4. Ґрунтові водорості	30
Лабораторне заняття № 5. Ґрунтові Найпростіші тварини	37
Лабораторне заняття № 6. Нематоди та дрібні членистоногі ґрунтового середовища	43
Лабораторне заняття № 7. Вивчення розподілу мікроорганізмів у різних типах ґрунтів методом скелець обростання Росі-Холодного	54
Лабораторне заняття № 8. Визначення каталазної активності ґрунтів	58
Лабораторне заняття № 9. Денітрифікуючі бактерії	64
Лабораторне заняття № 10. Вільноживучі азотфіксатори	68
Лабораторне заняття № 11. Амоніфікуючі бактерії ..	74
Лабораторне заняття № 12. Нітрифікуючі бактерії ..	79
Додаток 1. Правила техніки безпеки під час роботи у навчальній мікробіологічній лабораторії	85



ВСТУП

Біологія ґрунтів з основами сільськогосподарської мікробіології є науковою галуззю знань, що вивчає живу фазу ґрунту, передусім мікроорганізми, та її роль у ґрунтових процесах. Предметом її вивчення є особливості умов існування в ґрунтовому середовищі, таксономічна та видова різноманітність ґрунтової біоти, екологічні групи ґрунтових організмів і їхня роль, особливості організації та життєдіяльності вірусів і бактерій, найважливіші ґрунтові процеси, що викликаються різними групами мікроорганізмів, методи польових і лабораторних досліджень ґрунтових організмів.

Програма дисципліни «Біологія ґрунтів з основами сільськогосподарської мікробіології» забезпечує набуття здобувачами компетентностей про особливості ґрунтового середовища, систематичний склад ґрунтової біоти, організацію прокаріотичних організмів. Зміст програми також передбачає засвоєння знань про процеси впливу життєдіяльності ґрунтових мікроорганізмів на ґрунт і його властивості, про способи використання ґрунтових організмів у практичній діяльності.

Основними завданнями вивчення навчальної дисципліни є:

- знання особливостей існування у ґрунтовому середовищі;
- засвоєння знань про таксономічні групи ґрунтової біоти;
- знання будови, структури, екологічних особливостей, відтворення та процесів життєдіяльності вірусів і бактерій;
- формування уявлень про участь різних груп організмів у процесах, які відбуваються у ґрунтах;
- опанування лабораторними методами досліджень ґрунтової біоти.

Метою проведення лабораторних занять із дисципліни є набуття здобувачами вмінь: працювати з мікроскопом,



виготовляти і розглядати мікропрепарати, закладати лабораторні та польові досліди з культурами різних груп ґрунтових організмів, їх вирощувати та досліджувати, визначати й аналізувати біологічну активність ґрунтів.

Лабораторне заняття № 1

Тема: Мікробіологічна лабораторія, її оснащення та комплектування, охорона праці і техніка безпеки під час проведення мікробіологічних досліджень.

Мета заняття: ознайомитися із приміщенням навчальної мікробіологічної лабораторії, необхідним для її функціонування обладнанням та оснащенням робочого місця; засвоїти головні положення інструктажу із охорони праці і техніки безпеки під час проведення мікробіологічних досліджень; ознайомитись із способами стерилізації поживних середовищ, лабораторного посуду та інших матеріалів, засвоїти послідовність дій під час їхньої стерилізації.

Обладнання та матеріали: сушильна шафа, апарат Коха, чашки Петрі, колби, бактеріологічні петлі, штатив із пробірками, пастерівські піпетки, пінцет, скальпель, лоток із містком для фарбування препаратів, предметні та покривні стекла, мило, сірники, газові або спиртові пальники, вата, ватні корки, папір для загортання скляного посуду, серветки бавовняні, фільтрувальний папір, посудина з дезінфікуючим розчином, набір барвників, питна сода, ілюстраційний матеріал.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Мікробіологічна лабораторія повинна складатися як мінімум із чотирьох приміщень:

- 1) кімната, в якій проводять попередню підготовку матеріалу й обладнання для проведення мікробіологічних дослідів;
- 2) кімната для роботи з чистими культурами мікроорганізмів – бокс;



3) автоклавна – спеціально обладнане приміщення, де проводиться стерилізація матеріалу та поживних середовищ;

4) мийна кімната.

Мікробіологічна лабораторія повинна бути укомплектована приладами й обладнанням, необхідним для роботи з різними групами мікроорганізмів із урахуванням особливостей їхньої біології, а також для проведення дослідів і виконання мікробіологічних аналізів різних матеріалів.

Мікробіологічна лабораторія повинна бути оснащена необхідними меблями: лабораторними столами; стільцями або гвинтовими табуретками; шафами, що закриваються, для збереження посуду, поживних середовищ, реактивів та апаратури.

Із основного устаткування мікробіологічної лабораторії обов'язковими є: штативи для пробірок; термостат для вирощування мікроорганізмів (пристрій, який підтримує постійну задану температуру упродовж значного інтервалу часу); обладнання для стерилізації (автоклав, сухожарова піч Пастера, яка може підтримувати температуру до 200° С, апарат Коха, водяна баня, ультратермостат); мікроанаеростат (прилад для вирощування анаеробних мікроорганізмів); ламінар (пристрій, який використовують для пересіву культур мікроорганізмів); люмінодатна камера для вирощування фотоавтотрофних мікроорганізмів; бактеріальні фільтри різної конструкції; центрифуги; апарат для дистиляції води; вакуумні насоси; холодильні установки для збереження музейних культур мікроорганізмів і швидкопсувних препаратів; емальовані каструлі, бачки, цебра й інший посуд, необхідний для варіння поживних середовищ і кип'ятіння відпрацьованого матеріалу; рН-метри, аналітичні ваги.

Крім цього, у лабораторії необхідно мати достатню кількість склопосуду та інструментів, які використовуються під час мікробіологічних досліджень (чашки Петрі, пробірки, стекла предметні та покривні, піпетки пастерівські та градуйовані, шпатель скляні, мірні циліндри, колби, ступки



порцелянові, петлі бактеріологічні, пінцети, ножиці, скальпелі, лотки емальовані й ін.).

У мікробіологічній лабораторії також повинні бути у достатній кількості сухі поживні середовища, набір хімічних компонентів, які найчастіше використовуються для приготування поживних середовищ, набір вуглеводів, барвників і дезінфікуючих засобів (хлорамін, фенол, їдкий натр і ін.), фільтрувальний папір, імерсійна олія, спирт, ефір та інші реактиви і матеріали.

Лабораторні столи з підведеними до них електроенергією, газом і водою розміщують у лабораторії так, щоб світло від вікон падало спереду або збоку від працюючого, краще з лівої сторони. Для зручності дезінфекції поверхню лабораторних столів покривають лінолеумом, а найкраще вогне-кислотостійким пластиком. На робочому столі повинні бути: освітлювач, мікроскоп, який закривається скляним або хлорвініловим ковпаком, набір барвників і реактивів для фарбування мікробів, газовий або спиртовий пальник, штатив для пробірок, бактеріологічна петля, пастерівські та градуйовані піпетки, шпатель (у склянці), предметні та покривні стекла, ванночка з містком для фарбування мікробів, посудина з дезінфікуючою рідиною (1%-ий розчин хлораміну або 3%-ий розчин фенолу), імерсійна олія, склографи, фільтрувальний папір, бавовняна серветка, шматки господарського мила для знежирення стекел, сірники та ін.

Необхідною умовою функціонування мікробіологічної лабораторії є забезпечення необхідних умов і технічних засобів для стерилізації. Стерилізація – це повне знищення мікроорганізмів, їхніх спор і усього живого в поживних середовищах, матеріалі, посуді, інструментах і інших предметах лабораторного вжитку.

Найчастіше застосовують хімічну та фізичну стерилізацію. Хімічна стерилізація ґрунтується на використанні різних хімічних речовин, які викликають загибель мікроорганізмів. Така стерилізація застосовується



для обробки вакцин, сироваток та інших біопрепаратів, консервованих різними антисептиками (хлороформом, хінозолом, мертіолом і ін.). Хімічні речовини застосовуються також для знищення патогенних (хвороботворних) мікроорганізмів в об'єктах зовнішнього середовища: на робочому місці, у приміщеннях, на робочому одязі, на руках і т.п. У цих випадках говорять про дезінфекцію. Для дезінфекції застосовують 3-5%-ий водний розчин фенолу, 0,5-2%-ий розчин формаліну, 10%-ий розчин хлорного вапна, 0,5-3%-ий розчин хлораміну, розчини йоду, сулеми й ін.

До фізичних методів стерилізації відносяться: стерилізація високою температурою, ультрафіолетовими променями, іонізуючим випромінюванням, ультразвуком, холодна стерилізація фільтруванням через спеціальні бактеріальні фільтри.

Стерилізація високою температурою – один із надійних і найбільш розповсюджених фізичних методів. Вона проводиться шляхом прожарювання предметів у полум'ї пальника, кип'ятінням, сухим жаром (гарячим повітрям), перегрітою парою під тиском і текучою парою. Прожарювання у полум'ї – швидкий і надійний метод стерилізації. Цим методом стерилізують бактеріологічні петлі, голки, пінцети, предметні стекла, пастерівські піпетки й інші дрібні інструменти. Для стерилізації оброблюваний предмет кілька разів проводять через полум'я пальника. Під час прожарювання відбувається згоряння мікробів і їхніх спор. Кип'ятіння – це найпростіший спосіб стерилізації голок, шприців, інструментів, воно проводиться у спеціальних стерилізаторах упродовж 10-15 хвилин. Додавання до води 1-2% (від маси води) питної соди значно підвищує стерилізуючу дію кип'ятіння та усуває твердість води, і таким чином, захищає металеві предмети від іржі після кип'ятіння. Цей метод не забезпечує повної стерилізації, тому що спори деяких бацил і клостридій витримують кип'ятіння упродовж декількох годин. Стерилізація сухим жаром або гарячим



повітрям проводиться у спеціальних печах Пастера або сухожарових шафах. Стерилізують сухим жаром вату, марлю, пробірки, пастерівські та градуйовані піпетки, колби, чашки Петрі й інший скляний посуд. Стерилізація парою під тиском є найефективнішим у бактеріологічній практиці способом стерилізації. Навіть одноразова стерилізація парою під тиском знищує не тільки вегетативні, але і спорові форми бактерій. Стерилізацію парою під тиском проводять у спеціальних пристроях – автоклавах (рис. 1.1). Стерилізація в автоклаві проводиться, як правило, за тиску в 1 атмосферу (понад нормального атмосферного), що відповідає $120,6^{\circ}\text{C}$, або за 1,5 атмосфери, що відповідає 126°C . Тривалість стерилізації залежить від властивостей об'єкту, що стерилізується, і ступеня його бактеріального забруднення та коливається від 30 хвилин до 1-1,5 годин. Стерилізують в автоклаві поживні середовища, лабораторний посуд, відпрацьовані культури.



Рис. 1.1. Сучасний автоклав для стерилізації.

Для стерилізації приміщень часто використовують кварцові лампи, які випромінюють ультрафіолетові промені.



ХІД ЗАНЯТТЯ

1. Використовуючи довідкову літературу та ілюстраційний матеріал, ознайомитись із організацією та оснащенням мікробіологічної лабораторії.
2. Під час екскурсії лабораторіями кафедри ознайомитись із представленими тут обладнанням, пристроями та матеріалами, які використовуються для дослідження ґрунтових мікроорганізмів, засвоїти їхнє призначення та загальні навички роботи.
3. Використовуючи додаток 1, засвоїти основні правила техніки безпеки під час роботи у навчальній мікробіологічній лабораторії.
4. Використовуючи довідкову літературу та ілюстраційний матеріал, ознайомитись із найпоширенішими методами стерилізації, які використовуються в мікробіологічній лабораторії.
5. Простерилізувати бактеріологічну петлю в полум'ї спиртового пальника (цей процес називається фламбуванням). Для цього бактеріологічну петлю, яку виготовляють із платинового або ніхромового дроту і яка слугує для відбору мікробного матеріалу, майже вертикально вносять у полум'я для рівномірного розжарювання дроту, дріт петлі розжарюють до почервоніння, також одночасно прожарюють прилягаючу до петлі частину тримача, яка буде вводиться усередину посудини. Зразу ж після стерилізації петлю вводять у посудину із досліджуваними мікроорганізмами.
6. Простерилізувати у сухожаровій шафі запропонований посуд. Перед стерилізацією посуд добре миють, висушують, закривають пробірки та колби ватними корками, а піпетки загортають у папір. Стерилізацію проводять за температури 160-170⁰ С упродовж 1,5 години з моменту досягнення цієї температури. Показником достатньої стерилізації є незначне пожовтіння паперу, у який загорнуті предмети, що стерилізуються. Після закінчення стерилізації, шафу виключають, але її двері не



відкривають до повного охолодження, оскільки холодне повітря, що поступає сюди, може викликати утворення тріщин на посуді.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Призначення та організація мікробіологічної лабораторії.
2. Оснащення та комплектація мікробіологічної лабораторії, призначення основних пристроїв і обладнання.
3. Поняття про стерилізацію, її функціональна роль.
4. Основні методи стерилізації.
5. Суть хімічної стерилізації, речовини, які тут застосовуються.
6. Суть фізичної стерилізації, пристрої, які тут використовуються.
7. Фактори, які впливають на вибір способів стерилізації.
8. Послідовність стерилізації посуду у сухожаровій шафі.

Інформаційні ресурси:

Ежов Г.И. Руководство к практическим занятиям по сельскохозяйственной микробиологии. Москва : Высшая школа, 1981.

Емцев, В.Т., Мишустин Е.Н. Сельскохозяйственная микробиология: практ. пособие. Москва : Издательство Юрайт, 2017.

Зенова Г.М. и др. Практикум по биологии почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 2002.

URL: <https://agroinf.com/mikrobiologiya> – Назва з екрана.

URL: intranet.tdmu.edu.ua/data/cd/mikrobiologiya – Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=1nf-ALc6lW0> – Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=qXXcuErXEAg> – Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=3YIITrllwwU> – Назва з екрана.



URL: <https://www.youtube.com/watch?v=kXJFkWgL24U> –

Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=grHDjKFMxlo> –

Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=mfeYWHqMCKk>

– Назва з екрана.

Лабораторне заняття № 2

Тема: Методи виділення, культивування та мікроскопування мікроорганізмів.

Мета заняття: Засвоїти методи виділення та посіву на поживних середовищах ґрунтових мікроорганізмів; ознайомитись із порядком мікроскопування препаратів мікроорганізмів із використанням імерсійної системи мікроскопа.

Обладнання та матеріали: Мікроскоп “Биолам С11”, технохімічні ваги, сухожарова піч, термостат, водяна баня, фарфорові чашки із товкачиком, штатив із пробірками, градуйовані піпетки на 1 мл та 10 мл, колби на 100 мл, стерильні хімічні стакани на 50 мл, скляні шпателі, чашки Петрі, лійки, бактеріологічна петля, спиртовий пальник, склогограф, стерильне агаризоване середовище (МПА), дистильована вода, зразки ґрунту, постійні мікропрепарати мікроорганізмів.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Основним етапом будь-якого мікробіологічного дослідження є виділення мікроорганізмів із досліджуваного матеріалу, що містить суміш різних видів мікроорганізмів, і отримання із них чистої культури. Матеріалом для виділення можуть бути зразки ґрунту, насіння, надземні частини або корені рослин і т.д. Доставлений у лабораторію матеріал піддається бактеріологічному дослідженню у той же день.

Для отримання чистої культури мікроорганізмів використовуються різноманітні поживні середовища, які



відрізняються за походженням, консистенцією, складом і призначенням. На таких середовищах мікроорганізми вирощують (культивують) у лабораторних умовах, щоб отримати чисті культури бактерій або мікроскопічних грибів, і для накопичення їхніх великих кількостей, а також для вивчення їхніх морфологічних та фізіологічних властивостей.

Будь-яке поживне середовище повинне у своєму складі містити усі компоненти, що необхідні для росту та розмноження конкретного виду мікроорганізму, у легкозасвоюваній формі, бути ізотонічним, мати оптимальні вологість, в'язкість, значення рН, окислювально-відновний потенціал, бути стерильним і, по можливості, містити основні мікроелементи, вітаміни, пуринові та піримідинові азотисті основи, незамінні амінокислоти (ці інгредієнти, які бактерії не здатні самостійно синтезувати з інших речовин, виконують роль каталізаторів метаболічних процесів або включаються до складу клітинних білків і нуклеїнових кислот).

Для культивування мікроорганізмів готують поживні середовища такого складу, який найбільше відповідає вимогам тієї або іншої фізіологічної групи мікробів, прояву їхніх певних властивостей у відповідності з поставленою метою. Залежно від походження поживні середовища поділяють на природні та штучні. У складі останніх в особливу групу виділяють синтетичні середовища.

Природними середовищами називаються такі, котрі представляють собою натуральний продукт: молоко, яйце, овочі або природний субстрат – осаджена сироватка крові, жовч та ін. Штучні середовища готують за певними рецептами із різних настоїв або відварів тваринного чи рослинного походження із додаванням неорганічних солей, вуглеводів і азотовмісних речовин. Синтетичні середовища готують із хімічно чистих речовин (солей, вуглеводів, амінокислот, вітамінів і ін.), узятих у відповідних співвідношеннях.

За консистенцією розрізняють середовища рідкі, напіврідкі та щільні (тверді). Рідкі середовища складаються із води та розчинених у ній речовин (м'ясна вода, м'ясо-



пептонний і бобово-пептонний бульйон і ін.). Тверді середовища готують шляхом додавання до рідкого середовища загущуючі речовини: желатини (10-15%), агар-агару (1-2%). Напіврідкі середовища містять такі ж загущуючі речовини, але в меншій кількості (0,2-0,3% агар-агару).

За призначенням поживні середовища поділяють на звичайні, спеціальні, селективні та диференційно-діагностичні.

Після приготування або отримання в готовому вигляді поживного середовища проводять посів мікроорганізмів. Рідкий матеріал для посіву беруть стерильними бактеріологічною петлею, пастерівською або градуйованою піпеткою. Під час узяття петлею рідини вона повинна утворити в кільці петлі тонку прозору плівку. Піпетками користуються у тих випадках, коли матеріал засівають у великому або точно відміряному об'ємі. Із щільного матеріалу, що може емульгуватись, готують суспензію у фізіологічному розчині (0,85%-ий розчин NaCl). У випадку посіву досить щільного матеріалу, з якого не можна приготувати суспензію, його попередньо розтирають у стерильній ступці зі стерильним піском або подрібленим склом, потім додають фізіологічний розчин і (після приготування суспензії) проводять посів.

