

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ЦЕНТР «ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНИ»

Сергійчук Т.М., Юмина Ю.М.

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ЛАБОРАТОРНОГО ПРАКТИКУМУ
«СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКА МІКРОБІОЛОГІЯ»**

Сільськогосподарська мікробіологія. Сергійчук Т.М., Юмина Ю.М.

Київ - 2025

*Затверджено Вченою радою ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
протокол № 11 від 15 квітня 2025 р.*

Рецензенти:

Коломієць Ю.В. – доктор сільськогосподарських наук, професор, декан факультету захисту рослин, біотехнології та екології Національного університету біоресурсів та природокористування України.

Данкевич Л.А. – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Сергійчук Т.М., Юмина Ю.М.

Методичні рекомендації до лабораторного практикуму «Сільськогосподарська мікробіологія» / Упорядн. Т.М. Сергійчук, Ю.М. Юмина. – електронна версія. 2025. - 44 с.

У методичних рекомендаціях викладені основні методи дослідження фізико-хімічних (вологість, вологоємність, рН, кількість гумусових сполук) та мікробіологічних (загальна кількість мікробіоти та визначення основних фізіологічних та таксономічних груп мікроорганізмів) характеристик ґрунту. Кожна лабораторна робота містить короткі теоретичні відомості та хід проведення експериментальної роботи. У додатки винесено приготування основних реактивів, поживних середовищ та таблиця Мак-Креді для визначення кількості мікробіоти на рідких середовищах.

Рекомендується для студентів вищих навчальних закладів, що навчаються за напрямом «Біологія», а також для аспірантів та фахівців які працюють у галузі ґрунтової та сільськогосподарської мікробіології.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
ВЗЯТТЯ ЗРАЗКІВ ҐРУНТУ	5
РОЗДІЛ 1. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ҐРУНТУ	6
1.1. Визначення вологості Ґрунту	6
1.2. Визначення повної вологоємності	7
1.3. Визначення рН Ґрунту	8
1.4. Визначення вмісту гумусових кислот	12
Питання для самоконтролю	14
РОЗДІЛ 2. ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ КІЛЬКОСТІ МІКРОБІОТИ ҐРУНТУ	15
2.1. Метод граничних розведень	15
2.2. Крапельний метод визначення кількості мікроорганізмів	17
2.3. Прямі мікроскопічні методи підрахунку мікроорганізмів ..	18
Питання для самоконтролю	21
РОЗДІЛ 3. ВИЗНАЧЕННЯ ТАКСОНОМІЧНИХ ТА ФІЗІОЛОГІЧНИХ ГРУП МІКРООРГАНІЗМІВ	22
3.1. Виявлення актинобактерій та грибів (мікроміцетів)	23
3.2. Виявлення спороутворювальних бактерій	23
3.3. Виявлення вільноживучих азотфіксувальних бактерій	24
3.4. Виявлення нітрифікувальних бактерій	25
3.5. Виявлення денітрифікувальних бактерій	27
Питання для самоконтролю	28
РОЗДІЛ 4. ОТРИМАННЯ НАКОПИЧУВАЛЬНИХ КУЛЬТУР ОКРЕМИХ ПРЕДСТАВНИКІВ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ГРУП ҐРУНТОВОЇ МІКРОБІОТИ	29
4.1. Виявлення анаеробних азотфіксувальних спороутворювальних масляно-кислих бактерій виду <i>Clostridium pasteurianum</i>	29
4.2. Виявлення анаеробних деструкторів клітковини	30
4.3. Виявлення аеробних деструкторів клітковини	31
Питання для самоконтролю	33
РОЗДІЛ 5. МЕТОДИ БЕЗПОСЕРЕДНЬОГО СПОСТЕРЕЖЕННЯ ЗА МІКРОБІОТОЮ ҐРУНТУ	34
5.1. Метод скелець обростання	34
5.2. Метод Ґрунтових камер	34
5.3. Метод пророщування Ґрунтового пилу	35
5.4. Вивчення морфології бульбочкових бактерій	36
Питання для самоконтролю	37
ДОДАТКИ	38
Реактиви	38
Середовища	39
Таблиця Мак-Креді	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	43

ВСТУП

Сільськогосподарська мікробіологія – одна з важливих біологічних дисциплін, на якій базуються фундаментальні знання спеціалістів, що працюють в галузі сільського господарства. Вона займається вивченням мікроорганізмів, які беруть участь у підвищенні родючості ґрунтів, створенні бактеріальних добрив виробництві кормів зберіганні сільськогосподарської продукції та багато іншого. З успішним розвитком сільського господарства нерозривно пов'язана така її галузь як ґрунтова мікробіологія.

Ґрунт – вузлова ланка біосфери на суші і є осередком найбільшої концентрації живої речовини. Найціннішою властивістю ґрунту є його родючість, тобто здатність забезпечувати рослини необхідними поживними речовинами, водою, вміщувати кореневу систему і повітря, загалом – це здатність забезпечувати рослини всім необхідним для створення урожаю.

Важливу роль у підтриманні на оптимальному рівні запасів елементів живлення в ґрунті та умов їх досяжності для рослин відіграють мікроорганізми. Ґрунтова мікробіологія стала особливо актуальною у зв'язку з необхідністю екологізації сільськогосподарського виробництва.

Методичні рекомендації укладено відповідно до навчальної програми для студентів бакалаврів ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Опанування методами лабораторного практикуму передбачає:

- оволодіння методами вивчення фізико-хімічних характеристик ґрунту;
- оволодіння методами кількісного та якісного аналізу мікробіоти ґрунту;
- ознайомлення з різними морфологічними та фізіологічними групами мікроорганізмів ґрунту;
- оволодіння методами вивчення біологічної активності ґрунту;
- ознайомлення з методами безпосереднього спостереження за мікробіотою ґрунту.

Будемо вдячні за всі зауваження та пропозиції, надіслані на адресу авторів (stm1972@knu.ua, julia.yumyna@knu.ua) для можливості удосконалення методичних рекомендацій до лабораторного практикуму.

ВЗЯТТЯ ЗРАЗКІВ ҐРУНТУ

Від правильного взяття ґрунтового зразка залежать результати всіх наступних досліджень. Мікроорганізми в ґрунті розповсюджені нерівномірно, тому не слід обмежуватися лише одним зразком. Рекомендується на площі 100 м² відбирати 4-5 проб ґрунту.

Зразок ґрунту беруть стерильним шпателем з використанням спеціального буру (рис. 1), попередньо знявши верхній 1-сантиметровий шар. Відібраний з необхідної глибини ґрунт вносять у стерильну банку або в стерильні поліетиленові пакети. На банки (чи пакети) наклеюють етикетки, на яких вказують дату взяття проби, місце забору, горизонт та інші необхідні дані.

Зразки ґрунту досліджують протягом першої доби. При необхідності допустиме їх збереження в холодильнику, але не більше 2-3 діб.

У лабораторії зразки однієї ділянки змішують для отримання середньої характеристики.



Рис. 1 Взяття зразків ґрунту

РОЗДІЛ 1. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ҐРУНТУ

Для сільського господарства найбільш значимими є такі параметри ґрунту як вміст води та здатність її утримувати, рН та кількість гумусових сполук.

1.1. Визначення вологості ґрунту

Вологість ґрунту – це загальна кількість гігроскопічної, капілярної і гравітаційної води у відсотках до сухої маси ґрунту

Хід роботи

На аналітичних вагах зважують металевий (або скляний) бюкс із точністю до четвертого знаку. В бюкс вносять 3-5 г ґрунту і знову зважують, визначаючи вагу проби (**P**). Зразок ґрунту вміщують у сушильну шафу і сушать при 105-110⁰ С до постійної ваги.

Перед кожним зважуванням бюкс охолоджують в ексікаторі з поглиначем вологи. Різниця між **P** та абсолютно сухим ґрунтом (а.с.г) дасть вагу вологи, яка випарилась у процесі висушування (**в**). Вологість ґрунту (**A**) визначають за формулою:

$$A = \frac{b}{P - b} 100\%$$

Результати заносять до табл. 1.

Таблиця 1

Вологість ґрунту

Повторність	Вага бюксу	Вага бюксу з ґрунтом	Вага ґрунту до висушування	Вага ґрунту після висушування	Вага води, що випарилась	Вологість, %
1						
2						
3						
Середнє						

Часто вологість ґрунту визначають не у відсотках від абсолютно сухої ваги ґрунту, а у відсотках від повної вологості.

Прилади та матеріали: бюкси металеві або скляні, шпателі для відбору зразків ґрунту для зважування, аналітичні ваги, сухожарова шафа.

1.2. Визначення повної вологоємності

Вологоємність – це кількість води, яку ґрунт здатен утримати і вона співпадає з максимальною кількістю капілярної води.

Хід роботи

Для визначення повної вологоємності ґрунту використовують скляний циліндр діаметром 3-4 см і висотою 20 см. Один кінець циліндра обтягують 2-3 шарами марлі, між якими вміщують шар зволоженого фільтрувального паперу.

Пробу ґрунту (50-70 г) вносять у циліндр, зважують, опускають у посудину з водою і витримують доти, поки краплі води не з'являться на поверхні ґрунту. Рівень води повинен бути на 1-2 см нижче від рівня ґрунту в циліндрі.

Коли вода з'явиться на поверхні ґрунту циліндр виймають із води, залишають його на певний час у вільному стані для стікання надлишку вологи і зважують. Повну вологоємність визначають за формулою:

$$G = \frac{a}{P} 100\% ,$$

де, **a** – вага води, яку поглинула проба ґрунту в перерахунку на абсолютно сухий ґрунт; **P** – вага абсолютно сухого ґрунту, взятого для дослідження.

Приклад розрахунку: Якщо взяли для визначення повної вологоємності 100 г ґрунту, вологість якого становить 25% від його абсолютно сухої ваги, то ці 100 г вологого ґрунту містили 20 г води і 80 г абсолютно сухого ґрунту:

$$25\% = \frac{b}{100 - b} 100\%;$$

$$\begin{aligned} 2500 - 25b &= 100b \\ 125b &= 2500 \\ b &= 20. \end{aligned}$$

При визначенні повної вологоємності цей ґрунт поглинув ще 30 г води. Отже, 80 г абсолютно сухого ґрунту поглинули всього 20 + 30 = 50 г води. Звідси:

$$G = \frac{50}{80} 100\% = 62,5\%.$$

Вологість ґрунту у відсотках від повної вологоємності (A_1) визначається:

$$A_1 = \frac{b}{G} 100\% ,$$

де, A_1 – вологість ґрунту у відсотках від повної вологоємності; b – вага води, що випарилась; G – повна вологоємність ґрунту.

Дослідження виконують у 3-5 повторях, використовуючи середні дані. Результати аналізів заносять до табл. 2.

