

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И КАДРОВ

**Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»**

Кафедра ботаники и физиологии растений

О. А. Цыркунова, А. А. Горновский, О. А. Порхунцова

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Часть 1

*Методические указания по изучению дисциплины
для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по
специальностям 1-74 02 01 – «Агрономия», 1-74 02 02 – «Селекция и
семеноводство», 1-74 02 05 – «Агрехимия и почвоведение»,
1-33 01 06 – «Экология сельского хозяйства», 1-74 02 03 – «Защита
растений и карантин», 1-74 02 04 – «Плодоовощеводство»*

**Горки
БГСХА
2020**

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И КАДРОВ

Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

Кафедра ботаники и физиологии растений

О. А. Цыркунова, А. А. Горновский, О. А. Порхунцова

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Часть 1

*Методические указания по изучению дисциплины
для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по
специальностям 1-74 02 01 – «Агрономия», 1-74 02 02 – «Селекция и
семеноводство», 1-74 02 05 – «Агрехимия и почвоведение»,
1-33 01 06 – «Экология сельского хозяйства», 1-74 02 03 – «Защита
растений и карантин», 1-74 02 04 – «Плодоовощеводство»*

Горки
БГСХА
2020

УДК 576.8 (077)

Авторы:

старший преподаватель *О. А. Цыркунова*;
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *А. А. Горновский*;
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *О. А. Порхунцова*

Рецензент:

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *Ю. Л. Тибец*

Сельскохозяйственная микробиология. Часть 1: методические указания по изучению дисциплины / *О. А. Цыркунова, А. А. Горновский, О. А. Порхунцова.* – Горки : БГСХА, 2020. – 53 с.

Содержатся сведения о методах изучения и культивирования микроорганизмов: техника микроскопирования, приготовление питательных сред, способы стерилизации, технология культивирования. Даны методики количественного учета и анализа микрофлоры воздуха и почвы. Материал сопровождается большим количеством иллюстраций.

Для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальностям 1-74 02 01 – «Агрономия», 1-74 02 02 – «Селекция и семеноводство», 1-74 02 05 – «Агрохимия и почвоведение», 1-33 01 06 – «Экология сельского хозяйства», 1-74 02 03 – «Защита растений и карантин», 1-74 02 04 – «Плодоовощеводство».

© УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия», 2020

ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1. В помещении микробиологической лаборатории должны строго соблюдаться порядок и чистота.

2. Находиться в лаборатории необходимо без верхней одежды и в белых халатах.

3. Нельзя в лаборатории принимать пищу, пить, употреблять жевательные резинки.

4. Приступая к лабораторным занятиям, студенты занимают постоянные места за учебными столами.

5. Рабочее место должно быть оборудовано всем необходимым для выполнения работы.

6. Студенты пользуются закрепленными за ними микроскопами на протяжении всего курса и несут за них ответственность.

7. На рабочем столе не должно быть никаких лишних предметов.

8. Не следует создавать сквозняки и вызывать интенсивное движение воздуха (бег, быстрая ходьба и др.).

9. Перед началом работы студенты заранее знакомятся с заданием.

10. Записи наблюдений, зарисовки в рабочих тетрадях обязательны.

11. Во время работы следует избегать прикосновений руками к лицу, волосам, одежде, личным предметам.

12. После окончания работы препараты оставляют в эксикаторе, металлические предметы (петли, иглы, пинцеты) после употребления стерилизуют в пламени огня, пипетки помещают в стакан с дезинфицирующей жидкостью.

13. В лаборатории должны быть полотенце и мыло, чтобы после выполнения работ студенты мыли руки.

14. После окончания занятий рабочее место должно быть приведено в порядок.

При работе в газифицированных лабораториях студенты должны быть ознакомлены с правилами работы с газом и заполнить контрольный лист по технике безопасности.

Оборудование рабочего места: коробочка с предметными стеклами, корковые пробки, бактериологические петли, газовые горелки или спиртовки, спички, штатив с красками и иммерсионным маслом, емкость с водой и приспособлением для ее слива, книжка из фильтровальной бумаги, эксикатор, микроскопы с хлопчато-бумажными тряпочками для протирания объективов.

УСТРОЙСТВО СВЕТОВОГО МИКРОСКОПА «МИКРОМЕД - 1»

Бинокулярный микроскоп имеет тубус с двумя окулярами. При наблюдении объекта обоими глазами одновременно достигается большая резкость глубины, меньше утомляется зрение.

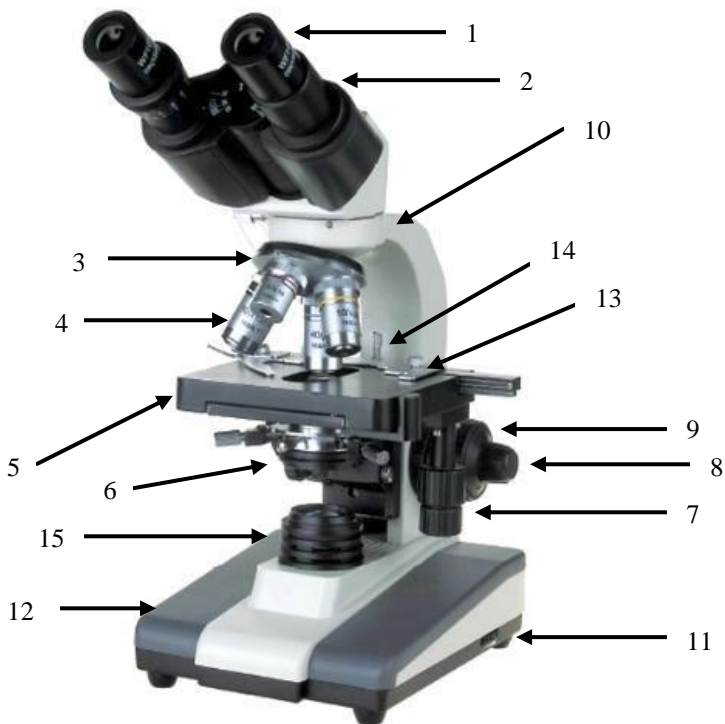


Рисунок 1 – Микроскоп с бинокулярной насадкой и встроенным в основание осветителем с галогенной лампой и блоком питания.

1 – окуляры; 2 – бинокулярная насадка; 3 – револьверное устройство; 4 – объективы; 5 – предметный столик; 6 – конденсор; 7 – рукоятка перемещения предметного столика в двух взаимно-перпендикулярных направлениях; 8 – рукоятка тонкой фокусировки; 9 – рукоятка грубой фокусировки; 10 – тубус; 11 – рукоятка регулировки яркости горения лампы; 12 – основание микроскопа; 13 – препаратодержатель; 14 – винтовой упор (ограничитель перемещения предметного столика при фокусировке); 15 – источник света.

В тубус микроскопа сверху вставлен окуляр, в нижней части он снабжен вращающимся по кругу револьвером, в отверстия которого ввинчиваются объективы. Вращая револьвер, можно подвести любой объектив, который после легкого щелчка, закрепится на месте.

Окуляры имеют две линзы (верхнюю и нижнюю). Расстояние между линзами равно полусумме их фокусных расстояний. С уменьшением фокусного расстояния повышается увеличение окуляра. Короткие окуляры будут более сильными, а более слабыми – длинные. Окуляры обозначают по тому увеличению, которые они дают ($\times 10$, $\times 16$, $\times 20$).

Объективы подразделяются на *сухие* и *иммерсионные*. Сухим называют такой объектив, между линзой которого и рассматриваемым препаратом находится воздух, в котором, как в среде менее плотной, чем стекло, часть лучей преломляется и рассеивается, не дойдя до объектива.

В микробиологии используется иммерсионный объектив (погруженный в масло). Между линзой и рассматриваемым препаратом находится масло (однородная среда). Получается система: стекло препарата – иммерсионное масло – стекло объектива (с одинаковым показателем преломления). Благодаря маслу все лучи, не преломляясь и не изменяя направления, попадают в объектив, чем улучшают изображение микробов, делают его более четким (рис. 2). На оправе объектива обозначается даваемое им увеличение ($\times 4$, $\times 10$, $\times 40$, $\times 60$, $\times 100$).

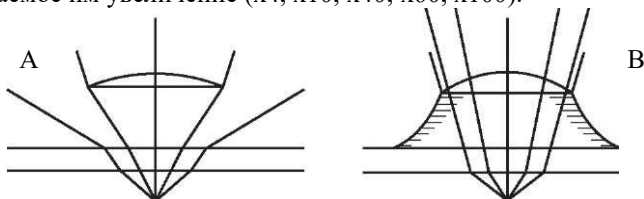


Рисунок 2 – Схема хода лучей при сухой (А) и иммерсионной (В) системах

Общее увеличение микроскопа равняется произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Например, иммерсионный объектив с увеличением $\times 100$ и окуляром $\times 10$ дает увеличение объекта в 1000 раз.

Конденсор состоит из системы линз, предназначенных для собирания лучей, идущих от источника света, в одной точке – фокусе, который должен находиться в плоскости рассматриваемого препарата. При микроскопировании окрашенных объектов конденсор должен быть поднят до уровня предметного столика. При изучении неокрашенных объектов следует опускать конденсор.

ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ФИКСИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ И МИКРОСКОПИРОВАНИЯ

Препарат-мазок. Для исследования микроорганизмов обычно используют фиксированные и окрашенные препараты, которые готовят следующим образом:

1. Обезжиривают предметное стекло. Для этого на него наносят каплю воды и растирают ее корковой пробкой. Можно использовать для этой цели реактивы (спирт, эфир и т.д.).

2. Обеззараживают бактериологическую петлю – прокаливают ее в пламени и дают остыть.

3. Берут подготовленной петлей микробный материал (из жидкой культуры или из колонии микробов на поверхности твердой питательной среды) и делают мазок – размазывают тонким слоем по стеклу, после чего петлю сразу прокаливают.

4. Высушивают мазок на воздухе или держат стекло высоко над пламенем, но не допуская закипания материала.

5. Фиксируют высушенный мазок, проводя стекло тыльной стороной 3–4 раза в пламени. Можно использовать фиксатор. Микроорганизмы при этом погибают и закрепляются на стекле.

6. Окрашивают препарат, нанося на него несколько капель красителя. Например, окраска кристаллвиолетом производится в течение 30–60 с. При простом способе окраски используют один краситель, и весь материал получают одноцветным. При сложных способах окраски применяют несколько красок и реактивов. Это позволяет выявить строение клеток бактерий, так как различия в химическом составе частей клетки обеспечивают неодинаковые отношения к разным красителям и позволяют получить разноцветную картинку. К сложным способам окраски относятся окраска по Граму, капсул, спор, волютинина.

7. Окрашенный препарат тщательно промывают водой.

8. Просушивают препарат, промокивая его между листами фильтровальной бумаги.

Микроскопирование. Перед началом работы проверьте исправность микроскопа и чистоту оптики.

В лабораторной практике обычно используют масляную иммерсию. На оправе иммерсионного объектива имеется черная круговая нарезка, обозначение oil – масляная иммерсия и цифра 100 – увеличение $100\times$.

1. На приготовленный и окрашенный препарат-мазок наносят небольшую каплю иммерсионного масла.

2. Поднимаем до упора конденсор, опускаем предметный столик с помощью макровинта.

3. Помещаем препарат на предметный столик микроскопа между держателем и прижимом препаратоводителя.

4. Окрашенные препараты рассматривают **только с иммерсионным объективом** (100/1,25 oil).

5. Осторожно погружаем объектив в масло с помощью макровинта до стекла.

6. Наблюдая в окуляр, проводим грубую фокусировку **вращая макровинт от себя**.

7. Окончательную фокусировку производим с помощью микровинта (вращение микровинта допускается **в пределах одного оборота**).

8. Во время микроскопирования правой рукой производим вращение микровинта, левой – передвижение препарата.

Препарат необходимо просмотреть в разных полях зрения для полноты изучения материала (рис. 3), что достигается вращением двух винтов столика микроскопа, приводящих его вместе с препаратом в движение в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Прежде чем дать отрицательный ответ, необходимо просмотреть не менее 100 полей зрения.

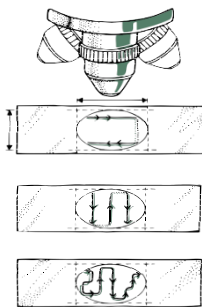


Рисунок 3 – Схемы изучения препарата в разных полях зрения

Окончание микроскопирования.

1. После окончания просмотра препарата опускаем предметный столик, крутя макровинт от себя, снимаем препарат.

2. При использовании иммерсионной системы необходимо вытереть масло с объектива мягкой чистой тряпочкой или марлей.

3. Поднимаем предметный столик до упора и укрываем микроскоп защитным чехлом.

4. Ставим микроскоп в шкаф.

Контрольные вопросы

1. Какие правила работы в микробиологической лаборатории?
2. Назовите оборудование микробиологической лаборатории.
3. Опишите технику приготовления препарата-мазка.
4. Назовите основные части светового микроскопа.
5. Правила работы с микроскопом.
6. Что такое иммерсионная система микроскопа, ее назначение и правила работы?

Раздел 1.