Під час посіву у рідке поживне середовище, дотримуючись стерильності, петлею беруть посівний матеріал, вносять його у пробірку із рідким поживним середовищем і легко струшують петлею у верхньому меніску рідини або розтирають на стінці пробірки, а потім змивають рідким середовищем. У випадку використання для посіву піпетки, її вміст випускають на стінку пробірки з верхнього краю рідини або вносять піпетку всередину середовища і матеріал, що міститься у ній, видувають. Після посіву петлю або піпетку витягають з пробірки, петлю стерилізують прожарюванням у полум'ї і ставлять у штатив, піпетку миють і стерилізують у сухожаровій шафі. Отвір пробірки із засіяною культурою обпалюють на полум'ї та відразу закривають корком, швидко



провівши його через полум'я так, ніби прагнуть вштовхнути у пробірку частину полум'я. Засіяні пробірки струшують, підписують і розміщують у термостаті із заданою температурою для вирощування.

Посів на щільні поживні середовища. Бактеріологічну петлю прожарюють у полум'ї. Для посіву на скошений агар пробірки з культурою та агаром беруть у ліву руку так, щоб скошена поверхня агару була звернена доверху. Корок пробірок захоплюють мізинцем правої руки і витягають над полум'ям. Прожареною петлею захоплюють матеріал і за строгого дотримання стерильності переносять у пробірку зі свіжим поживним середовищем. Петлю з культурою опускають до поверхні агаризованого середовища. Доторкаються петлею до поживного середовища і ковзними рухами по скошеній поверхні агару наносять пряму лінію або зигзагоподібні штрихи. Розподіливши матеріал, петлю виймають. Край пробірки обпалюють у полум'ї. Пробірку над полум'ям закривають пробкою, підписують і ставлять у штатив. Петлю прожарюють у полум'ї спиртівки і ставлять у штатив (рис. 2.1).

Посів у чашку Петрі проводять біля спиртівки. Чашку фіксують на столі лівою рукою. Кришку піднімають великим, середнім і вказівним пальцями настільки, щоб у щілину, що утворилася, вільно проходила петля або шпатель. Посівний матеріал захоплюють петлею і штриховими рухами розподіляють по поверхні поживного середовища. Бактеріологічну петлю прожарюють у полум'ї безпосередньо перед узяттям матеріалу і негайно після посіву. Можна нанести краплю посівного матеріалу на поверхню агару петлею або піпеткою, а потім розтерти її стерильним шпателем. Стерильні піпетки і скляні шпателі перед посівом розгортають з паперу над полум'ям спиртівки, а після посіву опускають у дезінфікуючий розчин (рис. 2.2).

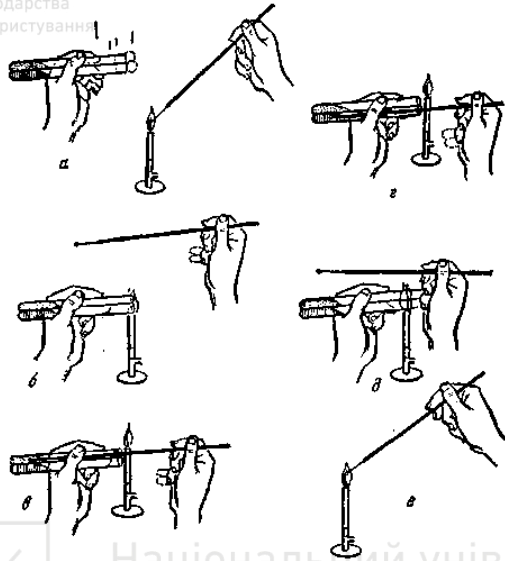


Рис. 2.1. Техніка посіву досліджуваного матеріалу.

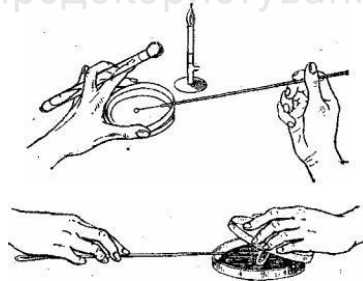
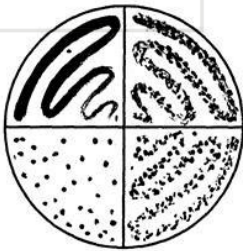


Рис. 2.2. Посів досліджуваного матеріалу на тверді поживні середовища в чашку Петрі.

На чашках Петрі з боку дна, а на пробірках у верхній частині роблять напис склогографом або тушшю, де вказують дату, назву засіяного матеріалу або номер аналізу, номер робочого місця студента. Пробірки і чашки з посівами поміщають у термостат за температури, оптимальної для конкретного мікроба. Чашки в термостаті розміщують догори



дном, що запобігає стіканню конденсаційної води з кришки і розмиванню колоній.

Посів уколom у стовпчик поживного середовища. Пробірку з поживним середовищем, застиглим у вигляді стовпчика, беруть у ліву руку. Над полум'ям виймають корок і перевертають пробірку догори дном. Петлю з досліджуваним матеріалом уколюють знизу в центр стовпчика по всій його глибині, потім петлю витягають, пробірку закривають, підписують і поміщають у термостат для вирощування (рис. 2.3).



Рис. 2.3. Посів досліджуваного матеріалу уколom.

Для розгляду та вивчення мікробних мікропрепаратів використовують імерсійну систему мікроскопа (x90). Імерсійними називають такі об'єктиви, між фронтальною лінзою яких і препаратом міститься рідке середовище з показником заломлення, близьким до показника заломлення скла. Як імерсійне середовище використовується, як правило, кедрова олія. Можна використовувати також воду, гліцерин, прозорі олії, монобромнафталін і ін. В імерсійній системі між фронтальною лінзою об'єктива і препаратом встановлюється однорідне (гомогенне) середовище (скло препарату - олія - скло об'єктива) з однаковим показником заломлення. Завдяки цьому усі промені, не заломлюючись і не змінюючи напрямку, потрапляють в об'єктив, створюючи умови найкращого освітлення препарату. Величина показника заломлення



дорівнює для води 1,33, для кедрової олії – 1,5, для монобромнафталіну – 1,6.

ХІД ЗАНЯТТЯ

1. Приготовлене агаризоване середовище (МПА) для отримання його рідкої консистенції розплавити на водяній бані.
2. У стерильні чашки Петрі, використовуючи стерильний хімічний стакан, розлили розплавлене МПА об'ємом 20-30 мл у кожну чашку.
3. За допомогою стерильної лійки у стерильні пробірки розлити розплавлене МПА на 1/3 їхнього об'єму.
4. Частину пробірок із МПА покласти у штатив під кутом для одержання скошеного агару, іншу частину пробірок ставлять у штатив у вертикальному положенні для одержання агару стовпчиком.
5. Після застигання МПА у чашках і пробірках за кімнатної температури, їх помістити у стерильну та нагріту до 80⁰ С сухожарову піч і підсушити упродовж 15 хвилин.
6. Запропоновані зразки ґрунту масою 10-15 г перенести у фарфорові чашки та диспергувати (подрібнити) за допомогою товкачика.
7. Диспергований зразок ґрунту перенести у стерильний хімічний стакан, додати сюди 10 мл дистильованої води та приготувати розведену ґрунтову суспензію для посіву.
8. Для отримання більшого розведення ґрунтову суспензію об'ємом 3 мл із хімічного стакана за допомогою стерильної градуйовані піпетки перенести у колбу та додати сюди 10 мл дистильованої води.
9. За допомогою піпетки зробити посів на МПА у чашках Петрі із обох розведень. Для цього стерильною градуйованою піпеткою набрати краплю ґрунтової суспензії певного розведення та нанести її на поверхню агаризованого середовища у центрі чашки Петрі, попередньо привідкривши кришку, щоб утворилася щілина, достатня для проходження піпетки.



10. Притримуючи кришку чашки, стерильним скляним шпателем розподілити, втираючи в середовище, краплю по всій площині чашки.
11. За допомогою бактеріологічної петлі зробити посів на МПА у чашках Петрі із обох розведень. Для цього петлю простерилізувати у полум'ї спиртового пальника, потім опустити її у суспензію у хімічному стакані або колбі (залежно від розведення), попередньо привідкривши кришку чашки (див. п. 9), петлею у центрі середовища штрихами засіяти невелику ділянку середовища, звільняючи таким способом петлю від надлишку матеріалу, по частині поверхні незасіяного поживного середовища додатково нанести рівнобіжні або зигзагоподібні штрихи, кришку чашки закрити, петлю простерилізувати у полум'ї.
12. Чашки підписати зі сторони дна склографом, роблячи відповідні написи (дата, ґрунт, розведення або номер, який розшифровують у робочому зошиті), перевернути їх догори дном і помістити у термостат із температурою 25-30° С.
13. Використаний посуд промити водопровідною і дистильованою водою, потім простерилізувати у сухожаровій печі.
14. Використовуючи інструкційні матеріали до світлового мікроскопа “Биолам С11”, повторити його будову та порядок роботи із ним, ознайомитись із послідовністю розгляду мікропрепаратів із використанням його імерсійної системи.
15. Для розгляду запропонованого постійного мікропрепарату розмістити мікроскоп у найбільш зручному для роботи положенні на своєму робочому місці та навести освітлення, помістити на предметний столик готовий пофарбований мазок, закріпити його затискачами. Спочатку розглянути препарат за допомогою сухого об'єктива і відшукати краще місце для детального дослідження, потім підняти тубус мікроскопа і за



допомогою револьвера установити імерсійний об'єktiv (x90). Нанести паличкою краплю кедрової олії на мікропрепарат, занурити в кедрову олію фронтальну лінзу імерсійного об'єктива, спостерігаючи збоку за тим, щоб не роздавити об'єktivом, предметне скло і не пошкодити лінзи об'єктива. Дивлячись в окуляр, повільно підняти тубус макрометричним гвинтом до появи в полі зору мікроскопа досліджуваного об'єкта, потім зкоректувати фокус мікрометричним гвинтом та розглядати запропонований мікропрепарат.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Поживні середовища для культивування мікроорганізмів, їхнє призначення, основні вимоги.
2. Класифікація поживних середовищ.
3. Посів мікроорганізмів у рідке поживне середовище.
4. Посів мікроорганізмів на щільні поживні середовища.
5. Посів мікроорганізмів у чашку Петрі.
6. Посів уколом у стовпчик поживного середовища.
7. Розгляд мікробних мікропрепаратів із використанням імерсійної системи мікроскопа.

Інформаційні ресурси:

Ежов Г. И Руководство к практическим занятиям по сельскохозяйственной микробиологии. Москва : Высшая школа, 1981.

Емцев, В. Т., Мишустин Е. Н. Сельскохозяйственная микробиология: практ. пособие. Москва : Издательство Юрайт, 2017.

Зенова Г. М. и др. Практикум по биологии почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 2002.

URL: <https://agroinf.com/mikrobiologiya> – Назва з екрана.

URL: intranet.tdmu.edu.ua/data/cd/mikrobiologiya – Назва з екрана.

URL: https://studopedia.su/12_129270_pitalielnie-sredi-dlya-kultivirovaniya-bakteriy.html – Назва з екрана.



URL:

<http://biologylib.ru/books/item/f00/s00/z0000015/st010.shtml> – Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=qxzMUCZsrR0> –

Назва з екрана.

URL:

<https://www.youtube.com/watch?v=iapM74ipRzM&list=PLKz2IVGBVMSwecOG4AyibcFRugN1h1YoS&index=13&t=0s> – Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=EQauIbKgRuE> – Назва з екрана.

URL: https://www.youtube.com/watch?v=z_j1i6bMGG4 – Назва з екрана.

URL: <https://postnauka.ru/video/25104> – Назва з екрана.

Лабораторне заняття № 3

Тема: Вивчення колоній і техніка виділення чистих культур бактерій.

Мета заняття: Засвоїти методику візуального та мікроскопічного опису колоній мікроорганізмів; засвоїти методику виділення та дослідження чистої культури мікроорганізмів; засвоїти методику виготовлення мазків і фарбування за Грамом.

Обладнання та матеріали: Мікроскоп “Биолам С11”, збільшувана лупа, добре вимиті предметні стекла, стерильні піпетки, стерильні пінцети, бактеріологічна петля, термостат, спиртівка, склограф, фільтрувальний папір, пробірки із МПА, чашки Петрі із колоніями мікроорганізмів, 96%-ий розчин етанолу, генціановий фіолетовий або метиловий фіолетовий, розчин Люголя, фуксин або сафранін, дистильована вода.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Крім морфологічних ознак власне клітин мікроорганізмів, дуже важливе значення для визначення виду бактерій мають їхні культуральні ознаки, тобто характер росту на рідких і щільних поживних середовищах. Кожний вид



мікробів утворює на щільних поживних середовищах колонії, які мають певні ознаки та властивості. Ці властивості колоній вивчають візуально і мікроскопічно.

Під час візуального вивчення колоній (неозброєним оком) чашку із колоніями розглядають спочатку зі сторони дна в проходячому світлі, а потім зі сторони кришки у відбитому світлі. Для опису характеру росту бактерій відбирають чашки з окремо розташованими колоніями. Чашки із суцільним ростом мікроорганізмів або з наявністю великої кількості колоній, що злилися, непридатні для дослідження.

За наявності в досліджуваному матеріалі декількох видів бактерій у чашках виростуть колонії різних типів, що відрізняються між собою за рядом ознак. У цьому випадку відбирають ізольовано розташовані колонії окремих типів, обводять їх зі сторони дна склографом, нумерують і досліджують.

Характеристику колоній здійснюють за наступною схемою: величина (розмір), форма (за конфігурацією контурів), прозорість, колір, поверхня, рельєф, консистенція.

Величина колонії визначається її діаметром. Великі колонії мають діаметр понад 4 мм, середні – від 2 до 4 мм, дрібні – від 1 до 2 мм, карликові – до 1 мм.

Конфігурація контурів колоній, що визначає їхню форму, може бути правильно і неправильно округлою, ризоїдною, розеткоподібною, неправильною й ін. (рис. 3.1).

Прозорість колоній визначається ступенем проходження світла. Колонії можуть бути прозорими, напівпрозорими і непрозорими, прозорість оцінюють під час розгляду зі сторони дна в проходячому світлі.

Колір колоній визначається їхньою пігментованістю. Вони можуть бути безбарвними або пігментованими (білі, жовті, зелені, червоні й ін.).

Поверхня колоній може бути гладкою, що блищить (*S*-форма), шорсткуватою або зморшкуватою (*R*-форма), матовою, сухою, вологою й ін.



Рельєф колонії характеризується піднесеністю її над поверхнею поживного середовища та контуром форми у вертикальному розрізі. Колонії можуть бути плоскі, опуклі (краплеподібні), із увігнутим центром, занурені в середовище.

Консистенція колоній може бути рідкою, пастоподібною, слизуватою, шкірястою, сухою. Консистенція визначається за допомогою дотику бактеріологічною петлею до колонії під час відбору матеріалу для пересівання або виготовлення мазка.

Мікроскопічне вивчення колоній проводять за допомогою лупи, окуляром, вийнятим із мікроскопа, або безпосередньо під мікроскопом.

Під час вивчення колоній під мікроскопом чашку з посівом розміщують на предметному столику догори дном. Дослідження проводять під малим збільшенням зі звуженою діафрагмою і дещо опущеним конденсором. За допомогою мікроскопічного вивчення добре визначається будова колоній – характер їхніх країв і структура. Край колонії може бути рівним у вигляді чітко вираженої лінії і нерівним (фестончастий, хвилястий, зазубрений, у вигляді торочки, локоноподібний) (рис. 3.2). Структура колоній може бути гомогенною або аморфною, дрібно- і грубозернистою, волокнистою, однорідною та неоднорідною.

Мікроорганізми у своєму нативному стані непомітні не лише в оптичний, але і в електронний мікроскопи. Причиною подібного явища є їхня прозорість – клітини мікроорганізмів мають коефіцієнт заломлення світла близький для скла. Тому для вивчення прокариот під мікроскопом використовуються різні методи фарбування, що дає можливість надати колір бактеріям або їхнім частинам. Крім того, мікроби мають тінкторальні властивості, які полягають у неоднаковій взаємодії різних частин тіла прокариот із барвником.

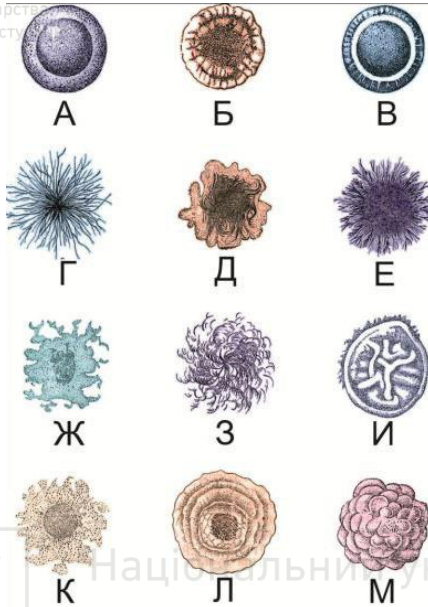


Рис. 3.1. Форми колоній мікроорганізмів: А. округла; Б. округла із фестончатим краєм; В. округла із валиком по краю; Г. ризоїдна; Д. ризоїдна; Е. з ризоїдним краєм; Ж. амебоїдна; З. ниткоподібна; И. складчаста; К. неправильна; Л. концентрична; М. складна.

Способів надати колір мікроорганізмам багато. Залежно від об'єкта фарбування використовувані для цього методики поділяють на позитивні способи, що забарвлюють клітини мікроорганізмів, та негативні методи – зафарбовується простір навколо бактерії, в результаті чого вона стає помітною як силует на зафарбованому фоні.

Як позитивне фарбування, так і негативне, поділяється залежно від стану мікроорганізму на вітальне (прижиттєве) фарбування (у цьому випадку найчастіше застосовуються слабкі розчини метиленового синього, конго червоного і толуїдинового синього) та поствітальне (фіксоване) фарбування. Фарбування фіксованих зразків найбільш ефективний спосіб надання бактерії кольору. Під час фіксації



мазок закріплюється на поверхні скла, і тому за подальшого фарбування препарату клітини не змиваються. Крім того, убиті мікробні клітини забарвлюються краще, ніж живі. Розрізняють фізичний спосіб фіксації, в основу якого покладена дія високої температури на клітину, і хімічні способи, що передбачають застосування хімічних засобів, які викликають коагуляцію білків цитоплазми.

