

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
АКАДЕМИЯ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ ИМ. Д.И. ИВАНОВСКОГО

**ПОЛЯКОВА А.В., ИЛЮШКИНА Л.Н.,
ХАРХУН Е.В., ГОРОВЦОВ А.В.**

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

приложение к фонду оценочных средств

**для студентов дневного отделения Академии биологии и
биотехнологии им. Д.И. Ивановского
направление 060301 – Биология**

Ростов-на-Дону
2015

УДК 579.2

ББК 28.4

П54

Одобрено на заседании учебно-методической комиссии кафедры биохимии и микробиологии. Протокол №7 от 24 марта 2015 г.

Печатается по постановлению редакционной комиссии по биологическим наукам Академии биологии и биотехнологии ЮФУ им. Д.И. Ивановского

К.б.н., доцент кафедры биохимии и микробиологии Полякова А.В.

К.б.н., доцент кафедры биохимии и микробиологии Илюшкина Л.Н.

К.б.н., ассистент кафедры биохимии и микробиологии Хархун Е.В.

К.б.н., ассистент кафедры биохимии и микробиологии Горовцов А.В.

П54 Учебно-методическое пособие для лабораторных работ по микробиологии для студентов дневного отделения Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского / Полякова А.В., Илюшкина Л.Н., Хархун Е.В., Горовцов А.В. ; Южный федеральный университет. – Ростов-на-Дону : Издательство Южного федерального университета, 2015. – 74 с.

ISBN 978-5-9275-1800-5

Методические указания предназначены для проведения лабораторных работ по общему курсу «Микробиология». Для студентов дневной формы обучения направления 060301-биология.

Публикуется в авторской редакции.

ISBN 978-5-9275-1800-5

УДК 579.2

ББК 28.4

©Полякова А.В., Илюшкина Л.Н., Хархун Е.В., Горовцов А.В., 2015

© Южный федеральный университет, 2015

ВВЕДЕНИЕ

Практикум является руководством к практическим занятиям по микробиологии. В нем изложены правила работы в микробиологической лаборатории и правила работы с культурами микроорганизмов, основные методы микроскопического исследования, способы получения накопительных и чистых культур микроорганизмов. Большой раздел посвящен описанию методов стерилизации и классификациям питательных сред. Приведены конкретные примеры дифференциально-диагностических и элективных сред, режимы методов термической стерилизации. Большое внимание уделено методам посева (штрихом, уколом, поверхностным и глубинным способом) и количественного учета микроорганизмов из разных сред обитания (воздуха, почвы, воды) с дальнейшей идентификацией выделенных чистых культур по основным фенотипическим признакам (окраска по Граму, отношение к кислороду, особенности культуральных свойств и т.д.). Один из разделов посвящен изучению действия факторов среды на микроорганизмы, среди которых температура, ультрафиолетовые лучи, антибиотики. Основная часть практикума посвящена изучению возбудителей различных процессов: спиртового, молочнокислого и уксуснокислого брожений, разложению целлюлозы и пектинов. Не менее важен раздел, посвященный изучению круговорота углерода и азота, где студенты смогут познакомиться с основными представителями аммонифицирующих, нитрифицирующих, денитрифицирующих, азотфиксирующих микроорганизмов. В целом, предложенные для освоения методы и задания позволят познакомиться с представителями микромира, с их морфологией, физиолого-биохимическими свойствами и основными методами работы и изучения данной группы живых существ.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1. СТРОЕНИЕ ПРОКАРИОТ

План лабораторной работы.

1. Инструктаж об охране труда, технике безопасности и правилах работы с культурами микроорганизмов.
2. Устройство микроскопа. Виды микроскопии. Порядок работы с микроскопом.
3. Живые препараты. Техника приготовления препаратов "раздавленная капля", "висячая капля" и "отпечаток".
4. Приготовление препарата "раздавленная капля" из настоя гороха.
5. Приготовление препарата "раздавленная капля" из настоя картофеля.
6. Приготовление препарата "отпечаток" культуры плесневого гриба.
7. Приготовление препарата "отпечаток" культуры актиномицета.

Методические указания к лабораторной работе №1

Техника безопасности в микробиологической лаборатории

При работе в микробиологической лаборатории необходимо соблюдать определенные правила поведения. Занятие начинают со знакомства с инструкцией по технике безопасности.

Микробиологическую лабораторию содержат в чистоте, ежедневно проводят гигиеническую уборку, работают в белых халатах, шапочках, не принимают пищу. Входить в лабораторию в головных уборах и верхней одежде, ставить на стол посторонние предметы (портфели, сумки) запрещается!

Помещения проветривают 30-60 минут, облучают ультрафиолетовыми лампами типа БУВ-30, БУВ-60; кварцевыми лампами типа ГОРК (30-40 минут), а также обрабатывают 2-3 % раствором соды, 3-5% фенолом (карболовая кислота), лизолом (фенол + зеленое мыло), 0,5-3% хлорамином, 70% спиртом. Дезинфекцию стола проводят до и после окончания опыта, руки тщательно моют с мылом до и после работы в лаборатории.

Микроорганизмы в лабораторных условиях выращивают в пробирках, колбах, чашках Петри, для пересева культур с одной среды на другую или приготовления препарата микроорганизмов пользуются микробиологической петлей. До работы петлю обжигают в пламени горелки,

чтобы уничтожить все микроорганизмы, которые могли осесть из воздуха. По окончании опыта петлю повторно прокаливают. Приготавливая препарат или производя пересев культур микроорганизмов, выросших в жидкой среде, пользуются не петлей, а пипеткой, в верхний конец которой должен быть вложен кусочек ваты, чтобы не допустить случайного соприкосновения микробного материала с полостью рта. По окончании опыта инструменты переносят в дезинфицирующий раствор. Приготовление препаратов, пересевы культур микроорганизмов проводят около пламени горелки по возможности быстро. На всех пробирках и чашках обязательно пишется название микроорганизма, дата его посева, фамилия студента, номер группы. В случае попадания исследуемого материала или культуры микроорганизмов на руки, стол, халат или обувь необходимо сообщить об этом преподавателю и под его руководством провести дезинфекцию.

Спички, фильтровальную бумагу, просмотренные препараты помещают в кристаллизатор. Отработанные чашки Петри, пробирки с посевами автоклавируют для уничтожения микроорганизмов, а затем моют. Все препараты готовят на специальных стеклянных мостиках над кристаллизатором. Помещения боксов дезинфицируют бактерицидными лампами, стены и столы – дезинфицирующими растворами. В помещениях при работающей бактерицидной лампе находиться нельзя, включение и отключение ламп производят в защитных очках. Для предотвращения переутомления зрения при микроскопировании следует делать перерывы в работе. Результаты исследований протоколируются.

ХОД РАБОТЫ:

1. Изучить инструкции по технике безопасности для студентов, работающих в лаборатории микробиологии, правила работы при выполнении микробиологического практикума.
2. Познакомиться с оборудованием микробиологической лаборатории.

Микроскоп. Основные правила микроскопирования.

Микроскопические методы изучения микроорганизмов

Изучение морфологии и строения клеток микроорганизмов, измеряемых микрометрами, нанометрами и ангстремами ($1 \text{ мм} = 1000 \text{ мкм}$; 1

мкм = 1000 нм; 1 нм = 10^{-9} м) возможно только с помощью микроскопа. Наиболее распространенными моделями световых микроскопов являются микроскопы МБИ – 1, МБР – 1 и серии БИОЛАМ 70: Р (рабочий), С (студенческий), Д (дорожный). Микроскопы могут быть моно- и бинокулярными, в последнем случае используется насадка АУ-12, предназначенная для наблюдения объекта одновременно двумя глазами.

Микроскоп состоит из механической и оптической частей. К механической части относят: штатив, предметный столик, тубус, тубусодержатель, револьвер, макро- и микрометрические винты. Верхняя часть штатива - тубусодержатель - может перемещаться на 50 мм с помощью механизма, приводимого в действие вращением макрометрического и микрометрического винтов, предназначенных для грубой и тонкой фокусировки препарата. При вращении этих винтов по часовой стрелке тубусодержатель микроскопа опускается, при вращении против часовой стрелки - поднимается. В верхней части тубусодержателя находится револьвер, в отверстия которого ввинчиваются объективы и тубус.

Оптическая часть микроскопа состоит из окуляра, объектива, осветительного аппарата. Окуляр служит для рассмотрения изображения объекта, увеличенного с помощью объектива, и содержит две линзы: глазную (верхнюю) и собирающую (нижнюю). Окуляры могут давать увеличение в 5, 7, 10, 12, 15 и 20 раз, что указано на их оправе.

Объективы – наиболее важная часть микроскопа, состоят из системы линз. Собственное увеличение объективов – 8, 10, 20, 40, 90, 100 раз. Увеличение объектива зависит от фокусного расстояния фронтальной линзы и, следовательно, от ее кривизны. Чем больше увеличение объектива, тем ниже следует его опускать над плоскостью препарата. При 8× объективе рабочее расстояние (расстояние между фронтальной линзой объектива и исследуемым объектом) равно 8,53 мм; при 40× объективе – 0,4 мм; при 90× – 0,1 мм.

Объективы могут быть простыми (ахроматами) и сложными (апохроматами и планахроматами). Изображение, получаемое с помощью линз объективов, обладает рядом недостатков – аберраций. Наиболее существенные - сферическая (каждая точка объекта имеет вид кружочка, а не

точки, изображение не резкое, размытое) и хроматическая (получаемое изображение приобретает окраску, которую не имеет объект) аберрации. Объективы, у которых аберрации скорректированы не полностью, называются ахроматами. Они содержат до шести линз и дают изображение наиболее резкое в центре. Более совершенные сложные объективы, они состоят из 10, иногда 12 линз. Хроматическая погрешность у апохроматов почти в 10 раз меньше, чем у ахроматов. Кроме того, в них достигнута более равномерная резкость изображения. Планахроматы полностью устраняют кривизну поля зрения, их целесообразно использовать при микрофотографировании.

Осветительный аппарат состоит из зеркала и конденсора с диафрагмой. Зеркало двустороннее, при дневном свете пользуются плоской его стороной, при искусственном – вогнутой. Конденсор, состоящий из нескольких линз, собирает отраженный от зеркала свет в пучок, направляемый непосредственно на плоскость препарата. Под конденсором имеется ирисовая диафрагма и откидная оправа для светофильтра. Ирисовая диафрагма служит для задержания лишних лучей света и позволяет при необходимости уменьшить апертуру конденсора (апертура - это “охват” линзы, она характеризуется количеством лучей, попадающих в линзу). При искусственном освещении яркость поля зрения достигается изменением степени накала лампы осветителя или применением светофильтров, устанавливаемых в кольцо под конденсором или на осветитель. Осветители для микроскопов МБИ-1, МБР-1 типа ОИ-19, для микроскопов БИОЛАМ – типа ОИ-32, ОИ-35.

Общее увеличение микроскопа складывается из произведения увеличения объектива и увеличения окуляра. Монокуляр МБИ-1 имеет увеличение 1350 раз (15×90). Бинокуляры имеют дополнительное увеличение насадки ($15 \times 90 \times 1,5$) – 2025 раз.

Однако общее увеличение еще не характеризует всех возможностей микроскопа. Увеличенное изображение может оказаться как четким, так и нечетким. Отчетливость получаемого изображения определяется разрешающей способностью микроскопа - минимальным расстоянием между двумя точками, когда они еще не сливаются в одну. Чем больше

разрешающая способность микроскопа, тем меньшей величины объект можно увидеть. Повысить ее можно двумя путями: либо освещая объект короткими лучами света, например УФ, либо увеличивая показатель преломления среды (n), граничащей с линзой, с тем, чтобы приблизить его к показателю преломления стекла, на котором находится объект (n стекла = 1,5). В целом микроскопический объект может рассматриваться в трех типах системы: сухой - между линзой объектива и объектом находится воздух ($n = 1$); водной - между линзой объектива и объектом находится капля воды ($n = 1,3$) - водная иммерсия; масляной - линза объектива погружается в каплю иммерсионного масла - кедрового, касторового, вазелинового ($n = 1,52$) - масляная иммерсия.

Для успешной работы нужно соблюдать *основные правила микроскопирования*. При микроскопии в дневное время можно пользоваться естественным светом, однако чаще прибегают к источникам искусственного света, которые обеспечивают интенсивное регулируемое освещение (осветители типа ОИ-19, ОИ-35).

При установке света конденсор должен быть поднят до упора, ирисовая диафрагма открыта; настройка освещения производится с объективом малого увеличения ($8\times$). Объектив опускают на расстояние около 0,5 см от предметного столика и, вращая зеркало, добиваются равномерного и яркого освещения всего поля зрения.

Препарат помещают на предметный столик и укрепляют клеммами. При этом рассматриваемый объект должен быть на поверхности предметного стекла, обращенной к объективу. Вначале препарат исследуют с объективом $8\times$, который опускают с помощью макровинта на расстояние около 0,5 см от препарата. Глядя в окуляр, медленными вращениями макровинта против часовой стрелки получают изображение препарата. Точная фокусировка производится с помощью микрометрического винта, вращение которого допускается в пределах одного оборота. Для детального изучения препарата пользуются объективом $40\times$, осуществляя дофокусировку *микровинтом!* После просмотра препарата переводят револьвер на увеличение $8\times$ и *только после этого* снимают препарат с

предметного столика. Микроскоп в нерабочем состоянии должен находиться на увеличении $8\times!!!$

Микроскопические методы изучения микроорганизмов.

Светлопольная микроскопия позволяет исследовать объекты в проходящем свете.

Микроскопия *в темном поле* достигается с помощью специального конденсора (типа ОИ-13), которым заменяют обычный конденсор микроскопа. Метод основан на освещении объекта косыми лучами света, которые не попадают в объектив, и поэтому поле зрения выглядит черным. Микроорганизмы частично отражают лучи и становятся видимыми, даже если их диаметр намного меньше разрешающей способности объектива. Следовательно, микроскопия в темном поле позволяет увидеть объекты (рассмотреть их контуры), лежащие за пределами видимости обычного микроскопа.

Фазово-контрастная микроскопия позволяет изучать живые неокрашенные микроорганизмы, а при использовании дополнительных приспособлений к микроскопу – наблюдать и фотографировать размножение микробных клеток. Для проведения фазово-контрастной микроскопии используют обычный биологический микроскоп, в котором оптическую часть (объектив, окуляр, конденсор) заменяют специальным устройством (КФ-1, КФ-4), превращающим изменения световой волны по фазе (фазовые изменения возникают при прохождении световой волны через прозрачные объекты) в изменения по амплитуде, которые улавливаются глазом. В результате живые прозрачные объекты становятся контрастными, хорошо видимыми глазом.

Люминесцентная микроскопия основана на исследовании микроорганизмов в собственном свете, возникающем под действием ультрафиолетовых (длина волны 300-400 нм) или коротких синих лучей (длина волны 460 нм).

Изучение первичной (собственной) люминесценции микробов проводится редко, потому что свечение характеризуется малой интенсивностью и требует специальных приборов для регистрации; чаще используют вторичную или наведенную люминесценцию, которая возникает

после окраски препарата люминесцирующими красителями – флюорохромами. Этот метод обладает рядом преимуществ перед обычными – высокая контрастность изображения и, следовательно, возможность выявлять в исследуемом материале бактерии в небольших количествах. Отечественной промышленностью выпускаются люминесцентные микроскопы МЛ-1, МЛ-2, МИКМЕД 2, ЛЮМАМ (Санкт-Петербург) «Axioscop», «AxioStar» (Zeiss, Jena, Germany) и другие.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) позволяет наблюдать исследуемые объекты в их естественном состоянии, не подвергая обезвоживанию, и с разрешением не меньшим, чем это достигается при флуоресцентной микроскопии. Микроскоп незаменим при исследовании биопленок, выявлении пространственного расположения бактерий и грибов на поверхности растений и почвенных частиц, для анализа ненарушенной структуры объекта.

Электронная микроскопия при работе с биологическими объектами позволяет получать полезное увеличение объекта до 100 000 и более раз при разрешающей способности менее 0,15 нм. В микробиологии этим методом исследуют вирусы и тончайшие структуры микробной клетки. В электронном микроскопе изображение объекта достигается с помощью потока движущихся в вакууме электронов, источником которых является «электронная пушка». В качестве линз, фокусирующих электронный пучок на объекте, используется магнитное поле; роль предметного стекла выполняют проникаемые для электронов материалы (например, тонкая пленка коллодия или углерода). Изображение выявляется на флуоресцирующем экране или фотопластинке благодаря разной плотности деталей объекта для потока электронов.

ХОД РАБОТЫ:

1. Ознакомиться с устройством биологического микроскопа и правилами обращения с ним.

Знакомство с морфологией бактерий, актиномицетов, грибов.