МОРФОЛОГИЯ И СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Работа 1. Основные формы бактерий

Бактерии – широко распространенные микроорганизмы. Они находятся в воздухе, почве, воде, на поверхности растений, в кишечнике животных и человека.

Одноклеточные бактерии по форме подразделяются на три основные группы – шаровидные, палочковидные и извитые.

Шаровидные бактерии называются **кокками** (от греч. *kokkos* – зерно). Они имеют круглую форму и очень мелкие. В зависимости от характера деления и поведения клеток после деления бывают:

1. Микрококки (от греч. *mikros* – малый), или монококки (от греч. *monos* – один) – после деления клетки располагаются по одной;

2. Диплококки (от греч. *diploos* – двойной) – после деления клетки остаются соединенными по две;

3. Стрептококки (от греч. *streptos* – цепочка) – деление происходит последовательно в одной плоскости, образующиеся после деления клетки остаются соединенными в цепочки;

4. Тетракокки (от греч. *tetra* – четыре) – деление клетки происходит в двух взаимно перпендикулярных плоскостях с образованием четырёх соединённых клеток;

5. Сарцины (от лат. *sarcio* – соединяю) – деление клетки идет последовательно и быстро в трех взаимно перпендикулярных плоскостях с образованием кубиков (пакетиков) из восьми клеток;

6. Стафилококки (от греч. *staphyle* – виноградная гроздь) – деление клеток происходит беспорядочно в различных направлениях, что приводит к образованию скоплений, напоминающих гроздь винограда.

Палочковидные бактерии по форме напоминают палочку или цилиндр, бывают короткими и длинными, толстыми и тонкими, с краями различной формы. Палочки обычно крупнее кокков. Их подразделяют на:

1. Бактерии (от греч. *bakteria* – палочка), не образующие споры;
2. Бациллы (от лат. *bacillum* – палочка), образующие споры. Термин бактерии в узком смысле означает палочковидные, а в широком смысле – вообще любые формы. Деление палочек происходит только поперек, после чего они могут остаться соединенными попарно (3. Дипло-бактерии и 4. Диплобациллы) или в цепочки (5. Стрептобактерии и 6. Стрептобациллы).

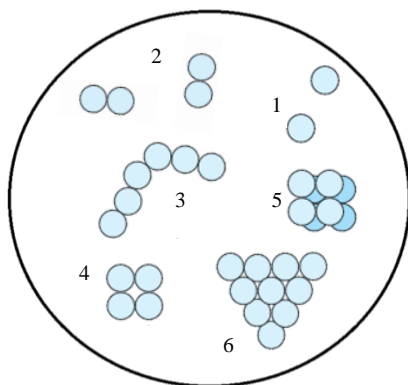


Рисунок 4 – Шаровидные бактерии
1 – микрококки; 2 – диплококки; 3 – стрептококки; 4 – тетракокки; 5 – сарцины; 6 – стафилококки.

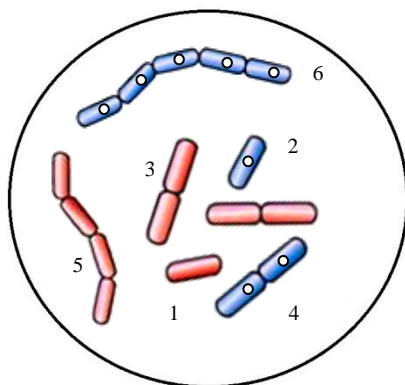


Рисунок 5 – Палочковидные бактерии
1 – бактерии; 2 – бациллы; 3 – диплобактерии; 4 – диплобациллы; 5 – стрептобактерии; 6 – стрептобациллы.

Извитые бактерии подразделяются по их извитости на:

1. Вибрионы (от франц. *vibrion* и от лат. *vibrare* – колебаться, дрожать) – слегка изогнутые клетки, по форме напоминают запятую, искривленность которых обычно меньше половины окружности;
2. Спириллы (от лат. *spirilla* – уменьшительное от *spira* – изгиб) – число завитков от 2 до 6, обычно крупные;
3. Спирохеты (от лат. *spira* и греч. *chaite* – волосы) – тонкие, длинные, с большим количеством завитков.

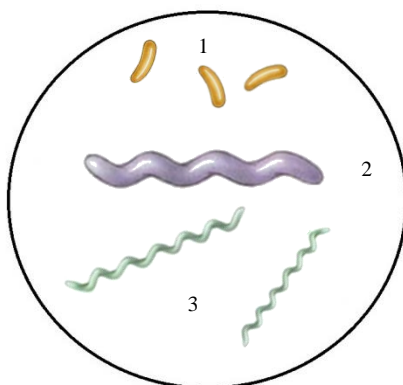


Рисунок 6 – Извитые бактерии
1 – вибрионы; 2 – спираиллы; 3 – спирохеты.

Выполнение работы. Готовят фиксированные и окрашенные кристалливиолетом (30–60с) препараты-мазки: 1) кокков; 2) палочковидных бактерий; 3) спирилл; 4) зубного налета. Рассматривают с помощью иммерсионной системы микроскопа.

Зарисовывают в тетради три поля зрения и делают в них рисунки с обозначением всех форм бактерий.

В препарате, приготовленном из собственного зубного налета, можно найти разные формы бактерий – шаровидные, палочковидные, извитые (например, спирохеты кариеса) и нитчатые.

Материалы и оборудование: выделенные культуры бактерий в пробирках – воздушные кокки, почвенные палочки и навозная жижа со спираллами; кристалливиолет.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные формы бактерий.
2. Охарактеризуйте шаровидные бактерии.
4. Назовите особенности извитых форм бактерий.
5. Какие бактерии называются бациллами?
6. Чем отличается бактерия от бациллы?
7. Сколько завитков имеет спиралла?
8. Как образуется стафилококк?
9. Нарисуйте стрептококк.
10. Из скольких клеток состоит сарцина?

Работа 2. Окраска по Граму

В 1884 г. датский ученый Г.Х. Грам предложил метод окраски, который позволил разделить все микроорганизмы на две группы – грамположительные (гр+) и грамотрицательные (гр-). Метод основан на различиях в химическом составе и строении клеточной стенки.

У грамположительных форм в состав клеточной стенки входит большое количество гетерополимера пептидогликана (муреина) и он равномерно локализуется множественными слоями в ней, выглядит при этом как гомогенный (однородный) слой (рис. 7). Клеточная стенка более толстая, содержит тейхоевые кислоты. У этих форм при окраске анилиновым красителем в присутствии йода образуется с муреином стойкое окрашенное соединение, не растворимое в спирте.

У грамотрицательных форм муреина в клеточной стенке нет или очень мало и он локализован в глубоких слоях. Имеется дополнительная внешняя мембрана, периплазматическое пространство, поэтому стойкого окрашенного комплекса при окраске по Граму не образуется. Такие клетки легко обесцвечиваются в спирте, их можно затем подкрасить другим контрастным по цвету красителем.

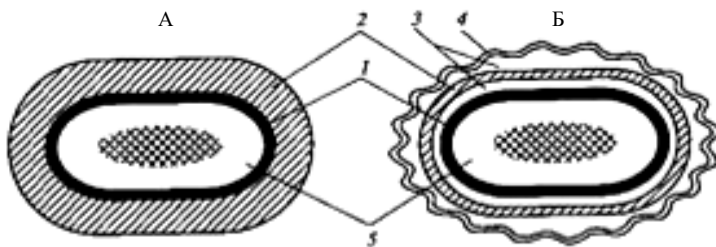


Рисунок 7 – Клеточная стенка грамположительных (А) и грамотрицательных (Б) бактерий

1 – цитоплазматическая мембрана; 2 – муреин; 3 – периплазматическое пространство; 4 – наружная мембрана; 5 – цитоплазма; 6 – ДНК.

Окраска по Граму положена в основу систематики бактерий и используется при определении их вида.

Выполнение работы. Для приготовления препаратов используют микробный материал, состоящий из двух выделенных культур микроорганизмов, смешанных в одной пробирке, одна из которых грамположительная, а другая грамотрицательная. Делают мазок, затем высушивают и фиксируют его в пламени.

Окраска по Граму заключается в следующем:

1. На фиксированный мазок накладывают бумажку Синева, пропитанную кристаллвиолетом, добавляют несколько капель воды для извлечения краски и оставляют на 2–3 мин, после чего бумажку удаляют;
2. Наливают на препарат несколько капель раствора Люголя (КЖ +J) на 1–2 мин, а затем жидкость сливают;
3. Опускают предметное стекло в стаканчик со спиртом на время от 3–6 с до 30–60 с (в зависимости от качества спирта) для обесцвечивания грамотрицательных форм;
4. Тщательно промывают препарат водой;
5. Окрашивают грамотрицательные бактерии фуксином 2-3 мин;
6. Промывают водой;
7. Просушивают препарат фильтровальной бумагой и рассматривают с иммерсионной системой микроскопа.

При просмотре препарата следует обратить внимание на то, что грамположительные формы окрашиваются в фиолетовый цвет кристаллвиолетом, а грамотрицательные – в красный или розовый цвет фуксином.

Грамположительные – стафилококк (*Staphylococcus*) – клетки мелкие и округлые, располагающиеся в виде скоплений. В качестве объекта можно использовать хлебные дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*).

Грамотрицательные – кишечная палочка (*Escherichia coli*) – клетки мелкие и короткие, иногда собраны в цепочки.

Зарисовывают микроорганизмы в одном поле зрения цветными карандашами и делают пояснительные подписи.

Материалы и оборудование: смесь культуры дрожжей и кишечной палочки, бумажки Синева, раствор Люголя, водный раствор основного фуксина или фуксин Пфейффера, стаканчики с 96 °-ным спиртом, красные и фиолетовые карандаши.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается принцип окраски по Граму?
2. Опишите технику окрашивания микробов по Граму.
3. Особенности строения клеточной стенки у грамотрицательных и грамположительных бактерий.
4. Назовите грамотрицательные и грамположительные бактерии.
5. Где используется данный метод?
6. В какой цвет окрашены грамотрицательные и грамположительные бактерии.
7. Какие формы обесцвечиваются в спирте?

Работа 3. Окраска капсул методом негативного контрастирования (по Гинсу)

Некоторые бактерии способны на наружной поверхности клеточной стенки образовывать слизистое вещество – капсулу, что является видовым признаком. Капсула у бактерий может достигать значительных размеров и имеет определенную форму. Капсула выполняет защитную функцию.

Химический состав ее у различных бактерий неодинаков. Капсульное вещество очень слабо воспринимает краску, поэтому при простом способе окраски капсула видна в виде слабоокрашенного ореола вокруг микробной клетки. Для обнаружения капсул лучше пользоваться негативными способами окраски, при которых окрашивается фон с контрастно выделяющимися неокрашенными капсулами, обрамляющими бактериальные клетки.

Выполнение работы. Для просмотра капсул используют культуру бактерий, образующих макрокапсулу.

1. Каплю исследуемого микробного материала наносят на край предметного стекла (рис. 8 а), добавляют к ней каплю туши и размазывают другим стеклом (можно со шлифованными срезанными краями), держа его под углом 45°, тонким слоем по предметному стеклу (рис. 8 б-е).

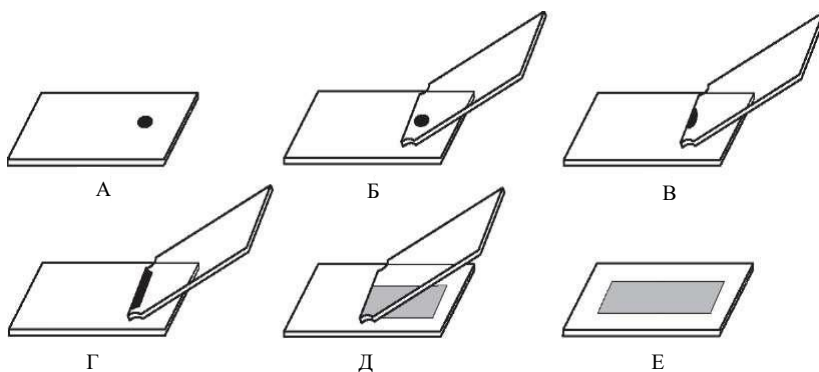


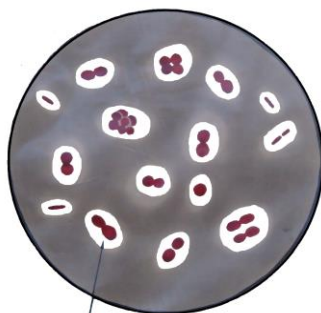
Рисунок 8 – Техника приготовления препарата методом негативного способа окрашивания

2. Высушивают на воздухе.
3. Фиксируют в пламени.
4. Окрашивают фуксином 1–2 мин.

5. Промывают водой.
6. Просушивают на воздухе или осторожно фильтровальной бумагой.

7. Рассматривают препарат с иммерсионной системой.

На фоне черной туши в препарате отчетливо выделяются розово-малиновые клетки азотобактера (*Azotobacter chroococcum*), окруженные бесцветными капсулами крупных размеров. Клетки имеют палочковидную форму или в виде крупных кокков, соединенных попарно и покрытых общей капсулой. Их зарисовывают в тетради цветными карандашами и подписывают.