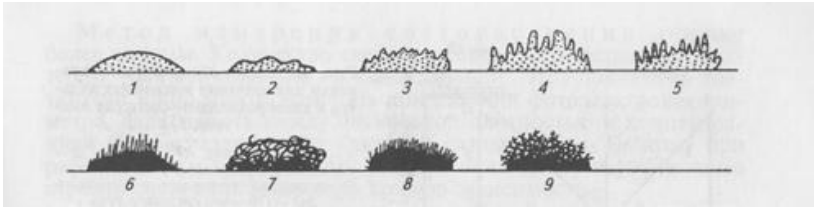


Рис. 3.2. Конфігурація краю колоній мікроорганізмів:

1. гладка; 2. хвиляста; 3. зубчаста; 4. лопатева; 5. неправильна;
6. віїчаста; 7. нитчаста; 8. ворсинчаста; 9. гілляста.

Залежно від необхідного результату застосовують прості або складні методи фарбування. Найбільш поширеним методом надання кольору фіксованим препаратам є фарбування за Грамом. Цей метод був запропонований датським вченим Г.Х. Грамом (1853-1938), який розробив цей метод у 1884 р., щоб розрізнити бактерії. Ця процедура фарбування нині широко використовується як інструмент для розрізнення грам-негативних і грам-позитивних бактерій, що звичайно є першим кроком в ідентифікації специфічного бактеріального зразка. Метод Грама ґрунтується на біохімічних властивостях клітинної стінки прокариотів.

Фарбування за Грамом відноситься до складного способу фарбування, коли на мазок впливають двома барвниками, з яких один є основним, а інший – додатковим. Окрім фарбувальних речовин під час складних способів фарбування застосовують знебарвлюючі речовини: спирт, кислоти та ін. Для фарбування за Грамом найчастіше використовують барвники трифенілметанової групи: генціановий, метиловий

фіолетовий або кристал віолет. Грам-позитивні (грам (+)) мікроорганізми утворюють стійку сполуку із зазначеними барвниками і йодом. Також вони не знебарвлюються внаслідок дії на них спиртом, унаслідок чого за додаткового забарвлення фуксином грам (+) мікроорганізми не змінюють попередньо набутий фіолетовий колір. Грам-негативні (грам (-)) мікроорганізми утворюють з основними барвниками і йодом сполуки, що легко руйнуються під дією спирту. В результаті мікроби знебарвлюються і потім забарвлюються фуксином, набуваючи червоного кольору (рис. 3.3).



Рис. 3.3. Фарбування мікропрепаратів мікроорганізмів за Грамом.

Чистою культурою мікроорганізму називають популяцію бактерій одного виду, що є нащадком однієї клітини. У випадку нитчастих або міцеліальних організмів чиста культура може бути отримана з однієї багатоклітинної нитки. Під час виділення чистих культур мікроорганізмів із досліджуваного матеріалу, що містить, як правило, суміш різних їхніх представників, застосовують різні методи, що ґрунтуються на принципі механічного поділу мікроорганізмів. Виділення чистої культури передбачає проведення трьох етапів: 1) отримання нагромаджувальної культури; 2) власне



виділення чистої культури; 3) визначення чистоти виділеної культури.

ХІД ЗАНЯТТЯ

1. Для досліджень використати вирощені культури мікроорганізмів із попереднього заняття. Для цього вийняти чашки Петрі із термостата, вивчити колонії мікроорганізмів візуально, розглядаючи чашку спочатку зі сторони дна у проходячому світлі, а потім із сторони кришки у відбитому світлі.
2. Підрахувати кількість колоній в чашці зі сторони її дна у проходячому світлі, зробити загальний висновок про розвиток колоній на поживному середовищі та вміст мікроорганізмів у зразках ґрунту.
3. Визначити вміст мікроорганізмів в 1 г свіжого ґрунту за формулою

$$a = b \cdot c \cdot d,$$

де a – кількість клітин в 1 г свіжого ґрунту, b – середня кількість колоній в чашці, c – розведення, з якого зроблений посів, d – кількість крапель в 1 мл суспензії.

4. Виокремити характерні, ізолювано розташовані колонії окремих типів, обвівши їх зі сторони дна склоглафом, пронумерувати і дати характеристику за відповідними ознаками: розмір, форма, прозорість, колір, поверхня, рельєф, консистенція (як описано вище).
5. Із частини виокремленої ізолюваної колонії приготувати мазок, провести забарвлення за Грамом і мікроскопіювати під імерсією, визначити при цьому чистоту культури та морфологію мікроорганізму.

Для цього взяти добре знежирене та продезінфіковане етанолом предметне скло і стерильною піпеткою в його центр нанести 2-3 краплі дистильованої води. Бактеріологічну петлю простерилізувати у полум'ї спиртівки та опустити в центр обраної ізолюваної колонії, привідкривши кришку чашки Петрі. Відібраний петлею матеріал опустити в краплю води на предметному склі та



круговими рухами розподілити по площі діаметром 1-1,5 см тонким шаром. Саме за такого розподілу досліджуваного матеріалу в мазку можна розглянути окремі клітини. Після приготування мазка петлю знову прожари у полум'ї, спалюючи залишки матеріалу.

Приготовлений мазок висушити на повітрі і після повного висихання зафіксувати шляхом фламбування. Для цього предметне скло з препаратом взяти пінцетом і плавним рухом провести 2-3 рази над верхньою частиною полум'я спиртівки. Весь процес фіксації повинен зайняти не більше, ніж 2 с. Надійність фіксації перевірити таким прийомом: вільну від мазка поверхню скла прикласти до тильної поверхні лівої кисті. За правильної фіксації скло повинне бути гарячим, але не викликати відчуття опіку (приблизно 70-80° C).

Для фарбування за Грамом на мазок піпеткою через фільтрувальний папір для уникнення появи осаду нанести декілька крапель генціанового фіолетового або метилового фіолетового, зачекати 2-3 хвилини. Після цього акуратно зняти фільтрувальний папір і фарбу змити невеликим струменем води. Далі мазок піпеткою залити на 1-2 хвилини розчином Люголя або йодистим розчином за Грамом (водний розчин йодиду калію і кристалічного йоду в співвідношенні 2:1) до почорніння препарату. Розчин злити, мазок прополоскати 96°-им етиловим спиртом або ацетоном, наливаючи і зливаючи його, поки мазок не знебарвиться і рідина, що стікає, не стане чистою (приблизно упродовж 20-40-60 с.). Потім на мазок піпеткою нанести фуксин або сафранін, після 2-5 хвилин витримки скло із мазком промити у проточній воді і висушити фільтрувальним папером.

Приготовлений мазок розглянути під мікроскоп з імерсією (об'єктив х90). Якщо в мазку виявляються однотипні за морфологією та забарвленням мікробні клітини, то культура вважається чистою



6. Із залишку обраної ізольованої колонії зробити пересів у пробірки зі скошеним МПА за допомогою бактеріологічної петлі для виділення чистої культури (див. лабораторне заняття № 2). Пробірки з посівами помістити в термостат із температурою 25-35° С на термін 5-7 днів.
7. Після зазначеного терміну пробірки з посівами вийняти з термостата і відмітити характер росту культури на скошеному агарі (якщо культура чиста, то вздовж лінії посіву відмічається однорідний суцільний ріст мікроорганізмів).

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Опис колоній мікроорганізмів.
2. Ознаки для характеристики колоній мікроорганізмів.
3. Мікроскопічне вивчення колоній мікроорганізмів.
4. Необхідність у фарбуванні мікроорганізмів під час їхнього вивчення, способи фарбування.
5. Метод фарбування бактерій за Грамом.
6. Поняття про чисту культуру мікроорганізму.

Інформаційні ресурси:

Ежов Г.И. Руководство к практическим занятиям по сельскохозяйственной микробиологии. Москва : Высшая школа, 1981.

Емцев, В.Т., Мишустин Е.Н. Сельскохозяйственная микробиология: практ. пособие. Москва : Издательство Юрайт, 2017.

Зенова Г.М. и др. Практикум по биологии почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 2002.

URL: <https://agroinf.com/mikrobiologiya> – Назва з екрана.

URL: intranet.tdmu.edu.ua/data/cd/mikrobiologiya – Назва з екрана.

URL: https://studopedia.com.ua/1_229434_tehnika-farbuвання-za-gramom.html – Назва з екрана.

URL: <https://studfiles.net/preview/3882817/page:10/> – Назва з екрана.



URL: <https://studfiles.net/preview/4104311/page:22/> – Назва з екрана.

URL: <http://bigbro.com.ua/farbuвання-za-gramom-metodika-ta-teoretichne-poyasnennya/> – Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=PvNkAPSABII> – Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=97Kw9wP2vbU> – Назва з екрана.

Лабораторне заняття № 4

Тема: Грунтові водорості.

Мета заняття: Засвоїти методи культивування, виявлення та дослідження видового складу ґрунтових водоростей; ознайомитись із найпоширенішими видами культур водоростей із запропонованих зразків ґрунту.

Обладнання та матеріали: Мікроскоп “Біолам С11”, предметне та покривні (стерильні та нестерильні) стекла, електронні ваги, сухожарова піч, чашки Петрі, пінцети, стерильні шпатели, препарувальні голки, піпетки, фільтрувальний папір у вигляді круга, промивалки, лопатки для відбору ґрунту, мірна колба на 1 л, конічні колби на 50 мл, хімічний стакан на 50 мл, ватні корки, склограф, зразки ґрунту, фізрозчин (0,5%-ий розчин NaCl), солі NaNO₃, KН₂PO₄, MgSO₄, CaCl₂, NaCl, Fe₂Cl₆, імерсійна олія, дистильована вода, ілюстраційні матеріали.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Водорості */Algae/* – це збірна біологічна група нижчих безсудинних, спорових рослин, яка об’єднує приблизно 35 тисяч видів. Традиційно до водоростей, крім евкаріотичних організмів, відносять також Синьо-зелені водорості або Ціанобактерії та недавно відкриті Прокаріотичні зелені водорості. Однак, за своєю будовою вони близькі до бактерій, які відносяться до царства Дроб’янки, й досить суттєво відрізняються від евкаріотичних водоростей із царства Рослини.



Більшість водоростей поширені переважно у водному середовищі (прісних і солоних водоймах). Частина видів поселяється у ґрунті та на його поверхні, на стовбурах і гілках дерев, на інших предметах і навіть у повітрі.

Клітинна мембрана водоростей зовні оточена щільною полісахаридною оболонкою, що пропускає світло та воду. На її поверхні можуть знаходитись різні луски, вирости, волоски (трихоцисти, джгутики, війки). Крім целюлози та пектинових речовин, які входять до складу оболонки, вона може бути одягнута слизом або інкрустована кремнеземом (у Діатомових водоростей утворюється своєрідний панцир, який складається із двох стулок). У протопласті наявні типові внутрішні мембранні структури: ендоплазматична сітка, апарат Гольджі, мітохондрії, хроматофори – зелені пластиди водоростей, лізосоми. Є також одне, декілька або багато ядер (у неклітинних форм). Присутні також одна велика або декілька дрібних вакуолей.

Ґрунтовими називають водорості, місце існування яких пов'язане з ґрунтом. Це можуть бути угруповання наземних форм, які за сприятливих умов розростаються на поверхні ґрунту у вигляді кірки або плівок; водно-наземних форм, які живуть у водному середовищі постійно вологих ґрунтів; власне ґрунтових форм, які живуть у товщі ґрунтового шару. Шар існування водоростей у ґрунті сягає лише декількох сантиметрів у глибину, глибше чисельність їх різко зменшується. Максимальна глибина, на якій були виявлені життєздатні водорості, тим не менше досить значна – 2,7 м.

Водорості виявляються в усіх ґрунтах. Однак чисельність і біомаса їх сильно варіюють в одному і тому ж ґрунті залежно від вологості, сольового режиму й умов освітлення. Кількість водоростей складає від 5 тис. до 1,5 млн./г ґрунту, досягаючи максимальних значень на ґрунтах, незайнятих суцільним покривом вищих рослин, наприклад, у корковому солончаку, на такирі. Біомаса їх на поверхневих розростаннях досягає сотень кг/га, у дерново-підзолистому ґрунті вона коливається в межах 40-300 кг/га в шарі 0-10 см і



значно вища в орних ґрунтах порівняно з лісовими.

Водорості є фотоавтотрофними організмами і у загальній біогеоценотичній системі вони, поряд з вищими рослинами, входять в екологічну групу первинних продуцентів органічної речовини. Продуктивність водоростей у наземних біогеоценозах, природно, незрівнянно менша, ніж вищих рослин, однак їхня біомаса винятково рухлива, вона швидко накопичується за сприятливих умов, стає поживою для інших ґрунтових мікроорганізмів і безхребетних тварин.

Живлення водоростей відрізняється від усіх інших ґрунтових мікроорганізмів тим, що водорості – фотосинтезуючі організми й у своїй величезній більшості не мають потреби в готових органічних речовинах. Проте, знаходячись у глибоких горизонтах ґрунту, куди не проникає сонячне світло, деякі водорості здатні переключатися на гетеротрофний обмін, поглинаючи із середовища розчинені органічні речовини. Є також водорості, що зовсім не мають хлорофілу й завжди живляться як гетеротрофи.

Водорості поділяються на кілька великих самостійних таксонів на рівні відділів. У ґрунті виявляються представники далеко не усіх великих груп водоростей. Серед ґрунтових водоростей Зелених приблизно 500 видів, далі за кількістю видів знаходяться Діатомові (приблизно 300 видів), Жовто-зелені (понад 150 видів) і дуже мало Евгленових і Пірофітових. Серед Червоних водоростей, як мешканців ґрунтів, відомий всього один вид.

Серед ґрунтових Зелених водоростей /*Chlorophyta*/ найбільш поширені наступні види: *Chlamydomonas atactogama*, *Chrorella vulgaris*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Scenedesmus obliquus*, *Closterium moniliferum*, *Cosmarium sp.*, *Gongrosira terricola*, *Ulothrix tenerrima*, *Hormidium nitens*, *Microspora tumidula*.

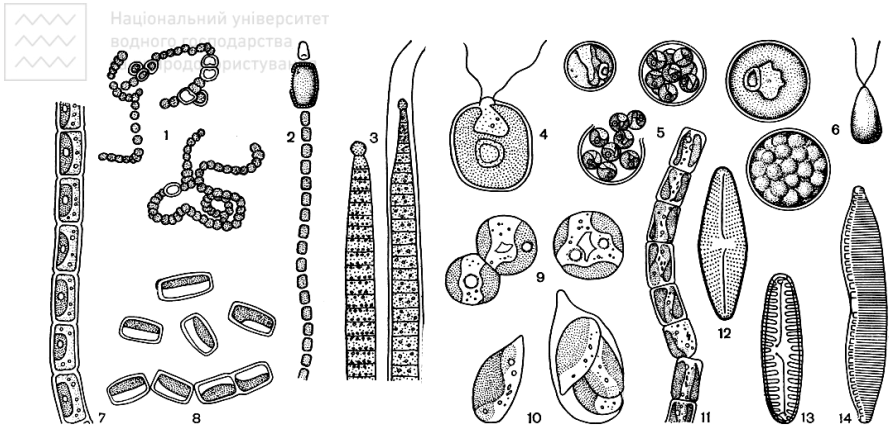


Рис. 4.1. Грунтові водорості: прокаріотичні синьо-зелені водорості (1. *Nostoc microscopicum*; 2. *Cylandrospermum licheniforme*; 3. *Phormidium autumnale*), Зелені водорості (4. *Chlamydomonas atactogama*; 5. *Chlorella vulgaris*; 6. *Chlorococcum humicola*; 7. *Hormidium nitens*; 8. *Stichococcus bacillaris*), Жовто-зелені водорості (9. *Pleurochloris magna*; 10. *Monodus acuminata*; 11. *Heterothrix exilis*), Діатомові водорості (12. *Navicula mutica*; 13. *Pinnularia borealis*; 14. *Hantzschia amphioxys*).

Із Жовто-зелених водоростей /*Xanthophyta*/ найчастіше зустрічаються у ґрунті такі види, як *Pleurochloris magna*, *Characiopsis minutissima*, *Bumillariopsis brevis*, *Botrydium granulatum*, *Heterothrix exilis*, *Tribonema vulgare*, *Monodus acuminata*.

Діатомові водорості /*Bacillariophyta*/ представлені в ґрунті такими видами: *Pinnularia borealis*, *Navicula mutica*, *Hantzschia amphioxys*, *H. hantzschiana* (рис. 4.1).

Для вивчення видового складу ґрунтових водоростей, як правило, користуються методом культур. Для приготування водних і агарових культур використовують мінеральні середовища: розчин Брістоля в модифікації Голербаха (грам на літр дистильованої води: NaNO_3 – 0,25; KH_2PO_4 – 0,25; MgSO_4 – 0,15; CaCl_2 – 0,05; NaCl – 0,05; Fe_2Cl_6 – сліди;



рН=4,3) і розчин Бенекє (грам на літр дистильованої води: NH_4NO_3 – 0,2; CaCl_2 – 0,1; K_2HPO_4 – 0,1; MgSO_4 – 0,1; Fe_2Cl_6 – сліди).

ХІД ЗАНЯТТЯ

1. Для приготування ґрунтової культури водоростей у чашки Петрі шаром 1 см помістити у непорушеному стані запропонований зразок ґрунту.
2. За допомогою промивалки дистильованою водою зволожити ґрунт у чашці приблизно до 80% від його повної вологоємності.
3. На зволожену поверхню ґрунту помістити 3-4 стерильні покривні стекла таким чином, щоб між ґрунтом і склом залишалися окремі повітряні камери.
4. Чашку зверху прикрити кришкою, підписати та поставити на освітлене місце за кімнатної температури. У цих умовах чашку витримати упродовж 15-20 днів.
5. Після закінчення терміну культивування стекла зняти пінцетом і видалити з них великі грудочки ґрунту.
6. На предметне скло нанести краплю води та помістити в неї зняті із поверхні ґрунту покривні стекла. Отримані мікропрепарати розглянути під малим і великим збільшенням мікроскопа.
7. Використовуючи довідкові та ілюстраційні матеріали, по можливості, визначити виявлені групи та види ґрунтових водоростей, зарисувати їх, підписати їхні назви.
8. Для приготування іншої ґрунтової культури водоростей у чашки Петрі помістити запропонований зразок ґрунту (як у п. 1).
9. ґрунт в чашці Петрі зволожити дещо сильніше, ніж у випадку п. 2 (вода дещо помітна біля поверхні).
10. Стерильним шпателем загладити мокру поверхню ґрунту та накрити її фільтрувальним папером у вигляді круга відповідного розміру. На крузі препарувальною голкою зробити численні проколи.
11. Чашку зверху прикрити кришкою, підписати та поставити



на освітлене місце за кімнатної температури. У цих умовах чашку витримати упродовж 30-40 днів.

