

Т.Ю. Петрищева

ПРАКТИКУМ

Микробиология, санитария и гигиена

**Для обучающихся по направлениям среднего профессионального образования Аналитический контроль качества химических соединений и
Технология хранения и переработки с/х продукции**

СОДЕРЖАНИЕ.

Раздел I. Общие правила работы с культурами микроорганизмов.

Работа 1. Правила работы и методы микроскопического исследования микроорганизмов.

Раздел II. Морфология и цитология прокариот.

Работа 2. Морфология бактерий. Окраска бактерий по Грамму.

Работа 3. Запасные клеточные включения. Споры.

Раздел III. Культивирование микроорганизмов.

Работа 4. Методы культивирования микроорганизмов. Стерилизация и стерильный пересев культуры.

Работа 5. Выделение микроорганизмов из природных источников в чистую культуру. Описание бактериальной колонии.

Раздел IV. Экология микроорганизмов.

Работа 6. Микрофлора почвы.

Работа 7. Микрофлора воды.

Работа 8. Микрофлора воздуха.

Работа 9. Микробиологический анализ пищевых продуктов.

Раздел V. Превращение микроорганизмами безазотистых органических веществ.

Работа 10. Знакомство с возбудителями спиртового брожения.

Работа 11. Гомо- и гетероферментативное молочнокислое брожение: характеристика процессов, возбудители.

Работа 12. Возбудители маслянокислого брожения: методы выделения и морфология.

Работа 13. Бактерии, сбраживающие пектиновые вещества: их выделение, морфология, характеристика процесса.

Работа 14. Знакомство с микроорганизмами, сбраживающими клетчатку.

Работа 15. Уксуснокислые бактерии: методы выделения и видовая характеристика.

Работа 16. Микроорганизмы, вызывающие аэробное разложение клетчатки: выделение и характеристика представителей из разных таксономических групп.

Работа 17. Выделение из почвы и подсчет численности целлюлозоразрушающих аэробов.

Раздел VI. Превращение микроорганизмами азотсодержащих веществ.

Работа 18. Микроорганизмы, вызывающие аммонификацию белков.

Работа 19. Нитрифицирующие бактерии, их характеристика.

Работа 20. Бактерии, осуществляющие процесс денитрификации: их выделение и характеристика.

Работа 21. Выделение из почвы и подсчет численности аэробных свободноживущих азотфиксаторов.

Работа 22. Свободноживущие азотфиксаторы: условия выделения,

морфологическая характеристика.

Работа 23. Знакомство с симбиотическими азотфиксаторами.

Раздел VII. Взаимоотношения микроорганизмов друг с другом и растениями.

Работа 24. Знакомство с микробами-антагонистами.

Работа 25. Изучение эпифитной микрофлоры.

Работа 26. Подсчет численности микрофлоры ризосферы и ризоплана различных растений.

Приложение.

ОБЩИЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С КУЛЬТУРАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ .

РАБОТА I. ПРАВИЛА РАБОТЫ И МЕТОДЫ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.

План занятия:

1. Изучение общих правил работы с микробиологическими объектами.
2. Устройство микроскопа и правила работы с ним.
3. Знакомство с методами приготовления препаратов микроорганизмов.
4. Приготовление микроскопических препаратов бактерий:
 - а) Методом раздавленной капли.
 - б) Методом прижизненного окрашивания.
 - в) Фиксированный и окрашенный препарат.

1. Правила работы в микробиологической лаборатории.

Среди многочисленных микроорганизмов окружающей нас среды, кроме сапрофитных форм, встречаются и патогенные представители. Да и сама работа с сапрофитами требует соблюдения определенных правил, в первую очередь стерильности. Поэтому для работы с микроорганизмами на занятиях следует соблюдать целый ряд правил техники безопасности:

- ✓ Не входить в лабораторию в верхней одежде.
- ✓ Работать только в белых халатах.
- ✓ Не принимать в лаборатории пищу и не класть на лабораторные столы портфели и сумки.
- ✓ Работать аккуратно и содержать рабочее место в чистоте.
- ✓ Использованные в работе предметы помещают в сосуды с дезинфицирующей жидкостью (3 % раствор фенола или 1% раствор хлорамина). Металлические предметы (иглы, петли, пинцеты) после соприкосновения с культурами прожигают на пламени спиртовки.
- ✓ После окончания работы руки протирают дезинфицирующим раствором или моют с мылом.
- ✓ В конце занятия рабочее место должно быть приведено в порядок и сдано дежурному по лаборатории, который в свою очередь ее сдает лаборанту.
- ✓ Лаборатория должна периодически убираться с применением дезинфицирующих средств, а воздух можно дезинфицировать путем проветривания или облучения УФ лампой.

2. Устройство микроскопа и правила работы с ним.

Микроскоп - это оптический прибор, позволяющий получить обратное изображение изучаемого объекта и рассмотреть мелкие детали его строения, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности глаза.

Разрешающая способность микроскопа дает раздельное изображение двух близких друг другу линий. Невооруженный человеческий глаз имеет разрешающую способность около 1/10 мм или 100 мкм. Лучший световой микроскоп примерно в 500 раз улучшает возможность человеческого глаза, т. е. его разрешающая способность составляет около 0,2 мкм или 200 нм.

Разрешающая способность и увеличение не одно и то же. Если с помощью светового микроскопа получить фотографии двух линий, расположенных на расстоянии менее 0,2 мкм, то, как бы не увеличивать изображение, линии будут сливаться в одну. Можно получить большое увеличение, но не улучшить его разрешение.

Различают *полезное* и *бесполезное* увеличения. Под полезным понимают такое увеличение наблюдаемого объекта, при котором можно выявить новые детали его строения. Бесполезное - это увеличение, при котором, увеличивая объект в сотни и более раз, нельзя обнаружить новых деталей строения. Например, если изображение, полученное с помощью микроскопа (полезное!), увеличить еще во много раз, спроецировав его на экран, то новые, более тонкие детали строения при этом не выявятся, а лишь соответственно увеличатся размеры имеющихся структур.

В учебных лабораториях обычно используют *световые микроскопы*, на которых микропрепараты рассматриваются с использованием естественного или искусственного света. Наиболее распространены *световые биологические микроскопы*: БИОЛАМ, МИКМЕД, МБР (микроскоп биологический рабочий), МБИ (микроскоп биологический исследовательский) и МБС (микроскоп биологический стереоскопический). Они дают увеличение в пределах от 56 до 1350 раз. *Стереомикроскоп* (МБС) обеспечивает подлинно объемное восприятие микрообъекта и увеличивает от 3,5 до 88 раз.

В микроскопе выделяют две системы: *оптическую* и *механическую* (рис. 1). К *оптической системе* относят объективы, окуляры и осветительное устройство (конденсор с диафрагмой и светофильтром, зеркало или электроосветитель).

Объектив - одна из важнейших частей микроскопа, поскольку он определяет *полезное увеличение объекта*. Объектив состоит из металлического цилиндра с вмонтированными в него линзами, число которых может быть различным. Увеличение объектива обозначено на нем цифрами. В учебных целях используют обычно объективы х8 и х40. Качество объектива определяет его разрешающая способность.

Окуляр устроен намного проще объектива. Он состоит из 2-3 линз, вмонтированных в металлический цилиндр. Между линзами расположена постоянная диафрагма, определяющая границы поля зрения. Нижняя линза фокусирует изображение объекта, построенное объективом в плоскости диафрагмы, а верхняя служит непосредственно для наблюдения. Увеличение окуляров обозначено на них цифрами: х7, х10, х15. Окуляры не выявляют новых деталей строения, и в этом отношении их увеличение *бесполезно*.

Таким образом, окуляр, подобно лупе, дает прямое, мнимое, увеличенное изображение наблюдаемого объекта, построенное объективом.

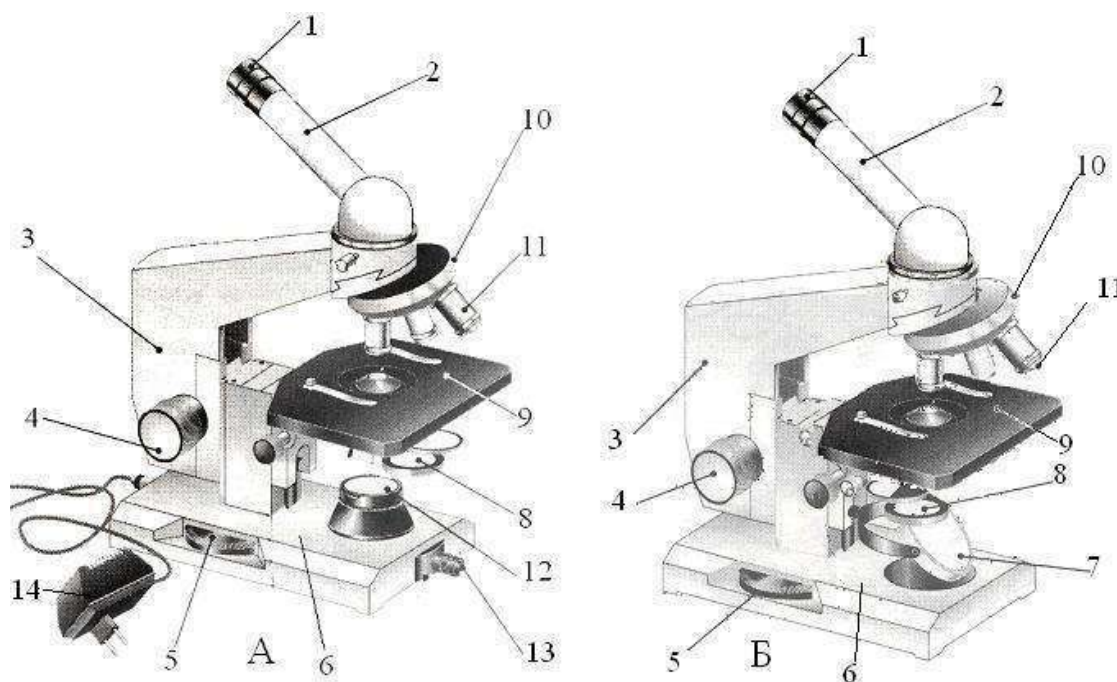


Рис. 1. Устройство световых микроскопов: А - МИКМЕД-1; Б - БИОЛАМ.

1 - окуляр, 2 - тубус, 3 - тубусодержатель, 4 - винт грубой наводки, 5 - микрометрический винт, 6 - подставка, 7 - зеркало, 8 - конденсор, ирисовая диафрагма и светофильтр, 9 - предметный столик, 10 - револьверное устройство, 11 - объектив, 12 - корпус коллекторной линзы, 13 - патрон с лампой, 14 - источник электропитания.

Для определения *общего увеличения микроскопа* следует умножить увеличение объектива на увеличение окуляра.

Осветительное устройство состоит из зеркала или электроосветителя, конденсора с ирисовой диафрагмой и светофильтром, расположенных под предметным столиком. Они предназначены для освещения объекта пучком света.

Зеркало служит для направления света через конденсор и отверстие предметного столика на объект. Оно имеет две поверхности: плоскую и вогнутую. В лабораториях с рассеянным светом используют вогнутое зеркало.

Электроосветитель устанавливается под конденсором в гнездо подставки.

Конденсор состоит из 2-3 линз, вставленных в металлический цилиндр. При подъеме или опускании его с помощью специального винта соответственно конденсируется или рассеивается свет, падающий от зеркала на объект.

Ирисовая диафрагма расположена между зеркалом и конденсором. Она служит для изменения диаметра светового потока, направляемого зеркалом через конденсор на объект, в соответствии с диаметром фронтальной линзы объектива и состоит из тонких металлических пластинок. С помощью рычажка их можно то соединить, полностью закрывая нижнюю линзу конденсора, то развести, увеличивая поток света.

Кольцо с матовым стеклом или *светофильтром* уменьшает освещенность объекта. Оно расположено под диафрагмой и передвигается в горизонтальной плоскости.

Механическая система микроскопа состоит из подставки, коробки с микрометрическим механизмом и микрометрическим винтом, тубуса, тубусодержателя, винта грубой наводки, кронштейна конденсора, винта перемещения конденсора, револьвера, предметного столика.

Подставка - это основание микроскопа.

Коробка с микрометрическим механизмом, построенном на принципе взаимодействующих шестерен, прикреплена к подставке неподвижно. Микрометрический винт служит для незначительного перемещения тубусодержателя, а, следовательно, и объектива на расстояния, измеряемые микрометрами. Полный оборот микрометрического винта передвигает тубусодержатель на 100 мкм, а поворот на одно деление опускает или поднимает тубусодержатель на 2 мкм. Во избежание порчи микрометрического механизма разрешается крутить микрометрический винт в одну сторону *не более чем на половину оборота*.

Тубус или *трубка* - цилиндр, в который сверху вставляют окуляры. Тубус подвижно соединен с головкой тубусодержателя, его фиксируют стопорным винтом в определенном положении. Ослабив стопорный винт, тубус можно снять.

Револьвер предназначен для быстрой смены объективов, которые ввинчиваются в его гнезда. Центрированное положение объектива обеспечивает защелка, расположенная внутри револьвера.

Тубусодержатель несет тубус и револьвер.

Винт грубой наводки используют для значительного перемещения тубусодержателя, а, следовательно, и объектива с целью фокусировки объекта при малом увеличении.

Предметный столик предназначен для расположения на нем препарата. В середине столика имеется круглое отверстие, в которое входит фронтальная линза конденсора. На столике имеются две пружинистые клеммы - зажимы, закрепляющие препарат.

Кронштейн конденсора подвижно присоединен к коробке микрометрического механизма. Его можно поднять или опустить при помощи винта, вращающего зубчатое колесо, входящее в пазы рейки с гребенчатой нарезкой.

Правила работы с микроскопом

При работе с микроскопом необходимо соблюдать операции в следующем порядке:

1. Работать с микроскопом следует сидя;
2. Микроскоп осмотреть, вытереть от пыли мягкой салфеткой объективы, окуляр, зеркало или электроосветитель;
3. Микроскоп установить перед собой, немного слева на 2-3 см от края стола. Во время работы его не сдвигать;
4. Открыть полностью диафрагму, поднять конденсор в крайнее верхнее положение;
5. Работу с микроскопом всегда начинать с малого увеличения;
6. Опустить объектив 8 - в рабочее положение, т.е. на расстояние 1 см от предметного стекла;
7. Установить освещение в поле зрения микроскопа, используя электроосветитель или зеркало. Глядя одним глазом в окуляр и пользуясь зеркалом с вогнутой стороной, направить свет от окна в объектив, а затем максимально и равномерно осветить поле зрения. Если микроскоп снабжен осветителем, то подсоединить микроскоп к источнику питания, включить лампу и установить необходимую яркость горения;
8. Положить микропрепарат на предметный столик так, чтобы изучаемый объект находился под объективом. Глядя сбоку, опускать объектив при помощи макровинта до тех пор, пока расстояние между нижней линзой объектива и микропрепаратом не станет 4-5 мм;
9. Смотреть одним глазом в окуляр и вращать винт грубой наводки на себя, плавно поднимая объектив до положения, при котором хорошо будет видно изображение объекта. *Нельзя смотреть в окуляр и опускать объектив.* Фронтальная линза может раздавить покровное стекло, и на ней появятся царапины;
10. Передвигая препарат рукой, найти нужное место, расположить его в центре поля зрения микроскопа;
11. Если изображение не появилось, то надо повторить все операции пунктов 6, 7, 8, 9;
12. Для изучения объекта при большом увеличении, сначала нужно поставить выбранный участок в центр поля зрения микроскопа при малом увеличении. Затем поменять объектив на 40 х, поворачивая револьвер, так чтобы он занял рабочее положение. При помощи микрометрического винта добиться хорошего изображения объекта. На коробке микрометрического механизма имеются две риски, а на микрометрическом винте - точка, которая должна все время находиться между рисками. Если она выходит за их пределы, ее необходимо вернуть в нормальное положение. При несоблюдении этого правила, микрометрический винт может перестать действовать;
13. По окончании работы с большим увеличением, установить малое увеличение, поднять объектив, снять с рабочего столика препарат, протереть

чистой салфеткой все части микроскопа, накрыть его полиэтиленовым пакетом и поставить в шкаф.

3. Методы изучения микроорганизмов.

