

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ТРАНСПОРТА»

Кафедра химии

О. А. ЕРМОЛОВИЧ, Е. Ф. КУДИНА, А. С. НЕВЕРОВ

МИКРОБИОЛОГИЯ

**Учебно-методическое пособие по выполнению
лабораторных работ**

Гомель 2008

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ТРАНСПОРТА»

Кафедра химии

О. А. ЕРМОЛОВИЧ, Е. Ф. КУДИНА, А. С. НЕВЕРОВ

МИКРОБИОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие по выполнению
лабораторных работ

Одобрено методической комиссией строительного факультета

Гомель 2008

УДК 579(076.5)
ББК 28.4
Е74

Рецензент – канд. хим. наук, доцент Ю.А. Пролесковский
(УО «ГГУ им. Ф.Скорины»)

Ермолович, О.А.

Е74 Микробиология : учеб.-метод. пособие по выполнению лабораторных работ
О. А. Ермолович, Е. Ф. Кудина, А. С. Неверов ; М-во образования Респ. Белору-
сь, Беларус. гос. ун-т трансп. – Гомель : БелГУТ, 2008. – 53 с.

ISBN 978-985-468-418-8

Пособие включает 8 лабораторных работ, а также основные теоретические сведения и приложения, необходимые для их выполнения.

Предназначено для студентов инженерно-технических специальностей.

УДК 579(076.5)
ББК 28.4

ISBN 978-985-468-418-8 © Ермолович О. А., Кудина Е. Ф., Неверов А. С., 2008
© Оформление. УО «БелГУТ», 2008

ВВЕДЕНИЕ

Пособие составлено в соответствии с действующей программой курса микробиологии для студентов, обучающихся по специальности 1–70 04 03: «Водоснабжение, водоотведение и охрана водных ресурсов».

Помимо приобретения теоретических знаний по микробиологии будущим специалистам необходимы лабораторно-практические занятия, являющиеся, по сути, небольшими научно-исследовательскими работами. Каждая лабораторная работа содержит краткое обоснование цели исследования, описания техники и методики постановки опыта, анализа полученных результатов, а также перечень необходимых материалов и оборудования для проведения эксперимента.

Цель лабораторных занятий – овладение теоретическими основами курса микробиологии, а также ознакомление с содержанием и основными методами санитарной микробиологии, позволяющей определить санитарное состояние окружающей среды.

ПРАВИЛА ПО ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1 Не входить в лабораторию в пальто, головном уборе, не вносить посторонние вещи.

2 Строго соблюдать правила обращения с химическими реактивами и красителями.

3 С большой осторожностью пользоваться смесью спирта с эфиром, не переносить ее на столы с горелками.

4 Поскольку некоторые микроорганизмы, особенно споры грибов, являются аллергенами, не допускать их распыления – не оставлять открытыми чашки Петри, пробирки, колбы с культурами микроорганизмов.

5 Перед тем как набирать ртом с помощью пипетки суспензии или реактивы, убедиться, что пипетка закрыта с тупого конца ватой.

6 В лаборатории поддерживать порядок и чистоту. По окончании занятий протирать иммерсионный объектив микроскопа мягкой тканью, накры-

вать микроскоп полиэтиленовым чехлом, приводить в порядок рабочее место.

7 Помнить о том, что студенты несут ответственность за используемые ими микроскопы, другое лабораторное оборудование, чистоту рабочего места.

8 Перед уходом из лаборатории дежурному проверять, выключены ли вода и электроприборы.

Лабораторная работа №1

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРОВАНИЯ

Цель занятия. Ознакомление с материалами и оборудованием микробиологических лабораторий; освоение техники микроскопирования микробиологических препаратов.

Материалы и оборудование: красители: метиленовый синий, фуксин, генциановый фиолетовый и др.; раствор Люголя; микроскоп, спиртовка, бактериальные петли, иглы.

Светлопольная микроскопия. Технические характеристики микроскопа

Изучение невидимых невооруженным глазом клеток микроорганизмов, размеры которых не превышают десятков и сотен микрометров (1 мкм = 0,001 мм), возможно только при помощи микроскопов (от греч. *Micros* – малый, *skopeo* – смотрю). Эти приборы позволяют получать в сотни раз (световые микроскопы) и в десятки-сотни тысяч раз (электронные микроскопы) увеличенное изображение исследуемых объектов.

При помощи микроскопа изучают морфологию клеток микроорганизмов, их рост и развитие, проводят первичную идентификацию (от лат. *identificare* – отождествлять) исследуемых организмов, ведут наблюдения за характером развития микробных ценозов (сообществ) в почве и других субстратах.

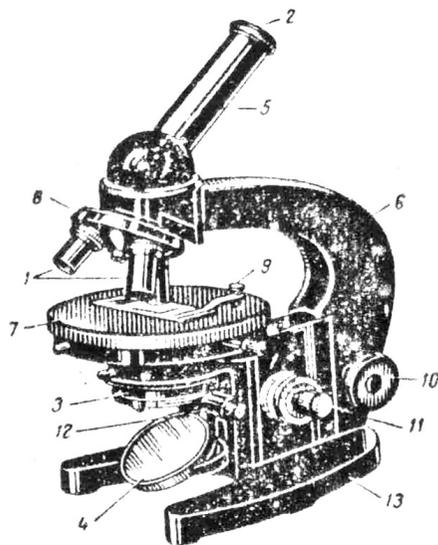
Микроскоп (рисунок 1) состоит из двух частей: механической (подсобной) и оптической (главной). К механической части микроскопа относят штатив, предметный столик и тубус (трубу).

Штатив имеет основание в виде подковы и колонку (тубусодержатель) в форме дуги. К нему примыкают коробка механизмов, система зубчатых колес для регуляции положения тубуса. Система приводится в движение вращением макрометрического и микрометрического винтов.

Макрометрический винт – (кремальера, зубчатка, макровинт) служит для предварительной ориентировочной установки изображения рассматриваемого объекта. *Микрометрический винт* (микровинт) используют для последующей четкой установки на фокус. При полном повороте микровинта труба передвигается на 0,1 мм (100 мкм). При вращении винтов по часовой стрелке труба опускается по направлению к препарату, при вращении против часовой стрелки – поднимается от препарата.

Рисунок 1 – Микроскоп биологический МБИ 1:

1 – объективы, 2 – окуляр, 3 – конденсор, 4 – зеркало, 5 – тубус, 6 – тубусодержатель, 7 – предметный столик, 8 – «револьвер», 9 – клемма, 10 – макро-винт, 11 – микровинт, 12 – винт конденсора, 13 – ножка



Предметный столик

служит для размещения на нем препарата с объектом исследования. Предметный столик вращается и перемещается во взаимно перпендикулярных плоскостях с помощью винтов. В центре столика находится круглое отверстие для освещения препарата снизу лучами света, направляемыми зеркалом микроскопа. В столик вмонтированы два зажима (*клеммы*) – пружинящие металлические пластинки, предназначенные для закрепления препарата. Если необходимо исследовать поверхность препарата, не допуская пропусков (что важно при подсчете), или же если во время работы требуется повторное исследование какого-либо определенного участка на препарате, на предметный столик помещают *препаратопроводитель*. На нем имеется система линеек – нониусов, с помощью которых можно присвоить координаты любой точке исследуемого объекта. Для этого при установке препаратопроводителя следует совместить центр вращения столика и оптическую ось системы

микроскопа с центрировочной пластинкой препаратоводителя (отсюда предметный столик с препаратоводителем называют иногда крестообразным).

Тубус (труба) – оправа, в которую заключены элементы оптической системы микроскопа. К нижней части тубуса прикрепляется револьвер (объективодержатель) с гнездами для объективов. Современные модели микроскопов имеют наклонный тубус с дугообразным тубусодержателем, что обеспечивает горизонтальное положение предметного столика.

Оптическая часть микроскопа состоит из основного оптического узла (объектив и окуляр) и вспомогательной осветительной системы (зеркало и конденсор). Все части оптической системы строго центрированы относительно друг друга. Во многих современных микроскопах зеркало и конденсор заменены вмонтированным в прибор регулируемым источником света. *Осветительная система* находится под предметным столиком. *Зеркало* отражает падающий на него свет в конденсор. Одна сторона зеркала плоская, другая – вогнутая. При работе с конденсором необходимо пользоваться только плоским зеркалом. Вогнутое зеркало применяют при работе без конденсора с объективами малых увеличений. *Конденсор* (от лат. *condenso* – уплотняю, сгущаю), состоящий из 2–3 короткофокусных линз, собирает лучи, идущие от зеркала, и направляет их на объект. Конденсор необходим, прежде всего, при работе с иммерсионной системой. Линзы конденсора вмонтированы в металлическую оправу, соединенную с зубчатым механизмом, позволяющим перемещать конденсор вверх и вниз специальным винтом. Для регулировки интенсивности освещения в конденсоре есть *ирисовая* (лепестковая) *диафрагма*, состоящая из стальных серповидных пластинок. Окрашенные препараты лучше рассматривать при почти полностью открытой диафрагме, неокрашенные – при уменьшенном отверстии диафрагмы. Под конденсором располагается *кольцевидный держатель* для светофильтров (обычно к микроскопу прилагаются синие и белое матовые стекла). При работе с искусственным источником света светофильтры создают впечатление дневного освещения, что делает микроскопирование менее утомительным для глаз.

Объектив (от лат. *objectus*) – наиболее важная часть микроскопа. Это многолинзовая короткофокусная система, от качества которой зависит в основном изображение объекта. Наружная линза, обращенная плоской стороной к препарату, называется фронтальной. Именно она обеспечивает увеличение. Остальные линзы в системе объектива выполняют преимущественно функции коррекции оптических недостатков, возникающих при исследовании объектов. Объективы бывают сухие и погружные (иммерсионные). При работе с *сухими* объективами между фронтальной линзой объектива и объектом исследования находится воздух. Оптический расчет *иммерсионных* объективов предусматривает их работу при погружении фронтальной линзы объектива в жидкую однородную среду. При работе с сухим объекти-

вом из-за разницы между показателями преломления стекла (1,52) и воздуха (1,0) часть световых лучей отклоняется и не попадает в глаз наблюдателя.

При работе с иммерсионным объективом между покровным стеклом и линзами объектива помещают кедровое масло, показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла.

Окуляр (от лат. *okularis* – глазной) служит непосредственным продолжением «линз» (хрусталиков) глаз человека. Преломляющую систему глаза можно рассматривать как двояковыпуклую линзу со средним фокусным расстоянием 15 см (расстояние наилучшего зрения 25 см). Окуляр состоит из двух линз – глазной (верхней) и полевой, или собирающей (нижней), заключенных в металлическую оправу. Назначение полевой линзы – собирать лучи, идущие от объектива, таким образом, чтобы они проходили через маленькое отверстие глазной линзы.

Назначение окуляра – прямое мнимое увеличение действительного обратного и увеличенного изображения, которое дает объектив. Увеличение окуляра выгравировано на его оправе. Рабочее увеличение окуляров колеблется в пределах от 4 до 15.

Основные технические характеристики микроскопа

Качество микроскопа определяется его увеличительной и разрешающей способностями.

Коэффициент увеличения микроскопа определяется умножением увеличения окуляра (K) на увеличение объектива (V):

$$D = KV.$$

Теоретически микроскоп может дать увеличение в 2000 раз и более. Однако следует различать полезное и бесполезное увеличения микроскопа. Пределы полезного увеличения в обычно используемых микроскопах достигают 1400 раз.

Среди существующих моделей современных микроскопов наиболее распространены микроскопы биологические исследовательские (марки МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3, МБИ-6, МБИ-10) и учебные микроскопы биологические рабочие (марки МБР-1, МБР-1А).

Работа с микроскопом

Место для микроскопа выбирают подальше от прямого солнечного света. Работа на столе с темной поверхностью меньше утомляет глаза. Лучше смотреть в окуляр левым глазом, не закрывая правого. В случае работы с бинокулярной насадкой сначала регулируют расстояние между окулярами в соответствии с расстоянием между глазами наблюдателя так, чтобы поля зрения обоих окуляров слились в одно. Переносить микроскоп необходимо двумя руками: одной держать штатив, другой — основание микроскопа. Следует предохранять микроскоп от толчков, соприкосновения с сильнодей-

ствующими веществами (кислотами, щелочами и др.). Не рекомендуется вынимать окуляр из тубуса, чтобы не загрязнять пылью тубус и объективы. Линзы должны быть всегда чистыми. Нельзя касаться пальцами оптических поверхностей. Микроскоп следует хранить в чехле.

Работа с иммерсионной системой микроскопа. При работе с иммерсионным объективом ($K=90\times$; $A=1,25$) необходимо установить зеркало плоской стороной вверх и поднять конденсор. Каплю иммерсионной жидкости (кедрового масла) наносят на препарат, не размазывая ее по стеклу. Погружать в иммерсионную жидкость можно только иммерсионные объективы (не сухие!). Глядя сбоку на предметное стекло, опускают объектив до поверхности масляной капли. Далее, глядя в окуляр, осторожно опускают объектив при помощи макровинта, следя за появлением изображения.

Техника микроскопирования микроорганизмов

Для исследования морфологии микроорганизмов используют специальные препараты. Их готовят, как правило, на предметных стеклах толщиной не более 1,2–1,4 мм. Поверхность стекла должна быть тщательно очищена и обезжирена, например хромовой смесью, спиртом, промыта водой и прокалена в пламени спиртовки. Для приготовления препаратов живых микроорганизмов используют покровные стекла толщиной до 0,17 мм, которыми накрывают препарат. Чистые стекла хранят в сухом состоянии или в обезжиривающих жидкостях. Живые микроорганизмы исследуют в лабораториях весьма ограниченно. Из-за малой контрастности живых клеток этот метод пригоден для изучения морфологии только крупных микроорганизмов, например, микроскопических грибов. Бактерии в основном изучают с помощью фиксированных препаратов.

Приготовление фиксированных препаратов

При приготовлении препаратов должна соблюдаться стерильность. Для этого необходимо прокалывать в пламени спиртовки петли, бактериологические иглы, обжигать пробирки и слегка пробки. Фиксированные препараты готовят в несколько этапов.

Приготовление мазка. Для приготовления препарата-мазка из культуры микробов, растущей на плотной питательной среде, на предметное стекло стерильной петлей (рисунок 2) наносят каплю воды или физиологического раствора, а затем, прикасаясь петлей к культуре, берут немного материала и размешивают. Микробную смесь размазывают петлей на площади 2–3 см² тонким слоем. Мазок высушивают на воздухе или в струе теплого воздуха над пламенем спиртовки, держа стекло мазком вверх. Охлажденный мазок фиксируют выше пламени спиртовки, стекло с мазком, обращенным кверху,

проводят 3-4 раза через пламя. При этом микробы погибают, клетки прикрепляются к стеклу и улучшается их окрашиваемость.