Таблиця 2

Повна вологоємність ґрунту

Повторність	Проба ґрунту	Вага води в пробі ґрунту	Вага води, поглинутої ґрунтом	Вологоємність	Вологість у % від повної вологоємності
1					
2					
3					
Середнє					

Прилади та матеріали: скляні циліндри ($d \approx 3-4$ см, $h \approx 20$ см, марля, фільтрувальний папір, ножиці, нитки або резинки, шпателі для відбору зразків ґрунту, ваги, ексікатори

1.3 Визначення рН ґрунту

При виділенні мікроорганізмів із природних середовищ та їх дослідженні постійно необхідно враховувати кислотні або лужні властивості середовищ. Мікроорганізми живуть і розмножуються в широких діапазонах значень рН, але найкращий їх розвиток відбувається при оптимальних значеннях, які у різних груп бактерій неоднакові (табл. 3).

Таблиця 3

Діапазон та оптимальні значення рН для деяких груп мікроорганізмів

Вид бактерій	Діапазон рН	Оптимум рН
<i>Escherichia coli</i>	5,0-8,2	7,0-7,6
<i>Proteus vulgaris</i>	4,4-8,4	6,0-7,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,6-8,0	6,6-7,0
<i>Serratia marcescens</i>	5,0-8,0	6,0-7,0
<i>Vibrio cholerae</i>	6,4-7,9	7,0-7,4
<i>Bacillus subtilis</i>	4,5-8,5	6,0-7,5
<i>B.anthraxis</i>	6,0-8,5	7,0-7,4
<i>Clostridium sporogenes</i>	6,0-8,5	6,0-7,6
<i>C.perfringens</i>	5,8-8,5	6,0-7,6
<i>C.tetani</i>	5,5-8,3	7,0-7,6

Реакція водного середовища визначається співвідношенням між концентрацією водневих іонів, які зумовлюють кислі властивості і позначається $[H^+]$ та концентрацією носіїв лужних властивостей гідроксильних іонів $[OH^-]$.

Нейтральною вважають реакцію водного розчину, в якому концентрація водневих іонів дорівнює концентрації гідроксильних іонів $[H^+] = [OH^-]$. Для чистої дистильованої води співвідношення між концентрацією водневих і гідроксильних іонів подається рівнянням: $[H^+] \times [OH^-] + K_w$, де символ K_w позначає іонний добуток води.

Чисельне значення K_w для дистильованої води знайдено експериментально і при кімнатній температурі воно складає 10^{-14} . Тобто, в нейтральному середовищі $[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}$, в кислому $[H^+] > 10^{-7}$, а у лужному – $[H^+] < 10^{-7}$.

Таким чином, для того щоб встановити реакцію середовища необхідно визначити концентрацію водневих або гідроксильних іонів. На практиці реакцію середовища встановлюють шляхом визначення концентрації лише водневих іонів $[H^+]$, так як концентрація водневих і гідроксильних іонів є величинами спряженими і при збільшенні однієї з них у стільки ж разів зменшується друга. В 1909 році датський вчений Зеренсен запропонував простий і зручний спосіб позначення реакції середовища, подаючи її не в абсолютному значенні концентрації водневих іонів, а у вигляді водневого показника, який позначається символом рН.

Водневим показником називають від'ємний логарифм концентрації водневих іонів, тобто:

$$pH = -\lg C_{H^+} = \lg \frac{1}{C_{H^+}}.$$

Так, наприклад, для дистильованої води, в якій концентрація водневих іонів дорівнює 10^{-7} ,

$$pH = -\lg 10^{-7} = \lg \frac{1}{10^{-7}} = \lg 1 - \lg 10^{-7} = 0 - (-7) = 7.$$

Середня точка шкали відповідає нейтральній реакції і рН=7. Значення рН більше 7 характеризують лужні розчини, а нижче 7 – кислі.

Для визначення рН поживного середовища (чи розчину) використовують індикаторний або потенціометричний методи.

Індикаторний метод ґрунтується на використанні рН-індикаторів. Індикатори – це переважно органічні речовини зі слабкими кислотними або лужними властивостями, які здатні змінювати колір залежно від концентрації водневих іонів середовища (табл. 4).

Залежно від того, в якому середовищі (лужному чи кислому) знаходиться індикатор, його власна дисоціація буде знижуватися або підвищуватись, що і визначає забарвлення індикатора в розчині.

Індикатори бувають у рідкому стані і паперові. На практиці частіше використовують паперові універсальні індикатори.

Використання рН-індикаторів у багатьох випадках обмежене. Це пов'язано з тим, що чутливість і характер зміни кольору індикаторів значно змінюється від умов визначення (температури, іонної сили розчинів, наявності деяких органічних речовин у розчині та ін.). Паперові рН-індикатори дозволяють визначити рН розчину з точністю $\pm 0,5$ до $\pm 1,0$ і відносяться, як правило, до попереднього (наближеного) визначення величини рН. Застосування рН-індикаторів зовсім неможливе при вимірюванні кислотності забарвлених розчинів.

Для визначення величини рН розчинів (у тому числі і забарвлених) використовують різні іономіри (потенціометри, рН-метри).

В мікробіологічних дослідженнях використовують різні рН-метри (рН-340, рН-262, рН-121, рН-150), універсальні іономіри (ЭВ-74, И-102) та редоксиметри. Сучасні потенціометри забезпечені температурним коректором для компенсації температурних ефектів у разі, якщо температура електрода і досліджуваного розчину не відповідає тій, при якій проводилось налагодження за буферним розчином.

Скляні електроди перед використанням протягом 8-10 год вимочують в 0,1 н розчині НСІ, потім декілька разів ретельно промивають дистильованою водою, просушують фільтрувальним папером. Допоміжний електрод заливають насиченим розчином КСІ.

Таблиця 4

Двокольорові індикатори Кларка і Лебса

Індикатор	Властивості	Рекомендована %	Інтервал рН	Забарвлення		Змішане забарвлення	рН у точці переходу
				в кислотній зоні	у лужній зоні		
Тимоловий синій (кислий ряд)	Коричнево-зелений або червоно-фіолетовий порошок. Нерозчинний у воді. Розчинний у спирті і в розбавлених лугах	0,04	1,2-2,8	Червоне	Жовте	Жовто-рожеве	2,6
Бромфеноловий синій	Дрібні, безкольорові або рожеві кристали. Слабко розчинні у воді, краще – у спирті, ефірі і в розбавлених лугах	0,04	3,0-4,0	Жовте	Синє	Зелене	4,1
Метиловий червоний	Блискучі темно-фіолетові кристали або червоно-бурий порошок. Нерозчинний у воді. Розчинний у спирті	0,02	4,2-6,3	Малинове	Жовте	Червоне	5,0
Бромкрезолпурпуровий	Майже безкольоровий порошок. Нерозчинний у воді. Розчинний у спирті і в розбавлених лугах	0,04	5,2-6,8	Блідо-жовте	Пурпурове	Зелене з пурпуровим відтінком	6,3
Бромтимоловий синій	Рожевий або безкольоровий порошок. Погано розчинний у воді. Розчинний у спирті і в розбавлених лугах	0,04	6,0-7,6	Блідо-жовте	Синє	Салатово-зелене	7,1
Феноловий червоний	Темно-червоний порошок. Погано розчинний у воді. Розчинний у лугах і в спирті	0,02	6,8-8,4	Блідо-жовте	Червоне	Розово-червоне	7,7
Крезоловий червоний	Темно-червоний кристалічний порошок. Погано розчинний у воді, спирті й лугах	0,02	7,2-8,8	Блідо-жовте	Червоне	Розово-червоне	8,1
Тимоловий синій (лужний ряд)	Коричнево-зелений або червоно-фіолетовий кристалічний порошок. Нерозчинний у воді. Розчинний у спирті і в розбавлених лугах	0,04	8,0-9,6	Блідо-жовте	Синє	Синьо-фіолетове	8,8

Перед визначенням рН шкалу приладу налагоджують за допомогою стандартних буферних розчинів із рН 4,0 і 8,0. Інколи прилад налагоджують за одним буферним розчином, значення рН якого близьке до рН досліджуваного розчину.

Електроди поміщають у стаканчик із досліджуваним розчином, ставлять перемикач „межі виміру” у положення, яке відповідає діапазону рН досліджуваного розчину і підраховують показники. Якщо діапазон невідомий, тоді при вимірюванні використовують спочатку більш грубий діапазон рН – від 0 до 14.

Сучасні потенціометри обладнані мікропроцесорною апаратурою, яка здійснює автоматичне калібрування та розпізнавання показника з цифровою індикацією на дисплеї. Автоматичні аналізатори рН/іономіри мають режим автоматичної температурної корекції, вони забезпечують діалоговий режим роботи з користувачем та реєстрацію й обробку результатів вимірювань на комп'ютері.

За відношенням до рН мікроорганізми поділяються на декілька груп (рис. 1). У ґрунті складаються умови, які дозволяють розвитку всіх груп мікроорганізмів.

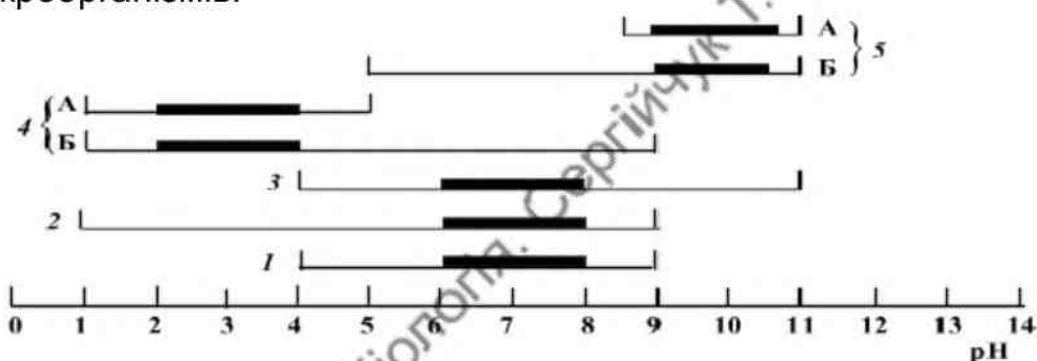


Рис. 1. Межі та оптимальні значення росту прокариот в залежності від рН:
 1 – нейтрофіли; 2 – кислотостійкі; 3 – лугостійкі; 4 – ацидофіли; 5 – алкалофіли.
 А – облігатні; Б – факультативні форми. Жирна лінія – оптимальні рН росту.

Хід роботи

Для визначення рН ґрунту беруть її наважку 10 г і заливають 25 мл холодної дистильованої води, позбавленої CO_2 . З метою позбавлення води CO_2 її кип'ятять протягом 1 год, охолоджують і закривають колбу притертою пробкою.

Ґрунт із водою струшують протягом 5 хв і в одержаній суспензії визначають рН за допомогою потенціометра або універсального індикатора.

Порядок вимірювання рН:

1. Включити прилад у мережу. Включити прилад за допомогою тумблера, встановивши його в положення „включено”.
2. Прогріти прилад протягом 10-15 хв.
3. Переключити „види роботи” в положення „рН” (або рХ).
4. Перевірити показання приладу за стандартними буферними розчинами з відомими значеннями рН.

5. Виміряти значення рН досліджуваного зразка ґрунту.
6. Промити електроди та просушити їх фільтрувальним папером.