Крайне малые размеры микроорганизмов требуют для их изучения применения специальных оптических приборов-микроскопов. Основной технической характеристикой микроскопа является его разрешающая способность, т.е. минимальное расстояние между двумя точками предмета, видимых раздельно. В лабораторном практикуме для исследования бактерий используются современные биологические микроскопы серии "Биолам". Их предельная разрешающая способность равна 0,21 мкм, что позволяет получать увеличение объекта до 1800 раз.

Микроскоп является основным средством изучения микроорганизмов, поэтому знакомство с его устройством и правилами работы является необходимым условием на лабораторных занятиях.

Для исследования морфологии микроорганизмов готовятся также и специальные препараты, которые в зависимости от задач могут содержать живые или убитые клетки микроорганизмов.

Препараты для исследования в живом виде готовят в основном для наблюдения за их подвижностью. Однако из-за малой контрастности живых клеток этот метод не пригоден для изучения морфологии микроорганизмов. Поэтому для более детального изучения микроорганизмов используют фиксированные препараты. В процессе фиксации микроорганизмов их убивают тем или иным способом, вследствие чего они плотно прилипают к поверхности стекла и лучше прокрашиваются красителями. Фиксированные препараты можно длительное время хранить (до 3 месяцев) и использовать повторно. Постоянные препараты получают, заливая фиксированные препараты канадским бальзамом.

Приготовление живых и фиксированных препаратов.

Метод раздавленной капли. На чистое обезжиренное предметное стекло прокаленной микробиологической петлей наносят каплю исследуемой суспензии микроорганизмов. Если в культуре развилось слишком много бактерий, то ее предварительно разбавляют водой. Затем покровное стекло ставят на ребро у края петли и постепенно опускают на нее. Под покровным стеклом не должно быть пузырьков воздуха, которые сильно мешают микроскопированию. Капля должна быть небольшой, чтобы жидкость не выступала за края покровного стекла. Если это происходит, то излишек выступившей жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Препарат из-за высыхания долго не хранится. Его сначала рассматривают при малом, а затем и при большом увеличении, соблюдая правила работы с микроскопом.

Метод прижизненного окрашивания препарата. Так как клетки

большинства микроорганизмов бесцветны и прозрачны, для лучшей их видимости используют прижизненное окрашивание микроорганизмов. Для этого в жидкость, в которой находятся микроорганизмы, добавляют каплю слабого раствора красителя (метиленовый синий, нейтральный красный, фуксин) и готовят препарат методом раздавленной капли. Бактерии при этом становятся отчетливо видны в поле зрения микроскопа. Препарат рассматривают при большом увеличении или с иммерсией.

Фиксированный и окрашенный препарат. Приготовление фиксированных препаратов складывается из ряда операций: приготовление мазка, высушивания, фиксации и окраски.

Для приготовления мазка на чистое и обезжиренное предметное стекло наносят каплю водопроводной воды, в которую вносят микробиологической петлей небольшое количество материала из плотной или жидкой питательной среды и размешивают. Микробную взвесь размазывают (растягивают) петлей по стеклу, т.е. делают мазок, который высушивают в токе теплого воздуха. Фиксируются мазки микроорганизмов обычно термическим способом, проводя стекло 2-3 раза через пламя горелки мазком вверх.

Фиксированный препарат после полного охлаждения окрашивают, заливая его поверхность раствором любого красителя на 2-3 минуты (фуксин, метиленовая синь, генцианвиолет). Затем краситель с мазка смывается водопроводной водой, нижнюю сторону препарата вытирают полоской фильтровальной бумаги, верхнюю осторожно обсушивают на пламени спиртовки. Препарат можно сначала рассматривать при малом, а затем и большом увеличении без покровного стекла или с иммерсией.

Для изучения микроорганизмов, как на прижизненных, так и фиксированных препаратах часто пользуются иммерсионной системой. В этом случае объектив микроскопа погружается в каплю иммерсионного масла. Так как коэффициент преломления его близок к показателю преломления стекла, то все лучи от источника света, собираются в объектив. Это резко увеличивает освещенность и дает возможность более отчетливо видеть исследуемый объект.

МОРФОЛОГИЯ И ЦИТОЛОГИЯ ПРОКАРИОТ.

РАБОТА 2. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ.

План занятия:

1. Изучение различных форм бактерий.
2. Изучение движения бактерий.
3. Окраска бактерий по Граму.

При исследовании различных препаратов из известных сред обитания можно встретить бактерии, представленные как одноклеточными, так и нитчатыми и колониальными формами. Морфологически бактерии

различаются по следующим признакам: а) форме; б) величине; в) взаимному расположению клеток; г) по наличию или отсутствию жгутиков и капсул; д) по способности к спорообразованию и т. д.

По форме клетки бактерии делят на 3 группы: шаровидные, палочковидные и извитые.

Шаровидные бактерии - кокки. Шаровидные бактерии не имеют жгутиков и не образуют спор. Направление плоскости деления клетки играет определяющую роль в образовании микроколоний. Выделяют следующие типы микроколоний:

Микрококки - клетки делятся в одной плоскости, после деления располагаются одиночно

Диплококки - после деления клетки располагаются попарно

Тетракокки - клетки делятся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях, образуются группы по 4 клетки

Стрептококки (Streptos – цепь) - клетки делятся в одной плоскости, после деления клетки остаются в цепочках

Сарцины (Sarcio – тюк) - клетки делятся в трёх взаимно перпендикулярных плоскостях, образуются пакеты по 8 или 64 клетки

Стафилококки (StAFyle – гроздь) - клетки делятся в неопределённых направлениях, образуют скопление клеток, напоминающее виноградные грозди

Палочковидные бактерии - это самая многочисленная и разнообразная группа бактерий. Длина клетки колеблется от десятых долей до 10 - 15 мкм и более, диаметр - от десятых долей до 2 мкм. Различаются морфологически по величине клетки, очертанию её концов, наличию или отсутствию жгутиков, а также по способности к спорообразованию. Чаще всего их делят на подгруппы:

Бактерии (по гречески «бактерион» - палочка) - палочковидные формы. Не образуют спор. Деление клетки поперечное. Могут быть соединены по две клетки - ***Диплобактерии*** и в цепи – ***Стрептобактерии***

Бациллы - Палочковидные формы, способные в неблагоприятных условиях формировать споры.

По взаимному расположению клеток различают диплобациллы и стрептобациллы.

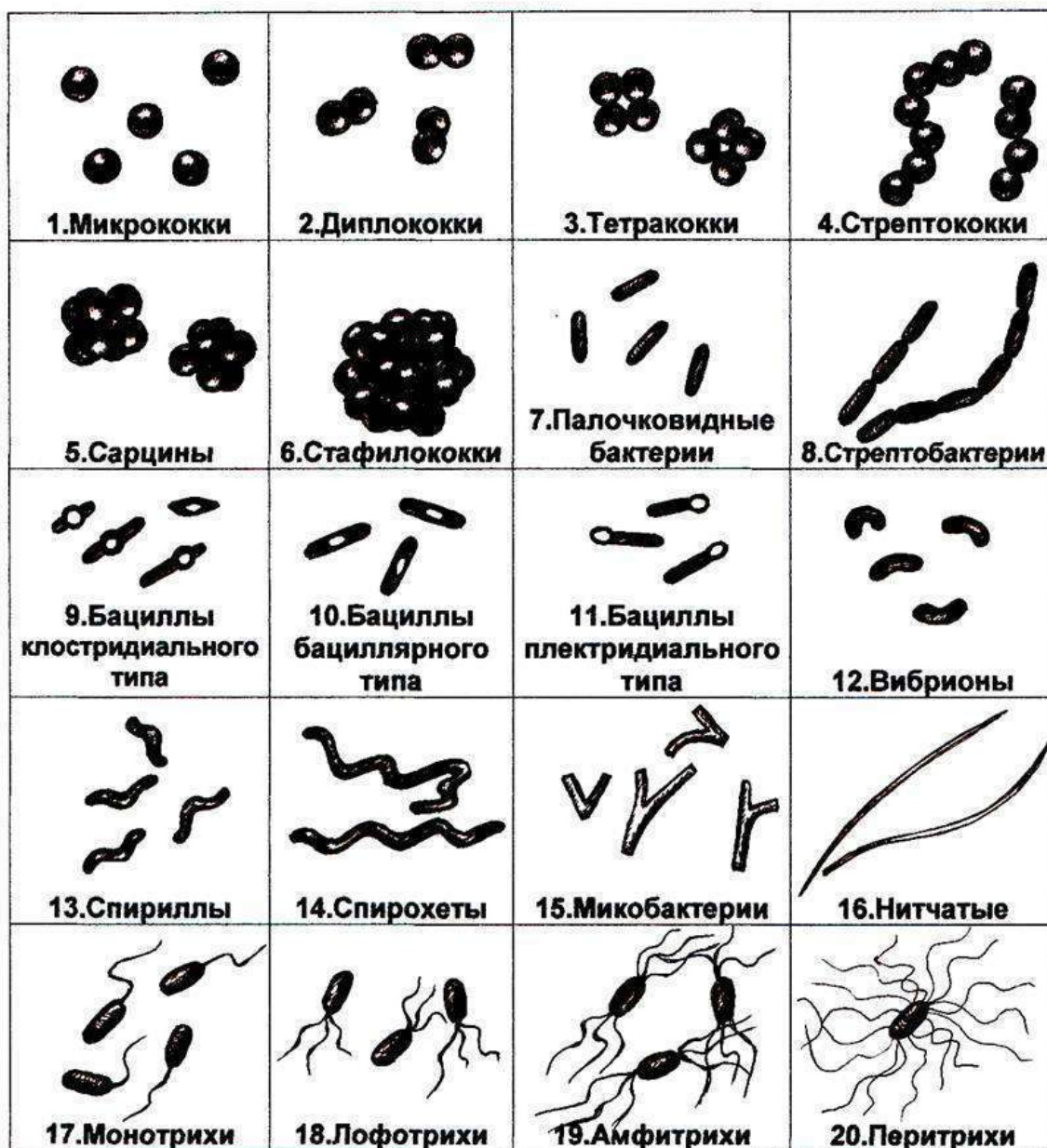
К группе палочковидных примыкают ***Нитчатые бактерии*** с длиной клетки 15 - 50 мкм, а также ветвистые формы микобактерий

Извитые бактерии - изогнутые палочки. Характер изогнутости клетки можно сравнивать с длиной волны. По степени изогнутости различают следующие формы:

Вибрионы - Короткие палочки, длиной 1-3 мкм, изогнуты на половину длины волны, напоминают по форме запятую

Спириллы - Палочки длиной 15-20 мкм, изогнуты на полную длину волны, напоминают растянутую латинскую букву S

Спирохеты - Тонкие длинные клетки, 20 - 30 мкм, с большим числом изгибов напоминают растянутую спираль, обладают продольным делением клетки



Движение бактерий.

У подвижных форм бактерий чаще наблюдаются два вида передвижения:

1) *Скользящее движение* неравномерным выделением слизи (встречается у миксобактерий, цианобактерий).

2) *Плавающее передвижение с помощью жгутиков* – наиболее распространенный тип движения. Жгутики – очень тонкие образования диаметром 10-20 нм, редко до 60 нм (у сложных жгутиков). Количество их

варьирует от одного до тысячи. По характеру расположения жгутиков различают следующие типы:

- 1) **Монотрихи** - имеют один полярный жгутик
- 2) **Лофотрихи** – бактерии имеют один пучок жгутиков
- 3) **Амфитрихи** - Два пучка жгутиков расположенных на противоположных полюсах
- 4) **Перитрихи** – вся поверхность бактериальной клетки покрыта многочисленными жгутиками

Для изучения морфологии и движения бактерий можно использовать настои из различных естественных материалов (мяса, рыбы, навоза, сена). Для их приготовления небольшое количество материала измельчают, добавляют немного мела и заливают на 2/3 объема водой. Посуду с настоем помещают в термостат или другое теплое место на 3-5 дней. За это время в среде накапливается масса разнообразных бактерий.

Из полученного настоя параллельно готовят 2 препарата - прижизненный и фиксированный. Полученные препараты микроскопируют сначала при малом, а затем и большом увеличении. Просматривая препараты, делают зарисовки и обращают внимание на различную форму бактерий. Находят клетки округлой формы - кокки. Одиночные кокки - монококки, они делятся в любой плоскости, но сразу же обособляются. Кокки, которые делятся только в одной плоскости и образуют группы из двух клеток - это диплококки, из целой цепочки клеток - стрептококки. Встречаются группы по 4 особи - тетракокки, по 8 особей - сарцины, целые гроздья клеток - стафилококки. Для изучения шаровидных форм лучше использовать различные настои, особенно настой пшеничной муки, или чистые культуры.

Для изучения палочковидных бактерий хорошим материалом является сенной настой. В нем встречаются бактерии, различающиеся по величине, наличию и расположению жгутиков, способности образовывать споры. Палочковидные представители, образующие споры в неблагоприятных условиях, называют бациллами. Как и кокки, палочковидные бактерии могут соединяться попарно (диплобактерии), или образовывать цепочки (стрептобактерии).

Извитые формы бактерий можно встретить при изучении мазков из настоя навоза, стоячей воды, зубного налета. В зависимости от формы и количества витков выделяют: короткие палочки, изгиб которых составляет 1/4 оборота спирали - вибрионы; спириллы - имеющие один или несколько витков, и спирохеты, длинные и тонкие клетки с количеством витков от 5 до 200.

Для изучения характера движения бактерий можно приготовить прижизненно окрашенный препарат бактерий из любого настоя. Для этого к капле настоя добавляют краситель нейтральный красный или готовят негативный тушевый препарат. На общем темном фоне туши будут отчетливо видны движущиеся неокрашенные клетки различных

микроорганизмов. Наиболее быстро передвигающимися будут бактерии, имеющие только один жгутик на полюсе - монотрихи. Они движутся прямолинейно. Более медленно движутся амфитрихи, имеющие по жгутику, и лофотрихи, по пучку жгутиков на своих полюсах. Медленнее всего, беспорядочно кувыркаясь, движутся перитрихи, равномерно по всей поверхности клетки покрытые жгутиками.

Окраска по Граму. Как один из диагностических признаков при определении видовой принадлежности бактерий служит окраска их по Граму. Это универсальный способ окраски, по которому все бактерии делятся на две группы: грамположительные и грамотрицательные. Способность окрашиваться по Граму зависит главным образом от химического состава и структуры клеточных стенок бактерий и обычно коррелирует с целым рядом других признаков: химическим составом цитоплазмы, содержанием РНК и ДНК, чувствительностью к антибиотикам.

На одно предметное стекло наносят 3 капли воды, в которые помещают разные культуры микроорганизмов. Одна или две из них должны быть с известным отношением к окраске по Граму (например: дрожжи, сарцины - грамположительные, уксуснокислые бактерии - грамотрицательные). Последняя - исследуемая культура. Готовят небольшие, равномерные и тонкие мазки, их высушивают, фиксируют и далее обрабатывают все сразу одновременно. Фиксированные мазки окрашивают 1 % раствором генцианвиолета в течение 1-2 минут. Не промывая мазок водой, наносят на препарат раствор Люголя на 1-2 минуты (мазок чернеет). Препарат обрабатывают 96 % этанолом в течение 1 минуты, а затем тщательно промывают водой и докрашивают мазок разбавленным раствором фуксина в течение 2-3 минут. Промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют. На препарате грамположительные бактерии окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные - в розово-малиновый.

РАБОТА 3. ЗАПАСНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ВКЛЮЧЕНИЯ. СПОРЫ.

План занятия:

Обнаружение запасных клеточных включений

а) волютина, б) гликогена, в) жира.

2. Окраска спор по методу Пешкова.

Материалы и оборудование: микроскоп, осветитель, предметные и покровные стекла, микробиологические петли, спиртовка, спички, кристаллизатор с подставкой, пинцет, фильтровальная бумага, красители: раствор фуксина, метиленовый синий по Леффлеру (30 мл насыщенного раствора, 1 мл 1 % КОН в 100 мл дистиллированной воды), раствор Люголя (7 г I₂ + 20 г KI на 100 мл воды), раствор Судан III (0,1 г Судана III + 20 мл спирта), 0,5 % раствор нейтрального красного, культуры дрожжей, 5-7

дневная культура сенной палочки, азотобактера.