капсула

Рисунок 9 – Азотобактер
Azotobacter chroococcum.

Материалы и оборудование: культура азотобактера, стекла со шлифовальными срезанными краями, свежая неразведенная тушь, водный раствор основного фуксина или фуксин Пфейффера, красные и черные карандаши.

Контрольные вопросы

1. Что представляет собой капсула и каково ее происхождение?
2. Опишите негативный способ окраски капсул.
3. Назовите капсульные бактерии.
4. Какую функцию в клетке выполняет капсула?
5. Все бактерии окружены капсулой?
6. Какого цвета капсула после окраски?
7. В какой цвет окрашены бактерии методом негативного контрастирования?

Работа 4. Окраска волютина (по методу Нейссера)

Многие микроорганизмы в определенных условиях образуют запасные вещества в виде гранулярных включений. По химической природе это чаще всего полисахариды, липиды, полифосфаты, белки, а также сера, железо. К основным клеточным включениям микробных клеток относятся волютин, гликоген, гранулеза, они выявляются при помощи специальных способов окраски.

Волютин (метахроматические зерна, метахроматин) – запасное вещество, состоящее из полифосфатов и веществ, близких к нуклеиновым кислотам. В них сосредоточены запасы органического фосфора.

Волютин имеет сходство с метиленовой синью, но при окрашивании ею приобретает фиолетово-черный цвет. Способность приобретать иной цвет, чем цвет окрашивающего вещества, называется метахромазией. Термин «волютин» произошло от названия вида *Spirillum volutans*, в клетках которой он был впервые обнаружен.

Волютин в виде крупных гранул находится в вакуолях дрожжей или цитоплазме бактерий (уксуснокислых, молочнокислых, азотфиксирующих) и актиномицетов.

Выполнение работы. Окраска волютина производится на культуре дрожжей, из которой готовят фиксированный в пламени препарат-мазок.

1. Окрашивают уксуснокислым синим 1–2 мин.
2. Промывают препарат водой.
3. Окрашивают раствором хризоидина 20–30 с.
4. Промывают водой.
5. Просушивают фильтровальной бумагой и исследуют под микроскопом с иммерсией.

Протоплазма дрожжей окрашивается в желтый или светло-коричневый цвет, а зерна волютина – в фиолетовый.

Зарисовывают клетки хлебных (пекарских) дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) с волютином в тетради цветными карандашами и дают пояснения.

Материалы и оборудование: жидкая культура дрожжей в пробирках, уксуснокислый синий, хризоидин, желтый или коричневый и фиолетовый или черный карандаши.

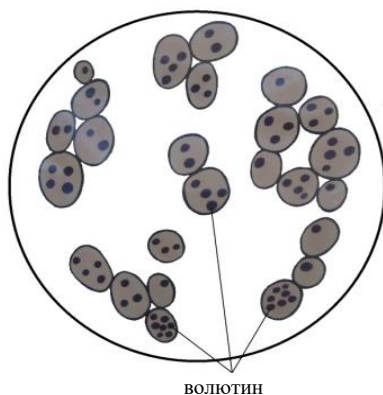


Рисунок 11 – Хлебные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

Контрольные вопросы

1. Что такое волютин?
2. Опишите способ окраски волютина.
3. Перечислите микроорганизмы, которые накапливают много волютина.
4. Что такое метахромазия?

Работа 5. Окраска гликогена

В цитоплазме бактерий обычно содержится 20-30% полисахаридов, а при благоприятных условиях до 50-60% от массы сухих клеток. Полисахариды цитоплазмы обнаруживаются в двух формах: они могут быть диспергированы в ней или объединены в гранулы.

Гликоген – крахмалоподобное вещество, имеет зернистую структуру, является гомополимером α -глюкозы. Гликоген иногда называют животным крахмалом, так как его строение похоже на амилопектин. Отличается от крахмала более разветвлённой и компактной структурой, не дает синего цвета при окраске йодом.

В клетках микроорганизмов гликоген равномерно разбросан по цитоплазме клетки в виде гранул диаметром 20-100 нм, их обычно можно увидеть только через электронный микроскоп. Часто встречается гликоген в клетках животных, большинства грибов, многих бактерий и архей, некоторых водорослей и простейших.

Если клетка содержит много гликогена она становится *красно-коричневой* при окрашивании раствором йода.

Выполнение работы. Окраска гликогена производится на культуре дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В образующихся (растущих) почках гликогена практически нет, поскольку углеводы расходуются в процессе активного метаболизма и гликоген не запасается. В материнских клетках окраска гликогена интенсивна.

Окраска гликогена производится на культуре дрожжей, из которой готовят препарат «раздавленная капля».

1. На предметное стекло помещаем каплю микробной жидкости.
2. Добавляем одну каплю раствора Люголя.
3. Накрываем покровным стеклом, избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой.
4. На покровное стекло капаем каплю иммерсионного масла.
5. Исследуем под микроскопом, используя иммерсионный объектив.

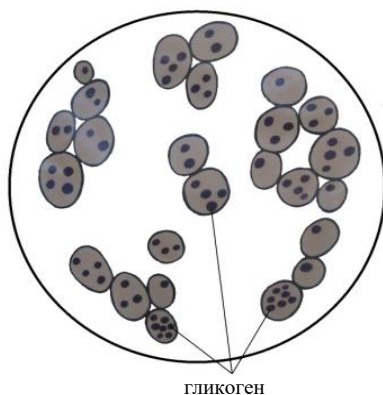


Рисунок 11 – Хлебные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

Протопласт дрожжей окрашивается в светло-желтый цвет, а зерна гликогена – в ярко-желтый или коричнево-желтый в зависимости от степени его накопления.

Зарисовывают клетки хлебных (пекарских) дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) с гликогеном в тетради цветными карандашами и дают пояснения.

Материалы и оборудование: жидкая культура дрожжей в пробирках, крепкий раствор Люголя, желтый и коричневый карандаши.

Контрольные вопросы

1. Что такое гликоген?
2. В какой цвет окрашен протопласт клетки, а в какой гликоген?
3. Какие микроорганизмы накапливают много гликогена?
4. Расскажите методику выявления гликогена.

Работа 6. Окраска гранулы

Гранула – углевод, крахмалоподобное вещество, выявляется качественной реакцией со слабым раствором йода (клетки темно-синего цвета).

Встречается в виде включений только у прокариот, является специфическим запасным веществом бактерий рода *Clostridium* (клостридий), где накапливается в значительном количестве.

Многие включения являются запасными веществами, отложение которых клеткой происходит в условиях избытка питательных веществ в окружающей среде, а потребление наблюдается, когда организм попадает в условия голодания.

Существуют бактерии, запасющие одно вещество, два или целый ряд соединений. Природа запасаемого субстрата определяется видом бактерий и условиями их культивирования. Обычно накопление полисахаридных гранул стимулируется недостатком азота при избытке углеводов.

Выполнение работы. Окраска гранулы проводится на культуре маслянокислых бацилл *Clostridium pasteurianum*, из которой готовят препарат «раздавленная капля».

1. Петлей берем микроорганизмы на стенке в нижней части пробирки с безазотистой средой Виноградского и переносим каплю жидкости на предметное стекло.

2. Добавляем одну каплю крепкого раствора Люголя.

3. Накрываем покровным стеклом.

4. На покровное стекло капаем каплю иммерсионного масла.

5. Исследуем под микроскопом, используя иммерсионный объектив.

При просмотре обращают внимание на крупные, подвижные палочки, которые под действием йода постепенно замедляют движение и останавливаются. Йод проникает внутрь клеток и окрашивает гранулу в сине-фиолетовый цвет (характерная качественная реакция йода на растительный крахмал). На фоне окрашенной части клеток отчетливо выделяется неокрашенная или слегка желтоватая спора.

Зарисовывают клетки маслянокислых бацилл *Clostridium pasteurianum* с гранулезой в тетради цветными карандашами и дают пояснения.



Рисунок 9 – *Clostridium pasteurianum*.

Материалы и оборудование: жидкая культура *Clostridium pasteurianum* в пробирках, крепкий раствор Люголя (KI + I₂), покровные стекла, фиолетовый карандаш.

Контрольные вопросы

1. Что такое гранулеза?
2. Для чего накапливается гранулеза в клетках микроорганизмов?
3. Что является качественной реакцией для гранулезы?

Работа 7. Окраска жира

Жиры – органические вещества, сложные эфиры высших карбоновых кислот и ряда спиртов (глицерол). В живых организмах они выполняют, прежде всего, структурную и энергетическую функции: они являются основным компонентом клеточной мембраны и в них сохраняется энергетический запас клетки.

Жир содержится в клетках практически всех видов микроорганизмов, особенно много его накапливается при старении культуры, его количество может достигать у некоторых микробов 50% к сухой массе.

Выполнение работы. Окраска жира проводится на старой культуре дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

1. На предметное стекло наносят небольшую каплю 40%-ного раствора формалина.

2. Бактериальной петлей в нее вносят культуру микроорганизма. Формалин убивает клетки и разрыхляет их оболочки.

3. Через 5 мин в эту же каплю добавляют небольшую каплю метиленового синего, а спустя 10 мин – каплю судана III (растворимого в жире красителя, индикатора жироподобных веществ).

4. Образовавшуюся общую каплю накрывают покровным стеклом, удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой и микроскопируют препарат с иммерсией.

Цитоплазма клеток окрашивается в синий цвет, включения жира – в розово-оранжевый.

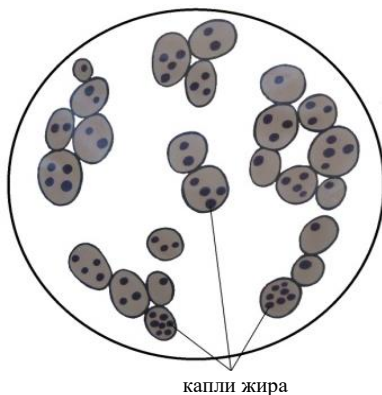


Рисунок 11 – Хлебные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

Многие гранулы, окрашивающиеся Суданом III или Суданом черным В (0,3%-ным раствором в 70%-ном этиленовом спирте), состоят из поли-β-оксимасляной кислоты. Для выявления поли-β-оксимасляной кислоты готовят препарат клеток 24-часовой культуры.

Мазок подсушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки, окрашивают Суданом черным 5–15 мин (краситель может при этом высохнуть, но это не имеет значения). Затем краситель смывают, препарат подсушивают фильтровальной бумагой и обрабатывают ксилолом, несколько раз погружая в него стекло. Время обесцвечивания не должно превышать 1 мин. Дополнительное окрашивание препарата проводят 0,5%-ным водным раствором сафранина в течение 5–10с. Включения поли-β-оксимасляной кислоты выглядят как черно-синие гранулы в розовой цитоплазме клеток.

Материалы и оборудование: жидкая культура дрожжей в пробирках, 40%-й раствор формалина, метиленовый синий, судан III, синий и оранжевый или розовый карандаши.

Контрольные вопросы

1. Для чего жиры клеткам микроорганизмов?
2. В какой цвет окрашен протопласт клетки, а в какой капли жира?
3. Какие микроорганизмы накапливают много жира?
4. Расскажите методику выявления жира.

Работа 8. Окраска спор у бактерий (по методу Циля-Нильсена)

Некоторые бактерии могут образовывать споры, которая обладает высокой устойчивостью к неблагоприятным условиям внешней среды и выполняют защитную функцию. В одной клетке образуется одна спора округлой формы. Споры формируют палочковидные бактерии, которые называется бациллы.

Спора покрыта плотной и многослойной оболочкой, содержит мало свободной воды, много липидов и термоустойчивых соединений. Спора кислотоустойчива и плохо окрашивается красителями. Для того, чтобы увеличить проницаемость споры, в краситель добавляют протравитель (карболовую кислоту) и окраску производят при нагревании. Спора красится труднее, чем вегетативная часть клетки, но и медленнее обесцвечивается в кислотах. Поэтому, если после окрашивания поместить препарат в серную кислоту на определенное время, можно добиться того, что спора останется окрашенной, а вегетативная часть клетки быстро обесцветится. Затем вегетативную клетку легко можно покрасить в контрастный по цвету краситель, чтобы спора и вегетативная часть клетки были окрашены в разные цвета, тогда расположение спор в клетках будет хорошо различимо.

Расположение спор в клетке и внешний вид клетки со спорой – видовой признак. Форма спор – округлая или овальная. Они могут быть расположены в центре (центральное положение), смещены ближе к одному из концов клетки (промежуточное, или субтерминальное положение) и находиться на одном из ее концов (концевое, или терминальное положение).

По внешнему виду клетки со спорой различают следующие спорообразования:

1. Бацилярное – спора не меняет внешнего вида клетки, так как ее диаметр меньше диаметра вегетативной части клетки;

2. Клостридиальное – диаметр споры больше диаметра вегетативной части и клетка расширена в месте нахождения споры, при этом клетка имеет вид веретена или лимона;

3. Плектридиальное – спора находится на конце клетки, ее диаметр больше диаметра клетки, а вегетативная часть при этом внешнего вида не меняет. Клетка со спорой имеет вид теннисной ракетки.