Електроди перед зануренням у буферний розчин необхідно ретельно промити дистильованою водою, а залишки води з електродів зняти фільтрувальним папером. Рекомендується використовувати буферний розчин, величина рН якого знаходиться в тому ж діапазоні, що і значення рН ґрунтового розчину. Якщо рН досліджуваного розчину змінюється у широких межах (від 5 до 10), то перевірку приладу проводять за стандартними буферними розчинами, які мають рН від 1,7 до 9,2. Якщо прилад не показує те значення рН, яке має буфер, то ручкою „калібрування” встановлюють стрілку приладу на значення буферного розчину.

Прилади та матеріали: шпателі для відбору зразків ґрунту, мірні циліндри, ваги, скляні термостійкі стакани (об'ємом біля 50 мл), вода позбавлена CO₂ універсальний індикатор або потенціометр.

1.4. Визначення вмісту гумусових кислот

У ґрунті містяться різні органічні сполуки, сукупність яких є його органічною частиною. Умовно їх поділяють на чотири частини:

- свіжі нерозкладені органічні рештки, які ще не втратили своєї анатомічної будови;
- напіврозкладені без форми й анатомічної будови органічні рештки, які називають детритом;
- метаболічно активний вуглець, представлений низькомолекулярними та високомолекулярними індивідуальними сполуками – продуктами розкладу рослинних, тваринних і мікробних решток: лігнін, білки, вуглеводи, амінокислоти, ліпіди, низькомолекулярні органічні кислоти, пігменти та ін.
- специфічні сполуки, синтезовані у ґрунті, сукупність яких утворює гумус – складний конгломерат сполук, які підрозділяють на гумусові кислоти (гумінові та фульвокислоти) та нерозчинний залишок.

Гумусові сполуки відрізняються між собою низкою властивостей: кольором; розчинністю у різних розчинниках; вмістом С, Н, О, N; ступенем полімеризації – дисперсністю (табл. 5.)

Таблиця 5

Склад і основні характеристики гумусових сполук

Перегнійні сполуки	Колір	Розчинність	Вміст, %			
			С	Н	О	N
Гумусові кислоти	темно-бурий	у лугах, кислоти осаджують, у спирті нерозчинні	52-62	3-5,5	30-33	3,5-5,0
Гуміни	темно-бурий	нерозчинні у лугах	52-63	3,5-5,6	30,2-38,4	3,5-5,9
Фульвокислоти	жовтий	у воді і лугах, не осаджуються кислотами	44-49	3,5-5,0	44-49	2-4,0
Гіматомеланові	шоколадно-коричневий	у лугах і спирті, осаджуються кислотами.	60	~4,4		1,0-1,4

Хід роботи

В лабораторних умовах гумінові кислоти можна вилучати лужними розчинами (гідроксидом натрію, гідроксидом калію, пірофосфатом натрію). З цією метою 5 г ґрунту заливають 50 мл 2%-го розчину соди. Суміш підігривають на слабкому вогні протягом 10 хв.

Гумусові речовини при підігріванні переходять у розчин, який фільтрують через шар вати. У фільтрат додають 25 мл 10%-го розчину HCl. Випадає осад, який збирають на фільтрувальний папір, попередньо зважений на аналітичних вагах.

Фільтр з осадом висушують до постійної ваги, охолоджують в ексикаторі з поглиначем вологи і зважують. Вага осаду – це вага гумінових речовин, кількість яких перераховують на 1 г а.с.ґ. Отримані результати заносять до табл. 6.

Таблиця 6

Характеристика досліджуваного ґрунту

Опис зразка ґрунту	Вологість, у % від а.с. ґ.	Вологість у % від повної вологоємності	Повна вологоємність	pH	Коефіцієнт <i>K</i>	Вміст гумусових речовин в 1 г. а.с. ґ.

Коефіцієнт *K* визначається за формулою:

$$K = \frac{100}{100 - A},$$

де *A* – вологість ґрунту.

Цей коефіцієнт необхідний для перерахунку вмісту гумінових речовин на 1 г а.с. ґ., для чого кількість в 1 г ґрунту перемножують на коефіцієнт *K*.

Прилади та матеріали: шпателі для відбору зразків ґрунту, ваги, мірні циліндри, термостійкі стакани (об'ємом до 100 мл), воронки скляні для фільтрування, вата, попередньо висушений у окремих чашках Петрі фільтрувальний папір, пінцети, 2% розчин NaHCO_3 , 10% HCl .

Питання для самоконтролю

1. Дайте визначення поняттю «вологість ґрунту».
2. Як визначити вологість ґрунту?
3. Що таке «вологоемність ґрунту»?
4. Як можна визначити «вологоемність ґрунту»?
5. Як визначити рН ґрунту в лабораторних умовах?
6. Які сполуки входять до складу гумусу?
7. Яким чином з ґрунту можна вилучити гумусові кислоти та визначити їх кількість?

РОЗДІЛ 2. ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ КІЛЬКОСТІ МІКРОБІОТИ ҐРУНТУ

При характеристиці ґрунтової мікробіоти одним з основних критеріїв є визначення загальної кількості мікроорганізмів в 1 г ґрунту. Проте, слід зазначити, що для підрахунку загальної кількості бактерій ґрунту не існує цілком достовірного методу, що зумовлено:

- по-перше неадекватністю умов, які є у ґрунті і штучних поживних середовищах, що використовуються в лабораторних умовах;
- по-друге – в лабораторних умовах не можливо відтворити ті взаємовідносини, які складаються в мікробних угрупованнях у природних умовах.

В 1 грамі верхніх шарів чорноземних ґрунтів міститься більше 10^9 КУО мікроорганізмів, в каштанових ґрунтах – від кількох мільонів до мільярду, у лісових ґрунтах (буроземах, дерново-підзолистих, глейово елювіальних) загальна кількість мікроорганізмів коливається в межах $1 \times 10^3 - 3 \times 10^3$ КУО/г.

В мікробіологічній практиці використовують непрямі (шляхом висіву на поживні середовища) та прямі (шляхом використання мікроскопічних методів) методи підрахунку кількості мікробних клітин в 1 г а.с. ґ.

2.1 Метод граничних розведень

Метод граничних розведень базується на тому, щоб зробити ряд послідовних розведень і визначити таке розведення при висіві з якого на щільне поживне середовище можна було б підрахувати кількість колоній, що вирости.

Хід роботи

10 г просіяного і ретельно протертого у стерильній фарфоровій ступці ґрунту вносять у колбу з 90 мл стерильної водопровідної води або фізіологічного розчину. Колбу збовтують протягом 5-10 хв, після чого суспензію відстоюють протягом 30-60 сек для осідання грудочок.

1 мл суспензії переносять у пробірку з 9 мл стерильної водопровідної води (або фізіологічного розчину) і старанно перемішують. З цієї пробірки таким же чином переносять 1 мл суспензії у наступну пробірку і т.д. (рис. 2). Таким чином отримують ряд послідовних розведень у воді: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} і т.д. Для виготовлення кожного розведення використовують нову стерильну піпетку.

0,1-0,2 мл відповідного розведення висівають в чашки Петрі з поживним середовищем.

Посів ґрунтової суспензії на поживне середовище проводять глибинним або поверхневим методом. У першому випадку 0,1 мл (або 0,2 мл) суспензії вносять у стерильну чашку Петрі, заливають в неї розплавлене і охолоджене до 50° С поживне середовище. Вміст чашки ретельно перемішують. Після ущільнення середовища чашки перевертають вверх дном і поміщають у термостат при 28-30° С на 3-5 діб при визначенні бактерій, 5-7 – грибів і дріжджів, 7-10 діб – актиноміцетів.

У другому випадку посіви проводять на поверхню ущільненого поживного середовища за допомогою стерильного шпателя. При цьому для кожного розведення беруть новий шпатель.

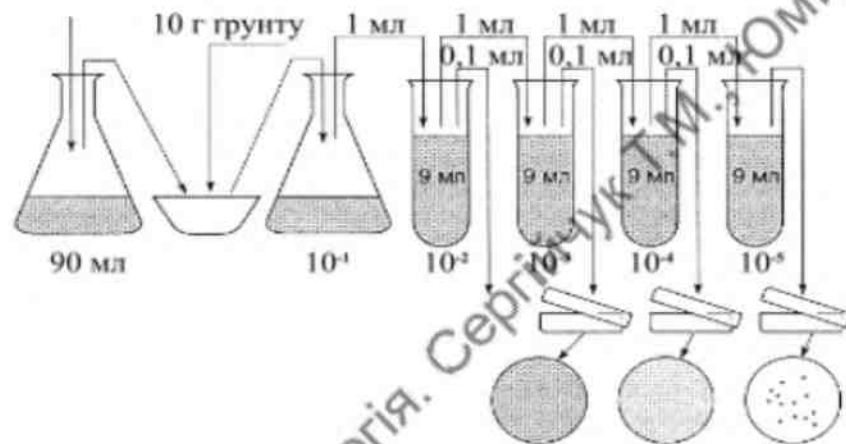


Рис. 2. Схема виготовлення розведень та посіву ґрунтової суспензії в чашки Петрі

З відповідних розведень роблять 3-5 паралельних посівів, тобто повторність кожного посіву 3-5-ти кратна.

Після культивування підраховують на кожній чашці кількість КУО, що вирости, маючи на увазі, що кожна з них вирости з однієї клітини. Найбільш достовірними результатами вважаються такі, коли на чашці Петрі виростає від 50 до 100 КУО. Це можливо досягти, зробивши попередній висів зразків ґрунту для визначення оптимального для дослідження розведення.

Попередній посів роблять у двох повторях із кожного розведення, і результати заносять до табл. 7.

Для основного посіву беруть те розведення, при висіві якого виростає не менше 30-50, але не більше 100 КУО. Кількість КУО підраховують із використанням лічильників колоній.

Результати попереднього посіву для визначення оптимального розведення суспензії ґрунту

Розведення	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Повторність					
Кількість КУО					

Результати основного посіву обробляють методом математичної статистики для встановлення загальної кількості мікроорганізмів в 1 г а.с.г. з урахуванням стандартного відхилення середнього арифметичного.

Приклад: В чашках Петрі, засіяних 0,2 мл суспензії ґрунту 10⁻⁵, виросло в середньому 50 КУО. Тоді в 1 г ґрунту було

$$\frac{10^5}{0,2} \cdot 50 = 2,5 \cdot 10^7 \text{ клітин}$$

Для перерахунку на 1 г а.с. г. отриману величину помножують на коефіцієнт К.

Прилади та матеріали: фарфорові ступки з вінчиками, шпателі для відбору зразків ґрунту, ваги, стерильні колби (об'ємом 150-200 мл), стерильний фізіологічний розчин або вода, стерильні пробірки піпетки (10 мл, 1 мл), стерильні чашки Петрі, скляні шпателі, спирт для пропалювання шпателів, середовища МПА та ГА.

2.2. Крапельний метод визначення кількості мікроорганізмів

Крапельний метод визначення загальної кількості мікробіоти є фактично аналогічним до методу граничних розведень з тією відмінністю, що розведення здійснюють не у воді, а безпосередньо у напівщільному поживному середовищі і висів здійснюють використовуючи одну чашку Петру для кількох повторів одного й того самого розведення, що дозволяє мінімізувати кількість використання середовищ та посуду.