В результате жизнедеятельности в клетках микроорганизмов образуются разнообразные запасные включения, к которым относят зерна волютина, гранулы гликогена и гранулезы, капли жира. С биологической точки зрения эти вещества являются энергетическим запасом клетки и расходуется только при неблагоприятных условиях среды. Все виды включений выявляются специальными цитохимическими методами.

У некоторых бактерий при неблагоприятных условиях среды образуются споры, которые рассматривают как один из этапов в жизненном цикле клетки. Они возникают внутри клетки и имеют овальную форму. В зависимости от положения поры выделяют несколько типов спорообразования. При клостридиальном типе спора формируется в центре клетки, при плекридиальном - на одном из ее концов. Ввиду малой проницаемости многослойных оболочек споры бактерий при обычной окраске мазка не прокрашиваются. Поэтому их окрашивают специальными методами, например по способу Пешкова М.А.

ХОД РАБОТЫ.

Обнаружение включений.

Волютин. Встречается у большинства бактерий и дрожжей в виде мелких зерен различной величины и формы. Представляет собой комплексное соединение из полифосфатов и РНК, поэтому является не только источником энергии, но и запасом фосфора и азота, которые расходуются при голодании клеток. Для его обнаружения на предметное стекло в каплю воды помещают исследуемые микроорганизмы, делают мазок, и фиксируют его. Мазок красят фуксином, промывают водой и, не высушивая, рассматривают под микроскопом. Зерна волютина на препарате окрашиваются в красно-фиолетовый цвет.

Гликоген. В клетках микроорганизмов могут накапливаться различные углеводы: гликоген (животный крахмал) и гранулеза (крахмалоподобное вещество). Гликоген можно легко обнаружить у дрожжей, аэробных споровых бактерий, а гранулезу у анаэробных бактерий. Для этого к капле культуры микроорганизмов на предметное стекло добавляют раствор Люголя, покрывают покровным стеклом и микроскопируют. Гранулы гликогена на препарате окрашиваются в красно-бурый цвет. Можно приготовить и фиксированный мазок, тогда окраску раствором Люголя проводят в течение 30-40 сек, промывают водой и, накрыв покровным стеклом, микроскопируют.

Жиры. Как включения можно обнаружить во многих клетках микроорганизмов, особенно в старых культурах дрожжей и азотобактера. Жировые включения накапливаются и при обильном питании клеток безазотистыми веществами. Для их обнаружения к капле суспензии

микроорганизмов добавляют каплю реактива Судан III и микроскопируют. Капли жира при этом окрашиваются в оранжево-красный цвет.

РАЗДЕЛ III . КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ.

РАБОТА 4. МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. СТЕРИЛИЗАЦИЯ И СТЕРИЛЬНЫЙ ПЕРЕСЕВ МИКРООРГАНИЗМОВ.

План занятия:

Знакомство со свойствами и классификацией питательных сред.
Приготовление питательных сред.

Знакомство с методами стерилизации. Подготовка лабораторной посуды к стерилизации.

Стерильный пересев культуры микроорганизмов.

Материалы и оборудование. Чашки Петри, конические колбы, пипетки на 1-2 мл, пробирки, вата для пробок, марля, нитки, бумага для обертывания посуды, пробирки со стерильной средой БПА (прямой и косой агар), микробиологические петли и иглы, спиртовки, спички, чистые культуры бактерий.

Питательные среды.

Для изучения особенностей жизнедеятельности различных микроорганизмов, т.е. физиологических свойств, их выращивают в лабораторных условиях. Выращивание микроорганизмов в лабораторных условиях называется культивированием, а выращенные микробы - культурой. Культуры могут состоять из различных видов микроорганизмов и их называют смешанными, или только из одного вида чистые. Микроорганизмы одного вида, выделенные из определенного источника среды (пищевые продукты, организм животного, человека и т.д.) называют штаммом.

Среды, используемые в лабораториях для культивирования микроорганизмов называются питательными. К ним предъявляют целый ряд требований: а) должны содержать все необходимые питательные вещества (азотистые, углеродные, минеральные, витамины) в легко усвояемой форме, б) должны оптимально соответствовать требованиям микроорганизмов по влажности, кислотности, вязкости, аэрации и т.д., в) должны быть стерильными и обеспечивать получение чистой культуры микроорганизмов.

По консистенции питательные среды бывают жидкими, полужидкими и плотными. В состав последних входят агар-агар, получаемый из морских водорослей, или желатин - белковое вещество животного происхождения. Добавление их к питательным средам вызывает уплотнение сред до консистенции плотного геля (студня).

По составу питательные среды делятся на естественные и искусственные. В состав первых входят натуральные продукты: молоко,

овощи, фрукты, отвар мяса, рыбы, круп. Последние же состоят из набора различных химических соединений (синтетические) или содержат химические вещества в комбинации с природными продуктами (полусинтетические). К полусинтетическим относят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), бобово-пептонный агар (БПА).

В зависимости от задач исследования кроме простых сред, используемых для выращивания многих микроорганизмов, применяют элективные и дифференциально-диагностические среды. *Элективные* (накопительные) среды обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы родственных микроорганизмов и непригодны для развития других. Используют для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания. Например, среда для выращивания сенной палочки, картофельной палочки, азотобактера. *Дифференциально-диагностические* среды служат для дифференцировки различных видов микроорганизмов на основании различий их обменных процессов.

Методы стерилизации.

Стерилизацией называется полное уничтожение микроорганизмов и их спор в питательных средах, посуде, инструментах. Самым распространенным и надежным способом стерилизации являются применение высокой температуры - *термическая стерилизация*. Ее проводят:

1. кипячением,
2. прокаливанием в пламени,
3. сухим жаром,
4. насыщенным паром под давлением,
5. текучим паром.

Холодная стерилизация проводится фильтрованием через бактериальные фильтры, воздействием различных физических факторов (ультрафиолетовые лучи, ультразвук) или химическими веществами (антисептиками). Способ выбирают в зависимости от свойств стерилизуемого объекта и целей исследования.

Прокаливание на огне является самым распространенным и быстрым способом стерилизации. Так стерилизуют петли и иглы, предметные стекла, мелкий инструмент.

Стерилизация сухим жаром используют для пробирок, колб, пипеток, чашек Петри и проводят в сушильном шкафу при 150-170⁰ в течение 2 часов. Посуду при этом заворачивают в бумагу.

Стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование)- является основным методом стерилизации питательных сред и посуды. Это самый надежный способ стерилизации, который осуществляется в автоклавах. Обработка материала проводится при избыточном давлении (0,5-2 атм.) и температуре пара 112-134⁰. При таких условиях в достаточно короткие сроки (20-30 мин) уничтожаются как вегетативные клетки, так и споровые формы микроорганизмов.

Стерилизацию текучим паром проводят в кипятильнике Коха или

незакрытом автоклаве при температуре 100° по 30-40 минут в течение 2-3 дней ежедневно. Такая стерилизация называется также дробной и приводит к полному уничтожению микроорганизмов.

Пастеризация является одним из методов стерилизации пищевых продуктов. Используется для уничтожения бесспорных бактерий в продуктах, теряющих вкусовые качества при кипячении (молоко, пивное сусло и др.). Осуществляется нагреванием жидкости при 60° в течение 30 минут или $75-80^{\circ}$ в течение 10-15 минут.

ХОД РАБОТЫ.

Приготовление питательных сред. Для приготовления наиболее употребительной плотной питательной среды БПА взвешивают: пептон-1 г., сахароза-2г., хлорид натрия-0,5г., агар-агар - 1,5 г.. Растворяют компоненты в 100 мл бобового бульона, добавляют двууглекислую соду до слабо щелочной реакции. Питательную среду разваривают до тех пор, пока исчезнут плотные частички и жидкость станет однородной. Горячую среду разливают в чашки Петри, колбы или в пробирки.

При приготовлении элективной питательной среды для выращивания сенной палочки берут 15-20 г сена из разнотравья, мелко нарезают и заливают 200 мл воды, добавив щепотку мела. Кипятят 15-20 минут и горячий сенной отвар разливают в колбы слоем 1,5-2 см, закрывают ватными пробками и помещают в теплое место для выращивания. Через неделю можно обнаружить как подвижные формы, так и клетки сенной палочки со спорами.

Подготовка посуды к стерилизации. Чашки Петри и пипетки для стерилизации заворачивают в бумагу. Чашку Петри кладут на середину квадрата из листа бумаги, сторона которого равна 3 диаметрам чашки и края загибают с двух сторон кверху. Затем образовавшиеся два конца подворачивают вниз и вставляют один в другой.

Чисто вымытые пипетки закрывают с одного конца кусочками ваты и заворачивают в полоски бумаги. Бумажные пакеты с посудой подписывают и передают лаборанту для стерилизации сухим жаром.

Стерильный пересев культуры. Используют для культивирования чистых культур, определения их физиологических свойств (отношение к кислороду, источникам питания и др.). В зависимости от задач исследования и вида питательной среды применяют различные методы посева культур. Однако, основным правилом является соблюдение стерильности, т.е. предотвращения возможности загрязнения материала и среды другими микроорганизмами. При пересеве чистой культуры на свежую плотную среду выполняют следующие операции. Берут две пробирки в левую руку и держат горизонтально, правой рукой вынимают пробки, обжигают края пробирок и обожженную петлю вводят в пробирку с культурой и, захватив часть материала, переносят в пробирку со свежей средой. Посев может быть сделан штрихом на косой агар или уколом на прямой агар. Пробки и концы

пробирок после пересева обжигают и закрывают одновременно. Обжигают и петли. Пробирки снабжают этикетками с указанием культуры, даты пересева, фамилии студента и помещают в термостат для выращивания.

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

Что означает понятие: культивирование микроорганизмов, культура, чистая и смешанная культура, штамм?

Что такое питательные среды, каким требованиям должны удовлетворять, типы питательных сред?

В чем сущность методов стерилизации?

Заполните таблицу:

Таблица 3.

Стерилизуемый материал	Метод стерилизации	Режим стерилизации

5. Как получают и пересевают чистые культуры?

РАБОТА 5. ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ В ЧИСТУЮ КУЛЬТУРУ. ОПИСАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КОЛОНИИ.

План занятия:

Знакомство с методом накопительных культур.

Знакомство с методом выделения чистых культур микроорганизмов.

Изучение культуральных свойств изолированной колонии.

Стерильный пересев микроорганизмов на пробирки со скошенной агаровой средой.

Материалы и оборудование. Чашки Петри с выделенными из какого-либо источника изолированными колониями микроорганизмов, спиртовки, спички, препаровальные иглы, пробирки со скошенной питательной средой, микробиологические петли, линейки, раствор метиленовой сини.

В природе микроорганизмы встречаются в виде биоценозов, состоящих из многих видов. Для изучения микроорганизмов необходимо иметь чистые культуры, содержащие популяции микробов одного вида. Выделению чистых культур микроорганизмов из природных источников обычно предшествует получение накопительной культуры. Метод накопительных культур был разработан С.Н.Виноградским и М.Бейеринком.

Накопительной называют культуру, в которой преобладают микроорганизмы одной эколого-трофической группы. Накопительную

культуру получают путем посева пробы из естественного источника на *элективную* питательную среду, которая по химическому составу (источники С, N, Р, S и др.) и физическим свойствам (рН, ионная сила) способствует росту микроорганизмов определенной группы, а для других микробов является неблагоприятной. Элективность можно создать также условиями выращивания (температура, свет, содержание кислорода) и внесением определенных агентов (микроэлементы, антибиотики, аминокислоты), либо отсутствием в среде каких-либо компонентов. Как правило на практике используют жидкие накопительные культуры.

Чистые культуры микроорганизмов выделяют из накопительной культуры несколькими методами:

- * методом последовательных разведений. При этом трудоемком методе бактериальную суспензию разводят стерильной средой, добиваясь, чтобы в ряду последовательных разведений достичь такого, где уже нет роста микробов. Тогда считают, что в последней пробирке, где наблюдается рост, содержалась одна микробная клетка.

- * выделением отдельных клеток с помощью микроманипулятора.

- * методом Р.Коха на плотной питательной среде. При этом пробу из накопительной культуры равномерно распределяют по поверхности застывшей плотной питательной среды в чашки Петри (поверхностный посев) или смешивают с расплавленной питательной средой (глубинный посев). Размножаясь, бактерии дают начало видимым невооруженным глазом изолированным друг от друга колониям, каждая из которых представляет собой потомство одной клетки.

Если при методе Коха использовать элективные среды, то можно совместить стадии получения накопительной культуры и выделения чистой культуры. В настоящее время на практике для выделения чистых культур микроорганизмов из природных источников используют метод Коха с элективными плотными средами.

ХОД РАБОТЫ.

Колонии, выросшие на поверхности плотной питательной среды в чашки Петри, микроскопируют и описывают морфологию бактерий. Для этого готовят прижизненный окрашенный метиленовым синим препарат.

Затем описывают культуральные свойства изолированной колонии по схеме:

- а) размеры колонии (10 мм и более в диаметре - крупная, 1-10мм - средняя, не превышает 1 мм - точечная);

- б) форма колонии (круглая, круглая с фестончатым краем, круглая с валиком по краю, ризоидная, с ризоидным краем, амебоидная, нитевидная, складчатая, неправильная, концентрическая, сложная);

- в) профиль колонии (изогнутый, кратерообразный, плоский, выпуклый, врастающий в агар, каплевидный, конусовидный);

- г) край колонии (гладкий, волнистый, зубчатый, лопастный, ворсистый)

ветвистый);

д) поверхность колонии (гладкая, шероховатая, складчатая, бугристая);

е) оптические свойства (прозрачная, просвечивающая, непрозрачная, блестящая, матовая, флуоресцирующая);

ж) цвет (грязно-белый, белый, желтый, черный, красный и др.);

з) структура колонии (однородная, мелко- или крупнозернистая, пленчатая, врастающая в агар, легко снимающаяся иглой с агара);

и) консистенция (маслянистая, тестообразная, слизистая, сухая, плотная, кожистая);

к) поверхность обратной стороны колонии (рассматривается с обратной стороны чашки Петри). Отмечают цвет, диффузию пигментов среду, характер поверхности;

л) запах колонии (землистый, эфирный, фруктовый и т.д.).

Произвести стерильный пересев изолированной колонии микроорганизмов на пробирки со скошенной плотной питательной средой. На следующем занятии определяют чистоту выделенной культуры по характеру роста. Если на всем протяжении штриха рост равномерный, без видимых вкраплений, культуру считают чистой.

Для чистой культуры микроорганизмов определяют физиологические свойства (отношение к кислороду, используемые источники С, N, потребность в факторах роста и т.д.) и биохимические свойства (продукция кислот, ферментов, аминокислот и т.д.), после чего проводят определение таксономической принадлежности выделенного микроорганизма.

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

В чем преимущество метода накопительных культур?

Какие методы выделения чистых культур вы знаете? Какой из них чаще используется в практике?

Какие признаки необходимы для характеристики культуральных свойств изолированных колоний микроорганизмов?

РАЗДЕЛ IV. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.

РАБОТА 6 . МИКРОФЛОРА ПОЧВЫ.

План занятия:

Отбор почвенной пробы и приготовление разведений.

Посев почвенной суспензии на питательные среды.

Подсчет численности почвенной микрофлоры.

Материалы и оборудование. Бур или совек, колба с расплавленной и охлажденной до +50° С питательной средой (КАА, МПА, БПА); на одну почвенную пробу - 1 колба с 99 мл стерильной водопроводной воды и 3 пробирки с 9 мл воды, 4 стерильные пипетки (на 1-2 мл), 2 стерильные чашки

Петри, спиртовки, спички.

Почва является наиболее благоприятной по сравнению с водой и воздухом средой для развития микроорганизмов. Почву обычно рассматривают как сложную гетерогенную систему микросред. Микроорганизмы, развивающиеся на поверхности почвенных частиц и внутри них, находятся в совершенно разных условиях по аэрации, влажности, температуре, рН среды, концентрации субстратов. Соответственно, в разных микроразонах почвы одновременно могут протекать противоположные процессы круговорота биогенных элементов. До 90 % почвенных микроорганизмов адсорбированы на твердой фазе почвы, органических остатках, корнях растений. Распределение микроорганизмов по почвенному профилю соответствует содержанию органических веществ. Численность и качественный состав микробного комплекса почвы зависит от типа почвы, от сезона года (влияние температуры, осадков, растительного опада), а также от типа растительного ценоза (влияние корневой экссудации и корневого опада), в агроценозах - от агротехники возделывания культур.