12. Після закінчення терміну культивування з фільтрувального паперу препарувальною голкою зняти нарости водоростей і приготувати із них мікропрепарати способом “роздавлена крапля” в краплі дистильованої води або фізрозчину (0,5%-ий розчин NaCl).
13. Виготовлені мікропрепарати розглянути під малим і великим збільшенням мікроскопа, а також із використанням його імерсійної системи (об’єктив x90).
14. Використовуючи довідкові та ілюстраційні матеріали, по можливості, визначити виявлені групи та види ґрунтових водоростей, зарисувати їх, підписати їхні назви.
15. Приготувати водне мінеральне середовища – розчин Брістоля в модифікації Голербаха. Для цього у мірну колбу на 1 л зважити на електронних вагах та внести: 0,25 г NaNO_3 , 0,25 г KH_2PO_4 , 0,15 г MgSO_4 , 0,05 г CaCl_2 , 0,05 г, NaCl, сліди Fe_2Cl_6 , (рН розчину має становити 4,3), вміст колби дистильованою водою довести до мітки.
16. Приготовлене середовище за допомогою хімічного стакана розлити в конічні колби невисоким шаром (по 25 мл), закрити ватним корком і простерилізувати 20 хвилин за температури 121°C у сухожаровій печі.
17. Після охолодження середовище засіяти невеликою кількістю ґрунту з верхніх горизонтів із запропонованих зразків, закрити ватним корком, підписати та поставити на освітлене місце за кімнатної температури. У цих умовах засіяні культури витримати упродовж 3 місяців.
18. Час від часу (у середньому раз на місяць) відбирати за допомогою піпетки вирощену на поживному середовищі суспензію водоростей, виготовити із неї тимчасові мікропрепарати та розглянути її під малим і великим збільшенням мікроскопа.
19. Використовуючи довідкові та ілюстраційні матеріали, по можливості, визначити виявлені групи та види ґрунтових водоростей, зарисувати їх, підписати їхні назви.



ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Загальна характеристика водоростей.
2. Поширення, біомаса та особливості існування ґрунтових водоростей.
3. Живлення ґрунтових водоростей та їхнє екологічне значення.
4. Основні систематичні групи та видова різноманітність ґрунтових водоростей.
5. Культивування ґрунтових водоростей.
6. Закладання культур ґрунтових водоростей.

Інформаційні ресурси:

Звягинцев Д.Л. Почва и микроорганизмы. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1987.

Звягинцев Д.Л., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1989.

Зенова Г.М. и др. Практикум по биологии почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 2002.

Зенова Г.М., Штина Э.А. Почвенные водоросли. Москва : Изд-во МГУ, 1990

Іутинська Г.О. Ґрунтова мікробіологія: навчальний посібник. Київ : Арістей, 2006.

URL: <http://www.irb.basnet.by/ru/pochvennyye-vodorosli-sistematika-ekologiya-znachenie/> – Назва з екрана.

URL:

<http://herba.msu.ru/algae/materials/soilalgae/index.html> – Назва з екрана.

URL:

<https://www.natural-sciences.ru/ru/article/view?id=9981> – Назва з екрана.

URL: https://studopedia.su/12_40244_pochvennie-protsessi-proishodyashchie-pri-uchastii-zhivotnih.html – Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=65HQ54hR908> – Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=wVVKikrWi-M> – Назва з екрана.



Лабораторне заняття № 5

Тема: Грунтові Найпростіші тварини.

Мета заняття: Ознайомитись з методами виявлення та дослідження якісного складу ґрунтових Найпростіших тварин. Вивчити видовий склад Найпростіших із досліджуваних зразків ґрунту.

Обладнання та матеріали: Мікроскоп “Біолам С11”, предметне та покривне стекла, технохімічні ваги, термостат, штатив для пробірок, конічні колби на 100 і 500 мл, лійка, мірні циліндри, пробірки, фарфорова чашка з товчачиком, градуйовані піпетки на 1 і 10 мл, фільтрувальний папір, склограф, зразки ґрунту, суха трава із різнотрав’я, дистильована вода, ілюстраційні матеріали.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Найпростіші тварини */Protozoa/* представляють собою збірку — групу переважно одноклітинних тварин, мікроскопічних розмірів, яка за сучасними системами класифікації об’єднує декілька самостійних типів. Середні розміри цих тварин становлять декілька десятків мікрометрів, найменшими є внутріклітинні паразитичні найпростіші (всього 2-4 мкм). Будова їхніх клітин є типовою для багатоклітинних тварин. Частина видів у цитоплазмі містить спеціалізовані органи: скоротливі та опорні фібрили, травні та скоротливі вакуолі. Форма клітин непостійна або постійна, у цьому випадку вона забезпечується наявністю пелікули (ущільнений зовнішній шар цитоплазми), панцира з лусочок, зовнішньої черепашки, внутрішніх голок, кісткових капсул.

Найпростіші тварини належать до мікробіоти та утворюють нанофауну ґрунту. Для їхнього активного життя в ґрунті найважливіше значення має наявність води в ґрунтових порах. Найпростіші зустрічаються у всіх досліджених ґрунтах. Чисельність їх може бути дуже високою: до декількох сотень



тисяч клітин у 1 г ґрунту, біомаса за сприятливих умов (наприклад, у лучних ґрунтах) досягає 300-400 кг/га. Крім води, на розподіл і чисельність Найпростіших впливають такі фактори середовища, як аерація, температура та величина рН, однак пряму залежність від них у природних умовах встановити важко. Одним із найбільш істотних факторів є кількість бактерій, якими живляться Найпростіші. Вони поїдають також клітини дріжджів і водоростей, виявляючи вибірковість щодо вибору їжі. Наявні серед Найпростіших і сапрофаги. Деякі види живляться осмотрофно. Основна їхня роль у ґрунті – участь у розкладанні органічної речовини і хижацтво на мікроорганізми.

Життя в ґрунтових мікросередовищах, де є величезна кількість дуже тонких капілярів, позначилось на морфології Найпростіших. Їхні клітини у 5-10 разів менші за розмірами, ніж у прісноводних або морських мешканців. У деяких видів спостерігається приплюснення клітини, відсутність шипів і виростів, втрата переднього джгутика. У черепашкових корененіжок, які живуть у ґрунті, спрощена форма черепашки і схований або дуже малих розмірів отвір, що запобігає пересиханню. Є види, що зустрічаються винятково в ґрунті. Неприятливі умови деякі види переживають у вигляді цист, інші утворюють панцирі.

Із вільноживучих форм у ґрунті зустрічаються представники типу Саркомастігофори *Sarcomastigophora* і типу Інфузорії (Війчасті) *Ciliophora*. Із першого типу у ґрунті живуть представники підтипу Джгутикові *Mastigophora* та підтипу Саркодові *Sarcodinal*. Джгутикові характеризуються передусім наявністю джгутиків. Серед джгутикових є види, що містять у клітинах пігменти, зокрема хлорофіл, і здатні до фотосинтезу. Це Рослинні джгутиконосці або Фітомастігіни. Правильніше їх було б відносити до водоростей. Вони займають проміжне положення між рослинами й тваринами. Типовим їхнім представником є евглена зелена *Euglena viridis*. Деякі зелені джгутикові (представники евгленових) здатні змінювати тип живлення, втрачаючи в темряві хлорофіл



і переходячи на гетеротрофне живлення та осмотрофний обмін. Тому їх можна назвати організмами зі змішаним типом живлення – міксотрофами. Серед Тваринних джгутіконосців або Зоомастігін є сапротрофи та форми з анімальним (голозойним) типом живлення (заковтування оформлених частинок). Представниками цієї групи є види родів *Monas*, *Vodo*, *Cercomonas*, *Oicomonas*. Саркодові представлені в ґрунті голими і черепашковими амебами з надкласу Кореніжки. Характерною рисою амеб є непостійна форма тіла. Живляться вони бактеріями, дріжджами, клітинами водоростей, іншими Найпростішими. Черепашкові амеби переважно сапрофаги. Їх дуже багато в болотних ґрунтах. Вони є характерними представниками біоценозу сфагнових торф'яників.

Тип Інфузорії представлений меншою кількістю видів, ніж попередній. Для представників типу характерна наявність різноякісних ядер в клітині: одне ядро досить велике і містить велику кількість хромосом, воно відповідає за всі вегетативні функції і називається макронуклеусом; друге ядро містить диплоїдний набір хромосом – мікронуклеус (таких ядер може бути декілька), воно зберігає спадкову інформацію. Для інфузорій також характерна наявність великої кількості війок. Покриви інфузорій представлені пелікулою, що складається з двох подвійних мембран.

Ґрунтові інфузорії представлені родами *Colpoda*, *Stylonichia*, *Vorticella* та ін. (рис. 5.1).

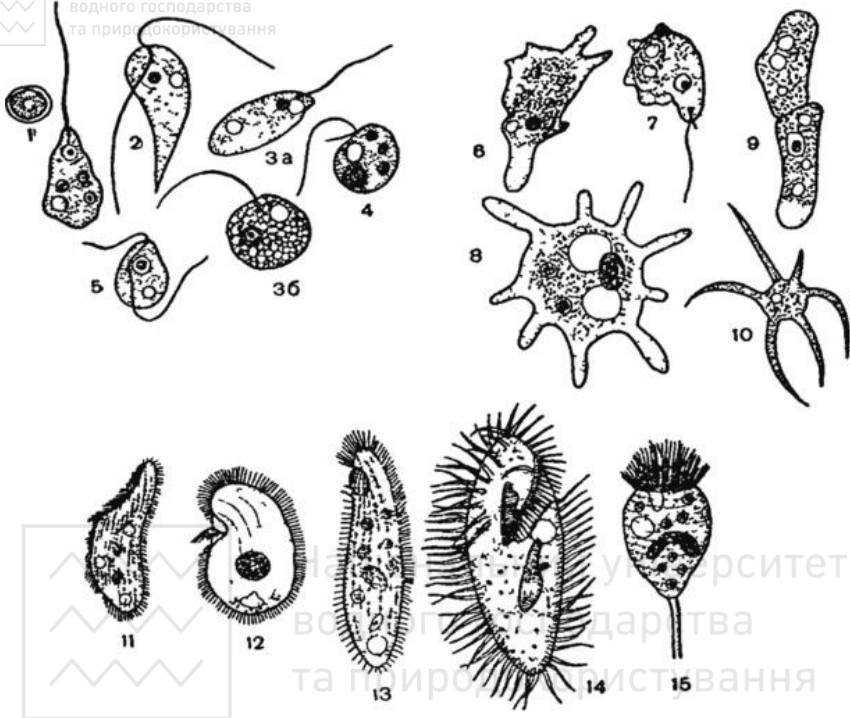


Рис. 5.1. Ґрунтові Найпростіші тварини:

1. *Mastigamoeba invertens*;
2. *Cercobodo crassicauda*;
3. *Oicomonas terma*;
4. *Monas sp.*;
5. *Bodo lens*;
6. *Vahlkampfia (Amoeba) albida*;
7. *Naegleria bistadiales*;
8. *Amoeba gorgona*;
9. *Amoeba umax*;
10. *Astramoeba radiosa*;
11. *Amphileptus sp.*;
12. *Colpoda sp.*;
13. *Balantiophorus elongates*;
14. *Gonostomium (Oxytricha) affine*;
15. *Vorticella microstoma*.

ХІД ЗАНЯТТЯ

1. Приготувати рідке поживне середовище із сінного відвару (1 вагову частину сухої трави із різнотрав'я залити 4 частинами охолодженої дистильованої води, настоювати 2-3 дні за температури 20-25⁰ С, після цього профільтрувати).
2. Приготовлене середовище розлити в таких пропорціях: в



колбу 90 мл (невелику кількість його взяти для доведення ґрунту до пастоподібного стану) та в 15 пробірок по 9 мл в кожену (для 5-ти розведень у 3-х повторностях).

3. Наважку ґрунту масою 10 г перенести у фарфорову чашку, зволожити рідким поживним середовищем до пастоподібного стану та ретельно розтерти товкачиком.
4. Підготовлений ґрунтовий зразок перенести у колбу з поживним середовищем та збовтувати упродовж 10 хвилин, потім на 30 с залишити для осадження крупних ґрунтових часточок.
5. З отриманої ґрунтової суспензії приготувати наступне розведення у трьох повторностях шляхом перенесення по 1 мл ґрунтової суспензії в кожену з 3 пробірок із 9 мл поживного середовища, вміст пробірок збовтати і дати відстоятись 30 с.
6. Аналогічним способом приготувати решту розведень ($1:10^3$ - $1:10^6$), відбираючи із пробірок по 1 мл суспензії попереднього розведення.
7. Пробірки підписати й помістити в термостат з температурою $22-24^{\circ}\text{C}$.
8. Мікроскопічний контроль за культурами й визначення Найпростіших тварин провести на 14 і 28 добу. Використовуючи довідкові та ілюстраційні матеріали, по можливості, визначити виявлені групи та види ґрунтових Найпростіших тварин, зарисувати їх, підписати їхні назви.
9. Визначити за таблицею Мак-Креді (табл. 5.1) кількість Найпростіших тварин в 1 г ґрунту.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Загальна характеристика Найпростіших тварин.
2. Поширення, біомаса та особливості існування ґрунтових Найпростіших тварин.
3. Живлення ґрунтових Найпростіших тварин та їхнє екологічне значення.



- Коротка характеристика основних систематичних груп ґрунтових Найпростіших тварин, їхня видова різноманітність.
- Культивування ґрунтових Найпростіших тварин на поживних середовищах.

Таблиця 5.1

Визначення кількості Найпростіших тварин в 1 г ґрунту (середнє із 3 повторностей) за Мак-Креді (скорочений варіант)

Числова характеристика	Найбільш вірогідне число Найпростіших	Числова характеристика	Найбільш вірогідне число Найпростіших
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
300	2,5	320	9,5
301	4,0	321	15,0
302	6,5	322	20,0
303	-	323	30,0
310	4,5	330	25,0
312	7,5	331	45,0
312	11,5	332	110,0
313	16,0	333	140,0

Інформаційні ресурси:

Звягинцев Д.Л. Почва и микроорганизмы. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1987.

Звягинцев Д.Л., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1989.

Зенова Г.М. и др. Практикум по биологии почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 2002.

Романенко В.Н. Почвенная зоология: учеб. пособие. Томск : Томский государственный университет, 2013.

URL: <http://obschaja-protozoologija.odn.org.ua/B5014Part94-507.html> – Назва 3



URL: <https://agroinf.com/mikrobiologiya/23/prostejshie.html>
– Назва з екрана.

URL: http://geolike.ru/page/g1_1236.htm – Назва з екрана.

URL: <https://znaika.ru/catalog/7-klass/biology/Mnogoobrazie-prosteyshikh.html> – Назва з екрана.

URL: <https://znaika.ru/catalog/7-klass/biology/Tip-Infuzorii.html> – Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=nt5wJ3x6BhY> – Назва з екрана.

Лабораторне заняття № 6

Тема: Нематоди та дрібні членистоногі ґрунтового середовища.

Мета заняття: Засвоїти методи виявлення та дослідження якісного складу ґрунтових членистоногих і нематод. Вивчити видовий склад дрібних безхребетних тварин у досліджуваних зразках ґрунту.

Обладнання та матеріали: Мікроскоп “Біолам С11”, збільшувана лупа, предметне та покривне стекла, технохімічні ваги, аркуш паперу, електор Тульгрена (сито з діаметром отворів 5 мм, лійка, посудина з 70%-им розчином спирту або 2%-им розчином формаліну, лампа на 60 Вт), металевий штатив, сито, гумова трубка із затискачем, чашки Петрі, лійка (діаметром 10 см), хімічні стакани на 50 мл, фільтрувальний папір, водопровідна вода, зразки ґрунту, ілюстраційні матеріали.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Ґрунт доволі рясно населений багатоклітинними дрібними безхребетними тваринами. Найдрібнішими із багатоклітинних тварин є Коловертки /*Rotatoria*/. Їхні розміри варіюють у межах 0,01-2,5 мм. Характерною їхньою особливістю є наявність у них колорухового апарату, що складається із колових рядів війок на передній частині тіла. Він виконує функцію органу руху та захоплення їжі. Коловертки подібні до інфузорій, однак їхнє тіло



багатоклітинне та розділене на чотири відділи: голова, шия, туловище, нога. Грунтові коловертки відносяться до мікрофауни ґрунту. Вони населяють лісову підстилку, товщу мохів і, як правило не проникають у мінеральні горизонти ґрунтів. Від кліматичних умов практично не залежать. Живляться детритом, бактеріями, одноклітинними водоростями; трапляються серед них хижаки, що захоплюють Найпростіших і дрібніших видів інших коловерток. Більшість видів коловерток є поліфагами, що не дуже сильно обмежені у виборі їжі, але трапляються монофаги, що віддають перевагу певним видам водоростей, або такі, що живляться лише детритом. Деякі види ведуть прикріплений спосіб життя, інші вільно плавають у водних капілярах і плівках.

Нематоди або Круглі черви (*Nematoda*) – це тип двобічно-симетричних червоподібних тварин, який включає приблизно 300 тис. видів. Вони живуть у різних середовищах: морських і прісних водах, ґрунті, органічних рештках, які гниють або бродять. Багато круглих червів пристосувалось до паразитування на рослинах, інших тваринах, деякі є паразитами людини. Із усіх багатоклітинних тварин, які живуть у ґрунті, нематоди є найбільш різноманітними і багаточисельними. Біомаса нематод в окультурених ґрунтах складає до 50 кг/га. За способом життя, що пов'язаний із типом живлення, нематоди можна розмістити в ряд: від строго сапробіонтних форм через напівпаразитів до справжніх паразитів рослин. Справжні сапробіонти мешкають у тих місцях, де активно відбуваються процеси розкладання органічної речовини, наприклад, у гної, компостах і лісових підстилках. Найчастіше в ґрунті зустрічаються гемісапробіонти, що живляться бактеріями, грибами, дріжджами й дрібними Найпростішими. В ризосфері рослин мешкають нематоди – паразитобіонти. Завдяки наявності стилету вони проколюють клітини кореня та живляться їхнім вмістом. Вони завдають не стільки прямої шкоди рослині, скільки шкодять тим, що відкривають доступ для грибною й бактеріальною інфекцій (рис. 6.1).



Справжні фітопаразити проникають у корені рослин, завдаючи їм механічних та хімічних ушкоджень. Наприклад, нематода, що вражає цукровий буряк, може знижувати врожай на 20-80%. Нематоди-хижаки живляться Найпростішими, коловертками, тихходками, іншими нематодами й ногохвістками. Вільноживучі ґрунтові нематоди меншою мірою ніж, наприклад, кліщі або ногохвістки, беруть участь у безпосередньому розкладанні рослинних залишків. Але, завдяки тому, що вони споживають в їжу мікробну біомасу з високим вмістом білка, їхні виділення багаті на азот. Біомаса нематод також є джерелом азоту. Тому значення ґрунтових нематод варто, мабуть, оцінювати з позиції їхнього впливу на баланс азоту в ґрунті.