Хід роботи

У декілька пробірок розливають по 9 мл поживного середовища, яке містить 0,6% агару. Краще використовувати ґрунтовий агар. До першої пробірки вносять 1 мл ґрунтової суспензії у розведенні 10⁻², а потім проводять титрування (готують ряд послідовних розведень – 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ і т.д.). Вміст кожної пробірки ретельно перемішують і наносять 3-5 крапель кожного розведення на внутрішню поверхню стерильної

чашки Петрі (рис. 3). Краплі можна наносити як на дно, так і на внутрішню поверхню кришки чашки.

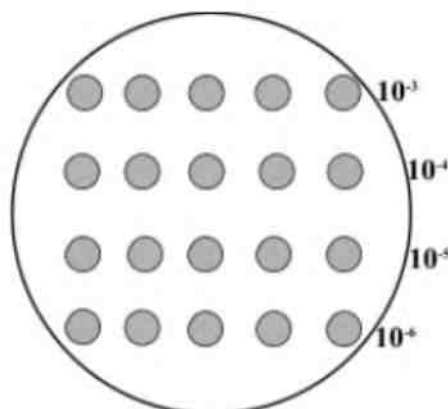


Рис. 3. Схема нанесення крапель на чашку Петрі крапельним методом

Перед нанесенням крапель необхідно встановити кількісне значення (об'єм) однієї краплі. З цією метою в піпетку набирають 1,0 або 2,0 мл поживного середовища і викапують 20-30 крапель, фіксуючи загальний об'єм, а потім встановлюють об'єм однієї краплі.

Чашки Петрі з нанесеними краплями поміщають у термостат при 20-30° С й інкубують. Через 4-6 діб підраховують кількість КУО, що виростили в кожній краплі і проводять перерахунок кількості мікроорганізмів на 1 г а.с.г.

Прилади та матеріали: фарфорові ступки з вінчиками, шпателі для відбору зразків ґрунту, ваги, стерильні колби (об'ємом 150-200 мл), стерильний фізіологічний розчин або вода, стерильні пробірки, піпетки (10 мл, 1 мл), стерильні чашки Петрі, середовища МПА (0,6% агару) та ГА (0,6% агару).

2.3. Прямі мікроскопічні методи підрахунку мікроорганізмів

Прямі мікроскопічні підрахунки складається з підготовки мазка із зразків ґрунтової суспензії на визначеній площі предметного скельця з наступним фарбуванням мазка та підрахунком мікробних клітин у полі зору мікроскопу.

Хід роботи

Метод Виноградського. Метод базується на підрахунку клітин мікроорганізмів у світлопольному мікроскопі. Ґрунтову бовтанку у розведенні 1:10 диспергують одним із методів (розтирання у стерильній

ступці, дією ультразвуку, використання хімічних засобів диспергування або ін.). Хороші результати дає обробка ґрунтової суспензії ультразвуком низької частоти і потужності. Оптимальний режим обробки на установці УЗДН-1 такий: час обробки – 30 сек, сила струму – 0,40 А, частота – 15 кГц.

При роботі з багатими ґрунтами з отриманої суспензії готують наступне розведення - 1:100 або 1:1 000. Після енергійного збовтування і відстоювання протягом декількох секунд (для осадження великих ґрунтових частинок) стерильною мікропіпеткою наносять 0,01 мл суспензії на чисте знежирене скло і рівномірно розподіляють на прямокутнику площею 4 см². З однієї пробірки готують не менше трьох препаратів. Препарат висушують, фіксують над полум'ям пальника і поміщають у стаканчик із карболовим еритрозином на 40-60 хв. Фарбовані препарати обережно промивають водою, висушують і розглядають з імерсією у світлопольному мікроскопі.

При рівномірному розподілі мікроорганізмів на площі мазка на кожному препараті достатньо підрахувати 20 полів зору. Підрахунок можна полегшити використанням окулярної сітки.

Знаючи площу поля зору мікроскопа (її визначають за допомогою об'єкт-мікромметра), середнє число клітин на цій площі, можна підрахувати кількість мікроорганізмів в 1 г а.с.ґ. Наприклад, якщо для аналізу було взято 0,01 мл суспензії у розведенні 1:10, число клітин в 1 г ґрунту вираховують за формулою

$$\frac{10(A+100)}{0,01}ab,$$

де, *a* – середня кількість клітин у полі зору; *b* – кількість полів зору на площі 4 см²; *A* – вологість ґрунту (у %).

Результати обробляють методом математичної статистики, встановлюють рівень їх достовірності і заносять до табл. 10.

Таблиця 10

Кількість мікроорганізмів в 1 г ґрунту, визначена методом Виноградського

<i>x</i>	\bar{x}	\bar{x}_i	δ^2	δ	m%

При мікроскопії мазків проводять диференційований підрахунок бактерій різних морфологічних груп. При цьому звертають увагу на число коків, великих та дрібних паличок і дріжджеподібних клітин. Інші клітини умовно за розмірами відносять до тієї чи іншої групи.

За допомогою об'єкт-мікромметра визначають середні розміри клітин кожної з указаних груп і, враховуючи їх число, визначають сумарну біомасу, беручи до уваги, що питома маса мікробної клітини 1,10 г/см³.

Недоліком методу Виноградського є неможливість диференціювати живі і мертві клітини мікроорганізмів. Тому результати, отримані з використанням цього методу, дещо перевищують фактичний вміст живих бактерій у ґрунті.

Люмінесцентний метод. Метод базується на мікроскопії препаратів ґрунтової суспензії, оброблених флюорохромом, під люмінесцентним мікроскопом.

На ретельно знежирене предметне скло наносять мікропіпеткою 0,01 мл досліджуваної суспензії ґрунту (розведення 1:100 або 1:1 000), рівномірно розподіляють на площі 4 см², висушують, обережно фіксують над полум'ям пальника і обробляють протягом 2-4 хв розчином акридинового оранжевого (розведення 1: 10 000). Для промивання препарат занурюють на 10 хв у водопровідну воду, а потім висушують при кімнатній температурі.

Для мікроскопії на препарат наносять краплю води і покривають знежиреним покривним склом. Надлишок води видаляють фільтрувальним папером. Препарати розглядають на люмінесцентному мікроскопі (фільтри ФС-1-2, ЖЗС-19ЖС-18). Живі мікробні клітини мають яскраво зелене свічення, мертві клітини та ґрунтові часточки – червоне.

Число мікробних клітин в 1 г ґрунту вираховують за формулою

$$\frac{4ac}{S} \cdot 10^{10},$$

де, *a* – середня кількість клітин у полі зору; *c* – показник розведення (100 або 1 000); *S* – площа поля зору (мкм²). Бажано підібрати таке розведення, при якому кількість мікробних клітин у полі зору складало 5-10.

Для підрахунку рекомендується з кожного ґрунтового зразка готувати по два препарати і на кожному з них підраховувати у 10-15 полях зору. При постановці тривалих дослідів необхідно мати на увазі, що в міру експлуатації джерел світла знижується яскравість свічення клітин, що може призвести до заниження результатів.

Отримані результати обробляють методами математичної статистики, перераховують кількість клітин на 1 г а.с.ґ. і заносять до табл. 11.

Таблиця 11

Кількість мікробних клітин в 1 г а.с.ґ., визначена різними методами

Метод	\bar{x}	δ	m	m%	V	m _d	t _d	Критерій Стюдента
Висів методом граничних розведень								
Висів крапельним методом								
Метод Виноградського								
Метод люмінесцентної мікроскопії								

Прилади та матеріали: фарфорові ступки з вінчиками, шпателі для відбору зразків ґрунту, предметні скельця, покривні скельця, мікропіпетки, об'єкт-мікрометр, карболовий еритрозин, акрединовий помаранчевий, світлопольний мікроскоп люмінесцентний мікроскоп.

Питання для самоконтролю

1. Які методи визначення загальної кількості ґрунтової мікробіоти Ви використовували в роботі?
2. В чому полягає основна суть методу граничних розведень?
3. В чому недолік методу граничних розведень для визначення загальної кількості ґрунтової мікробіоти?
4. В чому відмінність методу граничних розведень та крапельного методу для визначення загальної кількості ґрунтової мікробіоти?
5. Які середовища використовували для визначення загальної кількості ґрунтової мікробіоти?
6. В чому суть прямих методів кількісного підрахунку ґрунтових мікроорганізмів?

РОЗДІЛ 3. ВИЗНАЧЕННЯ ТАКСОНОМІЧНИХ ТА ФІЗІОЛОГІЧНИХ ГРУП МІКРООРГАНІЗМІВ

Не менш важливими показниками, окрім загальної кількості мікробіоти, є розподіл таксономічних та фізіологічних груп мікроорганізмів. Так, наприклад, розподіл таксономічних груп в чорноземах становить бактерії – 63-86% (з них ендоспороутворювальних – 21,4-24,5%), представників актинобактеріальної групи – 14-35%, мікроскопічних грибів – 0,8-3,5%. В каштанових ґрунтах бактерії також займають домінуюче положення - близько 65%, до 35% актинобактерій і біля 0,5% грибів. А от у лісових ґрунтах домінуюче положення займають мікроскопічні гриби та актинобактерії.

Кількісний аналіз представників окремих груп мікроорганізмів можна проводити шляхом висіву ґрунтової суспензії на щільні поживні середовища. З цією метою готують розведення ґрунту в стерильній водопровідній воді або сольовому розчині (NaCl – 0,05% або MgSO₄ – 01%). Певний об'єм розведення засівають поверхневим або глибинним методом і через 2-5 діб підраховують кількість колонієутворювальних одиниць (КУО), що виростили, а потім перераховують на кількість клітин в 1 г а.с. ґ.

На щільних поживних середовищах можна виявити різні групи мікроорганізмів:

- бацилярні форми, наприклад, виявляються при посіві пастеризованої ґрунтової суспензії (70⁰ С протягом 15 хв) на МПА+СА (1:1);
- для визначення кількості мікроорганізмів, що здатні асимілювати мінеральні форми азоту (наприклад, актиноміцетів) часто використовують крохмально-аміачний агар (КАА) або середовище Чапека;
- вміст бактерій роду *Azotobacter* визначають на середовищі Ешбі;
- на агаризованій ґрунтовій витяжці виявляють мікроорганізми, що мінералізують гумусові речовини (автохтонна мікрофлора). Ще краще для цієї мети використовувати нітритний агар – нітрити інгібують ріст бацилярних форм;
- для визначення мікроскопічних грибів використовують сусловий агар (СА) або підкислене середовище Чапека.

На рідких поживних середовищах можливе визначення кількості певних фізіологічних груп мікроорганізмів.

З цією метою визначають найменшу наважку ґрунту, яка ще дає ріст. При цьому вважається, що у найбільшому розведенні ріст викликається розвитком однієї клітини. На рідких середовищах зазвичай визначають:

- кількість аеробних целюлозоруйнуючих мікроорганізмів визначають на середовищі Імшенецького або Солнцевої;
- денітрифікуючі бактерії визначають на середовищі Гільтая;
- нітрифікатори I фази визначають на рідкому середовищі Виноградського.