Существуют различные способы определения численности микроорганизмов в почве:

Метод прямого подсчета под микроскопом.

Метод учета численности при посеве на плотные питательные среды (чашечный метод Коха).

При прямом подсчете клетки окрашивают красителями, чтобы отличить их от частиц почвы. Однако результаты получаются завышенными, т.к. просчитываются и живые, и мертвые клетки. Различить их позволяет люминесцентная микроскопия. При подсчете под электронным микроскопом получают гораздо более высокие результаты, т.к. учитываются более мелкие формы.

При использовании метода выращивания на питательных средах определяют количество жизнеспособных зачатков (бактерий, спор, обрывков мицелия). Универсальной среды, выделяющие все микроорганизмы, не существует, т.к. потребности их разнообразны и часто противоположны. Поэтому для характеристики микробного комплекса почвы используют различные селективные питательные среды, на которых вырастают узкоспециализированные группы (МПА для аммонификаторов, КАА для иммобилизаторов азота, среда Чапека для грибов, среда Гильтая для нитрификаторов, среда Эшби для азотобактера, среда Гетчинсона для целлюлолитиков и т.д.).

Для анализа микрофлоры отбирают среднюю пробу почвы с исследуемого участка по диагонали в 4-5 точках. Почву отбирают стерильным буром или совком с определенной глубины, сняв предварительно 2-х сантиметровый верхний слой. Образцы помещают в стерильные банки или полиэтиленовые пакеты и анализируют в тот же день.

ХОД РАБОТЫ.

Отбор пробы. Отобрать среднюю пробу с исследуемого участка весом не менее 1 кг. Хорошо перемешать почву, отобрать крупные корни. Навеску почвы 1г перенести в колбу с 99 мл стерильной воды (разведение $1:100$ или 10^{-2}). Колбу перемешать вращательным движением, не допуская намокания ватной пробки, в течение 10-15 минут, дать отстояться крупным почвенным частицам 1-2 минуты.

Приготовление разведения. Затем приготовить последующие разведения: 1 мл суспензии внести в пробирку с 9 мл воды, хорошо перемешать (разведение 10^{-3}), из последней пробирки вновь отобрать 1 мл суспензии и внести в следующую пробирку с водой (разведение 10^{-4}), эту операцию повторить еще раз (разведение 10^{-5}).

Каждый раз необходимо использовать новую стерильную пипетку для отбора и соблюдать правила стерильности: колбы открывать на минимальное время, пробки на стол не класть, пипетки вскрывать быстро, не касаясь руками нижнего конца. Колбу придерживать левой рукой, правой вынимают пробку (зажимая ее между мизинцем и ладонью) и держат пипетку. Работу желательно проводить вдвоем вблизи пламени спиртовки.

Проведение посева. Из разведения 10^{-5} новой пипеткой отобрать 1 мл суспензии и внести в пустую стерильную чашку Петри. Чашку полностью не открывать, а только слегка сдвинуть крышку вблизи спиртовки на минимальное время. Затем в чашку с внесенной почвенной суспензией залить 20-25мл нагретой и охлажденной до 50°C питательной среды (лучше КАА) и осторожно перемешать вращательными движениями на горизонтальной поверхности. После застывания среды чашки подписать карандашом по стеклу на крышке, перевернуть (чтобы избежать попадания на поверхность среды конденсата), завернуть в бумагу и поставить на инкубацию в термостат при 28°C .

Через неделю подсчитать результаты опыта. Работу проводят, не открывая чашку Петри. Для этого чашки просматривают с обратной стороны в проходящем свете и карандашом по стеклу отмечают просчитанные колонии. Если колоний много, делят чашку на сектора и просчитывают каждый сектор отдельно, результаты суммируют. Наиболее точные результаты достигаются при посеве из такого разведения, чтобы на чашки выросло от 50 до 200 колоний. Для чернозема это разведение 10^{-5} , для серой лесной почвы - меньшее.

Подсчет выросших колоний. Учет количества микроорганизмов проводят по числу выросших колоний, считая, что одна колония развилась из одной клетки или споры, по формуле:

$$X = \frac{A \times n}{m}, \quad \text{где } X - \text{количество клеток микроорганизмов в 1г сырой}$$

почвы,

A - число колоний на чашке,

n - соответствующие разведения,

m - объем почвы, внесенной в чашку.

Следует помнить, что на определенной среде учитывается лишь небольшая часть почвенной микрофлоры (0,1-10%) с соответствующими пищевыми потребностями, для характеристики всего микробного комплекса используют набор диагностических сред для важнейших эколого-трофических групп микроорганизмов.

Результаты опыта сводятся в таблицу.

Таблица 4.

Численность почвенных микроорганизмов на среде (КАА, МПА).

Вид почвы	Вариант опыта	Число колоний на чашке	Численность микроорганизмов в 1г почвы

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

В чем заключается специфика почвы как среды обитания для микроорганизмов?

Какие методы используются для подсчета почвенной микрофлоры?

Какие эколого-трофические группы комплекса почвенных микроорганизмов вы знаете?

Как отбирается почвенная проба?

Какие правила стерильности необходимо выполнять при приготовлении разведений почвенных суцессий и посева на питательные среды?

Как зависит состав и численность почвенных микроорганизмов от типа почвы?

В течении какого сезона года в почве наблюдается максимальная численность микроорганизмов?

Как влияет тип фитоценоза и агротехника возделывания культурных растений (внесение минеральных удобрений, рыхление, полив) на микрофлору почвы?

РАБОТА 7. МИКРОФЛОРА ВОДЫ.

План занятия:

Отбор пробы воды и приготовление разведений.

Посев на плотную питательную среду.

Подсчет численности микрофлоры воды.

Материалы и оборудование. Пробы стоячей и проточной воды, на одну пробу воды - 2 пробирки с 9 мл стерильной воды, 3 стерильные пипетки на 1 мл, 1 стерильная пустая чашка Петри, спиртовка, спички, колба с расплавленной и охлажденной агаризованной средой (МПА или БПА).

Вода является благоприятной средой для развития микроорганизмов.

Чем выше содержание растворенных в ней органических веществ, тем больше и численность микрофлоры. В открытые водоемы органические и минеральные вещества попадают со стоками бытовых и промышленных вод, в результате смыва почвы и удобрений с полей. Процессы естественного самоочищения позволяют поддерживать экосистему водоема, однако эти возможности не беспредельны. Питьевая вода проходит ряд стадий очистки и контролируется по санитарным нормам, включая и патогенных микроорганизмов. Ключевая вода практически стерильна после естественной фильтрации через почву.

Для экологической характеристики загрязнения водоемов используется понятие о зонах сапробности: олигосапробная зона содержит мало органических веществ, количество микроорганизмов составляет от 10 до 10^3 в 1мл; мезосапробная зона более загрязнена органикой, здесь проходят процессы аэробного окисления, количество микроорганизмов до 10^6 в 1мл; полисапробная зона наиболее загрязнена, здесь проходят процессы анаэробного сбраживания органики, сопровождающиеся выделением сероводорода, аммиака, метана, содержится более 10^6 бактерий/мл.

Микрофлора воды разнообразна, в основном она представлена сапрофитами, но могут встречаться и патогенны (холерный вибрион, тифозные, дизентерийные бактерии и т.д.). В качестве показателя возможного инфицирования воды используют кохи - индекс (количество бактерий *Escherichia coli* - кишечной палочки - в 1мл воды).

ХОД РАБОТЫ:

Отобрать пробы воды (стоячей, проточной, водопроводной). Приготовить ряд разведений проб, для этого 1мл пробы внести в пробирку с 9 мл стерильной воды, хорошо перемешать осторожным продуванием воздуха из пипетки (разведение $1:10^{-11}$). Из этого разведения приготовить следующие аналогичным способом.

Как правило, для водопроводной воды посев производят из разведения 10^{-1} , для проточной - 10^{-2} , для стоячей - 10^{-3} и более. 1мл нужного разведения чистой пипеткой внести в пустую стерильную чашку Петри, чашку подписать карандашом по стеклу на крышке. Затем залить 20-25мл расплавленной и охлажденной среды (МПА или БПА). Каждый раз использовать новую стерильную пипетку, работать с соблюдением правил стерильности: открывать пробирку на минимальное время, пробки на стол не класть, чашки Петри не открывать полностью, а лишь слегка сдвинуть крышку. Всю работу желательно проводить вдвоем вблизи пламени спиртовки. Чашку осторожно перемешивают, вращая на ровной горизонтальной поверхности.

После застывания среды чашки переворачивают и помещают на инкубацию в термостат при 28°C .

На следующем занятии провести подсчет выросших колоний, не открывая чашку. Для этого чашки просматривают с обратной стороны в

проходящем свете и карандашом по стеклу отмечают просчитанные колонии. Если колоний много, делят чашку на сектора и просчитывают каждый сектор отдельно, результаты суммируют. Наиболее точные результаты достигаются при посеве из такого разведения, чтобы на чашке выросло от 50-200 колоний.

Учет количества микроорганизмов проводят по числу выросших колоний развилась из одного микробного зачатка, по формуле:

$$X = \frac{A \times n}{m}, \text{ где } X - \text{ количество зачатков микроорганизмов в 1 мл воды,}$$

A - число колоний на чашке,

n - соответствующее разведение,

m - объем пробы, внесенный в чашку.

Результаты опыта сводят в таблицу.

Таблица 5.

Численность водной микрофлоры на среде (МПА, БПА).

Вид исследуемой воды	количество колоний	численность микроорганизмов в 1мл воды

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

Охарактеризуйте деление вод по зонам сапробности.

Чем отличается развитие микрофлоры поверхностных водоемов?

Какие источники загрязнения водоемов вы знаете?

Какова роль микроорганизмов в самоочищении водоемов?

Расскажите о санитарных нормах питьевой воды?

РАБОТА 8. МИКРОФЛОРА ВОЗДУХА.

План занятия:

Посев микроорганизмов из воздуха методом прямого осаждения (по Коху).

Подсчет численности микрофлоры воздуха.

Материалы и оборудование. Стерильные чашки Петри, спиртовка со спичками, колба с разогретой и охлажденной до 50⁰С агаризованной средой (МПА или БПА).

Воздух является временной средой существования микроорганизмов, занесенных с поверхности почвы с пылью. Состав микрофлоры воздуха зависит от сезона года, близости населенных пунктов, географических условий. Наиболее загрязнен воздух над городами в летней период, а также в

закрытых помещениях с большим скоплением людей. Большинство микробов в воздухе сапрофиты, но могут встречаться и патогенные виды. Санитарным показателем воздуха является общее число микробов в 1 м^3 . Для оценки обсемененности воздуха используются две группы методов: аспирационные (пропускание определенного объема через специальные фильтры) и седиментационные (осаждение микроорганизмов и пылинок на поверхности среды под действием силы тяжести).

ХОД РАБОТЫ.

Разлить агаризованную питательную среду (МПА или БПА) в стерильные чашки Петри. После застывания среды чашку открыть в исследуемом месте (в лаборатории, на улице) на 5 минут. Установлено, что за 5 минут на 1 дм^2 горизонтальной поверхности при отсутствии ветра оседает столько микробов, сколько их содержится в 10 л воздуха. После посева чашки закрыть, подписать и поместить в термостат при 28°C в перевернутом виде (во избежание попадания на поверхность среды конденсата с крышки).

На следующем занятии подчитать количество выросших на чашке колоний. Подсчет производить, не открывая чашки, на просвет с обратной стороны, отмечая карандашом по стеклу подсчитанные колонии. Если колоний много, разделить чашку на сектора, подсчитать в каждом секторе, а результаты суммировать.

Рассчитывать микробную обсемененность воздуха, считая что каждая колония возникла из одной клетки или споры. Измерить диаметр чашки Петри и рассчитать ее площадь. Численность микроорганизмов определяют по формуле:

$$X = \frac{A \times 100 \times 1000}{S \times 10} = \frac{A \times 10^4}{S}; \text{ где } X - \text{ количество микробов в } 1\text{ м}^3 \text{ воздуха,}$$

A - число колоний на чашке,

S - площадь чашки Петри,

100 - пересчет на 1 дм^2 ,

1000 - пересчет на $1000\text{ л} = 1\text{ м}^3$,

10 - пересчет на 1 л.

По результатам опыта заполнить таблицу.

Таблица 6.

Численность микрофлоры в воздухе.

Вариант опыта	число колоний на чашке	численность микроорганизмов в 1 м^3 воздуха

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

Как произвести подсчет количества микробов в 1 м^3 воздуха? Какие методы для этого используются?

Какими факторами определяется состав микрофлоры воздуха на разной высоте, в разные сезоны года, над городами, в закрытых помещениях?

РАБОТА 9. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ.

План занятия.

Микробиологическое исследование мяса и мясных продуктов.

Микробиологическое исследование молочных продуктов (сыра).

Материалы и оборудование. Свежий сыр (типа голландского), свежее мясо, скальпель, предметные стекла, микроскоп, раствор метиленового синего, кювета, промывалка, спиртовка, фильтровальная бумага.

Одним из важнейших показателей качества пищевых продуктов является содержание в них микроорганизмов. Если пищевые продукты хранятся в условиях, способствующих размножению микроорганизмов, то содержание микрофлоры резко возрастает. Это ухудшает качество продуктов, так как развитие микроорганизмов других групп (гниения), способствует изменению вкуса и внешнего вида продукта. Кроме того, продукты зараженные патогенными микроорганизмами, опасны и как фактор распространения инфекционных заболеваний. *Микробиологические показатели* определяются в микробиологических лабораториях на всех этапах переработки и производства готовых продуктов.

Общепринятым санитарно-микробиологическим показателем качества пищевых продуктов, является *микробное число* и наличие санитарно-показательных микроорганизмов (бактерии группы *Escherichia*). Микробное число - это общее количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1г или 1мл продукта. Общее количество микробных клеток в единице объема или массы можно определить прямым подсчетом (под микроскопом) или методом посева (чашечный метод Коха).

Мясо здорового скота не содержит микроорганизмов. Если мясо хранится при комнатной температуре, в нем начинаются гнилостные процессы, преобладающей микрофлорой являются палочковидные аэробы (*Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, *Proteus vulgaris*) и анаэробы (*Clostridium putrificus*, *Cl. sporogenes*).

Допустимый уровень общего количества микроорганизмов в мясе не более $5 \cdot 10^5$ в 1г продукта.

В основе сыроделия лежат сложные биохимические процессы, в которых основная роль принадлежит молочнокислому и пропионовокислому брожению. По степени растворения молочного белка (казеина) сыры делят на твердые и мягкие. Твердые сыры делят на крупные (швейцарский, советский) и мелкие (голландский). В закваску для крупных сыров входят палочковидные молочнокислые и пропионовокислые бактерии (последние образуют углекислый газ, вызывая образование крупных "глазков" в сыре). В закваску для мелких сыров входят молочнокислые стрептококки (образующие мелкие "глазки" в сыре). Пороки при приготовлении сыра определяются

присутствием в молоке посторонней микрофлоры: кишечной палочки, бактерий рода *Clostridium*, микромицетов.

ХОД РАБОТЫ.

Фламбированным (обоженным в пламени спиртовки) скальпелем срезать поверхностный слой сыра. Затем отрезать тонкий кусочек сыра и плотно сдавить его между двумя сухими чистыми предметными стеклами. Полученный отпечаток высушить на воздухе, зафиксировать над пламенем спиртовки, окрасить метиленовым синим.

При микроскопировании крупных сыров на отпечатке выявляются палочковидные формы молочнокислых и пропионово-кислых бактерий, при микроскопировании мелких сыров - молочнокислые стрептококки.

Для приготовления отпечатка мяса фламбированным скальпелем вырезают небольшой кусочек мяса из поверхностного слоя. Внутренней стороной прикладывают к поверхности чистого предметного стекла. Препараты подсушивают на воздухе, фиксируют над пламенем спиртовки, окрашивают метиленовым синим.

В препарате из свежего мяса в поле зрения встречаются единичные кокки. В препарате из мяса, непригодного в пищу, кокки отсутствуют, преобладают палочковидные формы, все поле зрения усеяно микроорганизмами.

Зарисовать и подписать препараты.