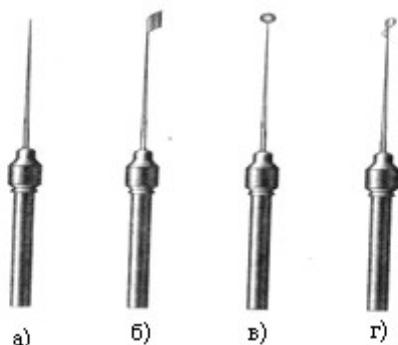


Рисунок 2 – Инструменты, используемые при работе с микроорганизмами:
а – бактериологическая игла, б – шпатель, в, г – петли

Окрашивание мазка. Для окраски фиксированный препарат помещают на мостик, находящийся над ванночкой. При окрашивании на мазок наливают несколько капель краски. По истечении срока окрашивания краску сливают, а препарат промывают водой (аккуратно) до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Мазок высушивают при помощи фильтровальной бумаги, которую осторожно прикладывают к стеклу. Мазок должен быть абсолютно сухим. Далее проводят микрофотографирование окрашенного препарата.

При окрашивании мазка препарат помещают на препаратодержатель. На мазок наносят несколько капель красителя. В зависимости от вида красителя и цели исследования продолжительность окрашивания варьируется от 1 до 5 мин, в отдельных случаях – до 30 мин и более. По окончании окрашивания препарат промывают водой, фильтровальной бумагой удаляют воду, подсушивают на воздухе и микрофотографируют.

Существуют простые и дифференцированные методы окраски.

При *простой* окраске используют какой-либо один краситель, например, метиленовый синий, фуксин, генциан фиолетовый. При этом прокрашивается вся клетка.

При *дифференцированной* окраске отдельные структуры клетки окрашиваются разными красителями. Таковы методы окраски по Граму, окраски спор.

Для окраски микроорганизмов используют анилиновые красители (основные, кислые и нейтральные). Наибольшее применение имеют основные красители — метиленовый синий, фуксин, генциановый фиолетовый и т. д. Для

окраски препаратов готовят спиртовые, водные и водно-спиртовые растворы, в некоторых случаях добавляют в качестве проб фенол, щелочь и др.

Окраска по Граму широко используется для определения видовой принадлежности бактерий. По способности окрашиваться по методу Грама все бактерии делятся на грамположительные (G^+) и грамотрицательные (G^-). (G^+) бактерии удерживают комплекс красителя генцианового фиолетового с йодом при обработке спиртом и поэтому окрашиваются в фиолетовый цвет. (G^-) бактерии не обладают такой способностью и обесцвечиваются спиртом. При последующей обработке фуксином они приобретают красную окраску. Способность бактерий окрашиваться по Граму связана с молекулярной организацией и химическим составом клеточной стенки бактерий.

Техника окраски по Граму:

1 На фиксированный мазок кладут сухую фильтровальную бумагу, пропитанную генциановым фиолетовым, наносят на бумагу 2–3 капли воды и окрашивают 2 минуты.

2 Снимают бумагу, не промывая препарат водой, наносят на мазок 2–3 капли раствора Люголя и выдерживают 1–2 минуты.

3 Сливают раствор Люголя и для обесцвечивания наносят на мазок 96%-ный этиловый спирт на 30 секунд.

4 Препарат промывают водой.

5 Для дополнительной окраски наливают на мазок водный раствор фуксина на 1 минуту.

6 Промывают препарат водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионным объективом.

(G^+) бактерии окрашены в синий (фиолетовый) цвет, а (G^-) – в розовый (красный).

Ход работы

1 Изучить с помощью микроскопа препараты различных бактерий (сарцин, стафилококков, палочковидных бактерий, вибрионов, спирохет), микроскопических грибов. Отметить их морфологические признаки (форму клеток, размеры и подвижность, окраску).

2 Зарисовать рассмотренные препараты.

3 Каждому студенту приготовить по два фиксированных препарата из предложенных чашек или пробирок с колониями бактерий или микроскопических грибов на плотной питательной среде.

4 Приготовленные фиксированные препараты из предложенных чашек или пробирок с колониями бактерий на плотной питательной среде окрасить: один – простым методом, второй – по методу Грама.

5 Промикроскопировать мазки, зарисовать форму бактерий, отметить их окраску и дифференцировать бактерии по отношению к окраске по Граму.

Контрольные вопросы

- 1 Правила работы в микробиологической лаборатории.
- 2 Устройство и принцип работы биологического микроскопа.
- 3 Основы техники микроскопирования: приготовление препарата-мазка.
- 4 Каковы методы окраски микроорганизмов?
- 5 В чем сущность метода окраски по Граму?

Лабораторная работа № 2

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ. КЛАССИФИКАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И ТРЕБОВАНИЯ К НИМ

Цель занятия. Ознакомление с методами стерилизации, со свойствами и классификацией питательных сред, со способами выращивания микроорганизмов в лабораторных условиях.

Материалы и оборудование: пептон, агар-агар, хлорид натрия, вода, пробирки биологические, чашки Петри, сушильный шкаф или автоклав, бактериальные фильтры.

Культивирование микроорганизмов.

Свойства и классификация питательных сред

Одной из основных задач микробиологии является выявление численности микроорганизмов (КОЕ – колониеобразующих единиц) в том или ином субстрате. Однако универсальной среды, на которой бы выявлялись все существующие в данном субстрате микроорганизмы, нет. Немецкий ученый *Р. Кох* предложил относительно универсальную среду на основе мясного бульона, на которой хорошо развиваются микроорганизмы, использующие органические азотсодержащие соединения.

Выращивание микроорганизмов в лабораторных условиях называется **культивированием**, а выращенные на питательной среде микробы – **культурой**. Культуры, состоящие из различных видов микроорганизмов, называются смешанными; культуры, состоящие из одного вида микробов, – чистыми. При специальных способах посева, когда в питательную среду вносится одна клетка, в результате ее размножения образуется совокупность особей, которая называется *клон*. По мере роста клона на поверхности плотной питательной среды образуется скопление микробов, видимое невооруженным глазом, которое называется **колонией**.

Микроорганизмы одного вида, выделенные из определенного источника внешней среды (организма человека, животного, пищевого продукта, пробы воды и др.), называются *штаммом*. Культивирование микроорганизмов осуществляется на средах, которые называются *питательными*.

Позднее **С. Н. Виноградским** в практику микробиологии были введены *элективные*, или *избирательные*, среды, предназначенные для определенных групп микроорганизмов. Они составлены в расчете на предельно строгие условия, при которых должен развиваться только избранный микроорганизм и никакой другой. Основной принцип элективных сред – учет избирательных потребностей микроорганизма в специфических условиях развития. Зная физиологические особенности соответствующей группы микроорганизмов, можно подобрать не только химический состав среды, но и такие условия культивирования (активную кислотность среды, условия аэрации, температуру и др.), при которых создается лабораторная имитация экологической ниши естественных условий обитания. Элективные среды позволяют осуществлять биологические процессы в лаборатории и на производстве без предварительной стерилизации среды. Примером элективных сред могут служить среды для выделения азотфиксаторов, нитрификаторов. Эти среды применяют главным образом для выделения микроорганизмов из мест их природного обитания и получения их накопительных культур.

Накопительные среды были предложены голландским ученым *М. Beijerinckom*. В них интересующий исследователя компонент среды дается в избытке, чтобы выяснить, какой микроорганизм или группа микроорганизмов его используют, поскольку именно он или они будут доминировать в этой среде.

Оптимальные среды предложил *А. А. Имшенецкий* для целлюлозоразрушающих микроорганизмов, *В. С. Буткевич* – для продуцента лимонной кислоты *Aspergillus niger*. Основной принцип оптимальных сред заключается в создании наиболее благоприятных условий для избранных микроорганизмов внесением в среду различных стимулирующих рост добавок (витаминов, ростовых веществ, микроэлементов).

По составу среды подразделяются на две группы: естественные (натуральные) и синтетические.

Естественными обычно называют среды, которые состоят из продуктов животного или растительного происхождения, имеющих сложный неопределенный химический состав. Это – различные части растений, животные ткани, солод, дрожжи, навоз, почва, вода морей, озер и минеральных источников. Их используют чаще в виде экстрактов или настоев. На естественных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, так как в них есть все компоненты, необходимые для роста. Однако среды с неопределенным составом малопригодны для изучения физиологии обмена веществ микроорганизмов, поскольку не позволяют учесть потребление ряда компонентов сре-

ды, а также выяснить, какие вещества образуют микроорганизмы. Указанные недостатки связаны с тем, что состав естественных сред очень сложен и непостоянен, так как существенно колеблется в зависимости от вида сырья и способа приготовления. Это заметно влияет на рост микроорганизмов. Естественные среды используют главным образом для поддержания культур микроорганизмов, накопления их биомассы и диагностических целей.

Синтетические – это такие среды, в состав которых входят в точно указанных концентрациях только известные химически чистые соединения. Синтетические среды бывают как простыми, так и достаточно сложными по составу. Их широко используют для исследований, связанных с изучением обмена веществ микроорганизмов.

Существуют и так называемые **полусинтетические** среды, относящиеся к средам с неопределенным составом. В них наряду с соединениями известной химической природы входят вещества неопределенного состава. Например, в мясной бульон наряду со сложными и неопределенными по химическому составу веществами (мясной бульон) могут входить пептон, глюкоза или сахароза, поваренная соль, фосфат калия; картофельные среды содержат глюкозу и пептон. Полусинтетические среды широко используют в микробиологической практике для получения витаминов, антибиотиков, аминокислот других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Питательные среды могут быть различной консистенции: **жидкие, плотные, полужидкие**.

Плотные питательные среды используют для учета количества бактерий, выделения чистой культуры и других целей. Такие среды готовят из жидких, добавляя 1,5–2,5 % агар-агара или 15 % желатина. При приготовлении полужидких сред вносят 0,1–0,2 % агар-агара.

Агар-агар – это растительный коллоид, получаемый из некоторых видов морских водорослей. В его состав входят главным образом полисахариды, а также ничтожное количество азотсодержащих веществ. Агар-агар удобен как инертный уплотнитель среды. Температура плавления агар-агара – 100 °С, затвердения – 40 °С.

Желатин – кислый азотсодержащий продукт, добываемый при выварке костей, хрящей, сухожилий, чешуи рыб. Температура плавления желатина (22–25 °С) ниже температуры инкубации большинства микроорганизмов (30–37 °С). Эта особенность и способность многих микроорганизмов разжижать желатин, выделяя протеолитические ферменты, ограничивают ее применение в качестве уплотняющего средства.

Для выращивания микроорганизмов, усваивающих органические формы азота, часто употребляют мясопептонные среды: мясопептонный бульон, мясопептонный агар-агар и мясопептонный желатин.

К *жидким* средам относятся мясопептонный бульон, сусло и др. Уплотнение сред достигается путем добавления агар-агара или желатина.

Стерилизация (от лат. *sterilis* – бесплодный) является одним из важнейших и необходимых приемов в микробиологической практике. В микробиологии стерилизацией называют уничтожение микробов или полное их удаление из обработанной среды. Стерилизуют питательные среды, посуду, инструменты и другие предметы, чтобы не допустить развития посторонней микрофлоры в исследуемом материале. Самым распространенным, удобным и надежным способом стерилизации является применение высокой температуры. Существуют различные способы термической стерилизации.

Кипячение применяется для стерилизации игл, шприцев и других мелких инструментов. Прокаливанием на огне стерилизуют бактериологические петли, иглы, пинцеты, предметные стекла.

Стерилизация сухим паром производится в сухожаровом шкафу при температуре 160 °С в течение 1 часа или при температуре 165–170 °С в течение 30 минут. Применяется для обработки стеклянной посуды. Стерилизация паром производится при температуре 100–130 °С. Существует два способа стерилизации паром: текучим и насыщенным под давлением.

Стерилизация текучим паром производится при температуре 100 °С в течение 30–60 минут три дня подряд по одному сеансу в день для полного уничтожения микрофлоры. Таким способом стерилизуют те питательные среды, которые не выдерживают нагревания выше 100 °С (желатин, молоко, среды с углеводами).

Самым эффективным способом стерилизации, обеспечивающим полное и надежное уничтожение микроорганизмов, является *стерилизация паром под давлением* в автоклаве. В автоклаве стерилизуют питательные среды, выдерживающие высокую температуру, посуду, инструменты, обезвреживают инфицированный материал.

Тиндализация – дробная стерилизация при невысокой температуре 56–60 °С по 30–60 минут в течение 5–7 дней подряд. Она применяется для объектов, не переносящих температуру 100 °С, и проводить ее можно в водяной бане.

Пастеризация проводится при температуре 60–70 °С с целью уничтожения бесспорных микроорганизмов в пищевых продуктах (вине, пиве, молоке).

Механическая, или холодная, стерилизация применяется для объектов, которые не выдерживают высокой температуры, химических веществ из-за денатурации этих объектов (например, сыворотки).

В этих случаях используют фильтрацию с помощью бактериальных фильтров из мелкопористых веществ (каолина, асбеста, инфузорной земли), которые не пропускают микроорганизмы. Фильтрация производится под давлением, создаваемым специальным насосом. Прибор должен быть пред-

варительно простерилизован в автоклаве под давлением 1 атм. в течение 45 минут.

Ход работы

1 Приготовить питательные среды по приведенным рецептурам.

Полная питательная среда:

а) *без микроэлементов*, концентрация реагентов, %: сахароза – 10,0; NH_4NO_3 – 0,3; KH_2PO_4 – 0,2; MgSO_4 – 0,05; FeSO_4 – 0,01;

б) *без углерода*: исключена сахароза. Для компенсации осмотической активности среды можно внести соответствующее по осмотическому эквиваленту количество хлорида натрия (NaCl), который не оказывает влияния на развитие гриба;

в) *без азота*: исключен NH_4NO_3 ;

г) *без фосфора*: KH_2PO_4 заменен другой солью, содержащей эквивалентное количество калия, например KCl . При замене одной соли на другую катион замещается калием, анион – хлором; хлор не оказывает влияния на развитие гриба;

д) *без калия*: KH_2PO_4 заменен эквивалентным количеством NaH_2PO_4 .

е) *без серы*: MgSO_4 и FeSO_4 заменены эквивалентными количествами MgCl_2 и FeCl_3 ;

ж) *без магния*: MgSO_4 заменен эквивалентным количеством Na_2SO_4 ;

з) *без железа*: FeSO_4 заменен эквивалентным количеством Na_2SO_4 ;

и) *с добавлением микроэлементов*: в состав среды вводят ZnSO_4 , или MnSO_4 , или H_3BO_3 . Концентрация соли, содержащей микроэлементы, во всех трех случаях – 0,01 %;

2 Простерилизовать приготовленные питательные среды.

3 Посеять гриб *Aspergillus niger* на питательную среду и оценить, на какой среде наблюдается наиболее интенсивный рост. Выяснить, как гриб будет развиваться в отсутствие или при дополнительном внесении какого-либо элемента питания.

Контрольные вопросы

1 Какие способы питания характерны для микроорганизмов?

2 Каковы механизмы «первичного» и «вторичного» активного транспорта веществ в бактериальную клетку?

3 Какие источники углерода присущи автотрофам и какие – гетеротрофам?

4 На какие группы делят микроорганизмы в зависимости от источника используемой ими энергии?