Препараты «раздавленная капля», «висячая капля», «отпечаток»

Живые существа в соответствии со строением их ядерного аппарата делят на прокариоты и эукариоты. У прокариотов генетический аппарат и клеточные структуры не отделены специальными оболочками от цитоплазмы, у эукариотов ядро и органеллы обособлены от цитоплазмы мембранами. К прокариотам относятся бактерии, актиномицеты, спирохеты, риккетсии, цианобактерии (сине-зеленые водоросли). К эукариотам – дрожжи, плесневые грибы, простейшие.

Бактерии – наиболее обширная и разнообразная группа микроорганизмов. По внешнему виду их делят на шаровидные, палочковидные и извитые формы (рис. 1).

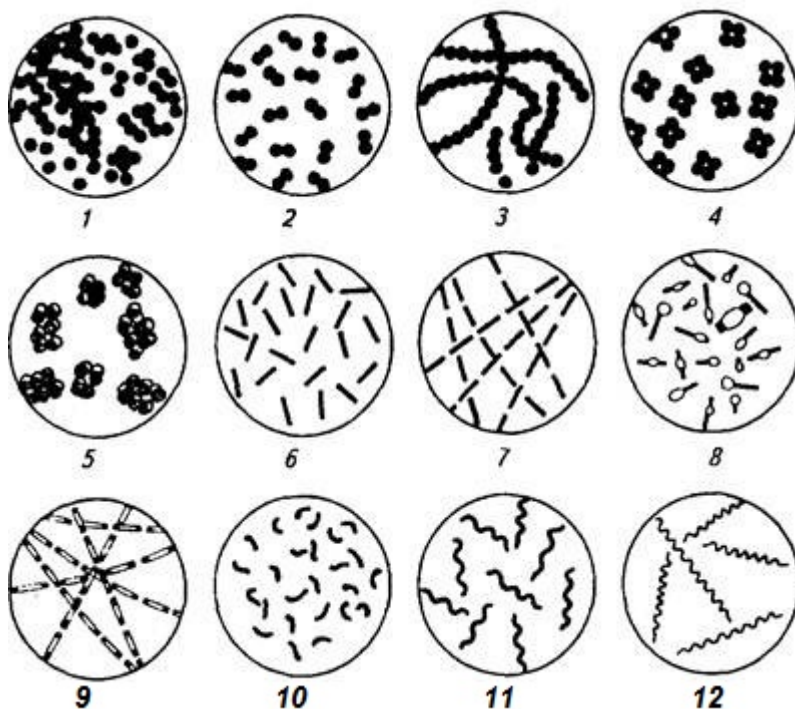


Рисунок 1. Основные формы микроорганизмов (схема): шаровидные: 1 - стафилококки, 2 - диплококки, 3 - стрептококки, 4 - тетракокки, 5 - сарцины; палочковидные: 6 - бактерии, 7 - стрептобактерии, 8 - бациллы, 9 - стрептобациллы; извитые: 10 - вибрионы, 11 - спириллы, 12 - спирохеты.

Шаровидные бактерии или *кокки* в зависимости от расположения отдельных клеток подразделяют на микрококки – одиночные клетки, диплококки, соединенные по два, стрептококки – соединенные в цепочки, тетракокки – соединенные по четыре, сарцины – кокки, соединенные в

правильные пакеты по 8 и более клеток, стафилококки – скопления клеток, напоминающие гроздь винограда. Кокки – самые мелкие бактерии, их диаметр составляет 1-2 мкм. Они в большинстве случаев не способны активно двигаться и не образуют спор.

Палочковидные бактерии цилиндрической формы, длиной от 2-5 до 10-12 мкм. Ширина клеток более стабильна и колеблется от 0,5 до 1 мкм. Палочки могут быть соединены попарно (диплобактерии) или в цепочки (стрептобактерии). Палочковидные бактерии, образующие споры, называют бациллами. Спорообразование у бактерий – способ перенесения неблагоприятных внешних воздействий. В клетке образуется только одна спора, она одевается многослойными оболочками. Различают три вида спорообразования: *бациллярный* – форма клетки не меняется, спора чаще формируется в центре; *кlostридиальный* – середина клетки расширяется, диаметр споры больше поперечника клетки, она приобретает вид веретена, спора располагается в центре; *плектридиальный* – клетка расширяется на одном конце, приобретая вид барабанной палочки или теннисной ракетки. Бациллы также могут быть соединены попарно (диплобациллы) или в цепочки (стрептобациллы). Среди палочковидных бактерий есть подвижные и неподвижные формы. Подвижные бактерии имеют жгутики, которые располагаются либо по всей поверхности клетки (перитрихи), либо на концах клетки в виде одиночного жгутика (монотрихи) или пучка жгутиков (лофотрихи), полярное расположение одиночных жгутиков – амфитрихи.

Извитые бактерии имеют цилиндрическую форму, изогнутую в различной степени. Извитые бактерии, у которых изгиб не превышает $1/3$ - $1/4$ оборота спирали, называют вибрионами (холерный вибрион). Бактерии, имеющие один или несколько правильных витков, называются спираллами. Формы, имеющие много витков, напоминающие штопор, называют спирохетами (например, бледная спирохета – возбудитель сифилиса).

Наряду с традиционными формами, некоторые бактерии имеют вид кольца (тороиды), бактерии, образующие выросты (простеки), в виде правильной шестиугольной звезды, в виде кусочков «битого стекла». Бактерии размножаются вегетативно – бинарным делением, а также у некоторых возможно почкование.

Актиномицеты (ветвящиеся бактерии) – прокариоты, имеющие сходство с бактериями и плесневыми грибами. Формируют мицелий, состоящий из тонких нитей гифов, не имеющих перегородок. Часть его погружена в питательную среду – субстратный мицелий, другая возвышается над ней – воздушный мицелий. На концах воздушного мицелия образуются спороносы, несущие споры-конидии. Актиномицеты размножаются спорами, а также фрагментами мицелия. Они широко распространены в природе, многие полезны для человека, так как образуют антибиотики (тетрациклин, биомицин, стрептомицин и др.). Современное название группы – актинобактерии.

Грибы – бесхлорофильные эукариоты. К ним относятся одноклеточные микроскопические организмы – *дрожжи*. Они бывают овальной, округлой и удлинённой формы, диаметр округлых форм колеблется от 4 до 12 мкм. Дрожжи рода *Saccharomyces* размножаются почкованием, растут на сахаристых субстратах. Некоторые виды (шизосахаромицеты) размножаются делением. Дрожжам свойственен половой процесс. Образование спор у дрожжей одновременно и процесс размножения и способ перенесения неблагоприятных внешних воздействий. В клетках образуется от 2 до 12 спор. Дрожжи широко используются в производстве спирта, в хлебопечении, в виноделии, пивоварении, производстве белково-витаминных концентратов (БВК).

Под названием «*плесневые грибы*» объединяют представителей различных классов грибов. На плотных средах плесени образуют пушистый паутинообразный налет различной окраски. Воздушный мицелий состоит преимущественно из спороносящей части гриба, вегетативное тело проникает в субстрат. Плесени размножаются спорами и участками мицелия. Мицелий фикомицетов (мукоровые грибы) не имеет перегородок, мицелий аскомицетов (пенициллов, аспергиллов) септирован. Плесневые грибы распространены повсеместно, широко используются как продуценты ферментов, антибиотиков, алкалоидов, органических кислот.

Приготовление препаратов живых клеток

Препарат «раздавленная капля»

На предметное стекло, толщиной не более 1,2-1,5 мм, тщательно вымытое и обезжиренное наносят стеклянной палочкой или пипеткой каплю исследуемого материала (настой гороха, сена, картофеля, мяса, рыбы, белка яйца, навоза, стоячей воды). Препарат покрывают покровным стеклом (толщина не более 0,15-0,18 мм), помещают на столик микроскопа и исследуют в сухой системе. Приготавливая препарат, предметные и покровные стекла следует брать за боковые ребра, не оставляя отпечатки пальцев на них. Препарат после его изучения помещают в кристаллизатор.

В препарате можно найти микро-, дипло- и стрептококки, собственно бактерии и бациллы. Обратите внимание на характер спорообразования (бациллярный, клостридиальный, плектридиальный), особенности движения палочковидных форм. Жгутики в живом препарате увидеть нельзя, но по характеру движения можно судить о расположении их. У перитрих кувыркающееся движение, у монотрих и лофотрих – направленное, стремительное, у амфитрих – зигзагообразное. В препарате из настоя навоза, мяса можно найти извитые формы бактерий (вибрионы, спириллы, спирохеты).

Препарат «раздавленная капля» быстро готовится, и позволяет установить форму клеток микроорганизмов, их размеры, способ спорообразования, а также наличие или отсутствие подвижности, но, к сожалению, является недолговечным.

Препарат «висячая капля»

«Висячей каплей» удобнее пользоваться для наблюдения подвижности микробов, их развития, размножения, прорастанием спор.

Для приготовления препарата небольшую каплю суспензии микроорганизмов наносят на покровное стекло, переворачивают его каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с углублением в центре (рис. 2).

Препарат «висячая капля»

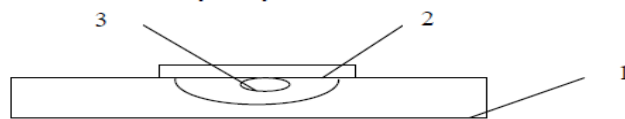


Рисунок 2. Условные обозначения: 1- предметное стекло с углублением в центре, 2 – покровное стекло, 3 – капля суспензии микроорганизмов

Края лунки предварительно смазывают вазелином. Капля оказывается герметически заключенной во влажной камере, что допускает многодневное наблюдение за объектом.

Препарат «отпечаток»

На культуру плесневого гриба или актиномицета, растущую на поверхности твердой среды, накладывают чистое покровное стекло и слегка надавливают пинцетом или препаровальной иглой. Стекло аккуратно снимают и помещают в каплю воды на предметное стекло вниз отпечатком. Препарат позволяет изучить естественное положение клеток микроорганизмов в колонии. Препарат изучают с объективами 8× и 40×. При просмотре препарата обратите внимание на мицелий микроорганизмов, септирован он или нет, окраску воздушного и субстратного мицелия, строение спораносцев и форму спор.

ХОД РАБОТЫ:

1. Приготовить препарат «раздавленная капля» настоя гороха или картофеля и изучить формы бактерий. Обратите внимание на характер спорообразования, движения палочковидных форм. Сделать зарисовки в тетради.

2. Просмотреть колонии актиномицетов или плесневых грибов, выращенных на плотной питательной среде в чашках Петри, при малом увеличении микроскопа, а также приготовить препараты «отпечатки» и изучить строение мицелия и спораносцев со спорами. Зарисовать и обозначить их.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ

План лабораторной работы.

1. Текущий тест.
2. Устный опрос.
3. Окраска цитоплазмы дрожжей метиленовым синим. Обнаружение живых и мертвых клеток.
4. Окраска гликогена в дрожжах раствором Люголя.
5. Техника приготовления фиксированных препаратов. Термическая и химическая фиксация.
6. Окраска капель липидов в дрожжах Суданом-3.
7. Окраска гранул полифосфатов в дрожжах метиленовым синим по Леффлеру.
8. Понятие накопительной культуры.
9. Получение накопительной культуры бактерий р. *Azotobacter* и *Clostridium pasteurianum*.
10. Знакомство с оборудованием микробиологической лаборатории.

Методические указания к лабораторной работе №2

Прижизненная окраска внутриклеточных органелл

Окраска микроорганизмов сложный физико-химический процесс, в котором играют роль явления электроадсорбции, капиллярности, химического сродства между красителем и объектом. Для окраски микроорганизмов используют анилиновые красители (основные, кислые, нейтральные). К кислым красителям относят те, у которых ион, придающий окраску (хромофор), - анион. У основных красителей хромофором является катион. Наибольшее применение имеют основные красители: основной фуксин, сафранин (красный), генцианвиолет (фиолетовый), метиленовая синь, малахитовая зелень и другие. Из кислых красок широкое применение находят кислый фуксин, эритрозин (красные), конго, пикриновая кислота (желтые), нигрозин (черная). Некоторые красители характеризуются избирательным химическим сродством к отдельным компонентам клетки (генетическому аппарату, включениям) и применяются для их выявления.

Так, волютин хорошо окрашивается метиленовым синим, хризоидином; гранулеза и гликоген – растворами йода; липиды – суданом III.

Для окраски препаратов готовят спиртовые, водно-спиртовые и водные растворы красителей.

В процессе прижизненной окраски используют красители в большом разведении (1: 1000, 1: 10000). На предметном стекле смешивают каплю исследуемого материала с раствором красителя. Препараты микроскопируют, используя объектив 40×.

Прижизненная окраска дрожжей

Морфология дрожжей. Термин «дрожжи» не имеет таксономического значения. К дрожжам относят все грибы, которые вегетативно размножаются в одноклеточной форме независимо от того, имеют или не имеют они мицелиальную фазу.

Дрожжевая клетка может иметь круглую, овальную, лимоновидную, бутылевидную, треугольную или серповидную форму. Размеры клеток от 2 – 3 мкм до 25 – 50 мкм в длину, ширина не превышает 10 мкм.

Некоторые почвенные дрожжи (*Lipomyces*, *Cryptococcus*) способны образовывать капсулы.

Наиболее обычным способом вегетативного размножения является почкование. Дрожжам свойственен и половой процесс. Образование спор у дрожжей – одновременно и процесс формирования устойчивых к неблагоприятным воздействиям форм.

Наблюдение за строением и размножением дрожжевых клеток с помощью микроскопа проводят на живых культурах, приготавливая нативные и окрашенные препараты «раздавленной» и «висячей капли».

Прижизненная окраска цитоплазмы дрожжей

К суспензии дрожжей на предметном стекле добавляют каплю раствора метиленового синего (1: 1000), накрывают покровным стеклом и микроскопируют.

Подобным образом дифференцируют живые и мертвые клетки дрожжей. Мертвые клетки окрашиваются в сине-голубой цвет быстрее и ярче за счет посмертного повышения проницаемости клеточной оболочки.

ХОД РАБОТЫ:

1. Приготовить и рассмотреть окрашенный метиленовой синью препарат дрожжей. Найти мертвые, живые, почкующиеся клетки. Зарисовать, сделать необходимые обозначения.

Окраска гликогена в клетках дрожжей

У многих микроорганизмов в клетках накапливаются запасные вещества различной природы. Полисахариды в клетках чаще всего имеют вид гранул. Гранулы гликогеноподобных полисахаридов раствором Люголя окрашиваются в красновато-коричневый цвет.

ХОД РАБОТЫ:

1. К суспензии дрожжей на предметном стекле добавляют каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют.

Техника приготовления фиксированных препаратов. Термическая и химическая фиксация.

В фиксированных препаратах микроорганизмы убиты и прикреплены к предметному стеклу, а затем окрашены. При светлпольной микроскопии фиксированные и окрашенные препараты имеют ряд преимуществ перед прижизненными: 1) высокую контрастность; 2) возможность дифференцированного выявления клеточных структур; 3) безопасность работы; 4) длительность сохранения препарата.

Приготовление препарата включает этапы: приготовление мазка, высушивание, фиксацию и окраску.

Приготовление мазка. На предметное стекло наносят каплю воды, вносят в нее небольшое количество исследуемого материала бактериологической петлей, предварительно прокаленной в пламени спиртовки. Клетки распределяют петлей на площади 2-3 см тонким слоем (в случае роста бактерий на жидкой среде на стекло наносят только каплю микробной суспензии).

Высушивание мазка производят на воздухе или высоко над пламенем горелки.

Фиксация. Охлажденный мазок фиксируют в пламени горелки: стекло с мазком, обращенным кверху, проводят 3-4 раза через пламя. При этом микробы погибают, прикрепляются к стеклу, лучше окрашиваются. Возможна также фиксация химическим путем (этиловым, метиловым спиртом, смесью равных объемов спирта с эфиром, ацетоном и т.д.).

Окраска липидов суданом III

Жироподобные вещества выявляют при обработке дрожжей суданом III (0,5% раствор в 95 этаноле).

ХОД РАБОТЫ:

1. В суспензию дрожжей на предметном стекле вносят каплю формалина для химической фиксации, а затем каплю метиленовой сини 1:100 и каплю раствора судана III. При этом цитоплазма прокрашивается в голубой цвет, а капли липидов – в красно-оранжевый.

Выявление полифосфатов (волютина и метакроматина)

Многие микроорганизмы обладают способностью накапливать полифосфаты в виде гранул и зерен. У бактерий и актиномицетов волютин локализован в цитоплазме, у дрожжей и грибов в вакуолях. Как правило, волютина больше в молодых клетках.

ХОД РАБОТЫ:

1. Фиксированный над пламенем горелки мазок дрожжей окрашивают метиленовым синим по Леффлеру 3 минуты. Краску сливают, препарат промывают водой и не высушивая наносят на мазок каплю 1% раствора H_2SO_4 . Мазок покрывают покровным стеклом и микроскопируют. Волютин имеет вид капель сине-фиолетового цвета на голубом фоне цитоплазмы.