Кільчасті черви або Кільчаки */Annelida/* – це також тип багатоклітинних двобічносиметричних тришарових тварин, у яких є вторинна порожнина тіла. Цей тип об'єднує понад 9000 видів (в Україні – приблизно 450 видів), які живуть у морських і прісних водах, а також у ґрунті. Порівняно з представниками інших типів червів, кільчаки мають значно вищий рівень організації. У ґрунті цей тип в основному представлений класом Малощетинкові черви або Олігохети */Oligochaeta/*. Серед олігохет найбільше значення для ґрунтів мають представники родин Енхітреїди */Enchytraeidae/* та Люмбрициди або Справжні дощові черви */Lumbricidae/*.

Енхітреїди відносяться до мезофауни ґрунту. Їхні розміри варіюють від 2-3 до 40-45 мм у довжину за товщини 0,2-0,8 мм. Найбільш дрібні з них користуються для переміщення в ґрунті системою природних пор і каналів, інші можуть активно прокладати ходи крізь ґрунт. Ґрунт, який поглинається цими тваринами, у подальшому змішується в кишковику з органічними й мінеральними речовинами, а потім викидається у вигляді специфічних утворень – копролітів. Біомаса енхітреїд в ґрунтах складає до 50 кг/га. Поширені енхітреїди переважно в північній півкулі, помірній і субарктичній зонах. Деякі види тривалий час витримують температури нижче 0⁰ С. Однак вони дуже чутливі до посух і



високих температур. Вони активні у вологому середовищі, але уникають перезвожених ґрунтів, де мало кисню. Основна маса енхітреїд зосереджена у верхньому кореневмісному шарі ґрунту, оскільки їхня основна їжа – відмираючі корені. Багато їх і в лісовій підстилці, там, де є сирий гумус типу “мор”. Цим вони відрізняються від дощових черв'яків.

Справжні дощові черви є найбільш вивченою ґрунтовою групою безхребетних тварин. Їхня біомаса коливається від 500 кг до 4 т на гектар. Вміст гумусу й кальцію в копролітах дощових черв'яків у 2 рази більший, ніж у навколишньому ґрунті, а їхня водостійкість є вищою на 40%. Дощові черви у симбіозі із мікроорганізмами здійснюють мінералізацію азотовмісних органічних сполук аж до утворення аміаку за рахунок амоніфікуючих мікроорганізмів, які живуть у їхньому кишковоки.

Вплив діяльності дощових черв'яків на ґрунт є різноманітним. Прокладаючи глибокі ходи, вони збільшують його пористість, полегшують проникнення води, повітря у корені рослин. Черви переміщують ґрунт, виносячи частину його на поверхню з нижніх горизонтів і зтягають у глибину рослинний матеріал із підстилки. Під впливом черв'яків змінюється й хімічний склад ґрунту. Карбонат кальцію, що виробляється спеціальними залозами, нейтралізує кислоти, тому копроліти завжди мають більш високе значення рН, ніж ґрунт. На копролітах рясно розвиваються бактерії, так що вони є центрами формування мікробних угруповань. За наявності ходів черв'яків корені проникають значно глибше, ніж без них.

Відомо приблизно 200 видів люмбрицид. Із них найбільш поширеними для середніх широт є такі види, як *Lumbricus rubellus* та *Lumbricus terrestris*. Досить розповсюдженим є вид *Allolobosphora caliginosa*, що живе в орних ґрунтах. Для гною та компостів характерним є *Eisenia foetida*. Поширення дощових черв'яків пов'язане з кліматичними факторами і типом ґрунтів. Важливою умовою їхнього існування є вологість, під час тривалих посух черви, як правило, гинуть. Ранні заморозки теж викликають їхню



загибель. Погано вони переносять і високі температури. Найменша чисельність дощових черв'їв спостерігається в кислих ґрунтах. Вапнування дерново-підзолистих ґрунтів призводить до збільшення кількості в них черв'їв.

Негативне значення дощових черв'їв виявляється в тому, що їхні великі представники можуть порушувати міцність (стійкість) ґрунту під будівлями, в деяких умовах вони пошкоджують посіви, а також вони є проміжними господарями інших черв'їв – паразитів сільськогосподарських тварин.

Тип Членистоногі */Arthropodal* є найчисельнішим і найрізноманітнішим серед усіх тварин. Він включає представників ґрунту, що належать до мікро-, мезо- і макрофауни.

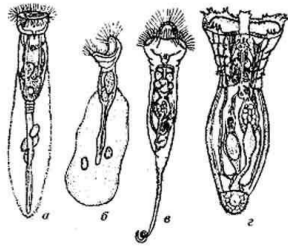
До мікрофауни відносяться тихоходки */Tardigradal*, панцирні кліщі */Oribatei* і ногохвістки */Collembola*. Тихоходки мають розміри тіла від 0,1 до 1 мм. Живуть серед вологих мохів, на лишайниках, у лісовій підстилці. Хоча їх відносять до гідробіонтної мікрофауни, вони добре переносять висихання, стійкі до високих і низьких температур. Ці тварини зустрічаються від тропіків до полярних районів. Найбільш відомі представники родів: *Macrobiotus*, *Hypsibius*, *Echiniscus*.

Панцирні кліщі або орібатиди та ногохвістки або колемболи – нижчі безкрилі комахи, утворюють ґрунтову аеробіонтну мікрофауну. Їхня сумарна біомаса оцінюється в 1-2 кг/га, тобто значно менше, ніж біомаса гідробіонтної частини мікрофауни – нематод і коловерток. Сильно впливає на чисельність цих тварин у ґрунті повітряний режим, який пов'язаний з пористістю ґрунтів: у піщаних їх, як правило, більше, ніж у глинистих, на пасовищах вони зосереджені в найбільш верхньому горизонті, а на ріллі проникають на всю глибину орного шару.

Основне місце існування ногохвісток – лісова підстилка. Угруповання ногохвісток, як правило, представлені сапробіонтними видами, що живляться мертвими рослинними тканинами разом із бактеріями й грибним міцелієм. Вони



приймають участь у розкладанні рослинних залишків і мають велике значення для кругообігу речовин у ґрунті.



Коловертки



Нематоди

Рис. 6.1. Ґрунтові безхребетні тварини.

Орїбатиди зустрічаються у ґрунтах усіх кліматичних поясів. Найбільш багаточисельні вони, як і ногохвістки, у ґрунтах вологих лісів, де зосереджені в шарі підстилки.

Кліщі і ногохвістки входять до екологічних груп: хижаки, сапробіонти, травоїдні тварини. Кліщі-хижаки живляться ногохвістками, іншими кліщами, нематодами, енхітреїдами та дрібними личинками комах. Серед панцирних кліщів є види, що живляться гіфами грибів, клітинами дріжджів, спорами, лишайниками й водоростями.

Усі інші групи членистоногих – павуки */Arachnidal*, мокриці */Oniscoideal*, багатоніжки */Myriapodal*, комахи */Insectal* відносяться до мезофауни ґрунту. Павуки є більш багаточисельними у ґрунтах пасовищних угідь, ніж в орних землях. Мокриці й багатоніжки мешкають головним чином у лісах, рідше на луках, ще менше в орних ґрунтах. Основне місцеіснування мокриць – лісова підстилка. Мокриці та деякі багатоніжки (ківсяки) відносяться до сапрофагів. Прокладаючи ходи в ґрунті, вони покращують його пористість, збільшують аерацію, здійснюють первинну переробку мертвого рослинного матеріалу. Екскременти багатоніжок схожі з копролітами дощових черв'яків. Серед



багатоніжок є дуже дрібні види, всього 1,5 мм довжиною, а є й такі, що досягають розмірів 10-15 см.

Комахи – клас Членистоногих, частка якого складає приблизно 70% усього видового складу тварин. Багато представників комах – одні в дорослому стані (стадія імаго), інші в стадії личинок – живуть у ґрунтах. Комахи по-різному впливають на ґрунт. Личинки багатьох комах поводять себе як дощові черви. Найбільше значення мають личинки ряду Твердокрилі або Жуки */Coleoptera/* і Двокрилі */Diptera/*: дротяники – личинки коваликів, безногі личинки довгоносиків, довговусих і мух. У ґрунті живуть личинки деяких видів метеликів і пильщиків. Окремі із них ведуть хижий спосіб життя, інші є сапрофагами. Дротяники та личинки хрущів виключно стійкі до високих концентрацій вуглекислого газу, завдяки чому вони добре переносять затоплення. У личинок хрущів виражений хемотаксис за відношенням до вмісту CO₂, що виділяється коренями рослин, яких вони їм вражають. Помітною для ґрунту є риуча діяльність мурашок. Терміти, не тільки перекопують ґрунт, але й впливають на його хімічний склад, температуру, капілярність і пересування солей (рис. 6.2; рис. 6.3).

ХІД ЗАНЯТТЯ

1. На технохімічних вагах відважити приблизно 50-70 г запропонованого зразка ґрунту. На аркуш паперу покласти сито і перенести в нього відважений зразок ґрунту.

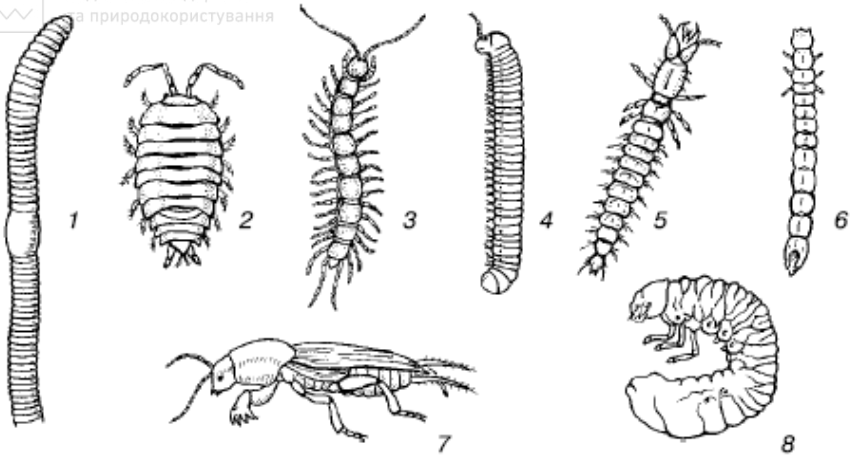


Рис. 6.2. Ґрунтові безхребетні тварини: 1. дощовий черв; 2. мокриця; 3. губонога багатоніжка; 4. двопарнонога багатоніжка; 5. личинка жури; 6. личинка дротяника; 7. ведмедка; 8. личинка хруща.

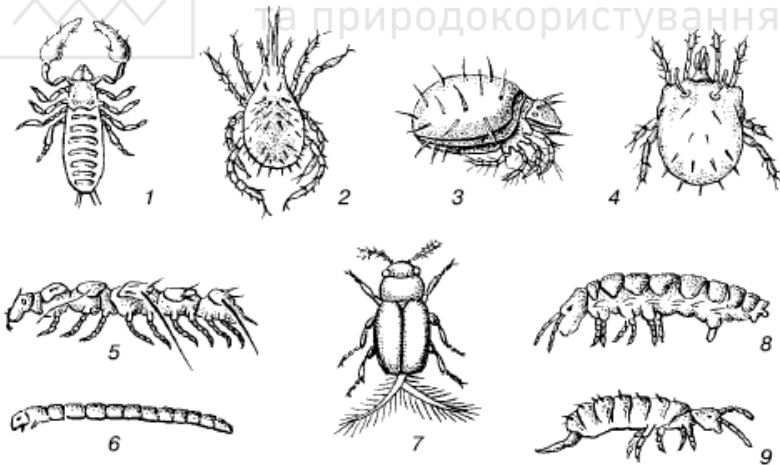


Рис. 6.3. Ґрунтові Членистоногі тварини: 1. псевдоскорпіон; 2. гама новий кліщ; 3-4. панцирні кліщі; 5. двопарнонога багатоніжка; 6. личинка комара-хірономіди; 7. жук; 8-9. ногохвістки.



2. Обережно переставити сито на інший аркуш паперу, а частинки ґрунту, що просіялись крізь отвори сита, з паперу перенести назад у сито після його розміщення на лійці.
3. Для виявлення безхребетних тварин використати еклектор Тульгрена (рис. 6.4). Для цього лійку еклектора закріпити в штативі, сито дещо меншого діаметру помістити зверху на лійку. Підставити під шийку лійки чашку Петрі із фіксуючою рідиною (70%-им розчином спирту або 2%-им розчином формаліну). Внаслідок підсихання проби ґрунту, яке відбувається інтенсивніше зверху, дрібні членистоногі рухаються вглиб і, провалюючись крізь отвори сита, потрапляють у чашку із фіксуючою рідиною. Для прискорення підсушування ґрунту застосувати нагрівання проби ґрунту лампою на 60 Вт (потрібно слідкувати, щоб температура поверхні ґрунту не піднімалась вище 35° - 40° С). Нагрівання проводити приблизно 20 хвилин.
4. Фіксуючу рідину із чашки Петрі з тваринами, що потрапили до неї, профільтрувати у хімічний стакан.
5. Після закінчення фільтрування фільтрувальний папір розправити на чистій чашці Петрі.
6. Використовуючи збільшувач лупу, розглянути наявні безхребетні тварини, підрахувати їхню кількість, за довідковими та ілюстраційними матеріалами, по можливості, визначити виявлені групи та види тварин, записати їхні назви.
7. Для точнішого виявлення тварин фрагменти фільтрувального паперу із тваринами перенести на предметні стекла, накрити покривним склом і розглянути під малим збільшенням мікроскопа. Провести аналіз, аналогічний п. 6.
8. Для обліку енхітреїд використати метод О'Коннора. Для цього лійку діаметром 10 см закріпити в штативі, на її шийку надягнути гумову трубку із затискачем, під яку підставити хімічний стакан. У лійку доверху налити



водопровідної води. У верхній частині лійки на штативі закріпити сито, так, щоб його дно було занурене у воду.

9. На технохімічних вагах відважити приблизно 50 г запропонованого зразка ґрунту та перенести його в сито, ґрунт знизу частково має бути зануреним у воду.
10. Над пробою ґрунту включити електричну лампочку на 60 Вт. Під час нагрівання проби енхітреїди мігрують вниз і, проповзаючи крізь отвори сита, тонуть у воді, накопичуючись у шийці лійки та в гумовій трубці.
11. Вигонку тварин проводити упродовж 3 годин, після цього відкрити затискач, енхітреїди зі струйкою води попадуть у підставлений хімічний стакан.
12. Вміст стакана профільтрувати в інший хімічний стакан.
13. Провести аналіз, аналогічний пп. 5-7.

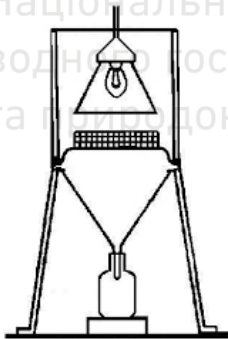


Рис. 6.4. Схема еклектора Тульгрена

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Загальна характеристика ґрунтових коловертток, їхня екологічна роль.
2. Загальна характеристика, поширення, біомаса, особливості існування, екологічна роль ґрунтових нематод.
3. Загальна характеристика, поширення, біомаса, екологічна роль, основні групи, видова різноманітність ґрунтових кільчастих червів.



4. Загальна характеристика, поширення, екологічна роль, основні групи, видова різноманітність ґрунтових членистоногих.
5. Методи виявлення дрібних безхребетних ґрунтових тварин.

Інформаційні ресурси:

Звягинцев Д.Л., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1989.

Зенова Г.М. и др. Практикум по биологии почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 2002.

Романенко В.Н. Почвенная зоология: учеб. пособие. Томск : Томский государственный университет, 2013.

URL:

http://www.cnsnb.ru/elibi.asp?s=elib&p=elib/fermer/2/dig/&a=d_51.htm – Назва з екрана.

URL:

<https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26248> – Назва з екрана.

URL: http://www.zoology.dp.ua/z_05_119.html – Назва з екрана.

URL: <https://www.work5.ru/gotovye-raboty/135086> – Назва з екрана.

URL: <https://scicenter.online/ekologicheskij-monitoring-scicenter/eklektornyie-metodyi-166179.html> – Назва з екрана.

URL: <https://scicenter.online/ekologicheskij-monitoring-scicenter/sposobyi-sbora-pochvennyih-nasekomyih-165389.html> – Назва з екрана.

URL:

https://myzooplanet.ru/pochvovedenie_903/pochvennyie-jivotnyie-17440.html – Назва з екрана.

URL:

http://window.edu.ru/catalog/pdf2txt/215/69215/43946?p_page=3 – Назва з екрана.

URL:

<https://sites.google.com/site/enciklopediasamarskojoblastit3/home/bespozvonocnye/clenistonogie/nogohvostki> – Назва з екрана.



URL: <https://www.youtube.com/watch?v=cdRpvlENtHI> –

Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=BLhAiKEmcKY> –

Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=dc41fCrX0uk> –

Назва з екрана.

Лабораторне заняття № 7

Тема: Вивчення розподілу мікроорганізмів у різних типах ґрунтів методом скелець обростання Росі-Холодного.

Мета заняття: Засвоїти методи вивчення комплексу мікроорганізмів та взаємовідносин між їхніми різними групами безпосередньо в ґрунті. Вивчити мікробні угруповання на скельцях обростання з генетичних горизонтів різних типів запропонованих ґрунтів.

Обладнання та матеріали: Мікроскоп “Біолам С11”, стерильні предметні та покривні стекла, штикова лопата або лопатка, ніж, кілки, сірники, пінцети, спиртівка, хімічні стакани на 50 і 250 мл, скляний бюкс, ґрунтові моноліти, 1%-ий розчин карболового еритрозину, імерсійна олія, дистильована вода, ілюстраційні матеріали.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Мікробні угруповання ґрунту є складовою частиною біотичного компоненту біогеоценозу або екосистеми, вони часто пов’язані із різними видами ґрунтової мезо- та макробіоти, а також із багатьма видами наземно-повітряного середовища, наприклад симбіотичні мікроорганізми на коренях вищих рослин. Водночас для сукупності ґрунтових мікроорганізмів характерні свої специфічні особливості, що дає підставу розглядати їх як відносно самостійне структурно-функціональне утворення. Елементарним рівнем такого утворення потрібно вважати мікробну асоціацію, яка представляє собою сукупність особин двох і більше видів. Вважається, що мікробні асоціації формуються за принципом сумісності (тип біотичних відносин носить характер



протокооперації, коменсалізму, мутуалізму). Поєднання мікробних асоціацій призводить до утворення мікробного ценозу або власне мікробного угруповання.