5 Что такое хемосинтез?

6 Что означают понятия «культивирование микроорганизмов», «колония», «штамм»?

7 Какие требования предъявляются к питательным средам ?

Лабораторная работа № 3

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия. Изучить морфологию микроорганизмов и особенности техники микроскопирования; ознакомиться с принципами выделения накопительных культур гнилостных микроорганизмов.

Материалы и оборудование: смесь спирта и глицерина 1:1, микроскоп, чашки Петри, бактериологические петли, колбы конические, электроплитка, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла.

Морфологические и культуральные признаки микроорганизмов

Большинство микроорганизмов – одноклеточные существа. Микробная клетка обычно отделена от внешней среды клеточной стенкой и содержит различные субклеточные структуры. Существует два основных типа клеточного строения, различающиеся рядом фундаментальных признаков. Это эукариотические и прокариотические клетки. Микроорганизмы, имеющие истинное ядро, называются *эукариотами*. Микроорганизмы с примитивным ядерным аппаратом относят к *прокариотам* – доядерным организмам.

К эукариотам принадлежат грибы, водоросли и простейшие. Бактерии, в том числе цианобактерии (синезеленые водоросли), относят к *прокариотам*.

Бактерии – одноклеточные организмы, однако, существует ряд форм, состоящих из многих клеток.

При определении вида бактерий учитывают морфологические, культуральные и физиолого-биохимические признаки. На рисунке 1 представлены различные формы бактерий.

Морфологическими признаками бактерий служат: *форма клеток* (шаровидные, палочковидные и извитые); у палочковидных отмечают форму концов клеток (вогнутые, закругленные или усеченные); клетки могут быть одиночные, соединенные попарно, в цепочки или в виде пакетов; *размеры клеток* в микрометрах (мкм) (поперечное сечение, длина палочки, диаметр шаровидных форм); *способность к спорообразованию и расположение в клетках спор* (бациллярное, клостридиальное и плектридиальное); *наличие капсул и клеточных включений, способность к движению и тип поверхности* клетки – перитрих (рисунок 2); *окраска по Граму и кислотоустойчивость*.

Культуральные признаки. При развитии культуры на жидких средах отмечают (рисунок 3): характер развития пленки (тонкая, сухая, складчатая, слизистая) и ее цвет; наличие мути (слабая, умеренная, сильная); присутствие характерного осадка (обильный, плотный, хлопьевидный) и его цвет.

Культуральные признаки на плотных средах следующие: *форма* колоний; *профиль* колоний; *край* колоний (гладкий, волнистый, зубчатый, лопастный, реснитчатый, ворсистый, ветвистый); *размеры* (10 мм и более в диаметре – крупная, от 1 до 10 – средняя, не превышает 1 мм – точечная); *поверхность* (гладкая, морщинистая, шероховатая, складчатая, бугристая); *оптические свойства поверхности* (прозрачная, просвечивающая, непрозрачная, блестящая, матовая, флуоресцирующая); *цвет* (грязно-белый, белый, желтый, оранжевый, сиреневый, синий, красный, черный и т. д.); *структура* колоний (однородная, мелко- или крупнозернистая, радиально или концентрически исчерченная, мучнистая, врастающая в агар-агар, легко снимающаяся иглой с агар-агара); *консистенция* (маслянистая, тестообразная, слизистая, сухая, плотная, сметанообразная). При посеве уколом, когда иглу с культурой вводят в столбик агар-агара, отмечают интенсивность роста в верхней, средней или нижней частях укола.

Определение качественного состава микроорганизмов по культуральным и морфологическим признакам

Из каждой группы колоний, выросших на плотных средах, готовят препарат и определяют по форме клеток, к какому роду микроорганизмов они относятся.

Из общего числа микроорганизмов, развивающихся на мясопептонном агаре (МПА), можно выделить следующие *роды*: *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Mycobacterium*, *Actinomyces*.

Flavobacterium. На МПА дают выпуклые или слабо выпуклые округлые колонии диаметром 2–3 мм с цельным краем, чаще гладкие и блестящие, прозрачные, желтого цвета за счет каротиноидных пигментов, не диффундирующих в среду, встречаются желтовато-оранжевые колонии, иногда и красные. Клетки палочковидной формы 0,5·(1,0...3,0) мкм с закругленными концами, неподвижны. Располагаются флавобактерии одиночно, парами и в виде коротких цепочек, иногда – в виде нити. Эндоспор не образуют. Грамотрицательные.

Micrococcus. На МПА, как правило, они образуют колонии мелких и средних размеров (диаметр 2–4 мкм). Колонии могут быть: матовые, блестящие, маслянистые; гладкие, выпуклые, плоские; зернистые, мелкоскладчатые; пастообразной или слизистой консистенции, иногда встречаются сухие плотные; цвет колоний возможен белый, серый, реже колонии бесцветные, встречаются буроватые, обычно – желтые, розовые или красные. Пигменты в среду не диффундируют. Клетки мелкие (диаметр 0,2–1,5 мкм), одиноч-

ные, могут встречаться пары, тетрады или скопления неправильной формы. Клетки неподвижные, не образуют эндоспор. Грамположительные.

Sarcina. Колонии средних размеров; круглые, компактные, выпуклые, плоские; гладкие, бугристые или складчатые, зернистой структуры; матовые или жирно-блестящие; желтые, лимонно-желтые, иногда розовые, красные, белые. Клетки сферические (диаметр 1,8–3,0 мкм), соединены в пакеты. Пакет объемный – куб, состоит из 8 клеток, поскольку образуется при делении клетки в трех взаимно перпендикулярных плоскостях. Под микроскопом пакет выглядит состоящим из четырех клеток (одна сторона куба). Есть сарцины, у которых пакеты уложены упорядоченно по четыре, и под микроскопом они смотрятся как большие тюки, состоящие из четырех пакетов (см. рисунок 1, κ).

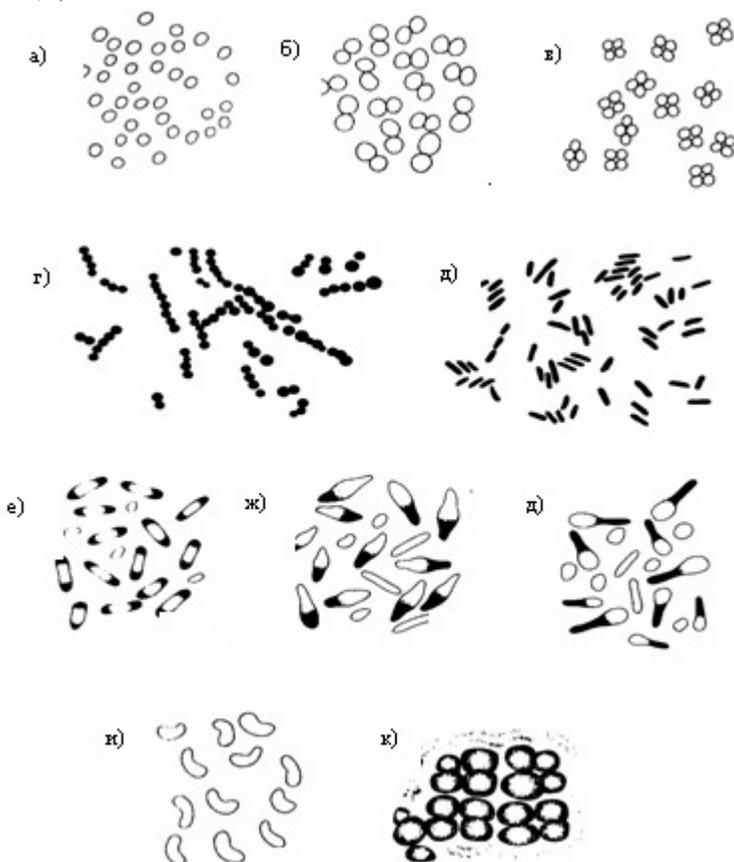


Рисунок 1 – Формы бактерий: шаровидная (а-г):
 а – микрококки, б – диплококки, в – тетракокки, сарцины, г – стрептококки;
 палочковидная: д – не образующие спор; спорообразующие (е, ж, з): е – бациллярный,
 ж – клостридиальный, з – плектридиальный типы спорообразования;
 извитая (и, к): и – вибрионы, к – сарцина

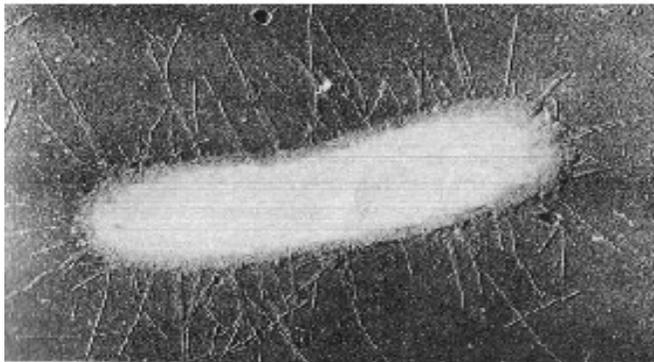


Рисунок 2 – Клетка *Escherichia coli*, окруженная фимбриями.
 Электронная микрофотография

Mycobacterium. Относится к группе микобактерий. На МПА микобактерии растут медленно или очень медленно. Они образуют мелкие, круглые компактные колонии, иногда приподнятые; мягкие, пастообразной или слизистой консистенции (растекающиеся по субстрату), бывают сухие крошащиеся, бугристые складчатые; матовые, блестящие, бесцветные или окрашенные (розовые, оранжевые, желтые, зеленые, синие, бурые, черные). Пигмент в среду не выделяют. Молодые клетки – ветвистые или угловатые с неправильными контурами (3,0...7,0)·0,7 мкм; с возрастом у большинства видов клетки распадаются на кокки и палочки. Большинство видов грамположительные.

Bacillus. Палочковидные бактерии, способные образовывать более или менее термоустойчивые споры. Во время формирования споры палочковидная форма клеток сохраняется. По характеру роста колоний на МПА (или МПА + сусло-агар) можно иногда определить видовую принадлежность бацилл. Клетки грамположительные, аэробы.

B. megaterium – земляная палочка (от лат. *terra* – земля, почва). Колонии гладкие, белые, выпуклые, жирно-блестящие, редкоскладчатые (рисунок 4, а); края колоний резко очерчены или волнисто-бахромчатые. Споры овальные или цилиндрические, не шире материнской клетки, в поперечнике достигают 2 мкм. Длина клеток – 5–7 мкм и более (рисунок 4, б).

B. subtilis (от лат. *sub* – внутри или под, *tilia* – липа, трава, луб; впервые выделена из сена) – сенная палочка. Колонии сухие мелкоморщинистые, бархатистые; бесцветные или розовые; срастающиеся с агар-агаром; край колоний волнистый или слегка волнистый. Палочки короткие тонкие – (3... 5)·0,9 мкм. Споры овальные (0,9·0,6 мкм), расположены не строго центрально, на некоторых – ближе к центру. Клетки подвижные (перетрихи).

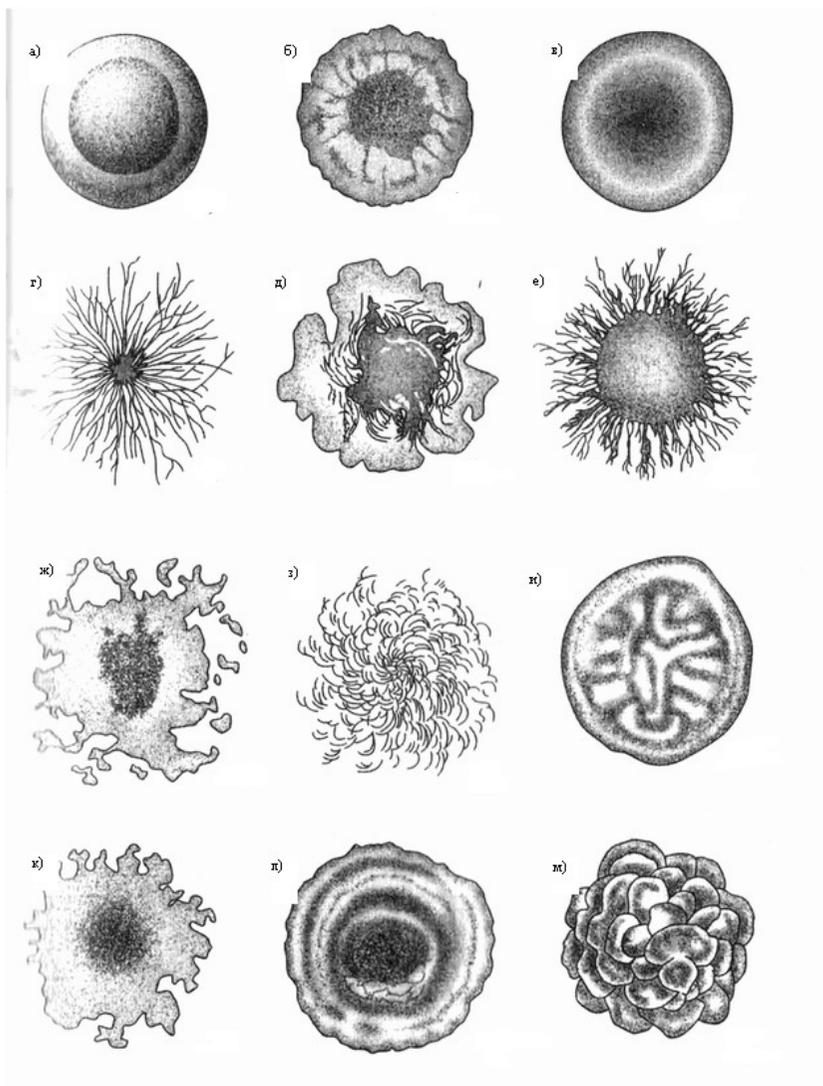


Рисунок 3 – Форма колоний микроорганизмов:

a – круглая; *б* – круглая с фестончатым краем; *в* – круглая с валиком по краю, *г*, *д* – ризоидные; *е* – круглая с ризоидным краем; *ж* – амебовидная; *з* – нитевидная; *и* – складчатая; *к* – неправильная; *л* – концентрическая; *м* – сложная

a)

б)

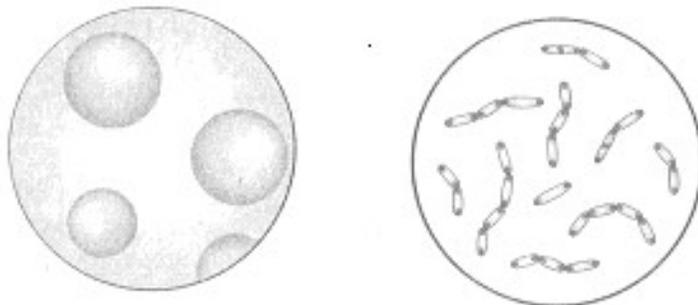


Рисунок 4 – *Bacillus megaterium*:

a – колонии на МПА, *б* – клетки двухсуточной культуры на МПА

B. mesentericus – картофельная палочка. Название связано не с картофелем, а с картофельной болезнью хлеба, которую она вызывает. Появляется картофельная палочка на качественном пшеничном хлебе (зерновом, барвихинском) при хранении его в течение нескольких дней в теплом месте при повышенной влажности, вызывая разрушение белковых веществ и крахмала. При ее интенсивном развитии внешние признаки мякиша изменяются: при разломе он становится тягучим и липким, появляется затхло-гнилостный, иногда с примесью сладкого, запах. Колонии на МПА тонкие, сухие, морщинистые, серовато-белые. Палочки тонкие, длинные и короткие; подвижные (3...10)·(0,5...0,6) мкм; иногда они соединены в длинные нити. Споры овальные и продолговатые (0,9–0,5 мкм). При формировании спор клетки не меняют палочковидной формы. Прорастание спор экваториальное.