Выполнение работы. Для знакомства с особенностями спорообразования у бактерий выделяют культуры трех видов, которые условно обозначают: спора №1, №2 и №3. В работе используют следующий микробный материал:

Спора № 1 – спорообразование центральное, бациллярное (*Bacillus mycoides*);

Спора № 2 – спорообразование субтерминальное, клостридиальное (*Clostridium butyricum* или *Clostridium pasteurianum*);

Спора № 3 – спорообразование терминальное, плектридиальное (*Clostridium pectinovorum*).

Готовят из этого микробного материала препараты-мазки. Мазок фиксируют в пламени дольше обычного (проводят стекло в язычке пламени раз десять), чтобы убить термоустойчивые споры.

Окраска спор заключается в следующем:

1. На фиксированный мазок накладывают кусочек фильтровальной бумаги и обильно смачивают ее карболовым фуксином Циля. Препарат подогревают, держа высоко над пламенем, до появления паров, но не доводят до кипения краски на стекле. Когда бумажка подсохнет, подливают новую порцию красителя и опять подогревают. Эту процедуру проводят 3–4 раза, после чего бумажку выбрасывают.

2. Погружают препарат с помощью пинцета в стаканчик с 1 %-ным раствором серной кислоты на несколько секунд для обесцвечивания вегетативной части клетки.

3. Препарат после обработки кислотой тщательно промывают водой.

4. Подкрашивают клетки метиленовым синим 1–2 мин.

5. Промывают водой.

6. Просушивают препарат фильтровальной бумагой и исследуют под микроскопом с иммерсией.

Споры окрашиваются в розовый цвет фуксином, а вегетативная часть клеток – в голубой цвет метиленовым синим.

Зарисовывают в тетради цветными карандашами бациллы с различным расположением спор и спорообразованием и дают пояснения к рисункам.

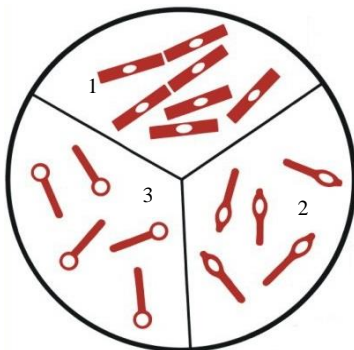


Рисунок 10 – **Спорообразования**
1 – бацилярное; 2 – клостридиальное; 3 – плектридиальное

Материалы и оборудование: культуры споровых форм бактерий в пробирках, фильтровальные бумажки размером 2 × 3 см, карболовый фуксин Циля, метиленовый синий, стаканчики с 1%-ной H_2SO_4 , пинцеты, красные и синие карандаши.

Контрольные вопросы

1. Сколько спор образуется в бактериальной клетке?
2. Какую функцию выполняет спора?
3. Почему спора обладает высокой устойчивостью к температуре по сравнению с вегетативной формой бактерий?
4. Какое расположение спор бывает в бактериальной клетке?
5. Опишите окраску спор по методу Циля-Нильсена.

Работа 9. Исследование актиномицетов

Актиномицеты (от лат. *actis* – луч и *myses* – гриб) – микроорганизмы, обладающие одновременно признаками бактерий и грибов. В систематике их относят к грамположительным бактериям. Как и бактерии они прокариоты (не имеют дифференцированного ядра), на питательных средах образуют колонии, подобные бактериальным. Как и грибы они образуют мицелий, хотя гораздо тоньше, и способны размножаться спорами.

Мицелий у актиномицетов может быть двух видов: субстратный (погружен в питательную среду и выполняет функции питания) и воздушный (находится над питательной средой, на нем формируются споры и он выполняет функцию размножения, придает колонии лучистый вид).

Актиномицеты широко распространены в почве и придают ей специфический землистый запах. Они чаще аэробы, мезофилы, нейтрофилы.

К высшим актиномицетам относят стрептомицеты, проактиномицеты, микромоноспоры, франки.

Стрептомицеты имеют два вида мицелия. Субстратный просматривается в виде тонких разветвленных нитей, воздушный образует споры.

У проактиномицетов (нокардий) воздушный мицелий отсутствует или слабо развит, а субстратный выполняет функции и питания, и размножения. Он хорошо виден в виде длинных и коротких нитей, которые на определенных стадиях расчлняются на палочковидные фрагменты, в дальнейшем переходящие в палочки, которые затем становятся спорами, из которых потом вновь образуется мицелий.

У микромоноспоры мицелий тоже только субстратный, на гифах которого образуется по одной споре, дающей затем начало новому мицелию.

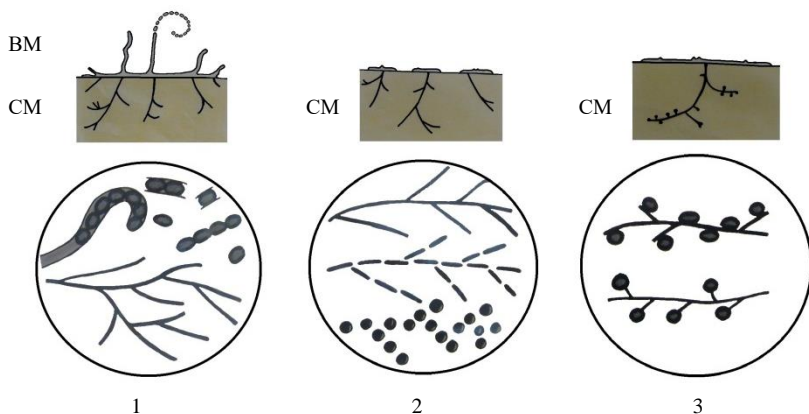


Рисунок 12 – **Высшие актиномицеты**

1 – стрептомицеты; 2 – проактиномицеты; 3 – микромоноспора.

BM – воздушный мицелий; CM – субстратный мицелий.

К низшим актиномицетам относят микобактерии и микрококки, у которых мицелий находится в зачаточном состоянии.

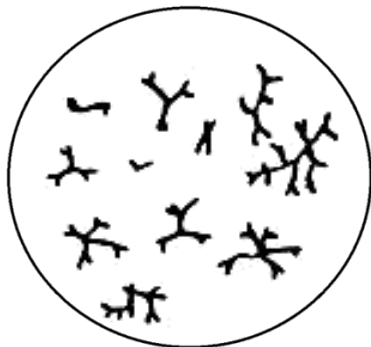


Рисунок 13 – Микобактерии

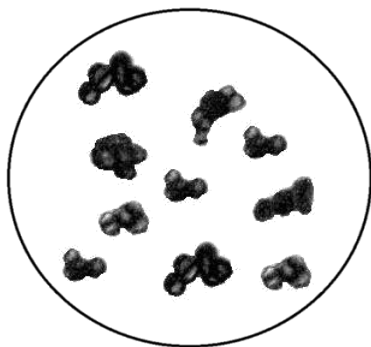


Рисунок 14 – Микрококки

Значение актиномицетов в природе и жизни человека:

1. Участвуют в минерализации органических веществ.
2. Участвуют в образовании и разложении гумуса (нокардии).
3. Синтезируют большое количество антибиотиков (стрептомицин, левомицетин, тетрациклин и др.)
4. Вызывают заболевания (туберкулез, проказа, актиномикозы).
5. Фиксируют молекулярный азот атмосферы (франки).

Актиномицеты выращивают на питательной среде Чапека или крахмало-аммиачном агаре. Колонии актиномицетов обычно не крупные, разноцветные (розовые, желтые, коричневые, красные, черные, белые), плотные, кожистые, пушистые, тестообразные, срастающиеся с субстратом.

Выполнение работы. Колонии актиномицетов извлекают со средой с помощью бактериологической петли или препаровальных игл и кладут на обезжиренное предметное стекло. Размазывают петлей или другим стеклом. Фиксируют в пламени. Окрашивают 30–60 с кристалльвиолетом. Рассматривают с помощью иммерсионной системы микроскопа.

Зарисовывают в тетради стрептомицеты, проактиномицеты, микромоноспоры. Отмечают виды мицелия, споры.

Материалы и оборудование: культуры актиномицетов в чашках Петри, препаровальные иглы, кристалльвиолет.

Контрольные вопросы

1. Чем похожи актиномицеты на бактерии?

2. Чем похожи актиномицеты на грибы?
3. Чем отличаются высшие актиномицеты от низших?
4. Какие колонии на питательной среде образуют актиномицеты?
5. Какую функцию выполняет воздушный и субстратный мицелий?
6. Какое значение имеют актиномицеты?

Работа 10. Исследование микроорганизмов в живом виде

Для наблюдения за движением, питанием, размножением, действием различных веществ на микроорганизмы необходимо исследовать живые клетки. Для этого готовят нефиксированные и неокрашенные препараты двумя способами: «раздавленной» и «висячей» капли.

Выполнение работы.

Готовят препарат «висячая капля» из навозной жижи (рис. 15).

1. Для приготовления этого препарата необходимо предметное стекло с углублением (лункой) в центре.
2. Каплю жидкой культуры наносят на покровное стекло.
3. Смазывают края покровного стекла вазелином, накрывают предметным стеклом выемкой вниз, чтобы она накрывала каплю. Благодаря вазелину предметное и покровное стекла склеиваются.
4. Переворачивают препарат, чтобы капля свободно свисала в углублении, не касаясь стенок или дна.

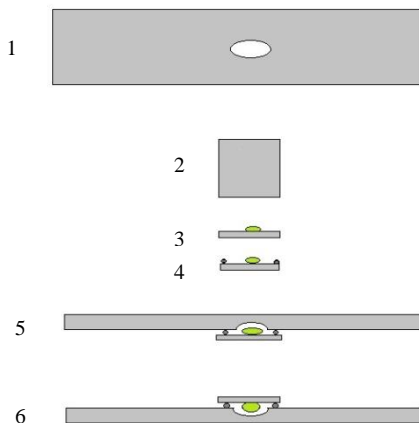


Рисунок 15 – Схема приготовления препарата «висячая капля»

1 – предметное стекло с углублением; 2 – покровное стекло; 3 – капля масла на покровном стекле; 4 – края покровного стекла, смазанные вазелином; 5-6 – готовый препарат.

Этот препарат имеет то преимущество, что микробы совершенно не травмируются и препарат не высыхает длительное время.

Для исследования препарата на покровное стекло наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают иммерсионным объективом. Просмотр ведут при сниженном конденсоре или закрытой диафрагме, чтобы неокрашенные препараты не были совершенно прозрачными, свет должен быть рассеянным.

При просмотре обращают внимание на форму, размеры, способность клеток к движению. Определяют к какой группе микробов они относятся (бактерии, простейшие, плесневые грибы).

Зарисовывают в тетради, подписывают и отмечают направление движения микроорганизмов навозной жижи.

Материалы и оборудование: навозная жижа, стекла с выемкой, покровные стекла, баночки с вазелином.

Контрольные вопросы

1. В чем преимущество препарата «висячая капля»?
2. Для чего используют исследование микроорганизмов в живом виде?
3. Расскажите методику приготовления препарата «висячая капля».

Работа 11. Исследование микроскопических мицелиальных грибов (плесневых грибов)

Грибы относятся к эукариотам, они характеризуются наличием толстой твердой клеточной стенки, в состав которой входит хитин, отсутствием хлорофилла, гетеротрофным типом питания, отсутствием подвижности, интенсивным ростом в течение всей жизни, поглощением пищи путем всасывания.

Микроскопические мицелиальные грибы (плесень) образуют на питательных средах пушистый налет различной окраски. Состоят из мицелия (грибницы). Мицелий – это совокупность ветвящихся гиф (нитей). Грибы, имеющие несептированный (без перегородок) одноклеточный мицелий, называются низшими. У высших грибов мицелий многоклеточный.

Размножаются мицелиальные грибы бесполым и половым путем. Наиболее распространенный способ размножения грибов – размножение спорами, которые образуются на специализированных органах. У низших грибов (мукор) споры образуются в спорангиях и их называют

эндоспорами, у высших (пеницилл, аспергилл) – открыто на гифах или мицелии и называются экзоспорами или конидиями.

Бесполое размножение осуществляется также фрагментами мицелия. Грибы, способные к половому размножению, относятся к совершенным, неспособные – к несовершенным.

Плесневые грибы аэробы, психрофилы, кислотоустойчивые, предпочитают высокую влажность.

Значение плесеней в природе и жизни человека:

1. Участвуют в минерализации органических веществ.
2. Вызывают порчу продуктов, зданий, сооружений.
3. Синтезируют антибиотики (пеницилин) и другие лекарственные средства.
4. Вызывают заболевания растений (фузариоз), человека и животных (аспергиллез).
5. Используются для получения органических кислот (лимонная).
6. Используются в производстве некоторых сортов сыра (бри, рокфор, камамбер).

Выполнение работы.

В живом виде исследуют плесневые грибы, которые образуют налет (пушок) на поверхности различных субстратов, например хлеба. Плесени состоят из разветвленных гифов, составляющих мицелий. Они достаточно крупные, чтобы их можно было рассматривать даже при малом увеличении, кроме того, плохо красятся.

Исследуют плесневый гриб мукор (головчатая плесень) *Mucor mucedo*, для этого препаровальными иглами берут кусочек мицелия и переносят на предметное стекло. Рассматривают при увеличении 10×4 или 10×10 .