Получение накопительных культур азотфиксаторов

Для получения накопительной культуры *Clostridium pasteurianum* небольшое количество почвы вносят в пробирку с жидкой безазотистой

средой Виноградского, залитой высоким столбиком, и закрывают пробирку резиновой пробкой.

Для получения накопительной культуры *Azotobacter sp.*, используют метод обрастания комочков почвы. Для этого на плотную безазотистую среду Эшби по трафарету стеклянной палочкой наносят комочки почвы, предварительно увлажненной до сметанообразного состояния.

Оборудование микробиологической лаборатории

Микробиологические исследования осуществляются в специальных светлых помещениях с окнами, ориентированными на юг. В состав микробиологической лаборатории входят лабораторные комнаты для исследования, а также подсобные помещения для подготовки питательных сред и реактивов (средоварня), мытья посуды (моечная), стерилизации (автоклавная) и бокс (помещение для пересева чистых культур микроорганизмов).

К основному оборудованию лаборатории относят микроскопы световые, люминесцентные, стереоскопические, осветители к световым микроскопам ОИ-19, ОИ-32.

Термостаты для выращивания культур микроорганизмов.

Автоклавы для стерилизации воды, сред, инструментария.

Термостаты для выращивания культур микроорганизмов.

Кипятильники Коха для дробной стерилизации (тиндализации).

Сушильные шкафы для стерилизации посуды ($T = 200^{\circ}\text{C}$).

Холодильники, дистилляторы.

Бактерицидные и кварцевые лампы для стерилизации воздуха помещений.

рН-метры, магнитные мешалки, качалки, счетчики для учета числа колоний, фотоэлектроколориметры (ФЭК), спектрофотометры.

Весы аналитические, технические, торсионные.

Машинка для изготовления ватных пробок, машинка для разлива питательных сред.

Бактериологические фильтры (Зейтца, мембранные), свечи Шамберлана-Беркефельда для отделения бактериальной массы.

Бюретки, воронки для горячего фильтрования.

Набор красок, реактивов, агар-агар, спиртовки.

Предметные и покровные стекла, пробирки, чашки Петри, чашки Коха, пипетки, шпатели стеклянные и металлические, бактериологические петли, пинцеты, ножницы, скальпели, штативы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3. КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА

План лабораторной работы.

1. Текущий тест.
2. Устный опрос.
3. Выявление капсул у бактерий р. *Azotobacter* и дрожжей *Lipomyces* по методу Бурри.
4. Выявление гранулезы в клетках *Clostridium pasteurianum* раствором Люголя.
5. Методы стерилизации.
6. Подготовка посуды к термической стерилизации.
7. Посев воздуха для учета общей микробной обсемененности.

Методические указания к лабораторной работе №3

Выявление капсул у микроорганизмов по методу Бурри

Некоторые микроорганизмы, например *Azotobacter*, особенно при росте на средах, богатых углеводами, образуют капсулы. Эти структуры часто имеют консистенцию геля и плохо видны при микроскопировании. Химический состав капсул у разных бактерий неодинаков, поэтому их нельзя выявить каким-либо одним методом окраски, капсулы легко деформируются. Чаще всего капсулы выявляют методом негативного контрастирования, применяя жидкую черную тушь, которая не смешивается с веществом капсулы, и она хорошо видна на общем темном фоне препарата.

ХОД РАБОТЫ:

1. Одну петлю слизи, образованной микроорганизмами вокруг комочков почвы на среде Эшби, переносят в каплю туши на предметном стекле и размешивают в ней. Затем накрывают покровным стеклом и

наблюдают прозрачные капсулы вокруг клеток на темном фоне. Можно заметить как капсулы у бактерий р. *Azotobacter*, так и сопутствующих дрожжей *Lipomyces*.

Обнаружение гранулезы у *Clostridium pasteurianum*

Гранулеза – крахмалоподобный запасной полисахарид, специфичный для рода *Clostridium*. Как и другие полисахариды, гранулеза вступает в реакцию с иодом, давая фиолетовое окрашивание.

ХОД РАБОТЫ:

1. Отобрать пипеткой немного жидкости со дна пробирки. Для этого закрытую пипетку опустить до самого дна, затем открыть ее на короткое время, и вновь закрыть, после чего перенести набранную жидкость на предметное стекло. К капле культуры добавить каплю раствора Люголя, накрыть покровным стеклом и микроскопировать. Наблюдаются клетки клостридий, заполненные гранулезой фиолетового цвета.

Способы стерилизации питательных сред, посуды, инструментария

При выделении микроорганизмов и сохранении чистых культур необходимо, чтобы среда не содержала никаких посторонних микробов, что достигается обеспложиванием или стерилизацией. Стерилизуют как среды, так и материалы, инструменты, аппараты, которыми пользуются при работе. Целью стерилизации является удаление всех живых микроорганизмов как внутри, так и на поверхности предмета.

Эффективность стерилизации выражается в виде статистической вероятности выживания клеток и должна составлять не более 10^{-6} .

Стерилизация бывает:

- физическая
- химическая
- биологическая.

Использование того или иного способа стерилизации обусловлено особенностями материала, его физическими и химическими свойствами, массой, объемом.

Физическая стерилизация подразделяется на термическую и холодную.

Термическая стерилизация - стерилизация под действием высоких температур, вызывающих денатурацию клеточных белков, разрушающих осмотический барьер клеток, нарушающих равновесие ферментативных реакций, что приводит к гибели клетки.

Термическая стерилизация осуществляется различными способами:

1. Прокаливание в пламене горелки (фламбирование). Так стерилизуют бактериальные петли, иглы, кончики пинцетов, горлышки колб и пробирок, ватные пробки (кратковременно).

2. Кипячение. Производят в стерилизаторе. Стерилизуют шприцы, ножницы, скальпели, пинцеты, резиновые перчатки и резиновые пробки.

3. Стерилизация сухим жаром. Осуществляется в сушильных шкафах при температуре 160 °С – 2 ч., 165 °С – 1 ч., 180 °С – 40 мин. Горячим воздухом чаще всего стерилизуют стеклянную посуду, инструментарий.

4. Стерилизация влажным жаром (текучим паром). Производится в аппарате Коха или в автоклаве при открытом выпускном кране. Таким образом стерилизуют питательные среды, свойства которых изменяются при температурах выше 100 °С. Обработку материала текущим паром используют для проведения дробной стерилизации (тиндализации) – трехкратной обработки питательной среды влажным жаром в течение одного часа при температуре 70 – 80 °С с интервалами 24 ч, во время которых поддерживается температура, благоприятная для прорастания спор. Проросшие из спор вегетативные клетки быстро погибают при очередном нагревании.

5. Стерилизация влажным жаром под давлением (автоклавирование). Наиболее надежный и чаще всего применяемый способ стерилизации питательных сред. Основан на нагревании материала насыщенным водяным паром при давлении выше атмосферного. Время стерилизации 10 - 45 мин. Таким образом стерилизуют среды, воду, посуду, предметы, портящиеся от сухого жара (резину). Температура пара возрастает при повышении его давления:

Температура пара (°C)	Давление (атм.)
112	0,5
121	1
128	1,5
134	2

6. Неполная стерилизация (пастеризация). Достигается выдерживанием материала при 60 °C в течение 30 мин, при 75 °C – 15 мин, при 90 °C без выдержки. Широко применяется для частичной стерилизации легко портящихся пищевых продуктов (молоко, соки, сиропы). В почвенной микробиологии пастеризуют суспензии почв, чтобы освободить их от вегетативных клеток, но сохранить споры бактерий.

В последнее время часто используют ультрапастеризацию – разновидность пастеризации, при которой жидкость на 1-2 секунды нагревают до температуры 135—150 °C и сразу же охлаждают до 4—5 °C.

Методы холодной стерилизации применяют в тех случаях, когда среды не выдерживают нагревание.

Холодная стерилизация включает в себя:

1. Фильтрацию, которая заключается в пропускании жидкостей через специальные фильтры, имеющие мелкопористые перегородки и поэтому задерживающие клетки микроорганизмов. Причем здесь имеет место не только механическая задержка, но и адсорбция микроорганизмов на стенках, ограничивающих поры, вследствие того, что большинство микроорганизмов в водных суспензиях несет на своей поверхности отрицательный заряд, а фильтры изготавливаются из положительно заряженных материалов. Диаметр пор определяет область применения фильтров (фильтрующее и стерилизующее действие). Используют следующие типы фильтров:

- Мембранные фильтры (пористые диски из целлюлозы, коллодия, ацетата, толщиной около 0,1 мм с диаметром пор от 0,35 до 1,2 мкм).
- Фильтры Зейтца (диски из смеси асбеста с целлюлозой). Их толщина 3-5 мм, диаметр 35-140 мм. С увеличением содержания целлюлозы пористость фильтра возрастает.

- Мелкопористые стеклянные фильтры (диски из сплавленных фрагментов стекла).
- Фарфоровые фильтры в виде полых свечей из каолина с примесью кварцевого песка (свечи Шамберлана), из инфузорной земли (свечи Беркефельда) и других материалов. Свечи Шамберлана стандартизуют по размерам пор. 1 и 2 задерживают крупные бактерии, 3-13 – малые формы, предназначены для фильтрации воды. Свечи Беркефельда имеют диаметр пор 3-4 мкм, 5-7 мкм, 8-12 мкм.

Отечественная промышленность изготавливает фильтры двух марок: «Ф» (фильтрующие) – задерживающие взвешенные частицы; «СФ» (стерилизующие) – с меньшими порами, задерживающие бактерии, но пропускающие вирусы. Фильтры предназначены для стерилизации антибиотиков и других лекарственных препаратов, для отделения дрожжевой массы в условиях винодельческого, пивоваренного и других производств.

Фильтр, представляющий собой диск, закрепляется в специальном держателе (стеклянном, металлическом), который вставляется в приемник фильтрата (колба Бунзена). Свечи вставляют непосредственно в резиновую пробку приемника. Перед употреблением фильтры, их держатели и приемник фильтрата должны быть простерилизованы.

Обычно фильтрование ускоряется путем создания на фильтре перепада давления, достигаемого либо приложением повышенного давления к находящейся над фильтром жидкости, либо откачиванием воздуха с помощью вакуумного насоса, присоединенного к приемнику фильтрата.

Мембранные и асбестовые фильтры рассчитаны на одноразовое использование. Свечи после специальной обработки можно использовать повторно.

2. Стерилизацию облучением, основанную на летальном эффекте, которое оказывают на клетки микроорганизмов ультрафиолетовые, рентгеновские, γ -, α -, β - лучи и нейтроны. В лабораторных условиях обычно используют ультрафиолетовые лучи, источником которых являются специальные бактерицидные лампы. Излучателем в них служит электрическая дуга, возникающая в парах ртути низкого давления и

испускающая линейчатый спектр в ультрафиолетовой области с длиной волны 260 нм. Такой спектр совпадает с диапазоном поглощения ДНК, в результате происходит димеризация тиминовых оснований. Бактерицидные лампы используют для частичной стерилизации открытых поверхностей и воздуха. Эффективность данного метода зависит от времени экспозиции, расстояния между лампой и объектом, состава среды, в которой находятся микроорганизмы, и наличия защитных слоев. Вегетативные формы бактерий более чувствительны к УФ-облучению, чем споры. Воздействие лучей должно быть непосредственным и длительным, т.к. они обладают слабой проникающей способностью и не проходят через обычное стекло, белую бумагу, полированные пластины алюминия. Длительная и непрерывная работа ламп снижает интенсивность излучения, целесообразно вести облучение с перерывами. Срок облучения 30 минут – 1 час.

3. Стерилизацию ультразвуком, создаваемым в жидкостях при помощи вибрирующих никелевых или кварцевых дисков. Разрушение клеток при ультразвуковом воздействии обусловлено возникновением вторичных явлений – кавитации. В результате действия звуковой волны высокой частоты образуются разрывы в жидкости, которые затем образуют пузырьки. При их захлопывании идет сильная гидравлическая волна, достигающая 10 атм., что приводит к механическому разрушению клеток. Бактерицидный эффект ультразвука снижается, если подавляется кавитация (разрыв жидкости), что происходит при дегазации, погружении объекта в гель или другую вязкую среду. Бактерицидный эффект ультразвука напротив усиливается при насыщении озвучиваемой эмульсии углекислотой, азотом, кислородом, воздухом, так как это усиливает кавитацию. К ультразвуку чувствительны все микроорганизмы, в том числе и споровые. Но по степени чувствительности они значительно отличаются. Следует отметить, что при повышении вязкости раствора эффективность ультразвуковой стерилизации снижается.

Химическая стерилизация представляет собой удаление или разрушение микроорганизмов, находящихся на неживых объектах или поверхностях, с помощью химических агентов, получивших название дезинфицирующих веществ. В качестве дезинфицирующих агентов

применяют галогены и их производные (гипохлорид натрия, хлорамины, спиртовой раствор йода), фенольные соединения, спирты, микробицидные газы (формальдегид, окись этилена). Для консервации питательных сред чаще всего применяют такие вещества как хлороформ, толуол, эфир. При необходимости освободить среду от этих консервантов ее нагревают на водяной бане при температуре 56 °С (консерванты испаряются). Для консервирования вакцин, сывороток пользуются борной кислотой, формалином – 0,05%, хлороформом – 0,5%, фенолом – 0,5%, мертиолатом в конечной концентрации 1:5000, 1:10000.

Идеальных дезсредств на все случаи жизни не существует. При выборе средства необходимо учитывать:

- активность вещества;
- спектр антимикробного действия;
- устойчивость – сохранение активности при длительном хранении;
- гомогенность – отсутствие распада на компоненты;
- растворимость (не только в воде, но и в жирах – для проникновения в клетки микроорганизмов;
- низкое поверхностное натяжение, позволяющее проникать в трещины и щели;
- безопасность – не должно быть токсичным, вызывать аллергии, отравления, а также не должно обладать канцерогенными свойствами;
- детергентная активность – способность удалять грязь и жиры;
- воздействие на материалы (металл, дерево, краска, пластмасса);
- запах;
- цена.

Для каждого дезинфицирующего средства подбирается оптимальная концентрация раствора, время контакта и температура.

Аппаратуру, имеющую зеркальное, оптическое и радиоэлектронное оборудование, а также изделия из термолабильных пластмасс, например центрифужные пробирки, стерилизуют с использованием газов таких как: оксид этилена, метилбромид, формальдегид, озон и др. Газовую стерилизацию проводят в специальных герметически закрывающихся аппаратах. Перед введением в камеру биоцида из нее как можно полнее

удаляют воздух, чтобы обеспечить тесный контакт активно действующего вещества со стерилизуемым объектом. При стерилизации строго контролируют концентрацию газа, давление, влажность, температуру и длительность экспозиции. В большинстве случаев процесс проводят в сочетании с некоторым повышением температуры (до 45-70 °С). Время экспозиции при использовании газового метода стерилизации варьирует от 6 до 18 часов. Режимы стерилизации определяются свойствами биоцида и конструкцией стерилизуемого объекта. По окончании стерилизации газ удаляют из камеры с помощью вакуумного насоса и на некоторое время камеру оставляют под вакуумом для десорбции газов из стерилизованных предметов. После этого камеру заполняют стерильным воздухом. Предметами, простерилизованными газами, рекомендуется пользоваться не ранее чем через 24 ч после стерилизации.

Биологическая стерилизация основана на применении антибиотиков. Антибиотики - это специфические вещества, образуемые клеткой в процессе жизнедеятельности, а также их производные и синтетические аналоги, обладающие способностью подавлять развитие микроорганизмов или задерживать развитие злокачественных новообразований.

Биологическую стерилизацию применяют при работе с культурами тканей, лабораторными животными, вирусами, а также при приготовлении питательных сред. В связи с тем, что антибиотики обладают избирательным действием, исходя из поставленных задач производится подбор антибактериального препарата.

По спектру действия антибиотики делятся на следующие группы:

- Противобактериальные узкого спектра действия (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы);
- Противобактериальные препараты широкого спектра действия (аминогликозиды, тетрациклины, макролиды и азалиды);
- Противотуберкулезные (рифамицин, стрептомицин, канамицин);
- Противогрибковые (нистатин, амфотерицин, азолы);
- Противоопухолевые препараты (блеомицин, дактиномицин, и митомицин);
- Противопротоzoйные (метронидазол, фурагин).

При применении антибиотиков следует учитывать необходимость подбора минимальной подавляющей концентрации (МПК), а также возможность формирования резистентности к используемому препарату.

Исследование микрофлоры воздуха

Воздух, как и вода, и почва, является основным местом обитания микроорганизмов. Бактерии в огромных количествах попадают туда вместе с поднимающейся с пылью, и их численность зависит от микрофлоры почвы. В воздухе микроорганизмы находят для себя достаточное количество пищи, но подвержены губительному действию солнечных лучей. Микрофлора воздуха меняется в зависимости от климатических условий, расположения населенных пунктов, сезона, времени года и суток. Сырая, дождливая погода очищает от пыли воздух и осаждаёт микробы. При подъёме вверх воздух более чист, чем у поверхности почвы. Большое количество микроорганизмов содержится в воздухе общественных помещений, и чем больше скопление в них людей, тем сильнее он загрязнён микроорганизмами.