B. mycoides – грибовидная палочка. Образует колонии, напоминающие рост гриба: ризоидные или мицелиевидные, стелющиеся по поверхности агара. Пучки нитей отходят от края колоний, создавая иллюзию ветвления; нити изгибаются направо или налево, образуя право- или левовращающиеся формы колоний. Клетки в поперечнике – 0,8–1,2 мкм, по длине в зависимости от среды – 5–7 мкм, часто 10 мкм и более (рисунок 5).

Цитоплазма вакуолизирована, с гранулами запасных питательных веществ. Формы подвижные (перитрихи). Вид имеет много вариантов. Клетки грамположительные.

B. cereus (от лат. *cera* – восковой) – колонии восковидные, толстые, компактные, матовые со складчатым центром и ризоидными волнистыми краями; иногда мелкобугристые, с бахромчатыми краями, от которых отходят тонкие сплетения нитей. Клетки толстые, диаметром 1–1,5 мкм, длиной 3–5 мкм, иногда и более; одиночные или соединены в цепочки, нити. Споры овальные (1,2–1,5)·0,9 мкм, расположены субтерминально, прорастают полярно.

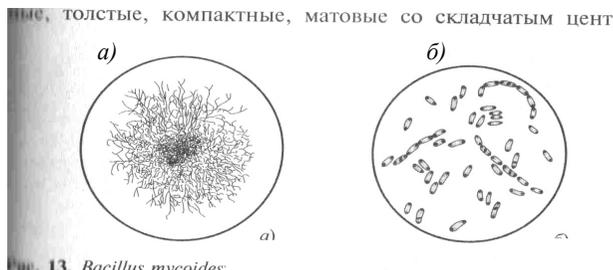


Рис. 13. *Bacillus mycoides*

Рисунок 5 – *Bacillus mycoides*:

а – колонии на МПА, б – клетки трехсуточной культуры на МПА

B. idosus (от лат. *idos* – образ, вид) — колонии сухие, матовые, плоские, мелкоморщинистые, легко и целиком снимающиеся иглой с поверхности агара. Клетки — тонкие прямые палочки (2...3)·0,6 мкм, подвижные. Споры овальные, чаще образуются в центральной части клеток.

Actinomyces – лучистые грибы (рисунок 6). К морфологическим признакам актиномицетов относят образование несептированного ветвящегося мицелия с длиной нитей 10–50 мкм. У отдельных представителей он может быть очень коротким или хорошо развитым, диаметр его варьируется в пределах 0,5–2,0 мкм (обычно менее 1 мкм). Мицелий можно наблюдать не всегда, так как у отдельных родов и видов он легко фрагментируется. Иногда фрагментация ведет к образованию кокковидных, удлинённых или дифтероидных клеток. Для некоторых актиномицетов характерно формирование спораносцев и спор на воздушном или субстратном мицелии. Спораносцы могут быть прямые, длинные, разветвленные, короткие в виде крючков или спиралей, в мутовках.

Актиномицеты — грамположительные микроорганизмы, хотя с возрастом культуры окраска по Граму может меняться.

Среди актиномицетов есть кислото- и спиртоустойчивые, иногда слабокислотоустойчивые виды. Почти все представители группы актиномицетов – аэробы, за исключением некоторых родов, виды которых могут быть анаэробами или факультативными анаэробами.

Pseudomonas. На МПА микроорганизмы этого рода формируют колонии: круглые, неправильной формы, плоские и выпуклые, слизистые и пастооб-

разные, просвечивающие, бесцветные или пигментированные (грязно-белые, синие, сине-зеленые, красные, желтые, бурые и черные). Характерная особенность представителей рода – образование сине-зеленого или желто-зеленого флуоресцирующего пигмента. Некоторые колонии удается наблюдать только в ультрафиолетовых лучах. У других видов пигменты диффундируют в среду, окрашивая ее в соответствующий цвет. Образование определенного пигмента зависит от состава и реакции среды.

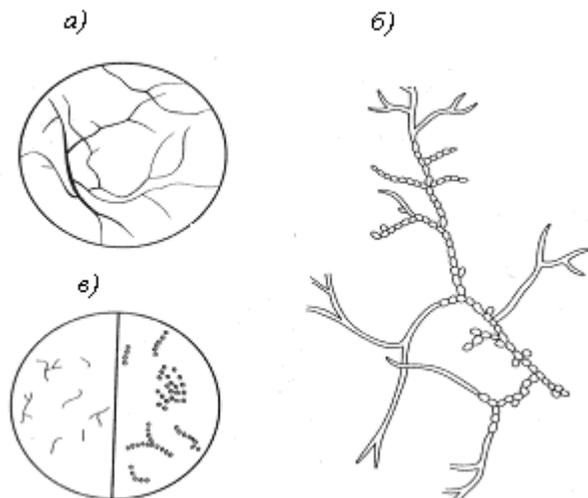


Рисунок 6 – Актиномицеты (а), нокардии (б), микобактерии (в)

Клетки *Pseudomonas* прямые или слегка изогнутые, часто с заостренными концами. Они располагаются одиночно, парами или короткими цепочками. Размеры клеток (1,5...4)·(0,5...1) мкм. Двигаются эти организмы при помощи жгутиков (монотрихи или лофотрихи), не образуют чехлов; для них неизвестны стадии покоя.

Бактерии *Pseudomonas* — аэробы, но в анаэробных условиях способны использовать для дыхания кислород нитратов. Клетки грамотрицательные.

Изучение морфологии грибов

Грибы – низшие эукариотические одноклеточные и мицелиальные хемо-органотрофные организмы. Их относят к особому царству – *Mycota*. Представителей грибов делят на макро- и микромицеты. Макромицеты образуют крупные плодовые тела, отсутствующие у микромицетов. У последних на протяжении всего жизненного цикла имеются только микроскопические структуры. Рассмотрим некоторых представителей грибов, важных для про-

мышленного производства. В царство *Mycota* входят миксомицеты (*Muchomycota*) и собственно грибы, или истинные грибы (*Eumycota*).

Миксомицеты – группа своеобразных организмов, напоминающих по некоторым свойствам грибы, но в определенные периоды цикла развития сходны с амебами.

Истинные грибы делят на *классы*:

Chitridiomycetes характеризуется полным отсутствием мицелия или неклеточным мицелием. Это типичные водные организмы, однако, среди них и обитатели почвы, паразиты растений, а также виды, живущие на отмерших растительных остатках.

Zygomycetes – группа организмов, полностью утративших подвижные стадии развития. К этому классу относят представителей муконовых грибов, широко распространенных в почвах (*Mucor*, *Rhizopus*).

Ascomycetes – обширная группа грибов с разветвленным многоклеточным мицелием (*Aspergillus*, *Penicillium* и др.).

Basidiomycetes – мицелий этих грибов состоит из многоклеточных гиф (разветвленные длинные нити). К базидиомицетам относят многих вредителей сельскохозяйственных растений, например, возбудителей ржавчины и головни, вредителей древесины – домового гриба.

Deuteromycetes – сборная группа, включающая так называемые несовершенные грибы. Их тело состоит из расчлененных прозрачных или окрашенных многоклеточных гиф, иногда из почкующихся клеток.

К классу *Ascomycetes* относят семейство *Saccharomycetace*, представители которого лишены мицелия, к ним относятся дрожжи и дрожжеподобные грибы. Это одноклеточные овальной формы, размножающиеся почкованием или делением (рисунок 7).

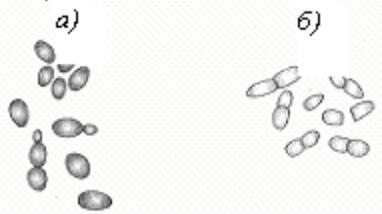


Рисунок 7 – Дрожжи:
а – почкующиеся, б – делящиеся

Дрожжи являются крупными (до 10–15 мкм) микроорганизмами. Встречаются круглая, овальная, цилиндрическая и другие формы дрожжей. Клетки имеют достаточно сложную структуру: четко дифференцированные оболочки, ядро и другие клеточные структуры, запасные питательные вещества, вакуоли.

В определенный период развития на поверхности субстрата образуется плодовое тело, которое состоит из плодоносящих гиф и органов спороношения (рисунок 8).

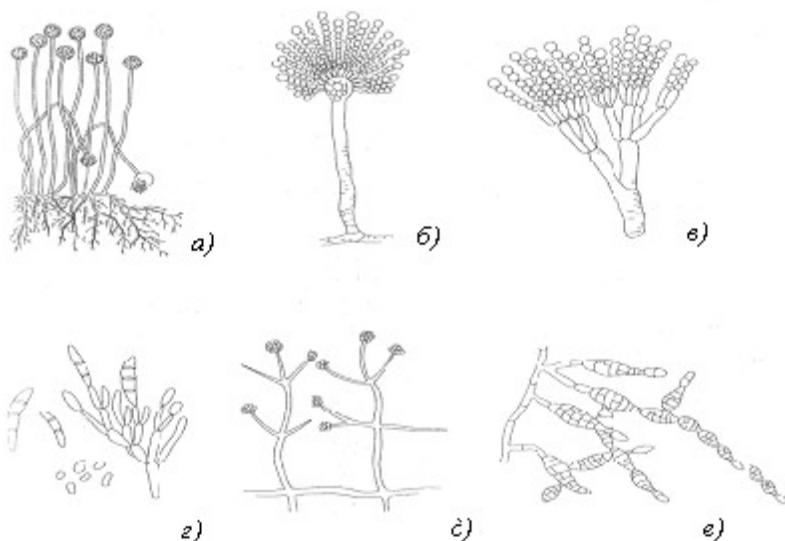


Рисунок 8 – Грибы микроскопические:
a – *Mucor*; *б* – *Aspergillus*; *в* – *Penicillium*, *г* – *Fusarium*, конидиеносец с конидиями; *д* – *Trichoderma* (конидиеносцы с головками конидий); *е* – *Alternaria*, конидиеносцы с цепочками конидий

Плесневые грибы развиваются на питательных средах в виде паутинообразных, пушистых, бархатистых налетов различной окраски (желтой, черной, зеленой, коричневой), по которой можно отличить один гриб от другого. Грибы различаются также строением мицелия и органов размножения.

Особенностью этих грибов является то, что они способны к половому и бесполому размножению. Они широко распространены в природе и вызывают порчу пищевых продуктов. Это грибы из родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phizopus*.

Mucor – головчатая плесень, которая развивается на питательных субстратах в виде пушистого белого или серого налета. Мицелий представляет одну разветвленную клетку. Органы размножения – спорангии в виде головки, заполненные эндоспорами. При созревании споры темнеют, а спорангии принимают вид гладких черных головок.

Aspergillus – возбудители плесневения непродовольственных и продовольственных товаров. Мицелий пустой, воздушный, местами окрашен в

темный цвет. Органы размножения –одноклеточные конидиеносцы, заканчивающиеся веерообразным расширением.

Penicillium – возбудители плесневения масла, сыра, колбас, фруктов и др. Мицелий пушистый, воздушный, окрашен в серо-зеленый цвет. Органы размножения – многоклеточные ветвящиеся конидиеносцы с цепочками экзоспор, напоминающими кисточку.

Rhizopus – возбудители болезни ягод, корнеплодов и растительных продуктов. Мицелии стелются по субстрату в виде длинных гифов (столонов), окрашены в темно-бурый цвет. Органы размножения – спорангии и спорангиеносцы, неветвящиеся, растущие пучками с корневидными отростками (ризоидами).

При изучении морфологии грибов культуры рассматривают в чашках Петри и путем изготовления препаратов «раздавленная капля».

Чашку открывают, помещают на предметный столик и рассматривают край колонии плесени под микроскопом с объективом 8х, находят органы плодоношения и изучают их. Для приготовления препарата «раздавленная капля» на чистое предметное стекло наносят каплю воды или смеси глицерина со спиртом (1:1). В эту каплю с помощью прокаленных в пламени спиртовки в течение 2–3 секунд и охлажденных двух препаровальных игл вносят осторожно мицелий гриба, расправляя гифы и органы спороношения. Каплю накрывают покровным стеклом и слегка придавливают. Препараты рассматривают с объективами 8х и 40х в затемненном поле зрения. Для этого конденсор опускают и прикрывают ирис-диафрагму.

Ход работы

1 Для изучения морфологических свойств приготовить фиксированные препараты культур, окрасить их по Граму и микроскопировать.

2 Для каждого вида микроорганизмов отметить их культуральные свойства, которые устанавливают по особенностям роста колоний на питательных средах.

3 Изучить характер роста грибов в чашках Петри визуально и с объективом 8х. Обратить внимание на внешний вид, цвет и строение плесени.

4 Изучить строение грибов в препарате «раздавленная капля».

5 Зарисовать в тетрадь строение каждого гриба, описать внешний вид.

Контрольные вопросы

1 Чем отличаются прокариоты от эукариот?

2 Перечислите основные формы бактерий и дайте им характеристику.

3 Каковы особенности грамположительных и грамотрицательных бактерий?

4 Назовите виды бактерий, не имеющих клеточной стенки.

5 Охарактеризуйте основные стадии процесса спорообразования.

6 Чем объясняется термоустойчивость бактерий?

7 Классификация грибов.

8 Какие Вы знаете способы размножения грибов?

9 Классификация дрожжей, строение их клетки, способы размножения.

Лабораторная работа № 4

УЧЕТ ЧИСЛЕННОСТИ И ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия. Изучить количественное определение микроорганизмов в воздухе, в воде и освоить метод непосредственного подсчета количества микроорганизмов.

Материалы и оборудование: физиологический раствор, чашки Петри с МПА, мерные колбы вместимостью 250 мл с водой, чистые чашки Петри, агар-агар.

Определение количества микроорганизмов в воздухе

Существует два основных метода количественного определения микроорганизмов, построенных на совершенно различных принципах:

1 Прямой, или непосредственный, подсчет. Количество микроорганизмов подсчитывают при помощи микроскопа в препаратах или в специальных счетных камерах.

2 Метод культивирования состоит в том, что вначале микроорганизмы выращивают на жидких и плотных питательных средах, а затем об их численности судят по количеству колоний на чашках Петри (чашечный метод) или по изменению внешнего вида жидкой питательной среды (метод предельных разведений).