Зарисовывают одноклеточный мицелий, спорангиеносцы, спорангии, споры и подписывают их.

Исследуют культуру плесневого гриба пенициллиума (кистевика) *Penicillium glaucum*, для этого препаровальными иглами извлекают кусочки мицелия на границе между зеленым и белым участками колонии и переносят на предметное стекло. Рассматривают при увеличении 10×4 или 10×10 .

Зарисовывают многоклеточный мицелий, конидиеносцы и конидии в тетради и подписывают их.

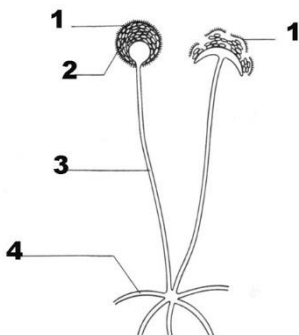


Рисунок 16 – Головчатая плесень
(*Mucor mucedo*)

1 – эндоспоры; 2 – спорангий; 3 – спорангиеносцы; 4 – одноклеточный мицелий.

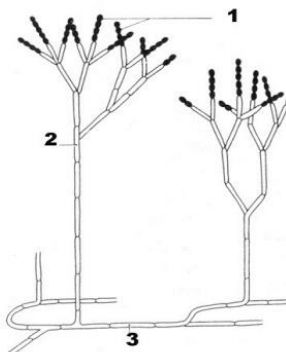


Рисунок 17 – Кистевик
(*Penicillium glaucum*)

1 – конидии (экзоспоры); 2 – конидиеносцы; 3 – многоклеточный мицелий.

Материалы и оборудование: культуры плесневых грибов на хлебе, препаровальные иглы, цветные карандаши (черный, зеленый).

Контрольные вопросы

1. Дайте характеристику плесневым грибам.
2. Какие плесневые грибы вы знаете?
3. Назовите плесневые грибы у которых мицелий одноклеточный и многоклеточный.
4. Какое значение плесневых грибов в природе и жизни человека?

Раздел 2. ПИТАНИЕ МИКРООРАГНИЗМОВ

Работа 12. Питательные среды для микроорганизмов

Для выращивания микроорганизмов в лабораторных условиях, а также для изучения их физиологических свойств пользуются питательными средами.

Выполнение работы. Ознакомьтесь с принципами классификации питательных сред и приготовлением основных питательных сред для выращивания микроорганизмов (МПБ, МПА).

Классификация питательных сред

По химическому составу питательные среды подразделяются на естественные, искусственные и синтетические. К естественным средам относятся почва, молоко, мясо и др. Искусственные среды готовят из естественных с добавлением химических веществ. Они могут быть животного (МПБ, МПА) и растительного (пивное сусло, картофельный агар) происхождения. Синтетические среды готовят по рецепту, их состав точно известен (среда Эшби, Чапека, Омелянского и др.).

По физическому состоянию, или консистенции, питательные среды делятся на жидкие и твердые (плотные). В жидких средах (МПБ, ПВ, молоко) накапливают и выявляют физиолого-биохимические особенности микроорганизмов, но их трудно выделить. Плотные среды готовят из жидких, добавляя к ним 1,5–2 % агар-агара или 10 % желатина. Их используют для выделения чистых культур, количественного учета и диагностики микрофлоры. Реже используют полужидкие (с 0,1–0,2 % агар-агара) и сыпучие среды.

По назначению питательные среды могут быть общего назначения, на которых может развиваться большое количество микроорганизмов (почва, МПБ, МПА и др.), и селективные (избирательные, от лат. *electus* – избираю), подходящие для одного вида микроорганизмов. Впервые селективные среды были предложены С.Н. Виноградским – безазотистая среда для азотфиксаторов и без органического углерода для автотрофных нитрифицирующих бактерий.

Приготовление ряда питательных сред

Мясопептонный бульон (МПБ) – среда искусственная, жидкая, общего назначения. Для ее приготовления используют мясо – говядину, телятину, конину и др. Из мяса получают фарш, заливают его холодной водопроводной водой (на 1 кг фарша 2 л воды), настаивают при температуре 5–7 °С 18–24 ч для выделения экстрактивных веществ. Затем мясной настой кипятят 15–30 мин, охлаждают и фильтруют через полотно. К 1 л полученного бульона добавляют 5 г NaCl и 10 г пептона. Сухой пептон представляет собой желтый липкий порошок – продукт неполного распада белков. Соль и пептон растворяют при нагревании, доводят щелочью pH до 7,2–7,4 (слабощелочная реакция среды благоприятна для большинства микроорганизмов). Среду разливают в колбы и стерилизуют в автоклаве. Используют для приготовления МПА и МПЖ, для накопительной культуры аммонифицирующих бактерий.

Мясопептонный агар (МПА) – среда искусственная, твердая, общего назначения. Представляет собой плотную студнеобразную массу.

Эта питательная среда широко применяется в лабораторной практике для выращивания микроорганизмов. Для ее приготовления используют сухой агар-агар (по малайски агар-агар – желе) – полисахарид с низким содержанием азотистых веществ и не представляющий питательной ценности для микроорганизмов. Агар-агар имеет вид серых листовидных пластинок. Добывается он из морских водорослей багрянок. Это отличное гелеобразующее вещество, которое обладает способностью набухать и растворяться при нагревании, а после застывания образовывать плотную студенистую массу. Для приготовления этой среды к 1 л МПБ добавляют 15–20 г агар-агара. Замачивают несколько часов для набухания агара, кипятят на слабом огне до полного его растворения, после этого доводят объем жидкости до первоначального дистиллированной водой, фильтруют через марлевый фильтр, смоченный предварительно горячей водой. Среду в горячем виде разливают в стеклянные колбы и стерилизуют в автоклаве. Готовый МПА имеет точку плавления 96–100 °С и температуру застывания около 40 °С, т. е. при комнатной температуре он всегда представляет собой твердую питательную среду. Используют для количественного анализа микрофлоры воздуха и почвы.

Мясопептонный желатин (МПЖ) – среда искусственная, твердая, общего назначения. Это плотная питательная среда, для приготовления которой используют сухой желатин. Желатин – вещество белковой природы, кислый азотсодержащий продукт, добываемый путем вываривания костей, хрящей. Для приготовления МПЖ к 1 л МПБ добавляют 100–150 г желатина, настаивают несколько часов для набухания желатина и затем нагревают до его полного растворения. Используют щелочь для доведения реакции среды до слабощелочной. Фильтруют горячую среду через складчатый бумажный фильтр, разливают в колбы и стерилизуют дробно текучим паром в аппарате Коха. Применение МПЖ ограничено в связи с тем, что он разжижается под действием протеолитических ферментов, выделяемых многими микроорганизмами. Кроме того, образуемый желатином гель плавится уже при 23–25 °С и застывает при 20 °С и ниже, а большинство микробов развивается при 30–37 °С. Используют для выявления культуральных и биохимических признаков идентифицируемых микроорганизмов.

Крахмало-аммиачный агар (КАА) – среда синтетическая, твердая, элективная. Имеет следующий состав: крахмал – 10 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2 г, K_2HPO_4 – 1 г, MgSO_4 – 1 г, CaCO_3 – 3 г, агар-агар – 20 г, вода дистиллированная – 1000 мл. Агар растворяют в 300 мл воды. Отдельно растворяют крахмал в 100 мл воды. В остальных 600 мл воды растворяют соли,

нагревают до кипения и в кипящий раствор при непрерывном помешивании вливают крахмал, затем добавляют воду с агаром и стерилизуют в автоклаве. Используют для выращивания актиномицетов.

Среда Чапека – среда синтетическая, твердая, элективная. Имеет следующий состав: глюкоза – 14,0 г, CaCO_3 – 0,7 г, KNO_3 – 0,7 г, MgSO_4 – 0,35 г, NaCl – 0,35 г, K_2HPO_4 – 0,35 г, FeSO_4 – следы; агар-агар – 20,0 г, вода дистиллированная – 1000 мл. Агар отдельно растворяют в 300 мл воды. Затем всю смесь кипятят, разливают в колбы и стерилизуют в автоклаве. Используют для выращивания актиномицетов.

Среда Эндо – среда синтетическая, твердая, элективная. Имеет следующий состав: пептон – 10 г, лактоза – 10 г, K_2HPO_4 – 3,5 г, NaHSO_3 – 2,5 г, агар-агар – 15,0 г, вода дистиллированная – 1000 мл. К среде добавляют 4 мл 10 %-ного спиртового раствора основного фуксина, поэтому она окрашивается в розово-кремовый цвет. Среду стерилизуют в автоклаве и сохраняют в темноте. Используют для выращивания кишечной палочки. Бактерии из рода *Escherichia* на этой среде образуют маляные колонии с металлическим блеском.

Пептонная вода – среда искусственная, жидкая, элективная. Для ее приготовления к 1 л воды добавляют 40 г пептона и 5 г NaCl , растворяют при нагревании, фильтруют, разливают в колбы и автоклавируют. Используют для выращивания аммонифицирующих (гнилостных) бактерий.

Полужидкий агар – среда синтетическая, полужидкая, общего назначения. Для ее приготовления 0,1 г агар-агара растворяют в 100 мл воды при кипячении, фильтруют и автоклавируют. Используют для прямого подсчета числа микроорганизмов в почве по Виноградскому.

Многие питательные среды (среда Эндо, сухой питательный агар, питательный бульон и др.) изготавливаются промышленным способом в виде сухих порошков. В лаборатории их доводят до готовности по рецепту, указанному на этикетке.

Материалы и оборудование: колбы с мясопептонным бульоном, мясопептонным агаром, средой Чапека или КАА для актиномицетов, средой Эшби для азотобактера, средой Омелянского для целлюлозоразлагающих бацилл и др.; сухой пептон, агар-агар и желатин в баночках.

Контрольные вопросы

1. Дайте классификацию питательным средам.
2. Какие среды называются элективными? Приведите примеры.
3. Как приготовить питательные среды МПА и МПБ?

Работа 13. Техника посева микроорганизмов

Посев микроорганизмов подразумевает внесение клеток или материала, содержащего клетки, в (или на) питательную среду для последующего культивирования. Иначе эта процедура называется *инокуляцией*, а сам посевной материал – *инокулюм*.

Методы посева значительно различаются в зависимости от консистенции среды, подлежащей инокуляции.

Выполнение работы. Ознакомьтесь с основными методами посева и культивирования микроорганизмов

Посев в жидкие питательные среды

В стерильную пробирку или другую емкость, предназначенную для посева, вносят нужный объем питательной среды. Для этого в правой руке зажимают стерильную пипетку, левой рукой берут колбу со средой, вынимают из нее пробку и отбирают пипеткой нужный объем среды. Переносят требуемый объем среды в пробирку.

Все манипуляции совершают над пламенем горелки, каждый раз, открывая и закрывая емкость со средой, обжигают ее горлышко в пламени, действуют быстро, пробку не кладут на стол.

Обычно для пересева клеток с плотной среды пользуются бактериологической петлей, а из жидкой среды – пипеткой или петлей. Отбор клеток микроорганизмов петлей проводят следующим образом:

1. Стерилизуют петлю прокаливанием, держа ее в правой руке.
 2. В левую руку берут чашку Петри таким образом, чтобы поверхность среды была хорошо видна.
 3. Приоткрывают чашку, вводят в нее петлю, охлаждают, дотронувшись до свободной от микроорганизмов части среды.
 4. Захватывают небольшое количество микробной массы, например одну изолированную колонию;
 5. Вынимают петлю из чашки, которую тут же закрывают.
 6. Открывают подготовленную пробирку со средой, как описано выше, аккуратно вводят в нее петлю с биомассой, стараясь не дотрагиваться до стенок пробирки.
 7. Несколько раз взбалтывают суспензию, чтобы смыть в среду микробную массу.
 8. Закрывают пробирку и ставят в штатив.
- Остатки клеток на бактериологической петле сжигают в пламени.

Если микроорганизмы пересевают из жидкой среды, можно воспользоваться бактериологической петлей, перенеся «зеркальце» суспензии в свежеприготовленную питательную среду. Однако чаще для этих целей используют пипетки.

Посев в плотную скошенную среду

Чтобы получить в пробирке поверхность плотной скошенной среды, на которую будет производиться засев, следует расплавить среду в водяной бане (агаризованную – при температуре кипения воды) или микроволновой печи, слегка остудить и залить в пробирку в количестве 7–9 мл. Сразу после этого необходимо положить пробирку со средой в штатив-скашиватель, выбрав такой угол наклона, который обеспечит получение наибольшей площади поверхности скошенной среды. При этом нужно следить за тем, чтобы верхний уровень среды не касался пробирки.

После застывания среды можно производить посев. Для этого стерильной бактериологической петлей отбирают небольшое количество микробной массы, открывают пробирку со скошенной средой, вводят петлю до самого дна пробирки, а затем совершают петлей зигзагообразные движения по поверхности среды, двигаясь от дна к горлышку пробирки. Поскольку на скошенную среду обычно засевают микроорганизмы для хранения или для последующей инокуляции жидких сред, стараются получить как можно больше биомассы. Для этого штрихи располагают густо, на минимальном расстоянии друг от друга, используя всю площадь поверхности.