В зависимости от задач исследования применяют различные методы учета воздушной микрофлоры. Для определения загрязнённости воздуха в помещении используется метод осаждения микробных клеток на агаровую пластинку (метод Коха).

ХОД РАБОТЫ:

1. В стерильную чашку Петри внесите над пламенем спиртовки расплавленную и охлажденную до 48°C питательную среду МПА так, чтобы она заполнила всю поверхность дна чашки, дайте среде застыть. Перенесите чашку в помещение, в котором будете анализировать воздух, снимите крышку и оставьте в горизонтальном положении 5 минут. Нельзя ставить чашку на пол, посев производите на высоте не менее 1 м. После посева закройте чашку Петри и поместите ее в термостат при T-28-30°C для проращивания.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4. ДЕЙСТВИЕ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

План лабораторной работы.

1. Текущий тест.
2. Устный опрос.
3. Определение общей микробной загрязненности воздуха по методу Коха.
4. Описание макроморфологических (культуральных) признаков микроорганизмов.
5. Посев на скошенный агар (посев штрихом).
6. Посев на агар, залитый столбиком (посев уколом).
7. Классификация питательных сред и их демонстрация.

Методические указания к лабораторной работе №4

Расчет бактериальной загрязненности воздуха

Через неделю учитывают колонии, выросшие на поверхности среды. Среди сапрофитов воздуха помещений, развивающихся на МПА, постоянно встречаются различные кокковые формы, в частности *Sarcina flava*, спороносные палочки и различные плесени.

При определении загрязненности методом Коха следует помнить, что за 5 минут при спокойном состоянии воздуха на площадь в 100 см² оседает такое количество клеток, которое соответствует содержанию бактерий в 10 л воздуха.

Пример расчета количества клеток в 1 м³ воздуха:

а) подсчитывают общее количество колоний в чашке Петри (методом прямого счета, с помощью счетных камер и счетчиков);

б) определяют площадь питательной среды в чашке Петри

$$S = \pi R^2, \text{ где } R = 5 \text{ см.}$$

$$S = 78,5 \text{ см}^2;$$

в) вычисляют количество колоний, соответствующее 100 см²:

$$25 \text{ колоний} - 78,5 \text{ см}^2$$

$$\text{«х»} - 100 \text{ см}^2$$

$$X = \frac{25 \times 100}{78,5} = 32 \text{ колонии};$$

г) пересчитывают количество бактерий на 1 м^3 воздуха (на 1000 л):

32 – 10 л

«х» - 1000 л

$X = 3200$ бактериальных клеток.

Нормативы допустимой бактериальной обсемененности воздуха закрытых помещений отсутствуют. Существует точка зрения, что санитарно-бактериологические показатели воздуха должны дифференцироваться в зависимости от назначения помещения. Степень чистоты воздуха показывают следующие ориентировочные величины:

- Чистый воздух – до 2000 микробных клеток
- Удовлетворительно чистый – от 2000 до 4000
- Слабо загрязненный – от 4000 до 7000
- Сильно загрязненный – более 7000 микробных клеток в 1 м^3 .

ХОД РАБОТЫ:

1. Рассмотреть чашки с посевами воздуха различных помещений, рассчитать количество микроорганизмов в 1 м^3 воздуха. Провести сравнительный анализ загрязненности воздуха микроорганизмами в данных помещениях.

Описание макроморфологических (культуральных) признаков микроорганизмов

К культуральным или макроморфологическим свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

Из культуральных признаков микроорганизмов наиболее существенным является строение колоний. Колонии - это видимые простым глазом на поверхности субстрата скопления огромного количества клеток микроорганизмов одного и того же вида. Споры или отдельные клетки микробов, попадая при посеве на определенное место плотного субстрата, не могут как в жидкости рассеиваться по всей среде, а прорастают и размножаются на одном и том же месте, образуя колонии.

Колонии, выросшие на поверхности среды, отличаются большим разнообразием. При их описании учитывают следующие признаки:

1. Форма колонии (округлая, неправильная, амёбовидная, ризоидная, мицелиальная и др.) (рис. 3);

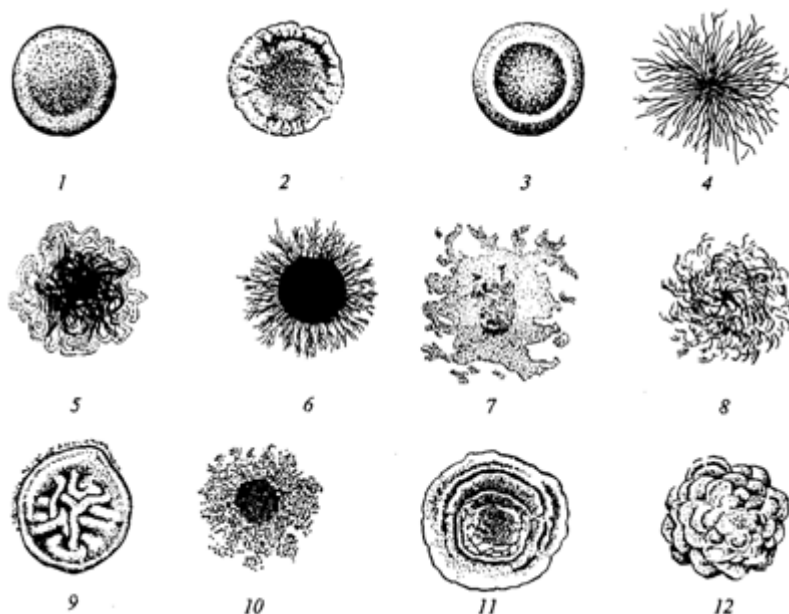


Рисунок 3. Форма колоний: 1 – круглая; 2 – круглая с фестончатым краем; 3 – круглая с валиком по краю; 4, 5 – ризоидные; 6 – с ризоидным краем; 7 – амёбовидная; 8 – нитевидная; 9 – складчатая; 10 – неправильная; 11 – концентрическая; 12 – сложная.

2. Размер (диаметр в миллиметрах) - 1-2 мм – мелкие колонии; 2-4 мм – средние; 4 мм и более – крупные; менее 1 мм – точечные;

3. Профиль (выпуклый, конусовидный, плоский, кратерообразный и т. д.) (рис. 4);

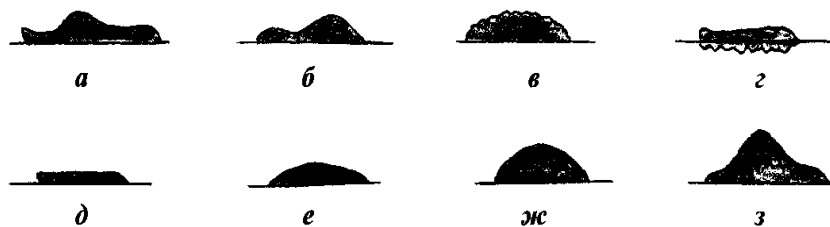


Рисунок 4. Профиль колоний: а – изогнутый; б – кратерообразный; в – бугристый; г – врастающий в агар; д – плоский; е – выпуклый; ж – каплевидный; з – конусовидный.

4. Край (ровный, лопастной, волнистый, зубчатый, бахромчатый,

фестончатый) (рис. 5);

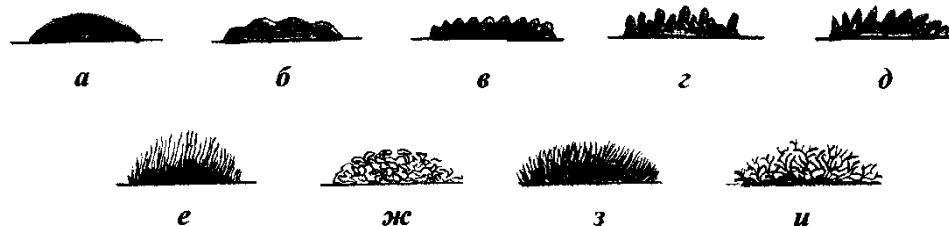


Рисунок 5. Край колоний: а - гладкий; б – волнистый; в – зубчатый; г – лопастный; д – неправильный; е – реснитчатый; ж – нитчатый; з – ворсинчатый; и – ветвистый.

5. Поверхность (гладкая, бугристая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами, радиально исчерченная);

6. Цвет – самой колонии и субстрата под колонией;

7. Оптические свойства – блестящая, матовая, прозрачная, непрозрачная, полупрозрачная, флуоресцирующая;

8. Структура – однородная, мелкозернистая, крупнозернистая, волокнистая (рис. 6);

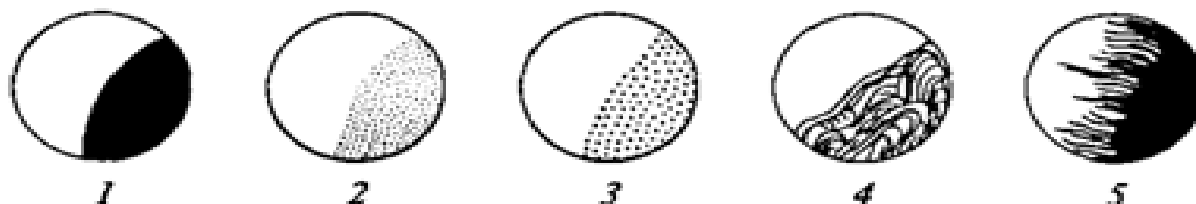


Рисунок 6. Структура колонии: 1 – однородная; 2 – мелкозернистая; 3 – крупнозернистая; 4 – струйчатая; 5 – волокнистая.

9. Консистенция (тестообразная, густая, слизистая, тягучая, жидкая, клейкая). Определяют, прикасаясь к колонии петлей.

Размеры и некоторые другие особенности колоний изменяются с возрастом и зависят от состава среды, поэтому при их описании указывают возраст культуры, состав среды и температуру культивирования.

ХОД РАБОТЫ:

1. На МПА выбрать одну бактериальную колонию и описать ее культуральные признаки.

Посев штрихом и уколом в столбик

После описания колонии производят посев данной культуры в три пробирки со скошенным агаром штрихом с помощью бактериологической петли. Для этого берут правой рукой петлю, как карандаш или ручку, прокалывают ее на пламени спиртовки, охлаждают на воздухе и касаются ею выбранной колонии. При этом чашку Петри не следует открывать полностью, а только лишь приоткрывать для введения петли. Затем в левую руку между большим и средним пальцами берут пробирку с питательной средой так, чтобы скошенная поверхность была хорошо видна. Мизинцем и безымянным пальцем правой руки вынимают пробку из пробирки, обжигают края пробки на спиртовке, вводят петлю в пробирку и касаются ею питательной среды, проводя штрих. После этого петлю вынимают, обжигают внутренний конец ватной пробки и закрывают пробирку.

Микроорганизмы по-разному растут и размножаются в зависимости от количества кислорода в среде. Это тоже культуральный признак. Для определения отношения к кислороду культуры микроорганизмов общепринятым является тест-посев уколом в столбик питательной среды. Посев осуществляется бактериологической иглой, последовательность операций та же, что и при посеве штрихом, за исключением того, что пробирку со столбиком питательной среды держат левой рукой вертикально. В правой руке петля с культурой и пробка.

Питательные среды

Питательные среды представляют собой субстраты для выделения, выращивания и сохранения культур микроорганизмов в лабораторных условиях.

Требования, предъявляемые к средам:

1. Среда должна содержать вещества, необходимые для жизнедеятельности клетки. В состав сред входят органические вещества (азот, углерод, кислород, водород); соли (натрия, калия и т.д.); микроэлементы (железо, медь, хром, цинк и т.д.) и факторы роста (витамины, аминокислоты, пурины, пиримидины). Все

вещества должны быть в легко усвояемом для микроорганизма виде.

2. Среды должны иметь определенную *концентрацию водородных ионов*, для измерения которой служит водородный показатель – рН. Для каждого микроорганизма существует оптимальная зона рН, в пределах которой он может нормально развиваться. Большинство бактерий тяготеет к нейтрально, слабо-щелочной среде (рН 7,0-7,4), уробактерии – щелочной (рН 11-13). Грибы, уксуснокислые, молочнокислые бактерии предпочитают слабокислые среды (рН 4,5-5,0). При изготовлении сред следует проверять значение рН до и после стерилизации. Микроорганизмы в процессе жизнедеятельности сами изменяют рН среды, потребляя определенные компоненты среды и выделяя метаболиты. В некоторых случаях подкисление среды настолько интенсивно, что приходится вводить избыточное количество нейтрализующих веществ, например, мел, в культуру молочнокислых бактерий, чтобы поддержать их развитие. Таким образом, среды должны обладать *буферностью*, т.е. содержать вещества, способные нейтрализовать продукты обмена.
3. Среды должны быть *изотоничными* для микробной клетки, т.е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оно соответствует давлению 0,5% раствора NaCl.
4. Среды должны быть *стерильными*: посторонние микроорганизмы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств и изменяют свойства среды (состав, рН и др.).
5. Среды должны быть влажными и не слишком вязкими, так как питание микробов осуществляется за счет осмоса и диффузии.
6. Среды должны обладать определенным *окислительно-восстановительным* потенциалом, т.е. соотношением веществ отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом rH_2 . Этот потенциал показывает насыщение среды кислородом.

Для одних микроорганизмов нужен высокий потенциал, для других – низкий. Например, анаэробы размножаются при rH_2 не выше 5, а аэробы - при rH_2 не ниже 10. Степень аэробности среды имеет показатель от 0 до 41.

7. Среда должны содержать *постоянные количества* отдельных ингредиентов. Соотношение углерода и азота должно соответствовать 20:1, для большинства патогенных бактерий – 2,5-3,0 г/л общего азота; 0,5% хлоридов в пересчете на NaCl; 1% пептона.

По *составу* среды подразделяются на натуральные, синтетические и полусинтетические. *Натуральные* (естественные) среды состоят из продуктов животного и растительного происхождения. К ним относят фрукты, овощи, мясо, хлеб, молоко и т.д. *Синтетические* (искусственные) готовят из химически чистых соединений, взятых в точно указанных концентрациях на дистиллированной воде. Например, среда Чапека для выращивания актиномицетов, плесневых грибов, среда Эшби для азотобактера и т.д. К числу сред неопределенного состава относят *полусинтетические* среды, в состав которых наряду с соединениями известной химической природы, входят вещества неопределенного состава, например, мясо-пептонный бульон с 5% NaCl или среда Чапека с дрожжевым автолизатом. Такие среды находят широкое применение в технической микробиологии для получения аминокислот, витаминов и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

По *назначению* различают универсальные, элективные и дифференциально-диагностические среды (индикаторные). К *универсальным* (основным или стандартным) относятся среды, благоприятные для выращивания многих видов микроорганизмов: мясо-пептонный бульон (МПБ), неохмеленное пивное сусло и др. *Элективные* среды введены С.Н.Виноградским и М.Бейеринком и обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы родственных микроорганизмов. Они предназначены для выделения микробов из мест их естественного обитания, и позволяют получить накопительную культуру (культуру преобладающего микроорганизма). Например, среда Виноградского для *Clostridium*

pasteurianum, среда Эшби для азотобактера и др. *Дифференциально-диагностические* (индикаторные) среды позволяют достаточно быстро отличить одни виды микроорганизмов от других. В них добавляют красители-индикаторы, которые окрашивают колонии в определенный цвет или изменяют цвет среды. Например, среда Эндо для дифференциации кишечной палочки. Этот микроорганизм на среде Эндо образует колонии кроваво-красного цвета с металлическим блеском.

По *физическому состоянию* различают жидкие, плотные и сыпучие среды. *Жидкие* среды широко применяют для выяснения физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, для накопления биомассы или продуктов обмена, а также поддержания и хранения многих микроорганизмов, плохо развивающихся на плотных средах. *Плотные* среды используют для выделения чистых культур (получение изолированных колоний), в диагностических целях (установление морфологии колоний, особенностей роста на скошенном агаре и др.), для хранения культур, количественного учета микроорганизмов, определения их антагонистических свойств и в ряде других случаев. *Сыпучие* среды применяют в промышленной микробиологии. К ним относят разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, пропитанные питательным раствором.