3.1 Виявлення актинобактерій та грибів (мікроміцетів)

Хід роботи

Готують наважку ґрунту та здійснюють ряд послідовних розведень, як описано в пункті 2.1. Висів здійснюють поверхневим шляхом, наносячи 0,1-0,2 мл відповідного розведення на:

- суслний (або хлібний) агар для підрахунку мікроміцетів;
- крохмально-аміачний агар (КАА) для виявлення актинобактерій.

Ставлять у термостат на 2-7 діб при $t = 20-28^{\circ}\text{C}$. Описують характеристики найбільш характерних колоній грибів та актинобактерій і заносять до табл. 12.

Таблица 12

Морфологічна характеристика грибів та актинобактерій

№ п/п	Загальна характеристика колоній	Мікроскопічна характеристика:		Примітка
		колоній	конідієносців (спороносців)	

Прилади та матеріали: фарфорові ступки з вінчиками, шпателі для відбору зразків ґрунту, ваги, стерильні колби (об'ємом 150-200 мл), стерильний фізіологічний розчин або вода, стерильні пробірки, піпетки (10 мл, 1 мл), стерильні чашки Петрі, скляні шпателі, спирт для пропалювання шпателів, середовища - суслний (або хлібний) та крохмально-аміачний агар (КАА).

3.2 Виявлення спороутворювальних бактерій

Хід роботи

Для кількісного підрахунку спороутворювальних бактерій певне розведення ґрунту прогрівають на водяній бані при $80-100^{\circ}\text{C}$ протягом 10-15 хв. При такій обробці вегетативні клітини гинуть. Наступний висів на МПА+СА (1:1) дасть ріст лише тих клітин, які знаходилися у формі спори.

Посіви інкубують при 30°C протягом 24-72 год із наступним підрахунком кількості КУО, що виростили на середовищі в чашці Петрі. Кількість КУО, що знаходилися у формі спор в 1 г а.с.ґ., підраховують виходячи з розведення ґрунту та об'єму, який був внесений на поживне середовище. Результати заносять до табл. 13.

Характеристика спороутворювальних бактерій ґрунту

№ п/п	Кількість спор в 1 г ґрунту	Кількість спор в 1 г а.с.ґ.	Вміст спор від загальної кількості бактерій, у %	Загальна характеристика колоній	Мікроскопічна характеристика	
					краю колоній	клітин та спор

Прилади та матеріали: фарфорові ступки з вінчиками, шпателі для відбору зразків ґрунту, ваги, стерильні колби (об'ємом 150-200 мл), стерильний фізіологічний розчин або вода, водяна баня, стерильні пробірки, піпетки (10 мл, 1 мл), стерильні чашки Петрі, скляні шпателі, спирт для пропалювання шпателів, середовище - МПА+СА (1:1)

3.3 Виявлення вільноживучих азотфіксувальних бактерій

Азотфіксацією називається відновлення молекулярного азоту до аміаку ферментом нітрогеназою в клітинах азотфіксувальних бактерій

Хід роботи

Підготовчі етапи виявлення азотфіксувальних бактерій проводять за методикою описаною у пункті 2.2. Висів із певних розведень здійснюють поверхневим (для аеробних) або глибинним (для анаеробів) шлдяхом на агаризоване мінеральне середовище Ешбі, яке не містить солей азоту. Посіви інкубують за температури 30° С протягом 5-7 діб. Підраховують загальну кількість бактерій цієї групи та їх морфологію (табл. 14).

Таблиця 14

Морфологічна характеристика аеробних діазотрофів

№ п/п	Кількість КУО в 1 г а.с.ґ.	Загальна характеристика колоній	Мікроскопічна характеристика:	
			краю колоній	клітин

Найбільш цінним для сільського господарства серед вільноіснуючих азотфіксаторів є *Azotobacter chroococcum*, який при рості на щільному поживному середовищі Ешбі утворює слизові, дещо опуклі, блискучі, гладенькі або бугристі з нерівними краями колонії. На початку колонії безкольорові, а з часом вони стають темно-бурими, коричневими або майже чорними. Середовище навколо колоній залишається незафарбованим.

Прилади та матеріали: фарфорові ступки з вінчиками, шпателі для відбору зразків ґрунту, ваги, стерильні колби (об'ємом 150-200 мл), стерильний фізіологічний розчин або вода, водяна баня, стерильні пробірки, піпетки (10 мл, 1 мл), стерильні чашки Петрі, скляні шпателі, спирт для пропалювання шпателів, середовище – агаризоване Ешбі.

3.4. Виявлення нітрифікувальних бактерій

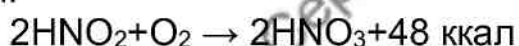
Нітрифікація – це окиснення аміаку до азотної кислоти через проміжну стадію азотистої кислоти. Цей процес відбувається у дві фази за участю двох спеціалізованих груп бактерій.

В першу фазу аміак окиснюється до солей азотистої кислоти:



Перебіг реакції забезпечується бактеріями, які належать до родів *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio*.

У другу фазу нітрифікації солі азотистої кислоти окиснюються до солей азотної кислоти:



У цьому процесі беруть участь бактерії родів *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*.

Хід роботи

Нітрифікувальні бактерії виявляють на рідкому мінеральному поживному середовищі Виноградського. Для цього ґрунт попередньо розтирають у фарфоровій ступці і готують ряд послідовних розведень ґрунту (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ... 10^{-7}). 1 мл кожного розведення вносять у декілька паралельних пробірок (3-5), в яких міститься 9 мл елективного поживного середовища. Після інкубації при 30°C протягом 5-14 діб відмічають розведення, в яких є ріст. Результати обробляють за таблицею Мак-Креді (див. додаток), розробленою на основі методів математичного аналізу. Для користування таблицею складають числову характеристику, яка має вигляд 3-значного числа.

Приклад 1. Припустимо, що виготовлені такі розведення ґрунту: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . 1 мл кожного розведення внесли в 5 паралельних пробірок. Після інкубації кількість пробірок із помутнілим поживним середовищем становила:

- у пробірках із розведенням 10^{-2} середовище помутніло в 4-х пробірках з п'яти ;
- з розведенням 10^{-3} – у 2-х пробірках;
- з розведенням 10^{-4} – в 1-й пробірці.

Розведення	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Кількість пробірок середовище в яких помутніло (із 5-ти)	4	2	1.

Числова характеристика в цьому випадку складе 421, якій за таблицею Мак-Креді відповідає найбільш вірогідна кількість клітин мікроорганізмів в 1 мл розведення, прийнятого за початок числової характеристики – 2,5.

Для того, щоб вирахувати кількість мікроорганізмів в 1 г ґрунту треба 2,5 перемножити на коефіцієнт того розведення, при висіві з якого спостерігається ріст у всіх паралельних пробірках. У нашому випадку таким розведенням було 10^{-2} . Виходячи з цього, найбільш вірогідна кількість клітин в 1 г ґрунту складе $2,5 \times 100 = 250$.

Приклад 2. Засіяли по 1 мл із 10-го по 6-те розведення в п'яти повторях.

Розведення	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Кількість пробірок середовище в яких помутніло (із 5-ти)	5	5	4	2	1	0.

Згідно цих даних числова характеристика буде 543, якій відповідає число 30, тобто в 1 мл розведення 10^{-2} міститься 30 клітин, а кількість клітин в 1 г ґрунту складе $30 \times 1\ 000 = 3\ 000$.

Через 7-14 діб на поверхні середовища утворюється тоненька плівка, а в середовищі зникає аміак і з'являється спочатку азотиста, а потім азотна кислота. Контролем служить стерильне середовище. Морфологію бактерій вивчають у препаратах, виготовлених із культуральної рідини і фарбованих фуксином. Про розвиток нітрифікувальних бактерій судять за утворенням NO_2^- та NO_3^- , наявність яких визначають з використанням спеціальних тестів.

Визначення нітритів.

1. *Реакція з реактивом Грісса.* У пробірку наливають 10-15 крапель реактиву Грісса і додають 1,5-2,0 мл досліджуваного розчину. Суміш підігривають на водяній бані. При наявності нітритів суміш набуває рожевого кольору. При наявності великої кількості нітритів у середовищі забарвлення з'являється без підігріву суміші.

2. *Реакція з цинк-йод-крохмальним розчином.* У фарфорову чашку (або годинникове скло) вносять 1 краплю 20%-го розчину сірчаної кислоти і додають до неї 3 краплі реактиву цинк-йод-крохмаль. До суміші додають 1 краплю досліджуваної культуральної рідини. За наявності нітритів суміш набуває синього кольору, що є наслідком витіснення азотистою кислотою вільного йоду з йодистоводневої солі. Вільний йод реагує з крохмалем, зумовлюючи синє забарвлення.

3. *Реакція з дифеніламіном.* До двох крапель сірчаної кислоти у фарфоровій ступці додають кристалик дифеніламіну. Після розчинення до суміші додають одну краплю досліджуваного середовища. Якщо в

середовищі є NO_2^- або NO_3^- , то суміш зафарбовується в темно-синій колір. Чутливість цієї реакції досить висока (1:100 000).

Визначення нітратів.

1. *Реакція з дифеніламіном.* Для визначення нітратів у середовищі необхідно зруйнувати нітроти, які містяться в ньому. З цією метою середовище кип'ятять із NH_4Cl у присутності 30%-ї оцтової кислоти. Після кип'ятіння проводять реакцію з дифеніламіном. Поява синього забарвлення свідчить про наявність у середовищі нітратів.

2. *Реакція з пірагалом.* До 10 мл суспензії додають 0,2 мл пірагалолу і ретельно перемішують. Опустивши кінчик піпетки у рідину, до суміші обережно доливають 2 мл сірчаної кислоти. У пробірку вносять кристалик (~0,1 г) NaCl . На межі суміш–кислота настає скипання рідин і з'являється кільце пурпурового кольору. Інтенсивність забарвлення і ширина кільця вказують на кількісний вміст нітратів.

Результати тестів заносять до таблиці 15.

Таблиця 15

Вміст нітрифікувальних бактерій у ґрунті

Розведення ґрунту	Повтори	Наявність		Числова характеристика	Кількість клітин в 1 г ґрунту	Кількість клітин в 1 г а.с.ґ.	Морфологія нітрифікаторів
		NO_2^-	NO_3^-				
10^{-2}	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
10^{-3}							

Прилади та матеріали: фарфорові ступки з вінчиками, шпателі для відбору зразків ґрунту, ваги, стерильні колби (об'ємом 150-200 мл), стерильний фізіологічний розчин або вода, водяна баня, стерильні пробірки, піпетки (10 мл, 1 мл), середовище Виноградського, реактив Грісса, 20% розчин H_2SO_4 , реактив цинк-йод-крохмаль, дифеніламін, пірагол, NaCl .

3.5. Виявлення денітрифікувальних бактерій

Денітрифікація – це процес відновлення нітратів через стадію нітритів до аміаку і вільного азоту.