Посев петлей на поверхность плотной среды в чашке Петри.

Бактериологической петлей на поверхности плотной среды можно посеять микроорганизмы двумя методами: обычным и истощающим штрихом. В первом случае клетки будут располагаться скученно и изолированные колонии, скорее всего не образуются. Метод истощающего штриха используют как раз для того, чтобы получить изолированные (располагающиеся отдельно друг от друга) колонии. В обоих случаях вначале требуется залить питательную среду в чашки Петри.

Стерильную среду плавят на водяной бане или микроволновой печи, слегка остужают и разливают в чашки Петри по 15–20 мл. Накрывают чашки стерильными бумажными фильтрами и подсушивают при комнатной температуре в течение 30–40 мин. Затем фильтры снимают и закрывают доньшки со средой стеклянными крышками. Подсушить агаризованную среду можно также в термостате или сушильном шкафу

при температуре 40–60°C, если оставить их открытыми на 15–20 мин, поверхность среды должна быть обращена вниз.

После посева чашки Петри перемещают в термостат *вверх доньшиками* (ставят на крышки), чтобы конденсат, образующийся на крышках в процессе инкубирования, не попадал на поверхность среды и не размывал посевы.

Посев штрихом. Стерильной и охлажденной бактериологической петлей захватывают небольшое количество клеточной массы с плотной среды или окунают ее в суспензию микроорганизмов. Проводят зигзагообразные линии по поверхности свежеприготовленной питательной среды в чашке Петри. Обычно посев штрихом осуществляют для хранения микроорганизмов, поэтому витки «спирали» располагают близко друг к другу, а в целях экономии среды посев каждого штамма производят на один из 4–8 секторов, границы которых размечают стеклоглафом на доньшке с внешней стороны.

Посев истоцающим штрихом. Этот метод отличается от предыдущего лишь тем, что на поверхность плотной среды наносят несколько серий штрихов и перед каждой из них бактериологическую петлю стерилизуют. В результате удается разобщить клетки, обеспечив получение изолированных колоний.

Посев шпателем на поверхность плотной среды в чашке Петри (метод Коха)

Микробиологический шпатель используется для распределения клеток по поверхности плотной среды в чашках Петри. В этом случае инокулюм представляет собой суспензию микроорганизмов. Обычно на поверхность среды в чашке наносят 0,1 мл суспензии с помощью пипетки. Совершая круговые («растирающие») движения шпателем, добиваются того, что суспензия равномерно распределяется по всей площади среды, жидкость впитывается в ее толщу, а клетки остаются прикрепленными к поверхности. Если суспензия была концентрированной (более 10^5 клеток/мл), клетки будут располагаться в непосредственной близости друг к другу и после инкубирования будет наблюдаться сплошной рост, или *газон* клеток. В то же время с помощью шпателя можно получить изолированные колонии. Для этого следует либо развести высеваемую суспензию до концентрации $\sim 10^3$ клеток/мл, либо произвести высев неразведенной суспензии на среду в трех чашках Петри.

Глубинный посев

Изолированные колонии микроаэрофильных и факультативно анаэробных микроорганизмов чаще получают методом глубинного посева. Для этого предварительно разливают в пробирки по 15–20 мл плотную питательную среду плавят, а затем остужают до 45–46°C. Если непосредственно перед использованием расплавленную среду из флакона разливали в пробирки, необходимо вначале поместить их в кипящую водяную баню на 10–15 мин, чтобы расплавились невидимые глазу комочки агара, которые образуются при соприкосновении агаризованной среды с холодными стенками пробирки, и только после этого поместить среду для остужения.

В охлажденную до 45–46°C среду вносят 1 мл разведенной суспензии микроорганизмов, содержащей $\sim 10^2$ клеток/мл, быстро перемешивают вращением пробирки в ладонях (не допуская образования пузырьков воздуха) и выливают в стерильную чашку Петри. Все манипуляции с охлажденным до 45°C агаром не должны занимать много времени, поскольку агаризованные среды застывают около 42°C. Закрывают чашку, дожидаются застывания среды и помещают в термостат вверх доннышком.

Материалы и оборудование: изолированные колонии бактерий на МПА, стерильные: чашки Петри с МПА, пробирки, пипетки, шпатели.

Контрольные вопросы

1. Что понимают под посевом микроорганизмов?
2. Как называется посевной материал в микробиологии?
3. Как проводят посев в жидкие питательные среды?
4. Чем отличается посев истощающим штрихом от посева штрихом?
5. Для чего используют микробиологический шпатель?

Раздел 3. МИКРОБЫ И ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА

Работа 14. Стерилизация

Стерилизация (от лат. *sterilis* – бесплодный) – это уничтожение микроорганизмов в различных объектах путем воздействия на них губительными факторами.

В зависимости от того, с помощью каких факторов убивают микроорганизмы, все методы стерилизации условно разделяют на термические и холодные.

Выполнение работы. Знакомятся со способами термической и холодной стерилизации.

Термическая стерилизация

Термическая (горячая) стерилизация основана на уничтожении микробов с помощью высоких температур. Это легко выполняется и широко используется в практической деятельности человека. При этом нужно помнить, что у вегетативных (неспоровых) клеток денатурация белков и гибель клеток начинается уже при температуре 56–60 °С. Более термоустойчивые споры погибают в сухой атмосфере при температуре 160 °С в течение 1–2 ч, а во влажной среде гибель происходит при температуре 112–120 °С в течение 20–30 мин.

Существуют следующие *способы термической стерилизации*:

1. Фламирование (от лат. *flamma* – пламя и франц. *flambé* – гореть) – стерилизация путем прокалывания в пламени мелких металлических или стеклянных предметов. Таким способом стерилизуют бактериологические петли, стеклянные шпатели и трубочки, предметные стекла и др. Температура пламени около 1000 °С. При прокалывании сгорают все микроорганизмы (вегетативные и споровые формы). Это быстрый и надежный способ стерилизации.

2. Обжиг проводится в пламени, стерилизуемые предметы предварительно обрабатывают спиртом. Таким способом стерилизуют небольшие металлические или стеклянные предметы (ножницы, металлические пинцеты и др.).

3. Кипячение. Является одним из самых простых способов стерилизации. Проводится в стерилизаторе – металлической прямоугольной коробке с крышкой и сеткой на дне для укладывания стерилизуемых предметов. Наливают в него воду и нагревают до кипения (нагрев электрический или на огне). Кипячение может длиться от 15–30 мин до 2 ч при температуре около 100 °С. Стерилизуют мелкие металлические или стеклянные предметы – шприцы, иглы, стеклянные трубки и др. При этом погибают вегетативные формы микроорганизмов и часть спор. Практикуют также ошпаривание кипятком стерилизуемого материала.

4. Стерилизация сухим жаром. Производится горячим воздухом в печи Пастера или сушильном шкафу. Печь Пастера представляет собой шкаф с двойными стенками, покрытый снаружи асбестом для теплоизоляции. Внутри шкафа устроены металлические полки с отверстиями, на которые помещают стерилизуемый материал. Нагрев электрический. Стерилизация проводится при температуре 160–180 °С в течение 1–2 ч

с момента достижения этих температур (контролируется по термометру). Стерилизуют сухим жаром, главным образом, стеклянную посуду – чашки Петри, пипетки, шпатели (обернутые в бумагу), а также пробирки, колбы. Этот прием является надежным, так как погибают неспоровые и споровые формы микроорганизмов. Обернутый в бумагу и простерилизованный материал можно хранить.

5. Стерилизация паром под давлением (автоклавирование). Проводится насыщенным водяным паром в автоклаве. Автоклавы бывают разной конструкции. Вертикальный автоклав представляет собой массивный двухстенный котел, окруженный снаружи металлическим кожухом, с тяжелой откидывающейся крышкой, плотно привинчивающейся к котлу болтами. В нижней части котла имеется воронка и кран, через которые наливается вода в свободное пространство между внутренним котлом и кожухом. На дно котла укладывают стерилизуемый материал, крышку плотно завинчивают, включают электрический нагрев. Когда вода закипает, пар проходит во внутренний котел. Давление в автоклаве поднимается, одновременно повышается температура. Когда манометр покажет, что давление в котле достигло заданной величины, отмечают время начала стерилизации. Давление поддерживается на определенном уровне с помощью предохранительного клапана.

Обычно в лабораторной практике стерилизация под давлением производится при 1,5–2 атм и температуре около 115–120 °С в течение 20–30 мин. По истечении времени стерилизации нагрев прекращают, открывают паровой клапан и спускают пар. Стерилизуют паром под давлением питательные среды МПБ, МПА, стеклянную посуду с водой, перевязочный материал, хирургические инструменты и др. Автоклавирование является быстрым и надежным способом стерилизации, при котором погибают все формы микроорганизмов, даже самые устойчивые споры.

6. Пастеризация. Этот прием частичной стерилизации назван в честь предложившего его французского ученого Л. Пастера. Способ заключается в том, что жидкость, налитую в стерильную посуду, прогревают на водяной бане при температуре 60–90 °С в течение 10–30 мин. Применяется для жидких сред, которые изменяют свои физико-химические свойства при высоких температурах. Пастеризуют молоко, сливки, вино, пиво, соки и др. При этом сохраняются витамины и вкусовые качества продуктов. Пастеризованные продукты длительному хранению не подлежат, так как при этом способе стерилизации погибают лишь ве-

гетативные формы микроорганизмов, а споры остаются. В лабораторной практике этим способом пользуются, главным образом, для отделения спорообразующих видов от неспорообразующих.

7. **Дробная стерилизация.** Основана на обработке стерилизуемого материала в несколько приемов. Дробным может быть кипячение или стерилизация текучим паром в аппарате Коха. Обычно стерилизацию проводят 3 дня по 30 мин ежедневно одним из указанных способов, а в перерывах оставляют среды при комнатной температуре. Это делается для провокации роста спор в вегетативные формы и их уничтожения при последующих обработках, что повышает надежность этих приемов.

8. **Тиндализация** – это разновидность дробной стерилизации (дробная пастеризация). Прием назван в честь предложившего его английского ученого Д. Тиндаля. Проводится в водяной бане при температуре 56–58 °С в течение 1 ч с 5–7-кратным повторением через 24 ч. В интервалах между прогреваниями материал выдерживается при комнатной температуре. Тиндализации подвергают питательные среды, бедные микроорганизмами, а также содержащие вещества, легко разрушающиеся и денатурирующие при температуре выше 60 °С (белки, витамины). Это сыворотка крови, яйца и др. В результате тиндализации достигается полное уничтожение микроорганизмов.

Холодная стерилизация

Холодные способы стерилизации включают различные приемы уничтожения микроорганизмов. Называют их холодными условно, чтобы подчеркнуть, что они не основываются на действии высоких температур. При этом нужно помнить, что низкие отрицательные температуры не убивают, а только задерживают рост и развитие микроорганизмов.

К холодной стерилизации относятся:

1. **Химическая стерилизация** – это уничтожение патогенных (болезнетворных) микроорганизмов с помощью химически ядовитых веществ. Метод используют в медицине. К антисептикам, или дезинфицирующим средствам, относятся мыла, красители (зеленка), соли тяжелых металлов, окислители (хлор, йод, перекись водорода, перманганат калия), формалин, формальдегиды, спирты и др.

2. **Физические методы стерилизации:** стерилизация ультрафиолетовыми лучами (УФ) – используют при кварцевании, ультразвуком (УЗ), током ультравысокой частоты (УВЧ) и др. Эти приемы широко используют в медицине.

3. **Стерилизация фильтрованием.** Механическое освобождение от микроорганизмов путем фильтрации различных жидких сред через

фильтры, задерживающие микробы. К таким мелкопористым фильтрам, у которых размеры пор меньше размеров бактерий, относятся фильтры Шамберлана из каолина, пластинчатые асбестовые фильтры Зейтца, мембранные фильтры из нитроцеллюлозы. Их используют для обработки легко портящихся от нагревания жидкостей.

Фильтры Шамберлана называют фильтровальными свечами, потому, что они представляют собой высокие полые цилиндры из высококачественной мелкопористой глины – каолина. В горлышко колбы с носиком вставляют резиновую пробку с отверстием, куда устанавливают свечу. Стерилизуют аппарат в автоклаве. Место соприкосновения свечи и пробки заливают парафином. На носик колбы надевают резиновую трубку и подсоединяют к насосу. Фильтруемую жидкость наливают в свечу. Из колбы насосом выкачивают воздух, поэтому жидкость под давлением фильтруется в колбу. В фильтрате могут быть только вирусы и фаги – ультрамикрорганйзмы, поэтому этим приемом обычно пользуются в вирусологии для отделения вирусов от более крупных микроорганизмов. Свечу после термической обработки можно использовать многократно.

Для работы в стерильных условиях используют прибор ламинар.

Материалы и оборудование: приборы для стерилизации – медицинский стерилизатор (кипятильник), печь Пастера, аппарат Коха, автоклав, фильтровальная свеча в колбе с носиком.