Для уплотнения сред применяют агар-агар, желатину и кремнекислый гель. Плотные среды получают, добавляя к жидким *агар-агар* (сложный полисахарид морских водорослей) в количестве 1,5-3,0%; для полужидкой среды – 0,5%. Он образует в воде гель, плавящийся при 100°C и затвердевающий при 40°C. Агар выпускают в виде пластин, порошка, волокон. Среда с агар-агаром стерилизуют в автоклаве 10-30 минут при 0,5-1,5 атм. Гель образует и *желатина* (белок костей, кожи, сухожилий), она плавится при температуре 23-26°C. Желатину добавляют в количестве 10-15%. Стерилизовать среды с желатиной следует в кипятильнике Коха при 100°C дробно, три дня подряд по 20 минут. Продолжительное нагревание выше 100°C понижает точку застывания желатины. Твердые среды в микробиологическую практику введены лабораторией Коха. Преимущество их над жидкими состоит в том, что на поверхности твердых сред различные виды микроорганизмов растут обособленно друг от друга, в виде колоний,

что позволяет изучить их морфологические особенности. Интервал температур, при которых агар-агар образует гель намного шире, поэтому агаровые среды более распространены, чем среды с желатиной. Желатина разжижается при комнатной температуре, а также может использоваться некоторыми микроорганизмами. *Кремнекислый гель* (силикагель) используют как твердую основу для синтетических сред строго определенного состава, поскольку он является веществом неорганической природы (диоксид кремния).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5. РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ

План лабораторной работы.

1. Устный опрос.
2. Определение отношения исследуемой культуры микроорганизмов к температуре.
3. Определение отношения исследуемой культуры микроорганизмов к кислороду.
4. Окраска по Граму (классический метод).
5. Тест Грегерсена (экспресс-метод).
6. Посев уколом на пестрый ряд Гисса.

Методические указания к лабораторной работе № 5

Определение отношения исследуемой культуры микроорганизмов к температуре

Наблюдают рост культуры на поверхности скошенного агара при разных температурах (4, 27, 50) инкубации. Описывают интенсивность роста (рис. 7), зарисовывают наблюдаемую картину. Делают вывод об отношении исследуемой культуры к температуре.

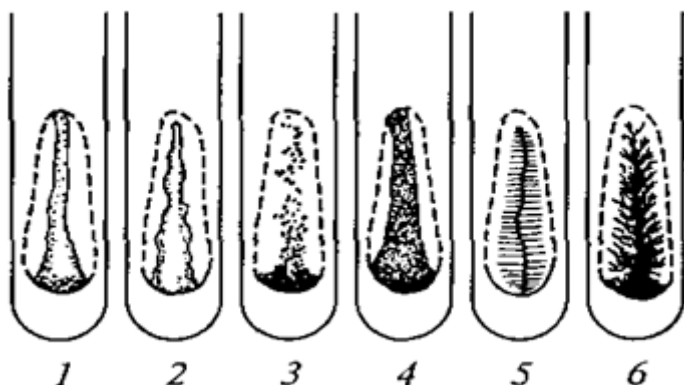


Рисунок 7. Рост бактерий по штриху. 1 – сплошной с ровным краем; 2 – сплошной с волнистым краем; 3 – четковидный; 4 – диффузный; 5 – перистый; 6 – ризоидный

Определение отношения исследуемой культуры микроорганизмов к кислороду

Наблюдают рост культуры в агаре, залитом столбиком. После инкубации в термостате при температуре 30°C возможны три типа роста:

- рост шляпкой на поверхности (аэробные микроорганизмы);
- рост у дна пробирки (анаэробные микроорганизмы);
- рост равномерный по всей длине укола (факультативно-анаэробные микроорганизмы).

Зарисовывают наблюдаемую картину. Делают вывод об отношении исследуемой культуры к кислороду.

Окраска по Граму (классический метод)

Впервые предложена в 1884 г. датским ученым Х. Грамом для выявления бактерий в гистологических срезах.

Сущность метода заключается в том, что при обработке генцианвиолетом и йодом в клетках одних микроорганизмов образуется относительно устойчивый и нерастворимый в спирте комплекс, который удерживается ими при обработке спиртом. Эти микроорганизмы относят к грамположительным, они остаются окрашенными в сине-фиолетовый цвет. Грамотрицательные бактерии обесцвечиваются спиртом, и их выявляют, дополнительно окрашивая контрастной краской (водным фуксином). В основе механизма окраски по Граму лежат особенности химического состава и строения клеточных стенок бактерий.

Для окраски берут клетки молодых 18 - 24 ч. культур бактерий, так как с возрастом в бактериальной популяции увеличивается количество мертвых клеток, которые всегда грамотрицательные, а некоторые грамположительные бактерии становятся грамотрицательными (например, *Lactobacillus*). Окраску по Граму проводят следующим образом:

1. Готовят мазок культуры исследуемого микроорганизма на предметном стекле, который высушивают на воздухе, фиксируют жаром.
2. На препарат помещают фильтровальную бумагу и наносят раствор генцианвиолета. Экспозиция 2 мин.
3. Не смывая краски, добавляют раствор Люголя (I в KI) на 2 мин. (до почернения мазка).
4. Сливают растворы красок и препарат обесцвечивают 96⁰ этиловым спиртом в течение 60 сек.
5. Препарат быстро, чтобы не увеличить экспозицию спирта, промывают водой.
6. Дополнительно контрастно окрашивают водным раствором основного фуксина. Экспозиция 2 мин.
7. Препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

В поле зрения микроскопа грамположительные бактерии сине-фиолетового цвета, грамотрицательные - красные.

Определение принадлежности бактерий к грамположительным или грамотрицательным можно проводить с помощью экспресс-анализа с 3% КОН. Для этого на предметное стекло помещают каплю раствора щелочи в которую вносят бактериологической петлей исследуемую культуру и перемешивают в течение 60 сек. Если суспензия микроорганизмов в щелочи становится вязкой или желеобразной, то культура относится к грамотрицательным, в противном случае - к грамположительным.

ХОД РАБОТЫ:

1. Приготовить фиксированный препарат, окрасить его по методу Грама, промикроскопировать при увеличении объектива 40х.

Тест Греггерсена (экспресс-метод)

Существует также экспресс метод определения типа клеточной стенки, предложенный Греггерсеном. Сущность его состоит в том, что при механическом воздействии в щелочном растворе, наружная мембрана грамотрицательных бактерий омыляется, однослойный пептидогликан легко ломается и ДНК выходит в раствор, делая его вязким и тянущимся за петлей. У грамположительных же разрушения клеточных стенок не происходит ввиду их большой прочности. Тест позволяет правильно установить тип клеточной стенки примерно в 97% случаев.

ХОД РАБОТЫ:

1. Нанести на предметное стекло каплю 3% КОН.
2. Набрать полную петлю биомассы исследуемой культуры и интенсивно размешивать петлей в капле щелочи в течение 3 минут.
3. Отрывая петлю от суспензии наблюдать образование тяжей в случае грамотрицательной культуры, или их отсутствие в случае грамположительной.

Определение спектра утилизируемых углеродных субстратов

Для идентификации микроорганизмов важен набор используемых ими углеродных субстратов, который существенно различается у разных видов. Для определения способности микроорганизма использовать те или иные субстраты используют среды Гисса. Эти среды включают 1% сахаров или сахароспиртов (сахароза, лактоза, маннит, и др.), пептон и кислотно-основный индикатор. При утилизации субстрата чаще всего выделяются кислые продукты метаболизма и происходит сдвиг цвета индикатора в сторону закисления. При невозможности использовать субстрат бактерии растут за счет пептона и защелачивают среду.

ХОД РАБОТЫ:

1. Произвести посев уколом на предложенные преподавателем среды Гисса.
2. Инкубировать в термостате.
3. Зарисовать результат и оформить спектр утилизируемых субстратов в виде таблицы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6. СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

План лабораторной работы.

1. Устный опрос.
2. Посев сплошным газоном.
3. Закладка опыта по действию УФ-лучей на микроорганизмы.
4. Закладка опыта по действию антибиотиков на микроорганизмы.
5. Снятие результатов пестрого ряда Гисса. Определение спектра утилизируемых источников углерода.
6. Работа с определителями.
7. Закладка опыта по изучению пектинового брожения.

Методические рекомендации к лабораторным работам № 6

Посев сплошным газоном

В ряде случаев необходимо, чтобы микроорганизмы росли однородным слоем по всей поверхности чашки Петри. В этой ситуации применяется посев сплошным газоном. Для достижения равномерного распределения культуры, клетки суспендируют в небольшом объеме жидкости и равномерно распределяют по всей поверхности среды шпателем Дригальского.

ХОД РАБОТЫ:

1. Приготовить суспензию клеток. Для этого одну петлю культуры размешать петлей до гомогенного состояния в 3 мл стерильной воды.
2. Нанести одну каплю суспензии на поверхность среды МПА в чашке Петри.
3. Тщательно растереть каплю по всей поверхности шпателем Дригальского.

Закладка опыта по действию УФ-лучей на микроорганизмы

Энергия, распространяющаяся в пространстве в виде электромагнитных волн, называется лучистой энергией. Различные ее спектры оказывают на микроорганизмы неодинаковое воздействие. Радиоволны не оказывают биологического действия, инфракрасные - при адсорбции их организмом вызывают нагревание. Видимый свет действует на фотосинтезирующие микроорганизмы благоприятно, являясь основным

источником энергии. Все остальные бактерии лучше развиваются в темноте. Даже рассеянный свет задерживает их размножение. А видимый свет значительной интенсивности может вызывать повреждение и гибель клеток. От губительного действия видимого света микроорганизмы предохраняет способность образовывать пигменты.

Наиболее активно на бактерии действует ультрафиолетовая часть спектра, оказывающая либо летальное, либо мутагенное действие в зависимости от природы микроба и дозы облучения.

Лабораторный опыт по влиянию ультрафиолетовых лучей на жизнедеятельность микроорганизмов закладывается следующим образом. В стерильную чашку Петри с МПА вносят каплю суспензии бактерий, которую равномерно распределяют по поверхности среды шпателем Дригальского. Затем на центральную часть сплошного газона микроорганизмов помещают стерильный трафарет, и, открыв чашку, ставят ее под облучатель кварцевой лампы на 20 - 30 мин на расстоянии от источника излучения 10 - 20 см. Затем трафарет убирают, чашки закрывают и инкубируют при 28 °С. Результаты опыта наблюдают через 5 - 7 дней. Рост микроорганизмов виден лишь на том участке агара, который был закрыт трафаретом от действия ультрафиолетовых лучей. Остальная часть среды стерильна. Губительное действие лучей зависит от расстояния, времени экспозиции и вида микроорганизма, который подвергался облучению.

ХОД РАБОТЫ:

1. Произвести посев сплошным газоном на среду МПА
2. Поместить на середину чашки кусочек стерильного плотного картона или стерильное покрывное стекло
3. Облучить чашку УФ-лампой в течение 5-20 минут (выполняется лаборантом)
4. Удалить с чашки кусочек картона или стекло стерильным пинцетом.
5. Инкубировать в термостате.

Закладка опыта по действию антибиотиков на микроорганизмы

Антибиотики - специфические продукты жизнедеятельности или их

модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (вирусам, бактериям, грибам, водорослям, простейшим) или к злокачественным опухолям, избирательно задерживающие их рост либо полностью подавляющие развитие.

К синтезу веществ, обладающих антимикробной активностью, способны:

- цианобактерии (малинголид);
- эубактерии (низин – *Lactococcus lactis*, колицин – *E. coli*, полимиксин – *B. polymyxa*);
- актиномицеты (стрептомицин – *Streptomyces griseus*, гентамицин – *Micromonospora purpurea*);
- грибы (пенициллин – *Penicillium chrysogenum*, цефалоспорин – *Acremonium chrysogenum*);
- низшие растения (усниновая кислота – *Usnea florida*);
- высшие растения (аллицин – *Allium sativum*);
- животные (интерферон, лизоцим).

Антибиотики отличаются от неспецифических метаболитов (кислоты, спирты), высокой биоактивностью в отношении чувствительных микроорганизмов. Их действующие концентрации выражаются в микрограммах или даже десятых и сотых долях мкг/мл.

Антибиотики обладают избирательностью биологического действия. Не все микроорганизмы, находясь в контакте с антибиотиком, чувствительны к нему, и поэтому делятся на чувствительные и резистентные (устойчивые).

Одни антибиотики подавляют рост небольшого числа видов микроорганизмов и являются антибиотиками узкого спектра действия (бензилпенициллин, новобиоцин, гризеофульвин), другие угнетают рост многих микроорганизмов - антибиотики широкого спектра действия (тетрациклины, хлорамфеникол). Разница в спектре действия антибиотиков обусловлена механизмами их действия.

По механизмам действия выделяют следующие группы антибиотиков:

- Антибиотики, ингибирующие синтез клеточной стенки (пенициллины,

- цефалоспорины, бацитрацин, ванкомицин);
- Антибиотики, нарушающие функции мембран (грамицидин, нистатин, трихомицин);
- Антибиотики, избирательно подавляющие синтез нуклеиновых кислот:
 - РНК (актиномицин, гризеофульвин, канамицин)
 - ДНК (митомицины, новобиоцин, саркомицин);
- Антибиотики – ингибиторы синтеза пуринов и пиримидинов (азасерин, саркомицин);
- Антибиотики, подавляющие синтез белка (аминогликозиды, эритромицин, тетрациклины, хлорамфеникол);
- Антибиотики – ингибиторы дыхания (пиоцианин, усниновая кислота);
- Антибиотики – ингибиторы окислительного фосфорилирования (колицины, олигомицин);
- Антибиотики, обладающие антиметаболитными свойствами (пурамицин, циклосерин);
- Антибиотики – иммуномодуляторы (циклоспорины, рубомицин, оливомицин).

Антибиотики могут подавлять развитие микроорганизмов (бактериостатическое действие), убивать их (бактерицидное действие) и растворять (бактериолитическое действие).

Для доказательства антибиотической активности и избирательности действия антибиотиков на микроорганизмы ставится следующий опыт. В чашку Петри засевают сплошным газоном культуру тест-микроорганизма и накладывают стерильным пинцетом диски фильтровальной бумаги, пропитанной различными антибиотиками. Посевы инкубируют при 28 °С. После чего по образованию зон отсутствия роста делают вывод о действии антибиотиков на данный микроорганизм.

ХОД РАБОТЫ:

1. Произвести посев сплошным газоном на среду МПА.
2. Поместить на чашку 4 диска с разными антибиотиками так, чтобы они находились в максимальном удалении друг от друга и от края чашки.
3. Инкубировать в термостате.

Разложение пектиновых веществ

Пектины - это межклеточные вещества растительных тканей. Имеется три типа пектиновых веществ: протопектин, пектин, пектиновая кислота, которые подвергаются окислению или сбраживанию разнообразными микроорганизмами.

При анаэробно-молочнокислом брожении они сбраживаются маслянокислыми бактериями *Clostridium pectinovorum*, *C. felsineum* с образованием масляной кислоты, уксусной кислоты, водорода, углекислого газа.

Пектиновое брожение наблюдается при мочке лубоволокнистых растений (льна, конопли), которая необходима для отделения от пектина целлюлозных волокон этих растений, имеющих промышленное значение.

При водной (анаэробной) мочке после погружения стеблей льна в воду они набухают. При этом экстрагируются водорастворимые вещества (сахара, гликозиды, пигменты) и начинают развиваться бактерии. Сначала размножаются аэробы (вода содержит кислород). После поглощения ими кислорода создаются анаэробные условия, и начинают развиваться факультативно-анаэробные бесспорные бактерии, близкие к *E. coli*. Отделение волокон происходит во время основной стадии брожения. *C. pectinovorum* расщепляет пектин, при этом накапливаются органические кислоты, и его сменяет более кислотоустойчивый *C. felsineum*.

В росистой (аэробной) мочке льна участвуют в основном плесневые грибы.

В лабораторных условиях анаэробное разложение пектина можно воспроизвести следующим образом: снопики льна, соломы вываривают 7 - 10 мин в кипящей воде для удаления экстрактивных веществ, которые могут помешать истинному пектиновому брожению. После чего снопики помещают в пробирки с чистой водопроводной водой и кипятят еще несколько минут. Затем пробирки заражают кусочком соломы. Посевы инкубируют 7 дней при температуре 35⁰ С. Через 2-3 дня в ней начинается брожение, а через 5-8 дней оно заканчивается.

ХОД РАБОТЫ:

1. Поставить опыт пектинового брожения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7. МЕТАБОЛИЗМ БАКТЕРИЙ

План лабораторной работы.

1. Текущий тест.
2. Устный опрос.
3. Определение действия антибиотиков на выделенную культуру микроорганизмов. Построение антибиотикограммы.
4. Определение влияния УФ-лучей на микроорганизмы.
5. Изучение процесса спиртового брожения.
6. Качественные реакции на этиловый спирт.
7. Изучение процесса пектинового брожения.
8. Качественные реакции на масляную кислоту.
9. Приготовление препарата пектинолитических клостридий с окраской гранулезы раствором Люголя.

Методические рекомендации к лабораторной работе № 7

Определение действия антибиотиков на выделенную культуру микроорганизмов. Построение антибиотикограммы

Избирательное действие антибиотиков можно наблюдать по образованию зон отсутствия роста. Может быть установлено три результата: антибиотик не действует на микроорганизм (зона отсутствует), антибиотик действует слабо (диаметр зоны < 15 мм), среднее действие антибиотика (диаметр зоны от 15 до 25 мм) антибиотик оказывает сильное действие (диаметр > 25 мм) (рис. 8).