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

Какие существуют микробиологические показатели пищевых продуктов?

По каким микробиологическим показателям оценивают качество мясных продуктов?

Предложите меры по предотвращению гнилостных процессов в мясе.

Микроорганизмы каких групп входят в состав заквасок для приготовления твердых и мягких сыров? Чем определяется образование "глазков" в сыре?

РАЗДЕЛ V. ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ БЕАЗОТИСТЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ.

Микроорганизмы - гетеротрофы получают энергию для процессов жизнедеятельности за счет окисления органических соединений. Они играют важную роль в круговороте углерода в природе, минерализуя органические остатки. Аэробы окисляют органические соединения (субстрат) до конечных продуктов - углекислого газа и воды. Анаэробы окисляют субстрат в бескислородных условиях, образуя не до конца окисленные продукты, содержащий еще значительный запас энергии. Энергетический выход анаэробного окисления гораздо ниже, чем при полном окислительном

распаде веществ. В результате брожения образуются разнообразные продукты, это зависит от природы субстрата и вида микроорганизма. Процесс бескислородного окисления органических субстратов называется *брожением*. В зависимости от конечных продуктов различают виды брожения: спиртовое, молочнокислое, маслянокислое.

РАБОТА 10. ЗНАКОМСТВО С ВОЗБУДИТЕЛЯМИ СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ.

План занятия:

Микроскопические исследования микроорганизмов спиртового брожения.

Материалы и оборудование. Пекарские дрожжи, микроскоп с подсветкой, микробиологические петли, раствор фуксина, покровные и предметные стекла, салфетки, кювета для промывки.

Спиртовое брожение вызывают дрожжевые грибы рода *Torula*, *Saccharomyces*, *Shizosaccharomyces*, а также плесневые грибы рода *Mycor* и бактерии *Zymomonas mobilis*, *Erwinia amylovora* и др. Суммарно процесс спиртового брожения выражается следующим уравнением:



В промышленности для процессов хлебопечения используют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, *Sacch.vini*. Дрожжи - факультативные аэробы, т.е. при аэрации осуществляют полное расщепление субстрата, а в анаэробных условиях - протекает процесс брожения (эффект Пастера). Культурные дрожжи выведены из диких путем длительной селекции. Они способны выдерживать большие концентрации спирта в среде (до 15%), образуя меньше побочных продуктов. В хлебопечении используют образующийся углекислый газ для поднятия теста. В природе дрожжи широко распространены на поверхности ягод, плодов, овощей.

ХОД РАБОТЫ.

Приготовить препарат "раздавленная капля" из суспензии пекарских дрожжей. Можно подкрасить препарат раствором фуксина для лучшей контрастности изображения. Культурные дрожжи представляют собой крупные округлые клетки, иногда сгруппированные по несколько штук в старой культуре. В препарате могут встречаться дикие дрожжи *Candida* (удлиненные узкие клетки), что свидетельствует о загрязнении исходной культуры. Зарисовать и подписать препарат.

РАБОТА 11. ГОМО - И ГЕТЕРОФЕРМЕНТАТИВНОЕ МОЛОЧНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССОВ, ВОЗБУДИТЕЛИ.

План занятия:

Микроскопическое изучение микроорганизмов молочнокислого брожения: а) гомоферментативного, б) гетероферментативного.

Материалы и оборудование. Скислое молоко, отстоявшаяся сметана, рассол квашенной капусты или соленых огурцов, микроскоп с подсветкой, микробиологические петли, предметные и покровные стекла, раствор фуксина, стеклянные воронки, бумажные фильтры.

Молочнокислое брожение - это процесс анаэробного окисления углеводов с образованием молочной кислоты. Молочнокислые бактерии широко распространены в природе. Они встречаются в почве, на поверхности растений, в молоке. Это аэротолерантные (факультативные) анаэробы. Различают гомо- и гетероферментативное брожение.

При типичном гомоферментативном брожении в качестве единственного продукта образуется молочная кислота:



При гетероферментативном брожении, помимо молочной кислоты, образуются и другие продукты: уксусная и янтарная кислоты, этиловый спирт, углекислый газ, водород.

Возбудителем гомоферментативного молочнокислого брожения являются такие бактерии, как *Streptococcus lactis* (клетки округлые расположены короткими цепочками по 3-5 клеток), *Streptococcus cremoris* (более длинные цепочки по 6-7 клеток), *Lactobacillus bulgaricus* (крупные палочки, располагаются в виде отдельных клеток или коротких цепочек).

Возбудители гетероферментативного брожения бактерии кишечного тракта *Escherichia coli*, *Bifidobacterium breve*, а также микроорганизмы, встречающиеся в заквашенных овощах и силосе - *Lactobacillus brassicae fermentatae* (капустная палочка), *Lactobacillus cucumeris fermentatae* (огуречная палочка), *Lact. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*.

ХОД РАБОТЫ.

Приготовить препарат возбудителей гомоферментативного молочнокислого брожения. На чистое предметное стекло петлей наносят каплю профильтрованной сыворотки кислого молока, делают мазок, высушивают его на воздухе, фиксируют, подкрашивают фуксином в течение 2 минут, промывают водой и микроскопируют. Под микроскопом видны мелкие овальные клетки, соединенные по 2-5 в цепочку - *Streptococcus lactis* и палочковидные клетки, часто тоже соединенные в короткие цепочки -

Lactobacillus lactis. В пробе с поверхности молочного сгустка можно обнаружить молочную плесень - *Oidium lactis* (*Geotrichum candidum*), которая имеет мицелий, распадающийся на четырехугольные крупные клетки. *Oidium lactis* - аэроб, окисляет молочную кислоту до углекислого газа, ухудшая качество молочных продуктов.

В препарате из сыворотки сметаны обнаруживаются более длинные цепочки *Streptococcus cremoris*, в препарате из ацидофилина - *Lact. acidophilum*, из ряженки - *Lact. bulgaricum*.

Приготовить препарат бактерий гетероферментативного молочнокислого брожения. На предметное стекло наносят каплю рассола квашенной капусты или соленых огурцов, делают мазок, фиксируют его, красят фуксином, промывают и микроскопируют. Мелкие бесспорные палочки - *Lactobacillus brassicae fermentati*, *L. plantarum*, *L. cucumeris fermentati*. Зарисовать и подписать препараты.

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

Особенности энергетического обмена анаэробных гетеротрофных микроорганизмов.

Какие микроорганизмы вызывают спиртовое брожение? Напишите уравнение процесса.

Назовите возбудителей гомо- и гетероферментативного молочнокислого брожения? Отличаются ли конечные продукты?

Какие экологические ниши занимают бактерии молочнокислого и спиртового брожения в природе, как они используются в народном хозяйстве?

Опишите микрофлору кисломолочных продуктов и консервированных овощей и силоса.

РАБОТА 12. ВОЗБУДИТЕЛИ МАСЛЯНОКИСЛОГО БРОЖЕНИЯ, МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И МОРФОЛОГИЯ.

План занятия:

Знакомство с элективной средой для накопительной культуры маслянокислых бактерий.

Микроскопическое изучение возбудителей маслянокислого брожения.

Материалы и оборудование. Накопительная культура маслянокислых бактерий, раствор Люголя, микроскоп с осветителем, микробиологические петли, предметные и покровные стекла.

Маслянокислое брожение - это процесс анаэробного окисления углеводов до масляной кислоты, водорода и углекислого газа.



Возбудителями процесса являются бактерии рода *Clostridium*, например *Cl.pasteurianum*. Они широко распространены в почве, облигатные анаэробы. Часто вызывают порчу продуктов (прогоркание сливочного масла).

ХОД РАБОТЫ.

Для получения накопительных культур маслянокислых бактерий готовят элективную среду. Неочищенный промытый картофель нарезают ломтиками в большую пробирку на 1/2 высоты, добавляют щепотку мела и заполняют почти до верха водопроводной водой. Пробирки кипятят 5 минут, затем вносят комочек почвы и помещают в термостат при 28⁰С. Через 3-5 дней наблюдают интенсивные выделения газов, среда мутнеет. Элективность среды создается анаэробными условиями (высокий столб жидкости в пробирке), уничтожением беспоровой микрофлоры кипячением, нейтрализацией образующейся масляной кислоты мелом для поддержания оптимального рН среды. Источником посевного материала является почва.

Приготовить препарат "раздавленной капли" из накопительной культуры, подкрасить раствором Люголя. Подвижные палочки с закругленными концами, в старых культурах имеют форму веретена со спорой в центре - *Cl.pasteurianum*. Синее окрашивание указывает на присутствие в клетках гранулёзы. Зарисовать препарат.

Отмечают образование газов в среде, запах масляной кислоты (прогоркшего масла).

РАБОТА 13. БАКТЕРИИ, СБРАЖИВАЮЩИЕ ПЕКТИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА: ИХ ВЫДЕЛЕНИЕ, МОРФОЛОГИЯ, ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССА.

План занятия.

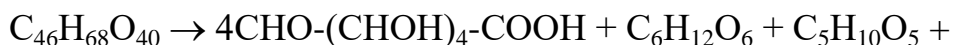
Знакомство с элективной средой для накопительной культуры пектиновых бактерий.

Микроскопическое изучение возбудителей пектинового брожения.

Материалы и оборудование. Накопительная культура возбудителей пектинового брожения, раствор Люголя, микроскоп с осветителем, микробиологические петли, предметные и покровные стекла, пинцет, скальпель.

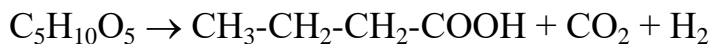
Пектиновые вещества - это основные межклеточные вещества растительной ткани, склеивающие клетки между собой. Брожение пектиновых веществ - это усложненный процесс маслянокислого брожения.

На первом этапе происходит гидролиз пектиновых веществ с помощью ферментов пектиназ до ряда продуктов: галактуровой кислоты, галактозы, арабинозы, ксилозы, уксусной кислоты, метилового спирта по уравнению:





На втором этапе сахара сбраживаются по типу маслянокислого брожения:



Возбудителями пектинового брожения являются бактерии *Clostridium pectinovorum* и *Cl.felsineum*. Это облигатные анаэробы, палочки, в период спороношения имеют плектридиальную форму (барабанных палочек). Брожение пектиновых веществ имеет большое практическое значение, т.к. вызывает мацерацию волокон прядильных растений (водяная мочка).

ХОД РАБОТЫ.

Для получения накопительной культуры пектиновых анаэробов готовят селективную среду. Снопик из 5-7 стебельков льна длиной 4-5см помещают в пробирку, заливают почти до верха водопроводной водой и кипятят 5 минут. Воду сливают, вновь заполняют пробирки водопроводной водой и кипятят. Процедуру повторяют 4-5раз. Селективность среды создается анаэробными условиями, уничтожением беспоровой флоры, присутствием в качестве единственного субстрата пектиновых веществ (растворимые углеводы экстрагированы). Для заражения кладут еще 1-2 стебелька льна и ставят в термостат при 28⁰С, через неделю изучают возбудителей процесса.

Приготовить препарат, для чего вынуть снопик из пробирки, из 1-2 соломинок отжать пинцетом или скальпелем немного жидкости на предметное стекло. Добавить каплю раствора Люголя и рассмотреть препарат под микроскопом.

Мелкие тонкие палочки со спорой на одном конце - *Cl.pectinovorum*, входе процесса по мере подкисления среды сменяется на *Cl.felsineum*. Клетки окрашиваются раствором Люголя в синий цвет.

Зарисовать и подписать препарат.

РАБОТА 14. ЗНАКОМСТВО С МИКРООРГАНИЗМАМИ, СБРАЖИВАЮЩИМИ КЛЕТЧАТКУ.

План занятия.

Знакомство с селективной средой для накопительной культуры целлюлозных анаэробов.

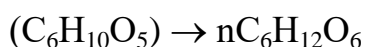
Микроскопическое изучение возбудителей брожения клетчатки.

Материалы и оборудование. Накопительная культура возбудителей сбраживания целлюлозы, микроскоп с осветителем, пинцет, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, раствор фуксина.

Целлюлоза является основным компонентом растительной клеточной

стенки. Брожение целлюлозы является усложненным вариантом маслянокислого брожения.

На первом этапе под действием ферментов целлюлаз происходит последовательный гидролиз целлюлозы до олигосахаров, целлобиозы и глюкозы:



На втором этапе глюкоза сбраживается по типу масляного брожения:



Анаэробное разложение целлюлозы вызывают почвенные бактерии *Clostridium omelianskii* и *Cl.thermocellum*. Это облигатные анаэробы, имеют вид тонких палочек со спорой на конце, в старой культуре образуются нити. В рубце жвачных животных целлюлозу сбраживают бактерии рода *Ruminococcus* и *Cl.cellobioparum*.

ХОД РАБОТЫ.

Для получения накопительной культуры готовят элективную среду следующего состава (в г/л) : $(NH_4)_2SO_4$ - 2,0; KH_2PO_4 - 1,0 ; $Mg SO_4$ - 0,5 ; NaCl - 1,0 ; $CaCO_3$ - 0,5 ; пептон - 0,5. Среду разливают в высокие пробирки, кипятят 5 минут, вносят полоску фильтровальной бумаги, комочек почвы и ставят в термостат при 30-35⁰С. Элективность среды определяется анаэробными условиями, уничтожением беспоровых форм кипячением, присутствием в качестве единственного субстрата целлюлозы. Источником посевного материала является почва. Через 2 недели анализируют результаты опыта.

Извлечь полоску фильтровальной бумаги из жидкости пинцетом. Отщипнуть небольшой кусочек бумаги, поместить на предметное стекло в каплю воды, расщепить препаровальными иглами на волоконца. Затем волокна удаляют, а из капли жидкости готовят фиксированный и окрашенный фуксином препарат. На препарате видны длинные тонкие изогнутые палочки с плектридиальным спороношением - *Cl.omelianskii*. При более высокой температуре инкубации развивается *Cl.thermocellum*.

Зарисовать препарат.

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

Какие основные продукты образуются в результате деятельности маслянокислых, пектиновых и целлюлозных анаэробных бактерий?

Опишите стадии сбраживания пектина и целлюлозы.

Назовите возбудителей брожения: истинно маслянокислого, пектинового, целлюлозного.

Какое значение они имеют в народном хозяйстве и в процессе минерализации углеродных соединений в природе?

РАБОТА 15. УКСУСНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ, МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ВИДОВАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА.

План занятия.

Знакомство с элективной средой для выделения уксуснокислых бактерий.
Микроскопическое изучение возбудителей уксуснокислого брожения.

Материалы и оборудование. Накопительная культура уксуснокислых бактерий, микробиологические петли, предметные и покровные стекла, микроскоп с осветителем, раствор Люголя, фуксин, кювета, промывалки.

Процесс уксуснокислого брожения называют брожением только по традиции. На самом деле этот процесс является неполным окислением субстрата, вызывается строгими (облигатными) аэробами. Процесс описывается следующим уравнением:



Уксуснокислые бактерии - бесспорные Грам (-) палочки, относятся к роду *Acetobacter*. Они растут и размножаются на поверхности питательной среды, образуя тонкие пленки, т.к. нуждаются в кислороде. Способны выдержать высокую концентрацию уксусной кислоты в среде (до pH 4,0). Их используют для получения уксуса. При недостатке спирта некоторые уксуснокислые бактерии способны полностью окислить уксусную кислоту до углекислого газа и воды. Эта группа широко распространена в природе и встречается на поверхности плодов.

ХОД РАБОТЫ.

Для получения накопительной культуры уксуснокислых бактерий в 2 колбы тонким слоем (1-2 см) наливают пиво, добавляют по 1 мл этилового спирта, одну ставят в термостат при 28⁰С, другую оставляют при комнатной температуре. Элективность среды обеспечивается аэробными условиями и присутствием этилового спирта. Через 3-4 суток на поверхности пива появляется пленка.

Рассматривают внешний вид пленки, приготавливают прижизненный и окрашенный раствором Люголя препарат, микроскопируют.

Уксуснокислые бактерии представлены родом *Acetobacter*.

Acetobacter aceti образует слизистую пленку, не поднимающуюся вверх по стенкам колбы. Это короткие бесспорные неподвижные палочки, клетки расположены в виде цепочек, от йода окрашиваются в желтый цвет.

Acetobacter pasteurianum образует сухую морщинистую серовато-белую пленку, поднимающуюся по стенкам колбы, йодом окрашивается в синий цвет, морфология клеток аналогична.