Хід роботи

Виявлення денітрифікувальних бактерій проводять на рідкому поживному середовищі з поплавками *Гільтая*. Підготовку ґрунту та посів у середовище проводять як у пункті 3.4. Посіви інкубують за температури 20-30° С протягом 7-14 діб. Контролем служить стерильне поживне середовище.

Про розвиток денітрифікаторів судять за газу в поплавках, помутніння, білого кільця на межі середовище-повітря. Складають числову характеристику і визначають кількість денітрифікуючих бактерій в 1 г ґрунту (табл. 16).

Таблица 16

Вміст денітрифікаторів у ґрунті

Розведення	Повтори	Утворення			Числова характеристика	Кількість клітин в 1 г ґрунту	Морфологія денітрифікаторів
		помутніння	газу	кільця			
10 ⁻²	1						
	2						
	3						
10 ⁻³							

Прилади та матеріали: фарфорові ступки з вінчиками, шпателі для відбору зразків ґрунту, ваги, стерильні колби (об'ємом 150-200 мл), стерильний фізіологічний розчин або вода, водяна баня, стерильні пробірки, піпетки (10 мл, 1 мл), середовище *Гільтая* з поплавками.

Питання для самоконтролю

1. На співвідношення яких основних таксономічних груп мікроорганізмів звертають увагу при дослідженні ґрунтової мікробіоти?
2. Які поживні середовища використовують для визначення актинобактерій та мікроміцетів?
3. Як можна виявити кількість мікроорганізмів що знаходяться у формі спор у ґрунті?
4. В чому елективність середовища Ешбі для виявлення вільноіснуючих азотфіксаторів?
5. Як можна виявити нітрифікувальні бактерії та розрізнити утворені нітриту та нітрати в середовищі?
6. На якому середовищі визначають денітрифікувальні мікроорганізми та що свідчить про позитивну реакцію їх наявності?

4. ОТРИМАННЯ НАКОПИЧУВАЛЬНИХ КУЛЬТУР ОКРЕМИХ ПРЕДСТАВНИКІВ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ГРУП ҐРУНТОВОЇ МІКРОБІОТИ

4.1. Виявлення анаеробних азотфіксувальних спороутворювальних масляно-кислих бактерій виду *Clostridium pasteurianum*

Підрахунок бактерій цієї групи можна проводити на безазотовому середовищі Виноградського (див. додаток).

Хід роботи

Підготовку ґрунту на його розведень здійснюють як описано для пункту 3.4. Для інактивації аспорогенних бактерій суспензію ґрунту прогрівають на водяній бані за температури 80-100° С протягом 10-20 хв. Після, 1 мл відповідного розведення ґрунту засівають у середовище в 3-5 повторах й інкубують при 20-30° С протягом 7-14 діб. Контролем служить стерильне середовище.

Про розвиток *Clostridium pasteurianum* судять за утворенням осаду на дні пробірки, газу в поплавках, масляної кислоти та наявності гранульози в клітинах бактерій.

Виявлення масляної кислоти.

1. *Якісна реакція на масляну кислоту.* До 5 мл культуральної рідини додають 0,5 мл 96⁰ спирту і 1-2 мл сірчаної кислоти. Суміш ретельно перемішують і нагрівають, утворюється масляно етиловий-ефір, який легко визначається за характерним запахом – запах ананасу.

Реакція протікає за рівнянням:



2. *Реакція із хлорним залізом.* До 5-ти мл культуральної рідини додають 2 мл 5%-го розчину хлорного заліза. Пробірку струшують і підігрівають. Унаслідок утворення маслянокислого заліза рідина набуває коричневого забарвлення.

Для виявлення гранульози з дна пробірки беруть культуру, готують препарат роздавлена крапля і додають краплю розчину Люголя.

При мікроскопічному дослідженні препаратів звертають увагу на рухливість клітини, форму клітини та спори, положення спори у клітині, наявність коричневого забарвлення у клітині (реакція розчину Люголя з гранульозою).

За результатами візуального та мікроскопічного спостережень складають числову характеристику і підраховують кількість клітин *C. pasteurianum* в 1 г а.с.ґ. (табл. 17).

Вміст *Clostridium pasteurianum* у ґрунтовій пробі

Розведення ґрунту	Повтори	Утворення:				Числова характеристика	Кількість клітин в 1 г а.с.ґ.	Морфологія клітин та спор
		газу	помутніння	масляної кислоти	гранульози			
10 ⁻²	1 2 3							
10 ⁻³								

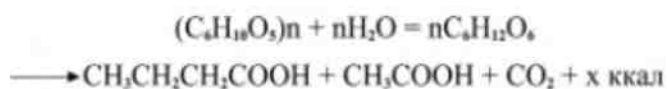
Прилади та матеріали: фарфорові ступки з вінчиками, шпателі для відбору зразків ґрунту, ваги, стерильні колби (об'ємом 150-200 мл), стерильний фізіологічний розчин або вода, водяна баня, стерильні пробірки, піпетки (10 мл, 1 мл), безазотове середовище Виноградського з поплавками, 96^o спирт, H₂SO₄, 5% розчин FeCl₃, предметні скельця, покривні скельця, розчин Люголя, світлопольні мікроскопи.

4.2. Виявлення анаеробних деструкторів клітковини

Клітковина (целюлоза) – складний полісахарид (C₆H₁₀O₅)_n, який є головним компонентом оболонок рослинних клітин.

Велика кількість клітковини у вигляді рослинних решток потрапляє у ґрунт, де під впливом ферментів мікроорганізмів підлягає біологічному розкладу.

Під впливом целюлази клітковина гідролізується з утворенням проміжних продуктів типу глюкози та целобіози. Остання під дією целобіази переходить у глюкозу, яка трансформується за типом маслянокислого бродіння з утворенням масляної, оцтової, янтарної, молочної та мурашиної кислот, водню, вуглекислого газу і спирту. Процес протікає за рівнянням:



Збудниками анаеробного розкладу клітковини є мезофільні і термофільні мікроорганізми, які відносяться переважно до роду *Clostridium*.

Хід роботи

Для виявлення збудників анаеробного розкладу клітковини використовують поживне середовище Омелянського (див. додаток).

Високі пробірки заповнюють на 2/3 середовищем, вносять 0,5-1,0 г досліджуваного ґрунту, а потім прогривають на водяній бані при 80° С протягом 10 хв для знищення аспорогенних бактерій.

Після прогривання у пробірку кладуть декілька смужок фільтрувального паперу, доливають стерильне середовище доверху і закривають пробкою з газовідвідною трубкою або затвором. Вільний кінець трубки поміщають у стакан із водою. Прилад поміщають у термостат за температури 30° С.

По мірі розвитку бродіння фільтрувальний папір жовтіє і покривається слизом. Через 12-14 діб смужки фільтрувального паперу розпадаються на окремі волокна. Для дослідження з культуральної рідини готують мазки, фарбують фуксином і розглядають з імерсією.

Хімічне дослідження проводять на наявність масляної кислоти (див. 4.1).

Прилади та матеріали: фарфорові ступки з вінчиками, шпателі для відбору зразків ґрунту, ваги, стерильні колби (об'ємом 150-200 мл), стерильний фізіологічний розчин або вода, водяна баня, смужки фільтрувального паперу, стерильні пробірки, піпетки (10 мл, 1 мл), середовище Омелянського, 96° спирт, H₂SO₄

4.3 Виявлення аеробних деструкторів клітковини

Значні кількості клітковини знаходяться у верхніх шарах ґрунту, де піддаються впливу аеробних деструкторів за участю целюлази. Процес іде за рівнянням:



В аеробному розкладі клітковини беруть участь гриби (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*), актиноміцети та бактерії. Найбільш енергійними деструкторами клітковини є бактерії родів *Cytophaga*, *Cellvibrio*, *Cellfalcicula* та ін.

Хід роботи

1. У колбах. В колби об'ємом 150-200 мл наливають тонким шаром (не вище 1 см) середовище Гетчинсона (див. додаток) в яке вносять 0,5-1,0 г ґрунту і на кінчику скальпеля крейди. На дно колби опускають складений конусом із складками або „гармошкою” фільтрувальний папір (рис. 6). Інкубацію ведуть при 25-26° С протягом 10-14 діб.

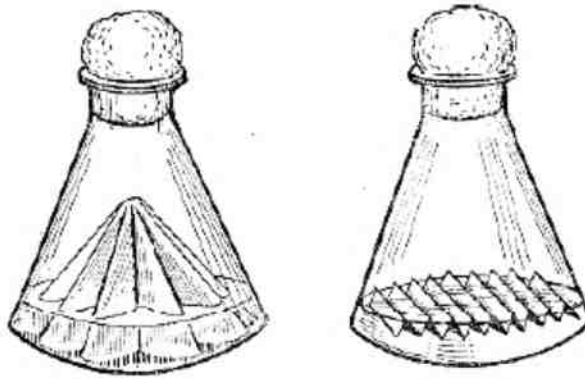


Рис. 6. Колби зі складеним папером для отримання накопичувальної культури аеробної

Енергійний розклад целюлози відбувається на межі середовища, де дифузія кисню і поживних речовин до фільтрувального паперу забезпечує найкращі умови для розвитку мікроорганізмів. Фільтрувальний папір покривається жовтуватими або оранжевими плямами за рахунок розвитку пігментованих бактерій. Папір ослизнюється і розпадається на окремі волоконця, конус осідає на дно колби.

Для мікроскопічного дослідження готують мазок шматочка фільтрувального паперу, що розклався, фарбують його фуксином і розглядають з імерсією.

В полі зору можуть бути фрагменти грибів та їх спори, бактерії – довгі, злегка зігнуті із загостреними кінцями палички (представники роду *Cytophaga*); короткі зігнуті палички – целюлолітичний вібріон (представники роду *Cellvibrio*) та ін.

2. У чашках Петрі. Досліджуваний ґрунт, зволожений до повної вологоємності, вносять в стерильну чашку Петрі й злегка втрамбовують його шпателем. Зверху кладуть кружок стерильного фільтрувального паперу і шпателем притискають його до ґрунту.

Чашки поміщають у вологу камеру й інкубують за температури 25-270 С протягом 5-10-ти діб. На поверхні паперу з'являються пігментовані зони, які свідчать про руйнування клітковини.

Для дослідження беруть шматочок паперу, що розкладається, переносять його в краплю води на предметному склі і розривають на окремі волокна. Препарат покривають покривним склом і досліджують з об'єктивом х40, а при необхідності переходять на імерсійний об'єктив.

Можна готувати фіксований і фарбований фуксином препарат, який розглядають з імерсією.

Прилади та матеріали: фарфорові ступки з вінчиками, шпателі для відбору зразків ґрунту, ваги, стерильні колби (об'ємом 150-200 мл), стерильні чашки Петрі, фільтрувальний папір, середовище Гетчинсона, предметні скельця, фуксин, світлопольні мікроскопи.