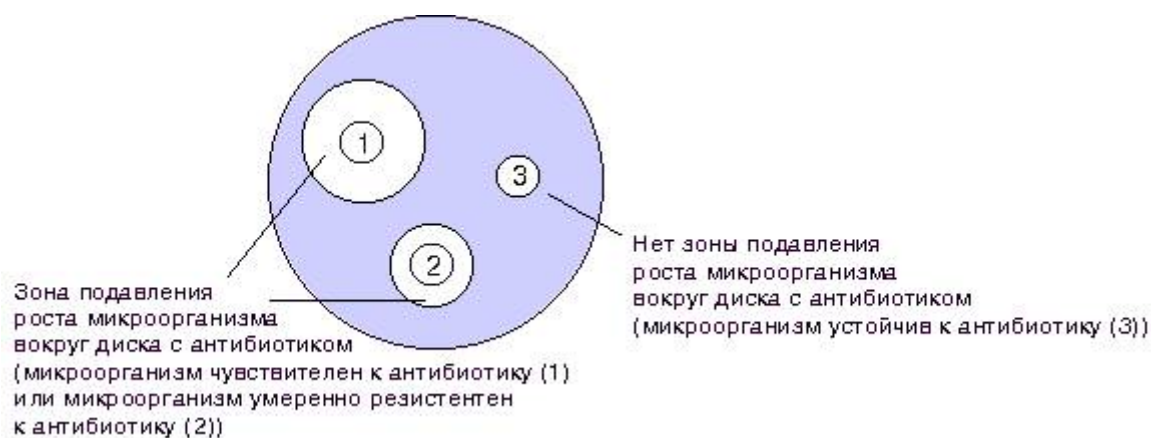


Рисунок 8. Результаты опыта по определению действия антибиотиков на тест-микроорганизм.

Метод определения чувствительности к антибиотикам (антибиотикограмма) играет важную роль в терапии инфекционных заболеваний, в особенности подострых и хронических.

Определение влияния УФ-лучей на микроорганизмы

Через 7 дней изучите чашку, подвергнутую облучению УФЛ. Рост микроорганизмов должен быть виден в том участке агара, который был закрыт картоном от действия УФЛ. Остальная часть чашки должна быть стерильна. Губительное действие лучей зависит от расстояния, времени экспозиции и вида микроорганизмов, которые подвергались облучению.

Спиртовое брожение

Анаэробное превращение углеводов с образованием этилового спирта, углекислого газа и выделением небольшого количества энергии принято называть спиртовым брожением. Вызывают спиртовое брожение дрожжи (род *Saccharomyces*), некоторые бактерии (*Sarcina ventriculii*, *Zygomonas mobilis*) и отдельные представители муковоксовых грибов. Однако практическое значение имеют только дрожжи. В их клетках встречаются различные включения: капли жира и волютин, гликоген, витамины, ауксины. В связи с этим некоторые виды дрожжей используют в качестве белковых добавок к кормовым рационам животных и птицы, что вызывает стимулирование роста и развития, увеличивает привесы. Спиртовое брожение имеет широкое распространение в природе и большое практическое значение (пивоварение, виноделие, хлебопечение).

В трубку Дунбара или сосуд Эйнгорна наливают 20% раствор сахарозы так, чтобы заполнить запаянный конец трубки или сосуда. Вносят 2-3 грамма прессованных пекарских дрожжей, закрывают отверстие трубки или сосуда ватномарлевой пробкой и ставят в термостат с температурой 30°C. Через 1- 1,5 часа у запаянного конца трубки или сосуда происходит вытеснение жидкости выделяющимся в процессе спиртового брожения углекислым газом. Об интенсивности брожения судят по количеству выделившегося углекислого газа. Этиловый спирт выявляют качественной реакцией образования йодоформа, вещества с резким характерным запахом.

К 10 мл бродящей жидкости прибавляют 10 мл 20% раствора Na_2CO_3 и около 0,1 г металлического I_2 . Смесь нагревают до полного растворения йода и его обесцвечивания. При охлаждении выпадают желтые кристаллы йодоформа с характерным запахом.

ХОД РАБОТЫ:

1. Внимательно рассмотреть и зарисовать в тетради трубку Дунбара или сосуд Эйнгорна с опытом по спиртовому брожению. По количеству выделившегося CO_2 сделать вывод об интенсивности брожения. Поставить пробу на получение йодоформа и убедиться в наличии спирта в бродящей жидкости.

Учет результатов постановки опыта пектинового брожения

Чтобы убедиться в присутствии в тканях растения пектинразлагающих бактерий, следует приготовить препарат для микроскопирования. Для этого на предметное стекло наносят каплю раствора Люголя на гликоген и гранулезу, затем туда же с вымокшего стебля растения отжимают каплю бродящей жидкости или вносят небольшой отрезок лубяной ткани. Препарат накрывают покровным стеклом и микроскопируют. Клетки пектинразлагающих бактерий отчетливо видны благодаря темнобурому или фиолетовому окрашиванию гранулезы.

ХОД РАБОТЫ:

1. Приготовить препарат раздавленная капля с окраской раствором Люголя, внимательно рассмотреть его при большом увеличении микроскопа, найти клетки клостридий, сделать рисунок в тетради.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №8. МОЛОЧНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ

План лабораторной работы.

1. Текущий тест.
2. Устный опрос.
3. Изучение процесса молочнокислого брожения.
4. Качественные реакции на молочную кислоту.
5. Приготовление фиксированного препарата молочнокислых бактерий.

6. Посев плесневых грибов и бактерий на среду с крахмалом.

Методические рекомендации к лабораторной работе № 8

Молочнокислое брожение

Основным свойством молочнокислых бактерий, по которому их объединяют в отдельную обширную группу микроорганизмов, является их способность образовывать в качестве главного продукта брожения молочную кислоту. В группу молочнокислых бактерий объединены различные по систематическому положению микроорганизмы.

Известны два типа молочнокислого брожения: гомоферментативное и гетероферментативное. Они отличаются друг от друга возбудителями, субстратами брожения, механизмом превращения углеводов и конечными продуктами (табл. 1).

Естественные накопительные культуры этих микроорганизмов содержатся в молоке, кислой капусте, в молочных продуктах, на растениях, в кислом тесте, силосе, в кишечнике человека и животных.

Отличительной чертой молочнокислых бактерий являются выраженные антагонистические свойства, которые используются в практике с глубокой древности для квашения овощей, силосования кормов, изготовления кисломолочных продуктов.

Для ознакомления с морфологией молочнокислых бактерий готовят их фиксированные препараты из заквасок или рассола. Проводят обезжиривание их смесью равных объемов этилового спирта и эфира (смесь Никифорова), для чего заливают ею мазок и дают смеси испариться. Препараты окрашивают метиленовой синью в течение 5 мин, промывают водой, микроскопируют.

Присутствие в исследуемом продукте (простокваша, кефир, рассол) молочной кислоты можно обнаружить, проведя пробу с фенолом.

Проба с фенолом:

К исследуемому продукту приливают реактив, приготовленный путем смешивания 5% растворов карболовой кислоты и хлорного железа в соотношении 1:2 (растворы разбавляют двойным количеством воды). В присутствии молочной кислоты первоначальный аметистово-синий цвет

переходит в соломенно-желтый, который дает молочнокислое железо.

Таблица 1

Характеристика молочнокислого брожения

Тип брожения	Путь превращения углеводов	Основные конечные продукты	Возбудители
Гомоферментативное	Гликолиз (путь Эмбдена-Мейергофа- Парнаса)	Молочная кислота	p. Streptococcus (S. faecalis), p. Lactococcus (L. lactis) p.Pediococcus (P.cerevisiae) .Lactobacillus n/p Thermobacterium n/pStreptobacterium (L.delbruckii, L.bulgaricus, L. lactis, L. plantarum, L.casei
Гетероферментативное	Гексозомононфосфатный (пентозофосфатный окислительный, путь Варбурга-Диккенса-Хореккера)	Молочная кислота, уксусная кислота, этиловый спирт, CO ₂ , диацетил, ацетоин	p.Leuconostoc (L. mesenteroides, L. lactis) p.Lactobacillus n/pBetabacterium (L.fermentum, L. brevis, L. buchneri)

ХОД РАБОТЫ:

1. Приготовить фиксированный препарат молочнокислых бактерий, после микроскопии зарисовать, отмечая морфологические особенности культуры.
2. Поставить пробу с фенолом и убедиться в наличии молочной кислоты в исследуемом продукте.

Посев плесневых грибов и бактерий на среду с крахмалом

Многие микроорганизмы обладают способностью утилизировать крахмал – основное запасное вещество высших растений и зеленых водорослей. Для этого ими используются ферменты – амилазы,

секретируемые в окружающую среду. Наличие такого рода ферментов можно показать при культивировании на среде с крахмалом.

ХОД РАБОТЫ:

1. Посеять предлагаемые культуры (плесневые грибы, бациллы) на среду с крахмалом широким штрихом S-образной формы.
2. Инкубировать в термостате.
3. Залить чашку раствором йода и наблюдать зону гидролиза крахмала в случае наличия амилалитической активности.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №9. НЕПОЛНОЕ ОКИСЛЕНИЕ

План лабораторной работы.

1. Текущий тест.
2. Устный опрос.
3. Изучение амилалитической активности грибов на среде с крахмалом.
4. Изучение симбиотического организма с участием уксуснокислых бактерий – чайного гриба
5. Закладка опыта по получению лимонной кислоты.

Методические указания к лабораторной работе №9

Уксуснокислое брожение

Это процесс окисления этилового спирта до уксусной кислоты и воды. Уксуснокислое брожение – неполное окисление, то есть такой тип дыхания, при котором в качестве продуктов обмена выделяются частично окисленные органические соединения. Возбудители его – грамотрицательные, бесспорные палочки, облигатные аэробы, родов *Acetobacter* и *Gluconobacter*. Наиболее часто встречаются *Acetobacter aceti*, окрашивается йодом в желтый цвет. *Acetobacter pasteurianum* очень сходен с *Acetobacter aceti*, но отличается тем, что йодом окрашивается в синий цвет. В отличие от двух названных видов *Acetobacter xylinum* образует мощную слизистую пленку, которая впоследствии уплотняется, становится хрящевидной и значительной толщины, за счет выделения целлюлозы, йодом окрашивается в синий цвет. Этот вид вместе с дрожжевыми грибами образует так

называемый «чайный гриб» и употребляется в быту для изготовления напитка, известного под названием чайного кваса. *Acetobacter orleanense* развивается на слабых растворах виноградного вина, используется в производстве уксуса старым французским способом. *Acetobacter schutzenbachii* является важнейшей культурой в получении уксуса новым немецким способом. Большое практическое значение имеет *Acetobacter suboxydans* в промышленном способе получения витамина «С» (аскорбиновой кислоты), осуществляя реакцию окисления сорбита в сорбозу. Уксуснокислые бактерии – вредители пивоваренного производства, хлебопечения, соковых и винных заводов, процесс широко распространен в природе.

Возбудители уксуснокислого брожения широко распространены в природе. Они встречаются в почве, на поверхности зрелых ягод, в закисшем пиве и вине.

Для наблюдения за ходом уксуснокислого брожения в колбу низким слоем наливают 50 мл пива, слегка подкисленного уксусной кислотой, и оставляют стоять при 25 - 30 ° С. Через 5-7 суток на поверхности пива появляется серовато-белая пленка уксуснокислых бактерий - *Acetobacter rancens*, *A. pasteurianum*. При более низкой температуре 20 - 22 ° С развиваются представители других видов - *A. aceti*, *A. xylinum*.

Для микроскопического исследования в каплю раствора Люголя на гликоген и гранулезу на предметном стекле вносят кусочек пленки уксуснокислых бактерий, накрывают препарат покровным стеклом, микроскопируют. У *A. pasteurianum* и *A. kutzinianum* оболочка клетки синее от действия на них йода. Другие бактерии *A. rancens* и *A. aceti* посинение не дают и окрашиваются йодом в желтый цвет.

Качественной реакцией на уксусную кислоту является образование грушевой эссенции (уксусноэтилового эфира) при нагревании 40 мл исследуемого раствора с 2 мл 96 ° этилового спирта и 2 мл концентрированной серной кислоты.

ХОД РАБОТЫ:

1. Рассмотреть пленку на поверхности пива, внести результаты наблюдений в тетрадь.

2. Приготовить препарат «раздавленная капля» с окраской раствором Люголя кусочка пленки уксуснокислых бактерий. Промикроскопировать и зарисовать в тетради.

3. Поставить качественную реакцию на уксусную кислоту и убедиться в ее присутствии в исследуемом продукте.

Микроскопическое изучение чайного гриба

ХОД РАБОТЫ:

1. Готовят препарат "раздавленная капля" из тонкой пленки чайного гриба. Этот симбиотический организм возникает при взаимодействии дрожжей и уксуснокислых бактерий *Acetobacter xylinum*. Для лучшей картины можно подкрасить препарат раствором Люголя.

Закладка опыта по получению лимонной кислоты грибом Aspergillus niger

Характерной особенностью плесневых грибов является неполнота окисления углеводов. При этом образуются различные органические кислоты – лимонная, щавелевая, глюконовая и другие. Большое практическое значение имеет получение лимонной кислоты биохимическим способом с помощью гриба *Aspergillus niger*.

ХОД РАБОТЫ:

1. В пробирки со скошенным агаром, на котором выращена спорулировавшая культура гриба, внести 5 мл стерильной водопроводной воды.

2. Ватно-марлевую пробку заменить на стерильную резиновую и интенсивным перемешиванием смыть споры с поверхности скошенного агара.

3. Полученную суспензию спор внести в колбу со средой Буткевича (сахароза 10%), разлитой по 50 мл в конические колбы.

4. Инкубировать в термостате до следующего занятия.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №10. ДЫХАНИЕ

План лабораторной работы.

1. Текущий тест.
2. Устный опрос.
3. Получение лимонной кислоты культивированием гриба *Aspergillus niger*.
4. Определение продукции лимонной кислоты титрованием.
5. Разложение целлюлозы в аэробных и анаэробных условиях.

Методические указания к лабораторной работе №10

*Получение лимонной кислоты культивированием гриба *Aspergillus niger**

Колбы с выросшей культурой *Aspergillus niger* зарисовывают, а затем осторожно сливают культуральную жидкость в воронку с бумажным фильтром и отфильтровывают культуральную жидкость в новую колбу. Фильтры после этого сбрасывают пинцетом в дезраствор. Полученная культуральная жидкость содержит лимонную кислоту.

Определение продукции лимонной кислоты титрованием

ХОД РАБОТЫ:

В колбу для титрования отбирают 10 мл культуральной жидкости, разбавляют дистиллированной водой и добавляют несколько капель спиртового раствора фенолфталеина. Титруют 0,1 N гидроксидом натрия до слабо-розовой окраски не исчезающей в течение 3 минут.

По результатам титрования определяют:

а) содержание лимонной кислоты в граммах во всем объеме питательной среды и б) процент выходы лимонной кислоты.

Устанавливают количество лимонной кислоты в граммах в 1 мл 0,1 N раствора ее. Молекулярный вес лимонной кислоты – 192, грамм-эквивалент – 64. Значит, в 1 л 1 N раствора находится 64 г, а в 1 л 0,1 N раствора – 6,4 г, в 1 мл 0,1 N раствора – 0,0064 г.

Пример расчета: а) содержания лимонной кислоты в граммах.

На титрование 10 мл фильтрата пошло 25 мл 0,1 N NaOH. Определяем, сколько щелочи необходимо, чтобы нейтрализовать лимонную кислоту во всем объеме (50 мл).

10 мл – 25 мл 0,1 N NaOH

50 мл - x

x = 125 мл

Так как вещества соединяются в эквимольных количествах, то при титре лимонной кислоты 0,1 N, равном 0,0064г содержание в граммах лимонной кислоты в 50 мл среды в колбе

$$0,0064 \text{ г} \times 125 = 0,8 \text{ г}$$

б) Процент выхода лимонной кислоты

В колбе было 50 мл, содержащих 10% сахарозы, то есть количество сухого вещества сахарозы в 5- мл объема будет равно 5 г.

Если бы лимонной кислоты в 50 мл было 5 г, то ее выход равнялся 100%, но в опыте получили 0,8 г.

5 г - 100%

0,8 г - x

x = 16%.

Разложение клетчатки

Разложение клетчатки (целлюлозы) - это основной процесс, в круговороте углерода на Земле. Полисахарид целлюлоза является одной из главных составных частей оболочек растительных клеток, которые в огромном количестве попадают в почву, где подвергаются разложению в аэробных и анаэробных условиях под действием бактерий, актиномицетов, грибов.