Для посева воздуха методом оседания по Коху, основанным на оседании микроорганизмов на поверхность питательной среды, чашки Петри с МПА размещают в разных местах помещения, снимают крышки и оставляют их открытыми на 10–20 минут. Вместе с пылью и капельками влаги на поверхность агара оседают и микроорганизмы. По истечении установленного времени чашки закрывают, подписывают на крышках и помещают в термостат при температуре 37 °С на 48 часов. После термостатирования проводят подсчет колоний, выросших на чашках Петри, и делают пересчет на 1 м³ воздуха по правилу Омелянского, согласно которому на площадь 100 см² в течение 5 минут оседает столько микроорганизмов, сколько их находится в 10 литрах воздуха (1 м³ равен 1000 л). Количество микроорганизмов X в 1 м³ воздуха рассчитывается по формуле

$$\bar{X} = \frac{N \cdot 100 \cdot 1000}{S \cdot 10 \cdot \bar{a}},$$

где N – количество колоний в чашке Петри;

S – площадь чашки Петри, см^2 ;

a – поправка на время посева, при посеве 10 минут $a = 2$.

Согласно нормативам воздух жилых помещений считают чистым при содержании в 1 м^3 до 1500 бактерий и 16 стрептококков, загрязненным – при 2400 всех бактерий и 36 стрептококков.

Подсчитать количество бактерий на чашках можно несколькими способами:

1) при небольшом количестве колоний их просто считают, иногда пользуясь лупой;

2) при среднем количестве колоний чашку делят на секторы, считают колонии в каждом из них и суммируют;

3) при большом количестве колоний подсчет ведут с помощью счетной камеры Вольфюгеля. Это стеклянная пластинка, разделенная на 144 квадрата, каждый площадью 1 см^2 . Квадраты, расположенные по диагонали, в свою очередь разделены на 9 маленьких квадратиков. Открытую чашку дном кверху помещают под стекло камеры и подсчитывают число колоний в нескольких (не менее 10) квадратах, расположенных в разных местах чашки. Затем делают их пересчет на всю чашку. Для этого площадь чашки вычисляют по формуле πr^2 , где $\pi = 3,14$, а радиус определяют с помощью линейки. Среднее содержание колоний на площади чашки 1 см^2 вычисляют как среднее арифметическое из десяти определений. Умножив эти два числа, получают цифру, указывающую на количество всех колоний, выросших на чашке.

Определение количества микроорганизмов в воде

Исследуемую воду объемом 1 мл выливают в стерильную бактериологическую чашку и заливают расплавленным и охлажденным до $40\text{--}45 \text{ }^\circ\text{C}$ агар-агаром. При этом агар-агар хорошо перемешивают с водой. Засеянные чашки оставляют на ровной поверхности стола до застывания, чашки подписывают, переворачивают дном вверх и помещают в термостат при температуре $37 \text{ }^\circ\text{C}$ на 24 часа. Подсчет колоний на чашках в посевах воды производится так же, как и в посевах воздуха, однако расчет ведется на 1 мл. Число выросших колоний в чашке и будет показывать количество микроорганизмов в 1 мл воды. Согласно СанПиН вода питьевая считается чистой, если в 1 мл содержится не более 100 микроорганизмов.

Метод количественного учета микроорганизмов и метод титра

Сущность метода количественного учета микроорганизмов заключается в посеве определенного количества пробы в чашки Петри с плотной питательной средой. При последующем выращивании посева из каждой клетки в результате ее размножения образуется обособленная колония, таким образом, подсчитанное количество выросших колоний будет соответствовать количеству микроорганизмов, находящихся во взятом для посева количестве

исследуемой воды. Для получения обособленных колоний в несколько чашек Петри делается посев различных количеств взятой для анализа пробы, полученных путем разведения ее. Посев каждого разведения следует производить повторно.

Для учета плесневых грибов и дрожжей в качестве питательной среды используется сусло или агар-агар. Для бактерий применяют МПА. При этом учитываются не все бактерии, а только сапрофиты, т. е. способные расти на питательных средах органического происхождения.

Посевы бактерий проводятся при температуре 24–25 °С в течение 48 часов, посевы плесневых грибов и дрожжей – при 25 °С в течение 5–9 суток.

Титром в микробиологии считают наименьшее количество субстрата, в котором еще обнаруживается присутствие определяемого микроорганизма. Чтобы определить титр, из исследуемого субстрата готовят вначале последовательные десятикратные разведения. Из каждого разведения проводят посевы на дифференциально-диагностические среды. По изменениям в средах определяют наименьший объем, вызвавший брожение (титр). Титр выражают в граммах или миллилитрах. Например, титр кишечной палочки в воде – 300 мл и т. д.

Титр кишечной палочки иначе называют *коли-титром*. В воде *коли-титр* определяют несколькими способами: бродильным двух- или трехэтапным методом и методом мембранных фильтров. Из них наиболее точным считается трехэтапный бродильный метод, длительность которого 4 суток.

На первом этапе засевают 100; 10; 1; 0,1 мл воды в пробирки и флаконы с определенным объемом дифференциально-диагностической среды Булира (приложение А), снабженные поплавками из ваты. Посевы выращивают 24 часа при температуре 43 °С.

На втором этапе определяют наименьший объем, вызвавший брожение (изменение цвета и образование газа) – бродильный титр, из которого делают посев методом последовательной штриховки на среду Эндо. Чашки помещают в термостат при температуре 37° С на 24 часа. В случае отсутствия изменений во всех сосудах исследование заканчивают. По истечении срока посева колонии рассматривают. При наличии на среде Эндо красных с металлическим блеском или без него колоний из них делают мазок, окрашивают по Граму. Если в мазках обнаружены грамотрицательные неспорые палочки, переходят к третьему этапу исследования.

На третьем этапе из типичных колоний, исследованных под микроскопом, производят посев в среду Булира. Посевы выращивают при температуре 43 °С в течение 24 часов, после чего учитывают результаты роста.

Ход работ

1 Сделать посев пробы воздуха в разных местах производственных помещений (4 чашки на 1 подгруппу).

2 Сделать посев пробы воды (1 чашка на 1 студента).

3 Сделать посев пробы плесневых грибов на питательную среду и провести подсчет микроорганизмов (рисунок 1) методом титра.

Колбу со 100 мл исследуемой воды (пробы) осторожно, не смачивая ватной пробки, взбалтывать в течение 0,5 мин. Затем отобрать стерильной пипеткой 1 мл исследуемой воды и внести его в пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора. Это первое разведение. Из него делается посев в первую чашку Петри. Для этого 1 мл раствора первого разведения выливают в чашку Петри со стерильным МПА. Для второго разведения берут 1 мл раствора первого разведения и вносят во вторую пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора. Полученный раствор второго разведения перемешивают и высевают 1 мл его в стерильный МПА второй чашки Петри. Затем 1 мл раствора второго разведения вносят в 9 мл стерильного физиологического раствора третьей пробирки. Получают третье разведение. Тщательно перемешивают третью пробирку и делают посев из нее в третью чашку Петри со стерильным МПА. Таким образом получают три разведения: 1:100; 1:1000; 1:10000 (рисунок 1).

При посеве проб смешивать питательную среду (40–45 °С) с пробой следует очень осторожно, легким вращательным покачиванием закрытой чашки, чтобы не замочить ее краев. Чашки поставить на горизонтальную поверхность и держать в покое до полного застудневания среды. На боковую стенку крышки каждой чашки наклеить этикетку, указав на ней фамилию студента, номер группы и номер чашки (или соответствующего разведения). После застудневания питательной среды чашки перевернуть вверх дном и поместить в термостат при температуре 24–25 °С на 48 часов.

Зарисовать схему посева.

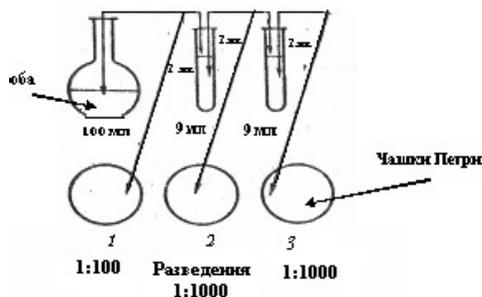


Рисунок 1 – Примерная схема посева микроорганизмов исследуемой пробы по методу счета колоний

Контрольные вопросы

- 1 Какие существуют методы количественного определения микроорганизмов?
2. В чем сущность определения микроорганизмов методом культивирования?
- 3 Все ли микроорганизмы, находящиеся в субстрате, можно определить методом культивирования?
- 4 В чем сущность метода количественного учета микроорганизмов? Его отличие от метода предельных разведений.
- 5 Что такое титр микроорганизмов?
- 6 Что такое коли-титр?

Лабораторная работа № 5

ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ БЕЗАЗОТИСТЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Цель занятия. Познакомиться с участием микроорганизмов в процессе брожения на примере молочнокислого брожения. Приготовить фиксированный препарат из молочнокислых бактерий.

Материалы и оборудование: 0,1н. раствор NaOH, колбы на 100 мл, молоко, индикатор – метиленовый синий, фенолфталеин, стеклянная палочка, бактериологическая петля, микроскоп.

Виды брожения

Микроорганизмы в основном получают энергию при высвобождении ее из безазотистых веществ. Только небольшая их часть может использовать солнечную энергию или энергию окисления минеральных соединений. В зависимости от того, каким путем идет разложение органических веществ, различают *брожение*, при котором высвобождение энергии происходит без доступа свободного кислорода (анаэробные условия), и *дыхание*, или *окисление*, когда выделение энергии происходит в аэробных условиях (при доступе воздуха). Во втором случае энергия высвобождается полностью, и в качестве конечных продуктов окисления выделяются CO_2 и H_2O .

Брожение сопровождается частичным высвобождением энергии, заключенной в органическом веществе. Поэтому среди конечных продуктов этого процесса всегда находятся не полностью окислившиеся вещества, содержащие запасы химической энергии – спирт, молочная кислота и др. В зависимости от основного продукта, образующегося в ходе этих процессов, брожения получили соответствующие названия: спиртовое, молочнокислое, маслянокислое и др.

Брожения, осуществляемые микроорганизмами, имеют большое значение в природе и широко используются в практической деятельности человека. Они лежат в основе пивоварения, виноделия, квашения овощей, силосования, переработки молока в кисломолочные продукты и сыр, мочения во-

локнистых растений (лен) и т. д. При изучении процессов, вызываемых микроорганизмами, удобно пользоваться методом элективных культур.

Спиртовое брожение – это процесс превращения углеводов, вызываемый дрожжами, некоторыми видами бактерий (*Zygomonas mobilis*, *Sarcina ventriculi* и др.) и отдельными представителями муконовых грибов. Однако практическое значение имеет лишь спиртовое брожение, осуществляемое дрожжами. Дрожжи встречаются на поверхности растений, плодов, ягод, зерна, в воздухе, почве.

Маслянокислое брожение осуществляется под действием спорообразующих бактерий рода *Clostridium*. В результате деятельности маслянокислых бактерий возможен синтез масляной кислоты из этанола и уксусной или пропионовой кислоты. Маслянокислое брожение приводит к порче пищевых продуктов, вспучиванию сыра и банок с консервами.

Молочнокислое брожение лежит в основе силосования, квашения овощей, переработки молока в кисломолочные продукты и сыр; кислый вкус черного хлеба определяется молочной кислотой.

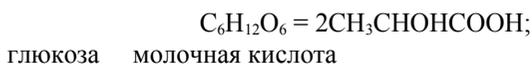
Данные процессы вызывают молочнокислые бактерии, которые разнообразны и широко распространены в природе. Молочнокислые бактерии обитают на поверхности растений, в молоке, на пищевых продуктах, в кишечнике человека и животных. Они имеют много общих признаков, важнейшими из которых являются:

- способность к синтезу молочной кислоты;
- грамположительность;
- отсутствие спор;
- неподвижность;
- форма (кокки или палочки);
- требовательность к источникам азота (многие из них не развиваются на простых синтетических средах);
- отсутствие фермента каталазы;
- способность к расщеплению перекиси водорода до воды и кислорода.

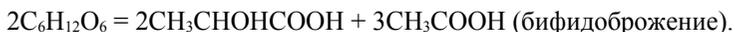
Последнее свойство выявляется, если на колонию молочнокислых бактерий нанести каплю 3%-ного раствора перекиси водорода: выделение кислорода при этом не происходит. Колонии бактерий, синтезирующих каталазу, в таких условиях покрываются пузырьками кислорода.

Молочнокислые бактерии можно разделить на две группы:

– *гомоферментативные*, образующие из сахара в основном одну молочную кислоту:



– *гетероферментативные*, образующие наряду с молочной кислотой значительные количества побочных продуктов:



Молочнокислые бактерии сбраживают моно- и дисахариды. Чаще бактерии, обитающие в молоке, сбраживают лактозу, но никак не воздействуют или слабо воздействуют на сахарозу. Обычно лактоза подвергается гидролизу с образованием глюкозы и галактозы, а затем уже происходит брожение.

Источниками азота для группы молочнокислых бактерий служат пептоны, смесь аминокислот. Большинство нуждается в ряде витаминов. При изучении молочнокислого брожения лучшая питательная среда – молоко. В нем есть все необходимые для развития молочнокислых бактерий элементы. В такой среде могут развиваться и другие бактерии (гнилостные, маслянокислые), но молочная кислота быстро подавляет их рост.

Критические значения реакции среды (рН) для развития некоторых групп бактерий:

молочнокислые — 4,0–3,5;

маслянокислые — 5,0–4,7;

гнилостные — 5,5–5,0.

Микроскопирование молочнокислых бактерий. Если простоквашу хранить при комнатной температуре, то на ее поверхности появляется белая или кремовая бархатистая морщинистая пленка. Такая же пленка обычно бывает на поверхности рассола при квашении огурцов, капусты и других овощей. Это молочная плесень – *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*), которая всегда сопутствует молочнокислому брожению, являясь его нежелательным спутником. Она окисляет молочную кислоту, образуемую молочнокислыми бактериями, до CO_2 и H_2O , снижая кислотность среды. В результате кисломолочные и квашеные продукты начинают портиться, т. к. в среде происходит развитие гнилостных бактерий. Молочная плесень – аэробная форма, поэтому развивается только на поверхности. Имеет многоклеточный мицелий, который распадается на отдельные клетки, так называемые *оидии*, по форме напоминающие дрожжи и служащие для размножения.

Ход работы

1 Определив начальную кислотность молока титрованием 0,1н раствором NaOH, его разливают в колбы на 100 мл по 40–50 мл и закрывают ватными пробками. Параллельно выполняют второй вариант опыта: разливают молоко в колбы, закрывают ватными пробками, ставят на асбестовые сетки и до-

водят молоко до кипения. Колбы с кипяченым и некипяченым молоком помещают в термостат при 30 °С. Через 10–12 ч некипяченое молоко скисает. В колбе образуется ровный плотный сгусток без следов газа (если в опыте используют молоко хорошего качества). Сгусток получается в результате реакции молочной кислоты с казеинатом кальция и выпадения казеиновой кислоты в осадок. При кипячении молока молочнокислые бактерии погибают, т. к. они не образуют спор, споры же маслянокислых бактерий сохраняются. При инкубации в термостате они прорастают и осуществляют маслянокислое брожение лактозы. В результате реакции масляной кислоты с казеинатом кальция и в этом варианте опыта казеиновая кислота выпадает в осадок. В дальнейшем она подвергается пептонизации (процесс постепенного растворения белков молока), в результате чего сыворотка приобретает кремовый цвет, неприятный запах масляной кислоты (запах пота) и прогорклый вкус.