Контрольные вопросы

1. Что такое стерилизация?
2. Назовите методы термической стерилизации, укажите температуру, экспозицию и применение.
3. Какие существуют физические методы стерилизации?
4. Какие химические средства используют для стерилизации?
5. Как в лабораторных условиях отделить споровые формы от неспоровых?
6. Как отделить бактерии от вирусов?

Раздел 4. МИКРОБИОЛОГИЯ ВОЗДУХА И ПОЧВЫ

Работа 15. Количественный учет и определение качественного состава микрофлоры воздуха и почвы методом агаровых пластинок

Анализ микрофлоры воздуха

Воздух – неблагоприятная среда для микроорганизмов. Он не является средой постоянного обитания, а только временного нахождения или переноса микроорганизмов. В воздухе нет питательных веществ, постоянной оптимальной температуры, часто отсутствует влага, губительно действуют на микробы солнечные лучи. Микроорганизмы попадают в воздух главным образом с пылью или каплями жидкости с поверхности почвы, растений, животных, транспорта, водной поверхности.

Микробы в воздухе распространены неравномерно. Количественный и качественный состав микрофлоры воздуха находится в прямой зависимости от микрофлоры почвы, над которой берут пробу воздуха. Количество микроорганизмов зависит от погоды (в дождливую их меньше, чем в сухую), от времени года (летом их больше, чем зимой) и места взятия пробы (над крупными населенными пунктами микробов больше, чем над сельской местностью). Микроорганизмов мало в воздухе над лесами, садами, лугами, озерами, океаном, высоко в горах и на севере.

Микрофлора воздуха характеризуется наличием большого количества шаровидных бактерий (микрочкокков, диплококков, сарцин, стафилококков), устойчивых к недостатку влаги и ультрафиолетовым лучам и образующих разноцветные пигментированные колонии на питательной среде, встречаются также палочковидные формы и плесневые грибы.

За сутки через легкие человека проходит 12–14 тыс. литров воздуха. Воздушным путем распространяются возбудители гриппа, туберкулеза, оспы, пневмонии, коклюша, ангины, катара верхних дыхательных путей и др.

Выполнение работы.

Посев микроорганизмов из воздуха. Наиболее простым способом определения общего количества микроорганизмов в воздухе является метод оседания микробов на агаровую пластинку, предложенный Р. Кохом. Метод заключается в том, что чашку Петри с мясопептонным агаром открывают в исследуемом помещении на 5 мин, после чего закрывают крышкой, оборачивают бумагой, переворачивают вверх дном во избежание размыва колоний конденсационной водой, подписывают и помещают в термостат при 28–30 °С для выращивания микробов, которые оседают на питательную среду вместе с пылью. По количеству выросших колоний можно судить о степени загрязненности воздуха микроорганизмами.

Количественный учет микроорганизмов в воздухе. Р. Кох экспериментально установил, что за 5 мин на поверхность 100 см² оседает

столько микроорганизмов, сколько их содержится в 10 л, или 0,01 м³ воздуха.

Чтобы рассчитать, сколько микробов содержится в 1 м³ воздуха над открытой при посеве чашкой Петри с МПА, необходимо сделать следующее:

1. Через 5–7 дней после посева подсчитывают число выросших в чашке колоний (n). Колония – это потомство одной микробной клетки на питательной среде.

2. узнают площадь чашки Петри, для чего измеряют диаметр внутренней чашки со средой (5 см²) и рассчитывают по формуле:

$$S \text{ чашки Петри} = \pi r^2 = 3,14 \times 5^2 = 78,5 \text{ см}^2.$$

3. определяют число микроорганизмов в 1 м³ воздуха. Зная, сколько микробов выросло на площади 78,5 см², можно пересчитать, сколько их было бы на 100 см², а это, по методике Коха, соответствует их содержанию в 0,01 м³, значит в 1 м³ их должно быть в 100 раз больше. Рассчитывают число микроорганизмов в 1 м³ воздуха (x) по формуле:

$$x = \frac{n \times 10000}{78,5}$$

Таблица 1 – Критерии для санитарной оценки воздуха жилых помещений (число микроорганизмов в 1 м³ воздуха)

Оценка воздуха	Общее число микроорганизмов в 1 м ³ воздуха	
	Летний период	Зимний период
Чистый	до 1500	до 4500
Загрязненный	более 1500	более 4500

Делают вывод о количестве микробов в помещении, где проводился анализ микрофлоры воздуха.

Определение качественного состава микрофлоры воздуха. Под качественным анализом микрофлоры понимается описание культуральных и морфологических признаков микроорганизмов, что служит основой для определения их видовой принадлежности.

Культуральные признаки – это внешний вид колоний при выращивании на различных питательных средах. *Колонией* называют изолированное скопление клеток одного вида, выросших из одной клетки (клон клеток).

К культуральным признакам колонии относятся:

- 1) Размер – крупные (диаметром 4–6 мм и более), средние (2–4 мм), мелкие (1–2 мм) и точечные (не более 1 мм) колонии;
- 2) Цвет – белый, розовый, желтый, оранжевый, красный и др.;

3) Форма;

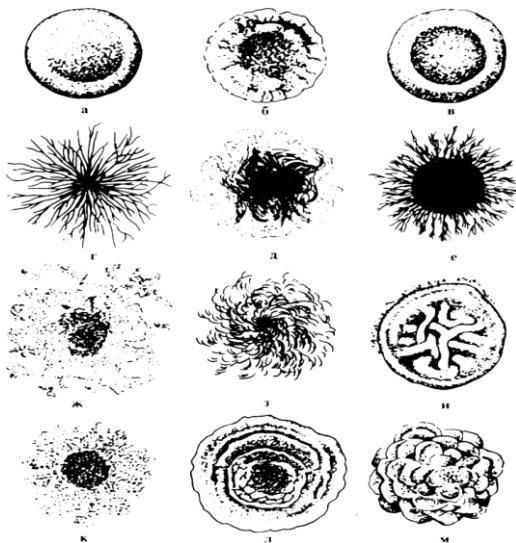


Рисунок 18 – **Формы колоний**

а) круглая; б) круглая с фестончатым краем; в) круглая с валиком по краям; г) ризоидная; д) ветвистая; е) круглая с ризоидным краем; ж) амёбовидная; з) нитевидная; и) складчатая; к) неправильная; л) концентрическая; м) сложная;

- 4) Профиль или рельеф;
- 5) Край;
- 6) Поверхность – блестящая, матовая, морщинистая, гладкая и др.;
- 7) Консистенция – жидкая, вязкая, пастообразная, сухая, плотная и другие (устанавливается прикосновением к поверхности колонии бактериологической петлей).

К морфологическим признакам микробов относятся форма, характер деления и размер клеток, особенности спорообразования и жгутикования, наличие капсулы, включений, окраска по Граму и др.

Для описания морфологических признаков из доминирующих колоний готовят препараты-мазки следующим образом: петлей берут немного микробного материала и тщательно размазывают по стеклу, фиксируют в пламени, окрашивают кристаллвиолетом 30–60 с и рассматривают, пользуясь иммерсионной системой микроскопа.



Рисунок 19 – Рельеф колоний

а) плоский, б) выпуклый, в) каплевидный, г) изогнутый, д) кратероидный, е) конусовидный, ж) бугристый, з) растающий;

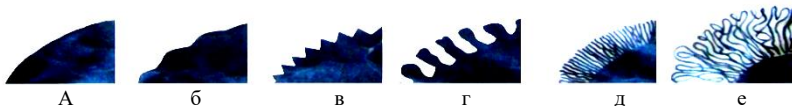


Рисунок 20 – Край колоний

а) ровный, б) волнистый, в) зубчатый, г) лопастной, д) бахромчатый, е) нитчатый (рассматривают, пользуясь лупой или под микроскопом); 7) прозрачность – тусклая, матовая, блестящая, прозрачная, мучнистая;

Отмечают форму клеток, наличие или отсутствие спор, капсул и зарисовывают в тетради. Делают выводы о преобладающих формах микроорганизмов в воздухе.

Анализ микрофлоры почвы

Почва является благоприятной средой для развития микроорганизмов, она обильно населена ими и является основным источником распространения микробов. В почве есть все необходимое для жизнедеятельности микроорганизмов – органические и минеральные вещества, влага, здесь они защищены от губительных ультрафиолетовых лучей солнца. Количество микробов в почве и их видовой состав зависят от различных почвенно-климатических факторов – механического состава почвы, ее влагоемкости, кислотности, вида обработки, времени года и др.

В почве много палочковидных бактерий, актиномицетов, плесневых грибов.

Посев микроорганизмов из почвы. Для определения количества микроорганизмов в 1 г почвы применяют метод питательных агаровых пластинок – поверхностный посев на МПА в чашках Петри, используя предварительное разведение. Из средней пробы исследуемой почвы в день анализа берут навеску 1 г и переносят ее в колбу со 99 мл стерильной воды (рис. 21). Колбу взбалтывают 10 мин и дают 1 мин отстояться, получают разведение 1:100 (в 1 мл воды находится 0,01 г почвы). Готовят четыре пробирки с 9 мл воды в каждой и заранее стерилизуют их в

автоклаве. Из колбы пипеткой набирают 1 мл почвенной суспензии и переносят в пробирку № 1, раствор при этом разбавляется в десять раз (разведение 1:1000). Другой пипеткой продувают полученную смесь для равномерного перемешивания, затем набирают 1 мл и переносят в пробирку № 2, получая при этом десятикратное разведение предыдущего раствора (1:10 000). Новой пипеткой сначала продувают полученный почвенный раствор, а потом набирают 1 мл и переносят в пробирку № 3 (разведение 1: 100 000). Затем, поступая аналогично, переносят 1 мл из пробирки № 3 в пробирку № 4 (разведение 1:1 000 000), а из нее набирают градуированной пипеткой и переносят на поверхность МПА в чашке Петри 0,1 мл (разведение 1:10 000 000). Стерильным

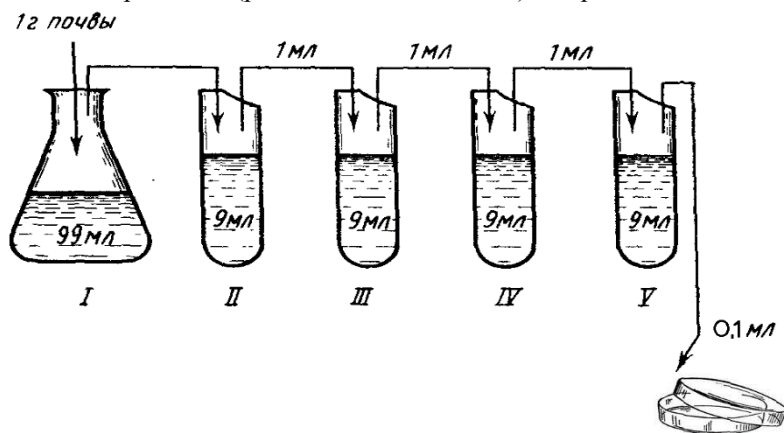


Рисунок 21 – Схема разведения почвы

стеклянным шпателем почвенную суспензию растирают легкими круговыми движениями досуха по поверхности среды, не повреждая ее при этом. Чашки в момент посева только слегка приоткрывают под углом, во избежания посева микробов из воздуха. Посев из каждого разведения желательно проводить хотя бы в две чашки.

Чашки Петри с МПА после посева закрывают, оборачивают бумагой, переворачивают вверх дном, чтобы избежать попадания конденсационной воды на поверхность агара, подписывают и помещают в термостат при температуре 28–30 °С.

Количественный учет микроорганизмов в почве. Через неделю после посева подсчитывают число выросших на среде колоний. Для удобства подсчитанные колонии можно отмечать тушью на наружной

стороне дна чашки. При правильно произведенном посеве число колоний не должно быть более 50–200. Для определения числа микроорганизмов в 1 г почвы нужно умножить число колоний на разведение (на 10 000 000 при посеве из пробирки № 4).

Определение качественного состава микрофлоры почвы. Выбирают наиболее типичные колонии и описывают их культуральные признаки. Готовят из этих колоний препараты-мазки, фиксируют в пламени, окрашивают кристаллвиолетом и рассматривают с помощью иммерсионной системы микроскопа. Описывают и зарисовывают в тетради морфологические признаки почвенных бактерий. Делают выводы о преобладающих в почве формах микроорганизмов.

Выделение чистых культур микроорганизмов

Чистой культурой называют культуру микроорганизма, полученную из одной клетки или отдельной колонии. Для выделения чистой культуры выбирают изолированную колонию и пересеивают ее штрихом на косой МПА в пробирки и культивируют в термостате.

Определение вида микроорганизма

Конечная цель микробиологического исследования – определение вида выделенного микроорганизма. Для того, чтобы это сделать, необходимо знать следующие признаки:

1) Культуральные признаки колонии (только по внешнему виду колоний на МПА можно легко идентифицировать некоторые микроорганизмы, например, *Bacillus mycoides* образует ветвистые стелющиеся по мясопептонному агару колонии, напоминающие мицелий гриба);

2) морфологические признаки микроорганизмов (по культуральным и морфологическим признакам, часто можно определить лишь род микробов);

3) биохимические признаки – отношение к различным источникам питательных веществ – углеводам, белкам, жирам и др. (для этого чистую культуру пересеивают на «пестрый ряд» различных сред с индикаторами);

4) физиологические признаки – отношение к кислороду, температуре и кислотности среды.