Процесс минерализации органических безазотистых соединений, в частности клетчатки, в природе происходящий в анаэробных условиях (в почве, водоемах) при участии микроорганизмов, является по существу маслянокислым брожением ее. Среди ряда образующихся при этом процессе продуктов распада постоянны только масляная кислота и углекислый газ. Этот процесс имеет очень большое значение в природе, в круговороте углерода, так как обеспечивает его возврат в атмосферу в виде углекислого газа, который ассимилируется зелеными растениями. Кроме того продукты гидролиза клетчатки (дисахара, моносахара, органические кислоты, спирты) могут служить энергетическим материалом для других микроорганизмов.

Возбудителем анаэробного разложения клетчатки является *Clostridium omelianskii*, ведущий процесс при температуре 30-35°C. Среди представителей группы обнаружены и термофильные формы – *Clostridium thermocellum*.

Широко распространен процесс аэробного разложения клетчатки. Масса растительных и корневых остатков разлагается на поверхности почвы, а также в верхних, хорошо аэрируемых ее горизонтах. Конечными продуктами аэробного распада являются углекислый газ и вода. Образующиеся в процессе аэробного распада сахара и оксикислоты, служат энергетическим материалом для группы азотфиксирующих бактерий, кроме того, при распаде клетчатки могут образоваться уроновые кислоты, которые соединяясь с белком принимают участие в образовании гумуса (уронопротеиновый комплекс). В аэробном разложении клетчатки принимают участие грибы (плесени и дрожжи), актиномицеты, бактерии и миксобактерии.

Для выделения целлюлозоразлагающих микроорганизмов существует ряд методов, в большинстве случаев основанных на применении селективных сред.

Для обнаружения аэробных целлюлозоразлагающих микроорганизмов жидкую среду наливают в колбочки, анаэробных - в пробирки высоким слоем. В качестве единственного источника углерода в среду помещают фильтровальную бумагу: в колбочки опускают складчатый фильтр, в пробирки полоску бумаги. После стерилизации колбы и пробирки засевают почвой. Через несколько недель (срок варьирует в зависимости от особенностей почвы) определяют степень разложения бумаги и микроскопируют микроорганизмы, вызывающие ее распад.

Для микроскопического исследования готовят препараты раздавленная капля с поверхности распадающейся фильтровальной бумаги.

Аэробные бактерии на уровне жидкости на бумаге образуют налет желтого или оранжевого цвета (миксобактерии). Когда бактерии хорошо разовьются, они нарушают целостность бумаги, фильтр постепенно оседает и на нем образуется слизь. Кроме того, в разрушении клетчатки в аэробных условиях активно участвуют грибы и актиномицеты.

При анаэробном процессе развитие целлюлозоразлагающих микроорганизмов сопровождается интенсивным помутнением среды, пенообразованием и изменением клетчатки. Фильтровальная бумага желтеет и постепенно разрушается бактериями (преимущественно р *Clostridium*). При микроскопировании в оставшихся волокнах бумаги обнаруживаются тонкие, длинные, слегка изогнутые клетки с круглой спорой на конце.

ХОД РАБОТЫ:

1. Внимательно рассмотреть, сравнить и зарисовать колбы и пробирки с опытами по разложению целлюлозы, заложенными в разные сроки (3 недели, 2 недели, 1 неделя, контроль).
2. Приготовить и рассмотреть в микроскоп препараты «раздавленная капля» разрушителей целлюлозы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №11. ЦИКЛ АЗОТА

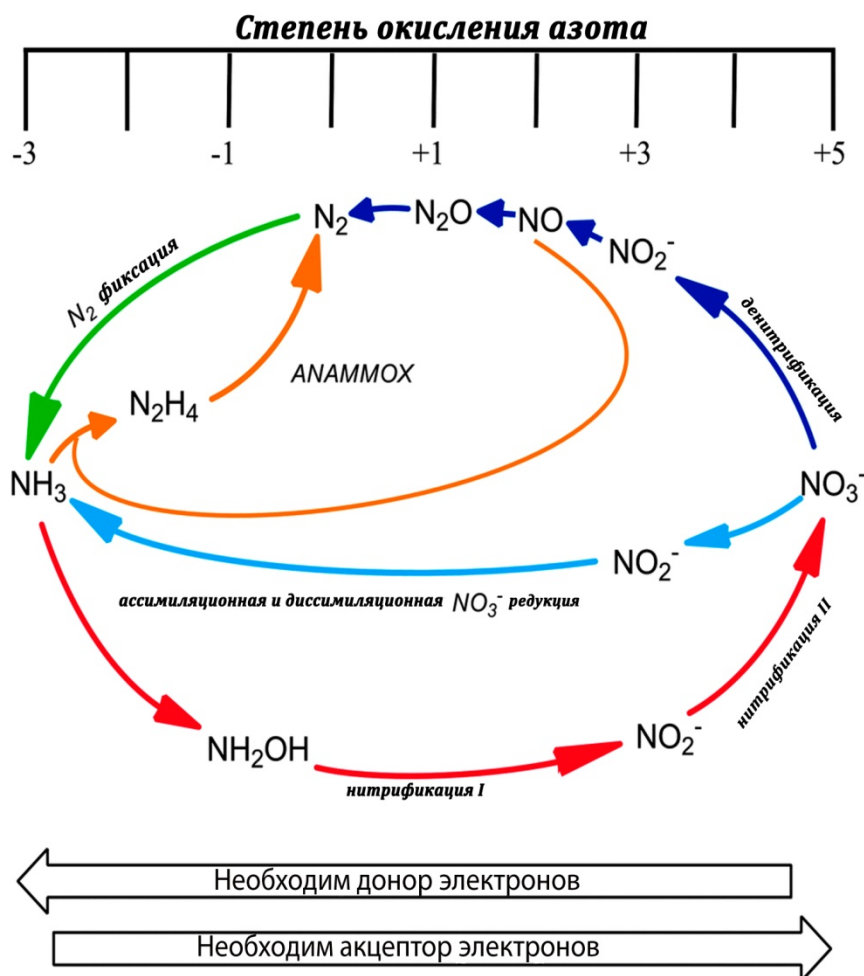
План лабораторной работы.

1. Текущий тест.
2. Устный опрос.
3. Изучение аммонификации белка и мочевины.
4. Посев микроорганизмов на среду с нитратами

Методические указания к лабораторной работе №11

Цикл азота

Азот составляет 80% земной атмосферы. Это один из основных элементов, необходимых для развития всех живых организмов на Земле. Чаще всего азот усваивается в виде аммонийных солей или нитратов. Микроорганизмы принимают участие практически во всех процессах, связанных с глобальным круговоротом азота. Основными процессами в рамках данного биогеохимического цикла являются: азотфиксация, аммонификация, нитрификация, ассимиляционная редукция нитратов, денитрификация (нитратное дыхание) и процесс анаэробного окисления аммония (ANAMMOX).



Азотфиксация

Газообразный азот химически инертен, он не может быть непосредственно использован растениями, животными и большинством микроорганизмов. Его запасы в атмосфере практически неисчерпаемые, однако только специфическая группа микроорганизмов может связывать атмосферный азот - азотфиксирующие бактерии. Таким образом, азотфиксацией называется биологический восстановительный процесс превращения микроорганизмами атмосферного азота в азот аммонийный с последующим его включением в белковые молекулы.

Представителей свободноживущих азотфиксаторов можно встретить среди видов следующих родов: *Azomonas*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azotobacter*, *Clostridium*, многие цианобактерии и аноксигенные фототрофные бактерии.

Наибольший интерес представляют бактерии родов *Azotobacter* и *Clostridium*. Представители данных родов широко представлены в почве.

Аммонификация

Аммонификацией называются процессы разложения белка и других органических азотсодержащих соединений с их минерализацией и высвобождением аммиака. К аммонификации способны многие виды спорообразующих и необразующих спор бактерий, а также различные актиномицеты и мицелиальные грибы.

Аммонификация белковых веществ

Все аммонификаторы выделяют в среду протеолитические ферменты, под воздействием которых осуществляется гидролиз белка до аминокислот. Образовавшиеся аминокислоты используются аммонификаторами в конструктивных и энергетических процессах. Характерными продуктами распада белков являются аммиак и сероводород, могут выделяться меркаптаны, скатол и индол, имеющие неприятный запах.

Разложение белков может идти в аэробных и анаэробных условиях. В аэробных условиях азотсодержащие органические соединения разлагают виды родов *Bacillus* и *Pseudomonas*, представители семейства *Enterobacteriaceae*, различные актиномицеты и мицелиальные грибы. Анаэробную аммонификацию осуществляют некоторые виды рода *Clostridium*. В условиях ограниченного доступа воздуха аммонификацию проводят факультативно-анаэробные бактерии и бациллы.

Для изучения аммонификации белковых веществ в качестве питательной среды можно использовать мясной бульон с добавлением 3% пептона. По 30 мл среды разливают в колбы емкостью 100 мл и добавляют 1/3 чайной ложки почвы. Колбы закрывают ватными пробками. Между пробкой и стенками горлышка колбы подвешивают две бумажки – красную лакмусовую, смоченную дистиллированной водой (для обнаружения выделяющегося аммиака), и фильтровальную, смоченную уксуснокислым свинцом (для выявления сероводорода и меркаптана). Сверху колбы закрывают пергаментной бумагой.

На 3-5 сутки инкубации при температуре 28-30°C опыт заканчивается и содержимое в колбе анализируют.

О развитии аммонифицирующих бактерий судят по помутнению среды, образованию в ней хлопьев или осадка, наличию пленки на поверхности, выделению аммиака и сероводорода. О выделении аммиака свидетельствует посинение лакмуса, об образовании сероводорода – почернение бумаги, пропитанной уксуснокислым свинцом.

ХОД РАБОТЫ:

1. Приготовьте препараты «раздавленная капля» и просмотрите под микроскопом. Зарисуйте, описывая морфологические особенности наблюдаемых клеток, отмечая подвижность, наличие или отсутствие спор.

Аммонификация мочевины

Мочевина – конечный продукт превращения соединений азота в организме человека и животных. Бактерии, вызывающие аммонификацию мочевины, вырабатывают экзофермент уреазу, который гидролизует мочевины до аммиака. Уробактерии обитают в почве, в рубце жвачных животных, в сточных водах. Среди них есть кокки, сарцины, бациллы.

Для получения накопительной культуры уробактерий готовят среды, содержащие мочевины, которые заражают почвой или навозом и ставят в термостат при 25-30°C. Для обнаружения аммиака, выделяющегося в атмосферу, под ватную пробку подвешивают красную лакмусовую бумажку, смоченную дистиллированной водой. На 3-5 сутки опыт заканчивают и культуру подвергают анализу.

ХОД РАБОТЫ:

1. Установите выделение аммиака по посинению красной лакмусовой бумажки, а накопление аммиака в субстрате – капельной реакцией с реактивом Несслера (на фарфоровой пластинке при добавлении субстрата образуется буро-рыжий осадок). Приготовьте препарат, промикроскопируйте и зарисуйте особенности морфологии культуры.

Нитратредукция и денитрификация

Восстанавливать нитраты до нитритов способны микроорганизмы, образующие фермент нитратредуктазу и использующие нитраты в качестве источника азота. Значительно реже встречается способность восстанавливать нитраты до молекулярного азота, что характерно для микроорганизмов, использующих нитраты как акцептор водорода при окислении органических соединений.

Способность к восстановлению нитратов выявляют на среде, состоящей из МПБ и 0,2% KNO_3 . Среду разливают в пробирки и опускают на дно каждой поплавки. Засейте среду клетками исследуемого микроорганизма и поместите в термостат при температуре 28-30°C.

По окончании опыта отметьте характер роста микроорганизма, накопление в поплавке газа определите качественными реакциями присутствие в культуральной жидкости нитритов и нитратов.

Наличие в среде нитратов можно оценить по реакции с дифениламиновым реактивом – при наличии в среде нитратов развивается темно-синее окрашивание. Нитриты мешают определению, т.к. дают такую же реакцию.

О присутствии нитритов можно судить по реакции с реактивом Грисса – в присутствии нитритов он приобретает цвет от розового до малинового, в зависимости от их концентрации.

Восстановление нитритов до N_2 обнаруживают по накоплению газа в поплавке.

ХОД РАБОТЫ:

1. Сделайте выводы о полноте прохождения процесса денитрификации, исходя из результатов качественных реакций с дифениламином и реактивом Грисса и наблюдения за газообразованием.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №12. МИКРОФЛОРА ВОДЫ И ПОЧВЫ

План лабораторной работы.

1. Текущий тест.
2. Устный опрос.

3. Изучение денитрификации.
4. Посев воды и почвы на питательные среды.

Методические указания к лабораторной работе №12

Посев воды на питательные среды

Чем больше в воде микроорганизмов, тем сильнее она загрязнена. Особенно много бактерий в воде открытых водоемов – рек, озер, прудов. Воды глубинные (подземные, ключевые, артезианские) намного беднее микробами. Объясняется это тем, что просачиваясь через слои почвы, они подвергаются естественной фильтрации. Бедна микроорганизмами дождевая вода и выпавший снег. Для определения качества водопроводной воды существует общепризнанный критерий.

- Если в 1 мл воды до 100 мкробных клеток, вода признается хорошей.
- Вода, содержащая от 100 до 500 клеток в 1 мл, считается допустимой к употреблению
- Наличие 500 клеток в 1 мл делает воду непригодной для употребления в некипяченом виде.

Микрофлора воды отличается от микрофлоры воздуха и зависит от источника, из которого она взята. Наличие в воде кишечной палочки, энтерококков и энтеровирусов свидетельствует о возможности присутствия патогенных бактерий – возбудителей тифа, паратифа, дизентерии, холеры. Очистка и обеззараживание питьевой воды осуществляется фильтрацией и хлорированием. Качество очистки устанавливается на основании бактериологического анализа.

Количественный учет бактерий в воде

Объектом исследования может служить речная или водопроводная вода. Перед посевом речной воды готовят серию разведений. Обычно разведения готовят в водопроводной стерильной воде. Для приготовления разведения 1 мл исходной суспензии стерильной пипеткой переносят в пробирку с 9 мл стерильной воды, т.е. готовят десятичные разведения. Таким образом получено 1-е разведение, 1: 10. Полученную в 1-м разведении суспензию тщательно перемешивают с помощью новой

стерильной пипетки, затем берут 1 мл полученной взвеси и переносят во вторую пробирку – это 2-е разведение, 1: 100. Таким же образом готовят и последующие разведения. Для приготовления каждого разведения следует использовать отдельную пипетку! Высеивать суспензии можно поверхностным или глубинным способом.

Исследуемую воду соответствующего разведения в количестве 1 мл внесите на дно стерильной чашки Петри и залейте расплавленной и охлажденной до 48°C средой МПА, осторожно перемещайте содержимое чашки вращательными движениями. Для выявления в исследуемой воде группы кишечных бактерий каплю 2-3-го разведения засеять на дифференциально-диагностические среды – Эндо, Левина, Плоскирева. Посевы инкубировать в термостате при 37°C.

Через неделю подсчитывают число колоний, выросших на чашке Петри.

Посев почвы на питательные среды

Почва обильно заселена микроорганизмами и служит поставщиком их во все другие естественные среды. При выделении микроорганизмов почвы существенным недостатком является отсутствие универсальной среды, пригодной для развития всех микроорганизмов. Так, на МПА развиваются в основном бактерии, способные усваивать органические формы азота. Нитрифицирующие, целлюлозоразлагающие, азотфиксирующие и другие микробы на этой среде не выявляются. Для более полного представления о населенности почвы делают посевы также и на специальные избирательные среды или же используют метод прямого счета микроорганизмов под микроскопом.

Перед посевом готовят десятикратные разведения. Для этого навеску почвы в 1 г вносят в стерильную колбу емкостью 250 мл со 100 мл водопроводной воды. Колбу встряхивают на качалке в течение 5 минут. После этого суспензии дают отстояться 30 секунд, чтобы осели крупные частицы, и тотчас же используют ее для приготовления разведений. При этом учитывают, что в полученной суспензии почва разведена в 100 раз (1:100). Последующие разведения готовят так, как описано ранее (рис. 9).

Для посева используйте 3, 4, 5 и 6-е разведения, посев можно производить как поверхностно, так и глубинно. Чашки с засеянными средами поместите в термостат на 28-30°C.