Методи прямого мікроскопічного підрахунку мікроорганізмів не дають можливості скласти уявлення про їхній природний розподіл і взаємовідносини між різними групами безпосередньо у ґрунтовому середовищі.

Для кожного типу ґрунту характерні певний якісний склад і просторовий розподіл мікроорганізмів, які формують мікробний ценоз або пул. Під час використання загальноприйнятих методів мікробіологічних досліджень просторовий розподіл мікроорганізмів спотворюється та порушується, що не дозволяє виявити мікробні угруповання у різних горизонтах ґрунтів.

Для вивчення мікронаселення ґрунтів, виявлення мікробних угруповань, встановлення спрямованості та інтенсивності процесів, обумовлених життєдіяльністю мікробних пулів, визначення взаємовідносин у них між окремими представниками ґрунтового мікросвіту, запропоновано ряд методів: метод скелець обростання Холодного та його модифікації, метод капілярних педоскопів Перфільєва та його модифікації, люмінісцентно-мікроскопічне вивчення мікроорганізмів ґрунту на ґрунтових монолітах за Звягінцевим та інші.

Суть методу скелець обростання Холодного полягає у тому, що у ґрунті на певний період часу розміщують простерилізовані предметні стекла, які незабаром вкриваються ґрунтовим субстратом, на їхній поверхні адсорбуються його колоїдні частинки органічного та мінерального походження. У цьому випадку створюється сприятливе середовище, де поселяються та активно розвиваються різні види мікроорганізмів, які утворюють на стеклах характерні для даного ґрунту мікроугруповання.

Перевагою цього методу є те, що він дозволяє проводити спостереження за розвитком мікроорганізмів безпосередньо в ґрунті за мінімальної зміни умов їхнього існування. На основі



вивчення скелець обростання можна скласти не тільки уявлення про склад мікробних асоціацій ґрунту, але, порівнюючи різні ґрунти між собою, можна отримати певне уявлення про відносне багатство того або іншого ґрунту на мікроорганізми. На скельцях обростання враховують лише ті мікроорганізми, що знаходяться в даний момент в активному стані, в той час, як використовуючи прямі мікроскопічні методи обліку мікроорганізмів, ми не маємо можливості диференціювати форми, що інтенсивно розвиваються, і форми, що перебувають у ґрунті у стані спокою.

Недоліками цього методу є те, що сама процедура встановлення скелець вносить певні зміни в умови ґрунтового середовища, внаслідок чого його властивості біля скелець виявляються дещо іншими. Інколи вказують на статичність методу: досліджувані препарати відображають тільки певний момент у житті ґрунту й не дозволяють простежити всю динаміку розвитку мікроорганізмів.

ХІД ЗАНЯТТЯ

1. Для дослідження використати ґрунтові моноліти або ґрунти на місцевості. У першому випадку лопаткою зробити мінірозріз. У другому випадку закласти ґрунтовий розріз. У ґрунті виділити ґрунтові горизонти. У розрізі зачистити одну зі стінок.
2. Для кожного горизонту зробити ножом вертикальну щілину та закласти в неї стерильні предметні стекла, щільно притиснувши їх до ґрунтового субстрату.
3. Розріз засипати, відмітивши кілочком місцезнаходження скелець.
4. Після закінчення строку експозиції (не менше 1 місяця) стекла обережно відокремити від ґрунту.
5. Вийняті стекла підсушити на повітрі, потім зафіксувати в полум'ї спиртівки, провівши склом, закріпленим у пінцеті, декілька разів над поверхнею полум'я.
7. Обережно відмити препарат водою від крупних частинок ґрунту. Для цього залишити скло в стакані з водою в



нахиленому положенні на декілька годин.

8. Відмитий мікропрепарат на склі зафарбувати 1%-им розчином карболового еритрозину упродовж 1 год. у вологій камері (скляний бюкс із наливою на дні водою).
9. Мікропрепарат промити дистильованою водою, висушити у полум'ї спиртівки.
10. Отримані мікропрепарати розглянути під малим і великим збільшеннях мікроскопа. У першому випадку на мікропрепарат нанести декілька крапель води та накрити покривним склом, розглянути під мікроскопом зі збільшенням об'єктива x15 та x40. У другому випадку розглянути під мікроскопом зі збільшенням об'єктива x90 із використанням імерсійної олії (див. лабораторне заняття № 2, п. 15).
11. Використовуючи довідкові та ілюстраційні матеріали, по можливості, визначити виявлені групи та види ґрунтових мікроорганізмів, зокрема звернути увагу на наявність на мікропрепаратах гіфів грибів, колоній бактерій, клітин Найпростіших, зарисувати їх, підписати їхні назви. Зробити висновок про наявність різних груп мікроорганізмів у генетичних горизонтах ґрунтів.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Поняття про мікробні угруповання ґрунту.
2. Недоліки методів прямого мікроскопічного підрахунку ґрунтових мікроорганізмів.
3. Методи вивчення мікронаселення ґрунтів.
4. Суть методу скелець обростання Холодного.
5. Переваги та недоліки методу скелець обростання Холодного.

Інформаційні ресурси:

Звягинцев Д.Л. Почва и микроорганизмы. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1987.

Звягинцев Д.Л., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1989.



Зенова Г.М. и др. Практикум по биологии почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 2002.

Іутинська Г.О. Грунтова мікробіологія: навчальний посібник. Київ : Арістей, 2006.

URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mikrobnnoe-soobshchestvo-pochvy-fiziologicheskoe-raznoobrazie-i-metody-issledovaniya> – Назва з екрана.

URL: https://m.studme.org/287641/ekologiya/selskohozyaystvennaya_mikrobiologiya – Назва з екрана.

URL: https://www.researchgate.net/publication/318701664_Metodologia_mikrobiologicheskikh_issledovaniy_pochvy_v_ramkah_proekta_Mikrobiom_Rossii – Назва з екрана.



Лабораторне заняття № 8

Тема: Визначення каталазної активності ґрунтів.

Мета заняття: Засвоїти методику визначення активності каталази у ґрунтових субстратах. Визначити каталазну активність для запропонованих зразків ґрунту.

Обладнання та матеріали: технохімічні ваги, секундомір, сито з діаметром отворів 0,25 мм, пінцет, товстостінні плоскодонні колби на 100 мл, прилад для визначення активності каталази, хімічні стаканчики на 10 мл, хімічний стакан на 50 мл, мірний циліндр на 10 мл, піпетка градуйована на 5 мл, папір для наважки карбонату кальцію, карбонат кальцію (CaCO_3), 10%-ий розчин H_2O_2 , дистильована вода, зразки ґрунту, стерилізований ґрунт.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Ферментативну активність ґрунту прийнято розглядати як сукупність процесів, які каталізуються позаклітинними екзоферментами (іммобілізованими на ґрунтових частинках і стабілізованими в ґрунтовому розчині) та внутрішньоклітинними ферментами ґрунтової біоти. У ґрунті



накопичується певний «пул» ферментів, якісний і кількісний склад якого характерний для даного типу ґрунтів, однак інтенсивність ферментативних процесів залежить від конкретних умов: наявності й концентрації субстрату, температури, вологості, значення рН та ін.

Різноманітність ферментів насамперед забезпечує можливість здійснення послідовних біохімічних перетворень органічних залишків, які надходять у ґрунт. Накопичуючись у ґрунті, ферменти стають невід'ємним реакційним компонентом екосистеми. Ґрунт є найбагатшою системою щодо ферментної різноманітності та ферментативного пулу.

Різноманітність і багатство ферментів у ґрунті забезпечує здійснення послідовних біохімічних перетворень різних поступаючих сюди органічних залишків. Значну роль ґрунтові ферменти відіграють у процесах гумусоутворення. Перетворення рослинних і тваринних залишків в гумусові речовини є складним біохімічним процесом, який здійснюється за участю різних груп мікроорганізмів, а також іммобілізованих ґрунтом позаклітинних ферментів. Виявлено прямий — зв'язок між інтенсивністю гуміфікації і ферментативною активністю. Особливо варто відзначити значення ферментів в тих випадках, коли у ґрунті складаються екстремальні для життєдіяльності мікроорганізмів умови, зокрема внаслідок хімічного забруднення. У цих випадках метаболізм у ґрунті залишається певною мірою незмінним завдяки дії іммобілізованих ґрунтом, і тому стійких, ферментів.

Ферментативна активність ґрунтів — один із показників потенційної біологічної активності ґрунтів, що характеризує потенційну здатність системи підтримувати гомеостаз. Оцінюючи біологічну активність ґрунтів у цілому, необхідно визначати активність декількох ферментів, які відносяться до різних класів. Найкраще вивченими у ґрунті є ферменти класів оксидоредуктаз і гідролаз, для них переважно й розроблені методи визначення.

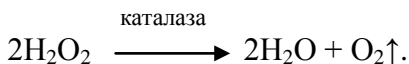
Ферменти, які відносяться до класу оксидоредуктаз,



каталізують окисно-відновні реакції та відіграють помітну роль у біохімічних процесах, що відбуваються у клітинах живих організмів, а також у ґрунті. Окисно-відновні реакції є головною ланкою у процесі синтезу гумусових речовин у ґрунті. Оксидоредуктази беруть участь в утворенні солонців і в деяких інших процесах у ґрунті. Найбільш поширеними в ґрунтах є такі оксидоредуктази, як каталаза, дегідрогенази, пероксидази, поліфенолоксидази та інші, активність яких є важливим показником біологічної активності ґрунтів, а також їхнього генезису.

Із гідролаз в ґрунтах широко поширені інвертаза, уреаза, протеази, фосфатази. Ці ферменти беруть участь в реакціях гідролітичного розкладання високомолекулярних органічних сполук і тим самим відіграють важливу роль у збагаченні ґрунту рухомими та доступними для рослин і мікроорганізмів поживними речовинами.

Одним із характерних показників біологічної активності ґрунту є активність каталази. Каталаза розкладає отруйний для клітин перекис водню, що утворюється у процесі дихання живих організмів і в результаті різних біохімічних реакцій окислення органічних речовин, на воду й молекулярний кисень:



Каталазна активність характерна для усіх живих організмів, у тому числі й мікроорганізмів. Каталаза широко поширена також у ґрунтах. Активність каталази визначають або газометричним методом, який ґрунтується на вимірюванні швидкості розкладання перекису водню під час його взаємодії з ґрунтом за об'ємом кисню, що виділився, або за кількістю нерозкладеного перекису, який розраховують шляхом перманганатометричного титрування колориметричним



Газометричний метод, який є швидким, точним і який не вимагає складної апаратури, найбільш широко застосовується на практиці.

ХІД ЗАНЯТТЯ

1. Запропонований зразок ґрунту просіяти через сито з діаметром отворів 0,25 мм і на технохімічних вагах відважити 1 г просіяного ґрунту. Відважити 0,5 г карбонату кальцію (CaCO_3).
2. Наважку ґрунту та карбонату кальцію помістити в товстостінну плоскодонну колбу на 100 мл.
3. Відміряти 1,7 мл 10%-ого розчину перекису водню, перенести його в маленький хімічний стаканчик, за допомогою пінцета обережно поставити стаканчик на дно колби.
4. Наважку ґрунту змочити 4 мл дистильованої води.
5. Колбу щільно закрити каучуковим корком із приладу для визначення активності каталази, який має трубку та сполучений товстостінним каучуком через трійник із бюреткою. Остання сполучається зі склянню грушою. Бюретку та грушу заповнити водою.
6. Рівень води у бюретці та груші врівноважити й останню закріпити на певній висоті (рис. 8.1).
7. Закрити кран, перекривши сполучення приладу із зовнішнім середовищем. Потрібно стежити, щоб рівень води у бюретці залишався нерухомим, що свідчить про досягнення температурної рівноваги між температурою приладу та кімнати.
8. Стаканчик із розчином перекису водню перекинути (цей момент є початком досліду, його відмітити включенням секундоміра), потім струшувати вміст колби упродовж 1 хвилини за температури $18-20^{\circ}\text{C}$. Струшування суміші варто продовжувати увесь час досліду, не торкаючись безпосередньо колби руками. Після закінчення терміну

проведення дослідів виключити секундомір і відмітити рівень води у бюретці. Кисень, який виділяється, витискає воду з бюретки.

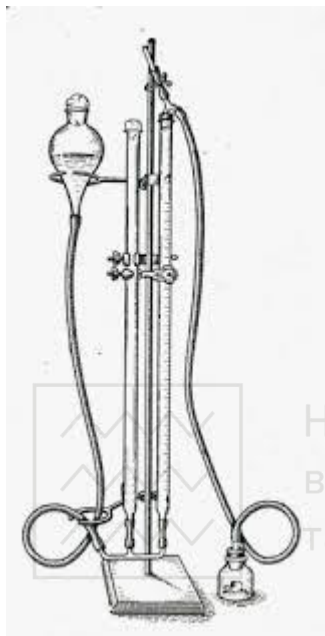


Рис. 8.1. Прилад для визначення активності каталази.

9. Операції, які наведені у пп. 1-8, провести із контрольним зразком, яким є ґрунт, стерилізований сухим жаром за температури 180°C .
10. Активність каталази виразити у мл кисню, що виділився на 1 г ґрунту (помилка визначення – до 5%), порівняти її із такою для контрольного зразка, оцінити за даними таблиці (табл. 8.1) та визначити ступінь збагаченості ґрунтів каталазою.



**Шкала для оцінки ступеня збагаченості ґрунтів каталазою
(розрахунок на 1 г ґрунту) (Звягинцев, 1978)**

Ступінь збагаченості ґрунтів	Дуже бідний	Бідний	Середня збагаченість	Багатий	Дуже багатий
Каталаза, O_2 см ³ /г за 1 хв.	1	1 - 3	3 - 10	10 - 30	30

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Поняття про ферментативну активність ґрунту.
2. Ендо- та екзоферменти ґрунтових мікроорганізмів.
3. Роль ґрунтових ферментів.
4. Оцінка біологічної активності ґрунтів.
5. Ґрунтові оксидоредуктази та гідролази.
6. Методи визначення активності каталази у ґрунті.

Інформаційні ресурси:

Звягинцев Д.Л. Почва и микроорганизмы. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1987.

Звягинцев Д.Л., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1989.

Зенова Г.М. и др. Практикум по биологии почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 2002.

Іутинська Г.О. Ґрунтова мікробіологія: навчальний посібник. Київ : Арістей, 2006.

URL: <http://studepedia.org/index.php?vol=1&post=98001> – Назва з екрана.

URL: http://wood-prom.ru/analitika/15110_pokazateli-biologicheskoy-aktivnosti-pochvy – Назва з екрана.

URL: <https://studfiles.net/preview/1726193/> – Назва з екрана.



Лабораторне заняття № 9

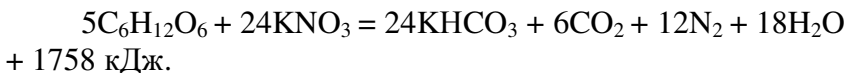
Тема: Денітрифікуючі бактерії.

Мета заняття: Засвоїти методику отримання накопичувальної культури для дослідження ґрунтових зразків на наявність у них денітрифікуючих мікроорганізмів.

Обладнання та матеріали: технохімічні ваги, сухожарова піч, термостат, штатив для пробірок, стерильні пробірки, гумові корки для пробірок, шпатель для внесення ґрунту, поживне середовище Гільтая (змішують два розчини: 1) у 250 мл водопровідної води розчинити 2,1 г KNO_3 ; 2) у 500 мл водопровідної води розчинити 10 г аспарагіну, 5 г цитрату натрію, 2 г KH_2PO_4 , 2 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 г CaCl_2 , сліди FeCl_3 ; після змішування суміш простерилізувати упродовж 30 хвилин), вазелінова олія, зразки ґрунту.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Денітрифікацією називають процес відновлення нітратних форм азоту через нітритні форми до аміаку та вільного молекулярного азоту. Розрізняють пряму і непряму денітрифікацію. За прямої денітрифікації відновлення нітратів здійснюється у результаті життєдіяльності особливої групи так званих денітрифікуючих бактерій. Процес прямого відновлення нітратів денітрифікуючими бактеріями має для них енергетичне значення – за рахунок відновлення нітратів вони окислюють органічні речовини:



В аеробних умовах денітрифікуючі бактерії зазвичай не відновлюють нітратів, а використовують у процесі дихання вільний кисень повітря. Таким чином, нітрати в анаеробних умовах є акцепторами водню замість кисню повітря, який виконує роль акцептора водню в аеробних умовах.

Відновлення нітратів відбувається у такій послідовності:





Нині відомо понад 150 видів денітрифікуючих бактерій із 50 родів, зокрема види родів *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus* і *Micrococcus*. В останні роки з'явилися відомості про можливу участь у процесах денітрифікації видів ґрунтових грибів (роди *Fusarium*, *Trichoderma*, *Talaromyces* та ін.). Найбільш активними є наступні збудники прямої денітрифікації:

Pseudomonas denitrificans – маленькі, перетрихіально джгутикові, безспорові палички, факультативні анаероби, відновлюють нітритні форми до молекулярного азоту;

Pseudomonas fluorescens – невеликі, безспорові, грамнегативні, рухливі палички, що утворюють зеленуватий пігмент і забарвлюють середовище в жовто-зелений колір, досить активно відновлюють нітратні форми з утворенням молекулярного азоту;

Achromobacter stutzeri (*Pseudomonas stutzeri*) – невеликі, грамнегативні палички (розміром 0,3x0,5 мкм), що сполучені в ланцюжки, відновлюють нітратні форми в анаеробних умовах;

Pseudomonas pyocyanea (*Ps. aeruginosa*) – невеликі, безспорові, грамнегативні, рухливі палички, краще розвивається в аеробних умовах, утворюють пігмент, що забарвлює середовище в синьо-зелений колір, відновлюють нітратні форми до нітритних і навіть до молекулярного азоту;

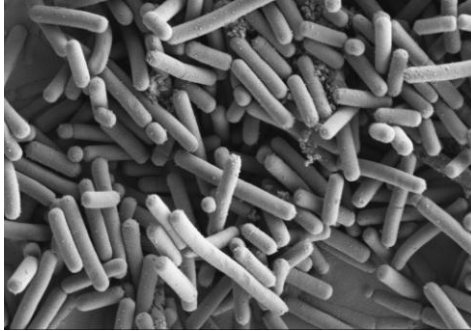
Thiobacillus denitrificans – це безбарвні, паличкоподібні, грамнегативні, аеробні бактерії з полярними джгутиками, є найважливішими учасниками очищення підземних вод від нітратів (рис. 9.1).

