Микробиологическое исследование комплексных образцов.

1. Выявление микроорганизмов-аммонификаторов, использующих органические формы азота

Типичные аммонификаторы выявляют посевом из соответствующего разведения (четыре— пять) на мясо-пептонном агаре (МПА) или мясо-пептонном бульоне (МПБ). Численность аммонификаторов определяют методом предельных разведений на плотной питательной среде. Учет проводят на третьи— пятые—седьмые сутки.

**В целях более точной оценки аммонифицирующей активности бактерий анализируют выделение аммиака (NH3) в мясо-пептонном бульоне с помощью реактива Несслера.**

Бактерии, способные к аммонификации мочевины, — уробактерии, выявляют по выделению аммиака на средах, содержащих мочевину (среде Федорова, среде Зенгена).

1. Выявление микроорганизмов, использующих минеральные формы азота

Бактерии и актиномицеты выявляют на крахмало-аммиачном агаре (КАА). Посев проводят из четвертого— пятого разведений по 0,05 см3 на поверхность среды. Инкубируют в термостате при температуре 28 °С, на четвертые— пятые сутки подсчитывают только бактериальные колонии, а на седьмые—десятые подсчитывают актиномицеты. Отмечают окраску колоний (желтый, розовый, черный), воздушного мицелия (серый, белый, желтовато-серый, розовый) и среды (выделение пигмента в субстрат).

1. Выявление целлюлозоразрушающих микроорганизмов. Аэробные целлюлозоразрушающие микроорганизмы хорошо выявляются на среде Гетчинсона. На застывшую среду в чашки Петри помещают стерильный обеззоленный фильтр, засевают суспензию по 1 см3 из третьего—четвертого разведения, растирают стерильным шпателем. Инкубируют в термостате при температуре 28 °С. Учет проводят на десятые сутки.
2. Выявление нитрифицирующих бактерий. Первую и вторую фазы нитрификации можно наблюдать в жидких средах Виноградского
3. Выявление денитрифицирующих бактерий. Среду Березовой наливают высоким слоем в пробирки вместимостью 20—25 см3 и стерилизуют при давлении 101,3 кПа в течение 20 мин. Стерильную среду засевают из третьего-восьмого разведений, инкубируют в течение семи дней при температуре 25 °С - 30 °С. Среда в пробирках синеет, образуются пузырьки газов, от развившихся бактерий мутнеет. Численность денитрифицирующих бактерий определяют методом предельных разведений. Наблюдения проводят на третьи-пятые-седьмые сутки. Среда в пробирках синеет, образуются пузырьки газов, от развившихся бактерий мутнеет.
4. Выявление азотфиксирующих микроорганизмов. Для определения количества клеток аэробного азотофиксатора — Azotobacter chroococcum применяют метод предельного разведения, используя жидкую среду Бейеринка. Для учета Cl. pasteurianum используют синтетическую безазотистую среду. Наблюдения ведут по газообразованию на третьи— пятые—седьмые сутки.
5. Выявление фосфатмобилизирующих бактерий. Проводят на среде Питковской. **В целях более точной оценки фосфатмобилизирующей активности бактерий анализируют выделение свободного фосфат-иона с помощью молибденовой сини.**
6. Выявление продуцентов сидерофоров. На CAS-агаре или количественная оценка продукции сидерофоров на пептонной воде.

Выявление ДНК и РНК, характерных для определённых видов микроорганизмов (ПЦР диагностика). Необходимо указание интересующего вида или рода бактерий (например: род Lactococcus).

1. Качественное определение наличия ДНК определенных родов микроорганизмов в образце.
2. Количественная оценка наличия ДНК определенных родов микроорганизмов в образце. В данном исследовании возможно сравнение двух и более образцов на содержание ДНК микроорганизмов.

Исследование индивидуальных штаммов.

1. Получение чистой культуры, окраска по Граму.
2. Определение видовой принадлежности секвенированием 16s-rDNA.
3. Продукция ауксина. Отдельные штаммы, количественная оценка продукции ауксина на пептонной воде с добавлением триптофана (реактив Сальковского).
4. Оценка фосфатмобилизирующей активности бактерий – оценка высвобождения свободного фосфат-иона из нерастворимых фосфатов с помощью молибденовой сини.
5. Оценка продукции сидерофоров на пептонной воде.
6. Продукция аммиака.
7. Оценка наличия протеолитической активности.
8. Оценка чувствительности к антибиотикам.