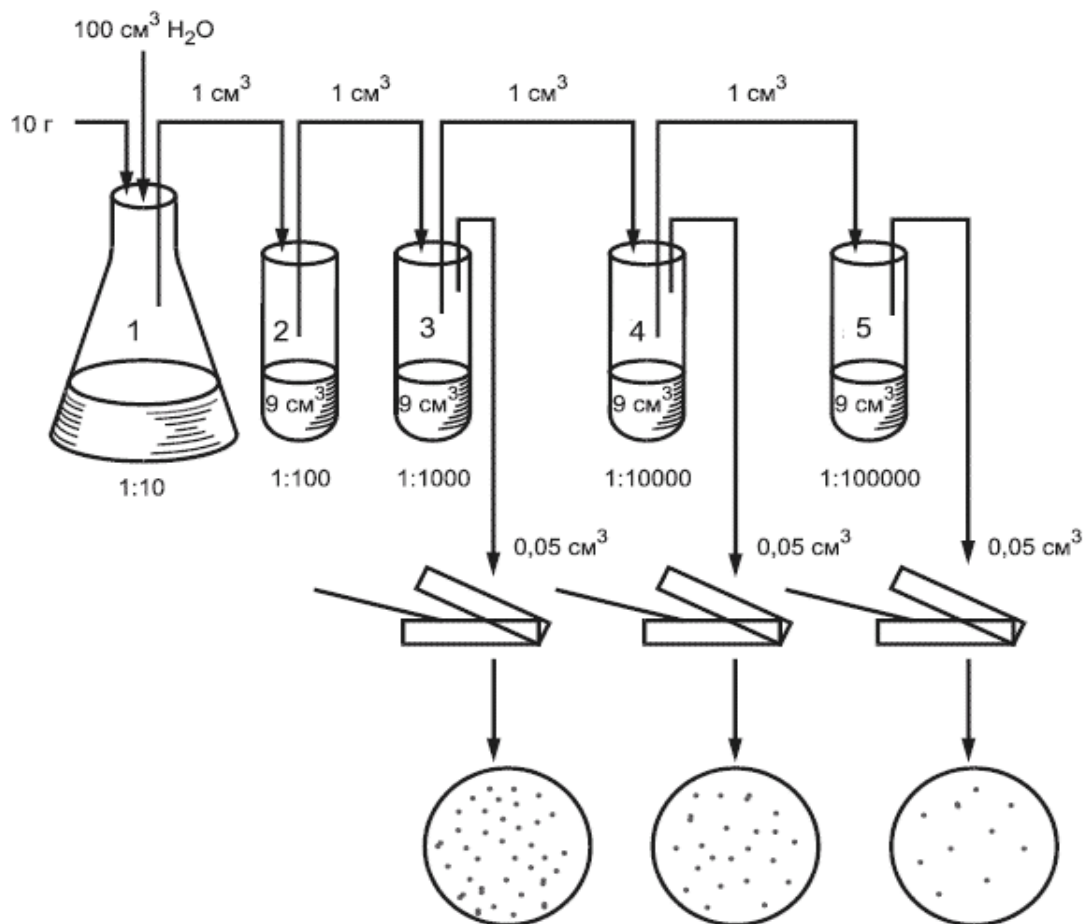


Рисунок 9. Схема приготовления разведений почвы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №13. ГЛОБАЛЬНЫЙ ЦИКЛ СЕРЫ

План лабораторной работы.

1. Текущий тест.
2. Устный опрос.
3. Получение накопительных культур сульфатредуцирующих организмов.
4. Учет результатов посева воды и почвы.

Методические указания к лабораторной работе №13

Цикл серы

Сера является одним из важнейших элементов для любого живого организма. Наряду с углеродом, азотом, кислородом, водородом и

фосфором, серу причисляют к так называемым органогенам, т.е. элементам, которые постоянно и в значительных количествах входят в состав живых организмов. Сера входит в состав аминокислот – цистеина и метионина, входит в состав многих коферментов, а также содержится в эфирных маслах растений. В различных белках содержание серы варьирует и в некоторых случаях может достигать 3%.

Сера - элемент, образующий множество различных соединений. Это связано в первую очередь с ее переменной валентностью, которая может принимать значения от -2 до +6. Как и в случае с азотом, в органических соединениях сера находится в полностью восстановленной форме. Все процессы превращений соединений серы можно, таким образом, разделить на четыре группы:

- Процессы при которых степень окисления серы не изменяется;
- Окислительные процессы (степень окисления возрастает);
- Восстановительные процессы (степень окисления понижается) (рис. 10).

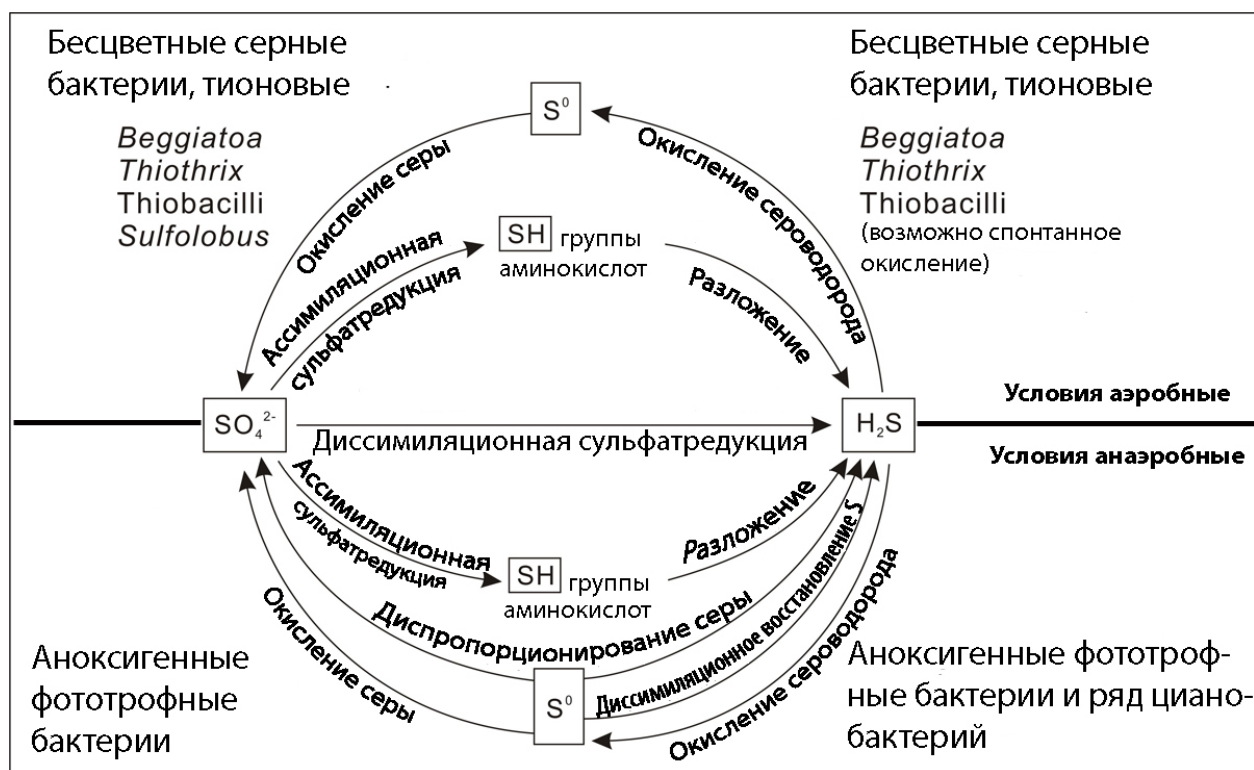


Рисунок 10. Цикл серы

К первой группе относится минерализация серы, то есть высвобождение серы из состава органических веществ при гниении. При этом происходит отщепление сероводорода. При этом сероводород может выделяться в процессе получения бактериями новых аминокислот (серина, глутамата и др.), или при катаболическом использовании цистеина.

Вторая группа – окисление сероводорода хемосинтетиками с участием кислорода (тионовые, бесцветные серобактерии), или окисление его фотосинтетиками в анаэробных условиях (зеленые и пурпурные серобактерии).

К восстановительным процессам относится в первую очередь диссимиляционная и ассимиляционная сульфатредукция.

Сульфатредукция

Физиологическую группу бактерий, восстанавливающих сульфат, называют сульфатредуцирующими, десульфатирующими или сульфидобразующими. Их отличает способность к переносу водорода с субстрата на сульфат как конечный акцептор электронов и, таким образом, к восстановлению сульфата до сульфида. В этом процессе происходит перенос электронов и энергия запасается благодаря фосфорилированию в электронтранспортной цепи в анаэробных условиях. Большая часть сероводорода, образующегося в природе, возникает благодаря этой реакции. Сульфатредуцирующие бактерии являются облигатными анаэробами, помимо сульфата они восстанавливают также сульфит и тиосульфат.

Сульфатредуцирующие бактерии учтывают посевами на средах, содержащих сульфаты и небольшие количества солей закисного железа. Образующийся при восстановлении сульфата бактериями сероводород связывается железом с образованием черного осадка в жидкости или черных колоний в агаре. Таким образом, рост сульфатредуцирующих бактерий можно различить на фоне развития в среде других организмов.

Получение накопительных культур сульфатредуцирующих организмов

1) Культивирование сульфатредукторов в жидкой среде.

ХОД РАБОТЫ:

1. В колбу с жидкой средой Таусона внести соль Мора.
2. После растворения соли Мора, внести на дно пробирки небольшое количество почвы, и залить пробирку средой Таусона почти доверху.
3. Аккуратно закрыть пробирку резиновой пробкой, так чтобы не оставалось пузырей воздуха.
4. Культивировать в термостате неделю. О росте СРБ судят по почернению среды и выпадению FeS на стенках пробирки.

2) Культивирование сульфатредукторов по методу Штурм.**ХОД РАБОТЫ:**

1. В крышку от стерильной чашки Петри внести почву и шпателем распределить ее тонким слоем.
2. Залить почву расплавленной и остуженной до 45 градусов средой Таусона с добавлением соли Мора.
3. Донышком от чашки Петри придавить слой расплавленного агара так, чтобы не оставалось пузырей воздуха.
4. Культивировать в термостате неделю. Рост СРБ наблюдается в центре чашки в виде черных колоний.

Учет результатов посева почвы на плотные питательные среды

Лучшим разведением следует считать то, при высеве которого на плотной питательной среде вырастает от 50 до 100 колоний. Для точности подсчета из каждого разведения засевают по 2-4 чашки Петри. Колонии бактерий подсчитывают через 5-7 суток. Количество клеток в 1 г сырой почвы вычисляют по формуле

$$M = a \times 10^p / V, \text{ где}$$

M – количество клеток в 1 г (мл)

a – среднее число колоний при высеве данного разведения

p – степень разведения

V – объем суспензии, взятый для посева в мл.

При пересчете количества клеток на 1 г воздушно-сухой или абсолютно-сухой почвы полученный результат делят на массу абсолютно-сухой почвы, взятой для анализа.

МПА – богатая питательными веществами среда, на которой развиваются многие гетеротрофные микроорганизмы. При высеве из почвы на МПА вырастают микроорганизмы различных систематических и физиологических групп: грамотрицательные, не образующие эндоспор бактерии родов *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia*; грамположительные спорообразующие палочки рода *Bacillus*; кокки родов *Micrococcus* и *Rhodococcus*, различные микобактерии, некоторые высшие актиномицеты и плесневые грибы.

Учет результатов посева воды

При посеве воды без разведения количество выросших колоний соответствует содержанию их в 1 мл воды. При посеве поверхностно 1 капли (0,05 мл) пересчет количества колоний, выросших на чашке на 1 мл производят умножая полученное число колоний на 20. Например, если посев производили 1мл из 3-го разведения и на чашке выросло 85 колоний, то в 1мл воды содержится: $85 \times 10^3 = 85000$ бактериальных клеток.

Кишечные палочки выявляются на среде Эндо в виде красных колоний с металлическим блеском, на среде Левина растут в виде черных или темно-синих колоний, окруженных светлым ободком, на среде Плоскирева окрашены в розовый цвет. В речной воде обнаруживаются представители родов *Escherichia*, *Proteus*, *Bacterium*, *Micrococcus*.

Каталазная активность

Каталаза свойственна большинству аэробных микроорганизмов. Облигатные анаэробы и многие микроаэрофилы каталазу не образуют. Фермент разлагает перекись водорода с образованием кислорода и воды.

Если исследуемый микроорганизм выращивается на поверхности плотной питательной среды, нанесите несколько капель 10% раствора H_2O_2 на колонию в чашке или на скошенный агар. Сразу же и в течение 5 минут наблюдайте за образованием пузырьков газа, что свидетельствует о наличии

в клетках каталазы. Если бактерии выращены в жидкой среде, в этом случае к 1 мл жидкой культуры добавьте 1 мл раствора перекиси и наблюдайте за постоянным образованием пузырьков.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №14. БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ФОТОСИНТЕЗ

План лабораторной работы.

1. Текущий тест.
2. Устный опрос.
3. Микроскопия культур сульфатредуцирующих организмов.
4. Определение количества сероводорода йодометрическим методом.
5. Знакомство с колонкой Виноградского, зелеными и пурпурными серными бактериями.
6. Микроскопия культур цианобактерий.

Методические указания к лабораторной работе №14

Микроскопия культур сульфатредуцирующих организмов

Пипеткой отобрать небольшое количество культуральной жидкости из пробирок с жидкой средой Таусона и нанести на предметное стекло. Накрыть покровным стеклом и микроскопировать с объективом 40х. Часто наблюдаются подвижные, чуть искривленные клетки рода *Desulfovibrio*.

Определение количества сероводорода

Для определения количества сероводорода, выделенного культурой сульфатредукторов за время культивирования в жидкой среде, применяют метод йодометрического титрования.

ХОД РАБОТЫ:

1. В колбу для титрования внести 10 мл 0,1 Н раствора йода в KI.
2. Вылить в эту же колбу все содержимое пробирки с культурой СРБ и размешать.
3. Для удаления остатков FeS и полного учета выделившегося сероводорода, в пустую пробирку внести 5 мл 10% HCl, закрыть резиновой пробкой и перевернуть пробирку несколько раз.

4. Вылить раствор в колбу для титрования.
5. Титровать 0,1 N раствором тиосульфата натрия до обесцвечивания.
6. Рассчитать выход сероводорода по формуле:

$$\text{H}_2\text{S (мг/л)} = (V_1H_1 - V_2H_2) \times 17 \times 1000 / V,$$

где V – общий объем пробы (20 мл)

V₁ - объем раствора йода (10 мл)

V₂ – объем тиосульфата, пошедшего на титрование

H₁ – нормальность раствора йода (0,1 N)

H₂ – нормальность раствора тиосульфата натрия (0,1 N)

17 – грамм-эквивалент сероводорода

1000 – коэффициент пересчета на литр.

Знакомство с колонкой Виноградского, зелеными и пурпурными серными бактериями

Колонка Виноградского – приспособление, изобретенное С. Н. Виноградским для демонстрации связи разных групп бактерий в микробоценозе и получения накопительных культур. Колонка Виноградского готовится из речного ила, который перемешивается с питательным субстратом (измельченная бумага, опилки, рубленные вареные яйца, и др.) и этой смесью заполняется на 1/3 стеклянный цилиндр. Еще на 1/3 тот же цилиндр заполняется илом без добавок и доверху заполняется водой из того же водоема.

В нижней части колонки происходит расщепление органики анаэробами, в том числе клостридиями, с образованием органических кислот. Последние используются сульфатредукторами и происходит выделение сероводорода, отчего нижняя часть колонки чернеет. Далее образуется градиент сероводорода с убыванием его концентрации вверх по цилиндру, и встречный убывающий градиент кислорода. При культивировании на свету снизу вверх образуются зоны роста зеленых серных, пурпурных серных, пурпурных несерных и бесцветных серных бактерий.

ХОД РАБОТЫ:

1. Зарисовать и описать колонку и принцип ее работы.

Микроскопия культур цианобактерий

Цианобактерии – древнейшая группа прокариот, и это первые организмы, у которых сформировался кислородный фотосинтез. Существует множество видов цианобактерий, населяющих как водоемы, так и верхние слои почвы, а также колонизирующие поверхность скал, кору растений и даже шерсть некоторых животных.

ХОД РАБОТЫ:

1. Зарисовать предложенные культуры цианобактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисенко Е.Г., Сидоренко О.Д., Ванькова А.А. Микробиология: Учебное пособие. – М.: Инфра-М, 2010. - 288 с.
2. Жарикова Г.Г., Леонова И.Б. Основы микробиологии: Практикум: учеб. Пособие для вузов. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 128 с.
3. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 1/ Под ред. Лабинской А.С., Волиной Е.Г. – М.: Изд-во БИНОМ, 2008. – 1080 с.
4. Практикум по микробиологии: Учеб. Пособие для студентов высш. учеб. заведений./Под ред. А.И.Нетрусова.- М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
5. Методы почвенной микробиологии и биохимии. /Под ред. Д.Г.Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 304 с.
6. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Н.С. Егорова.- 2-е изд.- М.: Изд-во МГУ, 1983. – 215 с.
7. Практикум по микробиологии. /Под ред. Н.С.Егорова. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 307 с.

Подписано в печать 21.12.2015.
Формат 60х84 1/16. Бумага офсетная.
Усл. печ. л. 4,3. Уч.-изд. л.2,89.Тираж 100 экз. Заказ № 4934.

Отпечатано в отделе полиграфической, корпоративной и сувенирной продукции
Издательско-полиграфического комплекса КИБИ МЕДИА ЦЕНТРА ЮФУ
344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 200/1. Тел. (863) 247-80-51.