2 Для микроскопических наблюдений за молочнокислыми бактериями готовят препарат из прокисшего молока. Бактериологическую петлю вводят в сгусток и, повернув вокруг оси, извлекают, прикасаясь ею к пленке, которую образует молочная плесень.

Сгусток размазывают по предметному стеклу очень тонким слоем без воды. Сушат на воздухе. Фиксируют смесью спирта с эфиром (приблизительно 1:1), несколько раз нанося смесь на мазок и сливая ее. При такой фиксации не только погибают и прикрепляются к стеклу бактерии, но и с помощью эфира извлекается и удаляется жир, капли которого на препарате мешают окраске и микроскопированию. Фиксированный препарат окрашивают метиленовым синим, 2–3 мин промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсией. Метиленовый синий – лучший краситель для молочнокислых бактерий молока, т. к. он слабо окрашивает основной фон (казеин) и хорошо – клетки микроорганизмов. На препарате преобладают мелкие округлые клетки *Lactococcus lactis*, соединенные в короткие цепочки. Бактерия *Lactococcus lactis* – возбудитель естественного скисания молока в средних широтах (оптимальная температура для ее развития – 30 °С), способствует накоплению в молоке до 1 % молочной кислоты. Нередко на препарате видны разных размеров тонкие палочки обычно правильной формы рода *Lactobacillus*, иногда содержащие зерна волютина. Чаще встречается *Lactobacillus bulgaricus* (рисунок 1, а) – возбудитель естественного скисания молока в южных широтах. Оптимальная температура ее развития – 40 °С, она кислотоустойчива, накапливает до 3,5 % молочной кислоты. На плотных средах эта бактерия образует мелкие характерные колонии в виде комочков ваты, как правило, выпуклые, непрозрачные, непигментированные.

Если на поверхности прокисшего молока появилась пленка, то в мазке обнаруживается также и молочная плесень (рисунок 1, б). Прямоугольные

или овальные клетки ее отличаются от молочнокислых бактерий большими размерами. Можно приготовить также фиксированные препараты из кисломолочных продуктов (йогурта, кефира, ацидофилина, ряженки, бифидока и др.) и зарисовать доминирующие формы.

Для титрования берут 5–10 мл (лучше 10 мл) свежего или прокисшего молока, помещают его в колбу на 100 мл, добавляют 20 мл дистиллированной воды, 1–2 капли фенолфталеина и титруют 0,1н раствором NaOH при постоянном взбалтывании до появления устойчивой слабо-розовой окраски. Если на поверхности прокисшего молока образовалась пленка, то, прежде чем взять сгусток, ее сдвигают пипеткой или стеклянной палочкой в сторону, затем разбивают сгусток, постукивая колбой о ладонь. Кислотность молока выражают в *градусах Тернера* ($^{\circ}T$) или процентах молочной кислоты. Так, 1 $^{\circ}T$ соответствует 1 мл 0,1н раствора щелочи, израсходованной на титрование 100 мл молока. Следовательно, если на титрование 10 мл молока пошло x мл щелочи, то для выражения кислотности молока в градусах Тернера нужно значение x умножить на 10. Чтобы выразить кислотность молочной кислоты в процентах, количество 0,1н раствора NaOH (в мл), потраченное на титрование 100 мл молока, умножают на 0,009, так как 1 мл 0,1н NaOH нейтрализует эквивалентное количество молочной кислоты.

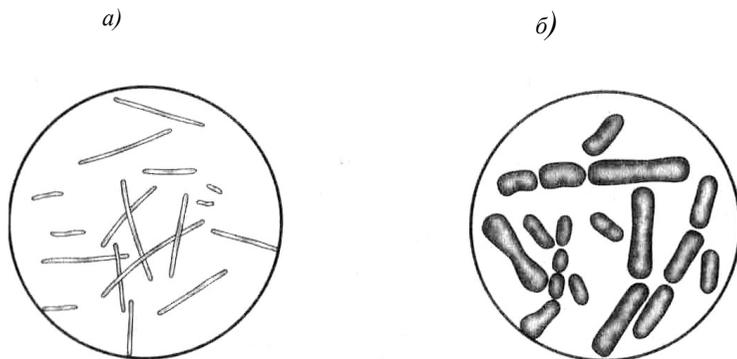


Рисунок 1 – *Lactobacillus bulgaricus* (а), молочная плесень (б)
(*Geotrichum candidum*)

Контрольные вопросы

- 1 По каким микробиологическим показателям определяют качество кисломолочных продуктов?
- 2 Почему в кисломолочных продуктах не определяют микробное число?

3 Как можно определить качество кисломолочных продуктов микроскопическим методом?

Лабораторная работа № 6

ОБЩИЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЧВЫ

Цель занятия. Изучить микробиологический состав почв разного состава.

Материалы и оборудование: питательные плотные среды, жидкие среды в пробирках: среда для аэробных целлюлозоразрушающих бактерий, среда для анаэробных азотфиксаторов; гелевые пластины, пропитанные питательной средой для азотобактера и аэробных целлюлозоразрушающих бактерий; свежие пробы почв разных типов; стерильные чашки Петри, колбы со стерильной водопроводной водой по 90 мл, стерильные пипетки на 10 мл, стерильные градуированные пипетки на 1 мл, стерильные шпатели, часовые стекла, стеклянные палочки с оттянутыми концами; чайные ложки, пинцеты, граффареты, лупы, микроскопы, предметные стекла и препараты для приготовления окрашенных сред.

Взятие средней почвенной пробы и подготовка образца

Среднюю почвенную пробу получают смешиванием отдельных образцов, количество которых зависит от микрорельефа (ровный, волнистый, склон), степени гетерогенности почвы и ее однородности в ботаническом отношении. Рекомендуют брать пробу с площади 100 м² из трех точек; с площади, превышающей 100 м², – из пяти по принципу конверта (четыре в точках по углам и одну – ближе к центру прямоугольника). При исследовании почвы пробы берут с глубины всего пахотного слоя, снимая верхний слой толщиной 2 см; при изучении микрофлоры почвенного профиля – по генетическим горизонтам (снизу вверх). Почвенный образец берут буром, лопатой и ножом. Перед взятием образца их тщательно очищают, затем обрабатывают спиртом и обжигают. Можно ограничиться очисткой этих предметов, если затем несколько раз воткнуть их в почву изучаемого горизонта. Укладывают образец в заранее приготовленную стеклянную стерильную банку, закрывающуюся корковой пробкой, обернутой стерильной бумагой, либо в стерильные пергаментные пакеты или пакеты из плотной бумаги, взятой с двойным слоем. На пакеты, банки наклеивают этикетки с указанием места взятия пробы, горизонта и других сведений. Почвенные образцы анализируют в первые сутки. При необходимости допускается хранение их в холодном помещении (в холодильнике) в течение двух дней. Для придания среднему образцу большей однородности, соблюдая все условия асептики,

тщательно перемешивают почву, вынимают корни растений, различные включения.

Ход работы

1 Приготовление почвенной суспензии и посев

На стерильное часовое стекло стерильным шпателем (или алюминиевой ложкой) помещают 10 г почвы. Чтобы при взвешивании в почву не попали микроорганизмы из воздуха, особенно споры грибов, часовое стекло накрывают другим часовым стеклом. Предварительно стекла взвешивают. Часовые стекла, шпатели и ложки стерилизуют. Навеску почвы переносят в колбу на 250 мл со 100 мл стерильной водопроводной воды, взбалтывают 10 минут (лучше на механической качалке) и дают отстояться грубым частицам почвы.

Одновременно отбирают 10–20 г почвы для определения влажности, т. к. полученные при анализе данные пересчитывают на 1 г абсолютно сухой почвы. Значительно больше микроорганизмов выявляется, если навеску почвы предварительно поместить в стерильную фарфоровую чашку или ступку, увлажнить (0,4–0,8 мл воды или 0,1%-ным раствором пиррофосфата $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ на 1 г почвы) и 5 мин растереть стерильным резиновым пестиком или пальцем в стерильной резиновой перчатке до пастообразного состояния. Этот прием дает возможность разрушить почвенные агрегаты и десорбировать микроорганизмы с поверхности почвенных частиц и из органоминерального геля.

Перед приготовлением суспензии для каждого образца готовят 2 стерильные колбы на 250 мл; одна содержит 100 мл стерильной водопроводной воды, другая – пустая. Водой из первой колбы смывают растертую почвенную массу в пустую стерильную колбу. Колбу с полученной суспензией встряхивают 5 мин, после чего оставляют на 30 с и готовят разведения, содержащие разные концентрации почвы. 1 мл суспензии в первой колбе соответствует разведению 10^{-1} . Далее из первой во вторую колбу стерильной пипеткой отбирают 10 мл суспензии и добавляют 90 мл водопроводной воды и т. д. Последующие разведения (10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} и т. д.) лучше тоже делать в колбах на 250 мл.

Из каждого предыдущего разведения отдельной стерильной пипеткой берут 10 мл суспензии и переносят в следующую колбу с 90 мл воды. После каждого использования пипетку ополаскивают. Последующие колбы встряхивают по 1 мин. Из полученных разведений делают посев на плотные и жидкие среды. Набор сред зависит от задач бактериологического анализа почвы.

На **плотные питательные среды** посев проводят преимущественно поверхностно. Для этого агаризованные питательные среды разливают в сте-

рильные чашки Петри и после охлаждения подсушивают в термостате при 40 °С. На поверхность агаровой пластины стерильной градуированной пипеткой наносят 0,05 мл почвенной суспензии из соответствующего разведения, затем стеклянным шпателем растирают каплю досуха; при этом открытую чашку держат в вертикальном положении около пламени горелки. Посев из каждого разведения проводят минимум на 2–3 параллельных чашках (желательно – на 5).

При определении количества бактерий в почве *пахотного слоя* для посева на МПА, среде Чапека используют разведения 10^{-3} и 10^{-4} ; на сусло-агаре, МПА + сусло-агар, бедных средах (нитритный агар). Для почв *нижних горизонтов* соответственно используют разведения на один порядок меньше.

Суспензию вносят в стерильную чашку Петри, заливают агар-агаром, расплавленным и охлажденным до 45 °С, и смешивают с ним.

При учете микроорганизмов почвы **в жидких средах** последние разливают в пробирки по 9 мл и стерилизуют. Из каждого разведения почвенной суспензии, начиная с самого высокого, отдельной стерильной пипеткой берут по 1 мл и переносят в жидкую среду. Из каждого разведения засевают минимум 2 пробирки или колбы (лучше 3–5).

2 Выявление групп микроорганизмов на жидких средах (метод предельных разведений)

Аэробные целлюлозоразрушающие микроорганизмы количественно можно учесть на среде (в колбу на 100–150 мл наливают 30 мл питательной среды) из водопроводной воды, содержащей 0,1 % NH_4Cl и 0,05 % K_2HPO_4 . По 5 мл этой среды разливают в пробирки, в качестве источника углерода используют полоски фильтровальной бумаги длиной 7–10 см, не содержащие крахмала (реакция с раствором Люголя). Полоски на 4–5 см должны выступать над средой. Стерилизуют 30 мин.

Нитрифицирующие бактерии учитывают на **жидкой среде Виноградского для бактерий первой фазы нитрификации** (г/200 мл дистиллированной воды: NH_4SO_4 – 2,0; K_2HPO_4 – 1,0; MgSO_4 – 0,5; NaCl – 0,4; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4; MgCO_3 или CaCO_3 – 5,0). Питательную среду упаривают при 40–50 °С до образования белой блестящей эмалевой поверхности, возникающей за счет равномерного распределения слоя MgCO_3 или CaCO_3 . По эмалевой поверхности пластин раскладывается определенное число комочков свежей почвы. Чашки помещают во влажную камеру и ставят в термостат при 28–30 °С. Через некоторое время (спустя 7, 14, 21 сут), в зависимости от активности нитрифицирующих бактерий, вокруг отдельных комочков почвы появляются зоны растворения мела, свидетельствующие об обрастании комочков почвы нитрифицирующими бактериями.

Денитрифицирующие бактерии выявляют на **среде Гильтая** (г/л дистиллированной воды: сегнетова соль (натриевокалиевая соль винной кислоты)

или цитрат натрия – 20,0; KNO_3 – 2,0; K_2HPO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – следы).

В колбу наливают немного питательной среды и добавляют 1/3 чайной ложки почвы. Среду тщательно перемешивают с почвой для удаления пузырьков воздуха, затем наполняют колбу питательной средой до края и закрывают каучуковой пробкой, желательнее, чтобы в пробку была вставлена открытая с двух сторон стеклянная трубка. Пробка вытесняет часть жидкости в стеклянную трубку. Колбу со средой и почвой помещают в термостат при температуре 28–30 °С. После 5–7 дней инкубации культуру подвергают анализу: отмечают появление пузырьков газа под пробкой и цвет среды.

Анаэробные азотфиксаторы (*Clostridium pasteurianum*) учитывают на **среде Виноградского** (г/200 мл дистиллированной воды: маннит, или тростниковый сахар – 20,0; KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; NaCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; CaCO_3 – 5,0). Источником углерода в ней служит маннит, или тростниковый сахар.

3 Выявление групп микроорганизмов методом обрастания комочков почвы

Для определения качественного состава почвы и относительной оценки населенности почвы аэробными целлюлозоразрушающими микроорганизмами. Используют гелевые пластины или пластины из «голодного» агара. На пластину помещают кружок стерильной фильтровальной бумаги, увлажненной стерильной средой Виноградского или средой Гетчинсона (см. приложение А). Затем по фильтровальной бумаге раскладывают (по трафарету) 5–10 комочков почвы диаметром 1–2 мм.

Подсчитывают колонии, образовавшиеся вокруг комочков, а затем определяют, каково их соотношение (%) с общим числом комочков почвы (относительная оценка плотности населения учитываемых групп микроорганизмов в почве).

Рост нитрифицирующих бактерий устанавливают по образованию зон растворения CaCO_3 или MgCO_3 . Из этих зон вырезают кусочки геля и делают пробы на NH_3 (реактив Несслера), на нитрит (цинк-йод-крахмал в присутствии H_2SO_4) и на нитрат (дифениламин).

Наличие колоний азотобактера на гелевых пластинах определяют на 3–5-е сутки инкубации по образованию сероватых слизистых колоний, которые постепенно приобретают темно-бурый (*A. chroococcum*) или зеленый (*A. agile*) цвет.

Учет аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов на гелевых пластинах выполняют на 8–10-е сутки инкубации. Кроме общего подсчета обросших микроорганизмами комочков почвы, отдельно определяют количество комочков, обросших бактериями, актиномицетами и грибами (%).

Можно выделить следующие роды бактерий, использующих целлюлозу: *Cytophaga*, *Cellvibrio*, *Mycococcus*, *Polyangium*, *Dematium* и *Sorangium*.