Acetobacter xylinum образует плотную слизистую пленку значительной толщины. Клетки окрашиваются йодом в синий цвет. Бактерии являются компонентом "чайного гриба" - симбиотического организма, состоящего из уксуснокислых бактерий и дрожжей. Дрожжи сбраживают сахар до спирта, а *A. xylinum* окисляет спирт до уксусной кислоты.

Зарисовать препараты, отметить внешний вид и окраску пленки бактерий. Приготовить фиксированный препарат, окрашенный фуксином.

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

Чем отличается процесс неполного окисления углеводов от брожения?

Имеют ли уксуснокислые бактерии ферменты цикла Кребса и дыхательную цепь, каковы их потребности в кислороде?

Практическое применение и естественная экологическая пища уксуснокислых бактерий.

Как изменяется концентрация уксусной кислоты в среде после потребления субстрата (спирта)?

РАБОТА 16. МИКРООРГАНИЗМЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ АЭРОБНОЕ РАЗЛОЖЕНИЕ КЛЕТЧАТКИ, ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ИЗ РАЗНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП.

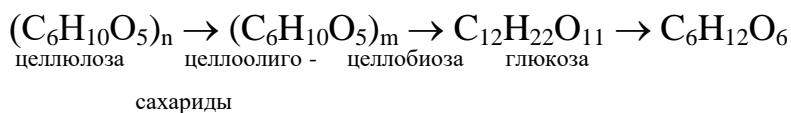
План занятия.

Знакомство с элективной средой для накопительной культуры целлюлозоразрушающих аэробов.

Микроскопическое исследование возбудителей.

Материалы и оборудование. Накопительная культура целлюлозоразрушающих аэробов, микроскоп с подсветкой, пинцет, предметные и покровные стекла, раствор фуксина, препаровальные иглы.

Целлюлоза - один из распространенных на Земле биополимеров, основное вещество клеточных стенок растений. Годовая продукция целлюлозы на Земле составляет $3 \cdot 10^{12}$ т. Целлюлоза - стойкое соединение, разлагается узкоспециализированной группой микроорганизмов, синтезирующих фермент целлюлазу. Целлюлазный комплекс состоит из четырех видов ферментов, осуществляющих гидролиз целлюлозы до целлоолигосахаридов, целлобиозы и глюкозы. Схема процесса гидролиза целлюлозы:



Целлюлаза может выделяться в среду (грибы и актиномицеты), или оставаться связанной с наружной поверхностью клеточной стенки (бактерии). Целлобиоза поступает внутрь клетки и расщепляется до глюкозы внутриклеточной целлобиазой. Гидролитическая стадия протекает одинаково у аэробных и анаэробных микроорганизмов. На второй стадии у аэробов глюкоза окисляется полностью до углекислого газа и воды. Целлюлолитики широко распространены в почве, их можно обнаружить среди различных групп микроорганизмов: бактерий, грибов, актиномицетов. Многие фитопатогены обладают целлюлазной активностью, что облегчает им

проникновение внутрь растения.

ХОД РАБОТЫ.

Для получения накопительной культуры целлюлолитических аэробов используют среду Гетчинсона. Состав среды (в г/л): K_2HPO_4 - 1,0; $CaCl_2$ - 0,1; $MgSO_4$ - 0,3; $NaCl$ - 0,1; $FeCl_3$ - 0,01; $NaNO_3$ - 2,5. Стерильную питательную среду разливают в конические колбы слоем 1-2 см, опускают в колбу складчатый бумажный фильтр конусом вверх. В колбу вносят комочек почвы и ставят на инкубацию при 28°C. Через две недели на фильтре появляются разноцветные пятна колоний микроорганизмов. Элективность среды обеспечивается аэробными условиями роста и использованием в качестве единственного субстрата целлюлозы.

Вынуть пинцетом бумажный фильтр из колбы. Произвести внешний осмотр фильтра. Отметить места с цветными пятнами и ослизнением клетчатки. Приготовить препарат, для чего отщипнуть пинцетом кусочек фильтра с отмеченных пятен, поместить его в каплю воды на предметное стекло, расщепить волокна фильтра с помощью препаровальных игл. Окрасить препарат фуксином, промикроскопировать.

На препаратах можно обнаружить микроорганизмы разных групп. Миксобактерии (роды *Cytophaga*, *Sporocytophaga*, *Sorangium*) образуют на фильтре слизистые, влажные, медленно растущие пятна желтого, оранжевого, коричневого цвета. Клетки длинные, слегка изогнутые палочки с заостренными концами. Бактерии рода *Cellvibrio* образуют на фильтре слизистые колонии охряно-желтого цвета, быстро распространяющиеся по поверхности. Это мелкие, слегка изогнутые палочки (вибрионы) с закругленными концами. Бактерии рода *Cellfalcicula* образуют на фильтре слизистые зеленые колонии. Это короткие палочки с заостренными концами. Кроме этого на фильтре обнаруживаются колонии актиномицетов (роды *Actinomyces* и *Micromonospora*) и грибов (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Stachybotrys*).

Найти и зарисовать микроорганизмы из различных таксономических групп.

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

Опишите последовательность процесса гидролиза целлюлозы в почве.

Какой процесс энергетически выгоден: сбраживание или аэробное разложение целлюлозы?

Какова экологическая значимость процесса разложения клетчатки?

Назовите возбудителей аэробного расщепления целлюлозы. Почему способность расщеплять целлюлозу встречается среди микроорганизмов различных таксономических групп?

РАБОТА 17. ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ ПОЧВЫ И ПОДСЧЕТ ЧИСЛЕННОСТИ ЦЕЛЛЮЛОЗОРАЗРУШАЮЩИХ АЭРОБОВ.

План занятия.

Знакомство с селективной средой для выделения целлюлозоразрушающих микроорганизмов - аэробов.

Приготовление разведений почвенной суспензии и посев на селективную среду.

Подсчет численности целлюлозоразрушающих аэробов в различных типах почв и под различными растениями.

Материалы и оборудование. Стерильная посуда (чашки Петри, пипетки на 1 мл, 2 колбы с 99 мл воды), стерильная агаризованная среда Гетчинсона, стерильные бумажные фильтры, вырезанные по диаметру чашки Петри, пробы почвы, пинцеты, спиртовки.

Целлюлозоразрушающие аэробы играют важную роль в круговороте углерода, т.к. минерализуют самый распространенный биополимер - целлюлозу. Процесс разложения целлюлозы в основном происходит в верхнем горизонте почвы и осуществляется зимогенной микрофлорой, т.е. микроорганизмами - гидролитами. Интенсивность разложения целлюлозы считают хорошим показателем общей биологической активности почвы. Это показатель интенсивности минерализационных процессов. Кроме того, с разложением целлюлозы сопряжен процесс образования гуминовых веществ и формирование почвенной структуры. В то же время промежуточные продукты разложения целлюлозы сами являются хорошим субстратом для других микроорганизмов, в частности для азотфиксирующих бактерий.

В черноземах численность целлюлолитиков значительно выше, чем в сероземах и песках. На численность целлюлолитиков оказывает прямое воздействие тип фитоценоза. После злаков в почве остаются корневые и пожнивные остатки с гораздо более высоким содержанием целлюлозы, чем после бобовых.

ХОД РАБОТЫ.

В качестве селективной среды используют среду Гетчинсона, следующего состава (в г/л): KH_2PO_4 - 1,0; CaCl_2 - 0,1; MgSO_4 - 0,3; NaCl - 0,1; FeCl_3 - 0,01; NaNO_3 - 2,5; агар-агар - 20,0. Среду заранее стерилизуют и разливают в стерильные чашки Петри. В качестве единственного субстрата используют бумажные фильтры, полностью закрывающие поверхность чашки Петри.

Для приготовления разведений взять навеску почвы весом 10г (отобрать корни растений). Перенести навеску в колбу с 99 мл стерильной воды (разведение 10^{-1}) и взбалтывать 5 минут круговыми вращательными движениями, не допуская намокания ватной пробки, дать отстояться крупным почвенным частицам в течение 1-2 минут. Из первого разведения отобрать 1

мл суспензии и внести во вторую колбу с 99 мл воды (разведение 10^{-3}), перемешать 5 минут. Затем провести посев на элективную плотную среду.

Чистой стерильной пипеткой отобрать 1 мл суспензии из третьего разведения и в стерильных условиях внести на поверхность плотной среды. Закрыть чашку и осторожно вращательными движениями слегка наклоняя распределить равномерно суспензию по поверхности. Открыть чашку вблизи пламени спиртовки и пинцетом быстро уложить на поверхности бумажный фильтр.

Через 2 недели на поверхности чашки вырастают колонии целлюлозоразрушающих аэробных микроорганизмов. Подсчет их произвести с поверхности среды. Если колоний много, обратную сторону чашки разделяют карандашом по стеклу на сектора и подсчитывают каждый сектор с поверхности отдельно, затем данные суммируют.

Определяют численность целлюлолитиков в почвах нескольких типов или из-под различных растений. Численность микроорганизмов определяется по формуле:

$$A = \frac{B \times n}{V}, \quad \text{где } A - \text{численность микроорганизмов в 1 г почвы,}$$

B - число колоний на чашке,

n - разведение почвенной суспензии,

V - объем почвенной суспензии, внесенной в чашку.

Данные опыта свести в таблицу, сделать выводы.

Таблица 7.

Численность почвенных целлюлозоразрушающих аэробов.

Вариант опыта	Количество колоний на чашке	Численность целлюлозоразрушающих аэробов

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

Какое экологическое значение имеют микроорганизмы, расщепляющие целлюлозу? Где осуществляется этот процесс?

Почему численность целлюлолитических аэробов считают хорошим показателем плодородия почвы?

РАЗДЕЛ VI. ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ВЕЩЕСТВ.

Биологический круговорот азота состоит из ряда последовательных взаимосвязанных процессов: аммонификации, нитрификации, денитрификации, биологической фиксации атмосферного азота. Одни микроорганизмы минерализуют органический азот остатков растений и животных с выделением аммиака, другие - окисляют аммиак до нитратов и нитритов, третьи - восстанавливают нитраты до свободного азота, четвертые

- способны связывать свободный азот атмосферы. Эти разнонаправленные процессы протекают одновременно в различных микроразонах почвы и определяются составом микробного комплекса и условиями окружающей среды (температуры, влажности, типа почвы, типа фитоценоза).

Почвенные микроорганизмы играют основную роль в формировании плодородия почвы, т.к. переводят недоступные формы азота в такую форму, которая может усваиваться растениями (аммонийные соли, нитраты). Известно, что соединения азота является основным лимитирующим фактором для растений, т.е. определяют продуктивность фитоценоза. В агроценозах при внесении минеральных и органических азотных удобрений необходимо учитывать деятельность микроорганизмов, участвующих во всех звеньях круговорота азота, а также иммобилизацию (связывание) минерального азота в биомассе почвенных микроорганизмов. Азотные удобрения целесообразно вносить весной, чтобы избежать больших потерь от вымывания нитратов и их денитрификации. В севооборот целесообразно вводить растения, обеспечивающие активную азотфиксацию для увеличения запасов биологического азота почвы.

РАБОТА 18. МИКРООРГАНИЗМЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ АММОНИФИКАЦИЮ БЕЛКОВ.

План занятия.

1. Знакомство с элективной средой для получения накопительной культуры аммонификаторов.
2. Микроскопическое изучение возбудителей аммонификации.

Материалы и оборудование. Накопительная культура аммонификаторов белков, микроскоп с осветителем, микроскопическая петля, предметные и покровные стекла, раствор фуксина, кюветы, промывалки, фильтровальная бумага.

Аммонификация - это процесс разложения азотсодержащих органических соединений (белков, мочевины, нуклеиновых кислот, хитина), сопровождающая выделением аммиака. Процесс может происходить в аэробных и анаэробных условиях.

Аммонификация белков состоит из двух стадий. На первой стадии происходит гидролиз белков под действием внеклеточных протеаз микроорганизмов до пептидов и далее до аминокислот.

Белки → пептиды → аминокислоты.

На второй стадии в аэробных условиях аминокислоты путем дезаминирования разрушаются с образованием аммиака и соответствующих органических и кетокислот, которые метаболизируются полностью. Аммиак частично усваивается самими микроорганизмами, а частично выделяется в среду.

Аминокислоты → органические
или кетокислоты + $\text{NH}_3 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{SO}_4^{-2}$

В анаэробных условиях на второй стадии аминокислоты подвергаются сбраживанию с образованием токсических соединений (диаминов - кадаверин, путресцин), дурно пахнущих продуктов (индол, скатол), сероводорода и меркаптанов. Этот процесс называют гниением.

В процессе аммонификации принимают участие различные группы микроорганизмов. В аэробных условиях вначале накапливаются неспорообразующие бактерии (*Pseudomonas*, *Proteus*) и плесневые грибы (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*), затем бациллы (*Bacillus*), а позднее - актиномицеты. В анаэробных условиях накапливаются бактерии рода *Clostridium*.

ХОД РАБОТЫ.

Для получения накопительной культуры аммонификаторов используют элективную среду МПА или БПА. Состав сред (в г/л): пептон - 10,0; NaCl - 5,0; мясной или бобовый отвар - до 1л, агар-агар - 20,0. Для выделения аэробов среду разливают тонким слоем (1-2 см) в конические колбы и заражают комочком почвы или перегноя. Для выделения анаэробов среду разливают в пробирки высоким слоем, создавая бескислородные условия.

На следующем занятии отметить помутнение среды, газообразование и специфический запах в пробирке с анаэробами.

Приготовить препарат "раздавленная капля", окрасить фуксином. Для анаэробов брать пробу из осадка на дне пробирки. Рассмотреть возбудителей процесса под микроскопом.

Среди аэробов можно обнаружить мелкие подвижные палочки размером 1-2 мкм (*Pseudomonas fluoresceus*), длинные нитевидные клетки (*Proteus vulgaris*), кокки (*Chromobacter prodigiosum*), более крупные 5-10 мкм подвижные палочки, одинокие или соединенные в цепочку (*Bacillus subtilis*, *B.mycoides*, *B.mesentericum*). Часто из почвы выделяют грибы (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*). Рассмотреть конидиеносцы с конидиями, определить род микромицета.

На препаратах анаэробов преимущественно обнаруживаются бактерии рода *Clostridium* (*Cl.sporogenes* - спора расположена клостридиально, *Cl.putrificum* - спора расположена плектридиально).

Зарисовать и подписать препараты.

Контрольные вопросы задания для самостоятельной работы.

1. Какое место занимают процессы аммонификации в круговороте азота и какова роль в поддержании почвенного плодородия?
2. Каков механизм процесса аммонификации в почве при аэробных и анаэробных условиях? Какие токсические продукты образуются при этом?
3. Назовите представителей аммонификаторов почвы.

РАБОТА 19. НИТРИФИЦИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ, ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА.

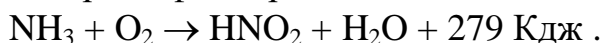
План занятия.

Знакомство с элективными средами для выделения бактерий I и II фазы нитрификации.

Микроскопическое изучение возбудителей I и II фазы нитрификации.

Материалы и оборудование. Накопительная культура нитрификаторов, микроскоп с осветителем, микробиологическая петля, спиртовка, предметные и покровные стекла, раствор фуксина, кювета, промывалка, фильтровальная бумага.

Процесс нитрификации заключается в окислении аммиака бактериями с образованием азотной кислоты. Процесс протекает в две последовательные фазы. В первой фазе происходит окисление аммиака до азотистой кислоты:



Осуществляют этот процесс нитрозные бактерии родов *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*. Во второй фазе азотистая кислота окисляется до азотной:



Осуществляют этот процесс нитратные бактерии рода *Nitrobacter*.

Нитрификаторы - строгие аэробы, получают необходимую для жизнедеятельности энергию в результате окисления только неорганических субстратов. По типу питания они относятся к хемолитоавтотрофам, органические вещества они синтезируют из CO_2 в процессе хемосинтеза и совершенно не нуждаются в готовых органических веществах.

В почве и воде деятельность нитрификаторов приводит к накоплению избыточного количества нитратов, что отрицательно сказывается на качестве сельхозпродукции и питьевой воды. Нитраты плохо сорбируются почвенными частичками, в отличие от ионов аммония, что приводит к их вымыванию весной и непроизводительным потерям азотных удобрений.