Процес прямої або “справжньої” денітрифікації небажаний, оскільки в його результаті легкодоступні, добре засвоювані рослинами мінеральні азотовмісні сполуки втрачають азот. Мінеральний азот переходить у газоподібну форму, яка безпосередньо не може засвоюватися рослинами. З'ясовано, що у процесі денітрифікації втрати азоту можуть досягати 20% від загальної кількості нітратних форм у ґрунті.

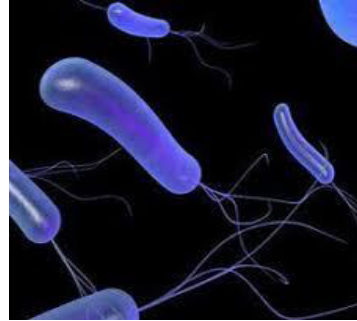
Однак помилково вважати, що процес денітрифікації є широко розповсюдженим. Основні умови, що сприяють



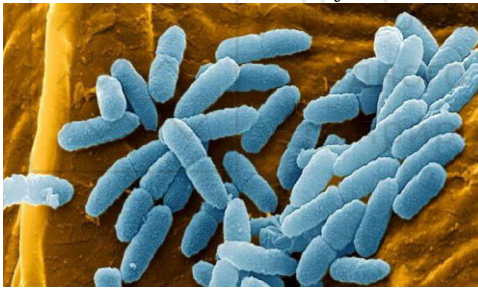
денітрифікації, це – висока вологість ґрунту, погана аерація, велика кількість легкоокислюваних безазотистих органічних сполук і нітритів, поганий дренаж, відповідна кислотність (рН 7,0-8,2) і температура.



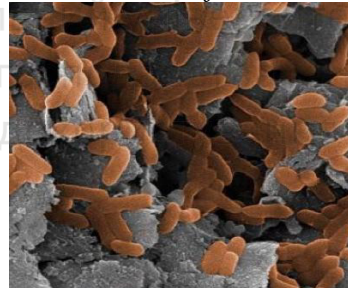
Pseudomonas denitrificans



Pseudomonas fluorescens



Pseudomonas pyocyanea
(*Ps. aeruginosa*)



Thiobacillus denitrificaris

Рис. 9.1. Види денітрифікуючих бактерій.

За відсутності цих умов, навіть за наявності великої кількості денітрифікуючих бактерій у ґрунті, помітного зменшення азоту у результаті денітрифікації не спостерігається. Велика кількість денітрифікуючих бактерій у родючих ґрунтах, у ризосфері і на коренях добре розвинутих рослин за певних умов може відігравати позитивну роль. Велика маса денітрифікуючих бактерій, маючи широкий набір ферментів, може викликати спряжене протікання процесів



амоніфікації і денітрифікації. Денітрифікуючі бактерії здатні не тільки відновлювати нітрати. Їхня роль у біологічному кругообігу речовин у природі дуже різноманітна.

Непряма денітрифікація відбувається внаслідок безпосередньої хімічної взаємодії між амінокислотами, амінними й амідними сполуками та азотистою кислотою. У результаті цієї взаємодії також утворюється молекулярний азот.

Роль мікроорганізмів у цьому процесі зводиться до утворення нітритних форм та амінокислот. Тому непрямій денітрифікації сприяють багато видів усіляких бактерій, що відновлюють нітратні форми до нітритних або розкладають білкові речовини з утворенням амінокислот і їхніх амідів.

ХІД ЗАНЯТТЯ

1. Приготовлене середовище Гільтая розлити у стерильні пробірки, що розміщені у штативі, високим шаром (до 3/4 висоти пробірки).
2. Для зараження денітрифікуючими бактеріями на технохімічних вагах відважити 0,5 г ґрунту із запропонованих зразків, узятих із сильно зволоженої земельної ділянки, яка не використовується в сільськогосподарському виробництві, та внести у пробірки із середовищем.
3. Для створення анаеробних умов на поверхню рідини у пробірках нанести вазелінової олії, отвір пробірок щільно закрити гумовими корками.
4. Штатив із пробірками поставити у термостат із температурою 25-30° С на 7-10 днів.
5. Після зазначеного терміну проаналізувати хімізм процесу денітрифікації. Про процес відновлення нітратних форм і утворення азоту, що відбувається у цьому випадку, свідчать посиніння середовища, поява пухирців газу та піни на поверхні середовища.



ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Суть процесів денітрифікації.
2. Пряма та непряма денітрифікація.
3. Мікроорганізми, що зумовлюють процеси денітрифікації.
4. Умови, що сприяють проходженню процесів денітрифікації.
5. Негативне та позитивне значення процесів денітрифікації.

Інформаційні ресурси:

Звягинцев Д.Л. Почва и микроорганизмы. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1987.

Звягинцев Д.Л., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1989.

Зенова Г.М. и др. Практикум по биологии почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 2002.

Іутинська Г.О. Грунтова мікробіологія: навчальний посібник. Київ : Арістей, 2006.

URL: <https://agroinf.com/mikrobiologiya/-prevrashcheniye-mikroorganizmami-soyedeneniy-azota/denitrifikaciya.html> – Назва з екрана.

URL: <https://bookucheba.com/pishevaya-promyshlennost-knigi/denitrifikatsiya-24628.html> – Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=I8FpCuC4Z5k> – Назва з екрана.

Лабораторне заняття № 10

Тема: Вільноживучі азотфіксатори.

Мета заняття: Засвоїти методику отримання накопичувальної культури для дослідження ґрунтових зразків на наявність у них азотфікуючих мікроорганізмів. Дослідити морфологічні ознаки азотфікуючих бактерій.

Обладнання та матеріали: Мікроскоп “Біолам С11”, добре вимиті предметні стекла, технохімічні ваги, сухожарова піч, термостат, спиртівка, шпатель для внесення ґрунту, колби плоскодонні на 100-150 мл, стерильні піпетки, складений конусом фільтрувальний папір, поживне мінеральне



середовище Ешбі (у 1000 мл водопровідної води змішати 20,0 г маніту або глюкози, 0,2 г гідроортофосфату калію (K_2HPO_4), 0,2 г сульфату магнію ($MgSO_4$), 0,2 г хлориду натрію ($NaCl$), 0,1 г сульфату калію (K_2SO_4), сліди сульфату заліза (II) ($FeSO_4$), 5,0 г крейди), 96%-ий розчин етанолу, генціановий фіолетовий або метиловий фіолетовий, розчин Люголя, фуксин або сафранін, запропоновані зразки ґрунту, імерсійна олія, дистильована вода, ілюстраційні матеріали.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Щорічно із врожаєм сільськогосподарських культур в усьому світі з ґрунту виноситься 100-110 млн. т азоту. Проте повертається в ґрунт із азотними добривами приблизно лише 15% спожитого рослинами азоту. За такого співвідношення спожитого та повернутого азоту запас його сполук у ґрунті міг би вичерпатися за 50-75 років, однак цього не відбувається. Пояснюється це тим, що дефіцит цього елемента у ґрунті значною мірою поповнюється із атмосфери за рахунок процесів його зв'язування біологічним шляхом. В земній атмосфері знаходиться так званий запасний фонд азоту, де цей елемент перебуває переважно у вільній молекулярній формі N_2 . Біологічна фіксація азоту здійснюється мікроорганізмами, що вільно живуть у ґрунті, а також бактеріями, що співіснують у симбіозі, насамперед із бобовими рослинами.

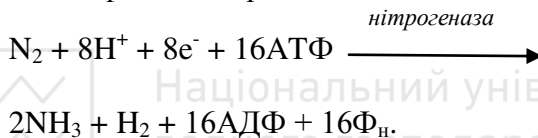
За один рік в орному шарі ґрунту на площі 1 га вільноживучі бактерії накопичують 10-15 кг азоту, а симбіотична асоціація бактерій із рослинами забезпечує зв'язування до 150-200 кг азоту на гектар. Засвоений молекулярний азот нагромаджується в клітинах мікроорганізмів у вигляді білкових сполук, частина його може виділятися у розчинних формах у ґрунт і в подальшому засвоюватися рослинами. У процесі розкладання відмерлих мікробних клітин азот вивільняється в хімічно зв'язаній формі і, мінералізуючись, стає доступним для живлення вищих рослин.

Здатність мікроорганізмів засвоювати молекулярний азот



забезпечується наявністю у них фермента – нітрогенази. Він представляє собою нітрогеназний комплекс і включає дві субодиниці: динітрогеназу та редуктазу нітрогенази, також два кофактори – залізовмісний та молібден-залізовмісний. Нітрогеназа має низьку субстратну специфічність і може відновлювати крім N_2 , також інші сполуки з потрійним зв'язком: ацетилен, ціанід, циклопропіл, азиди. Нітрогеназа чутлива до вільного кисню та активується навіть за незначних його концентрацій. Тому аеробні мікроорганізми-азотфіксатори мають ряд механізмів для захисту нітрогенази від кисню (генний контроль, наявність щільної оболонки, рослинні тканини у симбіотичних мікроорганізмів).

Процес азотфіксації виражається загальною схемою:



Процес зв'язування азоту є високоенергетичним і вимагає значної затрати енергії. Для функціонування нітрогенази необхідне джерело енергії та надходження електронів.

Нині відомо понад 30 видів вільноживучих мікроорганізмів, здатних фіксувати молекулярний азот атмосфери. Сюди передусім відносяться представники родів *Clostridium*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, деякі спірили, сіркобактерії, ціанобактерії (роди *Dermocarpa*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria*), дріжджі (рис. 10.1).

Clostridium pasteurianum – типовий представник анаеробного процесу фіксації азоту. У молодих культурах цей мікроорганізм має вигляд прямих паличок із закругленими кінцями, розміром 2,5-7,5x0,5 мкм. Палички розташовуються поодинокі або парами і мають багато джгутиків, розкиданих по всій поверхні клітини. Під час старіння клітини набувають характерної веретеноподібної форми з округлою спорою, розташованою ближче до одного з кінців. У цитоплазмі клітин



накопичується велика кількість крохмалеподібної речовини – гранульози, що дає з йодом блакитне забарвлення. Спори не забарвлюються. Оптимум рН середовища для цієї бактерії складає 5,6-7,4, вона зброджує сахарозу з утворенням масляної й оцтової кислот, CO_2 і NO_2 , зв'язує 10-12, а іноді 27 мг азоту на 1 г збродженої сахарози.

Azotobacter chroococcum – найпоширеніший вид. Його рухливі клітини мають розмір 2-7x1,5-2,5 мкм, у молодих культурах вони паличкоподібні, з віком набувають кулястої форми. Клітини сполучені парами або більшими групами й оточені великою слизуватою капсулою. Вони синтезують темно-коричневий пігмент, нерозчинний у воді. Характерною рисою виду є здатність використовувати крохмаль як єдине джерело вуглецю. Під час росту на середовищах із достатньою кількістю поживних речовин усередині клітин накопичується велика кількість зерен запасного поживного матеріалу. Зерна сильно заломлюють світло, завдяки цьому під час розгляду під мікроскопом незабарвлених мікропрепаратів вони мають зеленуватий відтінок. Це один із найбільш активних фіксаторів азоту. На 1 г зброженого вуглеводу він засвоює до 20 мг атмосферного азоту. Усі види азотобактера відносяться до аеробних мікроорганізмів, що найкраще розвиваються за вільного доступу повітря. Оптимум рН середовища існування для нього знаходиться в межах 7,2-8,0.

Бактерії з роду *Beijerinckia* поширені головним чином у ґрунтах тропічної зони і майже не зустрічаються у ґрунтах помірної зони.

ХІД ЗАНЯТТЯ

1. Приготовлене мінеральне середовище Ешбі розлити у колби шаром 1-1,5 см і простерилізувати у сухожаровій печі упродовж 30 хвилин за температури 121⁰С.
2. На технохімічних вагах відважити 0,5 г ґрунту із запропонованих зразків і за допомогою шпателя внести у колби.
3. Колби помістити у термостат із температурою 22-25⁰ С на



10-14 діб. Азотобактер краще розвивається у рідкому середовищі, в яке кладуть складений конусом фільтр.

- Після зазначеного терміну проаналізувати присутність азотфіксуючих мікроорганізмів. За наявності у ґрунті вільноживучих азотфіксаторів уже на 5-6-й день на поверхні поживного середовища, на фільтрі і на стінках колби з'являється плівка (вона містить *Azobacter chroococcum*), що швидко буріє, а внизу рідини, що на цей час злегка стає каламутною, піниться і пахне масляною кислотою, накопичується *Clostridium pasteurianum*.
- Для мікроскопічного дослідження приготувати мазки з побурілої плівки і з дна колби, провести забарвлення за Грамом і мікроскопіювати під імерсією (див. лабораторне заняття № 3, п. 5). Під час розгляду під мікроскопом звернути увагу на морфологічні ознаки клітин мікроорганізмів.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

- Поняття про біологічну фіксацію азоту.
- Коротка характеристика нітрогенази.
- Суть процесів азотфіксації.
- Екологічне значення процесів азотфіксації.
- Представники вільноживучих мікроорганізмів-азотфіксаторів.

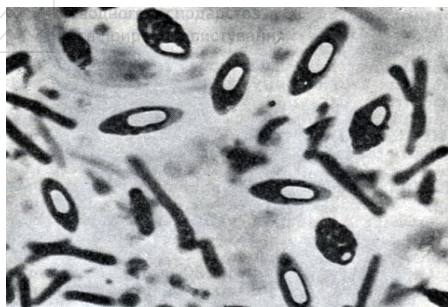
Інформаційні ресурси:

Звягинцев Д.Л. Почва и микроорганизмы. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1987.

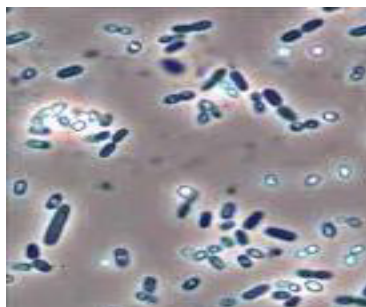
Звягинцев Д.Л., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1989.

Зенова Г.М. и др. Практикум по биологии почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 2002.

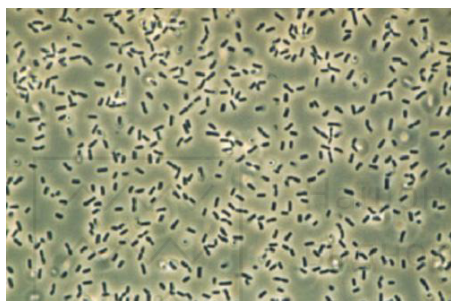
Іутинська Г.О. Ґрунтова мікробіологія: навчальний посібник. Київ : Арістей, 2006.



Clostridium pasteurianum



Azotobacter chroococcum



Bacillus subtilis



Citrobacter intermedius

Рис. 10.1. Види вільноживучих азотофіксуючих бактерій.

URL:

<https://www.booksite.ru/fulltext/1/001/008/003/925.htm> – Назва з екрана.

URL: <https://recanduanot.ru/raznoe/8068-biologicheskaja-azotfiksacija-2.html> – Назва з екрана.

URL: https://studopedia.su/4_539_azotfiksatsiya-molekulyarnogo-azota.html – Назва з екрана.

URL: <http://www.agrocounsel.ru/azotfiksatsiya> – Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=FdHzr7XJ50o> – Назва з екрана.



Лабораторне заняття № 11

Тема: Амоніфікуючі бактерії.

Мета заняття: Засвоїти методику отримання накопичувальної культури для дослідження ґрунтових зразків на наявність у них амоніфікуючих мікроорганізмів.

Обладнання та матеріали: технохімічні ваги, термостат, штатив для пробірок, ватні корки, целофан із резинкою, спиртівка, сірники, бактеріологічна петля, шпатель для внесення ґрунту, мірний циліндр на 100 мл, колби плоскодонні на 250 мл, скляні палички, запропоновані зразки ґрунту, пробірки із стерильним м'ясо-пептонним бульйоном (МПБ), смужки червоного лакмусового паперу, смужки фільтрувального паперу (0,5x5 см), просочені розчином оцтовокислого свинцю (для визначення H_2S), дистильована вода, ілюстраційні матеріали.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Розкладання білків мікроорганізмами пов'язане із використанням цих речовин як джерела азотного та вуглецевого живлення, що необхідні для покриття енергетичних витрат і побудови тіла мікроорганізмів.

Одним із процесів дисиміляції білкових речовин є амоніфікація, що представляє собою складний і різноманітний процес розкладання білка, який супроводжується утворенням у кінцевому підсумку вільного аміаку. Процес розпаду білків починається з їхнього гідролізу під впливом протеолітичних екзоферментів (протеїназ), які виділяються мікробами. Гідроліз відбувається поступово з утворенням ряду проміжних продуктів. Первинними продуктами гідролізу є пептони і поліпептиди. Вони утворюються в результаті розщеплення білкової молекули протеїназою. Пептони і поліпептиди під впливом поліпептидази спочатку розщеплюються до дипептидів, які в подальшому розкладаються дипептидазою до



У процесі амоніфікації, окрім білків, також розкладаються інші азотовмісні сполуки: нуклеїнові кислоти, сечовина, сечова та гіпурова кислоти.

Амінокислоти, що утворилися внаслідок розпаду білка, піддаються подальшому розщепленню під дією різних ферментів (дезаміназ, амідаз, дегідраз, декарбоксилаз). Цей процес починається з дезамінування амінокислот, у результаті якого утворюються аміак і різноманітні органічні сполуки відповідно до хімічної природи самих амінокислот і зовнішніх умов. Так, внаслідок розкладання амінокислот жирного ряду утворюються мурашина, оцтова, пропіонова, масляна й інші кислоти, також пропіловий, бутиловий, аміловий і подібні їм спирти.

В аеробних умовах ці продукти проміжного розпаду амінокислот піддаються окисленню і можуть бути цілком мінералізовані до кінцевих продуктів: аміаку, вуглекислого газу, води, сірководню і солей ортофосфорної кислоти.

Аміак, який утворюється внаслідок амоніфікації у водному розчині утворює сильну основу NH_4OH , що зумовлює деяке підлужнення ґрунту. Це сприяє активації протеїназ і прискоренню розпаду білка до амінокислот.

В анаеробних умовах продукти проміжного розпаду амінокислот повністю не окислюються. Внаслідок цього крім NH_3 і CO_2 , накопичуються різні органічні кислоти, спирти, аміни й інші органічні сполуки, що часто мають отруйні властивості та неприємний запах. Органічні кислоти, які у цьому випадку утворюються, розкладаються дуже повільно та накопичуються у ґрунті. Середовище підкислюється і, як наслідок цього, ферментативний розпад білків до амінокислот різко сповільнюється.