Используя полученную информацию и пользуясь определителем для бактерий, устанавливают род и вид выделенного в чистой культуре микроорганизма.

Материалы и оборудование: чашки Петри со стерильным мясопептонным агаром, колбы с 99 мл стерильной воды, зараженные 1 г почвы, пробирки с 9 мл воды, простерилизованные в автоклаве (по 4 штуки на

стол), стерильные пипетки на 1 мл и шпатели, бумага для обертывания чашек, кристаллвиолет.

Контрольные вопросы

1. Почему почва является благоприятной средой для обитания микроорганизмов, а воздух нет?
2. Как проводят посев микроорганизмов из воздуха?
3. Назовите культуральные признаки колонии.
4. Как можно определить количественный состав микрофлоры почвы?

Работа 16. Прямой метод подсчета числа микроорганизмов в почве по Виноградскому

Метод прямого микроскопического учета количества почвенных микробов, предложенный С.Н. Виноградским, выгодно отличается от других методов быстротой анализа и позволяет сделать подсчет бактерий без приготовления питательных сред и длительного выращивания на них микроорганизмов. При этом учитываются как живые, так и мертвые микробные клетки. В основе метода лежит использование карболового эритрозина, который окрашивает клетки микробов в розовый цвет, но не окрашивает минеральные почвенные частицы и органическое вещество почвы.

Выполнение работы. 1. 10 г почвы вносят колбу со 100 мл стерильной воды, взбалтывают 5 мин и дают отстояться 30 с.

2. Из жидкой части болтушки стерильной микропипеткой набирают почвенную суспензию.

3. По чистому и хорошо обезжиренному стеклу равномерно распределяют 0,01 мл на площади 4 см². Для этого подкладывают под стекло миллиметровую бумагу с очерченным прямоугольником размером 1×4 см.

4. Полученный мазок высушивают на воздухе.

5. Наносят на мазок 1–2 капли полужидкого агара, равномерно распределяют и дают агару подсохнуть.

6. Мазок фиксируют спиртом – покрывают несколькими каплями спирта и ожидают его полного улетучивания.

7. Окрашивают препарат карболовым эритразином от 30 мин до 24 ч, после чего краску сливают.

8. Препарат очень осторожно промывают тонкой струйкой воды.

9. Просушивают на воздухе, можно аккуратно промокнуть фильтровальной бумагой.

10. Пользуясь иммерсионной системой микроскопа, подсчитывают число клеток в 10–100 полях зрения. Определяют среднее число клеток, приходящееся на одно поле зрения.

Расчет числа микроорганизмов в 1 г почвы. Обозначим среднее число микроорганизмов в одном поле зрения через a . Известно, что в 4 см^2 содержится 25 000 полей зрения. Следовательно, на площади 4 см^2 число микробов составляет $25\,000 \times a$ штук. На этой площади распределяется сотая миллилитра (0,01 мл). Десять граммов почвы находится в ста миллилитрах воды, следовательно, 1 г почвы – в 10 мл. Чтобы узнать сколько микроорганизмов содержится в 1 г почвы, надо найти, сколько их в 10 мл. В 0,01 мл – $25\,000 \times a$ микробов, значит в 10 мл их в 1 000 раз больше.

Таким образом, число микроорганизмов в 1 г почвы (x) рассчитывают по формуле:

$$x = 25\,000\,000 \times a,$$

где a – среднее число микробных клеток в одном поле зрения, шт.

Готовят препарат, просматривают его в микроскоп, подсчитывают число микробов хотя бы в 10 полях зрения. Строят в тетради таблицу и заносят в нее свои данные, выводят среднее число микроорганизмов в одном поле зрения, а затем рассчитывают по формуле, сколько микробов содержится в 1 г анализируемой почвы.

Материалы и оборудование: колбы со 100 мл воды, простерилизованные в автоклаве, в которые вносят 10 г почвы, полоски миллиметровой бумаги с очерченным прямоугольником размером $1 \times 4 \text{ см}$, стерильные микропипетки на 0,1 мл, баночки с 96°-ным спиртом, полужидким агаром (1:1 000), карболовым эритрозином.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается преимущество прямого метода подсчета числа микроорганизмов по Виноградскому над другими методами?
2. Как готовится препарат-мазок для подсчета числа микроорганизмов по Виноградскому?

Приготовление красителей и индикаторов

Кристалливиолет (метилловый фиолетовый), **водный раствор**: метилловый фиолетовый кристаллический – 7 г, этиловый спирт 96°-ный – 100 мл, вода дистиллированная – 900 мл. Раствор устойчив.

Фукусин основной, насыщенный спиртовой раствор: фукусин основной кристаллический – 10 г, этиловый спирт 96°-ный – 100 мл. Раствор может храниться долгое время в бутылке из темного стекла.

Фукусин основной карболовый – фукусин Циля: фукусин основной кристаллический – 1 г, карболовая кислота (фенол) – 5 г, этиловый спирт 96°-ный – 10 мл, вода дистиллированная – 100 мл. К спиртовому раствору основного фукусина приливают 5%-ный раствор фенола (воду для его приготовления подогревают до 50°С), добавляют несколько капель глицерина. Настаивают в термостате 48 ч и фильтруют через бумажный фильтр. Раствор устойчив. Хранят в закупоренной таре.

Фукусин Пфейффера: карболовый фукусин Циля – 1мл, вода дистиллированная – 9 мл. Готовят на срок не более 10 дней.

Фукусин основной, водный раствор: фукусин основной, насыщенный спиртовой раствор – 1 мл, вода дистиллированная – 9мл. Раствор устойчив.

Метиленовый синий, насыщенный спиртовой раствор: метиленовый синий кристаллический – 10 г, этиловый спирт 96°-ный – 100 мл. Оставляют на 2–3 дня в термостате, периодически встряхивая, а затем фильтруют. Раствор устойчив.

Метиленовый синий, водный раствор: насыщенный спиртовой раствор метиленового синего – 1 мл, вода дистиллированная – 9 мл. Раствор устойчив.

Уксуснокислый синий Нейссера: готовят два раствора.

1. Метиленовый синий кристаллический – 0,1 г, этиловый спирт 96°-ный – 2 мл, уксусная кислота ледяная – 5 мл, вода дистиллированная – 100 мл.

2. Метиловый фиолетовый кристаллический – 0,1 г, этиловый спирт 96°-ный – 1 мл, вода дистиллированная – 30 мл. Перед употреблением смешивают две части первого раствора с одной частью второго. Раствор неустойчив.

Раствор хризоидина: хризоидин кристаллический – 1,0 г, вода дистиллированная горячая – 300 мл. Горячий раствор фильтруют через бумажный фильтр, после охлаждения готов к употреблению.

Эритрозин карболовый: эритрозин кристаллический – 3 г, фенол (карболовая кислота) – 5 г, вода дистиллированная – 100 мл. Карболовую кислоту растворяют в воде, нагретой до 50 °С, добавляют эритрозин, отстаивают и фильтруют через бумажный складчатый фильтр.

Раствор Люголя (для окраски по Граму): йод кристаллический – 1 г, калий йодистый – 2 г, вода дистиллированная – 300 мл. Навеску йода и йодистого калия растирают в ступке пестиком, доливают 1 мл воды и растирают, добавляют еще 5 мл воды, продолжая растирать. Когда кристаллы растворятся, доливают всю оставшуюся порцию воды. Хранят в темной посуде. Срок годности не более 30 дней.

Раствор Люголя (крепкий, для выявления гранулезы): йод кристаллический – 7 г, калий йодистый – 20 г, вода дистиллированная – 100 мл. Раствор готовят так же, как и предыдущий.

Бумажки Синева: нарезают кусочки фильтровальной бумаги размером 2×3 см; готовят 0,5%-ный спиртовой раствор кристаллвиолета; пропитывают бумажки 2–3 раза в этом растворе, высушивают; хранят защищенными от действия света.

Реактив Несслера: KJ – 7 г, HgJ₂ – 10 г, KOH – 10 г. Готовят два раствора. 1. Навески KJ и HgJ₂ растворяют в 40 мл дистиллированной воды. 2. Навеску KOH растворяют в 40 мл дистиллированной воды. Растворы 1 и 2 смешивают и доводят общий объем до 100 мл. Хранят в темной стеклянной посуде. В продаже имеется готовый реактив Несслера.

Цинк-йод-крахмал: 2 г хлористого цинка (ZnCl₂) растворяют в 100 мл дистиллированной воды, нагревают до кипения и приливают растворенный крахмал (0,4 г крахмала в 10 мл воды). Объем смеси доводят водой до 100 мл, кипятят до тех пор, пока она не станет прозрачной, охлаждают (можно настаивать неделю) и добавляют 100 мл 0,2 %-ного раствора йодистого калия (0,2 г KJ в 100 мл воды) или йодистого цинка.

Дифениламин: 1 г дифениламина (C₆H₅-NH-C₆H₅) растворяют в 100 мл крепкой серной кислоты и полученный раствор приливают к 20 мл дистиллированной воды.

Уксуснокислый свинец: 10 г уксуснокислого свинца Pb (CH₃COO)₂ растворяют в 100 мл воды и приливают 10%-ный раствор NaOH (10 г щелочи на 100 мл воды) до исчезновения осадка.

Приготовление Судана III. 0,1 г Судана III растворяют в 200 мл 96%-ного спирта или концентрированной молочной кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. А в р а м е н к о И. Ф. Микробиология. / И. Ф. Авраменко. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1979. – 176 с.
2. А с о н о в Н.Р. Практикум по микробиологии. / Н. Р.Асонов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1988. – 160 с.
3. Большой практикум по микробиологии. / Т. В. Аристовская [и др.] – М.: Высш. шк., 1962. – 490 с.
4. Е ж о в Г. И. Руководство к практическим занятиям по сельскохозяйственной микробиологии. / Г. И. Ежов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1981. – 271 с.
5. Е м ц е в, В. Т. Микробиология / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Дрофа, 2005. – 445 с.
6. К о л е ш к о О. И. Экология микроорганизмов почвы. / О. И. Колешко. – Мн.: Высш. шк., 1981. – 176 с.
7. К о ч е м а с о в а, З. Н. Санитарная микробиология и вирусология / З. Н. Кочемасова, С. А. Ефремова, А. М. Рыбакова. – М.: Медицина, 1987. – 352 с.
8. М и ш у с т и н, Е. Н. Микробиология / Е. Н. Мишустин, В. Т. Емцев. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1987. – 367 с.
9. Р а з у м о в с к а я З. Г. Лабораторные занятия по почвенной микробиологии. / З. Г. Разумовская, Т. Я. Чижик, Б. В. Громов. – Л.: ЛГУ, 1960. – 184 с.
10. Руководство к практическим занятиям по микробиологии /под ред. Н. С. Егорова. – М.: МГУ, 1995. – 224 с.
11. Сельскохозяйственная микробиология: метод. указания к лабораторным занятиям / сост. О. С. Кильчевская. – Горки: БГСХА, 2006. – 68 с.
12. Т е п е р, Е. З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М.: Колос, 1993. – 175 с.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ....	4
УСТРОЙСТВО СВЕТОВОГО МИКРОСКОПА «МИКРОМЕД - 1».....	5
ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ФИКСИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ И МИКРОСКОПИРОВАНИЯ.....	7
Раздел 1. МОРФОЛОГИЯ И СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ... 9	9
Работа 1. Основные формы бактерий.....	9
Работа 2. Окраска по Граму.....	12
Работа 3. Окраска капсул методом негативного контрастирования (по Гинсу).....	13
Работа 4. Окраска спор у бактерий (по методу Циля-Нильсена).....	15
Работа 5. Окраска волутина (по методу Нейссера).....	18
Работа 6. Исследование актиномицетов.....	19
Работа 7. Исследование микроорганизмов в живом виде.....	21
Раздел 2. ПИТАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	24
Работа 8. Питательные среды для микроорганизмов.....	24
Раздел 3. МИКРОБЫ И ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА.....	27
Работа 9. Стерилизация.....	27
Раздел 4. МИКРОБИОЛОГИЯ ВОЗДУХА И ПОЧВЫ.....	32
Работа 10. Количественный учет и определение качественного состава микрофлоры воздуха и почвы методом агаровых пластинок.....	32
Работа 11. Прямой метод подсчета числа микроорганизмов в почве по Ви- ноградскому.....	38
ПРИЛОЖЕНИЕ. Приготовление красителей и индикаторов.....	84
ЛИТЕРАТУРА.....	86

Учебное издание

Цыркунова Ольга Александровна
Горновский Андрей Анатольевич
Порхунцова Ольга Анатольевна

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Методические указания по изучению дисциплины

Редактор
Технический редактор
Корректор

Подписано в печать . Формат 60×84¹/₁₆. Бумага офсетная.
Ризография. Гарнитура «Таймс». Усл. печ. л. . Уч.-изд. л. .
Тираж 75 экз. Заказ .

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».
ЛИ № 02330/0548504 от 16.06.2009.
Ул. Студенческая, 2, 213407, г. Горки.

Отпечатано в УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».
Ул. Мичурина, 5, 213407, г. Горки.