Питання для самоконтролю

1. В чому особливість виявлення *Clostridium pasteurianum* ?
2. Які реактиви використовуються для якісного виявлення масляної кислоти?
3. Який рід бактерій найчастіше виявляють при анаеробній деструкції клітковини?
4. В чому полягає основний принцип виявлення аеробних деструкторів клітковини?
5. Які аеробні представники є найбільш активними деструкторами клітковини?

Сільськогосподарська мікробіологія. Сергійчук Т.М., Юмиченко О.М.

5. МЕТОДИ БЕЗПОСЕРЕДНЬОГО СПОСТЕРЕЖЕННЯ ЗА МІКРОБІОТОЮ ҐРУНТУ

Ці методи розроблені переважно М.Г.Холодним, який поклав в основу своїх досліджень екологічний принцип: культивувати і вивчати ґрунтові мікроорганізми в умовах, найбільш близьких до природних. Він запропонував низку методів, які успішно використовуються в мікробіологічній практиці при дослідженні ґрунтових мікроорганізмів: метод скелець (пластинок) обростання, ґрунтових камер, пророщування ґрунтового пилу.

5.1. Метод скелець обростання

Хід роботи

Метод був запропонований М.Г.Холодним і полягає в тому, що у ґрунті роблять вертикальний розріз і в нього вставляють чисте, гарно знежирене предметне скло. Упродовж короткого часу поверхня скла вкривається ґрунтовим розчином, до скла прилипають тверді грудочки – починається розвиток мікроорганізмів, які живляться за рахунок поживних речовин ґрунту і обростають скло.

Через певний проміжок часу (від 3-х до 14-ти діб) скло обережно виймають із ґрунту, щоб не ушкодити біоплівку з мікроорганізмами. Препарат висушують, фіксують, відмивають від часточок ґрунту і фарбують карболовим еритрозином (або обробляють акридиновим помаранчевим у розведенні 1:10 000 для люмінесцентної мікроскопії). При мікроскопії звертають увагу на різноманіття мікробного угруповання і щільність обростання ним скла.

Прилади та матеріали: посуд (широкі стакани) зі зразками ґрунту), предметні скельця, пінцети, карболовий еритрозин, акридиновий помаранчевий, світлопольний мікроскоп, люмінесцентний мікроскоп.

5.2. Метод ґрунтових камер

Хід роботи

Цей метод передбачає, що на поверхні предметного скла формується ґрунтова пластинка (18x18 см) завтовшки 1-2 мм. В центрі пластинки роблять „вікно” діаметром до 4 мм, видавивши ґрунт. Пластинку покривають стерильним, добре знежиреним покривним склом і, таким чином, утворюється невелика камера, наповнена повітрям і обмежена

ґрунтом. Такий препарат поміщають в ексикатор із водою (волога камера) й інкубують при 25-30⁰ С протягом 3-5 діб. У процесі інкубування мікроорганізми розвиваються як всередині камери, так і на покривному скельці. Такі препарати можна розглядати *in vivo*, спостерігаючи за ростом, розмноженням та відмиранням мікробних клітин. Препарати на покривному скельці можна також фіксувати, фарбувати і розглядати з імерсією.

Поміщуючи камери в різні умови, змінюючи температуру, освітлення, вологість, склад повітря, можна вивчати вплив цих факторів на мікроорганізми досліджуваного ґрунту.

Прилади та матеріали: чашка Петрі з ґрунтом, ексикатор, покривні скельця, пінцети, карболовий еритрозин, акрединовий помаранчевий, світлопольний мікроскоп, люмінесцентний мікроскоп.

5.3. Метод пророщування ґрунтового пилу

Хід роботи

Для цієї роботи ґрунт висушують при кімнатній температурі до повітряно-сухого стану. Стерильні покривні скельця протягом декількох секунд краще потримати над парою гарячої води – це забезпечує краще прилипання ґрунтових пилинок до скла. Пил наносять на покривне скла діаметром 6-7 мм і накладають напиленням донизу над лункою предметного скла. Попередньо в лунку вносять краплю стерильної води, це створює умови вологої камери. Перед тим як накласти покривне скельце над лункою її краї змазують вазеліновою олією, що забезпечує герметичність вологої камери.

Препарат інкубують при 25-30⁰ С. Препарат можна досліджувати *in vivo*, спостерігаючи в динаміці розвиток ґрунтових мікроорганізмів. Через 1-2 доби навколо ґрунтових пилинок спостерігається розвиток окремих клітин, через 3-5 діб можна помітити формування колоній бактерій, а також міцелій грибів та актиноміцетів.

Прилади та матеріали: покривні скельця, предметні скельця з лунками, пінцети, вазелінова олія, карболовий еритрозин, акрединовий помаранчевий, світлопольний мікроскоп, люмінесцентний мікроскоп.

Результати досліджень підсумовують і заносять до табл. 18.

Таблиця 18

Аналіз мікробіоти ґрунту (кількість на 1 г а.с.ґ.)

Загальна кількість	Спороутворювальні бактерії	Гриби	Актиноміцети	Діазотрофи		Нітрифікатори	Денітрифікатори
				аеробні	анаеробні		

Отримані результати обговорюють у групі і роблять висновки щодо характеру мікрофлори досліджуваних проб ґрунту.

5.4 Вивчення морфології бульбочкових бактерій

У процесі еволюції деякі прокаріоти набули здатності фіксувати молекулярний азот при симбіотичних відносинах із бобовими рослинами. Ці бактерії виявляються, перш за все, в бульбочках цих рослин, але вони можуть існувати тривалий час як сапрофіти у зоні ризосфери. Вони здатні розмножуватися у ґрунті за рахунок поживних речовин, що виділяються кореневою системою рослин, в тому числі і небобових.

Морфологічно виявляються паличкоподібні клітини, коки, а також великі, сильно роздуті, колбо-, грушоподібні або видовжені гіллясті клітини, які називають бактероїдами. Вважається, що саме у такій формі бульбочкові бактерії найбільш енергійно фіксують азот атмосфери.

Хід роботи

Для виділення бульбочкових бактерій в чистій культурі роблять висів вмісту свіжої бульбочки на спеціальне середовище (див. додаток). З цією метою беруть корінь із добре розвинутими бульбочками. Бульбочку відрізають, промивають у воді, потім поміщають на 5 хв в 0,1%-й розчин сулеми, промивають водою і спиртом. Залишки спирту видаляють стерильним фільтрувальним папером та спалюванням.

Стерильним пінцетом бульбочку переносять в стерильну чашку Петрі і розрізають на дрібненькі шматочки.

Стерильною петлею шматочок бульбочки вносять у пробірку з розплавленим та охолодженим до 40-45⁰ С середовищем. Середовище із вмістом бульбочки ретельно перемішують і виливають в стерильну чашку Петрі. Посіви інкубують за температури 25⁰ С протягом 2-3-х діб. На середовищі виростають колонії, описують їх морфологію та готують фарбовані препарати, які розглядають з імерсією.

Для вивчення бактерій, які містяться в бульбочці, роблять гістозріз або мазки.

Для виготовлення гістозрізу роблять зріз ботанічною бритвою або мікротомом. Зріз поміщають в краплю води на предметному склі, покривають покривним склом і розглядають під мікроскопом спочатку при малому збільшенні, а потім переводять на об'єктив із збільшенням $\times 60$ або $\times 100$. Препарат можна дофарбувати розбавленим розчином метиленової синьки.

Для виготовлення фарбованого препарату оброблену бульбочку розрізають, вміст бульбочки видавлюють на предметне скло, готують фіксований і фарбований препарат, який розглядають з імерсією.

Прилади та матеріали: коріння рослин бобової рослини (сої, гороху, люпину тощо), 0,1% розчин сулеми (HgCl_2), спирт, стерильні чашки Петрі, пінцети, ексикатор, скальпелі, поживне середовище для бульбочкових бактерій, ботанічна бритва або мікротом, предметні скельця покривні скельця, світлопольний мікроскоп.

Питання для самоконтролю

1. Які основні методи безпосереднього спостереження за розвитком ґрунтової мікробіоти Ви використовували?
2. На чому базуються основні методи безпосереднього спостереження за ґрунтовою мікробіотою?
3. Які рослини і які їх частини можуть бути використані для виявлення бульбочкових бактерій?
4. Який вигляд мають бульбочкові бактерії виявлені з гістозрізу бульбочки?

ДОДАТКИ

Реактиви

Грісса Реактив:

а) 0,5 г сульфанілової кислоти розчиняють в 150 мл 12%-ї оцтової кислоти;

б) 0,1 г нафтиламіну розчиняють в 20 мл води і додають 150 мл 12%-ї оцтової кислоти.

Розчини об'єднують.

Люголя розчин для виявлення гранульози:

- кристалічний йод – 1 г;
- йодид калію – 2 г;
- вода дистильована – 100 мл.

Метиленовий синій (насичений спиртовий розчин):

- метиленовий синій – 10 г;
- спирт етиловий 96⁰-й – 100 мл.

Розчин залишають при кімнатній температурі на три доби, періодично перемішуючи. Потім фільтрують через паперовий фільтр і зберігають у склянках з притертим корком. Для фарбування препаратів використовують метиленовий синій, розведений дистильованою водою 1:40.

Метиленовий синій за Леффлером:

- метиленовий синій (насичений спиртовий розчин) – 30 мл;
- водний розчин NaOH або KOH 1 %-й – 1 мл;
- вода дистильована – 100 мл.

Цинк-йод-крохмалю реактив. 4 г крохмалю розтирають у фарфоровій ступці з невеликою кількістю води. У 100 мл дистильованої води вносять 20 г хлористого цинку при підігріванні. До розчину хлористого цинку, що кипить, доливають суспензію крохмалю. Суміш кип'ятять до просвітлення, прибавляючи дистильовану воду до початкового об'єму. До прозорої суміші додають 2 г сухого йодистого цинку, доливають дистильованої води до 1 л і фільтрують. Реактив зберігають у темному посуді з притертою пробкою.

Фуксин водний розчин (синоніми: фуксин Пфейффера, фуксин розбавлений, фуксин основний – водний розчин):

- карболовий фуксин Ціля – 10 мл;
- вода дистильована – 90 мл.

Водний розчин фуксину нестійкий, його можна зберігати не більше 10 діб. Краще користуватися свіже виготовленим розчином.

Фуксин основний карболовий (фуксин Ціля):

- фуксин основний, спиртовий розчин, насичений – 10 мл;
- карболова кислота (фенол) – 5 г;
- вода дистильована 95 мл.

Карболову кислоту краще розчиняти у підігрітій до 50⁰ С воді. Приготовлену суміш залишають у термостаті на 2 доби при 37⁰ С, потім фільтрують через паперовий фільтр. Можна зберігати тривалий час у темній склянці з притертою пробкою.

Фуксин основний (насичений спиртовий розчин):

- фуксин основний кристалічний – 10 г;
- спирт етиловий 96⁰-й – 90 мл.

Розчин зберігають у пляшці з темного скла з притертим .

С е р е д о в и щ а

Виноградського середовище для анаеробних азотфіксаторів *Clostridium pasteurianum* (г/л дистильованої води):

- глюкоза.....20,0
- K₂HPO₄.....1,0
- MgSO₄.....0,5
- NaCl.....сліди
- FeSO₄.....сліди
- MnSO₄.....сліди

Середовище розливають по 10-12 мл у високі пробірки, додають крейду і стерилізують при 0,5 атм протягом 20 хв.