ХОД РАБОТЫ.

Для накопительной культуры нитрифицирующих бактерий используют элективную среду Виноградского следующего состава (в г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2,0; K_2HPO_4 - 1,0; MgSO_4 - 0,5; NaCl - 2,0; FeSO_4 - 0,01; CaCO_3 - 2,0. Среду разливают тонким слоем в колбу, заражают комочком почвы, ставят на инкубацию при 28°C . Элективность среды достигается полным отсутствием органического субстрата, присутствием в качестве субстрата аммонийной соли, аэробными условиями выращивания. В процессе инкубации вначале развиваются бактерии I фазы нитрификации, а затем - II фазы.

Через две недели снять результаты опыта. Приготовить препарат "раздавленная капля", окрасить фуксином.

Клетки овальной или кокковидной формы, подвижные - бактерии рода *Nitrosomonas* (*N.lurorae* для черноземов), мелкие неподвижные палочки, одиночные или соединенные в группы слизистой капсулой - *Nitrobacter* (*N.winogradskii*).

Зарисовать и подписать препарат.

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

В чем сущность процесса нитрификации? Какие стадии и возбудители?

Какую роль играет процесс нитрификации для повышения плодородия почвы?

В какой период целесообразно вносить в почву минеральные азотные удобрения, весной или осенью?

Какие особенности ультраструктуры нитратных бактерий вы знаете и с чем это связано?

РАБОТА 20. БАКТЕРИИ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЕ ПРОЦЕСС ДЕНИТРИФИКАЦИИ, ИХ ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА.

План занятия.

Знакомство с элективной средой для выделения денитрификаторов.

Микроскопическое изучение денитрифицирующих бактерий.

Материалы и оборудование. Накопительная культура денитрифицирующих бактерий, микроскоп с осветителем, предметные и покровные стекла, микробиологическая петля, спиртовки, раствор фуксина, кюветы, промывалки, фильтровальная бумага.

Процесс восстановления нитратов до молекулярного азота называется денитрификацией. Денитрифицирующие бактерии - факультативные анаэробы. В аэробных условиях они окисляют органические вещества кислородом воздуха, в анаэробных - в качестве конечного акцептора электронов в дыхательной цепи они используют нитраты. Денитрификацию можно условно назвать "нитратным дыханием".



По типу питания эти бактерии являются хемоорганогетеротрофами и нуждаются в органических веществах, как пищевом субстрате. Нитратное дыхание способны осуществлять бактерии из разных групп: *Pseudomonas* (*Ps.denitrificans*, *Ps.fluorescens*), *Escherichia*, *Chromobacterium*, распространенные во влажных слабоаэрированных почвах, особенно в ризосфере растений.

В ходе денитрификации почва теряет минеральный азот, что понижает ее продуктивность. Аэрация (вспашка, рыхление) тормозят этот процесс, т.к.

бактерии переходят к более выгодному кислородному дыханию. Денитрификаторы используются также и для очистки сточных вод от нитратов.

Следует отметить, что денитрификацию осуществляет не узкоспециализированная группа (как, например, нитрификацию), а широкий круг обычной почвенной микрофлоры. Интенсивность этого процесса зависит только от окружающих условий (низкой концентрации кислорода и наличия легко усвояемых субстратов).

ХОД РАБОТЫ.

Для получения накопительной культуры денитрификаторов используют среду Гильтая (в г/л): Na лимоннокислый - 2,5; аспарагин - 1,0; K_2HPO_4 - 1,0; K_2HPO_4 - 1,0; KNO_3 - 2,0; MgSO_4 - 2,0; CaCl_2 - 0,2; FeCl_3 - следы, pH 7,0. Среду разливают по пробиркам высоким слоем и заражают комочками почвы. Элективность среды достигается наличием нитратов, легкоусвояемых органических субстратов и анаэробными условиями.

Через неделю снимают результат. Отметить помутнение среды и обильное газообразование. Приготовить окрашенный фуксином препарат бактерий. В препарате можно обнаружить мелкие неспорообразующие подвижные палочки, одиночные или в виде коротких цепочек - *Ps.fluoresceus* и *Ps.denitrificans*. Зарисовать и подписать препарат.

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

1. Имеют ли денитрификаторы дыхательную цепь и сопряженную систему окислительного фосфорилирования?
2. К какой группе относятся денитрификаторы по типу питания?
3. Почему наиболее активно процесс протекает в болотистых почвах? Почему в ризосфере растений денитрификация усиливается?
4. В каких микроразонах почвы может происходить денитрификация в обычных условиях?

РАБОТА 21. ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ ПОЧВЫ И ПОДСЧЕТ ЧИСЛЕННОСТИ АЭРОБНЫХ СВОБОДНОЖИВУЩИХ АЗОТФИКСАТОРОВ.

План занятий.

1. Знакомство с элективной средой для выделения гетеротрофных свободноживущих азотфиксаторов.
2. Подсчет численности олигонитрофилов.
3. Подсчет численности азотобактера методом обрастания комочков почвы.

Материалы и оборудование. Стерильные чашки Петри, на одну почвенную пробу - 2 колбы с 99 мл стерильной воды, 2 стерильные пипетки, колба с разогретой и охлажденной до 50°C средой Эшби, стеклянные палочки

с оттянутым концом, фарфоровая чашка, весы с разновесами, трафарет.

Азотфиксация - это процесс связывания молекулярного азота атмосферы в химические соединения, присущий только прокариотами. Молекулярный азот в основном восстанавливается до аммиака и в форме аминокислот включается в белки. Микроорганизмы - азотфиксаторы разделяются на свободноживущие, симбиотические (эндосимбиоз с высшими растениями) и ассоциативные (в ризосфере и ризоплане растений). Эффективность азотфиксации свободноживущими микроорганизмами составляет 1-3 кг N/га·год, симбиотическими - 100-300 кг N/га·год, ассоциативными - до 70 кг/га·год. Однако доля бобовых растений в естественных ценозах и посевах мала, следовательно, основной вклад в обеспечение почвы азотом вносят ассоциативные азотфиксаторы.

Свободноживущие азотфиксаторы встречаются среди авто- и гетеротрофов. Автотрофы (цианобактерии и пурпурные несерные бактерии) вносят заметный вклад в почвах тропической зоны. В умеренной зоне широко распространены гетеротрофы: аэробы род *Azotobacter* и анаэробы - род *Clostridium*. Они нуждаются в готовых органических веществах, в отсутствии в среде источника азота начинают фиксировать азот из воздуха. Большая группа олигонитрофильных микроорганизмов способна фиксировать азот с малой эффективностью.

ХОД РАБОТЫ.

Для выделения из почвы аэробных азотфиксаторов - гетеротрофов используют среду Эшби следующего состава (в г/л): сахароза - 20,0; K_2HPO_4 - 0,2; $MgSO_4$ - 0,2; NaCl - 0,2; K_2SO_4 - 0,1; $CaCO_3$ - 5,0; смесь микроорганизмов - 1 мл. Элективность среды обеспечивается отсутствием азота и аэробными условиями выращивания.

Численность олигонитрофилов определяют при глубинном посеве. Для этого 1 мл почвенной суспензии (разведение 10^{-4}), внести в стерильную чашку Петри, залить 20-25 мл расплавленной и охлажденной до $50^{\circ}C$ среду Эшби, осторожно перемешать вращением на горизонтальной поверхности, не допуская попадания среды на крышку. Инкубировать при $28^{\circ}C$.

Через неделю подсчитать число колоний и вычислить численность олигонитрофилов в почве по формуле:

$$X = \frac{A \times n}{m}, \text{ где } X - \text{количество зачатков микроорганизмов в 1 г почвы.}$$

A - число колоний на чашке.

n - разведение,

m - объем суспензий, внесенный в чашку

Azotobacter определяют методом обрастания почвенных комочков. В стерильную чашку Петри залить 20-25 мл среды Эшби. На поверхность застывшей среды стеклянной палочкой разложить комочки почвенной пасты.

Под чашку удобно подложить трафарет. Количество комочков на чашке должно составлять от 30 до 60. Почвенную пасту получают растиранием почвы с 2 % мела в фарфоровой чашке с добавлением стерильной воды до плотной однородной массы. Мел добавляют для подавления роста грибов.

Через неделю подсчитать число комочков, вокруг которых на поверхности среды появились темные ареалы обрастания. Рассчитать относительное содержание азотобактера в анализируемых почвах.

Таблица 8.

Относительное содержание азотобактера в почве.

Вариант опыта	Общее число комочков на чашке	Число обросших комочков	Содержание азотобактера (%)

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

1. Какие группы азотфиксаторов вы знаете?
2. Каков механизм процесса фиксации азота?
3. Как выделить из почвы аэробных гетеротрофов - азотфиксаторов?

РАБОТА 22. СВОБОДНОЖИВУЩИЕ АЗОТФИКСАТОРЫ, УСЛОВИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ, МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА.

План занятия.

1. Знакомство с условиями выделения несимбиотических почвенных азотфиксаторов.
2. Микроскопическое изучение аэробных азотфиксаторов (род *Azotobacter*).
3. Микроскопическое изучение анаэробных азотфиксаторов (род *Clostridium*).

Материалы и оборудования. Накопительная культура аэробных азотобактеров, микробиологическая петля, микроскоп с осветителем, предметные и покровные стекла, раствор фуксина, туши, Люголя, кювета, промывалки, фильтровальная бумага.

Наиболее хорошо изученными свободноживущими почвенными азотфиксаторами являются аэробные бактерии рода *Azotobacter* и анаэробные бактерии рода *Clostridium*. Это гетеротрофы, нуждающиеся в готовых органических веществах, при исчерпании азота в среде начинают фиксировать азот воздуха.

Азотобактер очень требователен к окружающим условиям, не растет на кислых, бедных органикой, фосфором и молибденом, недостаточно влажных и аэрируемых почвах. В сухом климате выявляется лишь как весенний эфемер. Фиксирует до 15-20 мг N/г потребленного органического субстрата.

В анаэробных условиях на тяжелых кислых почвах фиксацию азота осуществляют *Clostridium pasteurianum*. Необходимую энергию эта бактерия получает в процессе масляно-кислого брожения. Активность азотфиксации этой бактерии составляет до 10-12 мг N/г потребленного субстрата.

ХОД РАБОТЫ.

Для получения накопительной культуры свободноживущих азотфиксаторов используют элективную среду Эшби (см. Работу 20). Питательную среду разливают тонким слоем 1-2 см в колбы и заражают парниковой почвой. Инкубируют при 28⁰С. Через неделю на поверхности колбы появляется коричневая пленка, в некоторых колбах жидкость сильно пенится.

Приготовить прижизненный препарат из поверхностной пленки, окрасить раствором фуксина в течение 3 минут, добавить каплю туши, смешать и размазать петлей по стеклу. Когда мазок высохнет, промикроскопировать его.

В молодом возрасте азотобактер - подвижная крупная палочка, которая с возрастом теряет подвижность. Клетка уменьшается в размерах, превращается в цисту, образует плотную оболочку и слизистую капсулу, содержит, как правило, по две клетки вместе. *Azotobacter chroococcum* выделяет коричневый пигмент, *A. agile* и *A. vinelandii*- желто- зеленый пигмент. В препарате на черном фоне хорошо видны розовые капсулы и в них красные клетки *A. chroococcum*.

Если жидкость в колбе пенится и издает запах масляной кислоты, из нижних слоев приготовить прижизненный препарат, окрасить раствором Люголя. Клетки *Clostridium pasteurianum* палочковидные, в зрелом возрасте имеют вид веретена, образуют в центре спору, по диаметру превышающую клетку. Раствором Люголя окрашивается в синий цвет (реактив на гранулезу).

Зарисовать и подписать препараты.

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

1. Охарактеризуйте наиболее распространенных в почвах несимбиотических азотфиксаторов (отношение к кислороду, тип питания, условия для азотфиксации, распространение, экология).
2. Почему микроорганизмы из рода *Clostridium* менее эффективно осуществляют азотфиксацию, чем *Azotobacter*?
3. Могут ли в различных микроразнообразиях почвы одновременно фиксировать азот и *Azotobacter* и *Clostridium*?
4. Какие микробиологические препараты используются в сельском хозяйстве для бактериализации семян растений?

РАБОТА 23. ЗНАКОМСТВО С СИМБИОТИЧЕСКИМИ АЗОТФИКСАТОРАМИ.

План занятия.

1. Знакомство с внешним видом клубеньков на различных бобовых растениях.
2. Изучение строения клубеньков.
3. Изучение морфологии клубеньковых бактерий.

Материалы и оборудование. Зафиксированные в формалине корневые системы разных бобовых растений, бритва, микроскоп с осветителем, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, пинцет, раствор фуксина, спиртовка.

К эндосимбионтам высших растений относятся бактерии рода *Rhizobium* (симбиоз с отрядом бобовых) и актиномицеты рода *Frankia* (симбиоз с облепихой, ольхой). Бактерии *Rhizobium* имеют сложный цикл развития. Они проникают в корневой волосок в виде палочки с перитрихальным жгутикованием, обильно размножаются и в виде тяжа - "инфекционной нити" - проникают в клетки коры корня. Клетки усиленно делятся, образуя клубенек, в котором бактерии проходят стадию опоясанной палочки и превращаются в крупные клетки неправильной формы - бактериоиды. Наиболее активно работают (фиксируют азот) клубеньки в фазе цветения растений. К осени клубенек отмирает, а бактерии в виде артростор попадают в почву.

Симбиотические азотфиксаторы - гетеротрофы, органические вещества получают от растений, а сами поставляют азот в виде аминокислот. *Rhizobium* специфичны по отношению к растению-хозяину, что отражено в их видовых названиях, форма клубеньков также различна. У клевера они мелкие и продолговатые, у гороха - округлые и крупные, у люпина достигают величины грецкого ореха.

ХОД РАБОТЫ.

Рассмотреть и зарисовать внешний вид клубеньков на корнях различных бобовых растений.

Сделать бритвой тонкий срез поперек клубенька, поместить его в каплю воды, подкрасить фуксином и посмотреть под микроскопом. Отметить бактериоидную ткань с массой клеток неправильной формы - бактериоидов.

Зарисовать внутреннее строение клубенька. Для изучения морфологии клубеньковых бактерий приготовить фиксированный препарат. Разрезать клубенек, отжать его содержимое в каплю воды на предметное стекло. Если клубеньки маленькие, их разрушить препаровальными иглами и размазать по стеклу. Полученные мазки фиксируют над пламенем спиртовки и окрашивают раствором фуксина. На препарате видны палочки, опоясанные палочки и бактериоиды.

Зарисовать и подписать препарат.

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

1. Как клубеньковые бактерии проникают в растения? Чем определяется их видовая специфичность?
2. На какой стадии развития растений эти бактерии наиболее активно фиксируют молекулярный азот воздуха?
3. Какие типы взаимоотношений бактерий и растений наблюдается до и после образования клубеньков?
4. Почему посевы бобовых культур повышают плодородие почвы?

РАЗДЕЛ VII. ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ДРУГ С ДРУГОМ И ВЫСШИМИ РАСТЕНИЯМИ.

РАБОТА 24. ЗНАКОМСТВО С МИКРОБАМИ-АНТАГОНИСТАМИ.

План занятия.

1. Определение антибиотических свойств актиномицетов.
2. Определение чувствительности бактерий к пенициллину.

Материалы и оборудование. Чашки Петри с питательной средой (МПА или БПА), чистая культура актиномицета, раствор пенициллина, чистые культуры тест-организмов (*Bacillus subtilis*, *Sarcina flava*, *Micrococcus coralines*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium waksmanii* и др.), спиртовки, микробиологические петли, стерильные бумажные диски диаметром 2 см, скальпели, линейки.

На бактерии действуют не только абиотические факторы внешней среды, но и другие микроорганизмы. Взаимоотношения между различными группами микроорганизмами могут быть разнообразными: метабиоз, паразитизм, антагонизм, симбиоз, синтрофия. В случае антагонистических отношений микроорганизмы выделяют в среду продукты обмена веществ (антибиотики), которые задерживают или полностью подавляют рост других видов. Антибиотические вещества разнообразны по химическому составу и механизму действия. Характерной особенностью антибиотиков является избирательность их действия: каждый антибиотик эффективен по отношению к определенным группам микробов, но не действует на другие. Для определения антибиотических свойств микроорганизмов и спектра антимикробного действия используют методы диффузии в толще агара, основанные на способности антибиотика задерживать рост или убивать микроорганизмы, находящиеся в зоне диффузии.