Stachybotrys – колонии черные, бархатистые, под микроскопом обнаруживаются спорангии (орган, образующий споры), покрытые темноокрашенными спорами.

Cladosporium – конидиеносцы длинные, многоклеточные, от них отпочковываются неправильной формы конидии. Колонии окрашены в светлый оливково-зеленый цвет;

Fumago – колонии на клетчатке темные и состоят из скоплений в виде узелков темных овальных и округлых хламидоспор.

Chaetomium – образуют перитеции (плодовые тела) серого или зеленоватого цвета;

Аспорогенные грибы – образуют желтый или белый мицелий без спороношения.

4 Определение общей численности микроорганизмов в почве методом прямого счета под микроскопом

Из средней почвенной пробы берут 5 г и вносят в колбу на 250 мл, содержащую 50 мл стерильной водопроводной воды. Навеску почвы предварительно растирают в стерильной агатовой или фарфоровой ступке с небольшим количеством стерильной воды. Для черноземных и темно-каштановых почв навеску растирают с 0,1%-ным раствором пиррофосфата натрия. Затем 5 мин встряхивают и в течение 2–5 с дают осесть грубым частицам. Из полученной взвеси стерильной градуированной пипеткой берут 0,01 мл и переносят на хорошо обезжиренное стекло. Одновременно с суспензией на стекло помещают каплю 0,1%-ного раствора агар-агара (хорошо отмытый агар-агар готовят на дистиллированной воде). Агар-агар и суспензию на стекле перемешивают и стерильным покровным стеклом распределяют по трафарету на 4 см².

Трафарет – заштрихованный тушью на миллиметровой бумаге квадрат площадью 4 см², приклеенный к предметному стеклу с нижней стороны.

Препарат сушат, фиксируют 96%-ным спиртом и красят фуксином. Остаток красителя смывают, опуская стекла в воду тыльной стороной. Затем препарат снова сушат и просматривают под микроскопом.

Для получения более точных результатов подсчитывают 10 полей зрения и определяют среднее число клеток в одном поле зрения. Одновременно устанавливают площадь поля зрения:

$$p = \pi r^2.$$

Пример расчета. В чашке Петри диаметром 10 см выросло 45 колоний. Площадь чашки (πr^2) составит $3,14 \cdot 5^2 = 78,5$ см². Далее подсчитывают число клеток на 100 см² (равнозначных 10 л, или 0,01 м³ воздуха):

$$78,5 \text{ см}^2 - 45 \text{ клеток}$$

$$100,0 \text{ см}^2 - x$$

$$x = \frac{100 \cdot 45}{78,5} = 57 \text{ (клеток)}$$

Таким образом, в $0,01 \text{ м}^3$ воздуха находится 57 клеток, а в 1 м^3 их будет в 100 раз больше – 5700.

Диаметр поля зрения измеряют при помощи объектного микрометра. Затем находят, сколько полей зрения (K) размещается на площади мазка (P), равной 400 мм^2 , по формуле

$$\hat{E} = \frac{P}{\delta}.$$

Пример расчета. Если диаметр поля зрения равен $0,16 \text{ мм}$, а площадь поля зрения соответствует $0,02 \text{ мм}^2$, то

$$\hat{E} = \frac{P}{\delta} = \frac{400}{0,02} = 20000 \text{ полей зрения.}$$

Среднее число клеток в поле зрения умножают на K и устанавливают число клеток в $0,01 \text{ мл}$ суспензии. Для определения количества клеток в 1 мл суспензии полученное число умножают на 100, для подсчета в 1 г абсолютно сухой почвы — на степень разведения и делят на навеску абсолютно сухой почвы, содержащейся в 1 г сырой почвы.

Использование метода прямого учета почвенных микроорганизмов по Виноградскому в модификации Шульгиной показывает, что в почве содержится в сотни и тысячи раз больше клеток микроорганизмов, чем удается учесть методом питательных пластин.

Контрольные вопросы

- 1 Какие популяции микроорганизмов населяют верхний слой почвы?
- 2 Какие Вы знаете методики исследования почвенных микроорганизмов?
- 3 Определение каких бактерий является показателем санитарного состояния почвы?

Лабораторная работа № 7

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ВОДЫ

Цель занятия. Изучить методики микробиологического контроля воды.

Материалы и оборудование: среда Булира; среда Эндо; речная, озерная, водопроводная вода; маннит, глюкоза; электроплитка, микроскоп, стерильные пипетки, стерильные чашки Петри.

Микробиологический анализ

Степень микробного загрязнения воды очень важно учитывать в технологиях различных производств. Вода, поступающая на производство, по качеству должна соответствовать санитарным нормам. Для контроля за санитарным состоянием воды проводят микробиологический анализ: водопроводной воды – не реже одного раза в месяц, артезианской – не реже одного раза в год, воды открытых водоемов и колодцев – ежедневно.

Пробы воды для микробиологического исследования отбирают с соблюдением правил асептики (стерильности) в стерильную стеклянную посуду с притертыми или ватно-марлевыми пробками. Перед взятием пробы из водопроводного крана, трубы или колодца с насосом воду спускают в течение 5–10 мин, а края спускной трубы перед набором воды обжигают пламенем. Из открытых водоемов пробы воды отбирают при помощи специальных приборов – **батометров** – на расстоянии 10–15 см от дна. В проточных водоемах пробы отбирают около берега и в центре течения. При обычном плановом санитарном контроле должно быть взято не менее 500 мл воды, для исследования на присутствие патогенных микроорганизмов – не менее 1 л. Пробы отбирают в часы наибольшего расходования воды на предприятии. Микробиологический анализ воды выполняют не позднее 2 ч с момента взятия пробы. В исключительных случаях допускается удлинение срока до 6 часов при обязательном хранении проб при низких положительных температурах (1–5 °С). При транспортировке в теплое время года пробы предохраняют от нагревания, а в зимнее время – от замораживания. При санитарно-микробиологическом исследовании воды определяют микробное число и количество бактерий группы кишечной палочки (коли-титр).

Микробное число – общая микробная загрязненность определяется числом микробных колоний, которые вырастают на простой питательной среде (МПА) при 37 °С в течение 24 ч из посева 1 мл исследуемой пробы воды. Данный показатель позволяет учитывать не все микроорганизмы, содержащиеся в 1 мл воды, а лишь способные расти на простых средах при указанной температуре (мезофильные, сапротрофные). Однако число сапротрофных микроорганизмов, вырастающих на МПА, обычно соответствует степени загрязненности воды органическими веществами и, таким образом, косвенно характеризует ее санитарное состояние.

Кишечная палочка – самый многочисленный и постоянный обитатель толстого отдела кишечника человека и всех теплокровных животных. Она выделяется во внешнюю среду с фекальными массами, поэтому используется как индикатор фекального загрязнения внешней среды и косвенный показатель наличия в воде болезнетворных микробов – возбудителей кишечных инфекций человека, выделяемых с фекалиями в воду и другие объекты. Таким образом, кишечная палочка служит санитарно-показательным микроорганизмом воды. Поскольку она не образует спор и гибнет при относительно щадящих методах обеззараживания, ее присутствие в воде указывает на

недостаточность обработки воды. Если кишечная палочка сохранила жизнеспособность, значит, могли выжить и другие неспорообразующие бактерии, такие, как дизентерийная шигелла, брюшнотифозная сальмонелла и другие патогенные бактерии – возбудители желудочно-кишечных заболеваний.

Коли-индекс (индекс кишечной палочки) – это число кишечных палочек, обнаруженных в 1 л исследуемой воды (по международным стандартам – в 100 мл). По существующим нормативам коли-титр питьевой воды не должен быть менее 333 мл (в крупных городах – не менее 500 мл), а коли-индекс – не более 3.

Ход работы

1 Определение микробного числа

Определение микробного числа микроорганизмов в пробе воды (питьевой, речной, озерной, болотной). Культивирование микроорганизмов проводят на простой питательной среде МПА при 37 °С в течение 24 ч.

Для определения микробного числа делают посевы с соблюдением правил асептики в чашки Петри с МПА методом заливки с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 30 до 300 колоний. Поэтому из проб артезианской и водопроводной воды (содержащей обычно меньше микроорганизмов) высевают соответственно объемы в 1 мл и 0,1 мл из неразведенных проб. При исследовании воды открытых водоемов высевают по 1 мл из предварительно приготовленных в стерильной воде десятикратных разведений исследуемой пробы (10^{-1} – 10^{-3} и более, в зависимости от предполагаемого загрязнения). Указанные выше объемы проб воды (1 мл; 0,1 мл) или ее разведений (по 1 мл каждого) вносят стерильной пипеткой в пустые стерильные чашки Петри, в которые затем наливают расплавленный теплый МПА (с температурой не выше 45–46 °С). Воду и МПА тщательно перемешивают и после застывания среды посевы выращивают в термостате при 37 °С в течение 24 ч. Затем подсчитывают микробные колонии.

Общее число микробных колоний, выросших на всей чашке Петри, умножают на разведения, из которых был сделан высев 1 мл (чтобы перевести на 1 мл исследуемой воды). Затем определяют среднее арифметическое число колоний – микробное число исследуемой пробы.

2 Определение коли-титра и коли-индекса

Коли-титр определяют **методами бродильных проб**. Данные методы основаны на способности кишечной палочки теплокровных животных и человека развиваться при повышенных температурах (43–44 °С) и сбраживать сахара (маннит, глюкозу и др.) с выделением газа. Существуют двух- и трех-этапные бродильные методы.

Трехэтапный бродильный метод заключается в следующем. На первом этапе ставят первую бродильную пробу: различные разведения исследуемой

воды при помощи стерильных пипеток вносят в колбы и пробирки со специальными углеводными жидкими средами (среда Булира, среда Эйкмана, розоловая и др.).

В зависимости от предполагаемого микробного загрязнения водоисточника применяют разные схемы посева. Так, при исследовании водопроводной воды делают посевы в общем объеме 300 мл (2 объема по 100 мл и 10 объемов по 10 мл). При исследовании воды открытых водоемов (речной, озерной и т. д.) необходимо посеять воду в общем объеме 111,1 мл (1 объем – 100 мл; 1 объем – 10 мл и по одному объему в 1 мл и 0,1 мл). Соотношение между средой и засеваемой водой должно быть 1:2.

Посевы выращивают в термостате при 43–44 °С в течение 24 ч. При указанной температуре подавляется развитие микроорганизмов, не имеющих санитарно-показательного значения для воды. Затем просматривают посевы для выявления признаков роста кишечной палочки (наличие пузырьков газа, изменение цвета, помутнение).

На втором этапе для подтверждения правильности обнаружения роста кишечной палочки в жидкой среде из посева с признаками роста при помощи бактериальной петли делают высев в чашки Петри со средой Эндо и выращивают культуру при 37 °С в течение 24 ч.

Среда Эндо состоит из МПА, лактозы и обесцвеченного индикатора (фуксин обесцвечен сульфитом натрия). На данной среде бактерии группы кишечной палочки теплокровных животных образуют типичные темно-красные, ярко-красные или розовые колонии с темным центром, имеющие металлический блеск или без него. Столь характерный рост на среде Эндо этих бактерий обусловлен тем, что они активно сбраживают лактозу, продукты расщепления которой вызывают восстановление индикатора фуксина, окрашивающего колонии. При отсутствии характерного роста на пробу – дают **отрицательный ответ**.

При наличии типичных колоний из них делают мазки, которые окрашивают по Граму и микроскопируют. Если в мазках обнаруживают мелкие неспорообразующие грамотрицательные палочки, то переходят к третьему этапу для окончательного подтверждения результатов исследования.

На третьем этапе из типичных колоний, в которых при микроскопировании обнаружены характерные микробные клетки, делают пересев в разведенную жидкую углеводную среду (Булира и др.). Посевы выращивают при 43–44 °С в течение 24 ч, после чего учитывают окончательно. При наличии в посевах помутнения, газообразования и изменения цвета дают **положительный ответ**, результаты которого выражают в виде коли-титра. При отсутствии газообразования дается **отрицательный ответ**, т. е. данные **первой бродильной пробы подтверждаются**.

Контрольные вопросы

- 1 Как правильно отобрать пробу из водоемисточника?
- 2 По каким микробиологическим показателям определяют санитарное состояние водоемисточников?
- 3 Для какой цели производят микробиологическое исследование воды?
- 4 Как определяют микробное число? Что такое индекс кишечной палочки?
- 5 Как рассчитывается коли-индекс?

Лабораторная работа № 8

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К ТЕМПЕРАТУРЕ, ФИТОНЦИДАМ, АНТИСЕПТИКАМ И АНТИБИОТИКАМ

Цель задания. Исследовать влияние температурных факторов, фитонцидов, антисептиков и антибиотиков на рост и развитие микроорганизмов. Изучить методы и приемы их обеззараживания.

Материалы и оборудование: мясопептонный агар или среда Чапека; лук, чеснок, хрен, сосновая хвоя; 1%-ный р-р фенола, 1%-ный р-р хлорамина, 1%-ный р-р хлорной извести; антибиотики – биомицин, тетрациклин, ампициллин и др; электроплитка; стерильные пипетки, стерильные чашки Петри.

Влияние температуры на микроорганизмы

На активность микроорганизмов и формирование их сообществ в почве влияет ряд природных и антропогенных факторов. Среди них температура, влажность, воздушный режим, кислотность почв, а также абиотические факторы.

Развитие и жизнедеятельность каждого вида микроорганизмов могут происходить только в определенных пределах температуры. Наименьшая температура, при которой наблюдается развитие микроорганизмов, хотя и очень слабое, называется *минимальной*. Ниже этой температуры развитие прекращается, но микроорганизмы более или менее длительно могут сохраняться живыми. Наибольшая температура, при которой еще наблюдается слабое развитие микроорганизмов, называется *максимальной*.

Даже при незначительном превышении максимальной температуры развитие микроорганизмов прекращается и они быстро гибнут. Температура, при которой развитие микроорганизмов происходит наиболее интенсивно, называется *оптимальной*. По этой температуре различают 3 группы микроорганизмов: холодолюбивые, развивающиеся лучше всего при температуре около 10 °С; теплолюбивые – при 50–60 °С и мезофилы – при средних температурах около 25–30 °С. Основная масса почвенных микроорганизмов

принадлежит к мезофиллам. Наблюдения показывают, что при температуре ниже 5 °С в почве практически перестает накапливаться CO₂, т. е. приостанавливается распад органических соединений.

В почвах южной зоны, как правило, обитают микроорганизмы, предъявляющие повышенные требования к теплу. Например, южные почвы значительно богаче теплолюбивыми грибами рода *Aspergillus*, в то время как в северных преобладают виды рода *Penicillium*, способные развиваться при более низких температурах.

Отношение микроорганизмов к температуре, превышающей максимальную (или термоустойчивость микроорганизмов) различно. Бесспоровые бактерии, вегетативные клетки споровых бактерий, дрожжей и плесеней при температуре 50–70 °С погибают в течение 15–30 мин, а при 80–100 °С – в течение нескольких минут или нескольких секунд. Споры большинства дрожжей и плесеней погибают при 60–80 °С. Споры бактерий значительно более термостойки. Некоторые выдерживают нагревание до 100 °С в течение нескольких часов и относительно быстро погибают лишь при 120–130 °С.