Швидкість мінералізації білка і нагромадження аміаку залежать від співвідношень вуглецю та азоту у ґрунті (C : N), температури, вологості, рН середовища, аерації й інших факторів.

Найбільш активними учасниками розкладання білка є наступні мікроорганізми.



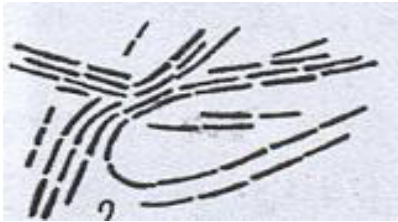
Серед аеробних бактерій процес амоніфікації здійснюється окремими видами *Bacillus*. *Bac. mycoides* – невелика паличка довжиною 1,6-3,6 мкм, що утворює спори овальної форми різної величини, рухлива, джгутики розташовані по усій поверхні клітини. Розвиваючись на твердих поживних середовищах, ці бактерії утворюють характерні сланюваті з поверхні колонії із пучками ниток, що нагадують колонії цвілей (звідси і назва *mycoides* – грибоподібний). Це одна з найбільш розповсюджених аеробних ґрунтових бактерій. *Bac. mesentericus* – невелика (1,5-5 мкм), рухлива, перетріхально джгутикова, спороутворююча паличка, часто сполучена в ланцюжки, оптимум її розвитку складає 35-45° С. На картопляних поживних середовищах утворює тонкі, сухі колонії зі зморшкуватою поверхнею, що схожі на брижі (звідси видова назва *mesentericus*). *Bac. subtilis* (сінна паличка) – коротка, рухлива, спороутворююча паличка із закругленими кінцями, розміром 3-5x0,6 мкм. Овальна спора розташована в центрі бактерій. На поживних середовищах утворює щільні, дрібні, зморшкуваті колонії, що зрощуються з агаром. Температурний оптимум знаходиться у межах 37-50° С, а температурний максимум росту становить 60° С.

Факультативними анаеробами із амоніфікуючих бактерій є, наприклад, *Proteus vulgaris* і *Escherichia coli*. *Proteus vulgaris* (протей) представляє собою дрібні (розміром 1,6-4 мкм), безспорові, рухливі палички, що сильно змінюють свою форму та розміри під час розвитку на поживних середовищах різного складу. Під час розкладання білка створюють слаболужну реакцію і утворюють сірководень та індол. *Escherichia coli* (кишкова паличка) – коротка (розміром 2-4x0,5 мкм), рухлива, безспорова паличка з закругленими кінцями, грамнегативна. Під час росту на МПБ викликає загальне помутніння, на агарі утворює сірувато-білий наліт.

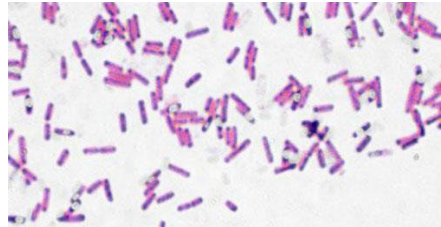
Із анаеробних бактерій типовим амоніфікатором є *Clostridium putrificus* (гнильна паличка) – невелика, рухлива, спороутворююча паличка (розміром 5,6x0,8 мкм). Спори



розташовуються на одному з її кінців, викликаючи потовщення у вигляді кінцевого наросту. Вуглеводи не зброджує. Розкладає білки лише в анаеробних умовах з утворенням великої кількості газів. Зустрічається в харчових продуктах, гної, ґрунті, консервах (рис. 11.1).



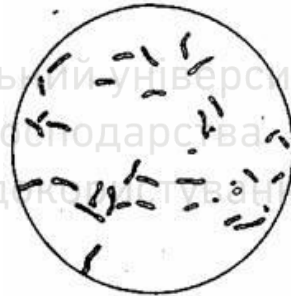
Bacillus mycoides



Bacillus mesentericus



Proteus vulgaris



Clostridium putrificus

Рис. 11.1. Види амоніфікуючих бактерій.

У розкладанні білкових речовин активну участь також приймають актиноміцети, цвілеві гриби, наприклад, види родів *Alternaria*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium* та ін., а також Найпростіші тварини.

ХІД ЗАНЯТТЯ

1. Із запропонованих зразків ґрунту приготувати ґрунтову суспензію на дистильованій воді із розведенням 1 : 10.
2. Бактеріологічною петлею взяти над полум'ям спиртівки краплю ґрунтової суспензії та перенести у пробірку з МПБ.



Пробірку закрити ватним корком і підвісити під ним індикаторні папірці: для виявлення аміаку – червоний лакмусовий, для виявлення сірководню – папірець, просочений оцтовокислим свинцем (папірці повинні вільно звисуватися у пробірці, не торкаючись її стінок і середовища).

3. Пробірки щільно закрити зверху пергаментом, целофаном або гумовим ковпачком для недопущення виходу газоподібних продуктів.
4. Штатив із пробірками помістити в термостат із температурою 25-30° С на 7 діб.
5. Після зазначеного терміну проаналізувати присутність амоніфікуючих бактерій. За наявності в ґрунті цих мікроорганізмів середовище мутніє, з пробірки виділяються гази, що неприємно пахнуть. Внаслідок розкладання білкових речовин з утворенням аміаку вкладений у пробірку червоний лакмусовий папірець синіє. Сірководень, що виділяється під час розкладання сірковмісних амінокислот (цистин, цистеїн, метіонін), виявляють за потемнінням смужки фільтрувального папірця, просоченого основним розчином оцтовокислого свинцю. Останній, зв'язуючись із сірководнем, переходить у сірчистий свинець, що має чорний колір.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Поняття про амоніфікацію білків та інших азотовмісних сполук.
2. Хімізм процесу амоніфікації.
3. Види амоніфікуючих мікроорганізмів.
4. Екологічне значення процесів амоніфікації.

Інформаційні ресурси:

Звягинцев Д.Л. Почва и микроорганизмы. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1987.

Звягинцев Д.Л., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1989.



Зенова Г.М. и др. Практикум по биологии почв. Москва :
Изд-во Моск. ун-та, 2002.

Іутинська Г.О. Ґрунтова мікробіологія: навчальний
посібник. Київ : Арістей, 2006.

URL: <https://helpiks.org/3-29606.html> – Назва з екрана.

URL:

https://studme.org/287628/ekologiya/mineralizatsiya_azota –
Назва з екрана.

Лабораторне заняття № 12

Тема: Нітрифікуючі бактерії.

Мета заняття: Засвоїти методику отримання
накопичувальної культури для дослідження ґрунтових зразків
на наявність у них нітрифікуючих мікроорганізмів.

Обладнання та матеріали: технохімічні ваги,
сухожарова піч, термостат, штатив для пробірок, фарфорова
чашка, шпатель для внесення ґрунту, пробірки, піпетки
градуйовані на 1 мл і 5 мл, мірний циліндр на 500 мл, колби на
1000 мл і 250 мл, 20%-ий розчин сірчаної кислоти, реактив
цинк-йод-крохмаль (2 г хлориду цинку ($ZnCl_2$) розчинити в
100 мл дистильованої води, нагріти до кипіння та прилити
розчиненого крохмалю (0,4 г крохмалю розчинити в 10 мл
води), об'єм суміші довести водою до 100 мл, кип'ятити до
тих пір, поки вона не стане прозорою, охолодити і додати 100
мл 0,2%-го розчину йодиду калію (KJ) або йодиду цинку
(ZnJ_2)), реактив Грісса (у 30%-му розчині оцтової кислоти
приготувати 1%-ий розчин сульфанілової кислоти та 0,1%-ий
розчин α -нафтиламіну, змішати їхні однакові об'єми
безпосередньо перед визначенням, приготовлений розчин
повинен бути безбарвним), поживне середовище
Виноградського (г на 1000 мл водопровідної
води: сульфат амонію ($(NH_4)_2SO_4$) – 2,0; гідроортофосфат
калію (K_2HPO_4) – 1,0; сульфат магнію ($MgSO_4$) – 0,5; хлорид
натрію (NaCl) – 2,0; сульфат заліза (II) ($FeSO_4$) – 0,4; сульфат
кальцію ($CaSO_4$) – 1,0), запропоновані зразки ґрунту,
дистильована вода, ілюстраційні матеріали.

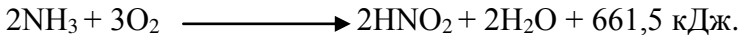


ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Нітрифікацією називається процес окислення аміаку в азотну кислоту через проміжну стадію азотистої кислоти.

Процес нітрифікації аміаку відбувається у дві фази за участю двох спеціалізованих груп аеробних бактерій.

У першій фазі аміак окислюється до солей азотистої кислоти:



Окислення аміаку або іона NH_4^+ відбувається через ряд проміжних форм, серед яких основну роль відіграє гідроксиламін (NH_2OH). Процес відбувається за участю мідновмісного гідроксиламіноксидоредуктазного ферментного комплексу.

У цьому процесі беруть участь нітрозні бактерії, що відносяться до трьох родів: *Nitrosomonas*, *Nitrosocystis*, *Nitrospira*. Вони є негативними одноклітинними бактеріями, що відносяться до класу *Proteobacteria*.

Nitrosomonas – овоїдний кок із одним довгим джгутиком, спор не утворює. Відомо п'ять видів цього мікроорганізму, що відрізняються за формою і відношенням до рН, яке коливається в окремих видів від 7,4 до 9,5. Найпоширенішим видом є *Nitrosomonas europaea*.

Nitrosocystis – коки діаметром приблизно 1,5 мкм, здатні утворювати зооглеї – скупчення коків, які оточені загальною слизовою капсулою.

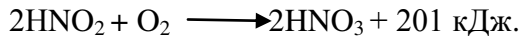
Nitrospira (Nitrosolobus) включає два види: *Nitrospira briensis* і *Nitr. arctica*. Обидва види мають правильну спіральну форму, довжина клітини сягає 20 мкм, хоча зустрічаються і дуже дрібні, коккоподібні організми. Розвиваються переважно в цілинних ґрунтах.

Також процес першої фази нітрифікації здатні здійснювати види родів *Nitrosococcus* (*N. nobilis*, *N. oceanus*), клітини яких мають правильну округлу форму, діаметром 1,5-2,2 мкм, розміщуються поодинокі, парами або тетрадами,



молоді клітини мають від 1 до 20 джгутиків, та (*N. multiformis*), які мають клітини, що розділені на відсіки через інвагінації зовнішньої цитоплазматичної мембрани.

У другій фазі нітрифікації солі азотистої кислоти окислюються в солі азотної кислоти:

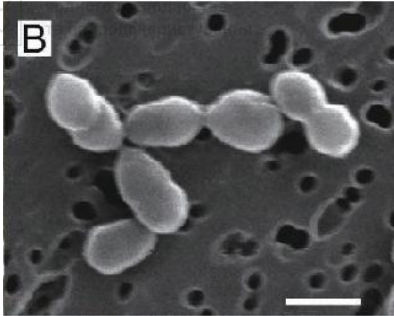


У цьому процесі беруть участь нітратні бактерії, що відносяться до роду *Nitrobacter*. Це дрібні, округлі, яйцеподібні або грушоподібні клітини діаметром до 1,5 мкм. Зустрічаються серед них також короткі, нерухомі, безспоріві палички з загостреними кінцями, розміром 1,2x0,8 мкм. Палички іноді сполучаються в ланцюжки, за Грамом забарвлюються негативно. На 5-6 добу в культурах з'являються овальні або грушоподібні рухливі клітини.

Найбільш відомими серед *Nitrobacter* є два види: *Nitrobacter winogradskyi* і *Nitr. agilis*. Це типові хемосинтезуючі автотрофи. Вони асимілюють вуглекислий газ із повітря за відсутності світла. Енергію для цього процесу вони одержують під час окислення аміаку та азотистих сполук. Вони синтезують усі органічні речовини клітин (амінокислоти, вітаміни, полісахариди) з неорганічних компонентів і вуглекислого газу.

Також процес другої фази нітрифікації здатні здійснювати види родів *Nitrospina* (*N. gracilis*), *Nitrospira* (*N. marina*), *Nitrococcus* (*N. nobilis*) (рис. 12.1).

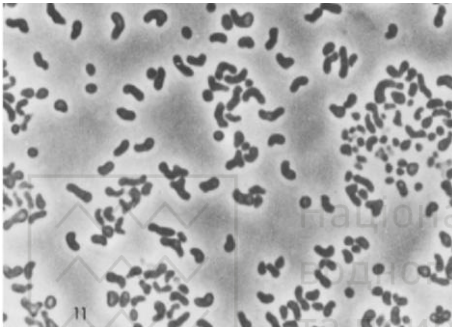
У ґрунтах також відбуваються процеси гетеротрофної нітрифікації, що полягають в окисленні амонійного та амінного азоту різних неорганічних та органічних сполук із утворенням проміжних сполук: гідроксиламіну, оксимів, гідроксамових кислот, нітрозосполук, нітритів, які у кінцевому підсумку можуть окислюватися до нітратів. Гетеротрофну нітрифікацію здійснюють бактерії родів *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, гриби родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* та інших.



Nitrosomonas



Nitrosospira



Nitrobacter



Nitrococcus

Рис. 12.1. Види нітрифікуючих бактерій.

Завдяки діяльності бактерій, що нітрифікують, величезні маси газоподібного аміаку, утвореного у процесі амоніфікації, фіксуються у ґрунті та переводяться в нітрати, що є важливим джерелом азотного живлення для рослин. У результаті своєї біогеохімічної діяльності вони формують родючість ґрунту, перетворюючи малодоступні та недоступні рослинам аміачні солі й аміак у легкозасвоювані рослинами мінеральні форми азотного живлення. Тому процес нітрифікації має розглядатися як один із найважливіших біологічних процесів ґрунту. За сприятливих умов упродовж року в орному шарі 1 га ґрунту може накопичуватися до 300 кг азотної кислоти. Така кількість нітратів створює не тільки добрі умови для азотного живлення рослин, але й сильно впливає на перехід



фосфорнокислих солей у доступну для рослин форму. Водночас за високого вмісту нітратів у ґрунті, вони здатні нагромаджуватись в урожайній частині рослин у небезпечних кількостях, нітратні форми гірше закріплюються у ґрунті та вимиваються з нього.

Вивчення нітрифікації свідчить, що цей процес відбувається найбільш активно за умов достатньої кількості мінерального амонійного азоту, за реакції ґрунту, що близька до нейтральної, за достатньої аерації. Такі умови є сприятливими і для росту та розвитку культурних рослин.

ХІД ЗАНЯТТЯ

1. Приготовлене поживне середовище Виноградського розлити у конічні колби об'ємом 150-200 мл тонким шаром (0,5-1,0 см) і простерилізувати в сухожаровій печі упродовж 30 хвилин за температури 121°C . Перед розливанням середовище необхідно добре струснути, тому що в ньому утворюється осад фосфорнокислого заліза.
2. У колби зі стерилізованим поживним середовищем внести досліджуваній зразок ґрунту, масою приблизно 0,5 г і помістити у термостат із температурою $25-30^{\circ}\text{C}$ на 5-7 днів.
3. Після зазначеного терміну проаналізувати присутність нітрифікуючих бактерій. За наявності у ґрунті цих мікроорганізмів середовище містить похідні азотистої та азотної кислот.
4. Для виявлення сполук азотистої та азотної кислот провести реакцію з цинком-йод-крохмалем. Для цього у фарфорову чашку капнути 1 краплю 20%-ого розчину сірчаної кислоти і додати до неї три краплі реактиву цинк-йод-крохмаль та 1 краплю досліджуваного поживного середовища із продуктами життєдіяльності мікроорганізмів. За присутності NO_2^- суміш забарвлюється у синій колір. Це відбувається внаслідок витіснення азотистою кислотою вільного йоду з йодисто-водневої солі. Вільний йод вступає у взаємодію з крохмалем, обумовлюючи синє забарвлення.



Також сполуки азотистої та азотної кислот у досліджуваному поживному середовищі можна виявити реакцією з реактивом Грісса. Для цього у пробірку внести 5 мл досліджуваного середовища з культурою нітрифікуючих бактерій та краплями сюди додати реактив Грісса. За присутності NO_2^- суміш забарвлюється у червоний колір, оскільки утворюються діазосполуки, що мають яскраво-червоне забарвлення.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Поняття про нітрифікацію.
2. Характеристика першої фази нітрифікації, мікроорганізми, що її здійснюють.
3. Характеристика другої фази нітрифікації, мікроорганізми, що її здійснюють.
4. Гетеротрофна нітрифікація.
5. Екологічне значення процесів нітрифікації, умови її активного здійснення.

Інформаційні ресурси:

Звягинцев Д.Л. Почва и микроорганизмы. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1987.

Звягинцев Д.Л., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1989.

Зенова Г.М. и др. Практикум по биологии почв. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 2002.

Іутинська Г.О. Грунтова мікробіологія: навчальний посібник. Київ : Арістей, 2006.

URL: <http://www.grandbiology.com/biols-1047-1.html> – Назва з екрана.

URL: https://studopedia.su/20_28836_nitrifikatsiya.html – Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=lUdSgnkQKY0> – Назва з екрана.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=LqvSiQIL-1Y> – Назва з екрана.



Правила техніки безпеки під час роботи у навчальній мікробіологічній лабораторії

Під час проведення та підготовки лабораторних занять у мікробіологічній лабораторії студенти, лаборанти та викладачі зобов'язані неухильно дотримуватись таких основних правил роботи:

1. До роботи в мікробіологічній лабораторії допускаються особи, які обізнані з правилами роботи у ній і пройшли відповідний інструктаж.

2. Працюючі в лабораторії повинні бути одягнуті в халати, забороняється заходити в лабораторію у верхньому одязі.

3. Палити, вживати їжу й зберігати продукти в лабораторії категорично заборонено.

4. Матеріал, який надходить у лабораторію для дослідження, повинен підписуватись або маркуватись, усі реактиви та матеріали мають бути підписані.

5. Відпрацьовані культури мікробів підлягають обов'язковому знищенню. Поверхню робочого місця, як і використані інструменти, дезінфікують або стерилізують, робоче місце прибирають.

6. У лабораторії не дозволяються зайві ходіння, різкі рухи, непотрібні розмови.

7. Забороняється без дозволу викладача змішувати реактиви, пробувати їх на смак або нюхати, переносити їх із місця основного знаходження.

8. Дозволяється лише виконання операцій і дій, які передбачені ходом заняття.

9. У випадку розливу реактиву або культуральної рідини, пошкодження посуду, травмування студента, виникнення аварійної ситуації необхідно терміново повідомити викладача.

10. Після закінчення роботи необхідно ретельно вимити руки із милом.