ХОД РАБОТЫ.

- I. Предварительно обожженным в пламени спиртовки и охлажденным

скальпелем вырезают небольшие (1-2 см в диаметре) участки среды с хорошо сформированным мицелием актиномицета и помещают их в центр чашки Петри со стерильной питательной средой. После этого микробиологической петлей по поверхности среды производят посев тест-организмов по радиусу от периферии чашки к блочку с актиномицетом. Каждый раз после посева обжигают петлю в пламени спиртовки. На дне чашки подписывают название тест-организма по ходу каждого штриха.

II. В центре чашки Петри на поверхность стерильной питательной среды кладут бумажный диск, предварительно смоченный раствором пенициллина. Вокруг диска по радиусу чашки от периферии к диску производят посев тест-организмов. Чашки ставят на инкубацию в термостат при 28⁰С.

Антибиотики, диффундируя в агар в центре чашки, по-разномувливают на изучаемые тест-организмы. На следующем занятии измерить зону подавления роста культур вблизи блочка с актиномицетом и бумажного диска и определить чувствительность тест-организмов к антибиотикам. Результаты опыта свести в таблицу.

Таблица 9

Чувствительность тест-организмов к различным антибиотикам.

Тест-культуры	Ширина зоны подавления роста антибиотиками: пенициллином Actinomyces sp.

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

Какие существуют типы взаимоотношений микроорганизмов друг с другом?

Какие вещества называются антибиотиками, в чем проявляется избирательность их действия?

Какими методами можно определить, обладает ли данный вид микроорганизмов антибиотической активностью?

Как определяется спектр действия данного антибиотика?

Каковы механизмы воздействия антибиотиков на процессы жизнедеятельности прокариот?

РАБОТА 25. ИЗУЧЕНИЕ ЭПИФИТНОЙ МИКРОФЛОРЫ.

План занятия.

Количественный учет эпифитной микрофлоры семян злаков.

Определение качественного состава эпифитной микрофлоры семян, хранящихся при различных условиях.

Материалы и оборудование. Пробы семян, хранившихся в правильных условиях и при повышенной влажности, технические весы с разновесами,

колба на 200 мл с 45 мл стерильной воды, стерильный отмытый кварцевый песок, две колбы с 99 мл стерильной водопроводной воды, стерильные пипетки по 1 мл, стерильные чашки Петри, колба с разогретой и охлажденной до 50⁰С средой (МПА или БПА), спиртовки. Микроскоп с осветителем.

На поверхности растений развивается большая группа микроорганизмов, которые называются эпифитами. Эпифитные микроорганизмы, обитающие на поверхности корней, называются ризосферными, на поверхности стеблей, листьев и семян растений - филлостерными. Эпифиты питаются продуктами жизнедеятельности (экзосмоса) растений. Эпифиты, в свою очередь, защищают поверхность растений от повреждения фитопатогенными микроорганизмами, т.к. целый ряд из них обладает антибиотической активностью.

Численность филлостерной микрофлоры обычно невелика и видовой состав довольно постоянен. Более 90 % из них составляют неспороносные бактерии (род *Pseudomonas*), а бациллы и грибы составляют небольшой процент, встречаются микрококки, молочнокислые бактерии и дрожжи. На зерне особенно часто встречается *Psedomonas herbicola* (*Erwinia herbicola*), образующая золотисто-желтые колонии.

Если семена зерновых культур хранятся в условиях повышенной влажности, то наблюдается процесс саморазогревания семян за счет активного развития микрофлоры. При этом обычно меняется и видовой состав микрофлоры. Обильно размножаются непигментированные палочки, термофильные микрококки (белые плотные колонии), а также плесневые грибы и актиномицеты. Часто при этом накапливаются и токсические вещества, поэтому скармливание такого зерна скоту вызывает отравление. Напротив, преобладание *Ps. herbicola* в микрофлоре зерна служит показателем хорошего качества.

ХОД РАБОТЫ.

Навески семян злаков, хранившиеся в разных условиях, массой по 5 г поместить в колбу с 45 мл стерильной водопроводной воды и добавить 2-3 г песка. Колбы взбалтывать 10 минут круговыми вращательными движениями, стараясь не замочить ватную пробку. Оставляют стоять 2 минуты для осаждения песка. Разведение смыва 10⁻¹. Из надосадочной жидкости приготовить разведение 10⁻³ и 10⁻⁵. Для этого каждый раз новой стерильной пипеткой отбирают 1 мл из предыдущего разведения, вносят в колбу с 99 мл воды, хорошо перемешивают. Из разведения 10⁻⁵ производят посев. Для этого 1 мл суспензии вносят в пустую стерильную чашку Петри (вблизи пламени спиртовки), заливают 20-25 мл расплавленный и охлажденный до 50⁰С среды (МПА или БПА) и осторожно перемешивают вращательными движениями, не допуская попадания среды на крышку. Чашки инкубируют при 28⁰С в термостате.

На следующем занятии подсчитывают общее число колоний, выросших на чашках. Отдельно подсчитывают число колоний *Ps.herbicola* (блестящие оранжевые) и *Ps.fluorescens* (желто-зеленые). Для различных проб зерна определяют процентное содержание *Ps.herbicola*. Результаты опыта сводят в таблицу.

Таблица 10.

Качественный и количественный состав эпифитной флоры зерна.

Пробы семян	Число колоний на чашке	Численность микробов в 1г зерна	Процентное содержание <i>Ps.herbicola</i>
----------------	---------------------------	---------------------------------------	---

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

Какие микроорганизмы относятся к эпифитной микрофлоре?
 Как питаются эпифиты? Какие вещества поставляют для них растения?
 Получают ли растения пользу от симбиоза с эпифитами?
 Существует ли антогонизм эпифитов и фитопатогенов?
 Какие группы микроорганизмов входят в состав эпифитной микрофлоры поверхности семян?
 Как меняется микрофлора семян при неправильном их хранении, и какие последствия это вызывает?

РАБОТА 26. ПОДСЧЕТ ЧИСЛЕННОСТИ РИЗОСФЕРЫ И РИЗОПЛАНА РАЗЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ.

План занятия.

Подсчет численности ризосферной микрофлоры растений.
 Учет микрофлоры ризоплана растений методом последовательных отмываний корней по Теппер.

Материалы и оборудование. Монолит почвы или вегетационный сосуд с растениями, пинцет, ножницы, весы с разновесами, стерильный песок, 6 колб на 250 мл с 99 мл стерильной воды, стерильные пипетки, колба с расплавленной и охлажденной средой (МПА или БПА), стерильные чашки Петри.

В почве, непосредственно прилегающей к корням (ризосфере) и на поверхности корня (в ризоплане) содержится гораздо больше бактерий и меньше грибов и актиномицетов, чем в почве без растений. Источником питания микробов служит корневой опад (отмирающие клетки эпидермиса и корневые волоски), а также корневые выделения (продукты экзосмоса растений). Корневой опад и экзосмос составляют до 1/3 продуктов фотосинтеза растений и является нормальным физиологическим процессом неповрежденных корней растения. Экологический смысл этого процесса

заключается в обеспечении пищевых потребностей микрофлоры ризоплана и ризосферы, которая, в свою очередь, осуществляет процесс ассоциативной азотфиксации и снабжает растение органическими формами азота. Следовательно, отношение растений с микрофлорой ризоплана и ризосферы являются симбиотическими. Так как химический состав корневых выделений различается у растений разных родов (у бобовых преобладают аминокислоты, у злаков - сахара и органические кислоты), то и видовой состав микрофлоры ризосферы у них различен.

Кроме того, бактерии ризосферы минерализуют органические остатки в почве, выделяют кислоты, растворяющие нерастворимые фосфаты, что обеспечивает растение доступными веществами. Отдельные виды продуцируют витамины, ростовые вещества, стимулируют рост корней, или токсины, ингибируют рост. Таким образом, микрофлора ризосферы регулирует рост и развитие растений. Ряд видов бактерий (например, *Pseudomonas*) обладает антибиотической активностью к фитопатогенам (например, возбудителям корневых гнилей растений).

ХОД РАБОТЫ.

Из монолитов почвы пинцетом и ножницами отбирают 1 г молодых корней примерно одного диаметра. Корни помещают в колбу с 99 мл воды и взбалтывают 5 минут (разведение 10^{-2}). Пинцетом извлекают корни и переносят последовательно во вторую, третью и четвертую колбы. В каждой колбе корни отмывают по 2 минуты. В четвертую колбу добавляют 3-5 г песка.

I. Посев ризосферной микрофлоры. Из первой колбы делают разведение до 10^{-4} (1 мл суспензии и 99 мл воды) и 1 мл вносят в стерильную чашку Петри. Вблизи пламени спиртовки в чашку заливают 20-25 мл среды и круговыми движениями осторожно перемешивают, не допуская попадания среды на крышку.

II. Посев микрофлоры ризоплана. Смывы с корней (2,3 и 4 колбы) объединяют. Корни извлекают пинцетом и взвешивают. Из объединенного смыва делают разведение до 10^{-4} (1 мл суспензии и 99 мл воды) и производят посев на чашку Петри

Чашки инкубируют при 28°C . На следующем занятии подсчитать численность микроорганизмов по формулам:

$$P_3 = \frac{A_1 \times n_1}{B - B_{\text{отм}}}, \quad \text{где } P_3 - \text{численность микроорганизмов в ризосфере,}$$

количество зачатков/г почвы,

A_1 - число колоний на чашке,

n_1 - соответствующее разведение,

B - вес первоначальной навески корней,

$B_{\text{отм}}$ - вес навески отмытых корней.

$$P_n = \frac{A_2 \times n_2 \times m}{B_{\text{отм}}}, \quad \text{где } P_n - \text{численность микроорганизмов в ризоплане,}$$

количество зачатков/г корней,

A_2 - число колоний на чашке,

n_2 - соответствующее разведение,

m - суммарный объем смыва (2,3 и 4 колбы),

$V_{отм}$ - вес навески отмытых корней.

Результаты опытов сводят в таблицу.

Таблица 11.

Численность микрофлоры ризосферы и ризоплана растений.

Вид растений (тип почвы)	Численность микроорганизмов	
	в ризосфере	в ризоплане

Контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы.

1. Какие микроорганизмы относятся к микрофлоре ризосферы и ризоплана?

2. Какова роль растений в питании микроорганизмов ризосферы и ризоплана?

3. Какова роль микрофлоры ризосферы и ризоплана в питании и регуляции роста растений?

4. Какие микроорганизмы являются антагонистами корневых гнилей растений?

5. Где содержится больше микроорганизмов, в ризосфере или ризоплане растений?

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приготовление хромовой смеси.

В концентрированную серную кислоту добавляют 5 % (от объема) бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$). Смесь хорошо размешивают и оставляют на сутки. Раствор используют для мытья посуды. Изменение цвета с темно-оранжевого на темно-зеленый свидетельствует о ее непригодности.

Дезинфицирующие растворы.

В лабораторной практике их используют для чистки рабочего стола, протирания стен, полов, даже для дезинфекции рук, которые можно протереть 70 % -ным этанолом.

Растворы (%): фенола (карболовая кислота) - 3-5
хлорамина - 0,3-0,5
соды (бикарбонат натрия) - 2-3.

РЕЦЕПТЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ КРАСИТЕЛЕЙ.

Насыщенные спиртовые растворы красителей.

а) раствор фуксина

Фуксин основной - 10 г

96 % - ный этиловый спирт - 100 мл

б) раствор генцианвиолета - 10 г

96 % - ный этиловый спирт - 100 мл

Вместо генцианвиолета можно пользоваться кристалл- или метилвиолетом.

в) раствор метиленового синего

метиленовый синий - 6 г

96 % - ный этиловый спирт - 100 мл

Растворы красителей выдерживают 24 часа при 37°C. На их основе готовят водные растворы красителей.

Водные растворы красителей.

а) раствор фуксина

насыщенный спиртовой раствор фуксина - 1 мл дистиллированная вода - 100 мл

б) раствор генцианвиолета

насыщенный спиртовой раствор генцианвиолета - 1 мл дистиллированная вода - 100 мл

в) раствор метиленового синего

насыщенный спиртовой раствор метиленового синего - 1 мл дистиллированная вода - 100 мл

г) раствор нейтрального красного

нейтральный красный - 0,5 г дистиллированная вода - 100 мл

Водные растворы красителей нестойкие, их готовят непосредственно перед анализом.

РАСТВОР ЛЮГОЛЯ ДЛЯ ОКРАСКИ ГЛИКОГЕНА И ГРАНУЛЕЗЫ.

Йод кристаллический - 7 г Калий йодистый - 20 г вода дистиллированная - 300 мл

В ступку помещают навеску йода и йодистого калия, растирают смесь пестиком, добавляют 1 мл дистиллированной воды, при этом йод растворяется в йодистом калии.

Раствор количественно переносят в склянку и доводят общий объем до 300 мл, хранят в темной посуде. Раствор годен не более 30 дней.

РАСТВОР ЛЮГОЛЯ ДЛЯ ОКРАСКИ ПО ГРАМУ.

Йод кристаллический - 1 г Калий йодистый - 2 г вода дистиллированная - 300 мл

Готовят таким же способом.

РАСТВОР ТУШИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ КАПСУЛ.

Тушь разводят водой 1:10, кипятят 20 минут, дают отстояться две недели. Затем сливают надосадочную жидкость, кипятят.

РАСТВОР СУДАНА III.

Судан III - 0,5 г

96 %-ный этиловый спирт или концентрированная молочная кислота - 100 мл

РЕЦЕПТЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД.

Бобово-пептонный агар (БПА).

200 г белой фасоли заливают 1 л водопроводной воды и варят до готовности, чтобы бобы не разварились. Отвар фильтруют через вату, добавляют 20 г сахарозы, 10 г пептона, 10 г хлористого натрия и 15 г агар-агара. Растворяют все компоненты при нагревании, доводят объем до 1 л, pH до слабощелочной реакции на лакмусовой бумажке добавлением 20 %- ного раствора соды (Na_2CO_3), стерилизуют.

Мясо-пептонный агар (МПА).

500 г мясного фарша (без жира и сухожилий) заливают 1 л водопроводной воды, настаивают 1 час при 50°C , экстракт процеживают через вату, кипятят 30 минут, фильтруют через бумажный фильтр. Добавляют 10 г пептона, 5 г хлористого натрия и 15 г агар-агара. Растворяют все компоненты при нагревании, доводят объем до 1 л и стерилизуют.

Среда Гетчинсона для выделения целлюлозоразрушающих аэробов (в г/л).

NaNO_3 - 2,5 KH_2PO_4 - 1,0 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3 NaCl - 0,1 CaCl_2 -

0,1 FeCl_2 - 0,01

агар-агар - 15,0

Для выделения целлюлозоразрушающих актиномицетов рН доводят до 7,2 добавлением 20 % - ного раствора NaCO_3 . Возможна замена KH_2PO_4 на K_2HPO_4 , в этом случае рН не доводят.

Для выделения целлюлозоразрушающих бактерий и грибов рН среды оставляют 4,5.

Среда Чапека для выделения микроскопических грибов (в г/л).

Сахароза - 20,0 NaNO_3 - 2,0 KH_2PO_4 - 1,0 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5
 KCl - 0,5

FeSO_4 - 0,01 агар-агар - 15,0

Перед разливом среды в чашки к ней добавляют 4 мл концентрированной молочной кислоты на 1 л.

Крахмало-аммиачный агар (КАА) для выделения иммобилизаторов азота и актиномицетов (в г/л).

Крахмал растворимый - 10,0 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2,0 K_2HPO_4 - 1,0
 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,0
 NaCl - 1,0 CaCO_3 - 3,0 агар-агар - 15,0.

Голодный агар (ГА) для выделения олиготрофов (в г/л).

Водопроводная вода - 1 л

агар-агар (многократно выщелоченный) - 15,0.

Среда Эшби для выделения азотфиксаторов (в г/л).

Сахароза - 20,0

K_2HPO_4 - 0,2

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2

NaCl - 0,2

K_2SO_4 - 0,1

CaCO_3 - 5,0

агар-агар - 15,0.