Влияние фитонцидов и антисептиков

Фитонциды – это летучие вещества, выделяемые высшими растениями и обладающие антимикробным действием. Они различны по химической природе и силе действия. Одни из них вызывают гибель микроорганизмов, другие лишь угнетают их развитие. Фитонциды обладают избирательностью: каждый действует только на определённые микроорганизмы, эффект действия зависит от времени, условий и устойчивости микроорганизмов.

Антисептики – это химические вещества, губительно действующие на микроорганизмы. Интенсивность действия того или иного антисептика зависит от природы этого вещества, концентрации его в среде, времени, условий воздействия и устойчивости микроорганизмов. Различные микроорганизмы проявляют неодинаковую чувствительность к одному и тому же антисептику.

Учение об антисептике сыграло большую роль в развитии хирургии. Практическое приложение микробиологической науки в хирургии привело к уменьшению числа послеоперационных осложнений, гангренозных процессов и в значительной степени обусловило снижение смертности в хирургических отделениях.

Ход работы

1 Влияние температуры на рост и развитие гриба *Aspergillus niger*

В три стерильные чашки Петри разлить предварительно расплавленный на водяной бане и охлажденный до 60 °С мясоептонный агар или среду Ча-

пека. Взять прокаленной петлей каплю исследуемого материала и быстро (слегка приоткрыв чашку левой рукой) внести посевной материал в жидкую среду путем погружения в него петли и, помешав его, закрыть чашку. Посев сделать во все три чашки.

Засеянные чашки перевернуть кверху дном и поставить выращивать посевы при температурах 5, 25, 40 °С на 48 часов.

Результаты исследований записать в таблицу 1.

2 Влияние фитонцидов и антисептиков на рост гриба *Aspergillus niger*

а) В три стерильные чашки натереть на терке, предварительно ошпаренной кипятком, луковицу репчатого лука, 2–3 зубка чеснока, 1 корень хрена, сосновую хвою разложить в четыре чашки Петри и залить остывшей до 60 °С агаризованной средой. Затем сделать сплошной посев спор изучаемого гриба во всех четырех чашках Петри.

Таблица 1 – Влияние температуры на интенсивность роста гриба *Aspergillus niger*

Родовое название гриба	Показатель интенсивности развития (зона обрастания), мм	Температура, °С		
		5	25	40

Для этого отобрать стерильной пипеткой 0,2 см³ суспензии спор изучаемого гриба, вылить ее на поверхность питательной среды, тщательно и равномерно разместить по всей поверхности питательной среды стерильной изогнутой стеклянной палочкой (шпатель Дригальского). После этого в 1-ю чашку в центр засеянной пластинки поместить небольшое количество луковой кашицы, во 2-ю – чесночной кашицы, в 3-ю – тертый хрен, в 5-ю – сосновую хвою, 6-я чашка Петри является контрольной. Все поместить в термостат с температурой 25 °С.

Для выявления фитонцидности исследуемых растений (лук, чеснок, хрен, сосна) отметить, сопоставляя с контрольной чашкой, на всей ли поверхности питательного агар-агара одинаково хорошо растет плесень, имеется ли вокруг исследуемого на фитонцидность материала «стерильная» зона – зона отсутствия роста гриба. Замерить диаметр этой зоны с помощью миллиметровой бумаги.

б) Сделать посев спор плесневого гриба в четырех чашках Петри на агаризованную среду. В 1-ю чашку добавить 5 мл 1%-ного раствора фенола, во 2-ю – 5 мл 1%-ного раствора хлорамина, в 3-ю – 5 мл 1%-ного раствора хлорной извести, 4-я чашка – контрольная. Чашки поместить в термостат с температурой 25 °С.

Влияние антисептиков оценить по интенсивности развития грибки и спорообразования и результаты записать в таблицу 2. Для этого пользоваться условными обозначениями:

- отсутствие роста (или спороношения);
- + слабый рост (или спороношение);
- ++ умеренный рост (или спороношение);
- +++ обильный рост (или спороношение).

Таблица 2 – Влияние фитонцидов и антисептиков на рост гриба *Aspergillus niger*

Показатель	Фитонциды				Антисептики		
	Репчатый лук	Чеснок	Хрен	Сосновая хвоя	Фенол	Хлорамин	Хлорная известь
Интенсивность развития							
Наблюдения и заключение							

3 Влияние антибиотиков на рост гриба *Aspergillus niger*

Широкое использование антибиотиков, в частности биомицина, тетрациклина и других, в рационе животных и человека, а также для лечения и профилактики болезней, привело к появлению форм микроорганизмов, резистентных (устойчивых) к различным антибиотикам, в том числе к пенициллину.

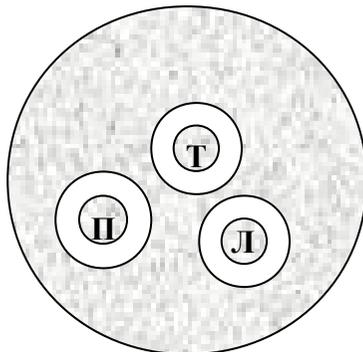
Для определения резистентных к антибиотикам бактерий используют метод бумажных дисков, пропитанных данными антибиотиками.

Метод основан на диффузии антибиотика из пропитанного антибиотиком диска фильтровальной бумаги в плотную питательную среду.

На поверхность среды высевают суспензию агаровой культуры микроорганизма. Градуированной пипеткой берут 0,02 мл этой суспензии (одна капля) и стерильным шпателем растирают досуха на питательной среде в чашке Петри у пламени горелки. Затем стерильным пинцетом раскладывают диски фильтровальной бумаги, пропитанные разными антибиотиками, не менее 4–6 дисков. Чашки выдерживают 30 мин при комнатной температуре (период преддиффузии препаратов в среду). Затем чашки помещают в термостат при 37 °С на 16–18 ч.

При оценке результатов опыта измеряют диаметр зон задержки роста микроорганизмов вокруг дисков с антибиотиками, включая диаметр самих дисков (рисунок 1).

Рисунок 1 – Диски, применяемые для определения чувствительности бактерий к антибиотикам: задержка роста стафилококка под влиянием пенициллина (П), левомицетина (Л), тетрациклина (Т)



Отсутствие зоны задержки роста микроорганизма означает, что испытуемый штамм устойчив к данному препарату. Зоны диаметром до 10 мм указывают на малую чувствительность, зоны диаметром больше 10 мм – на чувствительность микроорганизмов.

Результаты опыта записывают в таблицу 3.

Таблица 3 – Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

Антибиотик	Диаметр зоны задержки роста микроорганизма	Наблюдения и заключение

Контрольные вопросы

- 1 Как классифицируются микроорганизмы по отношению к температуре?
- 2 Как действуют на микробы низкие и высокие температуры?
- 3 При какой температуре погибает мицелий и споры микроорганизмов?
- 4 При каких температурных режимах возможно развитие плесневых грибов?
- 5 Как подразделяются микроорганизмы по отношению к влаге?
- 6 Какими свойствами обладают фитонциды? От чего зависит эффект их действия на микроорганизмы?
- 7 Как используют антисептики в обеззараживании сточных вод?
- 8 Какое влияние оказывают химические и биологические факторы на микроорганизмы?
- 9 Что такое антибиотики и фитонциды?
- 10 Что такое антисептик?

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(обязательное)

Рецепты основных питательных сред

Мясопептонный бульон: пептона – 10 г, хлорида натрия – 5 г, мясной воды – до 1000 мл; кипятить в течение 15–20 минут, выкипевшую воду долить до установления значения pH = 7,2...7,4; стерилизовать при 120 °С в течение 20 минут.

Мясопептонный агар (МПА): агар-агара – 15–30 г (в зависимости от необходимой плотности среды), мясopептонного бульона – до 1000 мл, pH = 7,2...7,4; стерилизовать при 120 °С в течение 20 минут.

Сусло-агар: агар-агара – 1,8 г, надосадочной жидкости стерильного пивного сусла – до 100 мл; нагреть до растворения; pH = 6,4...6,5; стерилизовать при температуре 110 °С в течение 30 минут.

Среда Кесслера: пептона – 10 г, желчи жидкой – 50 мл, воды дистиллированной – до 1000 мл; кипятить 20–30 минут, фильтровать через ватно-марлевый фильтр, добавить 2,5 г лактозы и восстановить водой объем до 1000 мл; pH = 7,4...7,6; добавить 2 мл 1%-ного водного раствора генцианвиолета, стерилизовать при температуре 120 °С в течение 15 минут.

Среда Симонса: агар – 20 г, фосфата натрия (аммония) – 1,5 г, сульфата магния – 0,2 г, натрия лимоннокислого нейтрального – 2,5 г, воды дистиллированной – до 1000 мл; стерилизовать в автоклаве при температуре 120 °С в течение 15 минут, добавить 1 мл 0,5%-ного спиртового раствора бромтимолового синего.

МПА с углеводами (глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза): используется заводского производства и состоит из смеси агар-агара, гидролизата из рыбы, фосфата (хлорида) натрия; соответствующего сахара и индикаторов – водного голубого и розоловой кислоты; стерилизовать при 120 °С в течение 20 минут.

Среда Булира: 12,5 г маннита, 6 мл 1%-ного водного раствора нейтрального красного, довести объем до 1000 мл МПБ; вместо маннита можно взять 1%-ного или 2%-ного раствор глюкозы, стерилизовать при 120 °С в течение 20 минут.

МПА с крахмалом: на 100 мл МПА добавить 1 г крахмала, перекипятить и стерилизовать при 120 °С в течение 20 минут.

Агар-агар — сложный полисахарид, получаемый из некоторых морских водорослей, используется для получения плотных питательных сред, так как в воде образует гели, плавящиеся при 100 °С, а затвердевающие при температуре около 40 °С.

Среда Гетчинсона (г/л диспильированной воды): NaNO_3 – 2,5; KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; NaCl – 0,1; CaCl_2 – 0,1; FeCl_3 – 0,01; pH среды доводят до 7,2 добавлением 20%-ного раствора Na_2CO_3 .

Среда Гильтая. Первый раствор: KNO_3 – 2,1 г; аспарагин – 10 г; дистиллированная вода – 250 мл; второй раствор: цитрат натрия – 5,0 г; KH_2PO_4 – 2,0 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,0 г; CaCl_2 – 2,0 г; FeCl_3 – следы; дистиллированная вода – 500 мл. Растворы сливают вместе, устанавливают pH 6,8–7,0, объем доводят дистиллированной водой до 1000 мл.

Среда Имшенецкого и Солнцевой (%): NaNO_3 – 0,25; K_2HPO_4 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,03; NaCl – 0,01; CaCl_2 – 0,01; CaCO_3 – 0,5; добавлять мел необязательно.

Среда Чапека (%): KH_2PO_4 – 0,1; MgSO_4 – 0,05; NaNO_3 – 0,2; KCl – 0,05; FeSO_4 – 0,001; сахароза – 3. На 1 л среды – 15–20 г агар-агара.

Среда Виноградского (г/200мл дистиллированной воды): KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; NaCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,01.

Среда Эндо (к 3%-ному агару добавляют (на 1 л питательной среды):

1) 10 г молочного сахара; 2) 10 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина, обесцвеченного перед добавлением к агар-агару 10%-ным водным раствором сульфита натрия до слаборозового оттенка или до полного обесцвечивания (обычно расходуют 20–25 мл этого раствора).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Азаров, В. Н. Основы микробиологии и пищевой гигиены / В. Н. Азаров – М. : Экономика, 1981. – 216 с.
- 2 Краткий определитель бактерий Берджи. – М. : Мир, 1980. – 430 с.
- 3 **Лерина, И. В.** Лабораторные работы по микробиологии. / И. В. Лерина, А. И. Педенко. – М. : Экономика, 1986. – 126 с.
- 4 **Звягинцев, Д. Г.** Почва и микробиология / Д. Г. Звягинцев. – М., 1987. – 256 с.
- 5 Промышленная микробиология : учеб. пособие / З. А. Аркадьева [и др.] ; под ред. Н. С. Егорова. – М. : Высш. шк., 1989. – 688 с.
- 6 **Емцев, В. Т.** Микробиология / В.Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. – М., 1990. – 444 с.
- 7 **Гусев, М. В.** Микробиология : учеб. для студентов вузов / М. В. Гусев, Л. А. Минеева ; МГУ им. М. В. Ломоносова. – 5-е изд., стереотип. / – М. : Academia, 2004. – 461 с.
- 8 **Заварзин, Г. А.** Введение в природоведческую микробиологию / Г. А. Заварзин, Н. Н. Колотилова. – М., 2001. – 234 с.
- 9 / **Теппер, Е. З.** Практикум по микробиологии: учеб. пособие для вузов / Е. З. Теппер, В.К. Шильникова, Г. П. Переверзева ; под ред. В. К. Шильниковой – 5-е изд., перераб. и доп. – М. : Дрофа, 2004. – 256 с.
- 10 **Сидоренко, О. Д.** Микробиология для студентов вузов / О. Д. Сидоренко, Е. Г. Борисенко, А. А. Ванькова. – М. : ИНФРА-М, 2005. – 287 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
Правила по технике безопасности при работе в микробиологической лаборатории	3
<i>Лабораторная работа № 1</i> Оборудование и материалы, используемые в микробиологической лаборатории. Техника микроскопирования.....	4
<i>Лабораторная работа № 2</i> Культивирование микроорганизмов. Классификация питательных сред и требования к ним.....	11
<i>Лабораторная работа № 3</i> Исследование морфологии микроорганизмов.....	16
<i>Лабораторная работа № 4</i> Учет численности и выделение чистой культуры микроорганизмов.....	27
<i>Лабораторная работа № 5</i> Превращение микроорганизмами безазотистых органических веществ.....	31
<i>Лабораторная работа № 6</i> Общий микробиологический анализ почвы.....	36
<i>Лабораторная работа № 7</i> Микробиологический контроль воды.....	41
<i>Лабораторная работа № 8</i> Определение чувствительности микроорганизмов к температуре, фитонцидам, антисептикам и антибиотикам.....	45
Приложения А. Рецепты основных питательных сред.....	50
Список литературы.....	52

Учебное издание

Ермолович Ольга Анатольевна

Кудина Елена Федоровна

Неверов Александр Сергеевич

МИКРОБИОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие
по выполнению лабораторных работ

Редактор *М.П. Дежко*

Технический редактор *В.Н. Кучерова*

Подписано в печать 11.11.2008 г. Формат 60x84 1/16
Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать на ризографе.
Усл. печ. л. 3,02. Уч.-изд. л. 3,11. Тираж 150 экз.
Зак. № Изд. № 141.

Издатель и полиграфическое исполнение
Белорусский государственный университет транспорта:
ЛИ № 02330/0133394 от 19.07.2004 г.
ЛП № 02330/0148780 от 30.04.2004 г.
246653, г. Гомель, ул. Кирова, 34