Виноградського середовище для виявлення нітрифікуючих бактерій (г/л водопровідної води):

- (NH₄)₂SO₄.....2,0
- K₂HPO₄.....1,0
- MgSO₄.....0,5
- NaCl.....2,0
- FeSO₄·7H₂O.....0,4
- CaSO₄ (або K₂SO₄).....1,0

Гетчинсона середовище для виділення аеробних деструкторів целюлози (г/л дистильованої води):

- K₂HPO₄.....1,0
- CaCl₂·6H₂O.....0,1
- MgSO₄·7H₂O.....0,3
- NaCl.....0,1
- FeCl₃·7H₂O.....0,01
- NaNO₃.....2,5
- рН 7,2-7,3

Гільтая середовище (г/л):

1-й розчин:

- KNO_32,0
- аспарагін.....1,0
- вода дистильована250 мл

2-й розчин:

- Na-лимоннокислий 3-заміщений.....5,0
- K_2HPO_42,0
- MgSO_42,0
- FeCl_2сліди
- вода дистильована500 мл

Обидва розчини зливають разом і доводять об'єм до 10000 мл. Середовище розливають по 10-15 мл у високі пробірки з поплавками, стерилізують при 0,75 атм протягом 20 хв.

Ґрунтовий агар (ГА):

- вода водопровідна – 800 мл;
- Ґрунтовий екстракт – 200 мл
- CaCO_3 – 1,0 г
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05 г
- $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,05 г
- K_2HPO_4 - 1,0 г
- глюкоза – 1,5 г
- агар – 15,0 г
- рН -7,0-7,2
- Стерилізують при 0,75 атм протягом 15-20 хв

Ґрунтовий екстракт:

500 г багатого гумусом ґрунту суспендують в 1 000 мл дистильованої води, автоклавують при 1 атм протягом 1 год, фільтрують через паперовий фільтр і повторно стерилізують. Отриманий екстракт зберігають у холодильнику.

Ешбі середовище (г/л водопровідної води):

- маніт (або глюкоза).....20,0 г
- K_2HPO_40,2 г
- MgSO_40,2 г
- NaCl0,2 г
- K_2SO_40,1 г
- FeSO_4сліди
- CaCO_35,0 г

Крохмально-аміачний агар (г/л дистильованої води) :

- крохмаль – 10,0
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0
- K_2HPO_4 -1,0
- MgSO_4 – 1,0
- NaCl – 1,0
- CaCO_3 – 3,0
- агар – 20,0
- Крохмаль попередньо розмішують у невеликій кількості холодної води і

доливають до основи поживного середовища. Стерилізують при 0,75 атм протягом 15-20 хв.

Омелянського середовище для виявлення анаеробних деструкторів клітковини:

- м'ясо-пептонний бульйон.....300 мл
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$1,0 г
- K_2HPO_41,0 г
- MgSO_40,5 г
- NaCl0,1 г
- CaCO_32,0 г
- FeSO_42 краплі
1%-го розчину

Середовище стерилізують при 1 атм протягом 30 хв.

Середовище для виділення бульбочкових бактерій:

- бобовий бульйон (із 100 г гороху).....1000 мл
- маніт (або сахароза).....10 г
- KH_2PO_41,0 г
- агар.....15 г

Таблиця Мак-Креді

Числова характеристика	Вірогідне число при паралельних пробірках у кількості			Числова характеристика	Вірогідне число при паралельних пробірках у кількості		
	3	4	5		3	4	5
000	0,0	0,0	0,0	100	0,4	0,3	0,2
001	0,3	0,2	0,2	101	0,7	0,5	0,4
002	-	0,5	0,4	102	1,1	0,8	0,6
003	-	0,7	0	103	-	1,0	0,8
010	0,3	0,2	0,2	110	0,7	0,5	0,4
011	0,6	0,5	0,4	111	1,1	0,8	0,6
012	-	0,7	0,6	112	-	1,1	0,8
013	-	0,9	-	113	-	1,3	-
020	0,6	0,5	0,4	120	1,1	0,8	0,6
021	-	0,7	0,6	121	1,5	1,1	0,8
022	-	0,9	-	122	-	1,3	1,0
030	-	0,7	0,6	123	-	1,6	-
031	-	0,9	-	130	1,6	1,1	0,8
040	-	0,9	-	131	-	1,4	1,0
041	-	1,2	-	132	-	1,6	-
140	-	1,4	1,1	423	17,0	-	-
141	-	1,7	-	424	20,0	-	-
200	0,9	0,6	0,5	430	11,5	2,5	-
201	1,4	0,9	0,7	431	16,5	3,0	-
202	2,0	1,2	0,9	432	20,0	4,0	-

203	-	1,6	1,2	433	30,0	-	-
210	1,5	0,9	0,7	434	35,0	-	-
211	2,0	1,3	0,9	440	25,0	3,5	-
212	3,0	1,6	1,2	441	40,0	4,0	-
213	-	2,0	-	442	-	70,0	-
220	2,0	1,3	0,9	443	-	140,0	-
221	3,0	1,6	1,2	444	-	160,0	-
222	3,5	2,0	1,4	450	-	-	4,0
223	4,0	-	-	451	-	-	5,0
230	3,0	1,7	1,2	500	-	-	2,0
231	3,5	2,0	1,4	501	-	-	3,0
232	4,0	-	-	502	-	-	4,0
240	-	2,0	1,4	503	-	-	6,0
241	-	3,0	-	504	-	-	7,5
300	2,5	1,1	0,8	510	-	-	3,5
301	4,0	1,6	1,1	511	-	-	4,5
302	6,5	2,0	1,4	512	-	-	6,0
303	-	2,5	-	513	-	-	8,5
310	4,5	1,6	1,1	520	-	-	5,0
311	7,5	2,0	1,4	521	-	-	7,0
312	11,5	3,0	1,7	522	-	-	9,5
313	16,0	3,5	2,0	523	-	-	12,0
320	9,5	2,0	1,4	524	-	-	15,0
321	15,0	3,0	1,7	525	-	-	17,5
322	20,0	3,5	2,0	530	-	-	8,0
323	30,0	-	-	531	-	-	11,0
330	25,0	3,0	1,7	532	-	-	14,0
331	45,0	3,5	2,0	533	-	-	17,5
332	110,0	4,0	-	534	-	-	20,0
333	140,0	5,0	-	535	-	-	25,0
340	-	3,5	2,0	540	-	-	13,0
341	4,5	2,5	-	541	-	-	17,0
350	-	2,5	-	542	-	-	25,0
400	2,5	1,3	-	543	-	-	30,0
401	3,5	1,7	-	544	-	-	35,0
402	5,0	2,0	-	545	-	-	45,0
403	7,0	2,5	-	550	-	-	25,0
410	3,5	1,7	-	551	-	-	35,0
411	5,5	2,0	-	552	-	-	60,0
412	8,0	2,5	-	553	-	-	90,0
413	11,0	-	-	554	-	-	100,0
414	14,0	-	-	555	-	-	180,0
420	6,0	2,0	-				
421	9,0	2,5	-				
422	13,0	3,0	-				

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреюк К.І., Іутинська Г.О., Антипчук А.Ф. та ін. Функціонування мікробних ценозів ґрунту в умовах антропогенного навантаження. К.:Обереги, 2001. – 240 с.
2. Варбанець Л.Д., Мацелюх О.В., Гудзенко О.В., Нідялкова Н.А., Зелена П.П., Юмина Ю.В., Степура Л.Г., Шепелевич В.В., Войчук С.І.. Скринінг продуцентів α -L-рамнозидаз і пептидаз серед представників актинобактерій та бацил. Мікробіологічний журнал - Т. 78, №3 - 2016. - С. 26-35.
3. Волкогон В., Надкернична О., Токмакова Л. та ін. Експериментальна ґрунтова мікробіологія. К., 2010. – 464 с.
4. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Білінська І.С. Мікробіологія: підручник. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2009. 360с.
5. Іутинська Г.О. Ґрунтова мікробіологія: Навчальний посібник. – К.: Арістей, 2006. 284 с.
6. Мацелюх О.В., Нідялкова Н.А., Варбанець Л.Д., Андреева Н.О., Шепелевич В.В., Зелена П.П., Юмина Ю.М.. Здатність мікроорганізмів різних екологічних ніш до гідролізу нерозчинних білків// Мікробіологічний журнал, 2015, Т. 77, №3, с. 16-22.
7. Мікробіологія. Том 1 (Том 2) : підручник/ Сергійчук М.Г., Сківка Л.М., Сергійчук Т.М. та ін. – К. :ФОП Маслаков, 2020. – 500 с (348с.)
8. Нідялкова Н.А., Варбанець Л.Д., Шепелевич В.В., Зелена П.П., Юмина Ю.М., Гаркава К.Г., Трошина Л.О.. Протеаза *Streptomyces* sp.12: очищення і властивості.// Мікробіологічний журнал -Т. 79, №2 - 2017. - С. 33-47.
9. Панас Н.Є., Лисак Г.А., Іванків М.Я. Сільськогосподарська мікробіологія. Лабораторний практикум для студентів факультету агротехнологій та екології, що навчаються за ОПП «Агрономія». Львів, 2022. 99с.
10. Eldor A. Paul and Serita D. Frey. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry – Book, Fifth Edition, 2023. - 608 p.
11. Hill G.T, Mitkowski N.A., Aldrich-Wolfe L. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. Applied Soil Ecology Volume 15, Issue 1, 2000, Pages 25-36
12. Jan Dirk van Elsas, Jack T. Trevors, Alexandre Soares Rosado, Paolo Nannipieri. Modern Soil Microbiology, Third Edition, 2021 by CRC Press – 500 p.
13. Laurent Philippot, Karl Ritz, Pascal Pandard, Sara Hallin, Fabrice Martin-Laurent, Standardisation of methods in soil microbiology: progress and challenges, *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 82, Issue 1, October 2012, Pages 1–10, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01436.x>

14. Römbke J, Bernard J, Martin-Laurent F. Standard methods for the assessment of structural and functional diversity of soil organisms: A review. *Integr Environ Assess Manag*. 2018 Jul;14(4):463-479. doi: 10.1002/ieam.4046. Epub 2018 May 16. PMID: 29603577.
15. Serhiichuk T, Aleksandrova I, Korbush M, et al. Nigella sativa oil of «diana» sort in the therapy of antibiotics simulated dysbiosis. *J Microbiol Exp*. 2022;10(6):195–200. DOI: 10.15406/jmen.2022.10.00373

Сільськогосподарська мікробіологія. Сергійчук Т.М., Юмина Ю.М.

Навчальне видання

Тетяна Михайлівна Сергійчук
Юлія Михайлівна Юміна

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ЛАБОРАТОРНОГО ПРАКТИКУМУ
«СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКА МІКРОБІОЛОГІЯ»

Сільськогосподарська мікробіологія. Сергійчук Т.М., Юміна Ю.М.